



ROZPRAWA DOKTORSKA

**Opracowanie nowej linii dermokosmetyków naturalnych
i biodegradowalnych, zgodnych z zasadami
zrównoważonego rozwoju oraz wymaganiami Ecocert/ COSMOS,
przyjaznych środowisku i skórze**

*Development of a new line of environmentally and skin-friendly,
natural and biodegradable dermocosmetic products
compliant with the principles of sustainable development
and Ecocert/COSMOS requirements*

mgr Monika Krzyżostan

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

Promotor: prof. dr hab. Izabela Nowak
Promotor pomocniczy: dr Sylwia Jarmolińska

**Opiekun naukowy ze strony firmy dr Koziej Sp. z o.o. Sp.k., w której realizowany był
doktorat wdrożeniowy:** dr n. farm. Piotr Koziej w latach 2020-2024
oraz mgr Justyna Koziej – XI-XII.2024

Poznań 2024

Niniejsza rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach programu
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Doktorat wdrożeniowy”
we współpracy z firmą dr Koziej Sp. z o.o. Sp.k.

Prof. dr hab. Izabeli Nowak

Bardzo dziękuję za nieocenioną opiekę merytoryczną,
motywację oraz zaufanie, którym mnie Pani obdarzyła.

Dr Sylwii Chalupniczak (Jarmolińskiej)

Bardzo dziękuję za nieocenioną pomoc,
dzielenie się wiedzą, zaangażowanie oraz wyrozumiałość.

Dr Agacie Wawrzyńczak

Bardzo dziękuję za zaangażowanie i ogromne wsparcie,
dzielenie się wiedzą, wyrozumiałość
oraz pomoc na każdym etapie powstawania tej pracy.

Dużo nauczyłam się dzięki Pani,
a praca w przyjaznej atmosferze
sprzyjała kreatywności.

Justynie Koziej

Bardzo dziękuję za zaufanie, otwartość
oraz umożliwienie łączenia pracy zawodowej
ze studiami doktoranckimi.

Rodzinie i przyjaciołom

Bardzo dziękuję za nieustanne wsparcie, wyrozumiałość,
siłę i motywację, którą mogłam od Was czerpać.

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	16
ŻYCIORYS NAUKOWY	18
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	19
DODATKOWE PUBLIKACJE W CZASOPISMACH BRANŻOWYCH	19
KONFERENCJE NAUKOWE	20
ABSTRAKT W JĘZYKU POLSKIM	22
ABSTRAKT W JĘZYKU ANGIELSKIM	24
STRESZCZENIE PRACY	26
I. WSTĘP	31
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA	34
1. Zrównoważony rozwój w przemyśle kosmetycznym [D1]	34
1.1. Europejski Zielony Ład	36
1.2. Standardy COSMOS	38
1.2.1. Kryteria dla surowców naturalnych i organicznych	39
1.2.2. Składniki niedozwolone	40
1.2.3. Kryteria dla procesów przetwarzania surowców	41
1.2.4. Poziomy certyfikacji kosmetyków	41
1.3. Zrównoważone surowce użyte do przygotowania dermokosmetyków [D3, D5]	42
1.3.1. Surowce z upcyklingu	50
1.3.2. Surowce otrzymane w procesie fermentacji	51
2. Atopowe zapalenie skóry (AZS)	52
2.1. Patogeneza atopowego zapalenia skóry	53
2.1.1. Zaburzenia immunologiczne	54
2.1.2. Dysfunkcja bariery naskórkowej	55
2.1.3. Zaburzenia w składzie mikrobiomu skóry	58
2.2. Pielęgnacja skóry z AZS	59
2.2.1. Rola emolientów	59
2.2.2. Łagodne mycie skóry	60
3. Wąkrota azjatycka [D2]	61
3.1. Madekasozyd i azjatykozyd- główne saponiny triterpenowe [D2]	62
3.2. Wąkrota azjatycka we wspomaganiu leczenia AZS	63
3.3. Charakterystyka surowców otrzymanych z wąkroty azjatyckiej zastosowanych w recepturach dermokosmetyków	65
3.3.1. Ekstrakt z liści wąkroty azjatyckiej	65
3.3.2. Bioferment z liści wąkroty azjatyckiej	66
III. CEL PRACY	68

IV. CZĘŚĆ BADAWCZA.....	71
4. Opracowanie metodyki oznaczania zawartości madekasozydu i azjatykozydu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [D3].....	71
4.1. Wykorzystane odczynniki.....	72
4.2. Dobór warunków analizy HPLC	72
4.3. Walidacja metody HPLC [D3].....	72
4.4. Przygotowanie krzywych kalibracyjnych.....	73
4.5. Obliczenie zawartości madekasozydu i azjatykozydu w analizowanych próbkach	74
4.6. Przygotowanie próbek do analizy.....	74
5. Oznaczenie madekasozydu i azjatykozydu w surowcach otrzymanych z liści wąkroty azjatyckiej metodą HPLC.....	75
6. Podłoża kosmetyczne (nośniki) [D3]	76
6.1. Preparatyka różnego rodzaju podłoży kosmetycznych (nośników) [D3].....	77
6.1.1. Preparatyka emulsji typu w/o	77
6.1.2. Preparatyka emulsji typu o/w	79
6.1.3. Preparatyka żelu	80
6.2. Badanie parametrów fizykochemicznych podłoży kosmetycznych (nośników) [D3]	80
6.2.1. Oznaczenie pH.....	80
6.2.2. Oznaczenie lepkości	81
6.2.3. Oznaczenie gęstości.....	82
6.3. Badania stabilności.....	82
6.3.1. Badanie stabilności podłoży kosmetycznych (nośników)	83
6.3.2. Badanie stabilności madekasozydu i azjatykozydu w otrzymanych podłożach kosmetycznych	87
6.4. Badanie kontrolowanego uwalniania madekasozydu i azjatykozydu z przygotowanych podłoży kosmetycznych (nośników)	88
6.4.1. Profile uwalniania madekasozydu i azjatykozydu.....	90
6.4.2. Dopasowanie modeli kinetycznych do profilu uwalniania madekasozydu i azjatykozydu	92
7. Produkty dermokosmetyczne przeznaczone do pielęgnacji skóry z AZS [D4- D5]	94
7.1. Preparatyka formułacji dermokosmetyków pielęgnacyjnych [D4]	94
7.1.1. Balsam do ciała (emulsja typu w/o).....	95
7.1.2. Krem do rąk (emulsja typu w/o).....	95
7.1.3. Krem do twarzy (emulsja typu o/w)	97
7.2. Badanie in vivo skuteczności działania dermokosmetyków pielęgnacyjnych [D4- D5].....	97
7.2.1. Charakterystyka grupy badanej oraz przebieg badań	98
7.2.2. Badanie poziomu przeznaskórkowej utraty wody (TEWL) [D4].....	99
7.2.3. Badanie poziomu nawilżenia naskórka [D5]	100
7.2.4. Badanie parametrów topografii skóry [D5].....	102

8. Badania produktów dermokosmetycznych stanowiące istotną część wdrożeniową pracy .	106
8.1. Badania in vivo dla dermokosmetyków pielęgnacyjnych (ciąg dalszy).....	106
8.1.1. Badanie pH powierzchni skóry	106
8.1.2. Badanie rumienia (erythema)	109
8.1.3. Ocena mikrobiomu skóry	110
8.2. Badania in vivo dla dermokosmetyków myjących.....	114
8.2.1. Preparatyka emulsji do mycia ciała.....	115
8.2.2. Preparatyka olejku do demakijażu	117
8.2.3. Opis grupy badanej i przebiegu badań in vivo	118
8.2.4. Badanie poziomu przeznaskórkowej utraty wody (TEWL).....	118
8.2.5. Badanie poziomu nawilżenia naskórka	119
8.2.6. Badanie pH powierzchni skóry	120
8.2.7. Badanie rumienia (erythema)	121
8.3. Badania niezbędne do wdrożenia dermokosmetyków zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009	122
V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	123
VI. LITERATURA	125
OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI.....	136
PRZEDRUK PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE.....	151

WYKAZ SKRÓTÓW

SKRÓT	ROZWINIĘCIE SKRÓTU
A	Azjatykozyd
AZS	Atopowe zapalenie skóry
CFU	Jednostki tworzące kolonie
CITES	Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora; Konwencja o międzynarodowym handlu dzikimi zwierzętami i roślinami gatunków zagrożonych wyginięciem
COSMOS	Cosmetic Organic Standard; Standardy dla kosmetyków organicznych
COX	Cyklooksygenaza
CPAI	Chemically Processed Agro-Ingredients; Składniki przetworzone w procesach chemicznych
CSR	Corporate Social Responsibility; Społeczna odpowiedzialność biznesu
D4	Cyklotetrasiloksan
D5	Cyklopentasiloksan
D6	Cykloheksasiloksan
DfS	Design for Sustainability; Projektowanie dla zrównoważonego rozwoju
DNCB	2,4-dinitrochlorobenzen
ECHA	Europejska Agencja do Spraw Chemikaliów
ELS	Electrophoretic Light Scattering; Elektroforetyczne rozpraszanie światła
Emulsja o/w	Emulsja typu olej w wodzie
Emulsja w/o	Emulsja typu woda w oleju
HPLC	High-performance Liquid Chromatography; Wysokosprawna chromatografia cieczowa
IL	Interleukina
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients; Międzynarodowe nazewnictwo składników kosmetyków
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase; Syntaza tlenku azotu
LD	Laser diffraction; dyfrakcja laserowa
M	Madekasozyd
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
NMF	Natural Moisturizing Factor; Naturalny czynnik nawilżający
p.p.	Punkty procentowe
PBT	Substancje trwałe, ulegające bioakumulacji i toksyczne dla środowiska

PMT	Substancje trwałe, mobilne, toksyczne dla środowiska
PPAI	Physically Processed Agro-Ingredients; Składniki przetworzone w procesach fizycznych
ROS	Reactive Oxygen Species; Reaktywne formy tlenu
RSPO	The Roundtable on Sustainable Palm Oil; Stowarzyszenie na rzecz zrównoważonego przetwórstwa oleju palmowego
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety; Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów
SCORAD	SCORing AtopicDermatitis; System punktacji oceniający stopień nasilenia AZS
SMLS	Static Multiple Light Scattering; Statyczne wielokrotne rozpraszanie światła
SVHC	Substances of Very High Concern
TECA	Titred Extract of Centella Asiatica; Miareczkowany ekstrakt z wąkroty azjatyckiej
TEWL	Transepidermal Water Loss; Przeznaskórkowa utrata wody
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α ; Czynn timer martwicy nowotworów
vPvB	Substancje bardzo trwałe i wykazujące bardzo dużą zdolność do bioakumulacji

ŻYCIORYS NAUKOWY

W lipcu 2009 roku ukończyłam studia licencjackie z kosmetologii na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, broniąc pracę pt. „Wpływ promieniowania ultrafioletowego na wywoływanie i przebieg chorób skóry”, wykonaną w Katedrze i Klinice Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Promotorem pracy badawczej była prof. dr hab. Magdalena Czarnecka-Operacz.

W październiku 2009 roku rozpoczęłam studia magisterskie z Chemii Kosmetycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. W maju 2011 roku uzyskałam tytuł magistra broniąc pracę pt. „Badanie uwalniania wybranych składników aktywnych z różnych formułacji kosmetycznych oraz ocena skuteczności działania kwasu hialuronowego w testach aplikacyjnych” pod kierunkiem prof. dr hab. Izabeli Nowak. Po ukończeniu studiów rozpoczęłam pracę na stanowisku technologa w laboratorium badawczo- rozwojowym firmy farmaceutycznej Polfarmex, opracowując receptury dermokosmetyków. Przez 9 kolejnych lat byłam zawodowo związana z sektorem badawczo-rozwojowym przemysłu kosmetycznego. Zdobywałam doświadczenie pracując na stanowisku technologa w laboratoriach badawczo- rozwojowych firm kosmetycznych ukierunkowanych na produkcję dermokosmetyków oraz kosmetyków naturalnych, takich jak Laboratorium Kosmetyczne AVA oraz Laboratorium Kosmetyczne dr Irena Eris. Opracowałam ponad 500 receptur kosmetyków pielęgnacyjnych (emulsji typu woda w oleju i olej w wodzie, emulsji wielokrotnych, hydrożeli, oleożeli) oraz myjących (żele pod prysznic, szampony, płyny micelarne) zakończonych wdrożeniem produktów kosmetycznych na rynek. Stworzyłam również od podstaw laboratorium kosmetyczne biorąc udział w start’upie dotyczącym opracowania receptur kosmetyków spersonalizowanych oraz ich produkcji. Obecnie pracuję jako kierownik laboratorium badawczo-rozwojowego w Instytucie Badań Kosmetyków Dr Koziej, zarządzając projektami badawczo-wdrożeniowymi realizowanymi na zlecenie firm z sektora kosmetycznego. Podczas swojej pracy zawodowej byłam prelegentką na licznych sympozjach i konferencjach branżowych, m.in. Jesiennym Sympozjum Przemysłu Farmaceutycznego i Kosmetycznego, Międzynarodowej Konferencji Naukowo-Technicznej Przemysłu Kosmetycznego, Konferencji HPCI, Konferencji Beauty Innovations oraz Beauty Forum. Ponadto, jestem autorką licznych publikacji w czasopismach branżowych, takich jak: Dermatologia Estetyczna, Świat Przemysłu Kosmetycznego, Chemia i Biznes, Cosmetic Reporter, Przemysł Farmaceutyczny, a także na portalu Biotechnologia.pl.

W 2020 roku rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Chemii UAM, w Zakładzie Chemii Stosowanej, realizując program Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Doktorat wdrożeniowy” we współpracy z firmą dr Koziej Sp. z o.o. Sp.k. Jestem autorką pięciu publikacji z listy czasopism punktowanych przez MNISW oraz trzynastu wystąpień na konferencjach krajowych oraz międzynarodowych.

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

PRACE PRZEGLĄDOWE

- D1** Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Use of Waste from the Food Industry and Applications of the Fermentation Process to Create Sustainable Cosmetic Products: A Review**, Sustainability 2024, 16, 2757; <https://doi.org/10.3390/su16072757> (IF=3.3, punkty MNiSW=100)
- D2** Monika Krzyżostan, Izabela Nowak, **Saponiny triterpenowe pochodzące z *Centella asiatica* L.**, Przemysł Chemiczny 2024, 103/4; <https://doi.org/10.15199/62.2024.4.3> (IF=0.464, punkty MNiSW=70).

PRACE EKSPERYMENTALNE

- D3** Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Controlled release of madecassoside and asiaticoside of *Centella asiatica* L. origin from sustainable cold-processed topical formulations**, Molecules 2024, 29, 23, 5583; <https://doi.org/10.3390/molecules29235583> (IF=4.2, punkty MNiSW=140)
- D4** Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Wpływ kosmetyków zawierających ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej na wybrane parametry bariery naskórkowej u chorych na atopowe zapalenie skóry**, Chemik 2024, 3, 73, 185-189. <https://doi.org/10.15199/4.2024.3.5> (punkty MNiSW=20).
- D5** Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract**, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 2025 (IF=8,5 punkty MNiSW=140) - wysłane do wydawnictwa.

DODATKOWE PUBLIKACJE W CZASOPISMACH BRANŻOWYCH

1. Monika Krzyżostan, **Bez mikroplastików - aktualny przegląd legislacji**, Chemia i Biznes 2020, 3, 49-51.
2. Monika Krzyżostan, **Trendy anti-aging w 2021 roku**, Chemia i Biznes 2021, 1, 169-170.

3. Monika Krzyżostan, **Trendy w pielęgnacji ciała w 2021 roku**, Chemia i Biznes 2021, 2, 90-92.
4. Monika Krzyżostan, **Mikroplastiki w kosmetykach - update legislacyjny**, Świat Przemysłu Kosmetycznego 2021, 1, 99-100.
5. Monika Krzyżostan, **Kosmetyk bezpieczny, czy niebezpieczny?**, Świat Przemysłu Kosmetycznego 2021, 4, 74-78.
6. Monika Krzyżostan, **Ochrona skóry przed promieniowaniem UV**, Chemia i Biznes 2022, 2, 41-45.
7. Monika Krzyżostan, **Zrównoważony produkt kosmetyczny**, Świat Przemysłu Kosmetycznego 2022, 3, 114-117.

KONFERENCJE NAUKOWE

KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE - WYSTĄPIENIA USTNE

1. Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Stability of modern and sustainable cold-processed cosmetic emulsions and gel containing fermented extract from *Centella asiatica* L.**, 10th Polish-Kazakh Meeting. Relationship between chemistry and biology, Department of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, 26.06.2024, Poznań.

KONFERENCJE KRAJOWE - WYSTĄPIENIA USTNE

2. Monika Krzyżostan, Izabela Nowak, Sylwia Chałupniczak, **Opracowanie metodyki analizy wybranych saponin triterpenowych w ekstraktach z wąkroty azjatyckiej**, Konferencja Naturalne Surowce Lecznicze i Kosmetyczne, Wydział Biologii Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, 15-16.11.2023, Lublin.
3. Monika Krzyżostan, **Uwalnianie substancji aktywnych z kosmetyków- jak wpływa na przenikanie w głąb skóry?**, Panel dyskusyjny: **W głąb skóry – innowacyjne technologie i receptury wspomagające penetrację składników aktywnych**, Kongres Beauty Forum, 15-17 maja 2021, Warszawa.
4. Monika Krzyżostan, **Zrównoważony rozwój w projektowaniu produktów kosmetycznych**, 11. Kongres Świata Przemysłu Kosmetycznego, 16-17 listopada 2021, Warszawa.
5. Monika Krzyżostan, Panel dyskusyjny: **Peelingi chemiczne o wielokierunkowym działaniu w terapii skór problematycznych** - Moderator, Kongres Beauty Forum, 23-24 kwietnia 2022, Nadarzyn k. Warszawy.

KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE - POSTERY

6. Monika Krzyżostan, Sylwia Jarmolińska, Izabela Nowak, **Development of Ecocert/COSMOS certified natural dermocosmetics**, 6th Polish-Kazakh Meeting. Relationship between chemistry and biology, Department of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, 23.11.2020, Poznań.
7. Monika Krzyżostan, Izabela Nowak, Sylwia Jarmolińska, **Centella asiatica L. as a source of effective active ingredients for dermocosmetics**, 7th Polish- Kazakh Meeting. Relationship between chemistry and biology, Department of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, 6.07.2021, Poznań.
8. Monika Krzyżostan, Izabela Nowak, Sylwia Jarmolińska, **Centella asiatica extract for the treatment of atopic dermatitis, COMPASS: the future of interdisciplinary science**, Department of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznań 22-24.09.2021, Poznań.
9. Monika Krzyżostan, Sylwia Chałupniczak, Izabela Nowak, **Determination of madecassoside and asiaticoside of Centella asiatica L. extracts and Centella asiatica-containing dermocosmetics by using HPLC method**, 8th Polish-Kazakh Meeting. Relationship between chemistry and biology, Department of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, 7.07.2022, Poznań.
10. Monika Krzyżostan, Sylwia Chałupniczak, Izabela Nowak, **The effects of a standardized extract of Centella asiatica (L.) on atopic dermatitis on the body in human adults**, 9th Polish-Kazakh Meeting. Relationship between chemistry and biology, Department of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, 27.06.2023, Poznań.

KONFERENCJE KRAJOWE - POSTERY

11. Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Stabilność zrównoważonych produktów kosmetycznych wytwarzanych w procesach na zimno**, Ogólnopolska Konferencja Naukowa Zrównoważony rozwój w obszarze kosmetyków i detergentów, Sieć Badawcza Łukasiewicz- Instytut Ciężkiej Syntezy Organicznej „Błachownia”, 12.04.2024, Kędzierzyn-Koźle.
12. Agata Wawrzyńczak, Monika Krzyżostan, Bartosz Woźniak, Izabela Nowak, **Badania fizykochemiczne produktów kosmetycznych i chemii gospodarczej otrzymywanych zgodnie z zasadami zrównoważonego rozwoju**, 66. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, PTChem 2024, 15-20 września 2024, Poznań.
13. Ida Dulińska-Molak, Monika Krzyżostan, Agnieszka Chojnacka, Marta Binkiewicz-Krawczyk, Katarzyna Seremak, Justyna Koziej, **Wegański produkt kosmetyczny o działaniu slow- aging opracowany zgodnie z Zieloną Chemią**, Konferencja HPCI CEE 2021, Naukowa sesja posterowa pt. „Innowacyjne rozwiązania technologiczne; systemy, metody, aparatura w produkcji surowców, kosmetyków i przemyśle kosmetycznym”, 22-23.09.2021, Warszawa.

ABSTRAKT W JĘZYKU POLSKIM

Zaproponowane przez Komisję Europejską polityki Zielonego Ładu, takie jak gospodarka zeroemisyjna oraz w obiegu zamkniętym, spowodowały wzrost zapotrzebowania na tworzenie zrównoważonych produktów kosmetycznych, których cykl życia w znacznie zredukowanym stopniu oddziałuje na środowisko. Na założenia Zielonego Ładu w dużej mierze odpowiadają standardy COSMOS dla kosmetyków naturalnych i organicznych, stanowiące całościowe, kompleksowe spojrzenie na proces wytwarzania kosmetyku. Jednocześnie brakuje na rynku specjalistycznych dermokosmetyków przeznaczonych do pielęgnacji skóry atopowej, zawierających składniki aktywne pochodzenia naturalnego o działaniu potwierdzonym badaniami naukowymi, stworzonych w duchu zrównoważonego rozwoju. Ze względu na opisany w literaturze wielokierunkowy mechanizm działania saponin triterpenowych zawartych w wąkrocie azjatyckiej (*Centella asiatica* L.), roślina ta może wykazywać duży potencjał w hamowaniu procesów zapalnych zachodzących w skórze osób chorych na atopowe zapalenie skóry (AZS), co zostało już potwierdzone w badaniach *in vivo* na modelach mysich. Ponadto, proces fermentacji rośliny pozwala na otrzymanie surowca o działaniu postbiotycznym, który może wspomagać przywrócenie równowagi mikrobiomu skóry atopowej.

Głównym celem prowadzonych badań było opracowanie zoptymalizowanej technologii wytwarzania pięciu naturalnych produktów dermokosmetycznych zgodnych ze standardami COSMOS, opartych na działaniu emolientów oraz ekstraktu i biofermentu otrzymanych z liści wąkroty azjatyckiej, przeznaczonych do pielęgnacji skóry atopowej, a także potwierdzenie skuteczności ich działania w testach *in vivo*. Trzy spośród pięciu opracowanych produktów były przedmiotem przedłożonej pracy doktorskiej.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie cyklu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych z listy MNiSW. W artykule przeglądowym D1 opisano założenia Zielonego Ładu i sposoby jego wdrażania w przemyśle kosmetycznym. W nawiązaniu do gospodarki o obiegu zamkniętym ukazano aspekt upcyklingu odpadów pochodzących z przemysłu spożywczego, a także metody ekstrakcji oraz biofermentacji służące do ich przetwarzania na zrównoważone surowce kosmetyczne. W artykule przeglądowym D2 opisano właściwości, zastosowanie oraz budowę saponin triterpenowych wyizolowanych z liści wąkroty azjatyckiej, tzn. madekasozydu, azjatykozydu, kwasu madekasowego i kwasu azjatykowego. W publikacji eksperymentalnej D3 przedstawiono ocenę środowiskową surowców oraz zoptymalizowany, niskoenergetyczny proces wytwarzania podłoży kosmetycznych tj. emulsji typu w/o, o/w oraz żelu. Opisano badania stabilności otrzymanych podłoży, a także szczegółowo omówiono profile uwalniania madekasozydu i azjatykozydu w zależności od ich stężenia, rodzaju podłoża oraz pH płynu akceptorowego. W tym celu przeanalizowano mechanizmy uwalniania w oparciu o cztery modele kinetyczne. Natomiast w publikacjach eksperymentalnych D4 i D5 opisano wyniki badań *in vivo* nad

skutecznością działania trzech produktów dermokosmetycznych na skórę atopową, których formułacje zostały opracowane na bazie otrzymanych wcześniej podłoży.

W toku prowadzonych badań zoptymalizowano proces technologiczny otrzymywania emulsji w/o, o/w oraz żelu, dążąc do zmniejszenia śladu węglowego w środowisku. Zbadano parametry fizykochemiczne oraz potwierdzono stabilność formułacji z wykorzystaniem technik dyfrakcji laserowej (LD), elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS) oraz statycznego wielokrotnego rozpraszania światła (SMLS). Potwierdzono stabilność madekasozydu i azjatykozydu w podłożach kosmetycznych za pomocą HPLC. Na podstawie profilu uwalniania madekasozydu i azjatykozydu wybrano optymalny rodzaj nośników właściwych dla skóry atopowej i opracowano formułacje balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy. Skuteczność ich działania na skórę potwierdzono w randomizowanych, pojedynczo zaślepionych, kontrolowanych badaniach *in vivo* z udziałem ochotników z AZS.

ABSTRAKT W JĘZYKU ANGIELSKIM

The Green Deal policies proposed by the European Commission, such as the circular economy and zero emissions, have led to an increase in demand for the creation of sustainable cosmetic products with a significantly reduced impact on the environment. The assumptions of the Green Deal are met by the COSMOS standards for natural and organic cosmetics, providing a holistic and comprehensive view of the cosmetic manufacturing process. Simultaneously, on the market lacks specialist dermocosmetics intended for the care of atopic skin, containing active ingredients of natural origin with effects confirmed by scientific research and created in the spirit of sustainability. Due to the multidirectional mechanism of action of triterpene saponins from *Centella asiatica* L., described in the literature, this plant can demonstrate a great potential in inhibiting inflammatory processes that occur on the skin of people with atopic dermatitis (AD), as it has been confirmed in in vivo studies on mouse models. In addition, the plant fermentation process allows the production of a raw material with a postbiotic effect supporting the restoration of the balance of the atopic skin microbiome.

The main objective of the research was to develop an optimized technology for the production of three natural dermocosmetic products compliant with the COSMOS standards, based on the emollients and an extract and bioferment obtained from the leaves of *Centella asiatica* L., intended for the care of atopic skin, as well as to confirm the effectiveness of their action by in vivo tests. Three of the five developed products were the subject of the submitted dissertation.

The doctoral dissertation was prepared in the form of a coherent series of articles published in scientific journals from the list of the Ministry of Science and Higher Education. The review article D1 describes the assumptions of the Green Deal and the methods of its implementation in the cosmetics industry. In reference to the circular economy, the upcycling of waste from the food industry was presented, as well as extraction and biofermentation methods for their processing into sustainable cosmetic raw materials. The review article D2 shows the properties, application, and structure of triterpene saponins isolated from the leaves of *Centella asiatica* L, such as madecassoside, asiaticoside, madecassic acid, and asiatic acid. The experimental publication D3 presents an environmental assessment of raw materials and an optimized, low-energy process for the production of various cosmetic supports, namely: w/o, o/w emulsions and gel. The stability studies of the obtained supports are described, and the release profiles of madecassoside and asiaticoside are discussed in detail with a reference to their concentration, type of the cosmetic support, and pH of the acceptor fluid. The release mechanisms were analyzed based on four kinetic models. In the experimental publications D4 and D5, the results of in vivo studies on the effectiveness of dermocosmetic products in atopic skin, the formulations of which were developed based on previously obtained cosmetic supports, are described.

During the studies, the technological process of obtaining w/o, o/w emulsions and gel was optimized, aiming at reducing the carbon footprint in the environment. Physicochemical parameters were examined and the stability of formulations was confirmed using laser diffraction (LD),

electrophoretic light scattering (ELS), and static multiple light scattering (SMLS) techniques. The stability of madecassoside and asiaticoside in cosmetic supports was confirmed by HPLC. Based on the release profile of madecassoside and asiaticoside, the most optimal carriers matched to the needs of atopic skin were selected and formulations of body lotion, hand cream, and face cream were developed. Their effectiveness on the skin was confirmed in randomized, single-blind and placebo-controlled in vivo studies with the participation of volunteers with AD.

STRESZCZENIE PRACY

Zaproponowany w 2019 roku przez Komisję Europejską oraz rekomendowany do wdrożenia Zielony Ład spowodował wzrost zapotrzebowania na tworzenie zrównoważonych produktów kosmetycznych, których cały cykl życia w znacznie zredukowanym stopniu oddziałuje na środowisko. Na założenia Zielonego Ładu w dużej mierze odpowiadają standardy COSMOS (ang. Cosmetic Organic Standard) dla kosmetyków naturalnych i organicznych, zgodnie z którymi certyfikują uznane jednostki certyfikujące, do których należy Ecocert. Jednocześnie brakuje na rynku specjalistycznych dermokosmetyków przeznaczonych do pielęgnacji i wspomagania leczenia skóry atopowej, zawierających składniki aktywne pochodzenia naturalnego o działaniu potwierdzonym badaniami naukowymi, stworzonych w duchu zrównoważonego rozwoju. W obecnych na rynku produktach dedykowanych skórze atopowej dominują oleje mineralne, takie jak parafina i wazelina, które nie są akceptowane przez szerokie grono konsumentów. Ponadto, metody otrzymywania tychże składników nie są zgodne z zasadami Zielonej Chemii, przez co pozostawiają ślad węglowy w środowisku.

Atopowe zapalenie skóry (AZS) jest przewlekłą, nawrotową, zapalną chorobą skóry, która rozpoczyna się zazwyczaj we wczesnym dzieciństwie i często utrzymuje w wieku dorosłym, lub powstaje *de novo*. Charakteryzuje się występowaniem silnego świądu, dużej suchości skóry oraz typowo umiejscowionych zmian rumieniowych i grudkowo-żłuszczących, które często przybierają postać sączących strupów. Schorzenie stanowi poważny problem dla osób chorych, w tym dzieci, niekorzystnie wpływając na jakość życia pacjentów oraz ich rodzin. Z tego powodu poszukiwanie nowych substancji oraz opracowywanie skutecznych preparatów, będących alternatywą dla dostępnych na rynku produktów zawierających syntetyczne składniki jest bardzo istotne, zarówno z perspektywy wspomagania leczenia AZS oraz perspektywy pro-środowiskowej.

Głównym celem badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pt. **Opracowanie nowej linii dermokosmetyków naturalnych i biodegradowalnych, zgodnych z zasadami zrównoważonego rozwoju oraz wymaganiami Ecocert/COSMOS, przyjaznych środowisku i skórze** było opracowanie zoptymalizowanej technologii wytwarzania pięciu naturalnych produktów dermokosmetycznych opartych o działanie emolientów oraz substancji aktywnych pochodzących z ziela wąkroty azjatyckiej (*Centella asiatica* L.), przeznaczonych do kompleksowej pielęgnacji skóry atopowej oraz potwierdzenie skuteczności ich działania w testach *in vivo*. W toku badań opracowano formułacje oraz procesy technologiczne wytwarzania kremu do twarzy, kremu do rąk, balsamu do ciała, emulsji do mycia ciała oraz olejku do demakijażu.

Pierwszy rodzaj zastosowanej optymalizacji dotyczył składników receptur i obejmował ocenę profilu środowiskowego zastosowanych surowców uwzględniającą źródła ich pochodzenia, metody przetwarzania, stopień biodegradowalności oraz toksyczności dla organizmów wodnych. Istotne było również zminimalizowanie ilości odpadów powstających w innych gałęziach przemysłu, głównie w przemyśle spożywczym oraz drzewnym. W związku z tym, w pracy wykorzystano surowce pochodzące

z upcyklingu odpadów po produkcji soków, oliwy z oliwek, oleju sojowego, czy papieru. Proces tworzenia receptur dermokosmetyków zaprojektowano w oparciu o następujące wytyczne:

- 90% wszystkich składników w recepturze każdego produktu ma biodegradowalność na poziomie co najmniej 60% zgodnie z wytycznymi OECD dotyczącym testów biodegradacji nr 301 w środowisku tlenowym i wodnym;
- 50% składników receptury otrzymywanych jest w wyniku procesów fizycznych, takich jak np. ekstrakcja, wyciskanie, maceracja, które nie oddziałują negatywnie na środowisko;
- 50% składników receptury otrzymywanych jest w procesach chemicznych zgodnych z zasadami Zielonej Chemii, lub w procesach biotechnologicznych;
- 10 % surowców w recepturze pochodzi z upcyklingu;
- wykorzystanie surowców otrzymanych w procesach fermentacji z użyciem mikroorganizmów;
- surowce użyte w recepturach nie są toksyczne dla organizmów wodnych (weryfikacja toksyczności na podstawie informacji zawartych w karcie charakterystyki surowca kosmetycznego);
- eliminacja z receptur silikonów oraz olejów mineralnych i zastąpienie ich emolientami pochodzenia naturalnego;
- eliminacja z receptur drobin mikroplastiku.

Drugi etap optymalizacji dotyczył procesu technologicznego, którego celem było zmniejszenie zużycia energii oraz wody podczas wytwarzania produktów dermokosmetycznych poprzez przeprowadzenie procesu emulgowania na zimno, bez konieczności podgrzewania składników fazy emulsji. Konwencjonalne emulsje kosmetyczne wykonywane są w procesie na gorąco (75-80°C), natomiast dzięki optymalizacji proces technologiczny przebiegał w temperaturze 25°C, co pozwoliło na znacznie mniejsze zużycie energii elektrycznej w porównaniu z konwencjonalnym procesem technologicznym. Ponadto, proces na zimno wspierał stabilność składników fazy olejowej emulsji, takich jak naturalne oleje i masła, a także składników aktywnych zawierających triterpeny i polifenole, które są podatne na proces utleniania w podwyższonej temperaturze. Podsumowując, procesy technologiczne, zarówno dotyczące wytworzenia składników receptur, jak i metody wytwarzania mas kosmetycznych przeprowadzone zostały zgodnie ze standardami COSMOS dla kosmetyków naturalnych oraz z zasadami Zielonej Chemii, niwelując ilość zużytej energii, wody i wytworzonych odpadów, minimalizując tym samym ślad węglowy w środowisku.

Kolejnym etapem prac nad przygotowaniem formułacji dermokosmetyków było wprowadzenie do receptur surowców aktywnych otrzymanych z ziela wąkroty azjatyckiej. Pierwszym z nich był ekstrakt o optymalnej zawartości madekasozydu (M) i azjatykozydu (A)-saponin triterpenowych o działaniu przeciwzapalnym, immunomodulującym, antyoksydacyjnym, antybakteryjnym, przyspieszającym gojenie się ran oraz pobudzającym fibroblasty do syntezy kolagenu, który został wybrany na podstawie analizy składu ekstraktów dostępnych na rynku surowców kosmetycznych.

Drugim surowcem, stanowiącym element innowacji, był bioferment otrzymany na drodze fermentacji rośliny z użyciem bakterii *Lactobacillus reuteri*, który poza substancjami aktywnymi pochodzącymi z wąkroty azjatyckiej zawierał lizaty oraz produkty metabolizmu bakterii *L. reuteri* wykazujące działanie postbiotyczne, przywracające równowagę mikrobiomu skóry atopowej. W celu identyfikacji zawartości madekasozydu i azjatykozydu w powyższych surowcach opracowano i zwalidowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem UV-VIS.

Przygotowane formułacje dermokosmetyków zostały poddane badaniom:

- fizykochemicznym;
- stabilności w zmiennych warunkach temperaturowych: 4 °C, 45 °C, -5 °C ↔ 45 °C;
- czystości mikrobiologicznej;
- skuteczności działania konserwantu (test obciążeniowy, challenge test);
- dermatologicznym (skórnym testom płatkowym półotwartym);
- aplikacyjno-aparaturowym in vivo potwierdzającym skuteczność działania produktów na skórę atopową.

Pozostałe prace badawcze były zaprojektowane indywidualnie dla każdego produktu lub grupy produktów (dermokosmetyki pielęgnacyjne oraz dermokosmetyki myjące).

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie cyklu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, w których przedłożono wyniki badań dla trzech spośród pięciu opracowanych produktów dermokosmetycznych: balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy. W pracach przeglądowych opartych na dostępnych materiałach literaturowych opisane zostały założenia Zielonego Ładu oraz sposoby jego wdrażania w przemyśle kosmetycznym, podano definicję zrównoważonego produktu kosmetycznego na podstawie planowania całego cyklu życia produktu oraz w oparciu o kryteria jednostek certyfikujących i normę ISO 16128. W nawiązaniu do gospodarki o obiegu zamkniętym przedstawiono aspekt upcyklingu odpadów pochodzących głównie z przemysłu spożywczego, takich jak skórki, pestki i pulpa z owoców i warzyw, serwatka z mleka, muszle oraz fragmenty pancerzy skorupiaków, a także metody ekstrakcji oraz biofermentacji służące do ich przetwarzania na zrównoważone surowce kosmetyczne [D1]. W drugiej pracy przeglądowej [D2] opisano właściwości terapeutyczne, zastosowanie oraz budowę saponin triterpenowych wyizolowanych z ziela wąkroty azjatyckiej, takich jak madekasozyd, azjatykozyd, kwas madekasowy oraz kwas azjatykowy. Biorąc pod uwagę szeroko opisany w literaturze wielokierunkowy mechanizm działania saponin triterpenowych zawartych w wąkrocie azjatyckiej roślina wykazuje duży potencjał w hamowaniu procesów zapalnych zachodzących w skórze osób chorych na AZS. Jednak dotychczas preparaty do stosowania miejscowego zawierające ekstrakt, lub triterpeny wyizolowane z rośliny nie były badane w testach in vivo z udziałem pacjentów cierpiących na atopowe zapalenie skóry. Z tego powodu *Centella asiatica* L. została wybrana do dalszych badań eksperymentalnych, których wyniki przedstawiono w publikacjach D3, D4 i D5. Na podstawie przeprowadzonych badań kontrolowanego

uwalniania madekasozydu (M) i azjatykozydu (A) z różnego rodzaju formułacji kosmetycznych jako nośników otrzymanych w procesie na zimno: emulsji typu woda w oleju (w/o), emulsji typu olej w wodzie (o/w) oraz żelu oceniono wpływ rodzaju podłoża kosmetycznego, stężenia substancji aktywnych oraz pH płynu akceptorowego na profil i kinetykę uwalniania substancji [D3]. Oznaczono ilościowo za pomocą HPLC madekasozyd i azjatykozyd uwolnione do płynu akceptorowego. Dokonano charakterystyki otrzymanych nośników pod względem ich parametrów fizykochemicznych oraz stabilności w podwyższonych warunkach temperaturowych (45 °C). Za pomocą HPLC potwierdzono również stabilność madekasozydu i azjatykozydu w badanych formułacjach przechowywanych w temperaturze 45°C przez okres 2 miesiące, a tym samym skuteczność nośników przygotowanych w procesie na zimno w ochronie substancji aktywnych. Ponadto, oceniono profil środowiskowy surowców użytych do przygotowania nośników, biorąc pod uwagę parametry takie jak: źródło pochodzenia surowca z uwzględnieniem aspektu upcyklingu, technologie użyte do jego otrzymania, biodegradowalność oraz toksyczność dla organizmów wodnych [D3]. W kolejnych dwóch pracach eksperymentalnych [D4 i D5] przedstawiono wyniki badań in vivo przeprowadzonych na grupie 20 dorosłych ochotników z atopowym zapaleniem skóry aplikujących balsam do ciała, krem do rąk oraz krem do twarzy dwa razy dziennie przez okres 30 dni [D4- D5]. Badania aplikacyjne poprzedzone były wykonaniem testów płatkowych półotwartych przeprowadzonych pod nadzorem dermatologa na grupie 20 osób posiadających skórę wrażliwą [D5]. Na podstawie kontrolowanych badań randomizowanych, pojedynczo zaślepionych, oceniono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą badaną stosującą produkty zawierające ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej, a grupą kontrolną w wartościach mierzonych parametrów skóry:

- przeznaskórkowej utraty wody (TEWL, ang. Transepidermal Water Loss) [D4];
- nawilżenia warstwy rogowej naskórka [D5];
- wygładzenia powierzchni (parametr SEsm) [D5];
- szorstkości powierzchni (parametr SEr) [D5];
- stopnia złuszczenia naskórka (parametr SEsc) [D5];
- odczynu pH;
- rumienia.

Zbadano również wpływ stosowania balsamu do ciała na mikrobiom skóry ochotników cierpiących na AZS porównując ilość i rodzaj bakterii wyizolowanych ze zgięcia łokciowego przed aplikacją balsamu do ciała oraz po miesiącu jego stosowania.

Wyniki analizy pH skóry oraz intensywności rumienia po zastosowaniu balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy, a także składu mikrobiomu po zastosowaniu balsamu do ciała oraz wyniki dla produktów dermokosmetycznych przeznaczonych do mycia skóry z AZS, tj. emulsji do mycia ciała oraz olejku do demakijażu nie zostały opublikowane. Zostały zamieszczone w rozdziale 8. jako istotny element wdrożeniowy pracy. Ze względu na to, że emulsja do mycia ciała i olejek do demakijażu to produkty spłukiwalne, pozostające na skórze przez bardzo krótki okres czasu, zaniechano badań

porównawczych pomiędzy próbą badaną, zawierającą ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej, a próbą kontrolną, skupiając się na testach próby badanej. Wykazanie różnic pomiędzy grupą badaną i kontrolną w przypadku produktów myjących jest bardzo trudne, gdyż substancje aktywne potrzebują dłuższego kontaktu ze skórą, aby zadziałać w sposób statystycznie istotny. Natomiast produkty te są bardzo ważną, integralną częścią pielęgnacji skóry z atopią, ponieważ odpowiednio skomponowana receptura, zawierająca surfaktanty o niskim potencjale drażniącym oraz emolienty i substancje renatłuszczające nie narusza bariery naskórkowej, a nawet wspiera jej odbudowę, co jest kluczowe w pielęgnacji skóry atopowej. Grupa badana, licząca 10 ochotników z atopowym zapaleniem skóry testowała produkt przez okres 14 dni, aplikując go dwa razy dziennie na skórę ciała, a następnie spłukując wodą. Ocenie poddano następujące parametry skóry:

- przeznaskórkowa utrata wody (TEWL);
- nawilżenie warstwy rogowej naskórka;
- pH powierzchni skóry;
- rumień.

Podsumowując, w toku przeprowadzonych badań przedstawiono proces projektowania zrównoważonych emulsji typu w/o, o/w, żelu, emulsji myjącej (typu o/w) oraz olejku do demakijażu. Dzięki opracowaniu metody optymalizacji procesu technologicznego wytwarzania emulsji kosmetycznych możliwe stało się znaczne zmniejszenie zużycia energii elektrycznej, a wykorzystanie surowców pochodzących z upcyklingu pozwoliło zredukować ilość odpadów. Opracowanie i zwalidowanie metody HPLC do oznaczania zawartości madekasozydu i azjatykozydu w ekstraktach z wąkroty azjatyckiej dostarczyło praktycznego narzędzia dla przemysłu kosmetycznego do kontroli jakości dostaw każdej partii surowca oraz gotowego produktu kosmetycznego zawierającego ekstrakt z wąkroty azjatyckiej. Natomiast oznaczenie profilu i kinetyki uwalniania madekasozydu i azjatykozydu z różnego rodzaju nośników do miejscowego stosowania na skórę, w warunkach pH odpowiadających wartościami fizjologicznemu pH zdrowej skóry (5,8) oraz pH skóry atopowej (7,4) dostarczyło ważnych informacji na temat najbardziej optymalnego rodzaju nośnika dobrane do potrzeb skóry atopowej. Badania in vivo przeprowadzone na ochotnikach z AZS potwierdziły, że produkty emolientowe zawierające ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej mogą być z powodzeniem wykorzystywane we wspomaganiu leczenia atopowego zapalenia skóry oraz poprawić komfort życia pacjentów. Nowa linia dermokosmetyków wpisuje się w zapotrzebowanie rynku na skuteczne, naturalne preparaty dla skóry uszkodzonej i atopowej oraz globalną strategię zrównoważonego rozwoju.

I. WSTĘP

Projektowanie zrównoważonych produktów kosmetycznych to obecnie nie tylko globalny trend, ale przede wszystkim odpowiedź na założenia europejskiego Zielonego Ładu, który stał się bodźcem do wprowadzenia zmian w wielu sektorach gospodarki, mając na uwadze znaczne zmniejszenie oddziaływania działalności człowieka na środowisko [1]. Unia Europejska wprowadza szereg regulacji dotyczących surowców, systemu produkcji, opakowań, transportu i utylizacji, których celem jest osiągnięcie do 2050 roku gospodarki zeroemisyjnej oraz oddzielenie wzrostu gospodarczego od zużywanych zasobów [2]. W przemyśle kosmetycznym założenia te są realizowane poprzez stopniowe wdrażanie działań zmierzających do gospodarki o obiegu zamkniętym oraz zmniejszenia emisji gazów cieplarnianych [3]. Wiele z nich skupia się na sprostaniu wymogom recyklowalności opakowań z tworzyw sztucznych, ograniczeniu stosowania mikroplastików oraz zminimalizowaniu masy i objętości opakowań kosmetycznych. Jednak istnieje szereg aktywności, które należy podjąć już na etapie projektowania receptury kosmetyku oraz procesu technologicznego [4]. Pierwszym ogniwem mającym ogromny wpływ na tworzenie zrównoważonego rozwoju w branży kosmetycznej są producenci surowców, którzy mogą wdrażać politykę Zielonego Ładu projektując procesy wytwarzania surowców zgodne z zasadami Zielonej Chemii, przy użyciu procesów fizycznych (ekstrakcja, wyciskanie), lub biotechnologicznych wykorzystując rośliny pochodzące z kontrolowanych upraw, odpady z innych gałęzi przemysłu (upcykling) oraz surowce ze źródeł odnawialnych [5,6]. Bardzo ważnym dla środowiska aspektem, który należy zbadać jest biodegradowalność surowca oraz jego toksyczność dla organizmów wodnych [7]. Kolejnym ogniwem są technologowie, którzy dokonują optymalizacji profilu środowiskowego receptury poprzez selekcję surowców produkowanych w sposób zrównoważony, a także optymalizują procesy technologiczne wytwarzania mas kosmetycznych [8]. Pomimo, iż niskie zużycie energii podczas procesów produkcyjnych jest niezbędne do zmniejszenia śladu węglowego w środowisku i powinno być standardem wdrożonym w przemyśle kosmetycznym, projektowanie procesów emulgowania na zimno, bez konieczności podgrzewania składników, jest dużym wyzwaniem dla technologów i nie jest powszechnie stosowane [9]. Większość emulgatorów oraz stabilizatorów emulsji wymaga podgrzania do temperatury 75-80 °C. W związku z tym istnieje również potrzeba opracowywania nowych technologii emulgowania na zimno. Procesy niskoenergetyczne niosą liczne korzyści zarówno ekonomiczne i środowiskowe. Ponadto, pozwalają na mniejsze zużycie wody, ponieważ nie jest ona wykorzystywana do ogrzewania faz emulsji [10]. Zielona Transformacja w przemyśle kosmetycznym jest napędzana również przez coraz bardziej świadomych konsumentów, poszukujących produktów naturalnych, stworzonych w kontekście szeroko pojętego zrównoważonego rozwoju, co oznacza troskę o środowisko, zwierzęta oraz często również o uboższą ludność. Ponadto, oczekują oni od producentów transparentności oraz potwierdzenia jakości kosmetyku za pomocą certyfikatów nadanych przez znane jednostki certyfikujące, do których należy Ecocert, weryfikujący naturalność kosmetyku zgodnie ze standardami COSMOS [11]. Certyfikacja kosmetyku pozwala

odróżnić fałszywe, lub wprowadzające w błąd komunikaty marketingowe wykorzystujące elementy ekologiczności składników, opakowań oraz zrównoważonych praktyk wdrożonych w firmie, czyli tzw. greenwashing, od rzetelnych informacji oraz wypełnia lukę prawną powstałą na skutek braku ujednoliconej definicji kosmetyku naturalnego [12]. Według badań konsumentów uważają, że kosmetyki naturalne są bezpieczniejsze dla zdrowia od kosmetyków konwencjonalnych, ponieważ zawierają mniej substancji chemicznych, nie wywołują podrażnień skóry i alergii, są skuteczne w działaniu oraz przyjazne dla środowiska [13]. Ponadto, osobiste preferencje dotyczące unikania w składzie kosmetyku kontrowersyjnych składników, takich jak silikon, niektóre parabeny, syntetyczne barwniki, pochodne ropy naftowej oraz syntetyczne kompozycje zapachowe, a także obawy przed ich działaniem na organizm skłaniają konsumentów do sięgania po kosmetyki naturalne [13]. Kwestia naturalności kosmetyku nie pozostaje obojętna również dla posiadaczy skóry atopowej: 51 % ankietowanych pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (AZS) zadeklarowało, że zawartość składników pochodzenia roślinnego w produktach do pielęgnacji skóry jest dla nich bardzo istotna [14].

Atopowe zapalenie skóry jest jedną z najczęstszych zapalnych chorób skóry o przewlekłym i nawrotowym przebiegu [15]. Na wystąpienie choroby składa się interakcja czynników genetycznych, zaburzeń układu immunologicznego, czynników środowiskowych oraz dysfunkcja bariery naskórkowej. Jednym z charakterystycznych objawów schorzenia jest uporczywy, silny świąd oraz suchość skóry, przejawiająca się nadmiernym złuszczeniem, szorstkością, zaczerwienieniem, pieczeniem i ściągnięciem [16]. Zaburzona jest również równowaga mikrobiomu skóry, co powoduje przewagę bakterii patogennych, w szczególności *Staphylococcus aureus*, nad komensalnymi. Aby przywrócić funkcje bariery naskórkowej niezbędne jest wprowadzenie do pielęgnacji skóry odpowiednio dobranych produktów emolientowych, które stosowane kilka razy dziennie, również w okresie remisji choroby odbudowują integralność bariery naskórkowej zmniejszając suchość, świąd oraz zapobiegając infekcjom skóry [17]. Ponadto, celem jest zniwelowanie utrzymującego się stanu zapalnego, a także działanie immunomodulujące, co znacznie zmniejsza prawdopodobieństwo progresji choroby i pomaga osiągnąć stan remisji [18]. Obecnie na rynku brakuje dermokosmetyków przeznaczonych do kompleksowej pielęgnacji skóry atopowej, otrzymanych w zrównoważony sposób, w procesie na zimno, który nie tylko niweluje zużycie energii elektrycznej, ale również chroni stabilność naturalnych olejów i substancji aktywnych. Zdecydowana większość produktów rynkowych przeznaczonych dla skóry atopowej oparta jest o emolienty syntetyczne, takie jak oleje mineralne, które nie są akceptowane przez szerokie grono konsumentów, a procesy technologiczne otrzymywania zarówno składników, jak i gotowych produktów nie wspierają polityk Zielonego Ładu. Surowce te z powodzeniem można zamienić na składniki pochodzące z upcyklingu, które posiadają cenne dla skóry właściwości, a ich wykorzystanie niweluje ilość odpadów w środowisku. Brakuje również produktów certyfikowanych, które poza emolientami otrzymywanymi zgodnie z zasadami Zielonej Chemii, będą zawierały surowce pochodzenia naturalnego o udowodnionym działaniu przeciwzapalnym i immunomodulującym.

Dobrym rozwiązaniem wydaje się być wykorzystanie naturalnych ekstraktów i biofermentów o działaniu przeciwzapalnym oraz postbiotycznym w miejscowej pielęgnacji skóry atopowej.

Pomimo, iż wążkrota azjatycka (*Centella asiatica* L.) jest rośliną znaną i stosowaną w medycynie ajurwedyjskiej od około 3000 lat w leczeniu ran, blizn, oparzeń, trądziku pospolitego, łuszczycy i bielactwa, a także wielu chorób ogólnoustrojowych, nie została dotychczas wykorzystana w produktach do pielęgnacji i wspomagania leczenia skóry atopowej [19]. Jednak, biorąc pod uwagę wielokierunkowy mechanizm działania saponin triterpenowych zawartych w roślinie, takich jak madekasozyd i azjatykozyd, ma ona duży potencjał w hamowaniu stanu zapalnego powstającego w przebiegu atopowego zapalenia skóry, co zostało potwierdzone w badaniach *in vivo* na modelach mysich [20,21].

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie pięciu zrównoważonych produktów dermokosmetycznych, zgodnych ze standardami COSMOS dla kosmetyków naturalnych, przeznaczonych do kompleksowej pielęgnacji oraz mycia skóry atopowej. Misją było stworzenie specjalistycznych produktów wspierających leczenie skóry z atopią, a jednocześnie bezpiecznych dla środowiska, stawiając na równi zdrowie ludzi i przyszłość naszej planety. Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy zapoczątkowują kaskadę zmian pro-środowiskowych w przemyśle kosmetycznym, a jednocześnie dostarczają istotnych informacji o możliwości wykorzystania surowców otrzymywanych z liści wążkroty azjatyckiej, tzn. ekstraktu oraz biofermentu, we wspomaganiu leczenia atopowego zapalenia skóry u osób dorosłych. Ponadto, zaprezentowane wyniki analizy uwalniania madekasozydu i azjatykozydu umożliwiły wybór najbardziej optymalnych rodzajów nośników do stosowania miejscowego na skórę oraz potwierdziły zasadność ich stosowania zarówno w fizjologicznym pH skóry oraz w podwyższonym pH skóry atopowej. W recepturach kosmetyków wykorzystano surowce wegańskie, biodegradowalne, nietoksyczne dla organizmów wodnych, otrzymywane w procesach zgodnych z zasadami Zielonej Chemii oraz pochodzące z upcyklingu odpadów z przemysłu spożywczego i drzewnego. Optymalizacja procesu produkcyjnego do niskoenergetycznego zmniejszyła ślad węglowy w środowisku. Zastosowane metody wytwarzania produktów kosmetycznych wpisują się w główne polityki Zielonego Ładu, tj. gospodarkę o obiegu zamkniętym oraz niskoemisyjną.

II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

Przedstawiony rozdział oparty jest o publikacje przeglądowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

D1 Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Use of Waste from the Food Industry and Applications of the Fermentation Process to Create Sustainable Cosmetic Products: A Review**, *Sustainability* 2024, 16, 2757; doi.org/10.3390/su16072757 (IF=3.3, punkty MNiSW=100)

D2 Monika Krzyżostan, Izabela Nowak, **Saponiny triterpenowe pochodzące z *Centella asiatica* L.**, *Przemysł Chemiczny* 2024, 103/4; doi.org/10.3390/su16072757 (IF=0.464, punkty MNiSW=70).

1. Zrównoważony rozwój w przemyśle kosmetycznym [D1]

Zgodnie z definicją przyjętą w 1987 roku przez Komisję w Brundtland rozwój zrównoważony to taki, który zaspokaja obecne potrzeby bez uszczerbku dla zdolności przyszłych pokoleń do zaspokajania ich własnych potrzeb [4]. Koncepcja zrównoważonego rozwoju jest pojęciem bardzo szerokim, obejmującym wymiar środowiskowy, społeczny i ekonomiczny [1]. Dotyczy ona wielu sektorów gospodarki, a długoterminowy rozwój firm będzie uzależniony od wdrożonych dobrych praktyk zmniejszających ślad węglowy w środowisku [1]. Istnieje wiele działań obejmujących cały cykl życia produktu, które może podjąć branża kosmetyczna w celu wdrożenia bardziej zrównoważonej produkcji i konsumpcji produktów kosmetycznych (rys. 1) [3,5].



Rysunek 1. Cykl życia zrównoważonego produktu kosmetycznego [opracowanie własne].

Działania te, do niedawna dobrowolne i postrzegane jako trend pro-środowiskowy, od momentu ogłoszenia przez Komisję Europejską w 2019 roku polityk Zielonego Ładu sukcesywnie przybierają formę zobowiązań związanych z nowymi regulacjami dotyczącymi składników, opakowań, deklaracji marketingowych oraz wyliczania śladu węglowego przez przedsiębiorstwa produkcyjne [2]. Głównym celem jest zmniejszenie emisji dwutlenku węgla, zużycia energii, wody oraz zminimalizowanie ilości odpadów, czyli gospodarka w obiegu zamkniętym [2].

Niniejszy rozdział oparty jest m.in. o publikację przeglądową zatytułowaną **“Use of Waste from the Food Industry and Applications of the Fermentation Process to Create Sustainable Cosmetic Products: A Review” [D1]**, która obejmuje szczegółowy opis strategii zrównoważonego rozwoju skupiając się głównie na działaniach na rzecz środowiska podejmowanych w przemyśle kosmetycznym. Uwzględniono możliwe formy zaangażowania producentów oraz dostawców surowców, technologów, producentów opakowań, logistyków planujących transport gotowego produktu, konsumentów oraz jednostek rządowych w proces tworzenia zrównoważonego produktu kosmetycznego, jego dystrybucji, użytkowania i utylizacji. Opisano również strategie zarządzania firmą mające na uwadze interesy społeczne, aspekty środowiskowe oraz relacje z różnymi grupami interesariuszy, w szczególności z pracownikami, takie jak model społecznej odpowiedzialności biznesu (CSR). Ponadto, scharakteryzowano wybrane metody oceny wpływu produktu kosmetycznego na środowisko oraz raportowania dowodów podjętych inicjatyw na rzecz środowiska, do których należą: projektowanie dla zrównoważonego rozwoju (DfS) i dogłębna analiza całego cyklu życia produktu kosmetycznego. Zwrócono również uwagę na polityki Zielonego Ładu podając przykłady ich wdrożenia przez duże firmy kosmetyczne. Porównano standardy COSMOS (ang. Cosmetic Organic Standard) dla jednostek certyfikujących produkty naturalne i organiczne (Ecocert Greenlife, BDIH, Cosmebio, ICEA) z normą ISO 16128, która obecnie wypełnia lukę prawną związaną z brakiem definicji kosmetyku naturalnego. W publikacji [D1] skupiono szczególną uwagę na aspekcie otrzymywania zrównoważonych surowców kosmetycznych, wykorzystując w tym celu odpady pochodzące z przemysłu spożywczego, takie jak skórki, nasiona, pestki, liście roślin, pulpa z owoców i warzyw, pozostałości po ekstrakcji oleju oraz wyciskaniu soku, serwatka z mleka, muszle oraz fragmenty pancerzy skorupiaków. Opisano przyjazne dla środowiska procesy przetwarzania odpadów na surowce kosmetyczne, takie jak fermentacja z wykorzystaniem mikroorganizmów oraz różnego rodzaju metody ekstrakcji: rozpuszczalnikowa-Soxhleta oraz płynem nadkrytycznym z wykorzystaniem rozpuszczalników głęboko eutektycznych, lub dwutlenku węgla, ekstrakcja wodą podkrytyczną, ekstrakcja enzymatyczna, wspomagana mikrofalami lub ultradźwiękami. W wyniku tych procesów powstają surowce o wysokiej wartości dodanej, bogate w antyoksydanty, polifenole, białka, minerały, witaminy, karotenoidy, lignany, polisacharydy, kwasy tłuszczowe, polimery pochodzenia naturalnego, postbiotyki i inne substancje. Istotnym aspektem przedstawionym w publikacji są właściwości surowców otrzymanych z upcyklingu oraz ich działanie na skórę: antyoksydacyjne, przeciwzapalne, antybakteryjne, nawilżające, przeciwtrądzikowe, przeciwstarzeniowe, rozjaśniające przebarwienia skóry, wspomagające ochronę przed

promieniowaniem UV, wspierające mikrobiom skóry, emoliencyjne. Ponadto, surowce te mogą być wykorzystywane jako emulgatory, stabilizatory i zagęstniki emulsji. Obszerny przegląd literatury dotyczący surowców kosmetycznych otrzymanych z upcyklingu umożliwił selekcję składników zastosowanych w opracowanych recepturach dermokosmetyków.

1.1. Europejski Zielony Ład

Europejski Zielony Ład to zainicjowany przez Komisję Europejską zbiór inicjatyw politycznych, których celem jest osiągnięcie do 2050 roku neutralności klimatycznej [2]. Bodźcem do wprowadzenia zmian było postępujące globalne ocieplenie oraz zanieczyszczenie środowiska naturalnego. Strategia walki ze zmianą klimatu jest sukcesywnie przekształcana przez Radę oraz Parlament Europejski w przepisy prawne zobowiązujące państwa członkowskie UE do ich przestrzegania. Jednym z nich jest Rozporządzenie o europejskim prawie klimatycznym, obowiązujące od lipca 2021 roku. Główne cele Zielonego Ładu, dotyczące wszystkich sektorów gospodarki: przemysłu, rolnictwa, energetyki, transportu, zrównoważonego finansowania to [22-23]:



Gospodarka o obiegu zamkniętym

Ponowne wykorzystanie produktów oraz recykling odpadów i surowców z nich pochodzących.



Ograniczenie emisji gazów cieplarnianych o 55 % do 2030 roku

Osiągnięcie neutralności klimatycznej do 2050 roku poprzez dekarbonizację procesów przemysłowych oraz łańcucha dostaw i logistyki, zakup energii odnawialnej, ograniczenie ilości odpadów.



Czysty przemysł

Inwestowanie w zielone technologie, minimalizowanie ilości odpadów, zużycia energii oraz zasobów naturalnych, neutralność emisyjna, eliminowanie chemikaliów toksycznych dla środowiska.



Zrównoważone rolnictwo

Zwiększenie udziału rolnictwa ekologicznego, zminimalizowanie użycia pestycydów, nawozów i antybiotyków w celu otrzymania zdrowej żywności oraz ochrony przyrody.



Czyste środowisko i oceany

Ochrona i odbudowa bioróżnorodności i ekosystemów wodnych oraz lądowych, rozszerzenie obecnych obszarów Natura 2000, ograniczenie zanieczyszczenia powietrza, wody i gleby.



Sprawiedliwość i równość klimatyczna

Zastosowanie mechanizmów sprawiedliwej transformacji poprzez wsparcie finansowe i techniczne regionów, gałęzi przemysłu i pracowników, dla których przejście na gospodarkę zeroemisyjną jest najtrudniejsze.

Z punktu widzenia przemysłu kosmetycznego kluczową polityką Zielonego Ładu jest strategia chemiczna na rzecz zrównowżenia (ang. Chemicals Strategy for Sustainability) wprowadzająca szereg zmian w regulacjach dotyczących chemikaliów stosowanych w kosmetykach, których celem jest wyeliminowanie substancji toksycznych nie tylko dla konsumentów, ale również dla środowiska [24]. Aspekt bezpieczeństwa substancji oraz gotowych produktów dla środowiska jest bardzo istotny, szczególnie, że dotychczas klasyfikacja substancji kosmetycznych jako zakazane do stosowania, lub dopuszczone z ograniczeniami opierała się na ocenie ryzyka i niebezpieczeństwa dla zdrowia ludzkiego. Komisja Europejska zwróciła również uwagę na fakt kumulowania się stężeń substancji używanych w różnych produktach codziennego użytku, w tym kosmetyków w środowisku, co może stanowić zagrożenie. W związku z tym Komisja Europejska dokonała rewizji najważniejszego dla branży kosmetycznej Rozporządzenia 1223/2009/WE oraz rozporządzeń CLP i REACH, które dotyczą zarówno składników kosmetyków, jak i produktów gotowych. Planowany jest szereg zmian w zarządzaniu substancjami chemicznym oraz w podejściu i metodologii oceny ryzyka, między innymi jedna ocena dla jednej substancji oraz ocena ryzyka mieszanin. Do grupy substancji SVHC wzbudzających szczególne zagrożenie zostaną dodane nowe klasy substancji, takie jak: składniki zaburzające gospodarkę hormonalną, wpływające na organizm człowieka i na środowisko, substancje trwałe, ulegające bioakumulacji i toksyczne dla środowiska (PBT), trwałe i mobilne w środowisku (PMT) oraz bardzo trwałe i bardzo ulegające bioakumulacji (vPvB). Dzięki wprowadzeniu pojęcia i kryteriów niezbędnych zastosowań użycie najbardziej szkodliwych chemikaliów stanie się dozwolone tylko wtedy, gdy będzie to niezbędne dla zdrowia, bezpieczeństwa lub funkcjonowania społeczeństwa, a także, gdy nie istnieją bezpieczniejsze alternatywy [24,25]. Oceną ryzyka substancji ma zająć się Europejska Agencja d/s Chemikaliów (ECHA), a nie jak dotychczas Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów (SCCS), co pozwoli na ocenę zagrożenia związanego ze szkodliwością danej substancji na wielu płaszczyznach jednocześnie. Ponadto, planowane jest wprowadzenie obowiązkowego zamieszczania ostrzeżeń o obecności substancji szkodliwie wpływających na środowisko, lub toksycznych dla organizmów wodnych na etykietach produktów kosmetycznych [26]. Niektóre surowce kosmetyczne, ze względu na zagrożenie dla środowiska wodnego i zdolność do bioakumulacji zostały już zakazane lub znacznie ograniczone do stosowania. Należą do nich między innymi: mikroplastiki, niektóre rodzaje filtrów organicznych, siloksany, takie jak: cyklotetrasiloksan (D4), cyklopentasiloksan (D5) oraz cykloheksasiloksan (D6).

Drugą istotną dla branży kosmetycznej strategią Zielonego Ładu jest gospodarka w obiegu zamkniętym oraz zeroemisyjna. Wiąże się to z odpowiedzialnym pozyskiwaniem surowców kosmetycznych, stosowaniem zielonych technologii w celu ich przetwarzania, projektowaniem niskoemisyjnych procesów produkcji mas kosmetycznych, minimalizowaniem ilości odpadów oraz ich upcyklingiem. Możliwości zaangażowania producentów i konsumentów w zrównoważoną produkcję i użytkowanie produktów kosmetycznych przedstawiono na rysunku 1. Ponadto, Zielony Ład wymaga

od producentów transparentności deklaracji marketingowych, co reguluje dyrektywa Green claims. Celem jest przeciwdziałanie praktykom greenwashingu, wprowadzających konsumentów w błąd [1].

Pomimo, iż Komisja Europejska przyjęła wnioski z rewizji wyżej wymienionych rozporządzeń, na projekt ich nowej wersji trzeba będzie poczekać. Ścieżka legislacyjna jest procesem długotrwałym, jednak do tak dużych zmian w przemyśle kosmetycznym warto przygotować się z wyprzedzeniem, uwzględniając powyższe założenia polityk Zielonego Ładu.

1.2. Standardy COSMOS

Narzędziem, które bardzo ułatwia tworzenie zrównoważonego produktu kosmetycznego są standardy COSMOS (ang. Cosmetic Organic Standard), czyli obowiązujące od 2010 roku ujednolicone standardy certyfikacji kosmetyków naturalnych i organicznych, którymi zarządza niezależne, międzynarodowe stowarzyszenie non-profit-COSMOS-standard AISBL z siedzibą w Brukseli. Zostały one stworzone przez pięć niezależnych jednostek certyfikujących: Ecocert, Cosmebio, BDIH, ICEA, Soil Association, które uprzednio certyfikowały kosmetyki według swoich własnych kryteriów. Standardy COSMOS określają definicję kosmetyku naturalnego i organicznego oraz wymagania, jakie muszą one spełnić, aby mogły otrzymać certyfikat, opierając się na 4 podstawowych zasadach [28]:

1. Promowanie stosowania produktów z rolnictwa ekologicznego i poszanowanie bioróżnorodności.
2. Odpowiedzialne korzystanie z zasobów naturalnych i poszanowanie środowiska.
3. Wykorzystywanie metod przetwarzania i produkcji, które szanują zdrowie ludzkie i środowisko.
4. Integrowanie i rozwijanie koncepcji Zielonej Chemii.

Ponadto, stanowią całościowe, kompleksowe spojrzenie na proces wytwarzania kosmetyku, zaczynając od pochodzenia oraz metod przetwarzania składników, składu produktu, procesu produkcyjnego, poprzez tworzywo, z jakiego wykonane jest opakowanie kosmetyku oraz etykieta, aż do kwestii przechowywania, oznakowania i komunikacji marketingowej. Kryteria obejmują również podejście do zarządzania odpadami produkcyjnymi wskazując na konieczność ich redukcji, ponownego wykorzystania oraz recyklingu. Wyszczególnione zostały również środki czyszczące i dezynfekujące dozwolone do stosowania w procesie mycia zbiorników produkcyjnych oraz wszelkich narzędzi używanych na etapie produkcji mas kosmetycznych biorąc pod uwagę ich pochodzenie, biodegradowalność i toksyczność dla organizmów wodnych [28]. W ciągu ostatniego roku kryteria COSMOS zostały uaktualnione tak, aby jeszcze lepiej odpowiedzieć na strategię zrównoważonego rozwoju oraz polityki Zielonego Ładu [12, 27-28]. Certyfikacja kosmetyków naturalnych i organicznych zgodnie ze standardami COSMOS wypełnia obecną lukę związaną z brakiem prawnie regulowanej definicji kosmetyku naturalnego oraz nadzoru nad realizacją przez firmy kosmetyczne polityk Zielonego Ładu. Ecocert, czy też każda inna jednostka certyfikująca zgodnie z COSMOS dokonuje corocznego audytu w firmie, która ma wdrożony certyfikat dla swoich produktów, szczegółowo weryfikując każdy etap powstawania kosmetyku. Dzięki temu konsument może mieć pewność, że kosmetyk oznaczony logo jednej z pięciu jednostek certyfikujących spełnia ściśle określone kryteria [12]. Niestety,

certyfikacja kosmetyków jest procesem pracochłonnym i kosztownym, w związku z czym decydują się na nią tylko nieliczne firmy. Brak jednolitej, międzynarodowej definicji dla kosmetyków naturalnych powoduje mnogość nazw sugerujących naturalność kosmetyku, takich jak eko, bio, green, naturalny, organiczny, oraz różne interpretacje tych pojęć. Najczęściej producenci tworzą definicję kosmetyku naturalnego na podstawie zawartości ekstraktów, olejów, czy masel pochodzenia naturalnego, nie biorąc pod uwagę pozostałych składników receptury, takich jak syntetyczne zagęstniki, emulgatory, czy emolienty, a także aspektów środowiskowych związanych z emisją gazów cieplarnianych emitowanych podczas procesów produkcyjnych oraz transportu. Opublikowana w latach 2016-2017 norma ISO 16128 dotyczy naturalności składników receptur, jednak nadal nie definiuje kosmetyku naturalnego [4-5, 12].

1.2.1. Kryteria dla surowców naturalnych i organicznych

Standardy COSMOS bardzo szczegółowo określają kryteria dla surowców kosmetycznych, dzieląc je na pięć kategorii: [28-29].

- **Woda**, czyli główny składnik każdego kosmetyku. COSMOS dopuszcza do użytku zarówno wodę pitną, źródlaną, destylowaną, otrzymaną na drodze osmozy oraz wodę morską, jednak podstawowym kryterium jest jej czystość mikrobiologiczna oraz oczyszczanie z zastosowaniem procesów fizycznych (tab.1).
- **Minerały i składniki pochodzenia mineralnego**, czyli surowce powstające w wyniku procesów geologicznych, z wyłączeniem pochodnych paliw kopalnych. Do najważniejszych należą: glinki, glinokrzemiany, nieorganiczne pigmenty, mika, krzemionka, naturalne sole. Szczegółowy wykaz minerałów dopuszczonych do stosowania znajduje się w Załączniku IV do wersji 4.1. Standardu COSMOS [28]. Mogą być one przetwarzane w procesach fizycznych (tab.1).
- **Fizycznie przetworzone agro-składniki (PPAI, ang. Physically Processed Agro-Ingredients)**. Są to surowce pochodzenia roślinnego, zwierzęcego lub mikrobiologicznego, przetworzone w procesach fizycznych, wymienionych w tabeli 1 oraz spełniające wymogi Konwencji o międzynarodowym handlu dzikimi zwierzętami i roślinami gatunków zagrożonych wyginięciem (CITES). Składniki pochodzenia zwierzęcego mogą być wytwarzane przez zwierzęta, jednak nie mogą stanowić części ciała zwierzęcia, a ich produkcja nie może przyczyniać się do śmierci zwierząt. W procesie otrzymywania surowców dozwolone są wyłącznie rozpuszczalniki pochodzenia naturalnego [28].
- **Chemicznie przetworzone agro-składniki (CPAI, ang. Chemically Processed Agro-Ingredients)**. Są to surowce pochodzenia roślinnego, zwierzęcego lub mikrobiologicznego, przetworzone w procesach chemicznych, wymienionych w tabeli 1. Procesy te powinny być zgodne z zasadami Zielonej Chemii (Green Chemistry Programme), gdzie szczególny nacisk kładzie się na niskie zużycie energii, produkowanie minimalnej ilości odpadów oraz bazowanie na surowcach pochodzących ze źródeł odnawialnych. Ponadto, otrzymane składniki nie mogą ulegać bioakumulacji w środowisku, ich biodegradowalność musi wynosić > 70 % zgodnie z OECD 301A

i 301E oraz > 60 % zgodnie z OECD 301 B,C,D,F, aby uzyskać status łatwo biodegradowalnych [28-29].

- **Inne składniki**, do których można zaliczyć dopuszczone do stosowania substancje syntetyczne, jak np. syntetyczne konserwanty, znajdujące odpowiedniki w przyrodzie, takie jak kwasy: benzoesowy, dehydrooctowy, salicylowy, sorbowy i ich sole oraz alkohol benzyłowy [28-29].

Dodatkowo powyższe grupy surowców wg kryteriów COSMOS dzielą się na **surowce pochodzenia naturalnego oraz surowce organiczne**. Do składników pochodzenia naturalnego należą: woda, minerały i składniki pochodzenia mineralnego, surowce pochodzące z monitorowanych upraw, przetworzone w wyniku reakcji chemicznych (CPAI) oraz niektóre surowce przetworzone w procesach fizycznych (PPAI). Natomiast surowcami w 100 % organicznymi są najczęściej otrzymane w procesach fizycznych ekstrakty z roślin uprawianych na monitorowanych plantacjach, gdzie warunki uprawy i zbioru są ściśle kontrolowane [29]. Pozostałe ekstrakty mogą w pewnym stopniu mieć pochodzenie organiczne, np. w 50 %, na co wpływ mają np. rozpuszczalniki użyte w procesie ekstrakcji. Każdym surowiec musi być zatwierdzony przez jednostkę certyfikującą, np. Ecocert, do użytku w kosmetykach naturalnych i organicznych (ang. Ecocert/ Cosmos approved), a surowce organiczne muszą posiadać certyfikat. Niektóre składniki mogą być zatwierdzone tylko do użytku w określonych typach produktów kosmetycznych [29].

Zarówno surowce, jak i gotowe produkty kosmetyczne nie mogą być testowane na zwierzętach, co dotyczy również kwestii badań toksykologicznych w celu określenia wartości LC50/EC50 dla surowców. W związku z tym np. badanie toksyczności surowca dla organizmów wodnych nie powinno odbywać się na rybach i dafniach. W tym celu należy wykorzystać alternatywne metody badań in vitro oraz pośrednie metody alternatywne [28]. Jednak nie dla wszystkich surowców wymagane są badania toksyczności wodnej. Nie obejmują one surowców występujących w naturze i uzyskanych w procesie fermentacji, lub surowców powstałych w wyniku hydrolizy substancji występujących w naturze, jak np. maltodekstryna powstała ze skrobi [28].

1.2.2. Składniki niedozwolone

Do wytwarzania surowców nie mogą być wykorzystywane rośliny, a w przypadku procesów biotechnologicznych - mikroorganizmy, drożdże, czy grzyby modyfikowane genetycznie (GMO), a także gatunki roślin zagrożonych wymienionych na czerwonej liście IUCN [28]. Niedozwolone są również surowce w postaci nanocząstek o rozmiarach mniejszych, lub równych 100 nm, o rozkładzie cząstek 50 % lub więcej. W przypadku braku alternatywnych surowców oraz ze względu na ich znaczenie w kosmetykach, akceptowalne są krzemionki oraz dwutlenek tytanu i tlenek cynku w produktach ochrony przeciwsłonecznej [28-29]. Zabronione są również: oleje mineralne, silikon, sztuczne barwniki i kompozycje zapachowe [29].

1.2.3. Kryteria dla procesów przetwarzania surowców

Zarówno surowce pochodzenia roślinnego, zwierzęcego oraz powstające przy użyciu mikroorganizmów mogą być przetwarzane w procesach fizycznych, lub chemicznych, jednak wyłącznie tych przedstawionych w tabeli 1. Procesy chemiczne zaaprobowane przez COSMOS umożliwiają tworzenie surowców biodegradowalnych, respektują naturalne substancje czynne obecne w roślinach oraz równowagę ekologiczną, a także umożliwiają dobre gospodarowanie odpadami i wykorzystanie energii [28]. Niedozwolone są między innymi reakcje etoksyłowania oraz syntezy z wykorzystaniem tlenu etylenu, rtęci i rozpuszczalników petrochemicznych, a także wykorzystujące promieniowanie jonizujące.

Tabela 1. Procesy przetwarzania surowców zgodne ze standardami COSMOS [28].

Procesy fizyczne	Reakcje chemiczne
Absorpcja, deodoryzacja, mieszanie, wirowanie; dekoloryzacja z użyciem: bentonitu, węgla aktywowanego, ziemi wybielającej, nadtlenu wodoru, ozonu; suszenie przez parowanie / naturalne na słońcu; deterpenacja, destylacja, ekstrakcja, filtracja i oczyszczanie (ultrafiltracja, dializa, krystalizacja, wymiana jonowa); zamrażanie, mielenie, liofilizacja; maceracja, perkolacja, metody ciśnieniowe, prażenie, sedymentacja i dekantacja, przesiewanie, wyciskanie, kruszenie; sterylizacja za pomocą promieniowania UV, sterylizacja z obróbką termiczną (według temperatury uwzględniającej substancje czynne), ultradźwięki, mikrofałe, próżnia.	Alkilacja, amidacja, kondensacja / addycja, kalcynacja pozostałości roślinnych; procesy biotechnologiczne z wykorzystaniem mikroorganizmów; karbonizacja, estryfikacja, transestryfikacja, interestryfikacja; hydrogenacja, uwodnienie; fosforylacja (dozwolona tylko dla składników używanych w produktach spłukiwalnych); wymiana jonowa, neutralizacja, utlenianie / redukcja, hydroliza; zmydlanie, sulfonowanie (przy atomie węgla lub tlenu) dozwolone tylko dla surfaktantów używanych w produktach spłukiwalnych.

1.2.4. Poziomy certyfikacji kosmetyków

COSMOS wyróżnia dwa poziomy certyfikacji kosmetyków, co widoczne jest na logo jednostek certyfikujących:

- **COSMOS ORGANIC**, to oznaczenie kosmetyku organicznego
- **COSMOS NATURAL**, to oznaczenie kosmetyku naturalnego

W tabeli nr 2 przedstawiono kryteria przyznawania certyfikatów dla kosmetyków naturalnych i organicznych.

Tabela 2. Kryteria przyznawania certyfikatów dla kosmetyków organicznych i naturalnych certyfikowanych zgodnie ze standardami COSMOS [28-29].

Rodzaj certyfikatu	Najważniejsze kryteria do przyznania certyfikatu
 Ecocert COSMOS Organic	Dla kosmetyków niespłukiwalnych (kremy, balsamy): minimum 20 % surowców organicznych w recepturze. Dla kosmetyków spłukiwalnych (żele do mycia, szampony): minimum 10 % surowców organicznych w recepturze. Minimum 95 % składników pochodzących z monitorowanych upraw (agro składników): ✓ przetworzonych w wyniku procesów fizycznych (PPAI) ✓ przetworzonych w wyniku procesów chemicznych (CPAI) Na etykiecie kosmetyku muszą się znaleźć następujące informacje: X% wszystkich składników jest pochodzenia naturalnego Y% składników organicznych z plantacji monitorowanych Naturalny i Organiczny Kosmetyk Certyfikowany przez ECOCERT Greenlife. W składzie INCI składniki oznaczone są gwiazdkami: *składniki z plantacji monitorowanych ** wykonane z organicznych składników
 Ecocert COSMOS Natural	Minimalna ilość składników organicznych nie jest wymagana. Minimum 95 % składników pochodzących z monitorowanych upraw (agro składników). Na etykiecie kosmetyku muszą się znaleźć następujące informacje: X% wszystkich składników jest pochodzenia naturalnego Naturalny Kosmetyk Certyfikowany przez ECOCERT Greenlife. W składzie INCI składniki oznaczone są gwiazdkami: *składniki z plantacji monitorowanych

1.3. Zrównoważone surowce użyte do przygotowania dermokosmetyków [D3, D5]

Selekcja składników wykorzystanych do opracowania receptur dermokosmetyków jest pierwszym krokiem do zapobiegania negatywnym skutkom zanieczyszczenia środowiska substancjami chemicznymi o toksycznym działaniu na ekosystemy. Ocena środowiskowa surowców wykorzystanych do przygotowania trzech produktów dermokosmetycznych: balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy, będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej została przedstawiona w

publikacjach: **D3 pt. Controlled release of madecassoside and asiaticoside of *Centella asiatica* L. origin from sustainable cold-processed topical formulations** oraz **D5 pt. Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract.**

Wszystkie surowce użyte w pracy są wegańskie oraz spełniają kryteria COSMOS dla surowców organicznych i pochodzenia naturalnego. Zostały otrzymane w wyniku procesów fizycznych, biotechnologicznych (procesy fermentacji z użyciem bakterii), lub chemicznych, zgodnych z zasadami Zielonej Chemii. Minimum 10 % surowców w recepturze każdego produktu pochodzi z upcyklingu odpadów z przemysłu spożywczego i drzewnego. Surowce nie ulegają bioakumulacji w środowisku, łatwo ulegają biodegradacji (co najmniej 60 % w ciągu 28 dni zgodnie z kryteriami OECD 301B, D, F) oraz wykazują niską toksyczność dla organizmów wodnych. Oceny środowiskowej surowców dokonano na podstawie kart charakterystyki, dokumentacji udostępnionej przez producentów i dystrybutorów, a także bazy surowców certyfikowanych i zatwierdzonych przez COSMOS [28]. W tabeli nr 3 opisano pochodzenie, funkcje oraz procesy zgodne z Zieloną Chemią wykorzystane do otrzymania surowców użytych w recepturach dermokosmetyków pielęgnacyjnych opisanych w publikacjach **D3** i **D5**, a także w recepturach produktów myjących: olejku do demakijażu oraz emulsji do mycia ciała, których nie obejmują wyżej wymienione publikacje. Podano również, w jakim stopniu (w procentach) dany surowiec został przetworzony w procesach fizycznych (PPAI) oraz chemicznych (CPAI). Dane te pochodzą z certyfikatów wydanych przez COSMOS/Ecocert dla danego surowca. W przypadku surowców, które zostały zatwierdzone przez COSMOS/Ecocert do użytku w kosmetykach naturalnych i organicznych, ale producent nie zdecydował się na ich certyfikację, dane te nie są dostępne. Na podstawie wartości PPAI i CPAI możemy stwierdzić, że wszystkie surowce zostały przetworzone w procesach fizycznych, lub „zielonych” procesach chemicznych, a tym samym produkty otrzymane z tych surowców spełniają kryteria kosmetyków naturalnych zgodnie z certyfikacją Ecocert COSMOS Natural (tab. 2).

Tabela 3. Ocena środowiskowa surowców użytych w recepturach opracowanych produktów dermokosmetycznych. *obowiązuje dla surowców certyfikowanych i zatwierdzonych przez COSMOS **surowiec dopuszczony przez COSMOS do stosowania, nie posiada certyfikatu.

Nazwa handlowa surowca	Skład surowca wg INCI	Funkcja w kosmetyku	Źródło pochodzenia surowca	Otrzymywanie surowca zgodne z Zieloną Chemią	Zawartość PPAI/CPAI*
Ekstrakt z wąkroty azjatyckiej	Propanediol, Centella Asiatica Extract	Składnik aktywny	Liście wąkroty azjatyckiej	Ekstrakcja etanolowa (etanol pochodzenia roślinnego jako zielony rozpuszczalnik)	**
Centella asiatica bioferment (GEO)	Aqua, Lactobacillus/ Centella Asiatica Extract	Składnik aktywny	Liście wąkroty azjatyckiej, bakteria	Biofermentacja z użyciem bakterii <i>L. reuteri</i>	**

	Ferment, Gluconolactone, Sodium Benzoate, Calcium Gluconate, Lactic Acid, Acetic Acid, Protocatechic Acid, Caffeic Acid, Gallic Acid, Reuterin		<i>Lactobacillus reuteri</i>		
EWO- Vegetable Emulsifier	Glyceryl Oleate, Polyglyceryl-3- Polyricinoleate, Olea Europea Oil Unsaponifiables	Emulgator tworzący emulsje typu woda w oleju (w/o)	Zielone oliwki jako odpady z przemysłu spożywczego	Oczyszczanie kwasów tłuszczowych z oliwy z oliwek do postaci substancji niezmydlających się.	PPAI = 20 % CPAI = 80 %
Galehemp OW	Polyglyceryl 4 Hemp Seedate, Caprylyl Capryl Glucoside, Aqua	Emulgator tworzący emulsje typu olej w wodzie (o/w)	Tetraglicerol to mieszanina rafinowa-nych poligliceroli pochodzenia roślinnego; Olej z nasion konopi otrzymywany w wyniku tłoczenia z owoców <i>Cannabis sativa</i> L.; Caprylyl/ Capryl Glucoside - niejonowy środek powierzchniowo czynny, otrzymywany z odnawialnych surowców.	Transestryfikacja tetraglicerolu oraz oleju z nasion konopii otrzymując ester, który następnie jest mieszany z Caprylyl/capryl glucoside i wodą w celu uzyskania trans-estru.	CPAI = 80 % PPAI = 0 %
Softigen® Pura	Caprylic/Capric Triglyceride, Hydrogenated Rapeseed Oil	Emolient uznawany za wegański zamiennik lanoliny	Nasiona rzepaku, olej z pestek palmowych lub olej z nasion kokosa	Rafinacja, blanszowanie, deodoryzacja	CPAI = 100 % PPAI = 0 %
Phytosqualan ®	Squalane	Emolient	Zielone oliwki jako odpady z przemysłu spożywczego	Estryfikacja, destylacja, zmydlanie, uwodornienie, winteryzacja	CPAI = 100 % PPAI = 0 %
Synovea® EL	Ethyl Linoleate, Ethyl Palmitate, Ethyl Oleate, Ethyl Linolenate	Emolient, prekursor ceramidów, stabilna wersja kwasu	Nasiona słonecznika	Zielona estryfikacja	CPAI = 100 % PPAI = 0 %

		linolowego (Linoleinian etylu)			
LIPEX® Omega 3/6™	Olus Oil, Camelina Sativa Seed Oil	Emolient	Nasiona lnicznika siewnego	Ekstrakcja mechaniczna, rafinacja, deodoryzacja	PPAI = 5 %, CPAI = 95 %
LIPEX® PreAct™	Canola Oil	Emolient	Nasiona rzepaku	Wyciskanie, dezodoryzacja, uwodornienie, filtracja, frakcjonowanie rozpuszczalników	CPAI = 100 % PPAI = 0 %
Akogel™	Hydrogenated Vegetable Oil	Emolient	Owoc kokosa, nasiona soi warzywnej, nasiona rzepaku	Ekstrakcja mechaniczna, ekstrakcja rozpuszczalnikowa, rafinacja, dezodoryzacja, uwodornienie	CPAI = 100 % PPAI = 0 %
Raspberry Necta®	Rubus Idaeus Seed Oil	Emolient standaryzow any na zawartość witaminy E	Pestki malin jako odpady po produkcji soków	Ekstrakcja w procesie na zimno	PPAI = 100 % CPAI = 0 %
Emotion® Light	Tripelargonin	Emolient	Nasiona ostropestu plamistego	Destylacja i hydroliza oleju z nasion ostropestu z uzyskaniem czystego kwasu pelargonowego. Następny krok: estryfikacja w wysokiej temperaturze w celu uzyskania estru.	**
CeraFluid®	Triolein, Glyceryl Dioleate, Ceramide NP	Emolient, ceramid	Trioleina i dioleinian gliceryny - z oliwek- odpadów z przemysłu spożywczego; Ceramid NP- proces biofermentacji z użyciem drożdży	Trioleina i dioleinian gliceryny- proces destylacji oleju z oliwek, w wyniku którego uzyskuje się czyste kwasy tłuszczowe, a następnie proces estryfikacji kwasów tłuszczowych. Ceramid NP- amidacja kwasu stearynowego pochodzenia roślinnego na fitosfingozynie uzyskanej w	**

				procesie biofermentacji z wykorzystaniem drożdży.	
Ceramidon®	Octyldodecyl PCA	Emolient o strukturze podobnej do ceramidów skóry.	Kwas L-glutaminowy z buraka; oktyldodekanol - pochodzenie roślinne	Cyklizacja kwasu L-glutaminowego z otrzymaniem kwasu L-pirolidonowego (L-PCA). Estryfikacja L-PCA do estru oktylododecylowego L-PCA.	CPAI = 100 % PPAI = 0 %
Tocomix L70-IP Organic CO	Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil	Antyoksydant	Tokoferol - nasiona soi jako produkt odpadowy po produkcji oleju sojowego; Olej słonecznikowy - nasiona słonecznika	Tokoferol - techniki rozdzielania strumienia rafinacyjnego po produkcji oleju sojowego, oczyszczanie; Olej z nasion słonecznika - tłoczenie nasion	PPAI = 100 % CPAI = 0 %
Apricot Kernel Oil RBDW	Prunus Armeniaca Kernel Oil	Emolient	Pestki moreli jako odpady z przemysłu spożywczego	Tłoczenie pestek	PPAI = 100 % CPAI = 0 %
Massocare Propanediol Nat MB	Propanediol	Humektant, booster konserwacji	Olej palmowy z certyfikatem RSPO	Proces fermentacji glicerolu pochodzącego z oleju palmowego. Następnie procesy: sterylizacji, filtracji, kondensacji, desalinacji, frakcjonowania.	CPAI = 99,5 % PPAI = 0 %
RonaCare® Magnesium Sulfate	Magnesium Sulfate	Stabilizator emulsji typu w/o	Minerał	Naturalnie występujący w przyrodzie	PPAI = 0 % CPAI = 0 %
E-Leen Green C	Pentylene Glycol, Glyceryl Caprylate/ Caprate	Konserwant alternatywny spoza listy konserwantów znajdującej się w załączniku nr V do rozporządzenia (WE) NR 1223/2009.	Glikol pentylenowy - trzcina cukrowa; Monogliceryd kwasu kaprylowego - olej z nasion palmy olejowej, olej kokosowy, olej rzepakowy, olej słonecznikowy	Glikol pentylenowy: destylacja parowa wyłoków trzciny cukrowej, katalityczne uwodornienie, oczyszczanie; Monogliceryd kwasu kaprylowego – pochodzenia roślinnego, stapianie w temperaturze 40-	CPAI = 100 % PPAI = 0 %

				50 °C i dodanie do glikolu pentylenowego, a następnie mieszanie w temperaturze pokojowej.	
Citropol H	Polycitronellol	Emolient	Recycling terpentyny powstającej z sosny, jako produkt uboczny przy produkcji papieru.	Eteryfikacja	**
Instathix®	Xanthan Gum, Sodium Stearoyl Lactylate, Tapioca Starch, Algin	Zagęstnik	Guma ksantanowa - fermentacja glukozy; Skrobia z tapioki-tapioka; Algin - brązowe wodorosty; Sodium Stearoyl Lactylate-olej palmowy (RSPO).	Guma ksantanowa: fermentacja glukozy przez bakterie <i>Xanthomonas campestris</i> ; Skrobia z tapioki - przetwarzanie tapioki w procesach fizycznych; Algin: ekstrakcja brązowych wodorostów; Sodium Stearoyl Lactylate - estryfikacja oleju palmowego (RSPO) z biotechnologicznie uzyskanym kwasem mlekowym.	PPAI = 5 % CPAI = 95 %
HyaCare® Tremella	Tremella Fuciformis Sporocarp Extract	Zagęstnik, humektant	Owocniki grzybów <i>Tremella fuciformis</i>	Ekstrakcja i późniejsze oczyszczenie owocników <i>Tremella fuciformis</i> .	PPAI = 100 % CPAI = 0 %
Solagum AX	Acacia Senegal Gum, Xanthan Gum	Zagęstnik	Węglowodany - kukurydza, burak cukrowy, trzcina cukrowa; Guma akacjowa - wydzieliny z pnia i gałęzi drzewa akacjowego.	Guma ksantanowa - fermentacja węglowodanów za pomocą bakterii <i>Xanthomonas Campestris</i> ; guma akacjowa - oczyszczanie w procesach fizycznych wydzielin z drzewa akacjowego	CPAI = 45 % PPAI = 55 %
Amisoft ECS-22 W	Disodium Cocoyl	Surfaktant anionowy,	Kwas L-glutaminowy -	Kwas L-glutaminowy -	CPAI = 30 %

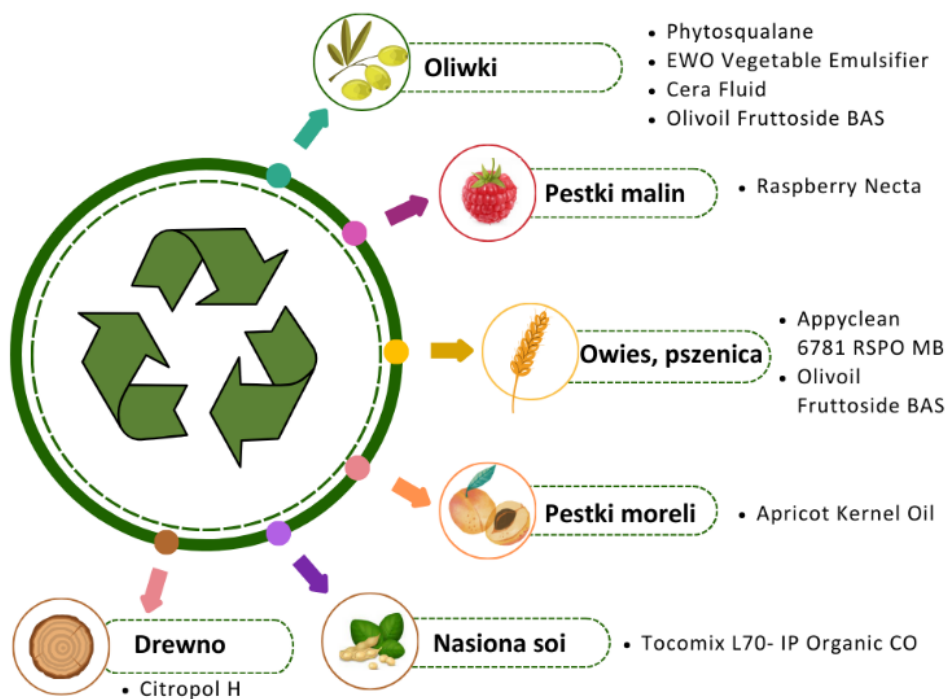
	Glutamate, Aqua	amino-kwasowy	trzcina cukrowa, buraki; kwasy tłuszczowe - palma kokosowa; wodorotlenek sodu - pochodzenie mineralne	proces fermentacji trzciny cukrowej i buraków; Reakcja kwasu L-glutaminowego z wodorotlenkiem sodu i kwasami tłuszczowym, a następnie neutralizacja.	PPAI = 0 %
Appyclean 6781 RSPO MB	Caprylyl/Capryl Wheat Bran/Straw Glycosides, Aqua	Surfaktant niejonowy	Alkohole tłuszczowe - z oleju palmowego; glukoza - z pszenicy / kukurydzy będących odpadem z przemysłu spożywczego; ksyloza - z biomasy lignocelulozowej pochodzącej z drewna.	Synteza alkoholi tłuszczowych C8-C10 z D-pentozą lub D-glukozą, następnie ewaporacja i dekoloryzacja.	CPAI = 60 % PPAI = 0 %
Olivoil Fructoside BAS	Sodium Cocoyl/Olivoyl Hydrolyzed Oat Protein, Fructosyl Cocoate/Olivate, Fructose, Aqua	Surfaktant niejonowy	Skrobia z owsa oraz oliwki jako odpad z przemysłu spożywczego	Hydroliza roślinnych protein otrzymanych z upcyklingu skrobi owsianej do aminokwasów i fruktozy, a następnie połączenie ich z kwasami tłuszczowymi z oleju z oliwek oraz oleju kokosowego za pomocą kondensacji.	CPAI = 28 %, PPAI = 0 %
Sophance LA-A	Glycolipids, Sodium Lactate, Aqua	Bio-surfaktant, soforolipid	Rzepak, kukurydza	Proces fermentacji z użyciem drożdży Candida Bombicola, odzyskiwanie i oczyszczanie	CPAI = 48 % PPAI = 0,02 %
Imderma lab® Tea Gem	Camellia Oleifera Seed Extract	Biosurfaktant roślinny	Nasiona kamelii olejodajnej	Ekstrakcja nasion	PPAI = 60 % CPAI = 40 %
Fludifeel Easy	Lauryl Glucoside, Myristyl Glucoside,	Emulgator tworzący emulsje typu o/w	Glukoza - nasiona pszenicy lub kukurydzy; alkohole tłuszczowe-	Glukozyd laurylowy, glukozyd mirystylowy - glikozylacja	CPAI = 61 % PPAI = 0 %

	Polyglyceryl-6 Laurate		nasiona palmy lub miąższ kokosa; gliceryna- rzepak, słonecznik; kwas laurynowy- rzepak, słonecznik.	glukozy i alkoholi tłuszczowych; Laurynian poliglicerolu-6 - polimeryzacja gliceryny, estryfikacja poliglicerolu-6 z kwasem laurynowym.	
Tego Remo 95 MB	Sorbitan Caprylate, Glyceryl Oleate, Aqua	Zagęstnik do układów surfaktantowych, emolient	Palma, kukurydza, rzepak, słonecznik pszenica	Mieszanie kaprylanu sorbitanu z oleinianem glicerylu i wodą	CPAI = 95 % PPAI = 0 %
Surfinesse™ Cleanse	Polyglyceryl-4 Olivat, Ethyl Olivat, Tocopherol	Surfaktant	Pochodzenie roślinne	Reakcja estryfikacji kwasów tłuszczowych z oliwek z poliglicerolem-4, lub etanolem dając odpowiednio: oliwian poliglicerolu-4, lub oliwian etylu.	CPAI = 99,8 %, PPAI = 0 %
KAK HL	Hexyl Laurate	Emolient	Pochodzenie roślinne	Estryfikacja kwasu laurynowego i alkoholu heksylowego	CPAI = 100 %, PPAI = 0 %
Gosulin IL	Isoamyl Laurate, Isoamyl Cocoate	Emolient	Alkohol izoamylowy - trzcina cukrowa, burak cukrowy pszenica, jęczmień; kwas laurynowy - palma olejowa	Alkohol izoamylowy - powstaje z alkoholu fuzlowego otrzymanego jako produkt uboczny procesu fermentacji stosowanego w przemyśle alkoholowym. Następnie estryfikacja alkoholu izoamylowego z kwasem laurynowym.	CPAI = 100 %; PPAI = 0 %
Emotion Silky	Neopentyl Glycol Dipelargonate	Emolient	Kwasy tłuszczowe z ostropestu plamistego; glikol neopentylenowy - synteza.	Destylacja i hydroliza oleju z nasion ostropestu plamistego do kwasu pelargonowego. Estryfikacja kwasów tłuszczowych i	**

				glikolu neopentyłowego.	
Rice Bran Oil	Oryza Sativa (Rice) Bran Oil	Emolient	Otręby ryżowe	Ekstrakcja otrębów ryżowych	PPAI= 100% CPAI= 0%

1.3.1. Surowce z upcyklingu

Szacuje się, że ponad jedna trzecia całkowitej produkcji rolnej w UE i Wielkiej Brytanii jest tracona z powodu niespełniania standardów estetycznych, co odpowiada około 1,3 miliarda ton rocznie [30]. Pozostałości z przemysłu rolno- spożywczego najczęściej trafiają na wysypiska śmieci, produkując znaczne ilości metanu, co stanowi 8-10 % całkowitej antropogenicznej emisji gazów cieplarnianych [31-32]. Odpowiedzią na problemy marnowania żywności oraz wsparciem gospodarki w obiegu zamkniętym jest upcykling, czyli proces ponownego wykorzystania produktów ubocznych pochodzących z przemysłu w celu wytworzenia nowych surowców o wartości dodanej [32-34]. Obszerny opis wykorzystania upcyklinu odpadów do produkcji surowców kosmetycznych znajduje się w publikacji [D1]. Na podstawie selekcji składników w recepturach dermokosmetyków będących przedmiotem niniejszej pracy wykorzystano surowce pochodzące z upcyklingu odpadów z przemysłu spożywczego: oliwek, otrębów owsianych i ryżowych, pulpy malin, nasion soi, buraków cukrowych, pestek moreli, trawy pszenicznej, a także z przemysłu drzewnego: terpentyny oraz biomasy lignocelulozowej z drewna. Pełnią one funkcje emolientów, emulgatorów, surfaktantów oraz antyoksydantów (rys. 2).



Rysunek 2. Surowce otrzymane z upcyklingu odpadów wykorzystane w pracy [schemat własny].

1.3.2. Surowce otrzymane w procesie fermentacji

Fermentacja to reakcja beztlenowego rozkładu związków organicznych za pomocą enzymów produkowanych przez mikroorganizmy, która dostarcza zrównoważonych rozwiązań dla wielu branż umożliwiając produkcję chemikaliów, biopaliw, biotworzyw, czy energii elektrycznej [35]. Na potrzeby przemysłu kosmetycznego jest wykorzystywana głównie do produkcji biofermentów będących składnikami aktywnymi, biosurfaktantów, emolientów, humektantów, zagęstników, barwników [35].

Biofermenty to innowacyjne surowce uzyskane w procesie fermentacji przeprowadzonej przy użyciu odpowiednio dobranych szczepów bakterii, lub drożdży, a także bakterii i drożdży jednocześnie. Fermentacji mogą podlegać zarówno odpady z przemysłu spożywczego, takie jak biomasa roślinna, owoce, warzywa, serwatka, pancerzyki krewetek, a także surowce roślinne nie stanowiące odpadów [36-37]. Otrzymywanie surowców kosmetycznych w wyniku procesów fermentacji niesie wiele korzyści. Poza wykorzystaniem zasobów odnawialnych oraz redukcją śladu węglowego poprzez wsparcie gospodarki o obiegu zamkniętym, poprawie ulega biodostępność składników aktywnych, ponieważ związki wielkocząsteczkowe są przekształcane w niskocząsteczkowe [38-39]. Ponadto, surowce aktywne otrzymane w wyniku fermentacji mają wartość dodaną w porównaniu z surowcami uzyskanymi metodą ekstrakcji. Poza substancjami aktywnymi pochodzącymi z substratu, zawierają one produkty metabolizmu bakterii i drożdży wykorzystywanych w procesie, takie jak białka, ceramidy, aminokwasy, kwasy i przeciwutleniacze, a także lizaty bakterii, dzięki czemu ostateczny surowiec wykazuje zwiększoną bioaktywność i biogodność [40]. W zależności od substratu poddanego procesowi fermentacji oraz rodzaju szczepów mikroorganizmów biofermenty posiadają właściwości przeciwzapalne, immunomodulujące, przeciwbakteryjne, antyoksydacyjne oraz postbiotyczne wspierając równowagę mikrobiomu skóry [39].

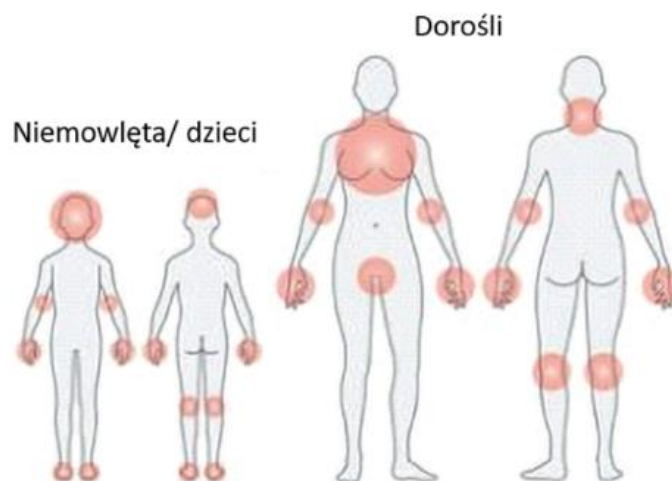
Drugą istotną grupą surowców fermentacyjnych wykorzystywanych w przemyśle kosmetycznym są biosurfaktanty produkowane przez bakterie, drożdże, lub grzyby z różnych substratów, takich jak oleje, cukry, alkany, różnego rodzaju odpady z przemysłu spożywczego i mleczarskiego [35,39]. Osobną grupę biosurfaktantów stanowią saponiny produkowane bezpośrednio przez rośliny. Substancje te stanowią łagodną dla skóry oraz nietoksyczną dla środowiska alternatywę dla surfaktantów syntetycznych. Proces otrzymywania biosurfaktantów zużywa mniej wody i energii w porównaniu z procesem syntezy konwencjonalnych surfaktantów pochodzenia petrochemicznego, pozwala wykorzystać odpady z innych gałęzi przemysłu, a powstałe związki są łatwo biodegradowalne i wykazują niską toksyczność dla organizmów wodnych [39]. Produkty te mają również większą zdolność pianotwórczą w niższych temperaturach oraz są lepiej tolerowane przez skórę wrażliwą i problematyczną ze względu na niski potencjał drażniący [35,39]. Kryteria klasyfikacji biosurfaktantów dotyczą masy cząsteczkowej, mikroorganizmu produkującego oraz struktury chemicznej. Do najczęściej wykorzystywanych w przemyśle kosmetycznym należą niskocząsteczkowe glikolipidy zbudowane z węglowodanów i długołańcuchowych kwasów alifatycznych oraz wielkocząsteczkowe

lipoproteiny zbudowane z aminokwasów i grup karboksylowych i hydroksylowych 14-węglowego łańcucha kwasów tłuszczowych [39].

Szczegółowy opis surowców kosmetycznych otrzymanych w procesie fermentacji odpadów pochodzących z przemysłu spożywczego, mleczarskiego i winnego, ich właściwości oraz działanie na skórę, a także rodzaje szczepów bakterii oraz drożdży wykorzystywanych w tym procesie przedstawiono w publikacji [D1]. Główny surowiec aktywny o nazwie handlowej Centella asiatica Bioferment GEO wykorzystany w recepturach dermokosmetyków będących przedmiotem niniejszej pracy został otrzymany w wyniku fermentacji liści wąkroty azjatyckiej za pomocą bakterii *Lactobacillus reuteri* i dokładnie opisany w rozdziale 3, podrozdziale 3.3.2. Pozostałe składniki aktywne wykorzystane w recepturach, otrzymane w wyniku fermentacji to ceramid NP będący składową surowca Cerafluid oraz 1,3-propanediol, zamiennik glikolu propylenowego, pełniący funkcję humektantu i wspomagający działanie konserwantu. Jako produkt uboczny procesu fermentacji stosowanego w przemyśle alkoholowym otrzymano również alkohol izoamyłowy, jeden z substratów reakcji estryfikacji niezbędnej do otrzymania emolientu o nazwie handlowej Gosulin IL. Istotnymi składnikami są biosurfaktanty, otrzymane zarówno w procesie fermentacji glukozy i nienasyconych kwasów tłuszczowych C-18 z udziałem drożdży *Candida Bombicola* (surowiec Sophance LA-A) oraz w wyniku niskotemperaturowej ekstrakcji z nasion kamelii olejodajnej *Camellia oleifera* (surowiec Indermalab® Tea Gem). Surowiec Sophance LA-A należy do glikolipidów, a dokładniej do soforolipidów zbudowanych z soforozy (dimeru glukozy) i długiego łańcucha hydroksylowych kwasów tłuszczowych. Poza właściwościami myjącymi, wykazuje właściwości przeciwbakteryjne przeciwko *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cutibacterium (Propionibacterium) acne* i przeciwgrzybicze przeciwko *Candida albicans* i *Aspergillus Niger* [41]. Ponadto, w recepturach wykorzystano zagęstniki fazy wodnej emulsji, których jednym ze składowych jest guma ksantanowa otrzymana w procesie fermentacji z użyciem bakterii *Xanthomonas campestris*.

2. Atopowe zapalenie skóry (AZS)

Atopowe zapalenie skóry (AZS, atopic dermatitis) jest powszechnie występującą, zapalną chorobą skóry o przewlekłym i nawrotowym przebiegu. Dotyczy 15-20 % dzieci i 7-14 % dorosłych [42]. Najczęściej rozpoczyna się we wczesnym dzieciństwie, z czego ponad 50 % przypadków AZS przypada na pierwszy rok życia dziecka. Natomiast u 90 % chorych objawy pojawiają się do 5 roku życia. Pomimo, iż w większości przypadków obserwuje się tendencję do ustępowania zmian i remisję choroby wraz z wiekiem pacjenta, coraz częściej atopowe zapalenie skóry dotyczy także osób dorosłych i ma tzw. późny przebieg [15,43]. Charakterystycznym objawem choroby jest uporeczywy, silny świąd powstający na podłożu suchej skóry, a także typowe umiejscowienie zmian oraz ich obraz, zmieniające się wraz z wiekiem chorego (rys.3).



Rysunek 3. Miejsca predylekcyjne do występowania zmian atopowych u niemowląt i dzieci oraz osób dorosłych [zaadoptowane z 15].

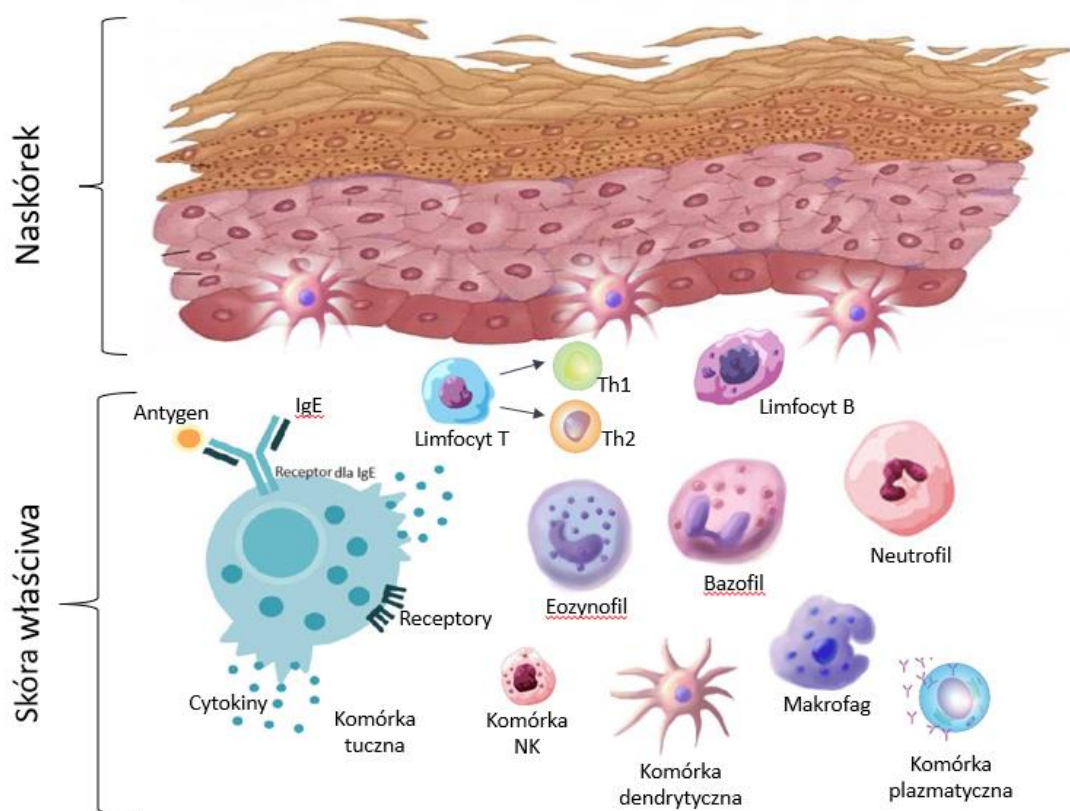
Zmiany zapalne na skórze widoczne są w postaci grudek, pęcherzyków, guzków, przeczosów, nadżerek i strupów. W efekcie przewlekłego drapania wywołanego świądem dochodzi do pogrubienia naskórka, tzw. lichenizacji. Skóra w tych miejscach wygląda tak, jakby była oglądana przez szkło powiększające. Wzmoczona suchość skóry (xerosis) objawia się nadmiernym złuszczeniem, szorstkością, zaczerwienieniem, świądem, pieczeniem i ściągnięciem. W skrajnych przypadkach dochodzi do powstawania pęknięć naskórka [43,44]. U chorych często współistnieją inne choroby o podłożu alergicznym, jak alergiczny nieżyt nosa oraz alergie pokarmowe. Dodatni wywiad rodzinny w kierunku atopowego zapalenia skóry i alergii jest jednym z głównych kryteriów rozpoznawczych choroby [45].

2.1. Patogeneza atopowego zapalenia skóry

Patogeneza AZS jest bardzo złożona i obejmuje interakcję czynników genetycznych i środowiskowych, zaburzeń układu immunologicznego, dysfunkcję bariery naskórkowej oraz nieprawidłowości mikrobiomu skóry i jelit [45-48]. Czynniki środowiskowe, takie jak alergeny pokarmowe i powietrzno pochodne warunki klimatyczne, zanieczyszczenie środowiska, czynniki psychosomatyczne (stres) oraz hormonalne należą do markerów wyzwalających wystąpienie choroby [43,45]. Niestety, w ostatnich latach warunki środowiskowe są coraz bardziej niekorzystne dla osób cierpiących na AZS. Wzrost zanieczyszczenia powietrza i żywności, ocieplenie klimatu, wysoko przetworzona żywność, a także szybkie tempo życia i stres przyczyniły się do ponad dwukrotnego zwiększenia zachorowalności na atopowe zapalenie skóry w ostatnich latach [44,49]. Z punktu widzenia wspomagania leczenia atopowego zapalenia skóry z wykorzystaniem produktów dermokosmetycznych szczególnie istotne jest zrozumienie zaburzeń immunologicznych zachodzących w skórze chorych, dysfunkcji bariery naskórkowej oraz zaburzeń w składzie mikrobiomu skóry.

2.1.1. Zaburzenia immunologiczne

Zaburzenia immunologiczne odpowiedzialne są za ostry i przewlekły stan zapalny skóry chorych na AZS, u których dochodzi do nadprodukcji przeciwciał IgE w surowicy (mechanizmy humoralne) oraz limfocytów T pomocniczych, głównie z linii Th2 (mechanizmy komórkowe) [45,47]. Ponadto, ze strony układu immunologicznego w patomechanizmie AZS biorą udział komórki Langerhansa znajdujące się w warstwie podstawnej naskórka, komórki dendrytyczne umiejscowione w skórze właściwej oraz pozostałe komórki naciekające miejsce zapalenia: komórki tuczne, eozynofile, bazofile, neutrofile, makrofagi (rys. 4).



Rysunek 4. Układ immunologiczny skóry [schemat własny].

Immunoglobuliny IgE aktywują komórki tuczne, co prowadzi do uwalniania mediatorów stanu zapalnego (rys. 4), a w konsekwencji nacieku komórek zapalnych, takich jak eozynofile i limfocyty, które obecne są w zmienionej chorobowo skórze. W patogenezie AZS biorą również udział limfocyty CD4+, które mają tendencję do różnicowania w kierunku linii limfocytów Th2, z upośledzeniem proliferacji linii Th1. Natomiast prawidłową odpowiedź immunologiczną warunkuje równowaga między limfocytami Th1 i Th2. U zdrowych ludzi po kontakcie z antygenem większość limfocytów T różnicuje się w kierunku subpopulacji Th1, a tylko niewielka liczba do Th2. Sytuacja jest odwrotna w przypadku chorych na AZS, gdzie dochodzi do zaburzenia proporcji limfocytów Th1 w stosunku do Th2, czego przyczyną prawdopodobnie jest obniżona nadwrażliwość typu późnego, uszkodzenie bariery

naskórkowej, a przez to słabsza miejscowa odporność na infekcje bakteryjne i wirusowe oraz skłonność do kolonizacji skóry przez mikroorganizmy [45,47]. Nadmierna aktywność limfocytów Th2 we wczesnej fazie odpowiedzi immunologicznej (fazie ostrej) IgE-zależnej prowadzi do zwiększonej produkcji i uwalniania cytokin: interleukiny 4, 5, 6, 10, 13, 31 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-31), przy jednocześnie obniżonej syntezie interferonu gamma (INF- γ) i czynnika α martwicy nowotworów (TNF- α) przez limfocyty Th1, ponieważ nadmiar limfocytów Th2 ma hamujący wpływ na limfocyty Th1 [50-51]. Z kolei uwolnione przez limfocyty Th2 cytokiny stymulują limfocyty B do produkcji przeciwciał IgE, a skóra staje się bardziej podatna na zakażenia gronkowcem złocistym (*Staphylococcus aureus*) [51]. W późnej fazie odpowiedzi immunologicznej IgE-zależnej występuje przewaga limfocytów Th1, wytwarzających szereg cytokin prozapalnych odpowiedzialnych za przewlekłe zmiany zapalne o charakterze wyprysku [50-51].

2.1.2. Dysfunkcja bariery naskórkowej

Skóra zbudowana jest z trzech warstw: naskórka, skóry właściwej oraz tkanki podskórnej. Najbardziej zewnętrzną warstwą jest naskórek składający się z czterech warstw zbudowanych z keratynocytów: warstwy podstawnej, kolczystej, ziarnistej oraz najbardziej zewnętrznej- warstwy rogowej (rys. 5) [52]. W skórze dłoni i stóp, tuż pod warstwą rogową występuje dodatkowo piąta warstwa, zwana warstwą jasną [53]. Naskórek, a dokładniej warstwa rogowa pełni fizyczną i funkcjonalną barierę ochronną dla głębiej położonych warstw skóry. Bariera naskórkowa odgrywa kluczową rolę w zapobieganiu przenikania mikroorganizmów, alergenów, toksyn i innych zanieczyszczeń środowiskowych do organizmu, a także chroni przed nadmierną utratą wody (TEWL) [47,53]. Prawidłowo funkcjonująca bariera naskórkowa wynika z budowy naskórka oraz procesów w nim zachodzących. W warstwie podstawnej komórki keratynocytów intensywnie się dzielą, tworząc nowe komórki, które przemieszczają się przez warstwę kolczystą i ziarnistą, ulegając stopniowej keratynizacji, aby w warstwie rogowej przekształcić się w pozbawione jądra komórkowego martwe korneocyty, zawierające keratynę odporną na działanie czynników zewnętrznych [53]. Proces przejścia keratynocyty z warstwy podstawnej do warstwy rogowej (ang. turn-over time) w zdrowej skórze trwa zwykle 28 dni. Po tym czasie połączenia między korneocytami (korneodesmosomy) ulegają enzymatycznej degradacji i następuje złuszczenie korneocytów [53].

Korneocyt zbudowany jest z rdzenia zawierającego filagrynę oraz koperty zawierającej lorikrynę i involucrynę. Białka te są kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania bariery naskórkowej. Funkcją filagryny jest spajanie włókien keratynowych w procesach dojrzewania keratynocytów i ich różnicowania w korneocyty. Zarówno proces powstawania filagryny w warstwie ziarnistej z jej prekursora- profilagryny, jak i proteoliza do składników naturalnego czynnika nawilżającego (NMF), między innymi kwasu mlekowego i urokinowego ma znaczący wpływ na prawidłowe funkcjonowanie bariery naskórkowej poprzez utrzymanie właściwego poziomu nawilżenia oraz kwasowego pH powierzchni naskórka [53-54].

Proces tworzenia składowych bariery naskórkowej zaczyna się już w warstwie ziarnistej, gdzie powstaje filagryna oraz w ciałkach lamelarnych Odlanda produkowane są lipidy cementu międzykomórkowego, które następnie są uwalniane do przestrzeni międzykomórkowej. Lipidy zapobiegają nadmiernemu parowaniu wody z naskórka. Skład cementu międzykomórkowego przedstawiono w tabeli nr 4. Komórki keratynocytów warstwy ziarnistej są ze sobą połączone za pomocą tzw. połączeń ścisłych (ang. tight junction) zbudowanych z białka adhezyjnego - kładyny, która zaraz po filagrynie jest drugim bardzo ważnym białkiem wpływającym na integralność bariery naskórkowej [53,55,56].

Tabela 4. Skład cementu międzykomórkowego warstwy rogowej naskórka [53].

Cement międzykomórkowy			
Naturalny czynnik nawilżający (NMF)	Zawartość [%]	Lipidy	Zawartość [%]
Aminokwasy (seryna, cytrulina)	40%	Ceramidy	40%
Sole amonowe, kwas moczowy, glukozamina	17%	Sterole (cholesterol) i pochodne	25%
Mleczany, cytryniany, mrówczany, chlorki, fosforany	12%	Wolne kwasy tłuszczowe	18%
Kationy sodu, potasu, wapnia oraz inne	12%	Węglowodory	11%
Kwas piroglutaminowy (PGA)	12%	Inne polarne lub niepolarne lipidy	6%
Mocznik	7%		

Ponadto, na prawidłowe funkcjonowanie bariery naskórkowej i proces złuszczenia korneocytów wpływa aktywność proteazy serynowej oraz jej inhibitorów, które regulują proces rozkładu białek budujących korneodesmosomy oraz syntezę lipidów warstwy rogowej. Nie bez znaczenia dla bariery naskórkowej pozostaje równowaga mikrobiomu skóry, na którą wpływ ma między innymi produkcja peptydów przeciwdrobnoustrojowych przez ciała lamelarne oraz fizjologiczne pH powierzchni skóry przyjmujące wartość zbliżoną do 5,5 [54-56].

Podsumowując, bariera naskórkowa składa się z odpowiednio zróżnicowanych korneocytów, ułożonych jak cegły w murze i połączonych za pomocą włókien białkowych- korneodesmosomów oraz cementu międzykomórkowego składającego się z NMF oraz lipidów ułożonych w warstwy lamelarne (tab. 4; rys. 6). Integralność i nieprzepuszczalność bariery naskórkowej warunkują również ścisłe połączenia między komórkami w warstwie ziarnistej, aktywność proteazy serynowej regulowana przez jej inhibitory oraz aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych, a także kwaśne pH powierzchni naskórka i równowaga mikrobiomu skóry (rys. 6) [47,52,54- 56].

Dysfunkcja bariery naskórkowej jest początkowym etapem rozwoju AZS i polega na występowaniu nieprawidłowości w składzie i funkcjonowaniu naskórka. Przyczynia się do tego wiele czynników:

➤ **Mutacja genu kodującego filagrynę**

Jest to związane z niedoborem filagryny, lub całkowitym jej brakiem, co skutkuje zaburzeniami w procesie różnicowania keratynocytów oraz składzie naturalnego czynnika nawilżającego (NMF), powodując nadmierną suchość skóry oraz zwiększoną przeznaskórkową utratę wody (TEWL). Podwyższeniu ulega również pH powierzchni naskórka, powodując zaburzenia w składzie mikrobiomu skóry oraz zwiększoną kolonizację gronkowcem złocistym (*Staphylococcus aureus*). Mutacja w genie filagryny jest uznawana za główny czynnik predysponujący do rozwoju AZS, jednak niewystarczający do wystąpienia choroby, ponieważ jest ona wieloczynnikowa [47, 54-57].

➤ **Zaburzenia połączeń ścisłych między komórkami**

Powodem jest ograniczenie ekspresji genów dla kładyny oraz upośledzenie funkcji biologicznej tego białka. Skutkuje to zmniejszeniem spójności komórek warstwy ziarnistej, a w konsekwencji zwiększoną utratą wody przez naskórek (TEWL), zwiększoną penetracją alergenów i drobnoustrojów [55-57].

➤ **Zwiększona aktywność proteazy serynowej**

Jedną z przyczyn jest mutacja w genie SPINK5 kodującym inhibitor proteazy serynowej LEKTI. Upośledzona regulacja aktywności proteazy serynowej powoduje rozkład białek w obrębie korneodesmosomów mających wpływ na spójność warstwy rogowej i jej prawidłowe złuszczenie. Dochodzi wówczas do rozszczelnienia warstwy korneocytów, ich nadmiernego złuszczenia, zwiększenia TEWL oraz suchości skóry [54,55,57].

➤ **Obniżony poziom oraz zaburzenia w składzie lipidów cementu międzykomórkowego**

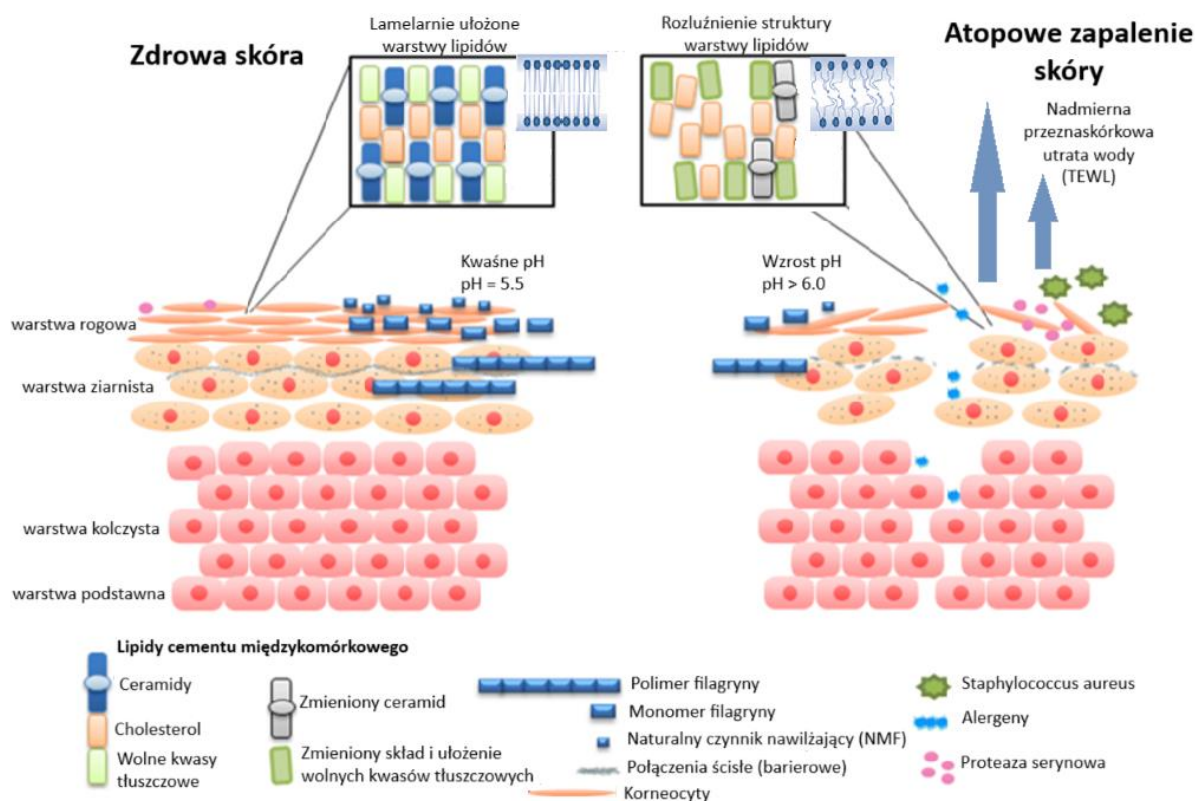
Niedobór ceramidów, wolnych kwasów tłuszczowych i cholesterolu w warstwie rogowej naskórka wiąże się z nadaktywnością proteazy serynowej, która degradowe enzymy takie jak β -glukocerebrozydazę i sfingomielinazę, przetwarzające lipidy warstwy rogowej. Dodatkowo zmniejsza ona sekrecję lipidów warstwy rogowej przez ciała lamelarne, skutkując niedoborem ceramidów, które odpowiadają za prawidłowy poziom wody w naskórku i uczestniczą w regulacji przepuszczalności wewnątrzkomórkowego. Ich niski poziom skutkuje stałym pobudzaniem keratynocytów oraz wydzielaniem cytokin prozapalnych. Zwiększa to przepuszczalność warstwy rogowej dla alergenów i bakterii, wzrost TEWL, nadmierną suchość skóry oraz dysbiozę [55-58].

➤ **Obniżony poziom peptydów przeciwdrobnoustrojowych**

Dysregulacja immunologiczna i wydzielanie cytokin, takich jak interleukina (IL) 4 i IL-13 ogranicza ekspresję peptydów przeciwdrobnoustrojowych fizjologicznie obecnych w skórze- katelicydyn i

defensyn. Skutkiem tego jest kolonizacja skóry przez bakterię *Staphylococcus aureus* i zaburzenia w składzie mikrobiomu skóry, który obecnie uważany jest za najbardziej powierzchniową warstwę naskórka, tzw. *stratum microbiotum* [47 55,57].

W efekcie powyższych mechanizmów znacznie wzrasta skłonność do rozwoju stanu zapalnego oraz przenikania potencjalnych alergenów i czynników drażniących przez naskórek. Na rysunku nr 6 przedstawiono porównanie budowy bariery naskórkowej w zdrowej skórze oraz w skórze z AZS.



Rysunek 5. Bariera naskórkowa w zdrowej skórze oraz w skórze dotkniętej atopią [zaadaptowano z 52 i dostosowano].

2.1.3. Zaburzenia w składzie mikrobiomu skóry

W zdrowej skórze bakterie komensalne na powierzchni naskórka są w równowadze do bakterii patogennych. Prawidłowy mikrobiom cechuje się bioróżnorodnością gatunkową i wysoką stabilnością. W przebiegu AZS, szczególnie w postaci umiarkowanej i ciężkiej, na skutek zaburzonych funkcji bariery naskórkowej dochodzi do dysproporcji pomiędzy bakteriami komensalnymi, a patogennymi. Objawia się to zmniejszeniem liczby bakterii komensalnych z rodzajów *Streptococcus*, szczególnie *Streptococcus epidermidis*, a także *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Proteobacteria* oraz wzrostem liczebności bakterii patogennych z rodzaju *Staphylococcus*, w szczególności *Staphylococcus aureus* [48,59]. Zmiany ilościowe w składzie mikrobioty mogą wystąpić na długo przed wystąpieniem objawów klinicznych choroby. *Staphylococcus aureus* należący do bakterii Gram (+) jest najczęstszym patogenem powodującym kliniczne objawy infekcji skóry [59]. Im większa kolonizacja skóry tym

patogendem, tym większe nasilenie zmian skórnych i cięższy przebieg choroby. *S. aureus* przyczynia się do dysfunkcji bariery naskórkowej zmniejszając zawartość filagryny w skórze, zaburzając strukturę korneocytów, podwyższając pH naskórka oraz zmniejszając wydzielanie peptydów o działaniu antybakteryjnym, takich jak defensyna i katelicydyna [43,59]. Ponadto, *S. aureus* uszkadzając barierę naskórkową przenika do wnętrza skóry właściwej nasilając stan zapalny oraz zmieniając odpowiedź układu immunologicznego. Enterotoksyny wydzielane przez patogen aktywują limfocyty i makrofagi oraz pobudzają ekspresję IL-31, która odpowiada za świąd [43,48,59]. Poza kolonizacją skóry przez patogenne bakterie, w okresie zaostrzeń choroby u chorych występuje zwiększona kolonizacja drożdżaków z gatunku *Malessezia*, głównie *Malessezia restricta*, *Malassezia globosa* i *Malessezia sympodialis*. Liczniej występują również grzyby: *Candida albicans* oraz *Cryptococcus*. W przebiegu AZS zaburzony jest nie tylko mikrobiom skóry, ale również jelitowy [59].

2.2. Pielęgnacja skóry z AZS

Niestety, AZS nie da się wyleczyć, jednak można osiągnąć wieloletnią remisję choroby poprzez profilaktykę oraz wspomaganie leczenia [18,60]. Kluczową rolę odgrywa przywrócenie prawidłowych funkcji bariery naskórkowej, a tym samym fizjologicznego pH powierzchni skóry i równowagi mikrobiomu, a także redukcja stanu zapalnego [18]. Poza leczeniem za pomocą glikokortykosteroidów miejscowych (mGKS), które stosuje się w łagodnym do umiarkowanego przebiegu choroby, a także stosowanych w ciężkiej postaci miejscowych inhibitorów kalcyneuryny (mIK), które hamują aktywację limfocytów T i uwalnianie cytokin prozapalnych ogromne znaczenie ma codzienna pielęgnacja skóry z użyciem produktów emolientowych, bez której nie ma skutecznego leczenia [17-18, 60]. Regularne stosowanie emolientów, kilka razy dziennie, znacznie zmniejsza prawdopodobieństwo progresji choroby i pomaga osiągnąć stan remisji [17-18]. W przeciwieństwie do glikokortykosteroidów, preparaty te mają znacznie mniej działań niepożądanych: nie powodują zahamowania syntezy kolagenu, i ścięczenia naskórka, nie uszkadzają bariery naskórkowej i mogą być bezpiecznie stosowane przez wiele miesięcy. Ponadto, mycie skóry atopowej znacząco wpływa na stan bariery naskórkowej. Mydła alkaliczne i detergenty rozpuszczają lipidy cementu międzykomórkowego oraz płaszcza lipidowego naskórka, a także podwyższają pH skóry przyczyniając się do pogłębiania dysfunkcji bariery naskórkowej [61]. Powodują również uwolnienie prozapalnych cytokin przez korneocyty warstwy rogowej naskórka wpływając na aktywność proteazy serynowej. Wykazują również działanie drażniące na skórę, szczególnie przy uszkodzonej barierze naskórkowej tak, jak ma to miejsce w AZS. Dlatego odpowiednio skomponowane i dobrane do potrzeb skóry atopowej produkty myjące są tak samo istotne w codziennej pielęgnacji, jak produkty emolientowe [61].

2.2.1. Rola emolientów

Termin „emolienty” ma dwojakie znaczenie. Może odnosić się zarówno do składników kosmetyków o charakterze lipofilowym, wykazujących działanie natłuszczające, regenerujące,

zmiękczone oraz wygładzające skórę, a także do grupy produktów kosmetycznych o zbliżonych właściwościach, przeznaczonych do pielęgnacji skóry suchej i atopowej. W podrozdziale odniesiono się do grupy produktów zawierających w swoim składzie fizjologiczne lipidy, takie jak ceramidy i wielonienasycone kwasy tłuszczowe, a także inne lipidy w postaci estrów kwasów tłuszczowych, glicerolipidów (fosfolipidów, triglicerydów), steroli (cholesterol) oraz wosków. Jak opisano w podrozdziale 2.1.2. macierz lipidowa w warstwie rogowej może odgrywać kluczową rolę jako część bariery skórnej, jednak w przebiegu AZS nie funkcjonuje ona prawidłowo. W skórze atopowej występują zaburzenia w składzie lipidów cementu międzykomórkowego oraz ich znaczne niedobory. Na mutacje genowe, które przyczyniają się do takiego stanu nie mamy wpływu, jednak możemy odbudowywać lipidy naskórkowe poprzez dostarczenie ich z zewnątrz, w postaci miejscowej aplikacji na skórę jako emolienty. W licznych badaniach udowodniono, że stosowanie emolientów kilka razy dziennie, również w okresie remisji choroby odbudowuje integralność bariery naskórkowej zmniejszając suchość, świąd oraz zapobiegając infekcjom skóry [17,18,60,62]. Bardzo ważny jest rodzaj zastosowanych składników emolienacyjnych w produkcie, ponieważ nie każdy emolient będzie odpowiedni dla skóry atopowej. Wykazano, że lipidy zgodne z fizjologicznymi lipidami występującymi w warstwie rogowej są szybko wchłaniane do komórek warstwy kłoczystej i ziarnistej, włączając się w ich struktury w procesie powstawania lipidów *de novo* [18,62]. Wykazują one zdecydowanie lepsze rezultaty w ograniczaniu przeznaskórkowej utraty wody (TEWL) od emolientów zawierających syntetyczne, okluzyjne składniki, jak parafina [62-63].

Szczególnym rodzajem emolientów są produkty „emolient plus”, które oprócz fizjologicznych lipidów zawierają również substancje czynne pochodzące z roślin, takie jak saponiny, czy flawonoidy o działaniu przeciwzapalnym i przeciwświądowym. Produkty te mogą również zawierać substancje aktywne zamknięte w różnego rodzaju nośnikach. Pojawiające się w ostatnich latach badania wykazały, że regularne stosowanie produktów „emolient plus” może przywrócić funkcję bariery naskórkowej, zmniejszyć produkcję cytokin prozapalnych oraz aktywację komórek tucznych. Ponadto, stosowanie tego typu produktów może opóźnić wystąpienie choroby i zmniejszyć zapotrzebowanie na miejscowe kortykosteroidy w leczeniu pacjentów z umiarkowaną do ciężkiej postaci choroby. Udowodniono również, że kuracja produktami „emolient plus” znacząco zmniejszyła świąd i rumień, jednocześnie zwiększając nawilżenie skóry u dorosłych cierpiących na AZS, a także zwiększyła różnorodność mikrobiomu skóry regulując jego równowagę [17, 64-66].

2.2.2. Łagodne mycie skóry

Kolejnym istotnym etapem w pielęgnacji skóry suchej i atopowej jest jej mycie z zastosowaniem łagodnych surfaktantów oraz substancji renowujących, które nie naruszają integralności bariery naskórkowej, ale wspomagają jej odbudowę oraz łagodzą suchość skóry. Wybór preparatu myjącego jest ważną, integralną częścią leczenia AZS. Niestety, większość surfaktantów ma potencjał drażniący, szczególnie w przypadku dysfunkcji warstwy rogowej naskórka. Ponadto, mogą

one uszkadzać barierę naskórkową na wiele sposobów. Jednym z nich jest denaturacja białek występujących w naskórku, takich jak filagryna, inwolukryna, czy lorikryna, ze względu na gęstość ładunku agregatów surfaktantów związanych z białkiem [67,68]. Innym mechanizmem jest uszkodzenie lipidów spowodowane przez adsorpcję surfaktantów do dwuwarstw lipidowych warstwy rogowej naskórka, zmieniając ich strukturę. Zasadowe pH produktu myjącego jest kolejnym czynnikiem uszkadzającym barierę naskórkową. W związku z tym mydła zasadowe, których pH waha się w przedziale 9-10 nie są dobrym wyborem. Najwyższy potencjał uszkodzenia białek i lipidów mają surfaktanty anionowe, zaraz po nich są surfaktanty amfoteryczne, a najmniejszy potencjał mają surfaktanty niejonowe, do których należą alkilopoliglukozydy (Appyclean 6781), soforolipidy (Sophance LA-A) oraz glukozydy (Olivoil Fruttoside BAS) zastosowane w recepturze emulsji do mycia ciała będącej jednym z pięciu produktów stanowiących cel niniejszej pracy. Potencjał drażniący surfaktantów anionowych można złagodzić zmniejszając ładunek anionowy poprzez włączenie różnych przeciwjonów i/lub kosurfaktantów, aby utworzyć mieszane micelle. Innym sposobem jest włączenie do receptury emolientów i humektantów [67,68].

Podsumowując, mydła zasadowe są kategorycznie przeciwwskazane do mycia skóry atopowej. Należy je zamienić na produkty typu syndet, oparte na syntetycznych surfaktantach, które mają pH lekko kwaśne (pH 5,5), zbliżone do fizjologicznego pH skóry. Badania wykazały poprawę kliniczną przy stosowaniu produktów myjących bez mydła w połączeniu z miejscowymi metodami leczenia AZS [69]. Przewagę środowiskową nad syndetami mają łagodne dla skóry oraz bezpieczne dla środowiska wodnego, łatwo biodegradowalne produkty myjące zawierające surfaktanty pochodzące z biofermentacji, niejonowe, o niskim potencjale drażniącym [39]. Ponadto, niezbędne dla ochrony bariery naskórkowej oraz jej odbudowy, a także złagodzenia działania surfaktantów są emolienty [67-69]

3. Wąkrota azjatycka [D2]

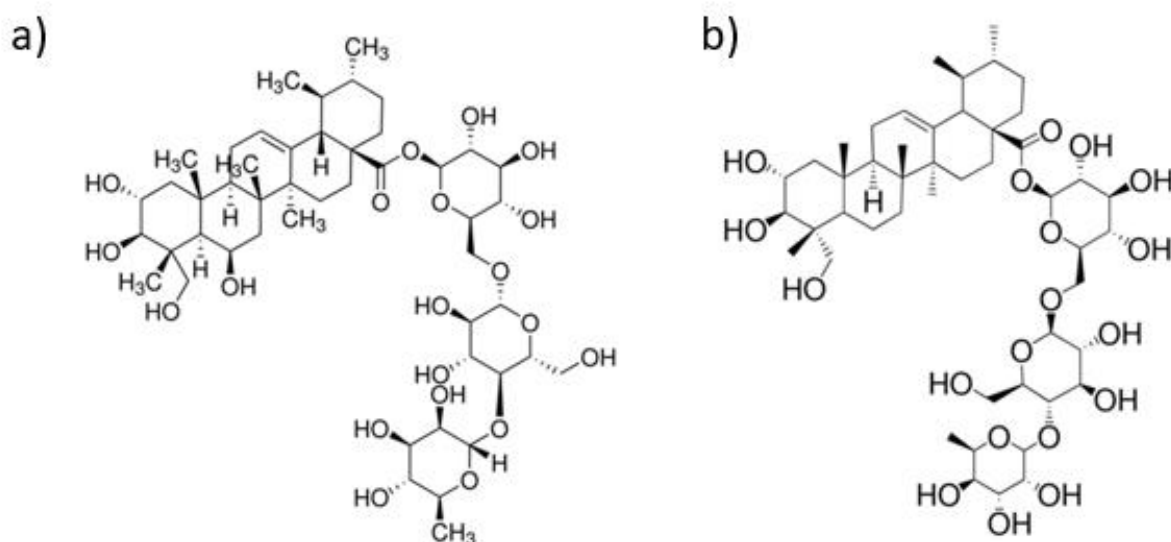
Wąkrota azjatycka (*Centella asiatica* L.) jest rośliną leczniczą należącą do rodziny *Apiaceae* (selerowatych), rosnącą wokół zbiorników wodnych, w krajach południowo-wschodniej Azji, głównie w Indiach, Chinach, Japonii, Malezji i Indonezji. Od blisko 3000 lat jest stosowana w medycynie ajurwedyjskiej, a w XIX wieku została wprowadzona do Farmakopei Indyjskiej [70-71]. Liczne, cenne właściwości rośliny były wykorzystywane w leczeniu chorób skóry: ran, blizn, oparzeń, trądu, łuszczycy, egzemy, twardziny skórnej, trądziku i bielactwa. Ponadto, wąkrota była stosowana doustnie w leczeniu chorób układu nerwowego, takich jak zaburzenia snu, depresja, choroba Alzheimera, a także w zaburzeniach endokrynologicznych, trawiennych i sercowo-naczyniowych [71-72]. Badania prowadzone na przestrzeni lat potwierdziły właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, immunomodulujące, przeciwbakteryjne, przywracające równowagę mikrobiomu jelitowego, neuroprotektoryjne, kardioprotektoryjne, hepatoprotektoryjne, przeciwłękowe, zapobiegające włóknieniu kolagenu, przeciwartretyczne, przeciwnowotworowe i przeciwdepresyjne wąkroty azjatyckiej [72-76].

Za wielokierunkowe działanie rośliny odpowiadają zawarte w liściach saponiny triterpenowe, głównie madekasozyd, kwas madekasowy, azjatykozyd oraz kwas azjatykowy. Mają one podobną strukturę, jednak każdy z nich ma nieco inne właściwości [77]. Inne substancje wyizolowane z części nadziemnej wąkroty azjatyckiej obejmują: monoterpeny, seskwiterpeny, garbniki, fitosterole, flawonoidy, olejki eteryczne, aminokwasy i witaminy, takie jak witamina C, witamina B1 i witamina B2 [71].

3.1. Madekasozyd i azjatykozyd- główne saponiny triterpenowe [D2]

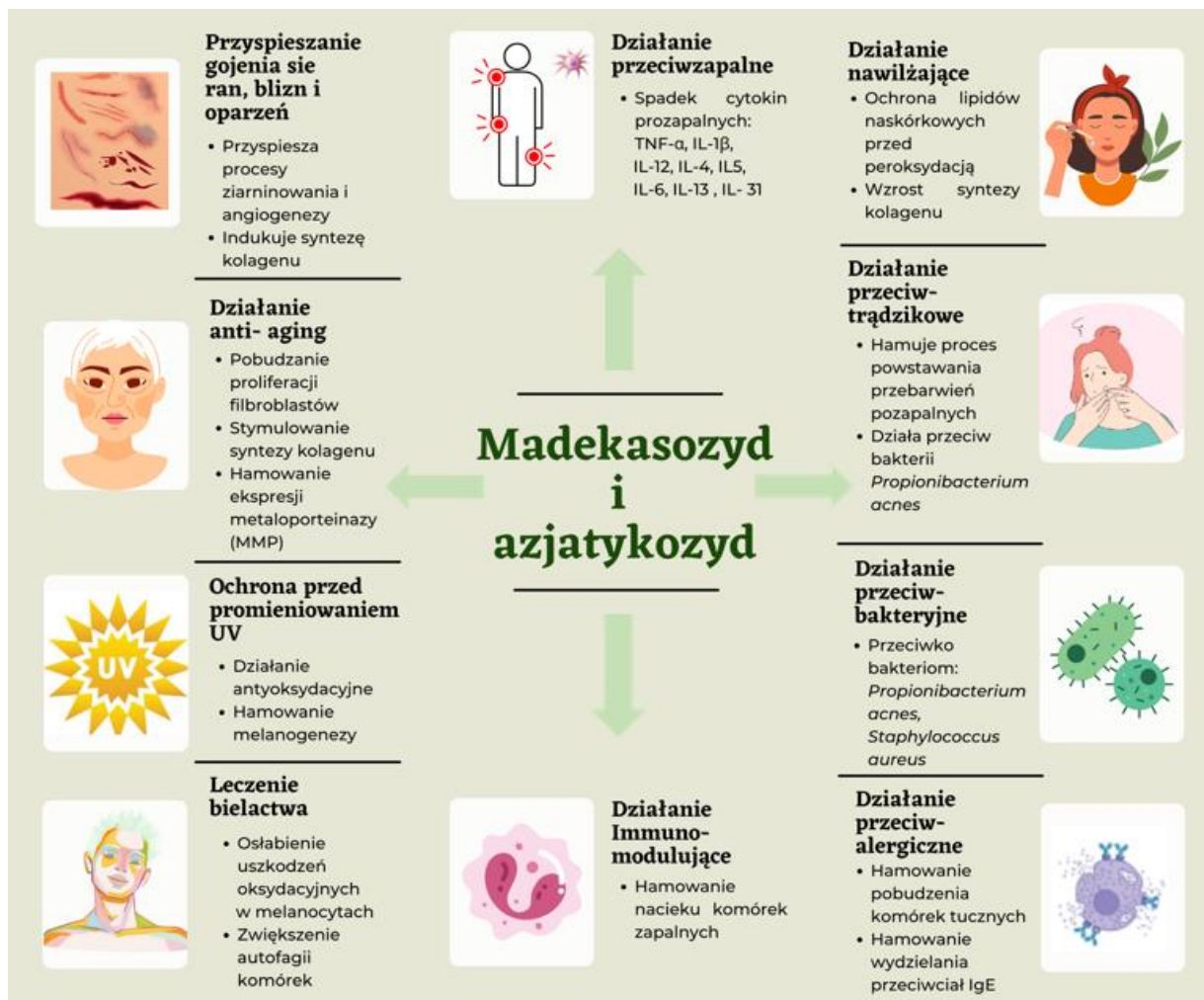
Przedstawiony rozdział opiera się na publikacji przeglądowej [D2] zatytułowanej „Saponiny triterpenowe pochodzące z *Centella asiatica* L.”. Dokonano w niej obszernej charakterystyki wąkroty azjatyckiej, opisano dostępne surowce rynkowe oraz skład chemiczny rośliny ze szczególnym uwzględnieniem właściwości terapeutycznych, zastosowania oraz budowy głównych saponin triterpenowych, takich jak madekasozyd, azjatykozyd, kwas madekasowy oraz kwas azjatykowy. W przeglądzie zwrócono uwagę na działanie tych związków na skórę oraz ich wykorzystanie w leczeniu dermatoz [D2].

Triterpeny obejmują najliczniejszą grupę substancji czynnych zawartych w ziele wąkroty azjatyckiej – stanowią do 8 % składowych rośliny [77]. Najwyższe stężenie oraz aktywność biologiczną wykazują pięciocykliczne glikozydy triterpenowe, pochodne ursanu- madekasozyd i azjatykozyd, których wzory strukturalne przedstawiono na rysunku 6. **Madekasozyd** to związek o wzorze sumarycznym $C_{48}H_{78}O_{20}$ i masie cząsteczkowej 975,1 g/mol. Wykazuje dobrą rozpuszczalność w wodzie i etanolu (100 mg/mL w 25 °C). Wzór sumaryczny azjatykozydu to $C_{48}H_{78}O_{19}$, a masa cząsteczkowa tego związku wynosi 959,1 g/mol. **Azjatykozyd** nie rozpuszcza się w wodzie i etanolu, natomiast jest dobrze rozpuszczalny w dimetylosulfotlenku DMSO (100 mg/mL w temp. 25 °C).



Rysunek 6. Wzory strukturalne: a) madekasozydu, b) azjatykozydu.

Substancje te wykazują szerokie spektrum działania ogólnoustrojowego: przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwwirusowe, antybakteryjne, immunomodulujące, wspomagające ziarninowanie, neuroprotektoryjne, hepatoprotektoryjne, ochronne na płuca [77-80]. Więcej informacji o szerokim działaniu tych związków znajduje się w publikacji [D2]. W kontekście niniejszej pracy szczególnie istotne jest wielokierunkowe działanie madekasozydu i azjatykozydu na skórę, które przedstawiono na rysunku 7.



Rysunek 7. Działanie madekasozydu i azjatykozydu na skórę [schemat własny na podstawie 79-81].

3.2. Wąkrota azjatycka we wspomaganiu leczenia AZS

Saponiny triterpenowe obecne w ekstrakcie z wąkroty azjatyckiej, lub wyizolowane z tej rośliny jako czyste związki chemiczne, wykazują działanie w odpowiedzi na kluczowe procesy zapalne zachodzące w skórze osób chorych na AZS. W przeprowadzonych w ciągu ostatniej dekady nadal nielicznych badaniach na modelach mysich, gdzie indukowano wystąpienie atopowego zapalenia skóry udowodniono działanie immunomodulujące, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze oraz regulujące mikrobiom skóry po zastosowaniu ekstraktu z wąkroty azjatyckiej lub wyizolowanych z niego triterpenów: madekasozydu, azjatykozydu, kwasu azjatykowego i kwasu madekasowego [21,

82-87]. W badaniu przeprowadzonym przez Lee i zespół atopowe zapalenie skóry u myszy indukowano za pomocą 2,4-dinitrochlorobenzenu (DNCB). Ekstrakt z wąkroty azjatyckiej podawano myszom doustnie w dawce 200 mg/kg masy ciała, lub aplikowano miejscowo w dawce 80 µg/cm² powierzchni skóry. W obu grupach zaobserwowano zmniejszenie nacieku komórek tucznych w skórze ucha, zahamowanie odpowiedzi limfocytów Th1 i Th2 oraz zmniejszenie ilości cytokin prozapalnych, takich jak TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 oraz cyklooksygenaza-2 (COX-2) [21]. Podobne wyniki otrzymał zespół Park'a aplikując standaryzowany ekstrakt z wąkroty azjatyckiej (TECA) w stężeniu 0,2 % i 0,4 % (40 g/cm² lub 80 g/cm²) na skórę grzbietu lub za uchem u myszy, trzy razy w tygodniu przez okres czterech tygodni. TECA zawierała w składzie: kwas azjatykowy (30 %), kwas madekasowy (29-30 %) i azjatykozyd (40 %). AZS wywołano za pomocą roztworu bezwodnika ftalowego o stężeniu 5 %. Analiza histopatologiczna tkanki skórnej wykazała, że TECA hamuje nadmierne rogowacenie naskórka i naciekanie komórek zapalnych, aktywność indukowanej syntazy tlenku azotu (iNOS), COX-2, jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-κB), a także uwalnianie cytokin prozapalnych: TNF-α, IL-1, IL-6 i IgE [20]. NF-κB jest zaangażowany w uwalnianie cytokin, a zahamowanie jego działania niweluje stan zapalny. W kolejnym badaniu sprawdzono potencjał immunomodulujący i przeciwzapalny TECA w połączeniu z astaksantyną na takim samym mysim modelu AZS [84]. Myszy podzielono na trzy grupy: pierwszej aplikowano miejscowo TECA w stężeniu 0,5 %, drugiej grupie aplikowano astaksantynę w stężeniu 0,5 %, natomiast trzecia grupa testowała połączenie 0,25 % TECA i 0,25 % astaksantyny (20 µg/cm² skóry) trzy razy dziennie przez okres czterech tygodni. Zmiany morfologiczne skóry oraz grubość naskórka zostały znacząco zmniejszone zarówno po zastosowaniu TECA, astaksantyny oraz połączenia TECA z astaksantyną, jednakże największe działanie hamujące ekspresję iNOS i COX-2, oraz uwalnianie TNF-α, IL-6 i IgE zaobserwowano w przypadku leczenia skojarzonego- TECA w połączeniu z astaksantyną [82]. Ponadto, zespół Park'a przeprowadził trzecie badanie, w którym sprawdzono działanie TECA w nośnikach- fitosomach. Warunki przeprowadzenia badania były niezmiennie. Myszom aplikowano na skórę 100 µl (20 µl/cm²) fitosomu zawierającego TECA w stężeniu 0,2 %, lub 0,4 % trzy razy w tygodniu przez okres czterech tygodni. Otrzymano podobne rezultaty, jak w dwóch poprzednich badaniach z wykorzystaniem TECA [83]. Dowiedziano również, że kwas azjatykowy wyizolowany z ziela wąkroty azjatyckiej hamuje powstawanie zmian skórnych w przebiegu AZS poprzez wzmacnianie immunomodulacji i hamowanie stanu zapalnego [84]. Działanie immunosupresyjne ekstraktu z wąkroty azjatyckiej można przypisać właściwościom przeciwalergicznym i przeciwzapalnym wykazywanym przez saponiny triterpenowe obecne w ekstrakcie. Badania potwierdziły również, że ekstrakt z wąkroty azjatyckiej ma działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko różnym rodzajom bakterii i grzybów. W przypadku AZS działanie przeciwko *Staphylococcus aureus* ma specjalne znaczenie i zostało potwierdzone w badaniach [85-87].

Powyższe badania wskazują, że standaryzowany ekstrakt z wąkroty azjatyckiej, lub saponiny triterpenowe wyizolowane z tej rośliny mogą być bezpiecznymi i skutecznymi alternatywnymi środkami terapeutycznymi wspomagającymi leczenie atopowego zapalenia skóry. Ponadto, w badaniach

toksykologicznych udowodniono, że wążrota azjatycka stosowana w zalecanych dawkach nie jest toksyczna, a możliwe skutki uboczne są rzadkie [88].

Ekstrakty z wążroty azjatyckiej wydają się być alternatywą dla leczenia glikokortykosteroidami, lub inhibitorami kalcyneuryny, które stosowane przewlekłe wykazują dużo skutków ubocznych, takich jak atrofia skóry i powstawanie rozstępów, odczucie pieczenia skóry. Saponiny triterpenowe wyizolowane z *Centella asiatica* L. mogą stanowić bezpieczną i skuteczną terapię w AZS, jednak temat wymaga przeprowadzenia badań aplikacyjnych in vivo.

3.3. Charakterystyka surowców otrzymanych z wążroty azjatyckiej zastosowanych w recepturach dermokosmetyków

Na rynku dostępnych jest wiele surowców kosmetycznych otrzymanych z ziela wążroty azjatyckiej, lub zawierających wyizolowane z rośliny triterpeny: ekstraktów, komórek macierzystych, różnego rodzaju nośników, takich jak liposomy, mikroigły, czy mikroemulsje [88]. Niestety, surowce te nie zawsze są standaryzowane na zawartość głównych saponin triterpenowych o kluczowym działaniu przeciwzapalnym, immunomodulującym i przeciwbakteryjnym, co oznacza, że mogą zawierać bardzo małe ilości tych substancji, a każda partia surowca może różnić się od siebie składem. Często skład ekstraktów nie jest znany, ponieważ producent nie oznaczył ilościowo i jakościowo substancji aktywnych wyekstrahowanych z rośliny. Na skuteczność działania surowców roślinnych na skórę zdecydowany wpływ ma ich jakość i stężenie substancji czynnych. Z tego powodu, z dostępnych na rynku surowców otrzymanych z liści wążroty azjatyckiej wytypowano kilka ekstraktów zgodnych ze standardami COSMOS, otrzymanych metodami zielonej ekstrakcji z użyciem rozpuszczalnika pochodzenia naturalnego. Ekstrakty te nie były standaryzowane, dlatego w toku badań będących jednym z celów niniejszej pracy dokonano analizy zawartości madekasozydu i azjatykozydu w wytypowanych ekstraktach rynkowych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), aby wyselekcjonować ekstrakt o najwyższej zawartości madekasozydu i azjatykozydu. Surowce rynkowe wytypowane do badań opisano poniżej. Drugi surowiec otrzymany z liści wążroty azjatyckiej o nazwie handlowej *Centella Asiatica Bioferment GEO* został opracowany przy współpracy z firmą Laboratorium Symbiosis Sp. z o.o. przy użyciu metody biotechnologicznej, jaką jest fermentacja z wykorzystaniem bakterii.

3.3.1. Ekstrakt z liści wążroty azjatyckiej

Wpływ na ilość madekasozydu i azjatykozydu w ekstrakcie ma zawartość tych substancji w roślinie, a także rodzaj oraz warunki przeprowadzenia ekstrakcji [71]. Do badań zakwalifikowano wyłącznie ekstrakty, które spełniają kryteria COSMOS, z związku z czym proces ich otrzymywania, użyte metody i rozpuszczalniki są zgodne z zasadami Zielonej Chemii, a wążrota azjatycka pochodzi z plantacji monitorowanych, gdzie warunki uprawy i zbioru są ściśle monitorowane. Takie kryteria znacznie zawęziły wybór, ponieważ tylko nieliczne ekstrakty z wążroty azjatyckiej dostępne na rynku

surowców kosmetycznych spełniają kryteria COSMOS. Charakterystykę wybranych do badań ekstraktów przedstawia tabela nr 5. Do receptur został wprowadzony ekstrakt, który zawierał największe stężenie madekasozydu i azjatykozydu.

Tabela 5. Charakterystyka ekstraktów z wąkroty azjatyckiej wytypowanych do badań (na podstawie informacji od producentów surowców oraz kart charakterystyki).

Lp.	Nazwa handlowa ekstraktu	Producent	Skład według INCI	Charakterystyka fizykochemiczna
1.	CICA EX BG ECO	Radiant	Butylene Glycol, Aqua, Centella Asiatica Extract, Madecassoside, Asiaticoside	Transparentna, klarowna ciecz
2.	Made White	Biospectrum, Inc	Aqua, Pentylene Glycol, Madecassoside	Ciecz o charakterystycznym zapachu, barwy ciemno brązowej
3.	Multi EX BSASM ECO	Biospectrum, Inc	Propanediol, Aqua, Centella Asiatica Extract , Polygonum Cuspidatum Root Extract, Scutellaria Baicalensis Root Extract, Camellia Sinensis Leaf Extract, Glycyrrhiza Glabra Root Extract, Chamomilla Recutita Flower Extract, Rosmarinus Officinalis Leaf Extract	Ciecz o charakterystycznym, ziołowym zapachu, barwy ciemno brązowej
4.	Ekstrakt z wąkroty azjatyckiej	Laboratorium Symbiosis Sp. z o.o.	Propanediol, Centella Asiatica Extract	Ciecz o ziołowym zapachu, barwy ciemno brązowej

3.3.2. Bioferment z liści wąkroty azjatyckiej

Bioferment z liści wąkroty azjatyckiej o nazwie handlowej Centella Asiatica Bioferment GEO to surowiec otrzymany w wyniku fermentacji rośliny z wykorzystaniem bakterii *Lactobacillus reuteri*. Zawiera on połączenie aktywnych triterpenów pochodzących z rośliny oraz produktów metabolizmu i lizatów bakterii *L. reuteri* o właściwościach postbiotycznych. Szczep mikroorganizmu użyty w procesie fermentacji został specjalnie dobrany w celu uzyskania konkretnych metabolitów o określonej aktywności biologicznej, do których należy między innymi reuteryna wykazująca właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwzapalne [89]. Dowiedziono w badaniach przeprowadzonych na komórkach makrofagów RAW 264.7 pochodzących od myszy z odmiany BALB/c silne właściwości antyoksydacyjne reuteryny, która zmniejszała poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w mitochondriach, a także poziom cytokin prozapalnych: TNF- α , IL-1 β i IL-6 [90]. Surowiec Centella Asiatica Bioferment GEO zawiera reuterynę w ilości 0,1-0,2 %. W surowcu obecne są również lizaty bakterii *L. reuteri*. Ponadto surowiec zawiera kwasy: mlekowy (0,5-5,0 %), protokatechowy (0,1-0,8 %), kawowy (0,1-0,5 %) i galusowy (0,1-0,4 %) powstające w wyniku procesu fermentacji, a także triterpeny pochodzące z liści wąkroty azjatyckiej: kwas azjatykowy, azjatykozyl i madekasozyd.

Najnowsze badania wskazują, że *Lactobacillus reuteri* jest coraz częściej stosowany miejscowo jako żywe bakterie (**probiotyki**), lub jako nieżywy mikroorganizm, jego metabolity oraz fragmenty ścian komórkowych i lizaty powstające w wyniku lizy, rozbicia i fragmentacji komórek (**postbiotyki**) w leczeniu atopowego zapalenia skóry [91]. Ze względu na to, że stosowanie probiotyków w produktach kosmetycznych stwarza wiele wyzwań w zakresie sprostania regulacjom dotyczącym limitów bakterii w badaniu mikrobiologicznym masy kosmetycznej, a także podczas procesu produkcji kosmetyku, w recepturach będących przedmiotem niniejszej pracy wykorzystano postbiotyk. **Postbiotyki** to związki bioaktywne otrzymywane w procesie fermentacji przeprowadzanej głównie przez bakterie kwasu mlekowego i drożdże, zwłaszcza *Saccharomyces cerevisiae*. W przeciwieństwie do probiotyków zawierających żywe bakterie, postbiotyki są definiowane jako „preparat nieożywionych mikroorganizmów i/lub ich składników, który zapewnia korzyść zdrowotną gospodarzowi” [92]. Postbiotyk jest zdecydowanie łatwiejszy pod względem technologicznym do wprowadzenia do receptur kosmetyków, które spełniają wymagania mikrobiologiczne dla produktów kosmetycznych. Ponadto, postbiotyk uzyskany na drodze fermentacji z wąkroty azjatyckiej ma określony skład chemiczny i aktywność biologiczną w stanie nieżywotnym, wyższą stabilność w szerokim zakresie pH i temperatury, a także wykazuje działanie na mikrobiotę skóry poprzez interakcję z komórkami gospodarza [93]. Postbiotyki wykazują podobną skuteczność biologiczną jak probiotyki, mają właściwości immunomodulujące, przeciwzapalne, antyoksydacyjne i przeciwbakteryjne, a jednocześnie istnieje mniejsze ryzyko wystąpienia skutków ubocznych u ludzi po ich zastosowaniu [94-95].

Proces fermentacji generuje nie tylko postbiotyki, ale również korzystnie wpływa na aktywność biologiczną fermentowanej rośliny. Przekształca związki wielkocząsteczkowe znajdujące się w roślinie w struktury niskocząsteczkowe, zwiększa produkcję związków bioaktywnych, takich jak polifenole, flawonoidy, kwasy organiczne, białka, ceramidy, aminokwasy, enzymy i przeciwutleniacze [38].

Podsumowując, bioferment z liści wąkroty azjatyckiej jest innowacyjnym surowcem, zaprojektowanym z myślą o potrzebach skóry atopowej uwzględniając przy tym nieinwazyjny dla środowiska proces fermentacji. Zarówno triterpeny pochodzące z *Centella asiatica* L., jak i postbiotyki powstałe z udziałem bakterii z *L. reuteri* mogą stymulować układ odpornościowy i modulować stany zapalne skóry, co pośrednio wpływa również na homeostazę mikrobiomu skóry, która jest kluczowa dla utrzymania integralności bariery naskórkowej. Charakterystykę tego surowca przedstawia tabela nr 6.

Tabela 6. Charakterystyka fizykochemiczna surowca Centella Asiatica Bioferment GEO.

Skład według INCI	Parametr fizykochemiczny	Charakterystyka
Aqua, Lactobacillus/Centella Asiatica Extract Ferment, Gluconolactone, Sodium Benzoate, Calcium Gluconate, Lactic Acid, Acetic Acid, Protocatechic Acid, Caffeic Acid, Gallic Acid, Reuterin	pH	3,6- 5,5
	Postać	Zawiesina
	Kolor	Brązowy ciemny
	Zapach	Charakterystyczny, ziołowy
	Rozpuszczalność	Częściowo rozpuszczalny w wodzie

III. CEL PRACY

Celem badań naukowych prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pt. **”Opracowanie nowej linii dermokosmetyków naturalnych i biodegradowalnych, zgodnych z zasadami zrównoważonego rozwoju oraz wymaganiami Ecocert/COSMOS, przyjaznych środowisku i skórze”** było opracowanie zoptymalizowanej technologii wytwarzania pięciu naturalnych produktów dermokosmetycznych opartych o działanie emolientów oraz substancji aktywnych pochodzących z ziela wąkroty azjatyckiej (*Centella asiatica* L.), przeznaczonych do kompleksowej pielęgnacji i wspomagania leczenia skóry atopowej: **kremu do twarzy, kremu do rąk, balsamu do ciała, emulsji do mycia ciała oraz olejku do demakijażu**. Ponadto, celem było wdrożenie zasad zrównoważonego rozwoju poprzez opracowanie receptur dermokosmetyków zgodnie ze standardami COSMOS dla kosmetyków naturalnych i organicznych, optymalizację procesu produkcyjnego dla uzyskania znacznie zmniejszonego zużycia energii elektrycznej oraz wykorzystanie odpadów z przemysłu spożywczego wspierając gospodarkę w obiegu zamkniętym.

Cel ten zrealizowano w następujących etapach:

1. Oznaczenie zawartości madekasozydu i azjatykozydu w czterech dostępnych na rynku surowców kosmetycznych ekstraktach z liści wąkroty azjatyckiej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Opracowanie i walidacja metody HPLC [D3]. Wybranie do dalszych badań ekstraktu o optymalnej zawartości madekasozydu i azjatykozydu, łatwo dostępnego do zakupu w ilościach produkcyjnych.
2. Oznaczenie zawartości madekasozydu i azjatykozydu w biofermencie z wąkroty azjatyckiej metodą HPLC.
3. Ocena środowiskowa surowców kosmetycznych wyselekcjonowanych do opracowania receptur dermokosmetyków (pochodzenie surowca, metody wytwarzania, zgodność z kryteriami COSMOS, stopień biodegradowalności, toksyczność dla organizmów wodnych) [D3].
4. Opracowanie składu ilościowo-jakościowego oraz procesu technologicznego wytwarzania „na zimno”, bez konieczności podgrzewania składników dla trzech różnych rodzajów podłoży kosmetycznych (nośników): emulsji typu W/O, emulsji typu O/W oraz żelu [D3].
5. Ocena użyteczności opracowanego procesu technologicznego otrzymywania emulsji typu w/o, emulsji typu o/w oraz żelu „na zimno” poprzez badania stabilności otrzymanych podłoży kosmetycznych opisanych w punkcie 4 w podwyższonej temperaturze (45 °C), co stanowi przyspieszone testy starzeniowe [D3].
6. Zbadanie stabilności madekasozydu i azjatykozydu w opracowanych podłożach kosmetycznych (nośnikach) opisanych w punkcie 4, przechowywanych w temperaturze 45 °C przez okres dwóch miesięcy. Stabilność badanych substancji potwierdzono za pomocą HPLC oznaczając ilość madekasozydu i azjatykozydu tuż po przygotowaniu nośników oraz po 1 i 2 miesiącach ich

przechowywania w podwyższonej temperaturze. Badanie potwierdziło skuteczność nośników przygotowanych w procesie na zimno w ochronie substancji aktywnych [D3].

7. Badanie uwalniania madekasozydu i azjatykozydu wyizolowanych z liści wąkroty azjatyckiej z otrzymanych w pkt. 4 podłoży kosmetycznych (nośników): emulsji typu o/w emulsji typu w/o oraz żelu. Oznaczenie ilościowe madekasozydu i azjatykozydu uwolnionych do płynu akceptorowego za pomocą HPLC. Ocena wpływu stężenia substancji aktywnej, rodzaju podłoża kosmetycznego (rodzaju nośnika) oraz pH płynu akceptorowego, które odpowiadało fizjologicznemu pH zdrowej skóry (pH=5,8) oraz podwyższonemu pH skóry atopowej (pH=7,4) na profil i kinetykę uwalniania madekasozydu i azjatykozydu. Warunki przeprowadzenia badania były zaprojektowane ze szczególnym uwzględnieniem możliwości miejscowego zastosowania nośników na skórę atopową (wartości pH płynu akceptorowego, skład emulsji o/w oraz w/o bogaty w emolienty). Badanie to umożliwiło wybranie najbardziej optymalnych podłoży kosmetycznych oraz zweryfikowało wpływ zarówno fizjologicznego pH zdrowej skóry oraz podwyższonego pH skóry atopowej, a także stężenia substancji aktywnych na profil ich uwalniania [D3].

8. Opracowanie formułacji **dermokosmetyków pielęgnacyjnych**, bazując na dwóch podłożach opisanych w punkcie 4:

- emulsji typu w/o zaadoptowanej jako baza dla **balsamu do ciała i kremu do rąk**
- emulsji typu o/w zaadoptowanej jako baza dla **kremu do twarzy**

Formułacje dermokosmetyków pielęgnacyjnych zostały opracowane w wersji bazowej (bez substancji aktywnych otrzymanych z liści wąkroty azjatyckiej) oraz w wersji zawierającej substancje aktywne pochodzące z wąkroty azjatyckiej opisane w punktach 1-2 [D4- D5].

9. Opracowanie formułacji **dermokosmetyków myjących**, bazując na procesie technologicznym opisanym w punkcie 4:

- emulsji do mycia ciała (typ o/w)
- olejku do demakijażu

zawierających substancje aktywne pochodzące z wąkroty azjatyckiej opisane w punktach 1-2.

10. Badanie parametrów fizykochemicznych (odczyn pH, gęstość, lepkość) formułacji dermokosmetycznych opisanych w punktach 7-8 [D4].
11. Badania dermatologiczne (skórne testy płatkowe półotwarte) formułacji dermokosmetycznych opisanych w punktach 7-8 przeprowadzone na ochotnikach posiadających skórę wrażliwą [D5].
12. Badania aplikacyjno-aparaturowe in vivo potwierdzające skuteczność działania produktów dermokosmetycznych wymienionych w punktach 7-8 na skórę atopową:
 - **dla produktów pielęgnacyjnych:** porównanie próby badanej, zawierającej ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej z próbą kontrolną, niezawierającą substancji aktywnych pochodzących z wąkroty azjatyckiej (kontrolowane badania randomizowane, pojedynczo zaślepione). Oceniono statystycznie istotne różnice

pomiędzy grupą eksperymentalną, a grupą kontrolną w wartościach mierzonych parametrów skóry: TEWL [D4], nawilżenie warstwy rogowej naskórka, pH powierzchni skóry, rumień, wygładzenia powierzchni skóry (parametr SEsm), szorstkość powierzchni skóry (parametr SEr), stopień złuszczenia naskórka (parametr SEsc) [D5].

- **dla produktów myjących:** ocena parametrów skóry dla próby badanej: TEWL, nawilżenie warstwy rogowej naskórka, pH powierzchni skóry, rumień. Ze względu na krótki czas przebywania produktów spłukiwalnych na skórze zaniechano porównania z próbą kontrolną.
13. Badanie wpływu balsamu do ciała zawierającego ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej na mikrobiom skóry ochotników cierpiących na AZS, porównując ilość i rodzaj bakterii wyizolowanych ze zgięcia łokciowego przed aplikacją balsamu do ciała oraz po miesiącu jego stosowania. Badanie umożliwiło potwierdzenie pozytywnego wpływu testowanego produktu na mikrobiom skóry chorych na AZS.

IV. CZĘŚĆ BADAWCZA

Przedstawiony rozdział oparty jest o publikacje eksperymentalne wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

D3 Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Controlled release of madecassoside and asiaticoside of *Centella asiatica* L. origin from sustainable cold-processed topical formulations**, Molecules 2024, 29, 23, 5583; <https://doi.org/10.3390/molecules29235583> (IF=4.2, punkty MNiSW=140)

D4 Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Wpływ kosmetyków zawierających ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej na wybrane parametry bariery naskórkowej u chorych na atopowe zapalenie skóry**, Chemik 2024, 3, 73, 185-189. <https://doi.org/10.15199/4.2024.3.5> (punkty MNiSW=20).

D5 Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract**, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology (IF=8.5, punkty MNiSW=140) - wysłane do wydawnictwa

4. Opracowanie metodyki oznaczania zawartości madekasozydu i azjatykozydu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [D3]

W ramach niniejszej pracy doktorskiej opracowano metodykę jakościowego i ilościowego oznaczania madekasozydu i azjatykozydu z użyciem HPLC, którą wykorzystano do oznaczenia tych związków w:

- surowcach aktywnych otrzymanych z liści wąkroty azjatyckiej, zgodnych ze standardami COSMOS, pochodzących od różnych producentów
- przygotowanych podłożach kosmetycznych (nośnikach): emulsji o/w, emulsji w/o oraz żelu [D3]
- płynie akceptorowym podczas badania kontrolowanego uwalniania madekasozydu i azjatykozydu z różnych podłoży kosmetycznych (nośników): emulsji o/w, emulsji w/o oraz żelu [D3]

W tym celu wykorzystano wysokosprawny chromatograf cieczowy Varian 920-LC (Agilent Technologies, USA) wyposażony w automatyczny podajnik próbek i detektor UV-VIS.

4.1. Wykorzystane odczynniki

Etanol 99,8 % został dostarczony przez firmę POCh (Gliwice). Wzorce analityczne madekasozydu (98,0 %) i azjatykozydu (98,0 %) zostały dostarczone przez Biopurify Phyto-chemicals Ltd. (Chengdu, Chiny). Kwas trifluorooctowy klasy HPLC oraz acetonitryl klasy HPLC zostały dostarczone odpowiednio przez Honeywell Chemicals (Charlotte, NC, USA) i Merck KGaA (Darmstadt, Niemcy). Roztwory buforowe o pH 5,80 i pH 7,40 zostały zakupione od Honeywell Chemicals.

4.2. Dobór warunków analizy HPLC

Do analiz wykorzystano kolumnę analityczną TSKgel C18 o wymiarach: 250 x 4,6 mm oraz grubości filmu 5 μm . Fazą ruchomą była mieszanina 0,1 % wag. roztworu kwasu trifluorooctowego (TFA) w wodzie oraz acetonitrylu w stosunku objętościowym 72:28, z przepływem izokratycznym 1,0 ml/min. Objętość 20 μl każdej próbki nastrzykiwano na kolumnę 3-krotnie, a z uzyskanych wyników wyliczono średnią arytmetyczną. Przed przystąpieniem do badań chromatograficznych wyznaczono analityczną długość fali (λ_{max}) przy której absorbancja promieniowania przez dany związek jest największa. W tym celu przeprowadzono pomiary spektrofotometryczne w zakresie UV-Vis, wykorzystując spektrofotometr Cary 50 (Varian). Dla obydwu związków λ_{max} wynosiła 205 nm.

4.3. Walidacja metody HPLC [D3]

Analiza HPLC surowców otrzymanych z wąkroty azjatyckiej, podłoży kosmetycznych oraz płynu akceptorowego w trakcie badania kontrolowanego uwalniania madekasozydu i azjatykozydu była poprzedzona walidacją opisaną metody analitycznej. W celu określenia powtarzalności metody każdą z przygotowanych próbek poddano serii trzech pomiarów, a następnie na podstawie wartości średnich obliczono odchylenie standardowe. Do obliczenia dokładności metody zastosowano metodę odzysku poprzez dodanie do ekstraktu z wąkroty azjatyckiej roztworów wzorcowych madekasozydu i azjatykozydu o stężeniach 0,050, 0,070 i 0,090 mg/ml. Następnie uzyskane próbki analizowano ($n = 3$) za pomocą HPLC, podając procent odzysku. Liniowość metody określono poprzez obliczenie wartości współczynnika korelacji R^2 dla każdej z krzywych kalibracyjnych (rys. 9 a i 9 b). Specyficzność metody potwierdzono poprzez porównanie czasów retencji pików uzyskanych dla badanych próbek z czasami retencji wzorców. Wyznaczono również parametry LOD (ang. limit of determination) i LOQ (ang. limit of quantification) opracowanej metody zgodnie z równaniami (1) i (2), dokonując analizy ślepej próby ($n = 6$):

$$(1) \text{ LOD} = (3.3 \times \text{BSTD})/S$$

$$(2) \text{ LOQ} = (10 \times \text{BSTD})/S$$

gdzie:

BSTD - odchylenie standardowe powierzchni pików ślepej próby

S - nachylenie krzywej kalibracyjnej

Precyzję obliczono używając względnego odchylenia standardowego z analizy HPLC ($n = 3$) roztworów wzorcowych o stężeniach 0,050 mg/ml, 0,070 mg/ml oraz 0,090 mg/ml. Wynik podano jako procent względnego odchylenia standardowego (% RSD) analizy (tab. 7).

Tabela 7. Parametry walidacji metody HPLC dla oznaczania madekasozydu i azjatykozydu-[D3].

Parametr	Madekasozyd	Azjatykozyd
LOD [mg/mL]	0,0045	0,0053
LOQ [mg/mL]	0,0136	0,0159
Precyzja [% RSD]	0,87	1,29
Odzysk [%]	104,71 ± 1,35	111,95 ± 0,98

4.4. Przygotowanie krzywych kalibracyjnych

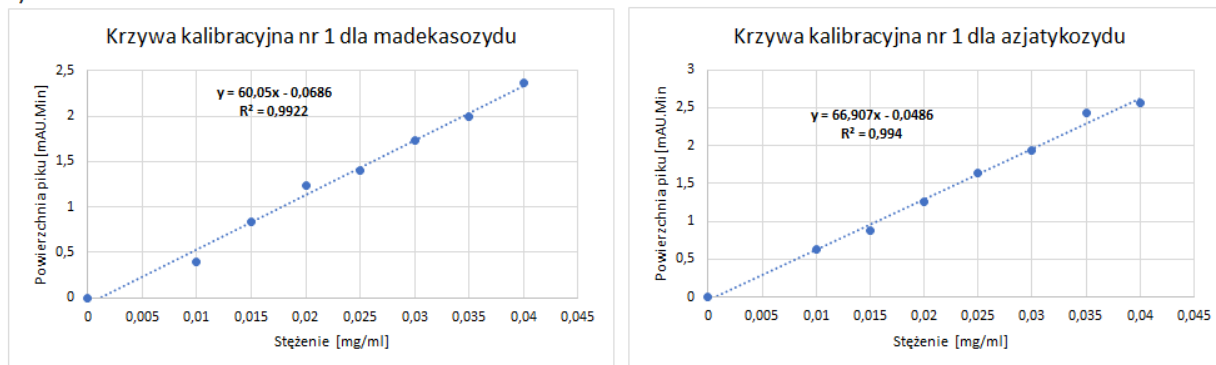
W związku z tym, że wykonanie poszczególnych analiz z wykorzystaniem HPLC przedstawionych w rozdziale 4 dzieliła znaczna odległość czasowa oraz ilości oznaczanych substancji różniły się od siebie, sporządzono dwa zestawy krzywych kalibracyjnych dla madekasozydu i azjatykozydu. Pierwszy z nich został wykorzystany do oznaczenia madekasozydu i azjatykozydu w surowcach otrzymanych z wąkroty azjatyckiej (ekstraktach i biofermencie) oraz w opracowanych podłożach kosmetycznych w celu potwierdzenia stabilności tychże triterpenów (rys. 8a). Natomiast drugi zestaw krzywych kalibracyjnych (rys. 8b) został przygotowany w celu oznaczenia madekasozydu i azjatykozydu w płynie akceptorowym podczas badania kontrolowanego uwalniania z różnych podłoży kosmetycznych [D3].

W celu sporządzenia pierwszego zestawu krzywych kalibracyjnych dla madekasozydu i azjatykozydu przygotowano roztwór wzorcowy o stężeniu 0,05 mg/ml poprzez rozpuszczenie 2,5 mg madekasozydu oraz 2,5 mg azjatykozydu w 50 ml etanolu. Następnie przygotowano rozcieńczenia roztworu wzorcowego o stężeniach: 0,01 mg/ml, 0,015 mg/ml, 0,020 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,030 mg/ml, 0,035 mg/ml, 0,040 mg/ml.

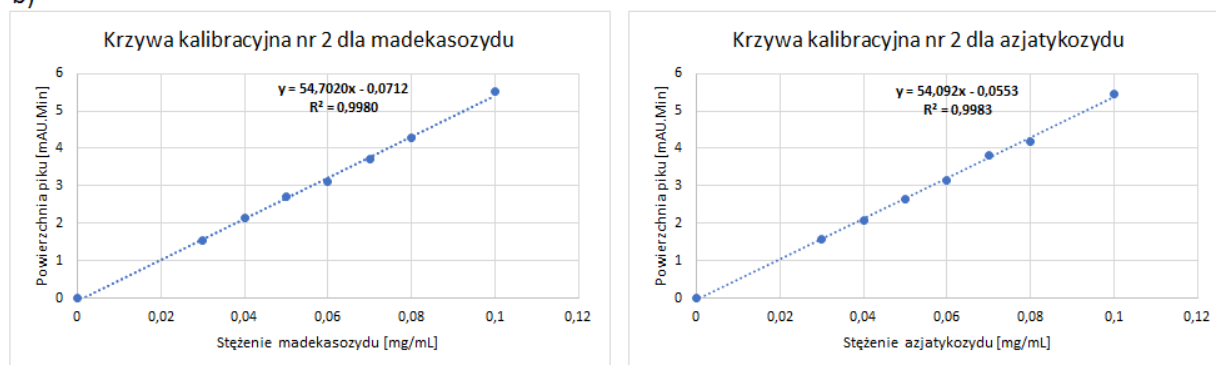
Roztwór wzorcowy o stężeniu 0,1 mg/ml do sporządzenia drugiego zestawu krzywych kalibracyjnych dla madekasozydu i azjatykozydu przygotowano poprzez rozpuszczenie 5 mg madekasozydu oraz 5 mg azjatykozydu w 50 ml etanolu. Następnie przygotowano rozcieńczenia roztworu wzorcowego o stężeniach: 0,03 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,07 mg/ml, 0,08 mg/ml.

Otrzymane roztwory przesączono przez filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,22 µm i umieszczono w szklanych fiolkach do analizy HPLC. Każdy z roztworów nastrzyknięto trzykrotnie, a z uzyskanych wyników obliczono średnią arytmetyczną. Ustalono czasy retencji dla madekasozydu i azjatykozydu, co w późniejszym etapie badań pozwoliło na identyfikację pików pochodzących od tych substancji w próbkach ekastraktów oraz biofermentu z wąkroty. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono krzywe kalibracyjne dla madekasozydu i azjatykozydu (rys 8a i 8b).

a)



b)



Rysunek 8. Zestawy krzywych kalibracyjnych dla madekasoydu i azjatykozydu oznaczanych w:
a) ekstrakcie i biofermentie z wąkroty azjatyckiej oraz w podłożach kosmetycznych;
b) płynie akceptorowym podczas badania kontrolowanego uwalniania z różnych podłoży kosmetycznych.

4.5. Obliczenie zawartości madekasoydu i azjatykozydu w analizowanych próbkach

Obliczenie zawartości madekasoydu i azjatykozydu w analizowanych próbkach przeprowadzono w oparciu o krzywą kalibracyjną będącą funkcją liniową postaci:

$$(3) y = ax + b$$

gdzie:

a - współczynnik kierunkowy

b - współrzędna punktu przecięcia prostej z osią y

W przygotowanych krzywych kalibracyjnych argumentami funkcji (x) są stężenia oznaczanych substancji, a wartościami (y) powierzchnie pików chromatograficznych od nich pochodzących.

4.6. Przygotowanie próbek do analizy

W celu oznaczenia zawartości madekasoydu i azjatykozydu w surowcach otrzymanych z liści wąkroty azjatyckiej odważono 1 g ekstraktu lub biofermentu i rozpuszczono w 10 ml etanolu przez energiczne wytrząsanie, a następnie roztwór przefiltrowano przez filtr strzykawkowy PTFE Pureland o średnicy porów 0,45 μm . Następnie odmierzone 1 ml roztworu i umieszczono go w szklanej fiolce do analizy HPLC.

W celu oznaczenia zawartości madekasozydu i azjatykozydu w przygotowanych podłożach kosmetycznych (nośnikach): emulsji o/w, emulsji w/o oraz żelu [D3] odważono 1 g badanej formułacji do kolbki i używając etanolu rozpuszczono w kolbce miarowej o pojemności 10 ml przez energiczne wytrząsanie, a następnie roztwór przefiltrowano przez filtr strzykawkowy PTFE Pureland o średnicy porów 0,45 µm. Następnie pobrano 1 ml otrzymanego roztworu i umieszczono go w szklanej fiole do analizy HPLC.

W celu oznaczenia madekasozydu i azjatykozydu uwolnionych do płynu akceptorowego podczas przeprowadzonego badania uwalniania substancji aktywnych z różnych podłoży kosmetycznych (nośników): emulsji o/w, emulsji w/o oraz żelu [D3] pobrano 1 ml płynu akceptorowego (buforu fosforanowego, pH=5,8 lub buforu boranowego, pH=7,4) i przefiltrowano przez filtr strzykawkowy PTFE Pureland o średnicy porów 0,22 µm do szklanej fiole do analiz HPLC.

5. Oznaczenie madekasozydu i azjatykozydu w surowcach otrzymanych z liści wąkroty azjatyckiej metodą HPLC

W celu wyselekcjonowania docelowego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej o największej zawartości madekasozydu i azjatykozydu analizie HPLC według metodyki opisanej w rozdziale 4 poddano cztery dostępne na rynku surowców kosmetycznych ekstrakty z tej rośliny, otrzymane w wyniku procesu ekstrakcji zielonym rozpuszczalnikiem (etanołem pochodzenia roślinnego). Ekstrakty były zgodne ze standardami COSMOS. Ponadto, główne triterpeny oznaczono również w biofermencie z wąkroty azjatyckiej. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli nr 8.

Tabela 8. Zawartość madekasozydu i azjatykozydu [mg/mL] w surowcach otrzymanych z liści wąkroty azjatyckiej oznaczona metodą HPLC.

Nazwa handlowa surowca	Producent	Madekasozyd [mg/ml]	Azjatykozyd [mg/ml]
CICA EX BG ECO	Radiant, Chuncheon, Korea	0,237	0,05
Made White	BIOSPECTRUM, INC, Korea	0,392	0,026
Multi EX BSASM ECO	BIOSPECTRUM, INC, Korea	0,221	0,208
Ekstrakt z wąkroty azjatyckiej	Laboratorium	0,204	0,075
Centella Asiatica Bioferment GEO	Symbiosis, Polska	0,021	nie wykryto

Jak wynika z przeprowadzonej analizy, największą zawartość madekasozydu wykazano w ekstrakcie o nazwie handlowej Made White (0,4 mg/ml). Pozostałe ekstrakty zawierały podobną ilość madekasozydu (ok. 0,2 mg/ml). Natomiast najwięcej azjatykozydu zawierał surowiec Multi EX BSASM ECO (0,2 mg/ml), w którym ilość azjatykozydu przewyższała o rząd wielkości zawartość tego związku w pozostałych ekstraktach. Jednak obydwa surowce nie zostały zakwalifikowane do użycia w

recepturach dermokosmetyków będących przedmiotem niniejszej pracy. Surowiec Made White został wycofany przez producenta ze sprzedaży, natomiast surowiec Multi EX BSASM ECO był mieszaniną ekstraktów z siedmiu różnych roślin, w tym z wążkroty azjatyckiej. Z tego powodu nie został wykorzystany w dalszych badaniach. Na podstawie wyników przeprowadzonych analiz oraz biorąc pod uwagę dostępność surowców do zakupu, a także aspekty środowiskowe, takie jak długość trasy oraz rodzaj transportu surowca do Polski wytypowano docelowy ekstrakt z wążkroty azjatyckiej o optymalnej zawartości madekasozydu i azjatykozydu, produkowany w Polsce przez Laboratorium Symbiosis. Ekstrakt zawierał 0,2 mg/ml madekasozydu oraz 0,075 mg/ml azjatykozydu. Wspieranie lokalnych producentów wpisuje się politykę Zielonego Ładu, a także pozwala zmniejszyć ślad węglowy w środowisku, związany z łańcuchem dostaw surowca [4-5].

Bioferment z wążkroty azjatyckiej zawierał znacznie mniejszą ilość madekasozydu (0,021 mg/ml) w porównaniu z ekstraktami. W wyniku zastosowanej metody analitycznej nie wykryto w nim obecności azjatykozydu. Warunki, w jakich zachodzi proces fermentacji rośliny mogą mieć znaczący wpływ na obecność substancji aktywnych w otrzymanym surowcu. Według Wang'a warunki przeprowadzenia procesu fermentacji liści wążkroty azjatyckiej, takie jak: temperatura i czas trwania procesu, a także pH mają znaczący wpływ na zawartość flawonoidów w biofermentacji [96]. Niemniej jednak, bioferment z wążkroty azjatyckiej zawiera inne wartościowe dla skóry atopowej substancje opisane w rozdziale 3.3.2. do których należą między innymi postbiotyki.

6. Podłoża kosmetyczne (nośniki) [D3]

Niniejszy rozdział oparty jest o publikację eksperymentalną:

D3 Controlled release of madecassoside and asiaticoside of *Centella asiatica* L. origin from sustainable cold-processed topical formulations

W publikacji przedstawiono profil oraz kinetykę uwalniania madekasozydu i azjatykozydu wyizolowanych z liści wążkroty azjatyckiej z trzech rodzajów podłoży (nośników) najczęściej stosowanych w przemyśle kosmetycznym: emulsji typu w/o, emulsji typu o/w oraz żelu. Badanie to miało na celu wybranie najbardziej optymalnego nośnika do stosowania miejscowego dla madekasozydu i azjatykozydu, a także sprawdzenie, czy stężenie tych substancji zawartych w badanych formulacjach kosmetycznych ma wpływ na profil i kinetykę uwalniania. Ponadto, celem była weryfikacja wpływu pH płynu akceptorowego, którego wartości odzwierciedlały pH zdrowej skóry (5,8) oraz podwyższone pH skóry atopowej (7,4) na profil i kinetykę uwalniania substancji aktywnych pochodzących z wążkroty azjatyckiej. Ma to przełożenie na efektywność działania substancji aktywnych na skórę atopową. Zmierzono również parametry fizykochemiczne otrzymanych podłoży kosmetycznych oraz oceniono ich stabilność w podwyższonej temperaturze (45 °C). Ponadto, zweryfikowano stabilność termiczną madekasozydu i azjatykozydu zawartych w ekstrakcie z wążkroty azjatyckiej, który wprowadzono do badanych podłoży kosmetycznych. Badania przeprowadzone z

wykorzystaniem przygotowanych nośników były eksperymentalnym przygotowaniem do opracowania docelowych formułacji dermokosmetyków do pielęgnacji i wspomagania leczenia atopowego zapalenia skóry, będących głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej.

6.1. Preparatyka różnego rodzaju podłoży kosmetycznych (nośników)

[D3]

W celu zbadania wpływu rodzaju podłoża kosmetycznego, stężenia substancji aktywnej oraz pH płynu akceptorowego na profil i kinetykę uwalniania madekasozydu i azjatykozydu wyizolowanych z wąkroty azjatyckiej przygotowano trzy różne podłoża kosmetyczne (nośniki): emulsję typu w/o, emulsję typu o/w oraz żel. Szczególną uwagę zwrócono na dobór surowców do przygotowania formułacji tak, aby spełniały one standardy COSMOS, a procesy wykorzystywane w celu otrzymywania składników były zgodne z zasadami Zielonej Chemii oraz wspierały gospodarkę w obiegu zamkniętym poprzez wykorzystanie odpadów z innych gałęzi przemysłu (tab. 2, podrozdział 1.3 oraz publikacja **D3**). W związku z tym pod uwagę wzięto pochodzenie surowca, metody jego wytwarzania, zgodność z kryteriami COSMOS, wysoki stopień biodegradowalności oraz niską toksyczność dla organizmów wodnych. Istotnym aspektem było ograniczenie zużycia energii elektrycznej podczas procesu technologicznego wytwarzania nośników w celu zmniejszenia śladu węglowego w środowisku oraz zabezpieczenia składników aktywnych formułacji, takich jak naturalne oleje i masła, przed procesem utleniania, który zachodzi w podwyższonej temperaturze. W związku z tym opracowano proces technologiczny na zimno, przebiegający w temperaturze pokojowej (25 °C), bez konieczności podgrzewania składników. W wyniku testów dobrano odpowiedni rodzaj emulgatora oraz temperaturę procesu emulsyfikacji. Ponadto, przygotowane podłoża odpowiadały potrzebom skóry atopowej [60]. Oznacza to, że emulsje zawierały dużą ilość emolientów (31 % wag. w emulsji w/o oraz 21 % wag. w emulsji o/w). Wyselekcjonowane emolienty posiadają niską liczbę kwasową i nadtlenkową, co sugeruje ich odporność na procesy utleniania [97]. Co więcej, formułacje zawierają łagodny dla skóry, alternatywny konserwant oparty o działanie glikolu pentylenowego oraz kaprylanu/kaprynianu glicerolu, który posiada również funkcję emolientyjną oraz nawilżającą. Z myślą o wrażliwej i skłonnej do podrażnień skórze atopowej oraz o bezpieczeństwie organizmów żyjących w wodzie formułacje nie zawierają barwników oraz kompozycji zapachowych o potencjale drażniącym, alergizującym i toksycznym dla organizmów wodnych [98,99]. Pogłębiona charakterystyka surowców wykorzystanych do opracowania formułacji podłoży kosmetycznych została przedstawiona w podrozdziale 1.3 (tab. 2) oraz w publikacji **D3**.

6.1.1. Preparatyka emulsji typu w/o

Składniki fazy olejowej emulsji (A) nr 1-12 (tab. 9) naważono do szklanej zlewki oraz wymieszano za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100 Value, a następnie zhomogenizowano za pomocą homogenizatora IKA Ultra Turrax T 18 Digital. Składniki fazy wodnej emulsji (B) nr 13-16 naważono

do szklanej zlewki i wymieszano za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100 Value. Następnie wymieszane składniki fazy wodnej (B) dodawano małymi porcjami do wymieszanych składników fazy olejowej (A) podczas mieszania z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego do uzyskania pożądanej lepkości masy. Na koniec masę zhomogenizowano za pomocą homogenizatora IKA Ultra Turrax T 18 Digital. Cały proces przebiegał w temperaturze pokojowej wynoszącej około 25 °C. Skład INCI przygotowanej receptury emulsji w/o przedstawia się następująco:

Ingredients/ INCI: Aqua, Propanediol, Hydrogenated Vegetable Oil, Caprylic/Capric Triglyceride, Canola Oil, Squalane, Tripelargonin, Olus Oil, Glyceryl Oleate, Polyglyceryl-3- Polyricinoleate, Ethyl Linoleate, Pentylene Glycol, Octyldodecyl PCA, Rubus Idaeus Seed Oil, Triolein, Hydrogenated Rapeseed Oil, Tocopherol, Ceramide NP, Glyceryl Dioleate, Magnesium Sulfate, Olea Europea (Olive) Oil Unsaponifiables, Ethyl Oleate, Glyceryl Caprylate/ Caprate, Lactic Acid, Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil, Ethyl Palmitate, Camelina Sativa Seed Oil, Ethyl Linolenate.

Tabela 9. Skład emulsji typu w/o.

Lp.	Faza emulsji	Nazwa handlowa surowca	Dostawca	Funkcja	Stężenie [% w/w]
1	A	EWO-Vegetable Emulsifier	Impag Group	Emulgator	1-10
2	A	Softigen®Pura	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient	1-10
3	A	Akogel™	Nordmann, Rassmann GmbH	Emolient	1-10
4	A	CeraFluid®	Amita Health Care Poland	Emolient, ceramid	1-5
5	A	Synovea® EL	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient, prekursor ceramidów	1-10
6	A	Phytosqualan®	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient	1-20
7	A	LIPEX® Omega 3/6™	Nordmann, Rassmann GmbH	Emolient	1-20
8	A	LIPEX® PreAct™	Nordmann, Rassmann GmbH	Emolient	1-20
9	A	Raspberry Necta®	Amita Health Care Poland	Emolient, antyoksydant	1-5
10	A	Tocomix L70-IP Organic CO	Jan Dekker/ IMCD Group	Antyoksydant, emolient	0,1-3
11	A	Emotion® Light	Amita Health Care Poland	Emolient	1-10
12	A	Ceramidone®	Aston Chemicals Ltd.	Emolient	1-5
13	B	Woda demineralizowana	-	Rozpuszczalnik	40-100
14	B	RonaCare® Magnesium Sulphate	Merck/ Azelis	Stabilizator emulsji	0,1-2
15	B	E-Leen Green C	Minasolve®/ Safic- Alcan Poland	Konserwant	1-5
16	B	Massocare Propanediol Nat MB	Comercial Quimica Masso	Humektant, booster konserwantu	1-10

6.1.2. Preparatyka emulsji typu o/w

Składniki fazy wodnej emulsji: (A) nr 1-2 oraz (B) nr 3-4 (tab. 10) naważono do osobnych szklanych zlewek oraz wymieszano za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100 Value do uzyskania jednorodnej masy, bez grudek. Dodano fazę B do fazy A i wymieszano za pomocą mieszadła mechanicznego. Składniki fazy olejowej emulsji (C) nr 5-14 (tab. 9) naważono do szklanej zlewki i wymieszano za pomocą mieszadła mechanicznego oraz zhomogenizowano za pomocą homogenizatora IKA Ultra Turrax T 18 Digital. Następnie wymieszane składniki fazy olejowej (C) dodano do wymieszanych składników fazy wodnej (A+B) podczas mieszania z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego do uzyskania jednorodnej masy, którą następnie zhomogenizowano za pomocą homogenizatora. Dodano składnik fazy (D) nr 15, wymieszano i zhomogenizowano. Cały proces przebiegał w temperaturze pokojowej wynoszącej około 25 °C. Skład INCI emulsji o/w:

Ingredients/ INCI: Aqua, Propanediol, Polyglyceryl- 4 Hemp Seedate, Canola Oil, Polycitronellol, Squalane, Triolein, Ethyl Linoleate, Pentylen Glycol, Hydrogenated Vegetable Oil, Octyldodecyl PCA, Rubus Idaeus Seed Oil, Caprylyl/ Capryl Glucoside, Xanthan Gum, Ceramide NP, Glyceryl Dioleate, Sodium Stearoyl Lactylate, Tocopherol, Ethyl Oleate, Glyceryl Caprylate/ Caprate, Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil, Ethyl Palmitate, Tapioca Starch, Ethyl Linolenate, Tremella Fuciformis Sporocarp Extract, Calcium Gluconate.

Tabela 10. Skład emulsji typu o/w.

Lp.	Faza emulsji	Nazwa handlowa surowca	Dostawca	Funkcja	Zakres stężenia [% w/w]
1	A	Woda	-	Rozpuszczalnik	50-100
2	A	HyaCare® Tremella	Adara Poland	Substancja aktywna, zagęstnik	0,01-1
3	B	Massocare Propanediol Nat MB	Comercial Quimica Masso	Humektant, booster konserwantu	1-10
4	B	Instathix®	Impag Group	Zagęstnik	0,5-5
5	C	Galehemp OW	Aston Chemicals Ltd.	Emulgator	1-10
6	C	Akogel™	Nordmann, Rassmann GmbH	Emolient	1-10
7	C	Synovea® EL	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient	1-10
8	C	Phytosqualan®	Sophim/ Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient	1-10
9	C	LIPEX® PreAct™	Nordmann, Rassmann GmbH	Emolient	1-10
10	C	Raspberry Necta®	Amita Health Care Poland	Emolient, antyoksydant	1-5
11	C	Tocomix L70- IP Organic CO	IMCD Group	Antyoksydant, emolient	0,1-3
12	C	Citropol H	Safic- Alcan Poland	Emolient	1-10
13	C	Ceramidone®	Aston Chemicals Ltd.	Emolient	1-5
14	C	CeraFluid®	Amita Health Care Poland	Emolient, ceramid	1-5
15	D	E-Leen Green C	Safic- Alcan Poland	Konserwant	1-5

6.1.3. Preparatyka żelu

Składniki fazy (B) nr 2-3 (tab. 11) naważono do zlewki i wymieszano ręcznie za pomocą bagietki. Dodano do wody (A) podczas mieszania za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100 Value do uzyskania jednorodnej masy, bez grudek. Następnie dodano składnik fazy (C) nr 4 i mieszano. Cały proces przebiegał w temperaturze pokojowej wynoszącej około 25 °C. Skład INCI żelu:

Ingredients/ INCI: Aqua, Propanediol, Xanthan Gum, Pentylene Glycol, Sodium Stearoyl Lactylate, Glyceryl Caprylate/ Caprate, Tapioca Starch, Algin.

Tabela 11. Skład żelu.

Lp.	Faza żelu	Nazwa handlowa surowca	Dostawca	Funkcja	Zakres stężenia [% w/w]
1	A	Woda demineralizowana	-	Rozpuszczalnik	50-100
2	B	Massocare Propanediol Nat MB	Comercial Quimica Masso	Humektant, booster konserwantu	1-15
3	B	Instathix®	Impag Group	Zagęstnik	1-5
4	C	E-Leen Green C	Safic- Alcan Poland	Konserwant	1-5

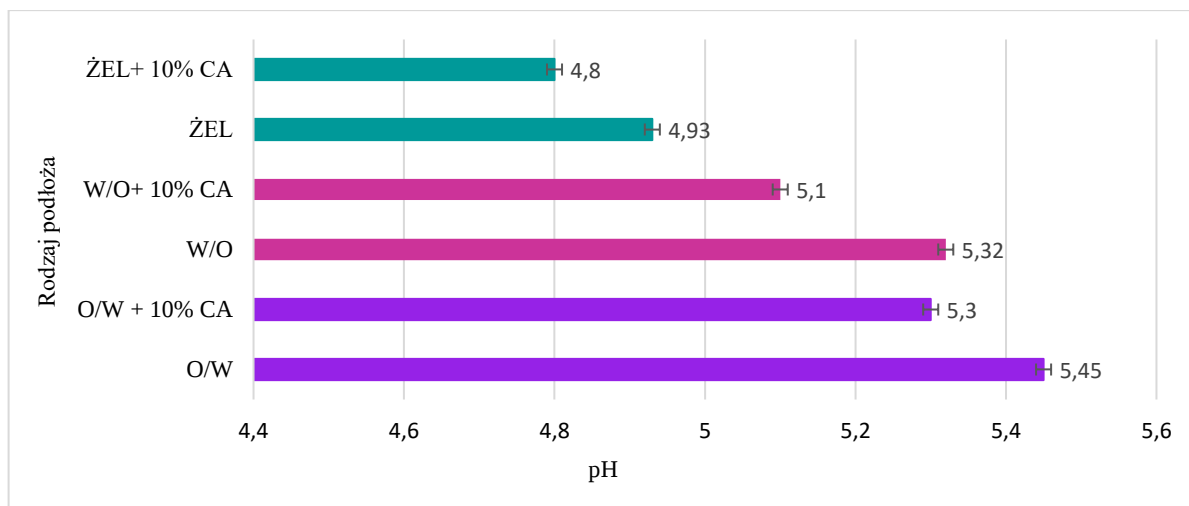
6.2. Badanie parametrów fizykochemicznych podłoży kosmetycznych (nośników) [D3]

Przygotowane podłoża kosmetyczne opisane w podrozdziale 6.1., a także ich wersje wzbogacone o 10 % wag. wybranego ekstraktu z wąkroty azjatyckiej (selekcję ekstraktu opisano w rozdziale 5) poddano badaniom podstawowych parametrów fizykochemicznych: odczynu pH, lepkości oraz gęstości. Aparatura użyta do pomiarów była cyklicznie wzorcowana w certyfikowanych laboratoriach pomiarowych. Szczegółowe wyniki przedstawiono w publikacji **D3** (tab. 2).

6.2.1. Oznaczenie pH

Wartości pH mierzono za pomocą pH-metru Fisherbrand™ Accumet AB 150 (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Wykorzystano metodę potencjometryczną polegającą na bezpośrednim zanurzeniu elektrody w analizowanej próbce, której temperatura wynosiła 20 °C. Wszystkie pomiary wykonano trzykrotnie, a wartości pomiarów uśredniono. Wynik podano z odchyleniem standardowym dla ($n = 3$) i przedstawiono na rysunku nr 9.

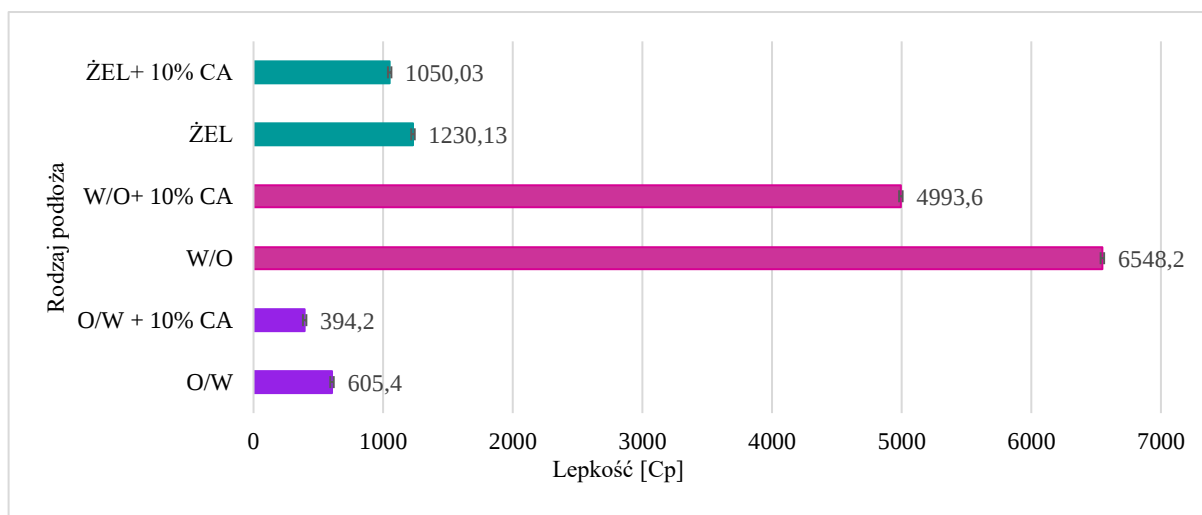
Jak wynika z przedstawionych danych (rys. 9) oraz wniosków zamieszczonych w publikacji **D3**, wartości pH wszystkich podłoży kosmetycznych oscylowały w granicach od 4,93 do 5,45, co oznacza, że były zbliżone do fizjologicznego pH zdrowej skóry [100]. Wprowadzenie ekstraktu z wąkroty azjatyckiej spowodowało nieznaczne obniżenie wartości pH wszystkich formułacji, które mieściły się w zakresie 4,80 do 5,30. Wynika to z wartości pH ekstraktu z wąkroty azjatyckiej, które wynosiło 4,0. Niemniej, odczyn pH wszystkich uzyskanych formułacji mieści się w zakresie uważanym za optymalne pH skóry ludzkiej mieszczące się w zakresie 4,1–5,8 [100].



Rysunek 9. Wartości pH dla podłoży kosmetycznych: emulsji o/w [O/W], emulsji o/w zawierającej 10 % ekstraktu z *Centella asiatica* L. [O/W + 10% CA], emulsji w/o [W/O], emulsji w/o zawierającej 10 % ekstraktu z *Centella asiatica* L. [W/O + 10% CA], żelu [Żel] oraz żelu zawierającego 10 % ekstraktu z *Centella asiatica* L. [Żel + 10% CA].

6.2.2. Oznaczenie lepkości

Lepkość oceniano za pomocą wiskozymetru DV2T (AMETEK Brookfield, Middleboro, MA, USA) wyposażonego w adapter do małych próbek. Pomiary dla każdej próbki przeprowadzono trzykrotnie w temperaturze 20 °C używając wrzeciona nr SC4-29 i prędkości obrotów 100 rpm (dla emulsji w/o) oraz wrzeciona nr SC4-21 i prędkości obrotów 150 rpm (dla emulsji o/w i żelu). Obliczono wartość średnią z ($n = 3$) oraz odchylenie standardowe, a wyniki pomiarów przedstawiono na rys. 10.



Rysunek 10. Wartości lepkości dla podłoży kosmetycznych: emulsji o/w [O/W], emulsji o/w zawierającej 10 % ekstraktu z *Centella asiatica* L. [O/W + 10% CA], emulsji w/o [W/O], emulsji w/o zawierającej 10 % ekstraktu z *Centella asiatica* L. [W/O + 10% CA], żelu [Żel] oraz żelu zawierającego 10 % ekstraktu z *Centella asiatica* L. [Żel + 10% CA].

Jak wynika z danych przedstawionych na rysunku nr 10 najwyższą lepkość posiadała emulsja typu w/o (6548,2 cP). Jest to spowodowane większą zawartością fazy olejowej w emulsji typu w/o (31 %) w porównaniu do emulsji o/w (21 %) i doбором olejów o wyższej lepkości i gęstości, co skutkuje

wyższą lepkością zewnętrznej fazy emulsji [101]. Ponadto, w przypadku emulsji w/o otrzymywanych w procesie na zimno, nie ma możliwości wprowadzenia modyfikatorów reologii w postaci wosków ze względu na wysoki punkt topnienia tych substancji. Dlatego w tego typu emulsjach uzyskanie odpowiednio wysokiej lepkości zależy od rodzaju emulgatora, a także parametrów procesu emulsyfikacji, takich jak czas i prędkość mieszania i homogenizacji masy kosmetycznej, co wpływa na wielkość kropli fazy rozproszonej (wewnętrznej) emulsji [102]. Niewątpliwie, wpływ na lepkość ma również wprowadzenie do fazy wodnej soli takiej jak siarczan magnezu [103]. Najniższą lepkość spośród badanych formułacji posiadał żel (1230,13 Cp). Podobnie jak w przypadku pH, dodanie 10 % wag. ekstraktu z wąkroty azjatyckiej spowodowało spadek lepkości wszystkich badanych podłoży kosmetycznych. Więcej szczegółów na temat badania lepkości znajduje się w publikacji **D3**, podrozdział 2.1.2.

6.2.3. Oznaczenie gęstości

Gęstość mierzono metodą piknometryczną przy użyciu piknometrów metalowych P-1 (Pol-Zaf s.c., Wrocław, Polska). Po dokładnym umyciu i osuszeniu piknometrów wyznaczono jego masę, a następnie napełniono go masą badanej formułacji kosmetycznej tak, aby jej nadmiar został odprowadzony przez specjalny otwór znajdujący się w przykrywie piknometrów. Piknometr zawierający masę badanej próbki ponownie zważono. Wszystkie pomiary wykonywano trzykrotnie w temperaturze 20 °C, wyniki uśredniono ($n = 3$) i policzono odchylenie standardowe. Znajac masę próbki i objętość piknometrów, gęstość wyliczono z poniższego wzoru: [104]

$$(4) \quad d(t) = 0,99985 (m(p+t)-m_p)/V_p + 0,0012$$

gdzie:

$m(p+t)$ – masa piknometrów napełnionych masą badanej próbki [g],

m_p – masa pustego piknometrów [g],

V_p – objętość piknometrów wyznaczona przez producenta (25,08 cm³)

Zgodnie z wynikami opisanymi w publikacji **D3**, podrozdział 2.1.2., wartości gęstości wszystkich podłoży kosmetycznych były zbliżone do siebie i oscylowały wokół wartości 1 g/ml. Dodatek ekstraktu z wąkroty azjatyckiej nie miał wpływu na wartości gęstości mas kosmetycznych.

6.3. Badania stabilności

Przeprowadzone badania stabilności termicznej dotyczyły zarówno opracowanych podłoży kosmetycznych zawierających 10 % wag. ekstraktu z wąkroty azjatyckiej, jak i substancji aktywnych (madekasozydu i azjatykozydu) zawartych w ekstrakcie. Dokładny ich opis oraz analiza wyników znajduje się w publikacji **D3**.

6.3.1. Badanie stabilności podłoży kosmetycznych (nośników)

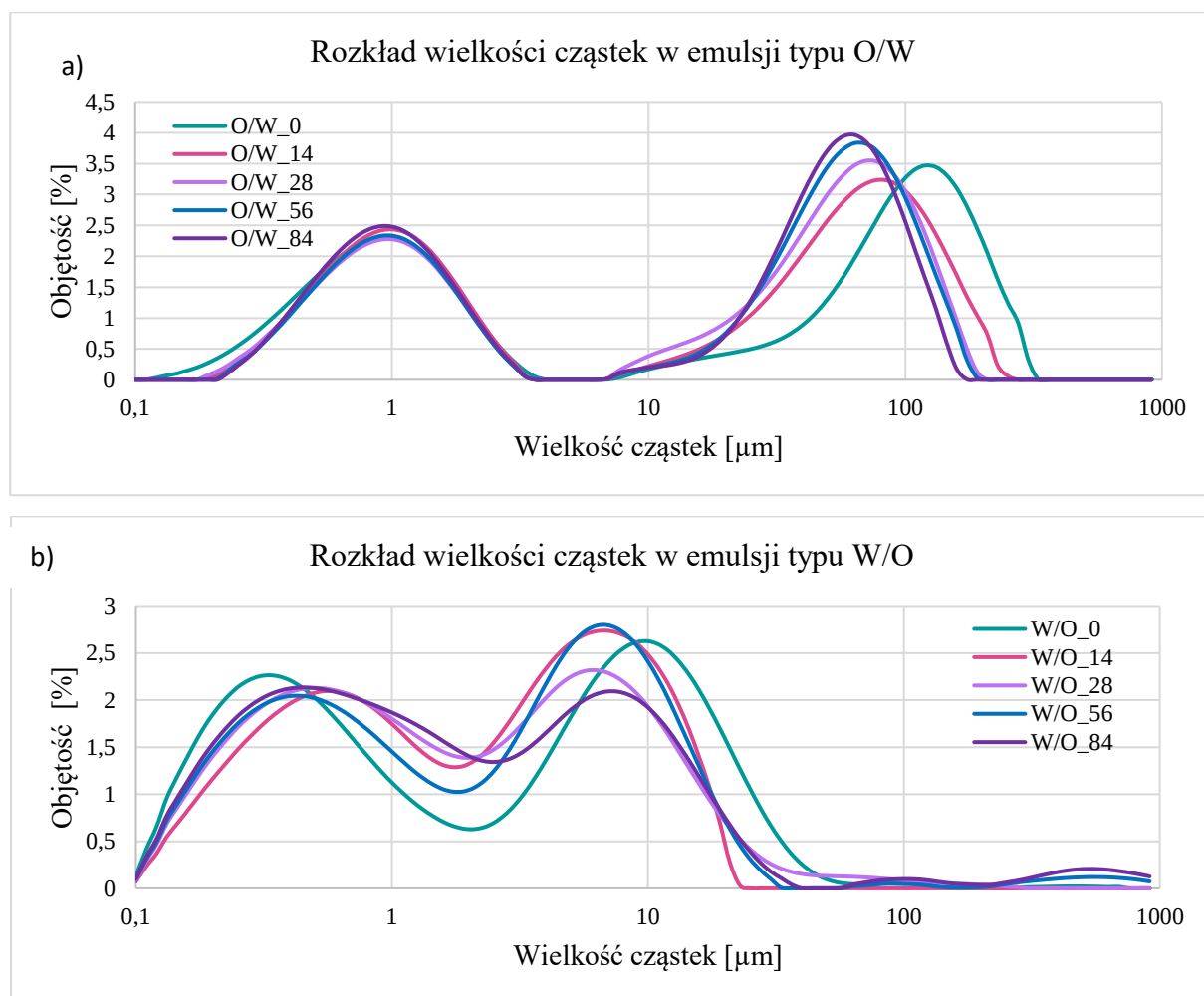
Do badań stabilności otrzymanych w procesie na zimno podłoży kosmetycznych wybrano techniki pozwalające w krótkim czasie ocenić wszystkie zjawiska o charakterze niestabilności pojawiające się w próbce oraz określić mechanizmy ich powstawania, takie jak flokulacja, śmietanowanie, sedymentacja, zmiana wielkości cząstek fazy rozproszonej, wartość potencjału zeta. Zmiany te można wykryć za pomocą technik, takich jak: dyfrakcja laserowa (LD), elektroforetyczne rozpraszanie światła (ELS) i statyczne wielokrotne rozpraszanie światła (SMLS) zanim będą one widoczne gołym okiem [102,105]. Dzięki temu możliwe jest szybkie podjęcie działań reformulacyjnych w celu stabilizacji układu. Badania stabilności podłoży kosmetycznych z wykorzystaniem wymienionych technik były prowadzone bezpośrednio po przygotowaniu próbek oraz po 14, 18, 56 i 84 dniach przechowywania próbek w temperaturze 45 °C, co daje pewne prognozy długoterminowej stabilności produktu w warunkach otoczenia.

6.3.1.1. Rozkład wielkości cząstek emulsji

Rozkład wielkości cząstek emulsji typu w/o oraz o/w analizowano za pomocą techniki LD przy użyciu aparatu Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Wielka Brytania) z jednostką do dyspersji na mokro, co oznacza zdyspergowanie odpowiedniej ilości emulsji w wodzie destylowanej. Dla każdej próbki pomiary powtarzano pięć razy. Przed analizą współczynnik refrakcji każdej próbki określono przy użyciu przenośnego refraktometru Refracto™ 30GS (Mettler Toledo, Greifensee, Szwajcaria).

W stabilnej emulsji zarówno dyspersja cząstek fazy rozproszonej oraz ich wielkość są równomierne. Ponadto, im mniejsze rozmiary cząstek fazy rozproszonej oraz węższy rozkład ich wielkości, tym większą stabilnością odznacza się emulsja. Na podstawie uzyskanych danych przedstawionych na rysunku nr 11(a) można zauważyć, że w przypadku **emulsji typu o/w** rozkład wielkości cząstek fazy rozproszonej (PSD) jest bimodalny w każdym czasowym punkcie pomiarowym (0-84 dni). Dla pomiarów bezpośrednio po przygotowaniu próbki (W/O_0) widoczne są niewielkie zmiany w PSD większych cząstek (kropli), o czym świadczy przesunięcie maksimum piku. Jest to spowodowane stabilizowaniem emulsji przez emulgator, które wymaga co najmniej jednego dnia przebywania emulsji w temperaturze pokojowej. Natomiast późniejsze pomiary potwierdzają, że mniejsze krople fazy wewnętrznej (olejowej) zostały bardzo dobrze ustabilizowane przez użyty emulgator oraz przez odpowiednio dobrane parametry procesu technologicznego na zimno, ponieważ nie wykryto żadnych drastycznych zmian w PSD [D3]. Na tej podstawie możemy wnioskować, że zarówno rodzaj i ilość użytego emulgatora, jak i warunki procesu emulsyfikacji, takie jak temperatura, czas i prędkość mieszania oraz homogenizacji zostały odpowiednio dobrane. Nieco inaczej wygląda PSD w przypadku emulsji typu w/o (rys. 11b). Analizując dane dla tego typu emulsji można zauważyć szerszy rozkład wielkości cząstek oraz większą różnicę w ich wielkości pomiędzy świeżo przygotowaną emulsją (W/O_0), a emulsją badaną w kolejnych punktach pomiarowych (14-84 dni). Oznacza to, że

zastosowany rodzaj emulgatora stabilizuje emulsję w czasie. Ponadto w przypadku próbek przechowywanych przez 56 dni i 84 dni można założyć niewielką tendencję do aglomeracji kropelek fazy wewnętrznej (wodnej) emulsji, co objawia się pojawieniem małych pików przy wartościach około 100 μm i 550 μm . Na tej podstawie można wnioskować tendencję emulsji do flokulacji, co może być spowodowane dużą różnicą w gęstości fazy wodnej i olejowej emulsji [106].



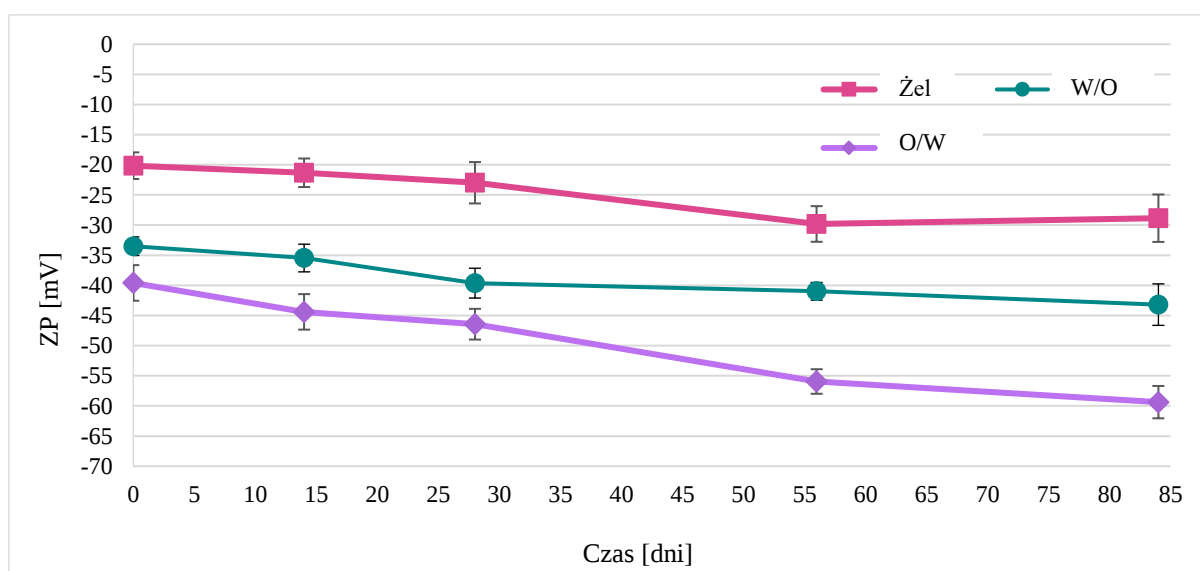
Rysunek 11. Rozkład wielkości cząstek w emulsji zawierającej 10 % ekstraktu z wankruty azjatyckiej: (a) typu w/o (b) typu o/w. Cyfry w legendzie wskazują liczbę dni przechowywania próbki w temperaturze 45 °C [D3].

6.3.1.2. Potencjał zeta

Do pomiarów potencjału zeta (ZP) zastosowano analizator Zetasizer Nano-ZS (Malvern Panalytical Ltd., Wielka Brytania), który działa w oparciu o technikę ELS. Przed pomiarem odpowiednią ilość emulsji lub żelu zawieszono w wodzie destylowanej przy użyciu łaźni ultradźwiękowej, a powstałą mieszaninę dodatkowo rozcieńczono w wodzie, aby uniknąć efektów wielokrotnego rozpraszania. Pomiarów dokonano 10-krotnie dla każdej próbki, w temperaturze 25 °C. Następnie uśredniono uzyskane wartości ($n = 10$) i obliczono odchylenie standardowe.

Potencjał zeta (ZP) określa siły odpychania cząstek w układach koloidalnych i jest mierzony w oparciu o zjawiska elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS). Analiza ZP polega na pomiarach ruchliwości elektroforetycznej, czyli prędkości ruchu naładowanych cząstek zawieszonych w cieczy pod wpływem pola elektrycznego. Następnie ruchliwość elektroforetyczną przekształca się w wartość ZP, który może być używany jako miara stabilności układu koloidalnego [107]. Próbki zawiesin wykazujące ZP większy niż ± 30 mV można uznać za stabilne, natomiast wartość ZP bliska zeru sugeruje niestabilność wynikającą z procesów flokulacji lub koalescencji. Podsumowując, im wyższy ZP, tym bardziej prawdopodobne jest zachowanie stabilności dyspersji [108].

Analizując wyniki dotyczące wartości ZP dla badanych podłoży kosmetycznych przedstawione na rysunku nr 12 można wnioskować, że otrzymane emulsje typu w/o oraz typu o/w wykazują dobrą stabilność. Potwierdzają to wartości ZP, które mierzone bezpośrednio po przygotowaniu próbek wynoszą $-33,5$ mV dla emulsji w/o oraz $-36,6$ mV dla emulsji o/w.



Rysunek 12. Wartości potencjału zeta mierzone w próbkach: żelu, emulsji o/w (O/W) oraz emulsji w/o (W/O) zawierających 10 % wag. ekstraktu z wąkroty azjatyckiej w czasie 84 dni przechowywania próbek w temperaturze $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ [D3].

Ponadto, wartości ZP dla obydwu emulsji wzrastały wraz z czasem ich przechowywania w temperaturze $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, osiągając wartości $-43,2$ mV dla emulsji w/o oraz $-59,4$ mV dla emulsji o/w po 84 dniach, co potwierdza silniejsze oddziaływania elektrostatyczne między cząstkami fazy rozproszonej obydwu emulsji, a tym samym ich lepszą dyspersję. Natomiast analiza ZP dla próbki żelu wykazała nieznacznie niższe wartości, wynoszące poniżej 30 mV (od $-21,3$ mV dla świeżo przygotowanej próbki do $-28,9$ mV dla próbki po 84 dniach przechowywania w temperaturze $45\text{ }^{\circ}\text{C}$). Jednak biorąc pod uwagę specyfikę układu koloidalnego, który w przypadku żeli jest tworzony przez sieć przestrzenną bardzo licznych cząstek fazy rozproszonej uzyskane wyniki mogą również wskazywać na zadowalający poziom stabilności. Cząstki fazy rozproszonej są stabilizowane raczej sterycznie przez reakcję sieciowania naturalnych polimerów zastosowanych do otrzymania żelu, takich jak guma ksantanowa, alginian i

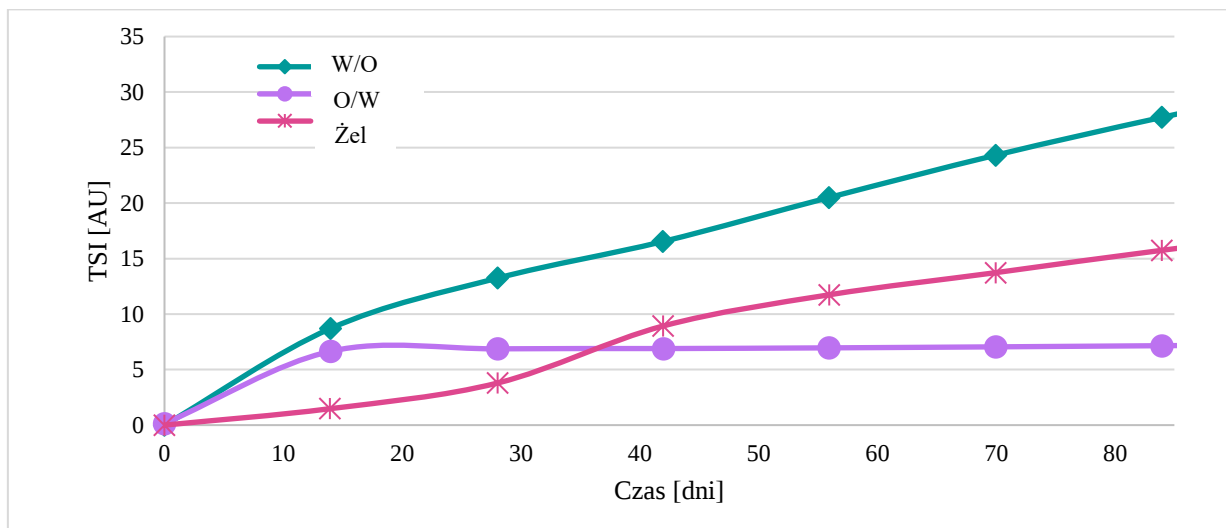
skrobia z tapioki, niż poprzez odpychanie elektrostatyczne [107-108]. Podsumowując, wszystkie otrzymane podłoża kosmetyczne można uznać za stosunkowo stabilne, z czego największą stabilnością charakteryzuje się emulsja typu o/w, która wykazywała najwyższe wartości ZP. Badanie potwierdziło, że opracowany proces tworzenia emulsji oraz żelu na zimno pozwolił uzyskać różnego rodzaju stabilne podłoża kosmetyczne pomimo wielu ograniczeń w możliwościach zastosowania emulgatorów, zagęstników czy też innych stabilizatorów emulsji, takich jak woski czy alkohole tłuszczowe, które wymagają stopienia w podwyższonej temperaturze (70-80 °C).

6.3.1.3. Indeks stabilności TSI (ang. Turbiscan Stability Index)

Do pomiarów indeksu stabilności TSI wykorzystano urządzenie Turbiscan Lab® Expert (Formulation, Tuluza, Francja). Wskaźnik TSI, który jest indeksem stabilności charakterystycznym dla urządzenia TurbiScan® został obliczony na podstawie wyników pomiarów rozpraszania wstecznego (Δ BS) fotonów światła na cząstkach fazy rozproszonej emulsji w/o, emulsji o/w i żelu oraz transmisji (Δ T) światła w badanych próbkach przechowywanych w temperaturze 45 °C. TSI jako parametr statystyczny podsumowuje wszystkie wahania wartości rozpraszania wstecznego i transmisji w badanej próbce i umożliwia ocenę występowania niestabilności, takich jak sedymentacja, śmietankowanie, lub flokulacja. W stabilnej próbce wartość indeksu TSI zmierza do zera, natomiast w przypadku destabilizacji układu parametr TSI osiąga wyższe wartości [109,110].

Na podstawie analizy wyników przedstawionych na rysunku nr 13 oceniono, że najbardziej stabilną formacją jest emulsja typu o/w, ponieważ parametr TSI wzrasta do wartości 6,7 w ciągu pierwszych 14 dni, a następnie utrzymuje się na stałym poziomie. Próbkę żelu w ciągu pierwszych 30 dni badania również wykazywała niskie wartości indeksu TSI osiągające wartość 3,8. Natomiast w kolejnych tygodniach przechowywania próbki w temperaturze 45 °C wartości TSI sukcesywnie wzrastały, osiągając wartość 15,7 w 84 dniu badania. Najmniej stabilnym układem jest emulsja typu w/o, dla której wartość parametru TSI stale wzrastała w ciągu 84 dni trwania badania osiągając maksymalną wartość 27,7. Otrzymane wyniki badań stabilności z wykorzystaniem metody statycznego wielokrotnego rozpraszania światła były spójne z wynikami uzyskanymi poprzez pomiar potencjału zeta (rys. 12) oraz rozkładu wielkości cząstek (rys. 11a i 11b). Każda z zastosowanych technik badań stabilności potwierdziła najlepszą stabilność emulsji typu o/w, co wskazuje na prawidłowe dobranie parametrów procesu technologicznego, takich jak rodzaj i ilość zastosowanego emulgatora oraz stabilizatorów emulsji, temperatura procesu emulsyfikacji, czas i prędkość obrotów mieszadła i homogenizatora. W przypadku żelu, zarówno wyniki pomiarów potencjału zeta (rys. 13) oraz parametru TSI (rys. 14) wskazują na niewielką agregację cząstek fazy rozproszonej. Jednak stabilizację układu może zapewnić gęste upakowanie sieci żelowej stabilizowanej przez polimery pochodzenia naturalnego [111]. Uzyskane wyniki rozkładu wielkości cząstek (rys. 12b) oraz parametru TSI wskazują, że emulsja typu w/o jest najmniej stabilnym układem, nieodpornym na działanie podwyższonej temperatury, w którym może rozpoczynać się proces flokulacji. Wnioski te należy uwzględnić przy formułowaniu

docelowych produktów kosmetycznych na bazie tego typu emulsji. Dokładny opis badań stabilności z wykorzystaniem opisanych technik oraz dyskusja wyników znajdują się w publikacji **D3**.



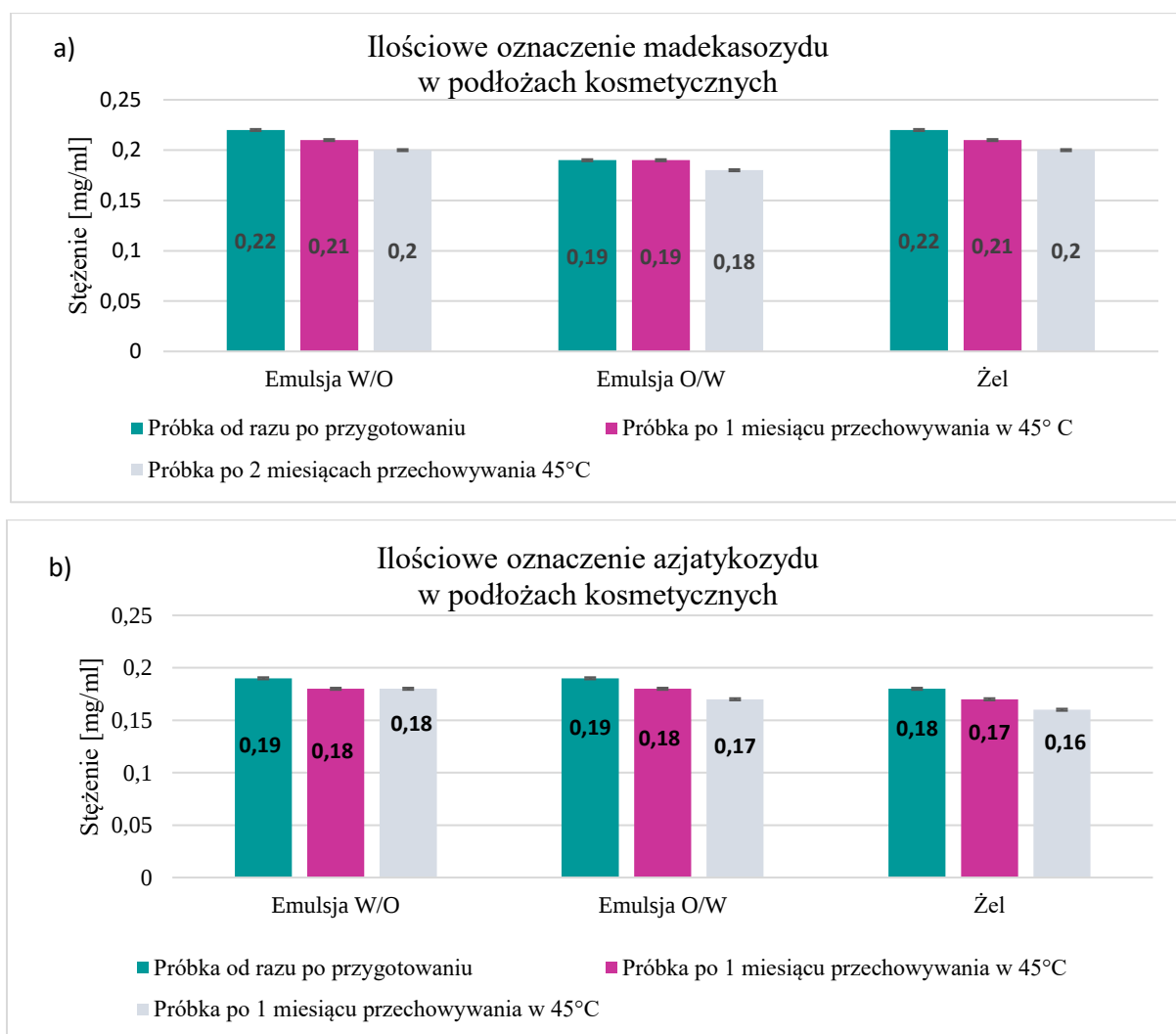
Rysunek 13. Stabilność wyrażona jako wartości TSI w funkcji czasu mierzona w próbkach: emulsji w/o (W/O), emulsji o/w (O/W) oraz żelu zawierających 10 % wag. ekstraktu z wążkroty azjatyckiej w czasie 84 dni przechowywania próbek w temperaturze 45 °C [D3].

6.3.2. Badanie stabilności madekazozydu i azjatykozydu w otrzymanych podłożach kosmetycznych

Badanie stabilności związków aktywnych zawartych w ekstraktach wprowadzonych do różnego rodzaju formułacji kosmetycznych jest bardzo istotne, ponieważ daje odpowiedź, czy warunki zewnętrzne, takie jak proces technologiczny wytwarzania produktów kosmetycznych, pH formułacji, działanie światła oraz temperatura nie powodują destabilizacji substancji czynnych. Ponadto, dzięki temu badaniu możliwe jest potwierdzenie, że substancje aktywne, takie jak madekasozyd i azjatykozyd zawarte w produktach kosmetycznych są stabilne w czasie przechowywania produktów w podwyższonej temperaturze, co odzwierciedla rzeczywiste warunki użytkowania kosmetyków przez klientów.

Zawartość madekazozydu i azjatykozydu oznaczono metodą HPLC opisaną w rozdziale 4 bezpośrednio po przygotowaniu formułacji oraz po 1 i 2 miesiącach przechowywania próbek emulsji w/o, emulsji o/w i żelu w podwyższonej temperaturze (45 °C). Próbki formułacji do analizy HPLC przygotowano metodą ekstrakcji opisaną w podrozdziale 4.4. Pomiar dla każdej próbki wykonano 3-krotnie, a wyniki uśredniono i policzono odchylenie standardowe. Metodę obliczenia zawartości madekazozydu i azjatykozydu w badanych próbkach opisano w podrozdziale 4.6.

Na rysunku nr 14 przedstawiono wyniki badań stabilności termicznej madekazozydu (rys. 14a) i azjatykozydu (rys. 14b) pochodzących z ekstraktu z wążkroty azjatyckiej w przygotowanych formułacjach: emulsji w/o, emulsji o/w oraz żelu zawierających 10% wag. ekstraktu [D3].



Rysunek 14. Stabilność termiczna a) madekasozydu b) azjatykozydu w różnych podłożach kosmetycznych w czasie przechowywania próbek w temperaturze 45 °C.

Z przedstawionych wyników można wnioskować, że stężenia madekasozydu i azjatykozydu pozostawały niemal stałe w każdym z badanych podłoży kosmetycznych w czasie 2 miesięcy ich przechowywania w temperaturze 45 °C. Potwierdza to, że zarówno proces technologiczny tworzenia formułacji kosmetycznych na zimno, pH formułacji oraz podwyższona temperatura nie powodują destabilizacji madekasozydu i azjatykozydu w czasie. Dyskusja wyników dla badań stabilności znajduje się w publikacji **D3**, podrozdział 2.3.

6.4. Badanie kontrolowanego uwalniania madekasozydu i azjatykozydu z przygotowanych podłoży kosmetycznych (nośników)

Kolejnym etapem badań przygotowanych podłoży kosmetycznych było badanie kontrolowanego uwalniania madekasozydu i azjatykozydu wyizolowanych z liści wąkroty azjatyckiej. Warunki przeprowadzenia badania były zaprojektowane ze szczególnym uwzględnieniem możliwości miejscowego zastosowania nośników na skórę atopową (wartości pH płynu akceptorowego, skład emulsji o/w oraz w/o bogaty w emolienty). Celem badania było wytypowanie najbardziej optymalnych

podłoży kosmetycznych (nośników) sprzyjających biodostępności madekasozydu i azjatykozydu, a także zweryfikowanie wpływu zarówno fizjologicznego pH zdrowej skóry, jak i podwyższonego pH skóry atopowej oraz stężenia substancji aktywnych na profil ich uwalniania [D3].

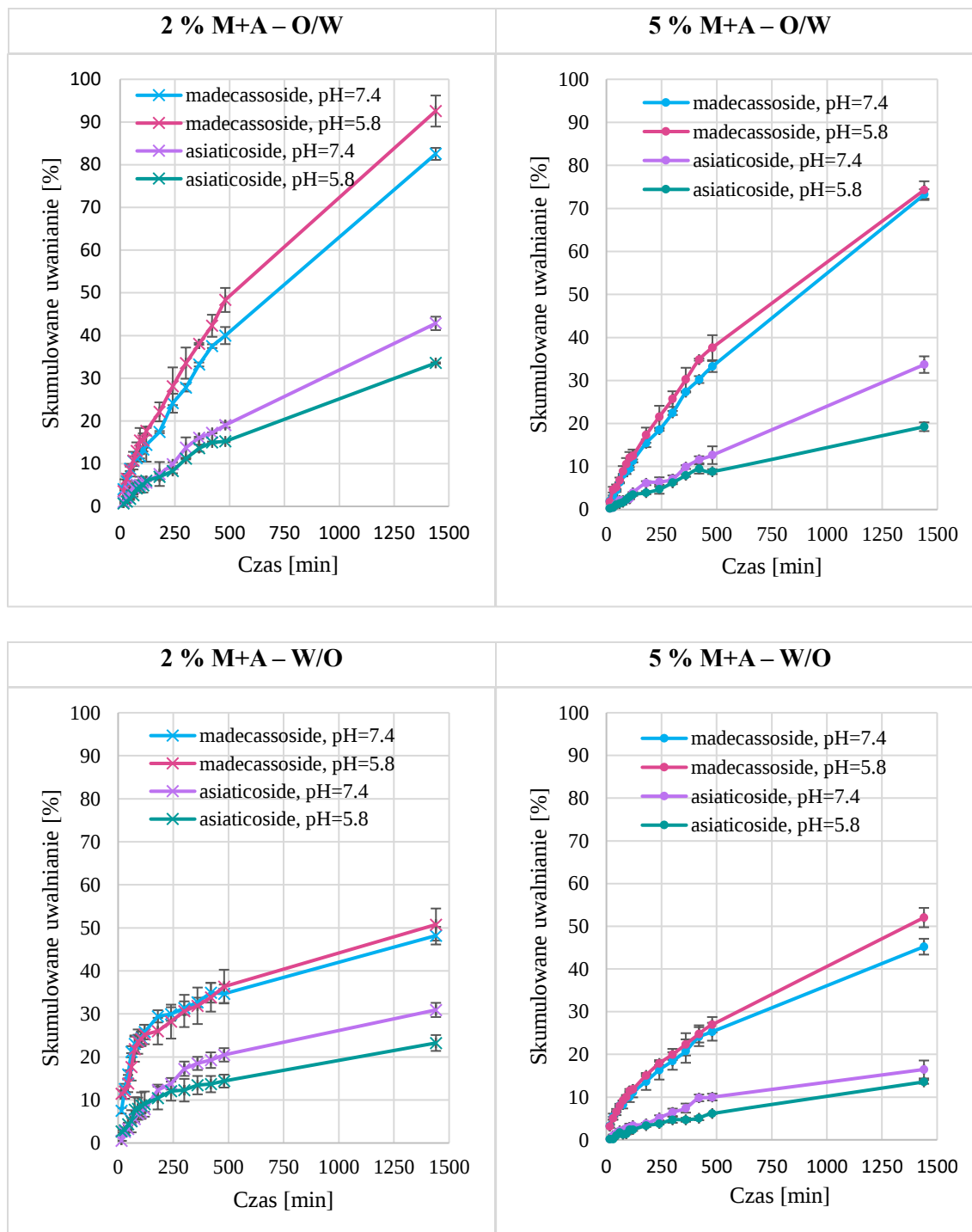
Do badania wykorzystano aparat dyfuzyjny Varian Vankel 7010 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), natomiast w celu ilościowego i jakościowego oznaczenia madekasozydu i azjatykozydu uwolnionych do płynu akceptorowego wykorzystano opracowaną metodę HPLC opisaną w rozdziale 4. W celu przygotowania próbek do badań zastosowano metodę dodatku wzorca. Do fazy wodnej emulsji oraz żelu opisanych w rozdziale 6.1. dodano substancje wyizolowane z liści wąkroty azjatyckiej, otrzymane w procesach zgodnych z Zieloną Chemią: madekasozyd (TEGO® Natural Madecassoside, Evonik) i azjatykozyd (Asiaticoside®, Ersbloh) w stężeniu 2 % wag., lub 5 % wag. Badanie przeprowadzono przy użyciu komór dyfuzyjnych oraz membrany wykonanej z celulozy (Cuprophane®, Medicell International Ltd.). Warunki przeprowadzenia badania podano w tabeli nr 12. Dokładny przebieg badania opisany jest w publikacji D3 pt. „Controlled release of madecassoside and asiaticoside of *Centella asiatica* L. origin from sustainable cold-processed topical formulations”.

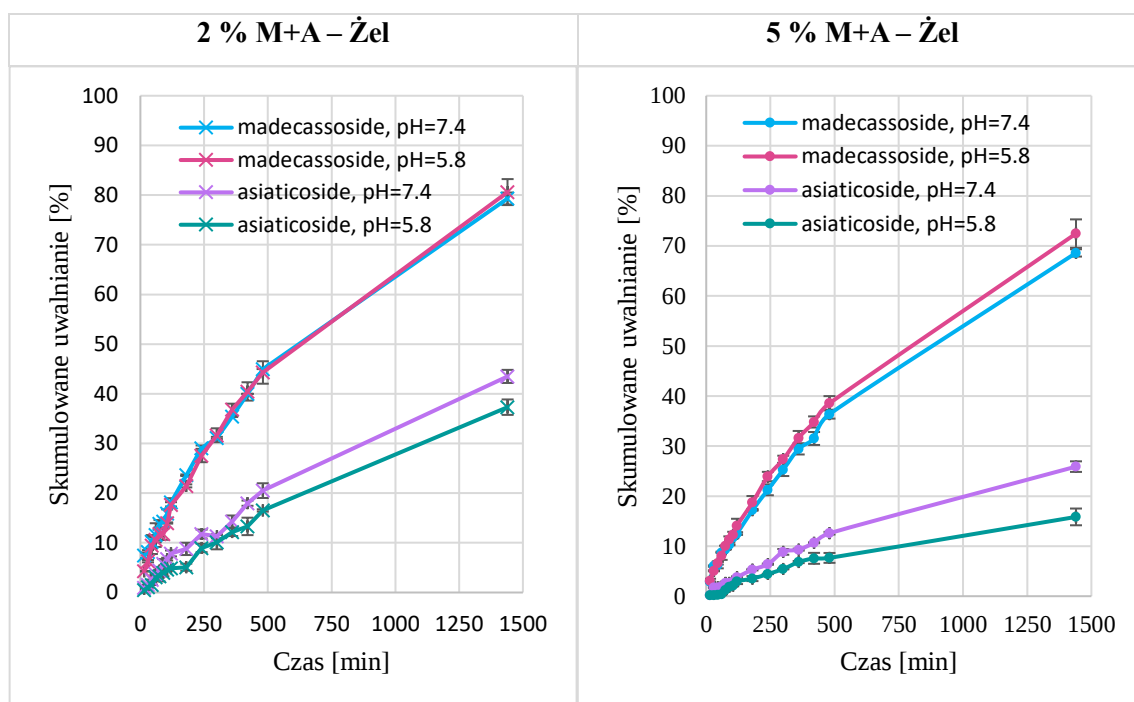
Tabela 12. Warunki przeprowadzenia badania uwalniania madekasozydu i azjatykozydu z badanych podłoży kosmetycznych (nośników).

Warunki przeprowadzenia badania uwalniania madekasozydu i azjatykozydu	
Rodzaj podłoża	Emulsja w/o, emulsja o/w, żel
Stężenie uwalnianych substancji	2 % wag. lub 5 % wag.
Ilość naważonej próbki	1 g
Rodzaj membrany	Membrana celulozowa Cuprophane® o średnicy porów 0,22 µm
Rodzaj płynu akceptorowego	Bufor fosforanowy o pH = 5,8 lub bufor boranowy o pH = 7,4
Objętość płynu akceptorowego	100 ml
Temperatura płynu akceptorowego	37 °C ± 0,5 °C
Prędkość obrotów mieszadła	100 obr./min
Czas trwania badania	24 h
Czas poboru próbki	W ciągu pierwszych 2 h: co 15 min W ciągu kolejnych 6 h: co 1 h Ostatnia próbka: po 24 h
Metoda analizy ilościowej i jakościowej uwolnionego madekasozydu i azjatykozydu	HPLC z detektorem UV-VIS

6.4.1. Profile uwalniania madekasozydu i azjatykozydu

Badanie uwalniania zostało przeprowadzone dwukrotnie dla każdej formułacji w celu sprawdzenia powtarzalności wyników. Uzyskane wyniki uśredniono, a następnie zaprezentowano na wykresie przedstawiającym procent uwolnionej substancji aktywnej w funkcji czasu (rys. 15).





Rysunek 15. Profile kontrolowanego uwalniania madekasozydu (M) i azjatykozydu (A) z różnych podłoży kosmetycznych (nośników): emulsji typu o/w (O/W), emulsji typu w/o (W/O) oraz żelu do płynu akceptorowego o pH 5,8 oraz pH 7,4 [D3].

Na podstawie analizy wyników badania (rys. 15) wysunięto następujące wnioski:

- wyższe stężenie madekasozydu i azjatykozydu w badanych podłożach kosmetycznych nie zwiększa ich skumulowanego uwalniania z podłoża.
- rodzaj podłoża kosmetycznego ma istotny wpływ na ilość uwolnionego madekasozydu i azjatykozydu
- w ciągu 24 godzin przebiegu badania największe ilości madekasozydu ($\approx 90\%$) i azjatykozydu ($\approx 40\%$) zostały uwolnione z emulsji typu o/w, czyniąc ten rodzaj emulsji najlepszym nośnikiem dla badanych substancji aktywnych.
- nieco mniejsze ilości madekasozydu ($\approx 80\%$) oraz porównywalne w stosunku do emulsji o/w ilości azjatykozydu ($\approx 40\%$) zostały uwolnione z żelu w czasie 24 godzin trwania badania. W związku z tym żel został uznany za drugi pod względem profilu uwalniania dobrze dobrany nośnik dla badanych substancji aktywnych.
- najmniejsze ilości madekasozydu ($\approx 50\%$) i azjatykozydu ($\approx 20\%$) zostały uwolnione z emulsji typu w/o, która stwarza najmniej sprzyjające środowisko dla uwalniania badanych substancji aktywnych. Może to być związane z wyższą w porównaniu z pozostałymi podłożami lepkością emulsji w/o (rys. 11, rozdział 6.2.2.), co hamuje migrację substancji aktywnych do warstwy granicznej, którą stanowi membrana celulozowa [112].
- pH płynu akceptorowego ma istotny wpływ na ilości uwolnionych substancji aktywnych, co jest szczególnie wyraźne w przypadku uwalniania azjatykozydu (większe ilości uwolnionego

azjatykozydu przy pH=7,4). Ma to szczególne znaczenie w pielęgnacji skóry atopowej, której pH jest podwyższone ze względu na dysfunkcję bariery naskórkowej oraz procesy zapalne zachodzące w skórze [113-114].

- Niższe pH płynu akceptorowego wynoszące 5,8 nieznacznie obniżyło ilość uwolnionego azjatykozydu, jednak nadal sprzyjało uwalnianiu madekasozydu, co potwierdza dobrą stabilność obydwu substancji aktywnych zarówno w podwyższonym, jak i fizjologicznym pH skóry oraz wskazuje na możliwość skutecznego ich zastosowania na skórę atopową.

Podsumowując można uznać, że badane podłoża zawierające ekstrakt z wąkroty azjatyckiej uzyskane w trakcie badań umożliwią kompleksową pielęgnację skóry z AZS, charakteryzującej się podwyższonym pH jej powierzchni. Szczegółowa analiza oraz dyskusja wyników badania kontrolowanego uwalniania madekasozydu i azjatykozydu z otrzymanych podłoży kosmetycznych znajduje się w publikacji D3 pt. „Controlled release of madecassoside and asiaticoside of *Centella asiatica* L. origin from sustainable cold-processed topical formulations”.

6.4.2. Dopasowanie modeli kinetycznych do profilu uwalniania madekasozydu i azjatykozydu

Aby określić mechanizm uwalniania madekasozydu i azjatykozydu z badanych formułacji przeprowadzono ocenę dopasowania czterech różnych modeli kinetycznych do profilu uwalniania substancji czynnych stosując równania (5-8):

$$(5) \text{ Model kinetyczny pierwszego rzędu } \log \frac{Q_t}{Q_0} = \frac{K_1}{2.303} \cdot t$$

$$(6) \text{ Model Higuchi'ego } \frac{Q_t}{Q_0} = K_H \sqrt{t}$$

$$(7) \text{ Model Korsmeyer-Peppas'a } \log \frac{Q_t}{Q_0} = n \cdot \log t + \log K_K$$

$$(8) \text{ Model Hixson-Crowell'a } (1 - \frac{Q_t}{Q_0})^{\frac{1}{3}} = 1 - K_\beta \cdot t$$

gdzie:

Q_t — ilość substancji czynnej uwolnionej z formułacji, mg/ml

Q_0 — początkowa ilość substancji czynnej w formułacji, mg/ml

t — czas trwania procesu uwalniania, min

K_1, K_H, K_K, K_β — współczynniki specyficzne dla danego modelu kinetycznego

Analiza modelu uwalniania zerowego i pierwszego rzędu, a także modele Higuchiego, Hixsona-Crowella i Korsmeyera-Peppasa są zwykle używane jako definicje analitycznej funkcji $Q(t)$. Ocenę dopasowania modelu kinetycznego do danych eksperymentalnych przeprowadzono w oparciu o współczynnik regresji R^2 , przy czym wartości R^2 bliskie 1 wskazują na najbardziej odpowiedni model

kinetyczny [115]. Wyniki dopasowania modeli kinetycznych do danych eksperymentalnych przedstawiono odpowiednio w tabelach znajdujących się w publikacji **D3**:

- dla emulsji typu o/w - tabela nr 4
- dla emulsji typu w/o - tabela nr 5
- dla żelu - tabela nr 6

Analizując wyniki uzyskanych badań dla **emulsji o/w** można stwierdzić, że najlepsze dopasowanie mają dwa modele: Korsmeyera–Peppasa oraz Hixsona–Crowella. W przypadku modelu Korsmeyera–Peppasa wartość R^2 jest najwyższa i waha się między 0,9985 a 0,9665. Model ten jest stosowany do oceny uwalniania substancji czynnej, gdy mechanizm uwalniania nie jest dobrze rozpoznany, lub gdy może być zaangażowany więcej niż jeden typ zjawiska uwalniania. Natomiast dopasowanie modelu Hixsona–Crowella, w którym szybkość uwalniania substancji czynnych jest ograniczona przez szybkość rozpuszczania, a nie przez dyfuzję przez matrycę, jest szczególnie wyraźne w przypadku uwalniania azjatykozydu. Substancja ta posiada zdecydowanie lepszą rozpuszczalność w układach niepolarnych, w związku z czym w przypadku emulsji o/w wyższe stężenie azjatykozydu znajduje się w fazie wewnętrznej (olejowej) emulsji, dlatego jego uwolnienie jest trudniejsze.

W przypadku **emulsji w/o** wyniki kontrolowanego uwalniania madekasozydu i azjatykozydu wskazują, że każda z substancji czynnych podąża za innym modelem kinetycznym. Profil uwalniania madekasozydu dobrze pasuje do modelu Korsmeyera–Peppasa, szczególnie przy wprowadzeniu wyższych stężeń tej substancji do badanego podłoża kosmetycznego. Madekasozyd jest dobrze rozpuszczalny w wodzie, tj. w przypadku emulsji w/o większe jego stężenie znajduje się w fazie wewnętrznej (wodnej) emulsji. W związku z tym wpływ stężenia składnika czynnego na kinetykę uwalniania jest wyraźnie widoczny. Przy niższym stężeniu, wynoszącym 2 % wag. ilość tego związku przenikająca do fazy zewnętrznej emulsji jest na tyle niewielka, że nawet dla najlepszego modelu kinetycznego (Korsmeyer–Peppas) parametr korelacji R^2 osiąga jedynie wartość 0,9527 w pH= 5,8 oraz 0,9005 w pH = 7,4. Wartość parametru R^2 rośnie wraz ze wzrostem stężenia madekasozydu do 5 % wag. przekraczając wartość 0,9974. Natomiast w przypadku uwalniania azjatykozydu z emulsji w/o można zaobserwować dobre dopasowanie do modelu Higuchiego, co dowodzi, że proces uwalniania jest kontrolowany przez dyfuzję substancji czynnych przez nośnik.

W przypadku analizy profilu uwalniania substancji aktywnych z **żelu** można stwierdzić, że parametry kinetyczne podążają za wzorem podobnym do tego obserwowanego dla próbek opartych na emulsji o/w. Profil uwalniania madekasozydu najlepiej pasuje do modelu Korsmeyera–Peppasa, ponieważ wartość współczynnika R^2 jest najwyższa i mieści się w zakresie od 0,9974 do 0,9823. Ponadto można rozważyć również model Hixsona–Crowella ze względu na częste zmiany powierzchni nośnika w czasie, co jest możliwe w przypadku żelu, którego struktura jest budowana przez polimery pochodzenia naturalnego. Wodne środowisko płynu akceptorowego łatwo przenika i eroduje matrycę polimerową, ułatwiając uwalnianie dobrze rozpuszczalnego w wodzie madekasozydu, które zachodzi

poprzez dyfuzję przez matrycę [116]. W przypadku azjatykozydu najlepsze dopasowanie ma model Hixsona–Crowella, a głównym parametrem kontrolującym uwalnianie jest dyfuzja przez matrycę. Szczegółowa analiza oraz dyskusja wyników dopasowania profili uwalniania madekasozydu i azjatykozydu do odpowiednich modeli kinetycznych została opisana w publikacji D3 pt. „Controlled release of madecassoside and asiaticoside of *Centella asiatica* L. origin from sustainable cold-processed topical formulations”.

7. Produkty dermokosmetyczne przeznaczone do pielęgnacji skóry z AZS [D4- D5]

Niniejszy rozdział oparty jest o dwie publikacje eksperymentalne:

D4 Wpływ kosmetyków zawierających ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej na wybrane parametry bariery naskórkowej u chorych na atopowe zapalenie skóry

D5 Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej opracowano formułacje trzech dermokosmetyków pielęgnacyjnych bazujących na podłożach opisanych w rozdziale 5: emulsję typu w/o oraz emulsję typu o/w. Opracowaną **emulsję typu w/o** zaadoptowano jako **bazę dla produktów do pielęgnacji ciała: balsamu oraz kremu do rąk**, ze względu na dużą zawartość emolientów, a także postać emulsji, której fazą zewnętrzną jest olej nadając jej charakterystyczne właściwości barierowe, wspierające przywrócenie funkcji bariery naskórkowej [18]. Natomiast **emulsję typu o/w**, która okazała się być najbardziej stabilną formacją (rozdział 6.3.1.) oraz najlepszym nośnikiem dla madekasozydu i azjatykozydu (najlepszy profil uwalniania tychże substancji opisany w rozdziale 6.4.) zaadoptowano jako **bazę dla kremu do twarzy**. Wszystkie opracowane formułacje powstały w wyniku zoptymalizowanego procesu technologicznego na zimno (temperatura około 25 °C), dzięki czemu zmniejszono zużycie energii elektrycznej, a tym samym ślad węglowy w środowisku. Do opracowanych podłoży emulsyjnych zostały wprowadzone surowce otrzymane z liści wąkroty azjatyckiej: **ekstrakt w ilości 5 % wag.** oraz **bioferment (Centella asiatica Bioferment GEO) w ilości 7 % wag.**

Pomimo tego, że podłoże żelowe okazało się być dobrym nośnikiem dla madekasozydu i azjatykozydu, co potwierdzono w badaniach kontrolowanego uwalniania tych substancji (rozdział 6.4) nie zostało zakwalifikowane jako baza dla opracowania docelowej formułacji dermokosmetycznej ze względu na brak w nim fazy olejowej (emolienicyjnej), która jest niezbędna do odbudowy uszkodzonej bariery naskórkowej w AZS [18,57].

7.1. Preparatyka formułacji dermokosmetyków pielęgnacyjnych [D4]

Głównym celem pielęgnacji skóry atopowej jest odbudowa uszkodzonej bariery naskórkowej oraz niwelowanie stanu zapalnego [18,49,57,64-65]. W związku z tym formułacje balsamu do ciała,

kremu do rąk oraz kremu do twarzy zawierają liczne surowce emoliencyjne, którymi są lipidy pochodzenia naturalnego: ceramidy, naturalne oleje otrzymane z nasion rzepaku, słonecznika, lnianego, ryżu, pestek malin, moreli, a także estry kwasów tłuszczowych otrzymane z oliwek, nasion soi, owoców kokosa, nasion ostropestu plamistego. 10 % wag. emolientów w każdej formułacji pochodzi z upcyklingu odpadów powstałych w przemyśle spożywczym. Dokładny opis i ocenę środowiskową surowców użytych do przygotowania formułacji dermokosmetyków przedstawiono w rozdziale 1.3.

Termin „emolienty” jest używany zamiennie dla określenia składników kosmetyku opartych na lipidach, lub gotowych produktów kosmetycznych przeznaczonych do pielęgnacji skóry suchej i atopowej. Natomiast określenie „emolienty plus” oznacza produkty kosmetyczne, które poza składnikami emolientowymi posiadają w składzie również ekstrakty zawierające określone substancje aktywne. Opracowane w ramach niniejszej pracy formułacje to produkty typu **emolient plus** [D5], ponieważ zawierają emolienty w postaci naturalnych olejów, estrów kwasów tłuszczowych, ceramidów oraz substancje o działaniu przeciwzapalnym, immunomodulującym oraz postbiotycznym, tj. ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej. Każda z trzech opracowanych formułacji pielęgnacyjnych została przygotowana w **wersji kontrolnej** (nie zawierającej w składzie surowców pochodzących z wąkroty azjatyckiej) oraz w **wersji badanej**, zawierającej 5 % wag. ekstraktu oraz 7 % wag. biofermentu z wąkroty azjatyckiej.

7.1.1. Balsam do ciała (emulsja typu w/o)

Preparatykę **wersji kontrolnej** balsamu do ciała opisano w rozdziale 6.1.1. wydłużając czasy mieszania i homogenizacji w celu lepszego rozbicia kropli fazy rozproszonej emulsji, a tym samym stabilizacji układu. Natomiast **wersję badaną** przygotowano dodając do fazy wodnej emulsji (patrz rozdział 6.1.1.) ekstrakt z wąkroty azjatyckiej (INCI: Propanediol, Centella Asiatica Extract) w ilości 5 % wag. oraz bioferment z wąkroty azjatyckiej (INCI: Aqua, Lactobacillus/Centella Asiatica Extract Ferment, Gluconolactone, Sodium Benzoate, Calcium Gluconate, Lactic Acid, Acetic Acid, Protocatechic Acid, Caffeic Acid, Gallic Acid, Reuterin) w ilości 7 % wag.

7.1.2. Krem do rąk (emulsja typu w/o)

Formułacja kremu do rąk została opracowana w oparciu o podłoże emulsji typu w/o (rozdział 6.1.1.), modyfikując w niewielkim stopniu składniki fazy olejowej (emoliencyjnej). W celu przygotowania **wersji badanej** formułacji kremu do rąk składniki fazy olejowej emulsji (A) nr 1-12 (tab. 13) naważono do szklanej zlewki oraz wymieszano za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100 Value, a następnie zhomogenizowano za pomocą homogenizatora IKA Ultra Turrax T 18 Digital. Składniki fazy wodnej emulsji (B) nr 13-17 naważono do szklanej zlewki i wymieszano za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100 Value. Następnie wymieszane składniki fazy wodnej (B) dodawano małymi porcjami do wymieszanych składników fazy olejowej (A) podczas mieszania z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego do uzyskania pożądanej lepkości masy. Na koniec masę

homogenizowano za pomocą homogenizatora IKA Ultra Turrax T 18 Digital przez odpowiednio długi czas. Cały proces przebiegał w temperaturze pokojowej wynoszącej około 25 °C.

Wersja kontrolna kremu do rąk została przygotowana według tej samej procedury, z pominięciem składników aktywnych otrzymanych z wąkroty azjatyckiej (nr 16 i 17 w tab. 13).

Tabela 13. Skład wersji badanej kremu do rąk (emulsja typu w/o).

Lp.	Faza emulsji	Nazwa handlowa surowca	Producent/ dostawca	Funkcja	Zakres stężenia [% w/w]
1	A	EWO Vegetable Emulsifier	Impag Group	Emulgator	1-10
2	A	Softigen®Pura	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient	1-10
3	A	Apricot Kernel Oil RBDW	IMCD Group	Emolient	1-10
4	A	CeraFluid®	Amita Health Care Poland	Emolient, ceramid	1-5
5	A	Synovea® EL	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient, prekursor ceramidów	1-10
6	A	Phytosqualan®	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient	1-15
7	A	LIPEX® Omega 3/6™	Nordmann, Rassmann GmbH	Emolient	1-10
8	A	LIPEX®PreAct™	Nordmann, Rassmann GmbH	Emolient	1-10
9	A	Raspberry Necta®	Amita Health Care Poland	Emolient, antyoksydant	1-5
10	A	Tocomix L70- IP Organic CO	IMCD Group	Antyoksydant, emolient	0,1-5
11	A	Citropol H	Safic- Alcan Poland	Emolient	1-10
12	A	Ceramidone®	Aston Chemicals Ltd.	Emolient, stymuluje syntezę lipidów i ceramidów w skórze	1-5
13	B	Woda demineralizowana	-	Rozpuszczalnik	40-100
14	B	RonaCare® Magnesium Sulphate	Azelis	Stabilizator emulsji	0,1-2
15	B	E-Leen Green C	Safic- Alcan Poland	Konserwant	1-5
16	B	Ekstrakt z wąkroty azjatyckiej	Laboratorium Symbiosis	Substancja aktywna	5
17	B	Centella asiatica Bioferment GEO	Laboratorium Symbiosis	Substancja aktywna	7

Skład INCI wersji badanej kremu do rąk przedstawia się następująco:

Ingredients/ INCI: Aqua, Lactobacillus/Centella Asiatica Extract Ferment, Squalane, Propanediol, Caprylic/Capric Triglyceride, Canola Oil, Olus Oil, Glyceryl Oleate, Polyglyceryl-3-polyricinoleate, Ethyl Linoleate, Pentylene Glycol, Octyldodecyl PCA, Polycitronellol, Prunus Armeniaca Kernel Oil,

Rubus Idaeus Seed Oil, Hydrogenated Rapeseed Oil, Tocopherol, Magnesium Sulfate, Ethyl Oleate, Glyceryl Caprylate/Caprates, Lactic Acid, Ethyl Palmitate, Acetic Acid, Centella Asiatica Extract, Gluconolactone, Protocatechic Acid, Olea Europaea (Olive) Oil Unsaponifiables, Caffeic Acid, Ethyl Linolenate, Sodium Benzoate, Gallic Acid, Reuterin, Calcium Gluconate.

7.1.3. Krem do twarzy (emulsja typu o/w)

Preparatykę **wersji kontrolnej** kremu do twarzy opisano w rozdziale 6.1.2. Natomiast **wersję badaną** przygotowano dodając do fazy wodnej emulsji (patrz rozdział 6.1.2.) ekstrakt z wąkroty azjatyckiej w ilości 5 % wag. oraz bioferment z wąkroty azjatyckiej w ilości 7 % wag. Skład INCI wersji badanej emulsji o/w przedstawia się następująco:

Ingredients/ INCI: Aqua, Propanediol, Lactobacillus/Centella Asiatica Extract Ferment, Polyglyceryl-4 Hemp Seedate, Canola Oil, Polycitronellol, Squalane, Triolein, Ethyl Linoleate, Pentylene Glycol, Hydrogenated Vegetable Oil, Octyldodecyl PCA, Rubus Idaeus Seed Oil, Caprylyl/Capryl Glucoside, Xanthan Gum, Ceramide NP, Glyceryl Dioleate, Sodium Stearoyl Lactylate, Tocopherol, Ethyl Oleate, Glyceryl Caprylate/Caprates, Lactic Acid, Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil, Ethyl Palmitate, Acetic Acid, Tapioca Starch, Centella Asiatica Extract, Gluconolactone, Protocatechic Acid, Caffeic Acid, Ethyl Linolenate, Sodium Benzoate, Gallic Acid, Reuterin, Tremella Fuciformis Sporocarp Extract, Calcium Gluconate.

7.2. Badanie in vivo skuteczności działania dermokosmetyków pielęgnacyjnych [D4- D5]

Kluczowym etapem badań było potwierdzenie skuteczności działania przygotowanych formułacji dermokosmetyków pielęgnacyjnych na skórze osób dorosłych z AZS o przebiegu łagodnym do umiarkowanego. W tym celu przeprowadzono randomizowane, pojedynczo zaślepione badania in vivo, w których oceniono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą badaną, stosującą produkty zawierające ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej, a grupą kontrolną, stosującą produkty niezawierające substancji aktywnych z wąkroty azjatyckiej. Badania opierały się na ocenie funkcji bariery naskórkowej uczestników wyrażonej w mierzonych parametrach skóry:

- przeznaskórkowej utraty wody (TEWL, ang. Transepidermal Water Loss) [D4]
- nawilżenia warstwy rogowej naskórka [D5]
- wygładzenia powierzchni (parametr SEsm) [D5]
- szorstkości powierzchni (parametr SEr) [D5]
- stopnia złuszczenia naskórka (parametr SEsc) [D5]

Pomiarów wyżej wymienionych parametrów skóry dokonano przed zastosowaniem produktów: balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy oraz po 2 i 4 tygodniach stosowania. Oceny dokonano za pomocą nieinwazyjnych testów instrumentalnych przeprowadzonych z użyciem aparatury Courage+Khazaka electronic GmbH (Niemcy).

Badania aplikacyjne poprzedzone były wykonaniem badań dermatologicznych (testów płatkowych półotwartych przeprowadzonych pod nadzorem dermatologa) na grupie 20 osób posiadających skórę wrażliwą. Dokładny przebieg tych badań został opisany w publikacji **D5**.

Pomiary parametrów skóry wykonano 3-krotnie, a wyniki przedstawiono jako wartość średnią [**D4- D5**]. Analizę statystyczną wyników wykonano przy użyciu programu IBM SPSS Statistics 28, przyjmując wartość $p < 0,05$ za statystycznie istotną. Aby zbadać różnice w danych ilościowych między grupą kontrolną a eksperymentalną, wybrano parametryczny test t-Studenta. Dokładny opis zastosowanych metod statystycznych znajduje się w publikacjach **D4-D5**.

7.2.1. Charakterystyka grupy badanej oraz przebieg badań

W badaniu wzięło udział 20 ochotników w wieku od 21 do 54 lat, 1 mężczyzna (5 %) oraz 19 kobiet (95 %). Szczegółowe informacje na temat wieku uczestników znajdują się w tabeli nr 2 w publikacji **D5**. Uczestnicy badania posiadali skórę wrażliwą oraz atopową zgodnie z głównymi kryteriami diagnostycznymi Hanifina i Rajki [120], a przebieg choroby w czasie trwania badania był łagodny do umiarkowanego. Do badań zakwalifikowane zostały osoby zgodnie z ustalonymi kryteriami włączenia, do których należały [**D5**]:

- wiek powyżej 18 roku życia
- przewlekłe lub nawracające, swędzące zmiany o charakterystycznym rozmieszczeniu na skórze
- pozytywny wywiad rodzinny w kierunku chorób alergicznych
- brak leczenia farmakologicznego podczas testowania produktu
- brak innych chorób skóry

Z badań zostały wykluczone kobiety w ciąży oraz karmiące piersią, osoby z ciężkim przebiegiem AZS oraz w trakcie terapii farmakologicznej. Badanie przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z dnia 27 czerwca 2024 roku (uchwała nr 478/24). Uczestnicy podpisali formularz świadomej zgody na uczestnictwo w badaniu oraz otrzymali pisemne instrukcje dotyczące stosowania testowanych produktów w tzw. panelu domowym. Badania były prowadzone pod nadzorem dermatologa. Ochotników podzielono losowo na dwie grupy: badaną ($n = 10$), która otrzymała balsam do ciała, krem do rąk oraz krem do twarzy zawierające ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej oraz kontrolną ($n = 10$), która testowała produkty niezawierające surowców aktywnych z wąkroty azjatyckiej. Uczestnicy zobowiązali się do regularnego stosowania produktów, dwa razy dziennie, przez okres 30 dni na oczyszczonej skórze twarzy i ciała. Wszyscy uczestnicy zostali poinstruowani o niestosowaniu innych produktów kosmetycznych o identycznym lub analogicznym przeznaczeniu, a także leków do stosowania miejscowego przez cały okres trwania badania. Ponadto, zostali oni poinformowani o konieczności natychmiastowego przerwania stosowania produktu w przypadku wystąpienia negatywnych objawów lub odczuć w miejscu stosowania i zgłoszenia ich badaczowi. Pomiarów parametrów skóry dokonano w miejscach występowania zmian atopowych na skórze przed rozpoczęciem badania oraz po 2 i 4 tygodniach

stosowania produktów. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną, a badaną w parametrach skóry mierzonych przed rozpoczęciem stosowania badanych produktów (wartość wyjściowa, $p > 0,05$, test t-studenta), w związku z czym można stwierdzić, że uczestnicy badania w obydwu grupach mieli podobny stan bariery naskórkowej przed rozpoczęciem badań. Dokładny opis grup: badanej i kontrolnej oraz przebieg badania znajduje się w publikacjach **D4- D5**.

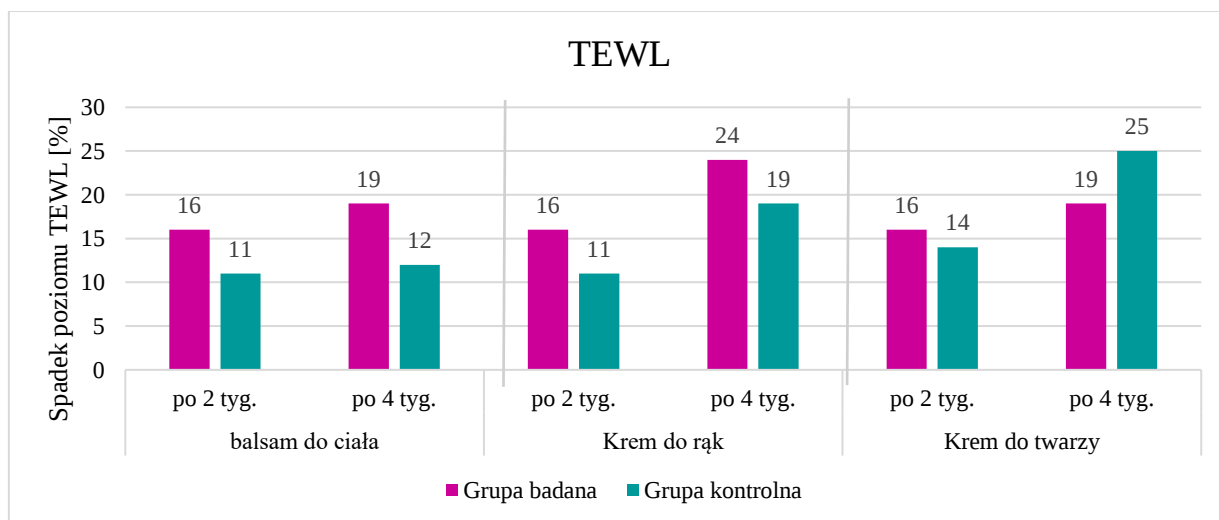
7.2.2. Badanie poziomu przeznaskórkowej utraty wody (TEWL) [D4]

Niniejszy podrozdział oparty jest o publikację eksperymentalną:

D4 Wpływ kosmetyków zawierających ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej na wybrane parametry bariery naskórkowej u chorych na atopowe zapalenie skóry

Pomiar TEWL jest podstawowym, nieinwazyjnym testem *in vivo* oceniającym funkcję bariery naskórkowej wyrażoną jako pasywna utrata wody przez naskórek [55]. U chorych na AZS TEWL jest znacznie podwyższony, co jest spowodowane dysfunkcją bariery naskórkowej charakteryzująca się zmienionym składem lipidów naskórkowych, zmniejszeniem ilości ceramidów, a także zaburzeniami funkcji ścisłych połączeniach pomiędzy komórkami warstwy rogowej i ziarnistej naskórka, które odpowiadają za adhezję komórek. W związku z tym naskórek u pacjentów cierpiących na AZS ma mikropęknięcia, które przyczyniają się do podwyższonego poziomu TEWL.

Pomiarów wartości TEWL dokonano za pomocą urządzenia Tewameter TM HEX oceniającego gradient gęstości parowania wody ze skóry, który jest proporcjonalny do wartości TEWL. Wyniki przedstawiające różnicę pomiędzy grupą badaną a kontrolną, wyrażone w procentach, przedstawiono na rysunku nr 17. Natomiast dokładniejsze wyniki, przedstawiające zmiany poziomu TEWL osobno w grupie kontrolnej i badanej przed rozpoczęciem badań oraz po 2 i 4 tygodniach stosowania testowanych produktów przeznaczonych do pielęgnacji skóry twarzy i ciała, a także ukazujące różnice pomiędzy grupami z uwzględnieniem odchyłeń standardowych zostały przedstawione w publikacji **D4**.



Rysunek 16. Porównanie zmian poziomu TEWL w grupie kontrolnej i badanej po 2 i po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy.

Analizując wyniki przedstawione na rysunku 16 można stwierdzić, że poziom TEWL malał w większym stopniu w grupie badanej, niż w grupie kontrolnej. W przypadku **balsamu do ciała**, po 2 tygodniach wartość TEWL spadła o 16 % ($p = 0,059$), podczas gdy w grupie kontrolnej jedynie o 11 % ($p = 0,202$). Natomiast po 4 tygodniach wartość TEWL zmalała o 19 % w grupie badanej ($p = 0,002$) i o 12 % w grupie kontrolnej ($p = 0,202$). Porównania między grupą badaną i kontrolną nie wykazały jednak statystycznie istotnych różnic zarówno po 2 tygodniach ($p = 0,680$), jak i po 4 tygodniach stosowania produktów ($p = 0,267$).

Spadek TEWL był również istotny statystycznie w przypadku obydwu grup po zastosowaniu **kremu do rąk**. Po 2 tygodniach stosowania produktu TEWL spadł o 16 % w grupie badanej ($p = 0,044$) i o 11 % w grupie kontrolnej ($p = 0,025$), nie wykazując jednak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami ($p = 0,390$). Po 4 tygodniach TEWL spadł o 24 % w grupie badanej ($p < 0,010$) i o 19 % w grupie kontrolnej ($p < 0,010$) również nie osiągając istotnych różnic pomiędzy grupami ($p = 0,400$).

Podobne wyniki uzyskano w przypadku stosowania **kremu do twarzy**. Zarówno po 2 tygodniach oraz po 4 tygodniach stosowania wartość TEWL spadła w istotny sposób w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej ($p < 0,05$). Po 2 tygodniach TEWL obniżył się o 16 % w grupie badanej oraz o 14 % w grupie kontrolnej, podczas gdy po 4 tygodniach badania TEWL obniżył się o 19 % w grupie badanej oraz o 25 % w grupie kontrolnej. Natomiast wyniki te nie różniły się od siebie w istotny sposób zarówno po 2 tygodniach ($p = 0,448$), jak i po 4 tygodniach ($p = 0,761$) stosowania kremu do twarzy.

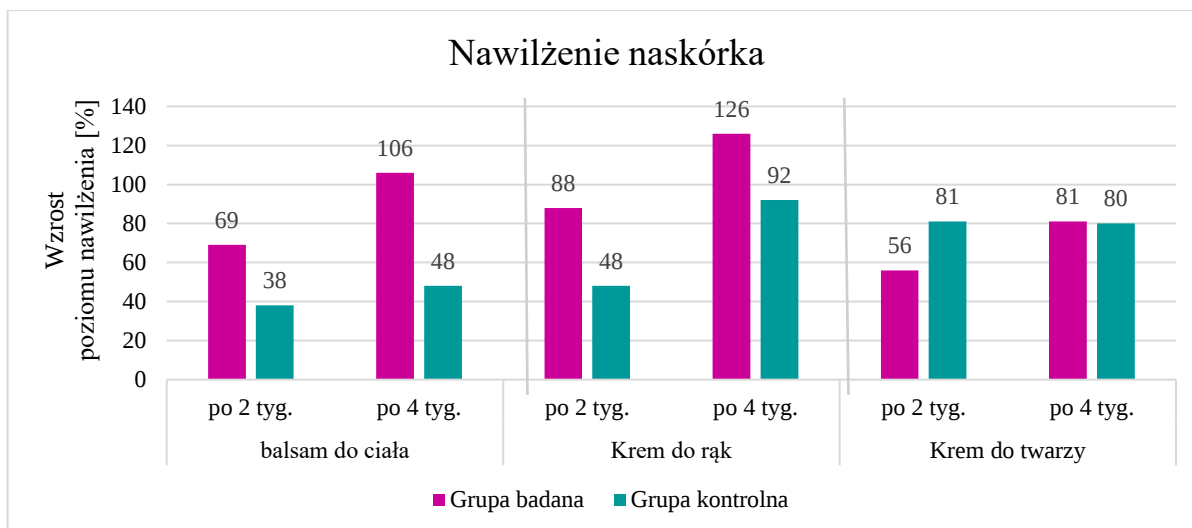
Podsumowując, zarówno produkty zawierające ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej testowane przez grupę badaną oraz produkty, których formułacje oparte są jedynie o substancje emolientowe, testowane przez grupę kontrolną mogą skutecznie obniżać poziom TEWL u osób z AZS poprzez poprawę funkcji bariery naskórkowej. Jednak produkty zawierające surowce pochodzące z wąkroty azjatyckiej nie były skuteczniejsze w redukcji TEWL w statystycznie istotny sposób. Na tej podstawie można wnioskować, że emolienty stanowią podstawowe składniki formułacji kosmetycznych, które wspomagają odbudowę bariery naskórkowej i zapobiegają nawrotom AZS [65]. Dyskusja otrzymanych wyników znajduje się w publikacji **D4**.

7.2.3. Badanie poziomu nawilżenia naskórka [D5]

Niniejszy podrozdział opiera się o publikację eksperymentalną:

D5 Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract.

Nawilżenie warstwy rogowej naskórka jest drugim podstawowym parametrem oceniającym stan bariery naskórkowej, a jego obniżona wartość często wiąże się z zaburzeniami funkcji warstwy rogowej [121]. Parametr ten został zmierzony za pomocą sondy Corneometer CM825, która wskazuje pojemność elektrostatyczną odzwierciedlającą stopień nawilżenia. Różnice we wzroście poziomu nawilżenia naskórka pomiędzy grupą badaną, a kontrolną przedstawiono na rys. 17, a dokładniejsze wyniki oraz ich dyskusja zostały opisane w publikacji **D5**.



Rysunek 17. Porównanie zmian poziomu nawilżenia w grupie kontrolnej i badanej po 2 i po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy.

Jak wynika z danych przedstawionych na rysunku nr 17 poziom nawilżenia naskórka wzrósł w istotny sposób w obydwu grupach, zarówno po dwóch ($p < 0,025$), jak i po czterech ($p < 0,001$) tygodniach stosowania balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy.

Po 2 tygodniach stosowania **balsamu do ciała** w grupie badanej poziom nawilżenia zwiększył się o 69 % w stosunku do wartości początkowej, podczas gdy w grupie kontrolnej wzrost wynosił 38 %. Różnice w wynikach nie były jednak statystycznie istotne ($p = 0,227$). Natomiast po 4 tygodniach stosowania produktu poziom nawilżenia wzrósł aż o 106 % w grupie badanej oraz o 48 % w grupie kontrolnej, wykazując statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami ($p = 0,004$).

Po dwóch tygodniach stosowania **kremu do rąk** poziom nawilżenia zwiększył się o znacząco bardziej w grupie badanej (o 88 %), niż w grupie kontrolnej (o 48 %) osiągając statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami ($p = 0,031$). Natomiast po 4 tygodniach nawilżenie w grupie badanej wzrosło o 126 %, podczas gdy w grupie kontrolnej odnotowano wzrost o 92 %. Różnice w nawilżeniu pomiędzy obiema grupami nie były statystycznie istotne ($p = 0,287$).

W przypadku stosowania **kremu do twarzy** po dwóch tygodniach odnotowano wzrost nawilżenia w grupie badanej o 56 %, podczas gdy w grupie kontrolnej nawilżenie wzrosło o 81 %, nie osiągając statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami ($p = 0,778$). Natomiast po 4 tygodniach odnotowano wzrost nawilżenia na podobnym poziomie ($p = 0,838$) w grupie badanej (o 81 %) oraz w grupie kontrolnej (o 80 %).

Podsumowując, wyniki badań sugerują wpływ ekstraktu i biofermentu z wąkroty azjatyckiej na znaczną poprawę nawilżenia warstwy rogowej naskórka, co jest szczególnie zauważalne na skórze tułowia oraz dłoni po zastosowaniu balsamu do ciała i kremu do rąk. Funkcja nawilżająca na tych obszarach ciała może być również wspierana przez rodzaj emulsji (typ w/o) zastosowanej jako podłoże dla balsamu do ciała i kremu do rąk. Jest to równoznaczne z odbudową funkcji bariery naskórkowej u chorych na AZS. Dyskusję wyników przedstawiono w publikacji **D5**.

7.2.4. Badanie parametrów topografii skóry [D5]

Niniejszy podrozdział opiera się o publikację eksperymentalną:

D5 In vivo study on skin barrier function in atopic dermatitis: influence of sustainable emollient plus topical formulations enriched with bioferment and extract from *Centella asiatica* L.

Do parametrów topografii skóry należą: gładkość (SEsm), szorstkość (SEr), oraz stopień złuszczenia naskórka. Parametry te zmierzono za pomocą urządzenia Visioscan VC20-plus przy użyciu folii samoprzylepnej Corneofix F20 zbierającej korneocyty w celu przeprowadzenia pomiarów złuszczenia naskórka.

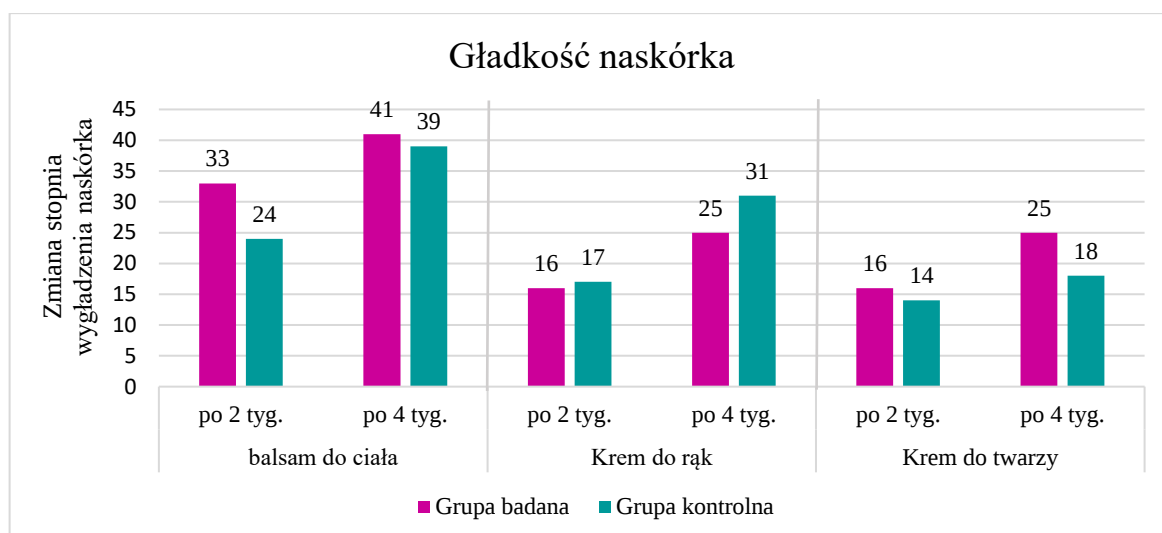
Ocena stopnia gładkości naskórka (SEsm)

Analiza wyników przedstawionych na rysunku 18 pozwala stwierdzić, że po 4 tygodniach stosowania wszystkich produktów wygładzenie naskórka znacząco się zwiększyło w porównaniu z pomiarami początkowymi ($p \leq 0,004$). Wzrost ten był zauważalny już po 2 tygodniach, nie osiągając jeszcze statystycznie istotnych różnic w odniesieniu do wartości początkowych.

Po 2 tygodniach stosowania **balsamu do ciała** wygładzenie naskórka wzrosło o 33 % w grupie badanej oraz o 24 % w grupie kontrolnej, osiągając statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami ($p = 0,04$). Natomiast po 4 tygodniach wygładzenie wzrosło o 41 % w grupie badanej oraz o 39 % w grupie kontrolnej, a różnice pomiędzy grupami nie były istotne statystycznie ($p = 0,121$).

W przypadku stosowania **kremu do rąk** poziom wygładzenia naskórka nie różnił się istotnie pomiędzy obiema grupami po 2 tygodniach stosowania produktu ($p = 0,779$), gdzie wzrósł o 16 % w grupie badanej i o 17 % w grupie kontrolnej. Podobnie nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami we wzroście stopnia wygładzenia naskórka po 4 tygodniach stosowania kremu do rąk ($p = 0,890$), kiedy odnotowano wzrost o 25 % w grupie badanej i o 31 % w grupie kontrolnej.

Natomiast statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami w wygładzeniu naskórka wystąpiły zarówno po dwóch ($p = 0,043$), jak i po 4 tygodniach stosowania **kremu do twarzy** ($p = 0,031$). Po 2 tygodniach wygładzenie naskórka wzrosło o 16 % w grupie badanej oraz o 14 % w grupie kontrolnej, natomiast po 4 tygodniach w grupie badanej wygładzenie wzrosło o 25 %, podczas gdy w grupie kontrolnej wzrosło o 18 %.



Rysunek 18. Porównanie zmian stopnia wygładzenia naskórka w grupie kontrolnej i badanej po 2 i po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy.

Podsumowując, zauważono wpływ ekstraktu i biofermentu na zwiększenie stopnia gładkości skóry u chorych na AZS już po dwóch tygodniach stosowania balsamu do ciała i kremu do twarzy. Tendencja ta utrzymywała się po 4 tygodniach stosowania kremu do twarzy, gdzie stwierdzono znacząco większe wygładzenie skóry w porównaniu z grupą kontrolną. Dokładniejsze omówienie wyników oraz zdjęcia ukazujące teksturę naskórka w powiększeniu przed zastosowaniem badanych produktów oraz po 2 i 4 tygodniach ich stosowania znajdują się w publikacji **D5**, rysunek nr 3.

Ocena stopnia szorstkości naskórka (SEr)

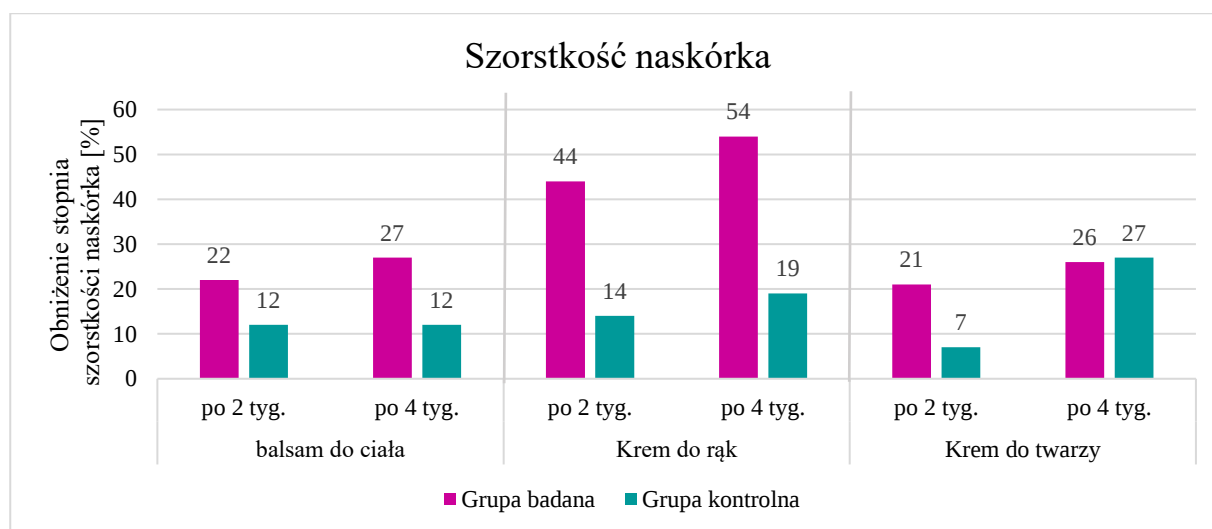
Analiza wyników przedstawionych na rys. 19 pozwala stwierdzić, że wszystkie testowane produkty zawierające ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej wyraźnie zmniejszyły szorstkość skóry z AZS już po 2 tygodniach osiągając statystycznie istotne różnice w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,050$).

Po zastosowaniu **balsamu do ciała** szorstkość naskórka zmniejszyła się o 22 % w grupie badanej oraz o 12 % w grupie kontrolnej ($p = 0,049$). Natomiast po 4 tygodniach szorstkość skóry zmniejszyła się również bardziej znacząco w grupie badanej (o 27 %), niż w grupie kontrolnej (o 12 %), $p = 0,047$. Zauważalny jest tutaj istotny wpływ substancji zawartych w ekstrakcie i biofermentzie z wąkroty azjatyckiej na zmniejszanie stopnia szorstkości skóry.

Analogicznie przedstawiają się wyniki po zastosowaniu **kremu do rąk**, gdzie zarówno po dwóch, jak i po czterech tygodniach stosowania produktu szorstkość skóry na dłoniach zmniejszyła się istotnie bardziej w grupie badanej, niż w grupie kontrolnej. Po 2 tygodniach stosowania preparatu szorstkość naskórka spadła o 44 % w grupie badanej i o 14 % ($p = 0,037$), podczas gdy po 4 tygodniach testowania produktów szorstkość naskórka zmniejszyła się o 54 % w grupie badanej i o 19 % w grupie kontrolnej ($p = 0,043$). W tym przypadku również potwierdzono lepszą skuteczność produktów zawierających ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej.

W przypadku **kremu do twarzy** po 2 tygodniach stosowania preparatów szorstkość naskórka zmniejszyła się istotnie bardziej w grupie badanej (o 21 %) w porównaniu z grupą kontrolną, gdzie spadek wynosił 7 % ($p = 0,047$). Natomiast po 4 tygodniach stosowania produktów różnice pomiędzy grupami nie były już statystycznie istotne ($p = 0,479$). Szorstkość naskórka zmniejszyła się o 26 % w grupie badanej oraz o 27 % w grupie kontrolnej.

Podsumowując, wyniki badań jednoznacznie wskazują na istotny wpływ ekstraktu i biofermentu z wąkroty azjatyckiej na niwelowanie stopnia szorstkości skóry atopowej w przypadku wszystkich zastosowanych produktów, których efekty działania były znaczące już po 2 tygodniach stosowania ($p < 0,04$). Istotnie lepsze efekty w redukcji szorstkości naskórka utrzymywały się również po 4 tygodniach na skórze tułowia oraz dłoni po zastosowaniu balsamu do ciała i kremu do rąk. Wnioski oraz dyskusję wyników badania przedstawiono w publikacji **D5**.



Rysunek 19. Porównanie zmian stopnia szorstkości naskórka w grupie kontrolnej i badanej po 2 i po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy.

Ocena stopnia złuszczenia naskórka (indeks złuszczenia)

Proces złuszczenia naskórka jest fizjologicznym procesem zachodzącym w skórze, jednak w przypadku AZS ulega on licznym zakłóceniom, których mechanizm został opisany w rozdziale 2.1.2. W konsekwencji dochodzi do wystąpienia nadmiernej suchości skóry oraz złuszczenia naskórka [**D5**].

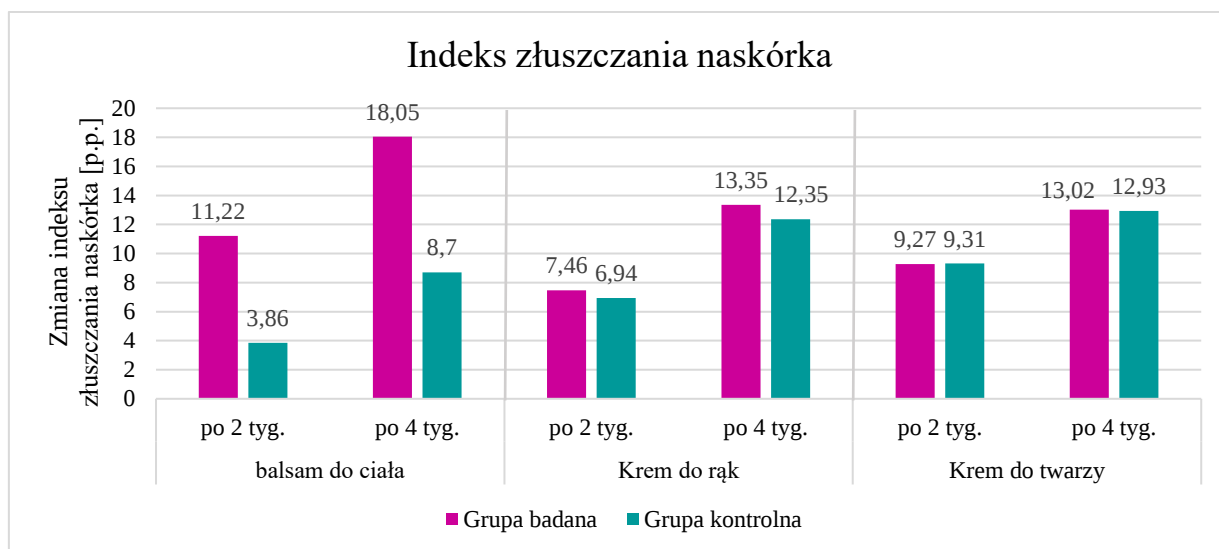
Analizując zdjęcia złuszczonych korneocytów wykonane kamerą Visioscan® VC20 plus po uprzednim zaadsorbowaniu ich na taśmie Corneofix® F20, przedstawione na **rysunku nr 6** w **publikacji D5**, można zauważyć wyraźną redukcję stopnia złuszczenia naskórka, o czym świadczy zmniejszenie płatków korneocytów już po 2 tygodniach stosowania balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy. Natomiast po 4 tygodniach stosowania produktów można zaobserwować jedynie małe, regularne korneocyty, co wskazuje na wzrost nawilżenia skóry [**D5**].

Wizualne przedstawienie stopnia złuszczenia naskórka w postaci zdjęć koresponduje z wynikami pomiarów aparaturowych tego parametru. Analiza wyników przedstawionych na rys. 21 wskazuje na znaczący spadek stopnia złuszczenia naskórka po 4 tygodniach stosowania wszystkich produktów, zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej ($p < 0,001$), jednak nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy obiema grupami ($p < 0,05$).

Po dwóch tygodniach stosowania **balsamu do ciała** stopień złuszczenia naskórka zmniejszył się o 11,22 punktów procentowych (p.p.) w grupie badanej oraz o 3,86 p.p. w grupie kontrolnej ($p = 0,086$). Natomiast po 4 tygodniach w grupie badanej zaobserwowano spadek indeksu złuszczenia o 18,05 p.p., podczas gdy w grupie kontrolnej spadł on o 8,7 p.p. ($p = 0,062$).

W przypadku **kremu do rąk** po 2 tygodniach indeks złuszczenia na skórze dłoni zmniejszył się o 7,46 p.p. w grupie badanej oraz o 6,94 p.p. w grupie kontrolnej ($p = 0,921$). Natomiast po 4 tygodniach stopień złuszczenia naskórka spadł o 13,35 p.p. w grupie badanej oraz o 12,35 p.p. w grupie kontrolnej ($p = 0,879$).

Po 2 tygodniach stosowania **kremu do twarzy** indeks złuszczenia zmniejszył się o 9,27 p.p. w grupie badanej oraz o 9,31 p.p. w grupie kontrolnej ($p = 0,994$). Natomiast po 4 tygodniach zaobserwowano spadek indeksu złuszczenia o 13,02 p.p. w grupie badanej oraz o 12,93 p.p. w grupie kontrolnej ($p = 0,990$).



Rysunek 21. Porównanie zmian stopnia złuszczenia naskórka w grupie kontrolnej i badanej po 2 i po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy.

Podsumowując, pomimo iż produkty zawierające ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej zmniejszały indeks złuszczenia naskórka w większym stopniu, niż produkty kontrolne, różnice te nie wykazywały istotności statystycznej co sugeruje, że decydujący wpływ na zmniejszenie stopnia złuszczenia wywierają składniki emolientowe formułacji, które wspierają odbudowę funkcji bariery naskórkowej [D5]. Dyskusja wyników znajduje się w publikacji D5.

8. Badania produktów dermokosmetycznych stanowiące istotną część wdrożeniową pracy

Rozdział ten dotyczy badań, które nie zostały opublikowane w czasopismach naukowych, natomiast stanowią kontynuację badań *in vivo* dla dermokosmetyków pielęgnacyjnych przedstawionych w rozdziale 7 niniejszej pracy. Badania te stanowią podstawę dla potwierdzenia skuteczności działania produktów na skórę atopową, a tym samym opracowania deklaracji marketingowych będących wymogiem Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 niezbędnym do wdrożenia produktów na rynek. Ponadto, w rozdziale opisano etapy zmierzające do opracowania produktów dermokosmetycznych przeznaczonych do mycia skóry atopowej, a mianowicie emulsji do mycia ciała oraz olejku do demakijażu, a następnie potwierdzenia skuteczności ich działania na skórę atopową w badaniach aplikacyjnych *in vivo*. Przedstawione w rozdziale badania są częścią Indywidualnego Planu Badawczego oraz elementem wdrożeniowym niniejszej pracy doktorskiej.

8.1. Badania *in vivo* dla dermokosmetyków pielęgnacyjnych (ciąg dalszy)

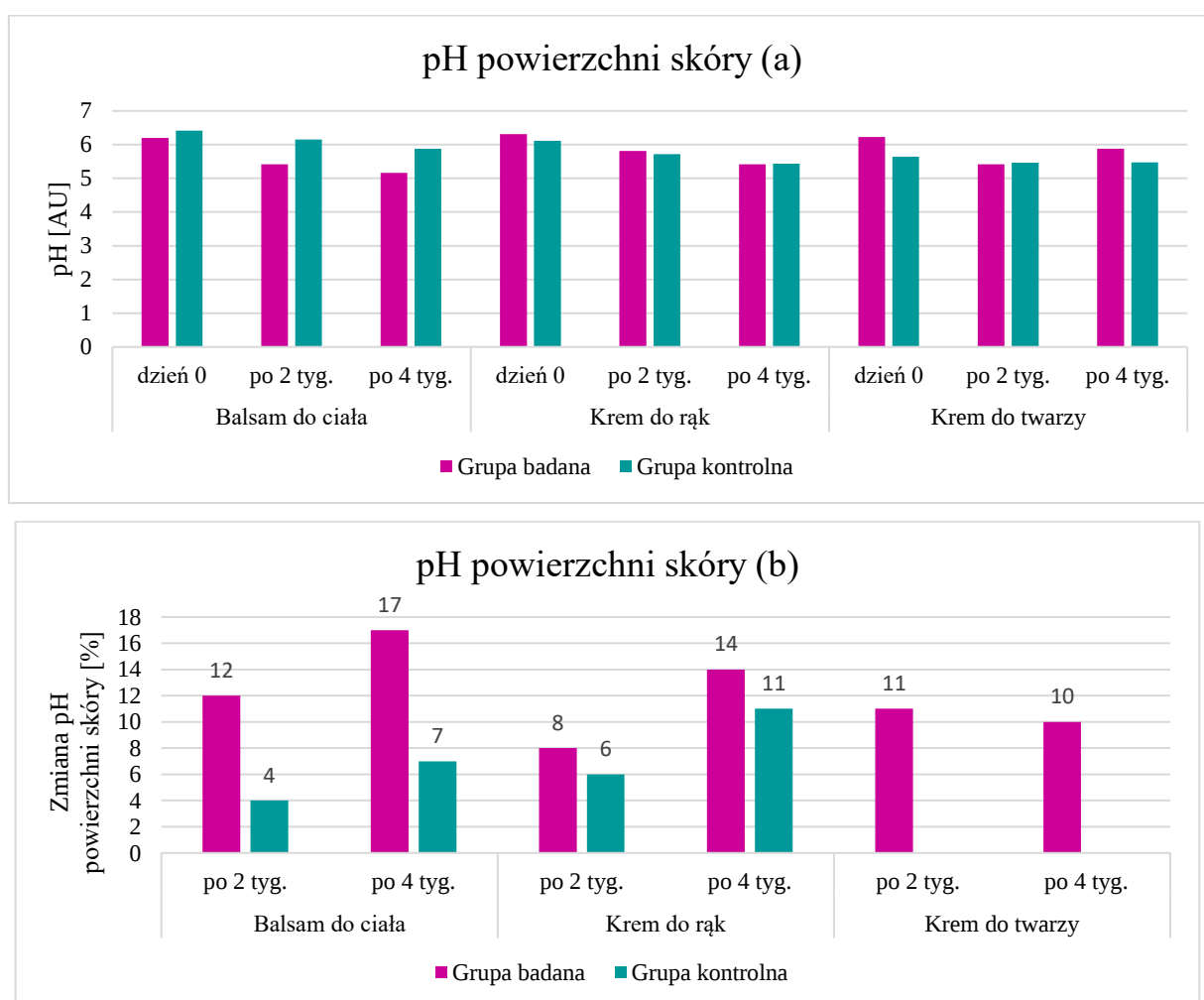
Badania *in vivo* parametrów skóry, takich jak pH powierzchni naskórka oraz zaczerwienienie (rumień, erythema), a także ocena wpływu badanego produktu kosmetycznego na mikrobiom skóry dostarczają cennych informacji na temat skuteczności zastosowanych dermokosmetyków takich jak: balsam do ciała, krem do rąk oraz krem do twarzy w niwelowaniu stanu zapalnego w skórze atopowej oraz przywracaniu fizjologicznej funkcji bariery naskórkowej i homeostazy mikrobiomu. Ponadto, badania porównawcze z grupą kontrolną pozwalają ocenić skuteczność działania ekstraktu oraz biofermentu z wąkroty azjatyckiej w przywracaniu prawidłowego pH powierzchni skóry oraz niwelowaniu rumienia będącego wskaźnikiem stanu zapalnego w skórze atopowej [43, 122].

8.1.1. Badanie pH powierzchni skóry

Kwasowe pH powierzchni skóry jest kluczowe dla utrzymania integralności bariery naskórkowej oraz homeostazy mikrobiomu skóry [122-123]. Podwyższenie tego parametru jest jednym ze skutków uszkodzonej bariery naskórkowej w AZS, a także mutacji w genie filagryny, której rozkład w zdrowej skórze prowadzi do powstawania kwasów, między innymi mlekowego i urokainowego, odpowiadających za utrzymanie kwaśnego pH naskórka. Mechanizmy prowadzące do podwyższenia pH powierzchni skóry atopowej dokładnie opisano w rozdziale 2.1.2. Zbyt wysokie pH powierzchni skóry może prowadzić do niekontrolowanego wzrostu i wirulencji bakterii *Staphylococcus aureus* oraz zwiększenia stanu zapalnego [122]. Dlatego jednym z głównych celów pielęgnacji skóry atopowej jest przywrócenie kwaśnego pH powierzchni naskórka [124-125].

Wartość pH powierzchni skóry oceniono za pomocą urządzenia Skin-pH-meter PH 905, które mierzy stężenie jonów H^+ na powierzchni skóry. Metodę przedstawienia wyników opisano w rozdziale 7.2.

Z analizy wyników pomiarów pH powierzchni skóry przed rozpoczęciem stosowania badanych dermokosmetyków pielęgnacyjnych wynika, że średnia wartość pH powierzchni skóry była podwyższona u wszystkich uczestników badania, zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej (rys. 22a). Średnia wartość pH mierzonego na skórze tułowia i kończyn w miejscach występowania zmian atopowych w grupie badanej wynosiła 6,20, a w grupie kontrolnej 6,41. Natomiast średnia wartość pH na skórze dłoni wynosiła odpowiednio 6,31 w grupie badanej oraz 6,11 w grupie kontrolnej. W przypadku skóry na policzkach średnia wartość pH w grupie badanej wynosiła 6,23, podczas gdy w grupie kontrolnej wyniosła 5,64. Biorąc pod uwagę powyższe, badanie wpływu kosmetyków zawierających ekstrakt i bioferment z *Centella asiatica* L. na wartości pH powierzchni skóry w okolicach tułowia, dłoni i policzków było bardzo istotnym parametrem oceniającym możliwości przywrócenia fizjologicznego pH powierzchni skóry, które mieści się zazwyczaj w zakresie od 4,5 do 5,5 [100].



Rysunek 22. (a) pH powierzchni skóry u uczestników badania przed rozpoczęciem stosowania produktów dermokosmetycznych (dzień 0) oraz po 2 i po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy wyrażone w jednostkach pomiarowych urządzenia [AU]; (b) porównanie zmian pH powierzchni skóry w grupie kontrolnej i badanej po 2 i po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy w odniesieniu do pomiaru początkowego.

Przedstawione na rysunku 22(a) uśrednione wartości pH powierzchni skóry ciała oraz dłoni wskazują na istotne obniżenie pH zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej po 2 i 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała i kremu do rąk ($p \leq 0,002$). Natomiast pH powierzchni skóry na policzkach zmniejszyło się znacząco po 2 i 4 tygodniach stosowania kremu do twarzy tylko w grupie badanej ($p = 0,030$), podczas gdy zmiany w grupie kontrolnej były statystycznie nieistotne ($p = 0,209$). Na tej podstawie można wnioskować, że produkty do pielęgnacji skóry ciała, tj. balsam do ciała i krem do rąk są istotnie skuteczne w przywracaniu fizjologicznego pH skóry zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej, natomiast w przypadku pH skóry twarzy większą skutecznością cechowały się produkty zawierające w składzie ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej.

Natomiast porównując różnice w obniżeniu pH powierzchni skóry w grupie badanej i kontrolnej przedstawione na rysunku 22(b) można wnioskować, iż produkty zawierające ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej wykazywały istotną statystycznie przewagę w skuteczności obniżania pH powierzchni skóry ciała oraz twarzy już po dwóch tygodniach stosowania balsamu do ciała i kremu do twarzy ($p < 0,050$). Po zastosowaniu **balsamu do ciała** pH powierzchni skóry obniżyło się o 12 % w grupie badanej oraz o 4 % w grupie kontrolnej ($p = 0,003$), natomiast po zastosowaniu **kremu do twarzy** pH w grupie badanej obniżyło się o 11 %, podczas gdy w grupie kontrolnej nie uległo zmianie ($p = 0,043$). Po 4 tygodniach trend ten utrzymywał się, co oznacza istotnie większe obniżenie pH powierzchni skóry ciała w grupie badanej (o 17 %) w porównaniu z grupą kontrolną, gdzie pH obniżyło się o 7 %. Wyniki te korespondowały z obniżeniem pH powierzchni skóry twarzy, które spadło znacząco bardziej w grupie badanej (o 10 %), podczas gdy w grupie kontrolnej pozostało bez zmian ($p = 0,047$).

Podsumowując, surowce otrzymane z wąkroty azjatyckiej mają znaczący wpływ na obniżanie pH powierzchni skóry ciała oraz twarzy, co może być związane z działaniem przeciwzapalnym oraz immunomodulującym madekasozydu i azjatykozydu obecnych w ekstrakcie i biofermencie [82-87]. Ponadto, jak przedstawiono na rysunku nr 10 (rozdz. 6.2.1.) produkty dermokosmetyczne zawierające surowce z wąkroty azjatyckiej mają niższe pH niż próbki kontrolne. Wynika to z licznych związków kwasowych (np. kwasu mlekowego) obecnych w biofermencie z wąkroty. W związku z tym można sugerować, że produkty ze składnikami aktywnymi na bazie wąkroty azjatyckiej naturalnie zakwaszają powierzchnię skóry, a tym samym wspomagają odbudowę bariery naskórkowej poprzez przywrócenie fizjologicznego pH skóry. Jest to zgodne z wynikami przedstawionymi przez Blaaka i in., którzy wykazali wpływ kosmetyków o kwaśnym pH na obniżenie pH powierzchni skóry i poprawę funkcji bariery naskórkowej [124]. Podobny efekt wykazali Brinke i in., którzy potwierdzili, że buforowane produkty do pielęgnacji skóry o $pH \leq 4,5$ były w stanie obniżyć pH powierzchni skóry atopowej i utrzymać jego wartości w zakresie fizjologicznym [125]. Ponadto badanie przeprowadzone przez Ratz-Łyko i in. na modelu mikrozapalenia indukowanego nikotynianem metylu w skórze ludzkiej wykazało, że emulsja typu o/w i żel zawierające 5% wag. ekstraktu z *Centella asiatica* L. znacząco obniżyły pH powierzchni skóry ze względu na regenerujący wpływ na barierę naskórkową [126]. Co więcej, obniżenie pH powierzchni skóry daje możliwość przywrócenia homeostazy mikrobiomu skóry,

ponieważ przywraca funkcje bariery naskórkowej, wspierając równowagę mikroorganizmów komensalnych takich jak *Staphylococcus epidermidis*, w stosunku do bakterii patogennych, takich jak *Staphylococcus aureus* [127].

8.1.2. Badanie rumienia (erythema)

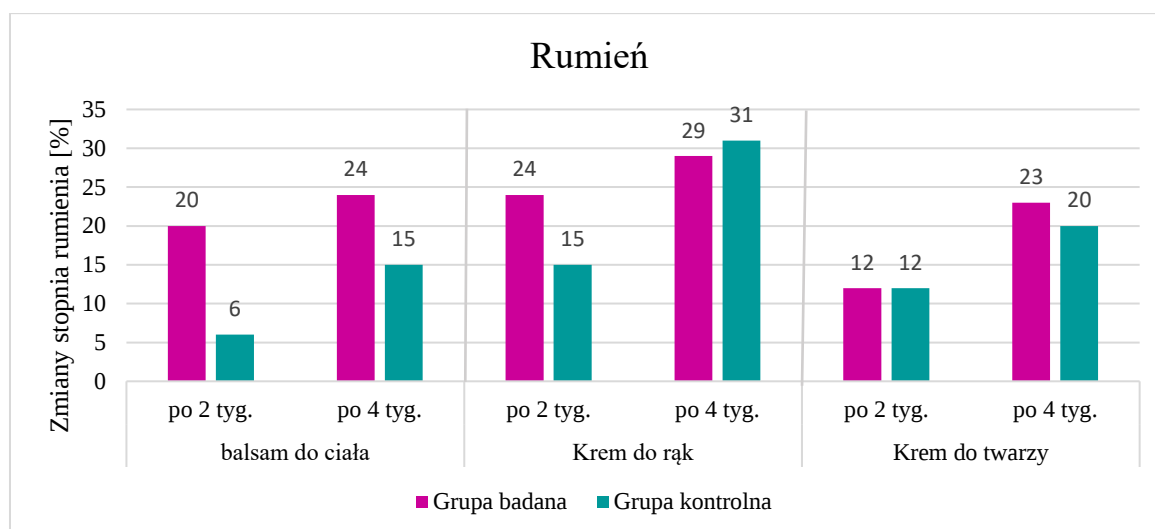
Rumień skóry jest objawem towarzyszącym AZS, a jego nasilenie zależy od ciężkości choroby. Zgodnie z systemem punktacji SCORing Atopic Dermatitis (SCORAD), AZS o łagodnym przebiegu charakteryzuje się jasnoróżowym rumieniem, podczas gdy w umiarkowanym przebiegu choroby rumień jest wyraźnie widoczny. W ciężkiej postaci AZS występuje rumień o barwie ciemnoczerwonej [128]. Jednym z celów przeprowadzonego badania była ocena właściwości przeciwzapalnych testowanych kosmetyków, przy czym rumień był jednym ze wskaźników stanu zapalnego.

Dane przedstawione na rysunku nr 23 wskazują na istotne zmniejszenie intensywności rumienia po 4 tygodniach stosowania wszystkich badanych produktów dermokosmetycznych zarówno w grupie badanej i kontrolnej ($p < 0,001$).

Balsam do ciała zawierający ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej znacząco bardziej redukował intensywność rumienia na skórze ciała w porównaniu z próbą kontrolną już po 2 tygodniach stosowania produktu ($p = 0,022$). W grupie badanej rumień zmniejszył się o 20 %, podczas gdy redukcja rumienia w grupie kontrolnej wynosiła 6%. Trend ten utrzymywał się po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała. W grupie badanej intensywność rumienia zmniejszyła się znacząco bardziej (o 24 %), niż w grupie kontrolnej (o 15 %) osiągając statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami ($p = 0,041$).

W przypadku stosowania **kremu do rąk** również odnotowano znaczącą przewagę w skuteczności produktu zawierającego ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej w odniesieniu do próby kontrolnej już po 2 tygodniach stosowania produktu ($p = 0,038$). W grupie badanej intensywność rumienia spadła o 24 %, podczas gdy w grupie kontrolnej o 15 %. Natomiast po 4 tygodniach stosowania produktów różnice pomiędzy grupą badaną i kontrolną wyrównały się i nie były statystycznie istotne ($p = 0,134$). Intensywność rumienia w grupie badanej spadła o 29 %, podczas gdy w grupie kontrolnej spadek wynosił 31 %.

Najmniejszy spadek intensywności rumienia zaobserwowano na skórze twarzy po zastosowaniu badanego produktu. Po 2 tygodniach pielęgnacji z użyciem kremu do twarzy zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej rumień zmniejszył się o 12 % ($p = 0,963$). Natomiast po 4 tygodniach stosowania produktu intensywność rumienia zmalała o 23 % w grupie badanej i o 20 % w grupie kontrolnej, nie wykazując istotnych różnic pomiędzy grupami ($p = 0,747$).



Rysunek 23. Porównanie zmian stopnia zaczerwienienia naskórka w grupie kontrolnej i badanej po 2 i po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy.

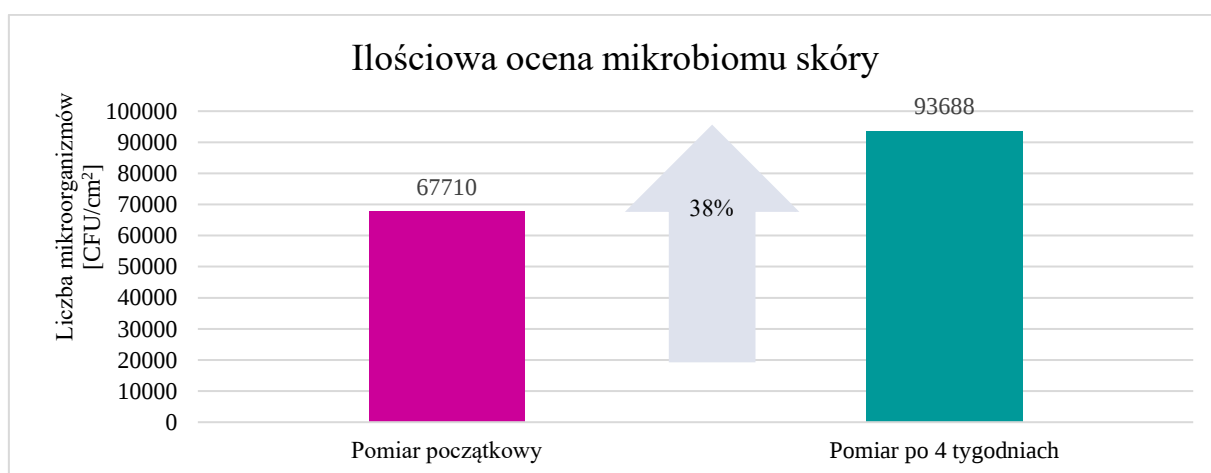
Podsumowując, produkty do pielęgnacji ciała, takie jak balsam i krem do rąk zawierające ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej wykazują większą skuteczność w redukowaniu intensywności rumienia u chorych na AZS w porównaniu z grupą kontrolną po ich zastosowaniu na skórę tułowia i dłoni. Nie zaobserwowano jednak istotnych różnic między grupą badaną, a kontrolną w redukcji rumienia na twarzy po zastosowaniu badanego produktu. Oceniając wyniki redukcji wskaźnika rumienia w okolicy tułowia, dłoni i policzków, można wnioskować, że kluczową rolę odgrywa zarówno ekstrakt i bioferment z *Centella asiatica* L., który ma właściwości przeciwzapalne (próba badana) jak i odpowiednio skomponowana baza emolientowa badanych produktów (próba kontrolna). Właściwości przeciwzapalne ekstraktu z *Centella asiatica* L. zostały szeroko udowodnione, szczególnie w leczeniu ran, a także na mysich modelach AZS [21, 129-130]. Otrzymane przeze mnie wyniki korespondują z wynikami badań in vivo przeprowadzonych przez Ratz-Łyko i in., które również wykazały statystycznie istotną redukcję intensywności rumienia na modelu mikrozapalenia indukowanego metylonikotynianem w ludzkiej skórze [126]. Ponadto, do redukcji stanu zapalnego w skórze, a tym samym niwelowania intensywności rumienia, może przyczyniać się reuteryna, która jest jednym z metabolitów bakterii *L. reuteri*, obecnym w biofermencie z wąkroty azjatyckiej stosowanym w próbkach badanych testowanych formułacji. Badanie in vitro przeprowadzone przez Chen i in. dowiodło, że reuteryna produkowana przez *L. reuteri* zmniejszała poziom wolnych rodników w mitochondrialnych komórkach makrofagów RAW 264.7 pochodzących od myszy BALB/c, a także poziom czynników prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-1 β i IL-6 [90].

8.1.3. Ocena mikrobiomu skóry

Istotną częścią oceny skuteczności działania balsamu do ciała zawierającego ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej była ocena jego wpływu na mikrobiom skóry z AZS. Celem badania było zweryfikowanie, czy długoterminowe stosowanie badanego dermokosmetyku przywraca

homeostazę mikrobiomu skóry atopowej. Ze względu na to, że zmiany skórne w AZS najczęściej występują w miejscach predykcyjnych na skórze kończyn oraz tułowia, obejmując między innymi zgięcia łokciowe, wymazy do badań pobrano ze skóry wewnętrznej części łokcia, jako obszaru reprezentatywnego i najbardziej dotkniętego AZS. Pierwszym etapem badania była ilościowa ocena mikroorganizmów [CFU/cm²] zasiedlających skórę w zgięciu łokciowym przed nałożeniem balsamu do ciała (pomiar początkowy) oraz po 4 tygodniach jego stosowania.

Analizując wyniki przedstawione na rysunku nr 24 stwierdzono istotną różnicę w ilości mikroorganizmów przed i po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała ($p = 0,005$, test U Manna-Whitneya). W porównaniu do stanu wyjściowego, po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała liczba mikroorganizmów na badanym obszarze ciała wzrosła znacząco, tj. o 38 % (rys. 24). Oznacza to, że proponowana terapia wspiera i chroni liczbę mikroorganizmów na wybranym obszarze skóry (wewnętrzna część łokcia).



Rysunek 24. Porównanie ogólnej liczby bakterii składających się na mikrobiom skóry zgięcia łokciowego u chorych na AZS przed zastosowaniem balsamu do ciała (pomiar początkowy) oraz po 4 tygodniach stosowania produktu.

Znaczny wzrost liczby mikroorganizmów na skórze dotkniętej AZS po 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała może być efektem działania składników zawartych w formułacji: emolientów, triterpenów pochodzących z ekstraktu z wąkroty azjatyckiej, a także postbiotyków zawartych w biofermencie. Otrzymane wyniki korespondują z wynikami innych badaczy. Udowodniono, że formułacje typu emolient plus przywracają naturalną barierę skórną i pomagają zmniejszyć dysbiozę poprzez zwiększenie różnorodności mikrobiologicznej [65-66]. W badaniu przeprowadzonym przez Lynde i in. wykazano, że produkty typu emolient plus, zawierające substancje antyoksydacyjne i przeciwbakteryjne mogą zwiększać różnorodność mikrobiomu na skórze atopowej [131]. Pozytywny wpływ emolientów na mikrobiom skóry osób cierpiących na AZS został również potwierdzony w badaniu przeprowadzonym przez Stalder'a i in. [132]. Znaczący wpływ na wzrost liczebności bakterii na skórze zgięcia łokciowego po zastosowaniu balsamu do ciała niewątpliwie wywiera również poprawa funkcji bariery naskórkowej, którą udowodniono dzięki obniżeniu wartości TEWL (rozdział 7.2.2.,

publikacja D4) oraz pH powierzchni skóry (rozdział 8.1.1.). W badaniu przeprowadzonym przez Fluhr i in. również opisano związek między różnorodnością mikrobiomu a integralnością bariery naskórkowej i wartością pH skóry. Efekt uszkodzenia bariery naskórkowej uzyskano poprzez 5-cio krotne usuwanie warstwy rogowej naskórka za pomocą specjalnej taśmy. Wykazano, że miejscowe stosowanie balsamów o różnych wartościach pH przyspiesza normalizację mikrobiomu skóry, przy czym nieco wyższą skuteczność odnotowano w przypadku balsamów o niższym pH [133].

Kolejnym czynnikiem, który mógł mieć wpływ na wyniki badania były lizaty szczepów bakterii *L. reuteri* znajdujące się w biofermencie z wąkroty azjatyckiej. Najnowsze badania wskazują, że stosowanie szczepów *Lactobacillus* w formulacjach miejscowych w leczeniu AZS, zarówno jako żywe bakterie (probiotyki) oraz jako nieżywione mikroorganizmy i ich metabolity (postbiotyki) stale rośnie. Butler i wsp. badali wpływ stosowania miejscowego produktu z żywymi szczepami *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 na skórę dotkniętą atopowym zapaleniem skóry u dorosłych. Wykazano statystycznie i klinicznie istotną poprawę wskaźnika SCORAD po 4 i 8 tygodniach stosowania badanego produktu [91]. Khmaladze i in. przeprowadzili badanie porównawcze efektów stosowania żywych bakterii oraz lizatów szczepu *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 w zastosowaniach miejscowych na modelach skóry, w których proces zapalny wywołano za pomocą promieniowania UVB. Zarówno żywe bakterie, jak i lizaty zmniejszały ilość prozapalnych cytokin, takich jak IL-6 i IL-8, w zrekonstruowanym ludzkim naskórku i natywnych modelach skóry. Miały one również pozytywny wpływ na barierę naskórkową poprzez zwiększenie poziomu akwaporyny i lamininy [134]. Można wnioskować, że integralność bariery naskórkowej może pośrednio wpływać na liczebność mikrobiomu skóry.

Kolejnym etapem badań nad mikrobiomem skóry była jakościowa identyfikacja wybranych gatunków mikroorganizmów, takich jak: *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Pantoea spp.*, *Bacillus spp.*, *Neisseria spp.*, *Lactobacillus spp.* i *Cutibacterium acnes*, żyjących na skórze chorych na AZS. Wyniki analizy, które przedstawiono w tabeli nr 14 pokazują, że szczep *Staphylococcus aureus*, który często występuje u pacjentów z AZS nie został zidentyfikowany u żadnego z nich na badanym obszarze skóry. Powodem może być to, że żaden z ochotników nie doświadczył zaostrzeń choroby w okresie trwania badania. *S. aureus* jest często izolowany ze skóry pacjentów z AZS w okresie zaostrzeń, ponieważ różnorodność mikrobiomu skóry jest wówczas zmniejszona z powodu mniejszej konkurencji ze strony mikroorganizmów komensalnych, takich jak *Staphylococcus epidermidis* oraz wyższego pH powierzchni skóry, co sprzyja kolonizacji *S. aureus* [135]. Ponadto, do zapobiegania kolonizacji skóry bakterią *S. aureus* mogą się przyczyniać lizaty i bakteriocyny bakterii *S. reuteri* znajdujące się w biofermencie z wąkroty azjatyckiej. Badanie przeprowadzone przez Princea i in. wykazało, że *S. reuteri* może zahamować apoptozę komórek keratynocytów wywołaną przez *S. aureus* zarówno w niezróżnicowanych, jak i zróżnicowanych keratynocytach [136].

Szczepy bakterii *Staphylococcus epidermidis*, które są uważane za pożyteczne mikroorganizmy komensalne, zostały zidentyfikowane na skórze każdego z ochotników przed rozpoczęciem stosowania balsamu do ciała oraz po 4 tygodniach stosowania preparatu (tab. 14). Otrzymane wyniki sugerują, że zastosowany dermokosmetyk nie eliminuje ze skóry komensalnej bakterii *S. epidermidis*, która jest niezbędna do utrzymania homeostazy mikrobiomu skóry i zapobiegania nadmiernej kolonizacji *S. aureus*. Wyniki te korespondują z wynikami badań przeprowadzonych przez Nakatsuji i in., które wykazały, że bakterie fizjologicznie bytujące na ludzkiej skórze, takie jak *S. epidermidis* i *S. hominis*, uczestniczą w obronie gospodarza poprzez zahamowanie wzrostu bakterii *S. aureus* dzięki promowaniu wydzielania peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMP) w skórze [137]. Z drugiej strony, w badaniu przeprowadzonym przez Ochlich i in. wskazano, że znacząco większa liczebność *S. epidermidis* w ciężkim atopowym zapaleniu skóry aktywowała prozapalny czynnik transkrypcyjny NF-κB i indukowała ekspresję prozapalnych cytokin w ludzkich pierwotnych keratynocytach, co oznacza, że bakterie patogenne w stosunku do komensalnych muszą być w równowadze, a przewaga jednego z rodzajów bakterii powoduje powstawanie stanu zapalnego [138].

Ponadto, jak przedstawiono w tab. 14, badany kosmetyk eliminował ze skóry bakterie z rodzaju *Pantoea* (u jednego uczestnika) oraz *Bacillus spp.* (u 3 uczestników badania). Obydwa drobnoustroje to patogeny oportunistyczne i są składnikiem niepożądanym w mikrobiomie skóry ludzkiej.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że bioferment oraz ekstrakt z wąkroty azjatyckiej przyczyniły się do zapobiegania wzrostowi *Staphylococcus aureus* oraz eliminacji oportunistycznych bakterii z rodzaju *Pantoea* oraz *Bacillus spp.* u ochotników z AZS, dzięki obniżeniu pH powierzchni skóry (rozdział 8.1.1.) oraz działaniu antybakteryjnemu. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w literaturze. Udowodniono, że triterpeny zawarte zarówno w ekstrakcie, jak i biofermencie z *Centella asiatica* L. wykazują działanie przeciwbakteryjne wobec szczepów *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* i *Bacillus cereus* [139].

Tabela nr 14. Jakościowy skład mikrobiomu uczestników badania przed zastosowaniem balsamu do ciała oraz po 4 tygodniach stosowania produktu (+ oznacza obecność mikroorganizmu, - oznacza brak obecności mikroorganizmu na skórze).

Uczestnik badania	Rodzaj zidentyfikowanego mikroorganizmu	Przed zastosowaniem balsamu do ciała	Po 4 tyg. stosowania balsamu do ciała
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+
	<i>Micrococcus spp.</i>	+	+
	<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+
	<i>Cutibacterium acnes</i>	+	+
	<i>Pantoea spp.</i>	+	-
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+
	<i>Micrococcus kristinae</i>	+	-
	<i>Staphylococcus caprae</i>	+	+
	<i>Bacillus spp.</i>	+	-

	Staphylococcus xylosus	+	+
3	Staphylococcus epidermidis	+	+
	Staphylococcus capitis	+	+
	Micrococcus spp.	+	+
	Neisseria spp.	+	+
4	Staphylococcus epidermidis	+	+
	Staphylococcus haemolyticus	+	-
	Micrococcus spp.	+	-
5	Staphylococcus epidermidis	+	+
	Micrococcus spp	+	+
	Neisseria spp.	+	+
	Corynebacterium spp.	+	+
6	Staphylococcus epidermidis	+	+
	Staphylococcus capitis	+	+
	Bacillus spp.	+	-
7	Staphylococcus epidermidis	+	+
	Lactobacillus spp.	+	+
	Bacillus spp.	+	-
	Corynebacterium spp.	+	+
8	Staphylococcus epidermidis	+	+
	Staphylococcus hominis	+	+
	Micrococcus spp.	+	+
9	Staphylococcus epidermidis	+	+
	Staphylococcus caprae	+	-
	Corynebacterium spp.	+	+
10	Staphylococcus epidermidis	+	+
	Corynebacterium spp.	+	+
	Cutibacterium acnes	+	+
	Micrococcus spp.	+	+

8.2. Badania in vivo dla dermokosmetyków myjących

Rozdział ten powstał na podstawie badań nieopublikowanych w czasopismach naukowych. Niemniej jednak, opracowanie formułacji dla dwóch dermokosmetyków myjących: emulsji do mycia ciała oraz olejku do demakijażu jest częścią Indywidualnego Planu Badawczego oraz elementem wdrożeniowym niniejszej pracy doktorskiej.

Mycie skóry atopowej jest równie ważnym etapem, jak jej pielęgnacja. Nieodpowiednio dobrane produkty myjące na bazie anionowych surfaktantów o dużym potencjale drażniącym niszczą lipidy oraz białka bariery naskórkowej, które w AZS nie funkcjonują prawidłowo i wymagają odpowiedniego podejścia mającego na celu ich odbudowę [67-68]. Konsekwencje źle dobranych produktów myjących do potrzeb skóry z AZS dokładniej opisano w rozdziale 2.2.2. niniejszej pracy. W związku z tym formułacja emulsji do mycia ciała została opracowana głównie na bazie łagodnych surfaktantów niejonowych oraz substancji renatłuszczających (emolientów), które nie naruszają

integralności bariery naskórkowej, ale wspomagają jej odbudowę oraz łagodzą suchość skóry. Natomiast olejek do demakijażu jest produktem z niską aktywnością wody, co jest związane tym, że opracowany został na bazie lipidów oraz łagodnego surfaktantu.

8.2.1. Preparatyka emulsji do mycia ciała

Emulsja typu o/w do mycia ciała zawiera łagodny surfaktant anionowy na bazie aminokwasu- kwasu glutaminowego (Amisoft ECS 22W, INCI: Disodium Cocoyl Glutamate), którego działanie dodatkowo jest złagodzone poprzez dodanie do receptury surfaktantów niejonowych, do których należą: alkilopoliglukozydy (Appyclean 6781), otrzymane w wyniku procesu fermentacji soforolipidy (Sophance LA-A) oraz glukozydy (Olivoil Fruttoside BAS). Ponadto, surfaktanty te są bezpieczne dla środowiska wodnego, łatwo biodegradowalne oraz mają niski potencjał drażniący [117-119]. Dla zapewnienia ochrony bariery naskórkowej oraz jej odbudowy, emulsja do mycia ciała zawiera ceramid i emolienty w ilości 16% wag. oraz humektanty pochodzenia naturalnego: ekstrakt otrzymywany z owocników grzyba Tremella, stanowiący alternatywę dla kwasu hialuronowego, a także propanediol, będący zamiennikiem glikolu propylenowego. Produkt został opracowany w wersji badanej zawierającej 5 % wag. ekstraktu z wąkroty azjatyckiej oraz 7 % wag. biofermentu z wąkroty azjatyckiej.

W celu przygotowania formułacji emulsji do mycia ciała składniki fazy wodnej emulsji (A) nr 1-3 (tab. 15) naważono do szklanej zlewki oraz wymieszano za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100 Value. Następnie dodano wymieszane ze sobą składniki fazy (B) nr 4-5 i mieszano za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100 Value do uzyskania jednorodnej masy, bez grudek. Dodano składnik fazy (C) nr 6 i wymieszano za pomocą mieszadła mechanicznego. Do całości dodano wymieszane ze sobą składniki fazy (D) nr 7-10. Składniki fazy olejowej emulsji (E) nr 11-22 naważono do zlewki i wymieszano za pomocą mieszadła mechanicznego, a następnie zhomogenizowano za pomocą homogenizatora IKA Ultra Turrax T 18 Digital. Następnie dodano wymieszane składniki fazy olejowej (E) do wymieszanych składników fazy wodnej (A-D) podczas mieszania z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego. Po połączeniu się fazy wodnej z olejową masę zhomogenizowano za pomocą homogenizatora. Dodano składnik fazy (F) nr 23, masę wymieszano oraz zhomogenizowano. Cały proces przebiegał w temperaturze pokojowej wynoszącej około 25 °C.

Tabela 15. Skład emulsji do mycia ciała (typu o/w).

Lp.	Faza emulsji	Nazwa handlowa surowca	Dostawca	Funkcja	Zakres stężeń [% w/w]
1	A	Woda	-	Rozpuszczalnik	1-50
2	A	Ekstrakt z wąkroty azjatyckiej	Laboratorium Symbiosis	Substancja aktywna	5
3	A	Centella asiatica Bioferment GEO	Laboratorium Symbiosis	Substancja aktywna	7
4	B	Massocare Propanediol Nat MB	Comercial Quimica Masso	Humektant, booster konserwacji	1-10
5	B	Solagum AX	Seppic	Zagęstnik	1-5

6	C	HyaCare® Tremella	Adara Poland	Substancja aktywna, zagęstnik	0,01-1
7	D	Amisoft ECS-22 W	Barentz	Surfaktant anionowy, amino-kwasowy	1-20
8	D	Appyclean 6781 RSPO MB	HSH Chemie	Surfaktant niejonowy	1-20
9	D	Olivoil Fruttoside BAS	Cornelius Polska	Surfaktant niejonowy	1-20
10	D	Sophance LA-A	Adara Poland	Bio-surfaktant, soforolipid	1-15
11	E	Galehemp OW	Aston Chemicals Ltd.	Emulgator	1-10
12	E	Fludifeel Easy	Seppic	Emulgator	1-5
13	E	Tego Remo 95 MB	Adara Poland	Zagęstnik, emolient	1-5
14	E	Akogel™	Nordmann, Rassmann GmbH	Emolient	1-10
15	E	Softigen®Pura	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient	1-10
16	E	Synovea® EL	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient	1-5
17	E	Phytosqualan®	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient	1-10
18	E	LIPEX® PreAct™	Nordmann, Rassmann GmbH	Emolient	1-5
19	E	Tocomix L70- IP Organic CO	IMCD Group	Antyoksydant, emolient	0,1-3
20	E	Citropol H	Safic- Alcan Poland	Emolient	1-10
21	E	Ceramidone®	Aston Chemicals Ltd.	Emolient	0,1-5
22	E	CeraFluid®	Amita Health Care Poland	Emolient, ceramid	1-5
23	F	E-Leen Green C	Safic- Alcan Poland	Konserwant	1-5

Skład INCI emulsji do mycia przedstawia się następująco:

Ingredients/ INCI: Aqua, Propanediol, Polyglyceryl- 4 Hemp Seedate, Caprylic/Capric Triglyceride , Disodium Cocoyl Glutamate, Glycolipids, Caprylyl/Capryl Wheat Bran/Straw Glycosides, Lactobacillus/Centella Asiatica Extract Ferment, Pentylene Glycol, Hydrogenated Vegetable Oil, Polycitronellol Acetate, Glyceryl Oleate, Sorbitan Caprylate, Triolein, Sodium Cocoyl/Olivoyl Hydrolyzed Oat Protein, Canola Oil, Caprylyl/ Capryl Glucoside, Squalane, Lauryl Glucoside, Ethyl Linoleate, Polyglyceryl-6 Laurate, Hydrogenated Rapeseed Oil, Xanthan Gum, Ceramide NP, Glyceryl Dioleate, Octyldodecyl PCA, Acacia Senegal Gum, Glyceryl Caprylate/ Caprate, Tocopherol, Myristyl Glucoside, Fructose, Fructosyl Cocoate/Olivate, Ethyl Oleate, Helianthus Annuus Seed Oil, Sodium Lactate, Lactic Acid, Centella Asiatica Extract, Ethyl Palmitate, Acetic Acid, Tremella Fuciformis Sporocarp Extract, Gluconolactone, Protocatechic Acid, Caffeic Acid, Sodium Benzoate, Gallic Acid, Ethyl Linolenate, Reuterin, Calcium Gluconate.

8.2.2. Preparatyka olejku do demakijażu

Olejek do demakijażu zawiera łagodny dla skóry surfaktant Surfinesse™ Cleanse otrzymywany z oliwek, który emulguje na skórze po kontakcie z wodą, tworząc postać delikatnego mleczka. Dzięki procesowi emulsyfikacji skutecznie usuwa makijaż oraz nadmiar sebum i zanieczyszczeń środowiskowych ze skóry, nie naruszając integralności bariery naskórkowej. Ponadto, receptura produktu oparta jest o działanie emolientów, a zawartość wody w formulacji jest znikoma (niska aktywność wodna). Produkt został opracowany w wersji badanej zawierającej 12 % wag. ekstraktu z wąkroty azjatyckiej (wersja olejowa). Ze względu na przeznaczenie produktu do stosowania w okolicach oczu i zapewnienie bezpieczeństwa konsumentom, zrezygnowano z użycia biofermentu z wąkroty azjatyckiej, który w swoim składzie zawiera liczne kwasy organiczne, powstające w wyniku procesu fermentacji, mogące wykazywać działanie drażniące na błonę śluzową oka.

W celu przygotowania formulacji olejku do demakijażu składniki fazy olejowej (A) nr 1-11 (tab. 16) naważono do szklanej zlewki oraz wymieszano za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100 Value. Następnie dodano składnik fazy (B) nr 12 i mieszano za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100 Value do uzyskania klarownej masy. Cały proces przebiegał w temperaturze pokojowej wynoszącej około 25 °C.

Tabela 16. Skład olejku do demakijażu.

Lp.	Faza emulsji	Nazwa handlowa surowca	Dostawca	Funkcja	Zakres stężeń [% w/w]
1	A	Surfinesse™ Cleanse	HSH Chemie	Emulgator, surfaktant	20-50
2	A	Synovea® EL	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emolient	1-5
3	A	KAK HL	Amita Health Care Poland	Emolient	10-40
4	A	Gosulin IL	Amita Health Care Poland	Emolient	10-30
5	A	Emotion Silky	Amita Health Care Poland	Emolient	1-20
6	A	LIPEX® PreAct™	Nordmann, Rassmann GmbH	Emolient	1-5
7	A	Rice Bran Oil	IMCD Group	Emolient	1-20
8	A	Apricot Kernel Oil RBDW	IMCD Group	Emolient	1-20
9	A	Tocomix L70- IP Organic CO	IMCD Group	Antyoksydant, emolient	0,1-3
10	A	Ceramidone®	Aston Chemicals Ltd.	Emolient	0,1-5
11	A	Centella asiatica Oil	DKSH	Składnik aktywny	12
12	B	Woda	-	Rozpuszczalnik	0,1-1,5

Skład INCI olejku do demakijażu przedstawia się następująco:

Ingredients/ INCI: Hexyl Laurate, Polyglyceryl-4 Olivat, Isoamyl Laurate, Prunus Armeniaca Kernel Oil, Neopentyl Glycol Dipelargonate, Rice Bran Oil, Helianthus Annuus Seed Oil, Canola Oil, Ethyl

Linoleate, Ethyl Olivat, Isoamyl Cocoate, Octyldodecyl PCA, Aqua, Tocopherol, Ethyl Oleate, Ethyl Palmitate, Centella Asiatica Extract, Ethyl Linolenate.

8.2.3. Opis grupy badanej i przebiegu badań in vivo

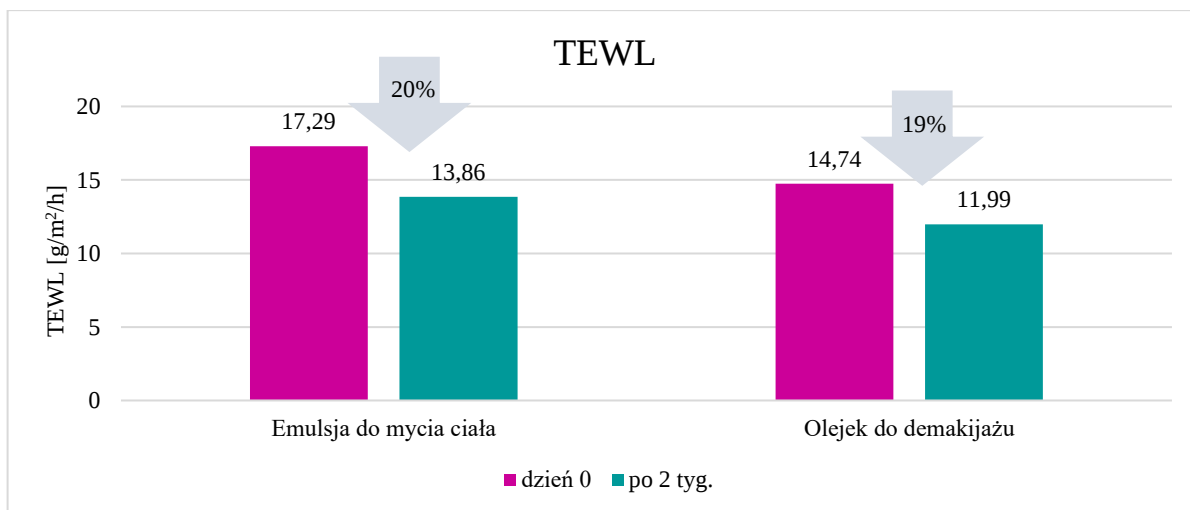
Badania in vivo dla dermokosmetyków myjących nie były badaniami porównawczymi z grupą kontrolną. Ze względu na uzyskanie wiarygodnych wyników, niebędących sumą działania produktów pielęgnacyjnych oraz myjących, grupa badana była zrekrutowana od nowa, a jej uczestnicy nie pokrywali się z uczestnikami kontrolowanych badań randomizowanych, pojedynczo zaślepionych opisanych w rozdziale 7.2.1. W badaniu wzięło udział 10 ochotników w wieku od 23 do 36 lat, 1 mężczyzna (10 %) oraz 9 kobiet (90 %) posiadających skórę wrażliwą i atopową zgodnie z głównymi kryteriami diagnostycznymi Hanifina i Rajki [120] oraz łagodny do umiarkowanego przebieg choroby. Kryteria włączenia i wyłączenia z badań pokrywają się z kryteriami opisanymi w rozdziale 7.2.1. niniejszej pracy. Ochotnicy stosowali produkty zawierające 5 % wag. ekstraktu i 7 % wag. biofermentu z wąkroty azjatyckiej (emulsja do mycia ciała), lub 12 % wag. ekstraktu z wąkroty azjatyckiej (olejek do demakijażu) przez okres 2 tygodni, dwa razy dziennie, po użyciu spłukując skórę wodą. Pomiarów parametrów skóry, takich jak: TEWL, poziom nawilżenia, pH powierzchni oraz intensywność rumienia dokonano w miejscach występowania zmian atopowych na skórze tułowia i kończyn dolnych (emulsja do mycia ciała) oraz policzków (olejek do demakijażu) przed rozpoczęciem badania oraz po 2 tygodniach stosowania produktów. Metodyka badań została opisana w rozdziale 7.2.

8.2.4. Badanie poziomu przeznaskórkowej utraty wody (TEWL)

Z analizy wyników dotyczących zmian wartości TEWL po 2 tygodniach stosowania emulsji do mycia ciała oraz olejku do demakijażu przedstawionych na rysunku 25 wynika, że obydwa produkty powodowały znaczne obniżenie wartości TEWL w odniesieniu do pomiaru początkowego (rys. 25).

Po 2 tygodniach stosowania emulsji do mycia ciała wartość TEWL obniżyła się o 20 %, natomiast olejek do demakijażu powodował spadek TEWL o 19 %. Wyniki badań potwierdzają, że obydwa produkty do mycia wspierają odbudowę funkcji bariery naskórkowej, co świadczy o właściwym dobraniu proporcji i rodzaju składników produktu, takich jak surfaktanty oraz emolienty.

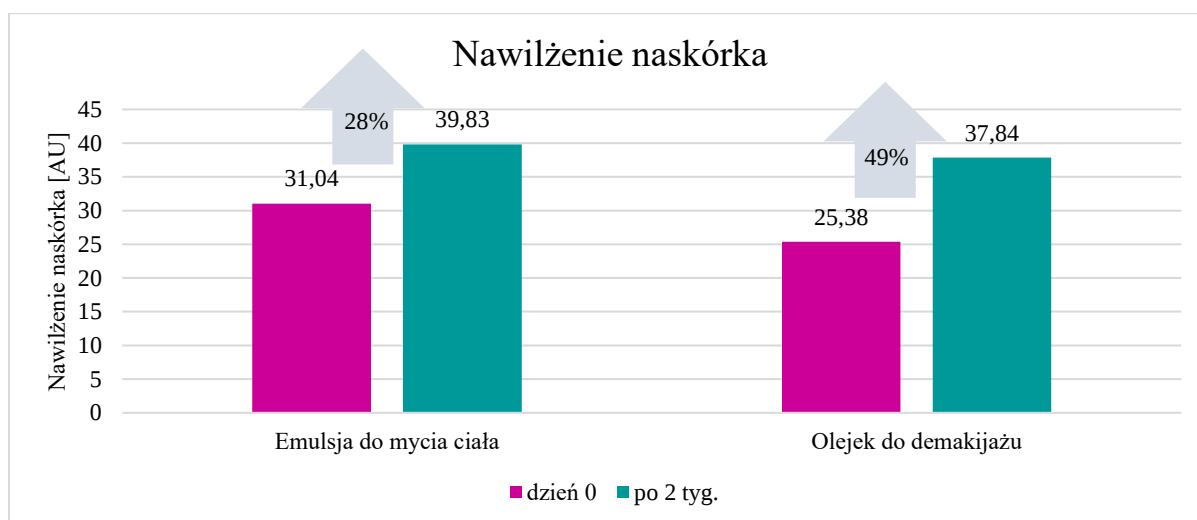
Otrzymane wyniki korespondują z wynikami badania przeprowadzonego przez Spada i in., w którym wykazano znaczne zmniejszenie TEWL oraz zwiększenie poziomu nawilżenia naskórka po zastosowaniu preparatu do mycia skóry zawierającego ceramidy i emolienty u pacjentów z egzemą [140].



Rysunek 25. Zmiany wartości TEWL [g/m²/h] po 2 tygodniach stosowania emulsji do mycia ciała oraz olejku do demakijażu; dzień 0-pomiar przed rozpoczęciem stosowania badanych preparatów.

8.2.5. Badanie poziomu nawilżenia naskórka

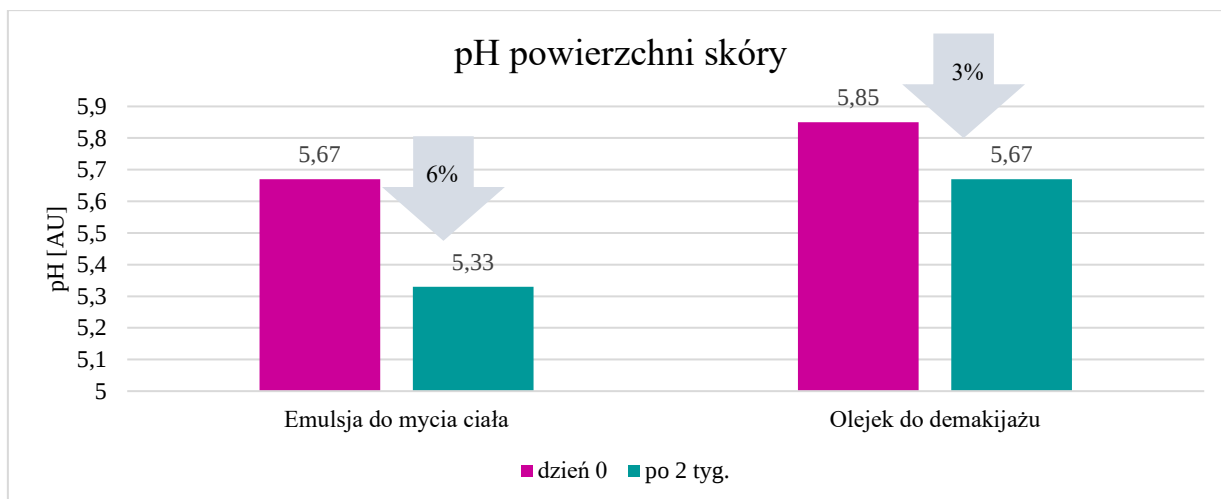
Analizując wyniki przedstawione na rysunku 26 można stwierdzić, że zarówno w rezultacie stosowania emulsji do mycia ciała, jak i olejku do demakijażu poziom nawilżenia naskórka uległ znacznej poprawie. Po 2 tygodniach stosowania emulsji do mycia ciała nawilżenie naskórka wzrosło o 28 % w stosunku do pomiaru początkowego, natomiast po 2 tygodniach stosowania olejku do demakijażu odnotowano wzrost poziomu nawilżenia o 49 %. Większy wzrost nawilżenia w wyniku stosowania olejku do demakijażu może być wspierany przez rodzaj formułacji. Olejek jest formacją praktycznie bezwodną, zawierającą bardzo niewielką ilość wody w składzie. Ponad 75 % składników receptury stanowią oleje i emolienty, które uzupełniają lipidy warstwy rogowej naskórka, powodując ograniczenie TEWL a tym samym wzrost stopnia nawilżenia naskórka. Otrzymane wyniki korespondują z wynikami pomiarów wartości TEWL, które przedstawiono w rozdziale 8.2.4. Podobne rezultaty badania z wykorzystaniem produktu myjącego zawierającego łagodne substancje myjące oraz emolienty u osób z AZS otrzymał zespół pod kierownictwem Favrel [141]. Pacjenci testowali emulsję do mycia jako jedyny środek pielęgnacyjny. W wyniku regularnego stosowania stwierdzono znaczne zwiększenie stopnia nawilżenia naskórka, co potwierdza wpływ bazy emolientowej i surfaktanowej w produktach do mycia skóry z AZS na poziom jej nawilżenia [141].



Rysunek 26. Zmiany wartości nawilżenia naskórka [AU] po 2 tygodniach stosowania emulsji do mycia ciała oraz olejku do demakijażu; dzień 0-pomiar przed rozpoczęciem stosowania badanych preparatów.

8.2.6. Badanie pH powierzchni skóry

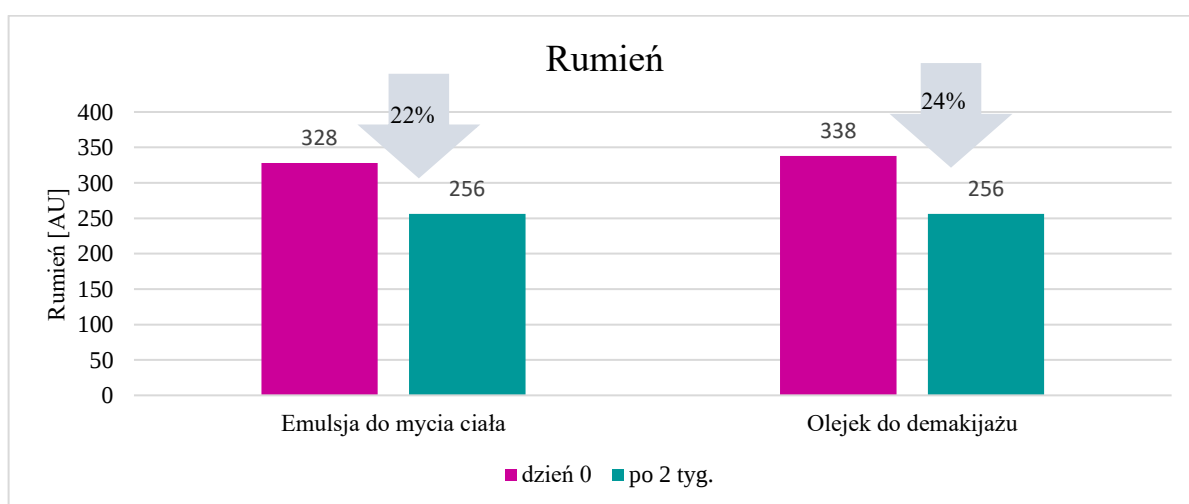
Analizując wyniki przedstawione na rysunku 27 można stwierdzić, że zarówno stosowanie emulsji do mycia ciała oraz olejku do demakijażu powoduje nieznaczne obniżenie pH powierzchni skóry u połowy badanych. Po dwóch tygodniach stosowania emulsji do mycia ciała wartość pH powierzchni skóry zmniejszyła się o 6 % w stosunku do wartości początkowej, spadając z wartości 5,67 do wartości 5,33. Natomiast po 2 tygodniach stosowania olejku do demakijażu pH powierzchni skóry obniżyło się o 3 % spadając z wartości 5,85 do wartości 5,67. Natomiast w całej grupie badanej nie stwierdzono zwiększenia poziomu pH, co świadczy o tym, że produkt nie zaburza funkcjonowania bariery naskórkowej. Spadek pH powierzchni skóry po zastosowaniu obydwu produktów może wynikać z kilku czynników: ochrony bariery naskórkowej dzięki zawartym w formulacjach emolientom, działaniu przeciwzapalnemu dzięki surowcom pochodzącym z wąkroty azjatyckiej oraz pH testowanych formuacji, którego wartość była zbliżona do fizjologicznego pH skóry (5,5). Czynniki te w naturalny sposób zakwaszają powierzchnię skóry, wspierając odbudowę funkcji bariery naskórkowej. Otrzymane wyniki korespondują z wynikami badania przeprowadzonego przez Lee i in., w którym zastosowano preparat myjący o obniżonej wartości pH do pielęgnacji skóry dzieci z AZS [142]. Po 6 tygodniach stosowania zaobserwowano obniżenie pH powierzchni skóry, TEWL oraz intensywności rumienia, a także spadek nasilenia objawów choroby [142]. Ponadto, opracowane produkty myjące nie zawierają mydła, a oparte są o działanie surfaktantów pochodzących z biofermentacji (soforolipidów), niejonowych, o niskim potencjale drażniącym [39]. Badania wykazały poprawę kliniczną przy stosowaniu produktów myjących bez mydła w połączeniu z miejscowymi metodami leczenia AZS [69].



Rysunek 27. Zmiany wartości pH powierzchni naskórka [AU] po 2 tygodniach stosowania emulsji do mycia ciała oraz olejku do demakijażu; dzień 0-pomiar przed rozpoczęciem stosowania badanych preparatów.

8.2.7. Badanie rumienia (erythema)

Jak wynika z danych przedstawionych na rysunku 28 zarówno emulsja do mycia ciała, jak i olejek do demakijażu przyczyniały się do znacznego obniżenia intensywności rumienia po 2 tygodniach ich stosowania w odniesieniu do wartości początkowych. W przypadku emulsji do mycia ciała intensywność rumienia obniżyła się o 22 %, spadając z wartości 328 AU do wartości 256 AU. Natomiast po 2 tygodniach stosowania olejku do demakijażu intensywność rumienia obniżyła się o 24 %, spadając z wartości 338 AU do 256 AU. Otrzymane wyniki potwierdzają wpływ właściwości przeciwzapalnych ekstraktu z wąkroty azjatyckiej, a także odpowiednio skomponowanej bazy emolientowej i surfaktantowej, która nie podrażnia skóry, a wspiera odbudowę bariery naskórkowej oraz niweluje stan zapalny, co koreluje z obniżeniem intensywności rumienia.



Rysunek 28. Zmiany intensywności rumienia [AU] po 2 tygodniach stosowania emulsji do mycia ciała oraz olejku do demakijażu; dzień 0-pomiar przed rozpoczęciem stosowania badanych preparatów.

8.3. Badania niezbędne do wdrożenia dermokosmetyków zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009

W celu wdrożenia produktów na rynek przeprowadzono pakiet badań zgodnie z Rozporządzeniem WE) nr 1223/2009, które zebrano w tabeli nr 17.

Tabela 17. Pakiet badań w celu wdrożenia produktu na rynek.

Badanie	Numer sprawozdania
Czystość mikrobiologiczna	MIK/1/2023, MIK/2/2023, MIK/3/2023, MIK/1/2024, MIK/2/2024
Test konserwacji	TK/1/2023, TK/2/2023, TK/3/2023, TK/1/2024, TK/2/2024
Dermatologiczne (patch testy)	BST Z11413 ZBP 18018 BST Z11533 ZBP 18657 BST Z11533 ZBP 1865 6 BST Z-11529/ ZBP-18633 BST Z-11530/ ZBP-18642
Stabilności produktu w zmiennych warunkach temperaturowych: 4 °C, 45 °C, -5 °C ↔ 45 °C	STAB/1/2024 STAB/2/2024

V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W toku przeprowadzonych badań opracowano pięć zrównoważonych formułacji dermokosmetyków przeznaczonych do kompleksowej pielęgnacji i mycia skóry atopowej, z czego trzy były przedmiotem badań przedłożonej pracy doktorskiej. W wyniku oceny środowiskowej surowców wyselekcjonowano zgodne z kryteriami COSMOS składniki pochodzenia naturalnego, które zostały przetworzone w procesach uwzględniających zasady Zielonej Chemii, m.in. na drodze ekstrakcji, fermentacji, wyciskania czy też reakcji estryfikacji. Ponadto, w każdej recepturze wykorzystano 10 % surowców pochodzących z upcyklingu odpadów z przemysłu spożywczego i drzewnego, takich jak oliwki, pestki malin i moreli, nasiona soi, otręby owsiane i ryżowe, buraki cukrowe, trawa pszeniczna, czy terpentyna otrzymana z drewna. Pełniły one funkcje emolientów, emulgatorów, surfaktantów i antyoksydantów. Wszystkie wykorzystane surowce były łatwo biodegradowalne zgodnie z wytycznymi OECD dotyczącym testów biodegradacji nr 301 w środowisku tlenowym i wodnym (co najmniej 60 % biodegradacji surowca w 28 dni) oraz wykazywały niską toksyczność dla organizmów wodnych.

W wyniku selekcji emulgatorów i zagęstników oraz dostosowania parametrów procesu technologicznego, takich jak temperatura emulgowania, czas i prędkość obrotów mieszadła i homogenizatora, opracowano zoptymalizowany, niskoenergetyczny proces wytwarzania emulsji typu w/o, emulsji typu o/w oraz żelu. Procesy emulgowania w temperaturze pokojowej stanowiły duże wyzwanie technologiczne, ze względu na liczne ograniczenia w użyciu emulgatorów, czy też stabilizatorów emulsji, takich jak woski, alkohole tłuszczowe oraz niektóre polimery naturalne, które wymagają podgrzania do temperatury 75-80 °C. Z tego powodu zdecydowana większość procesów technologicznych w przemyśle kosmetycznym przebiega w wysokiej temperaturze (70-80 °C). Dzięki optymalizacji procesu i otrzymaniu emulsji typu o/w i w/o oraz żelu na zimno (w temperaturze 25 °C), bez podgrzewania składników formułacji, znacznie ograniczono zużycie energii elektrycznej oraz wody, a tym samym zmniejszono ślad węglowy w środowisku, co wpisuje się w politykę gospodarki niskoemisyjnej. Opracowanie procesu uzyskiwania emulsji na zimno można również uznać za kamień milowy w kierunku ochrony właściwości olejów i substancji aktywnych wrażliwych na temperaturę. Jest to szczególnie istotne w przypadku produktów bogatych w emolienty, przeznaczonych do pielęgnacji skóry atopowej, w których oleje stanowią aż 30-50 % składu. Emulsje przetwarzane na zimno zabezpieczają oleje przed procesem utleniania, zmniejszając ryzyko oddziaływania na skórę wolnych rodników powstających w wyniku tego procesu i indukujących stan zapalny w skórze.

W badaniach starzeniowych przebiegających w temperaturze 45 °C, przeprowadzonych z wykorzystaniem technik dyfrakcji laserowej (LD), elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS) oraz statycznego wielokrotnego rozpraszania światła (SMLS), potwierdzono stabilność otrzymanych formułacji, a tym samym właściwie dobrane parametry zoptymalizowanego procesu technologicznego.

W kolejnym etapie badań opracowano i zwalidowano metodę HPLC służącą do oznaczania madekasozydu i azjatykozydu, czyli głównych triterpenów pochodzących z liści wąkroty azjatyckiej.

Na tej podstawie, dzięki przeprowadzeniu analiz, wyselekcjonowano docelowy ekstrakt z wąkroty azjatyckiej o optymalnej zawartości oznaczanych triterpenów, który wprowadzono do receptur. Potwierdzono stabilność tego ekstraktu, mierzoną jako stabilność zawartych w nim triterpenów, na drodze ilościowego oznaczenia ich w formułacjach emulsji typu w/o, o/w i żelu. Madekasozyd i azjatykozyd oznaczono także w biofermencie z wąkroty azjatyckiej, który również został wprowadzony do receptur jako innowacyjny surowiec o właściwościach postbiotycznych. Opracowana metodyka analiz HPLC do jakościowego i ilościowego oznaczania zawartości madekasozydu i azjatykozydu w ekstraktach z wąkroty azjatyckiej jest praktycznym narzędziem dla przemysłu kosmetycznego, służącym do kontroli jakości dostaw każdej partii surowca oraz gotowego produktu kosmetycznego zawierającego ekstrakt z wąkroty azjatyckiej. W trakcie prowadzonych badań określono również profile uwalniania madekasozydu i azjatykozydu z opracowanych formułacji, które stanowiły podłoża dla substancji aktywnych. Analiza wyników jednoznacznie wskazała, że najlepszym podłożem (nośnikiem) dla obu triterpenów jest emulsja typu o/w. Jednocześnie dowiedziono, że stężenie substancji aktywnych w formułacji nie wpływa w sposób istotny na skumulowaną ilość ich uwalniania w czasie. Ponadto, zweryfikowano wpływ odczynu pH na profil i kinetykę uwalniania madekasozydu i azjatykozydu, projektując warunki badania tak, aby odzwierciedlało fizjologiczne pH skóry (5,8) oraz podwyższone pH skóry atopowej (7,4). Wykazano, że podwyższone pH sprzyja uwalnianiu azjatykozydu, natomiast w niższym pH profil uwalniania obydwu związków jest optymalny. Badanie uwalniania substancji oraz dopasowanie modeli kinetycznych dostarczyło ważnych informacji na temat najbardziej optymalnego rodzaju nośnika dobranego do potrzeb skóry atopowej oraz mechanizmów jego działania.

Randomizowane, pojedynczo zaślepienie, kontrolowane badania skuteczności działania opracowanych formułacji dermokosmetycznych, tzn. balsamu do ciała, kremu do rąk oraz kremu do twarzy przeprowadzone z udziałem ochotników z łagodnym lub umiarkowanym przebiegiem AZS potwierdziły, że produkty emolientowe zawierające ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej są bardzo skuteczne w odbudowywaniu funkcji bariery naskórkowej poprzez redukcję TEWL oraz rumienia, obniżanie pH powierzchni skóry, wygładzanie naskórka, zmniejszanie jego szorstkości oraz stopnia złuszczenia, a także podwyższanie stopnia nawilżenia. Udowodniono statystycznie istotną przewagę ($p < 0,05$) w skuteczności tych produktów w obniżaniu pH skóry ciała i twarzy, niwelowaniu rumienia występującego na skórze ciała i dłoni, zmniejszaniu szorstkości oraz wygładzaniu naskórka zarówno na skórze ciała, jak i twarzy, a także zwiększaniu stopnia nawilżenia skóry ciała i dłoni w porównaniu z próbą kontrolną. Ponadto, balsam do ciała zawierający ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej wspierał homeostazę mikrobiomu skóry. Na tej podstawie można wnioskować, że połączenie saponin triterpenowych i postbiotyków pochodzących z ekstrakcji i fermentacji liści *Centella asiatica* L. wraz z emolientami, które mogą odbudować barierę naskórkową i zmniejszyć stan zapalny, zapewnią kompleksową pielęgnację skóry twarzy i ciała dotkniętej AZS. Opracowane produkty dermokosmetyczne mogą być z powodzeniem wykorzystywane w pielęgnacji oraz wspomaganiu leczenia atopowego zapalenia skóry.

VI. LITERATURA

1. Krzyżostan, M. Zrównoważony produkt kosmetyczny. *Świat Przemysłu Kosmetycznego*, 2022, 3, 114-117.
2. Communication from the Commission to the European Parliament, The European Council, The Council, The European Economic and Social Committee and The Committee of the Regions. The European Green Deal. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=COM:2019:640:FIN> (ostatni dostęp: listopad 2024).
3. Rocca, R.; Acerbi, F.; Fumagalli, L.; Taisch, M. Sustainability paradigm in the cosmetics industry: State of the art. *Cleaner Waste Systems*, 2022, 3, 100057.
4. Bom, S.; Jorge, J.; Ribeiro, H.M.; Marto, J. A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review. *Journal of cleaner production*, 2019, 225, 270–290.
5. Bom, S.; Ribeiro, H.M.; Marto, J. Sustainability Calculator: A Tool to Assess Sustainability in Cosmetic Products. *Sustainability*, 2020, 12, 1437.
6. Hitce, J.; Xu, J.; Brossat, M.; Frantz, M.C.; Dublanquet, A.-C.; Philippe, M.; Dalko-Csiba, M. UN sustainable development goals: How can sustainable/green chemistry contribute? Green chemistry as a source of sustainable innovations in the cosmetic industry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2018, 13, 164–169.
7. cosmeticseurope.eu: https://www.cosmeticseurope.eu/files/4214/6521/4452/GSP_Brochure.pdf (ostatni dostęp: listopad 2024).
8. Salvioni, D.M.; Almici, A. Transitioning Toward a Circular Economy: The Impact of Stakeholder Engagement on Sustainability Culture. *Sustainability*, 2020, 12, 8641.
9. Tamburic, S.; Fröhlich, J.; Mistry, S.; Fischer, L.J.; Barbary, T.; Bunyan, S.; Dufton, E. Sustainability by Reduced Energy Consumption during Manufacturing: The Case of Cosmetic Emulsions. *Cosmetics*, 2023, 10, 132.
10. Aguiar, J.B.; Martins, A.M.; Almeida, C.; Ribeiro, H.; Marto, J. Water sustainability: A waterless life cycle for cosmetic products, *Sustainable Production and Consumption*, 2022, 32, 35–51.
11. Amberg, N.; Fogarassy, C. Green Consumer Behavior in the Cosmetics Market. *Resources*, 2019, 8, 137.
12. Bozza, A.; Campi, C.; Garelli, S.; Ugazio, E.; Battaglia, L. Current regulatory and market frameworks in green cosmetics: The role of certification. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2022, 30, 100851.
13. Ratajczak, P.; Landowska, W.; Kopciuch, D.; Paczkowska, A.; Zaprutko, T.; Kus, K. The Growing Market for Natural Cosmetics in Poland: Consumer Preferences and Industry Trends. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2023, 16 1877–1892.

14. Kunkiel, K.; Natkańska, A.; Nędzi, M.; Zawadzka-Krajewska, A.; Feleszko, W.; Patients' preferences of leave-on emollients: a survey on patients with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Treatment*, 2020, 33, 2, 1143–1145.
15. Torres, T.; Ferreira, E. O.; Gonçalo, M.; Mendes-Bastos, P.; Selores, M.; Filipe, P. Update on atopic dermatitis. *Acta medica portuguesa*, 2019, 32, 9, 606-613.
16. Li, H.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Guo, Y.; Yao, Z. Update on the pathogenesis and therapy of atopic dermatitis. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 2019, 61, 324–338.
17. Grześk-Kaczyńska, M.; Petrus-Halicka, J.; Kaczyński, S.; Bartuzi, Z.; Ukleja-Sokołowska, N. Should Emollients Be Recommended for the Prevention of Atopic Dermatitis?—New Evidence and Current State of Knowledge. *Journal of Clinical Medicine*, 2024, 13, 863.
18. Elias, P.M. Optimizing emollient therapy for skin barrier repair in atopic dermatitis, *American College of Allergy, Asthma & Immunology*, 2022, 128:505-511.
19. Hoque, M.; Rafi, I.K.; Hossain, M.S. Centella asiatica: A mini review of its medicinal properties and different uses, *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 2023, 19,2, 1185–1191.
20. Park, J.H.; Choi, I.Y.; Son, D.J.; Park, E.K.; Song, M.J., Hellström, M., Hong, J.T. Anti-Inflammatory Effect of Titrated Extract of Centella asiatica in Phthalic Anhydride-Induced Allergic Dermatitis Animal Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18, 738.
21. Lee, Y.; Choi, H.K.; N'deh, K.P.; Choi, Y.J.; Fan, M.; Kim, E.K.; et al. Inhibitory effect of Centella asiatica extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice. *Nutrients* 2020, 12 ,2, 411.
22. https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal_pl (ostatni dostęp: listopad 2024)
23. Europejski zielony ład. Dostępne on- line: <https://www.consilium.europa.eu/pl/policies/green-deal/> (ostatni dostęp: listopad 2024)
24. Chemicals Strategy for Sustainability. Dostępne on- line: <https://echa.europa.eu/hot-topics/chemicals-strategy-for-sustainability> (ostatni dostęp: listopad 2024)
25. Scholz, S.; Brack, W.; Escher, B. I.; Hackermüller, J.; Liess, M.; von Bergen, M., Wick, L.Y.; Zenclussen, A.C.; Altenburger, R. The EU chemicals strategy for sustainability: an opportunity to develop new approaches for hazard and risk assessment. *Archives of toxicology*, 2022, 96,8, 2381-2386.
26. Białas, I. Produkty kosmetyczne w Zielonym Ładzie. Legislacja składnikowa- dokąd zmierzamy? *Świat Przemysłu Kosmetycznego*, 2022, 1.
27. Turek, A. Nowa odsłona standardu COSMOS, czyli zmiany w kosmetykach naturalnych, na co musimy się przygotować. *Świat Przemysłu Kosmetycznego*, 2023,1.
28. COSMOS STANDARD Criteria Version 4.1. Dostępne on- line: https://media.cosmos-standard.org/filer_public/4f/a0/4fa0fa41-3b64-47b6-a6cc-350ffdc6b54a/cosmos-standard_v4-1.pdf (ostatni dostęp: listopad 2024)

29. Krzyżostan, M. Natural and organic cosmetics. Law regulations and the newest trends. *Cosmetic reporter*, 2018, I-VI, 128-129.
30. Porter, S.D.; Reay, D.S.; Bomberg, E.; Higgins, P. Avoidable food losses and associated production-phase greenhouse gas emissions arising from application of cosmetic standards to fresh fruit and vegetables in Europe and the UK. *J. Clean. Prod.* 2018, 10, 869–878.
31. Baiano, A. Recovery of Biomolecules from FoodWastes—A Review. *Molecules* 2014, 19, 14821–14842.
32. Aschemann-Witzel, J.; Asioli, D.; Banovic, M.; Perito, M.A.; Peschel, A.O.; Stancu, V. Defining upcycled food: The dual role of upcycling in reducing food loss and waste. *Trends Food Sci. Technol.* 2023, 132, 132–137.
33. Del Rio Osorio, L.L.; Flórez-López, E.; Grande-Tovar, C.D. The Potential of Selected Agri-Food Loss and Waste to Contribute to a Circular Economy: Applications in the Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Molecules* 2021, 26, 515.
34. Fernández-Ochoa, A.; Leyva-Jiménez, F.J.; Pimentel-Moral, S.; Villegas-Aguilar, M.C.; Alañón, M.E.; Segura-Carretero, A.; Cádiz-Gurrea, M. Revalorisation of Agro-Industrial Wastes into High Value-Added Products. In *Sustainable Bioconversion of Waste to Value Added Products*; Inamuddin Khan, A., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2021; pp. 229–245.
35. Pérez-Rivero, C.; López-Gómez, J.P. Unlocking the Potential of Fermentation in Cosmetics: A Review. *Fermentation* 2023, 9, 463.
36. Sharma, P.; Gaurb, V.K.; Kimd, S.-H.; Pandeye, A. Microbial strategies for bio-transforming food waste into resources. *Bioresour. Technol.* 2020, 299, 122580.
37. Waqas, M.; Rehan, M.; Khan, M.; Nizami, D.A.-S. Conversion of food waste to fermentation products. In *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*; Ferranti, P., Berry, E., Jock, A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 501–509.
38. Majchrzak, W.; Motyl, I.; Smigielski, K. Biological and Cosmetical Importance of Fermented Raw Materials: An Overview. *Molecules* 2022, 27, 4845.
39. Klimek-Szczykutowicz, M.; Błońska-Sikora, E.M.; Kulik-Siarek, K.; Zhussupova, A.; Wrzosek, M. Bioferments and Biosurfactants as New Products with Potential Use in the Cosmetic Industry. *Appl. Sci.* 2024, 14, 3902.
40. Yoseph, C.; Avanti, C.; Hadiwidjaja, M.; Briliani, K. The importance of fermented plant extract for anti-aging in cosmetics product. *World J. Pharm. Res.* 2021, 10, 1330–1343. Available online: https://www.wjpr.net/abstract_file/17168 (accessed on 15 March 2024).
41. Rienzo, M.A.D.D.; Banat, I.M.; Dolman, B.; Winterburn, J.; Martin, P.J. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *New biotechnology*, 2015, 32, 720–726.
42. Bylund, S.; von Kobyletzki, L. B.; Svalstedt, M.; Svensson, Å. Prevalence and incidence of atopic dermatitis: a systematic review. *Acta dermato-venereologica*, 2020, 100,12, 5765.

43. Sroka-Tomaszewska, J.; Trzeciak, M. Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 4130.
44. Kasznia-Kocot, J.; Reichmann, K.; Wypych-Ślusarska, A. Wybrane aspekty jakości życia w atopowym zapaleniu skóry, *Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine*, 2014, 17, 2, 42-51.
45. Millan, M.; Mijas, J. Atopowe zapalenie skóry – patomechanizm, diagnostyka, postępowanie lecznicze, profilaktyka, *Nowa Pediatria*, 2017; 21, 4, 114-122
46. Yoshida, T.; Beck, L.A.; De Benedetto, A. Skin barrier defects in atopic dermatitis: From old idea to new opportunity, *Allergology International* 2022, 71, 3- 13.
47. Fujii, M. Current understanding of pathophysiological mechanisms of atopic dermatitis: interactions among skin barrier dysfunction, immune abnormalities and pruritus. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2020, 43, 12–19.
48. Hrestak, D.; Matijašić, M.; Čipčić Paljetak, H.; Ledić Drvar, D.; Ljubojević Hadžavdić, S.; Perić, M. Skin Microbiota in Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Science*, 2022, 23, 3503.
49. Fishbein, A.B.; Silverberg, J.I.; Wilson, E.J.; Ong, P.Y. Update on Atopic Dermatitis: Diagnosis, Severity Assessment, and Treatment Selection. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2020, 8, 1, 91-101.
50. Dzienis, K.; Tryniszewska, E.; Kaczmarek, M. Zaburzenia równowagi immunologicznej subpopulacji limfocytów Th1 i Th2 oraz rola ich wybranych cytokin w atopowym zapaleniu skóry, *Postępy Dermatologii i Alergologii*, 2006; XXIII, 2: 88–93.
51. Santamaria-Babí, LF. Atopic Dermatitis Pathogenesis: Lessons From Immunology. *Dermatol Pract Concept.*, 2022, 1, 12, 1, e2022152.
52. Rerknimitr, P.; Otsuka, A.; Nakashima, C.; Kabashima, K. Skin barrier function and atopic dermatitis. *Current Dermatology Reports*, 2018, 7, 209-220.
53. Martini, M.C. Kosmetologia i farmakologia skóry Redakcja naukowa wydania polskiego, Waldemar Placek, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
54. Hawro, T.; Sysa-Jędrzejowska, A.; Narbutt, J. Rola mutacji w genie filagryny w etiopatogenezie atopowego zapalenia skóry. *Przegląd piśmiennictwa, Postępy Dermatologii i Alergologii*, 2008, XXV, 1, 12–15.
55. Kim, B.E.; Leung, D.Y.M. Significance of Skin Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis, *Allergy Asthma Immunol Res.*, 2018, 10, 3, 207-215.
56. Yang, G.; Seok, J.K.; Kang, H.C.; Lee, J.Y. Skin Barrier Abnormalities and Immune Dysfunction in Atopic Dermatitis, *International Journal of Molecular Science*, 2020, 21, 2867.
57. Elias, P.M.; Schmuth, M. Nieprawidłowa bariera skórna w etiopatogenezie atopowego zapalenia skóry, *Dermatologia po Dyplomie*, 2010, 1, 3, 20-30.

58. Boer, D. E.; van Smeden, J.; Al-Khakany, H.; Melnik, E.; van Dijk, R.; Absalah, S.; Bouwstra, J. A. Skin of atopic dermatitis patients shows disturbed β -glucocerebrosidase and acid sphingomyelinase activity that relates to changes in stratum corneum lipid composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865, 6, 158673.
59. Noparlik, M.; Szczepańska, J.; Turniak, M. Rola mikrobiomu skóry w atopowym zapaleniu skóry. *Alergia Astma Immunologia*, 2023, 28, 3, 74-79.
60. Lun Hon, K.; Kung, J.S.K.; Gigi, W.G.; Fan Leung, T. Emollient treatment of atopic dermatitis: latest evidence and clinical considerations. *Drugs Context*, 2018; 7: 212530.
61. Mukhopadhyay, P. Cleansers and their role in various dermatological disorders. *Indian journal of dermatology*, 2011, 56, 1, 2-6.
62. Danby, S. G.; Andrew, P. V.; Kay, L. J.; Pinnock, A.; Chittock, J.; Brown, K.; Williams, S.F.; Cork, M. J. Enhancement of stratum corneum lipid structure improves skin barrier function and protects against irritation in adults with dry, eczema-prone skin. *British Journal of Dermatology*, 2022, 186, 5, 875-886.
63. Danby, S. G.; Andrew, P. V.; Taylor, R. N.; Kay, L. J.; Chittock, J.; Pinnock, A.; Cork, M. J. Different types of emollient cream exhibit diverse physiological effects on the skin barrier in adults with atopic dermatitis. *Clinical and experimental dermatology*, 2022, 47, 6, 1154-1164.
64. Cestar,i S.; Correia, P.; Kerob, D. Emollients “Plus” are Beneficial in Both the Short and Long Term in Mild Atopic Dermatitis, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2023, 2093-2102.
65. Araviiskaia E., Pincelli C., Sparavigna A., Luger T., The Role of a Novel Generation of Emollients, ‘Emollients Plus’, in Atopic Dermatitis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2022, 15, 2705–2719.
66. Quadri, M; Lotti, R.; Bonzano, L.; et al. A novel multi-action emollient plus cream improves skin barrier function in patients with atopic dermatitis: in vitro and clinical evidence, *Skin Pharmacology and Physiology*, 2021;34, 1, 8–18.
67. Marcelino, J., Giménez-Arnau, A. M. Impact of Cosmetics and Cleansers in Atopic Dermatitis—How to Advise Patients. *Current Treatment Options in Allergy*, 2024, 11, 62–76.
68. Hendricks, A. J., Kromenacker, B. W., Thompson, A., Mata, E. I., Ludwig, C. M., Platto, J. F., Shi, V. Effects of cleansing on skin barrier function in atopic dermatitis and healthy skin: A pilot study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2020, 83, 6, 16437.
69. Cheong, W. K. Gentle cleansing and moisturizing for patients with atopic dermatitis and sensitive skin. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2009, 10(Suppl 1), 13-17.
70. Pal, D.; Anil, A.; Chanchal, M. K. Centella Asiatica (Brahmi): A Herbal Medicince Plant. *International Journal of Science and Research*, 2018, 7, 7, 21-29.
71. Bylka W., Znajdek-Awiżeń P., Studzińska-Sroka E., Brzezińska M., Centella asiatica in cosmetology, *Postep Derm Alergol*, 2013, XXX, 1, 46-49.

72. Poovizhi, T.; Krishnaprabha, V.; Uthira, L. Perspective study on Pharmacological and Therapeutic potential of *Centella asiatica*. *Medicon Medical Sciences*, 2022, 2, 02-11.
73. Anand, T.; Mahadeva, N.; Phani, K. G.; Farhath, K. Antioxidant and DNA damage preventive properties of *Centella asiatica* (L) Urb. *Pharmacognosy journal*, 2010, 2,17,, 53-58.
74. Li, H.; Chen, X.; Liu, J.; Chen, M.; Huang, M.; Huang, G.; Chen X.; Du Q.; Su J.; Lin, R. Ethanol extract of *Centella asiatica* alleviated dextran sulfate sodium-induced colitis: Restoration on mucosa barrier and gut microbiota homeostasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 267, 113445.
75. Mudaliana, S. Antimicrobial activity of *Centella asiatica* and *Gigantochloa apus*. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 2021, 32, 4, 755-759.
76. Hoque, M.; Rafi, I.K.; Hossain M.S. *Centella asiatica*: A mini review of its medicinal properties and different uses, *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 2023, 19, 02, 1185–1191.
77. Sun, B.; Wu, L.; Wu, Y.; Zhang, C.; Qin, L.; Hayashi, M.; Kudo, M.; Gao, M.; Liu, T. Therapeutic Potential of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review, *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11, 1-24.
78. Yan, Z.H.; Shia, X.Y.; Jiang, H. Phytochemistry, pharmacology, and clinical applications of *Centella asiatica* (L.) Urban. *World Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2023, 9, 4, 369-398.
79. Tan, S.C.; Bhattamisra, S.K.; Chellappan, D.K.; Candasamy, M. Actions and Therapeutic Potential of Madecassoside and Other Major Constituents of *Centella asiatica*: A Review. *Applied Science*, 2021, 11, 8475.
80. Min, D. H.; Yu, Y. B.; Kim, T. H.; Kim, H.; Lee, S. Pharmacological effects of pentacyclic triterpenoids isolated from *Centella asiatica*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2024, 65, 2, 189-197.
81. Bandopadhyay, S.; Mandal S.; Ghorai, M.; Kumar, Jha N.; Kumar, M.; et all. Therapeutic properties and pharmacological activities of asiaticoside and madecassoside: A review, *Journal of Cellular and Mollecular Medicine*, 2023;27:593–608.
82. Park, J. H., Yeo, I. J., Jang, J. S., Kim, K. C., Park, M. H., Lee, H. P., Han S.B., Hong, J. T. Combination effect of titrated extract of *Centella asiatica* and astaxanthin in a mouse model of phthalic anhydride-induced atopic dermatitis, *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 2019, 11, 4, 548-559.
83. Park J.H., Jang J.S., Kim K.C., Hong J.T., Anti-inflammatory effect of *Centella asiatica* phytosome in a mouse model of phthalic anhydride-induced atopic dermatitis, *Phytomedicine*, 2018, 43, 110–119.
84. Moon, G.-H.; Lee, Y.; Kim, E.-K.; Chung, K.-H.; Lee, K.-J.; An, J.-H. Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effects of Asiatic Acid in a DNCB-Induced Atopic Dermatitis Animal Model. *Nutrients* 2021, 13, 2448.

85. Idris, F.N.; Mohd Nadzir, M. Comparative Studies on Different Extraction Methods of *Centella asiatica* and Extracts Bioactive Compounds Effects on Antimicrobial Activities. *Antibiotics*, 2021, 10, 457.
86. Arumugam, T., Ayyanar, M., Pillai, Y. J. K., Sekar, T. Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf and callus extracts of *Centella asiatica*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2011, 6,1, 55-60.
87. Sieberi, B. M., Omwenga, G. I., Wambua, R. K., Samoei, J. C., Ngugi, M. P. Screening of the Dichloromethane: Methanolic Extract of *Centella asiatica* for Antibacterial Activities against *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. *The Scientific World Journal*, 2020, 1, 6378712.
88. Johnson Jr, W., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Heldreth, B., Safety assessment of *Centella asiatica*-derived ingredients as used in cosmetics. *International journal of toxicology*, 2023, 42(1_suppl), 5S-22S.
89. Greifová, G., Májeková, H., Greif, G., Body, P., Greifová, M., & Dubničková, M. Analysis of antimicrobial and immunomodulatory substances produced by heterofermentative *Lactobacillus reuteri*. *Folia microbiologica*, 2017, 62, 515-524.
90. Y. Chen, X. Huang, A. Liu, S. Fan, X. Yang, H. Guo, M. Wu, M. Liu, P. Liu, F. Fu, K. Xuan, *Lactobacillus Reuteri* Vesicles Regulate Mitochondrial Function of Macrophages to Promote Mucosal and Cutaneous Wound Healing, *Advanced Science*, 2024, 11,24, 2309725.
91. Butler, É.; Lundqvist, C.; Axelsson, J. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 as a Novel Topical Cosmetic Ingredient: A Proof of Concept Clinical Study in Adults with Atopic Dermatitis. *Microorganisms*, 2020, 8, 1026.
92. Salminen, S.; Collado, M.C.; Endo, A.; Hill, C.; Lebeer, S.; Quigley, E.M.M.; Sanders, M.E.; Shamir, R.; Swann, J.R.; Szajewska, H.; Vinderola G., The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18, 649–667.
93. Duarte, M.; Oliveira, A.L.; Oliveira, C.; Pintado, M.; Amaro, A.; Madureira, A.R. Current Postbiotics in the Cosmetic Market—An Update and Development Opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106, 5879–5891.
94. De Almeida, C.V.; Antiga, E.; Lulli, M. Oral and Topical Probiotics and Postbiotics in Skincare and Dermatological Therapy: A Concise Review. *Microorganisms*, 2023, 11, 1420.
95. da Silva Vale, A.; de Melo Pereira, G.V.; de Oliveira, A.C.; de Carvalho Neto, D.P.; Herrmann, L.W.; Karp, S.G.; Soccol, V.T.; Soccol, C.R. Production, Formulation, and Application of Postbiotics in the Treatment of Skin Conditions. *Fermentation*, 2023, 9, 264.
96. Wang, W. Effects of different fermentation conditions on flavonoid content of *Asiaticum asiatica* extract. *Academic Journal of Agriculture & Life Sciences*, 2024, 5, 1, 88-93.

97. Pernin, A., Bosc, V., Soto, P., Le Roux, E., & Maillard, M. N. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions rich in omega-3: Effect of aqueous phase viscosity, emulsifiers, and antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2019, 121, 9, 1800462.
98. Nohynek, G. J., Antignac, E., Re, T., & Toutain, H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients, *Toxicology and applied pharmacology*, 2010, 243,2, 239-259.
99. Ratola, N., & Homem, V. Toxic Effects of Fragrances to Aquatic Organisms w: *Fragrances in the Environment*, Springer Cham, 2024,.1, XII, 299. ISBN 978-3-031-59049-8.
100. Ali, S. M., Yosipovitch, G. Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta dermatovenereologica*, 2013, 93, 3.
101. Zhang W., Zhang Y., He Y., Xu X., Zhao X., Oil density and viscosity affect emulsion stability and destabilization mechanism, *Journal of Food Engineering*, 2024, 366, 111864,
102. Calvo F., Gómez J.M., Alvarez O., Ricardez-Sandoval L., Effect of emulsification parameters on the rheology, texture, and physical stability of cosmetic emulsions: A multiscale approach, *Chemical Engineering Research and Design*, 2022, 186, 407-415.
103. Shams S.M., Kazemzadeh Y., Riazi M., Cortés F.B., Effect of pressure on the optimal salinity point of the aqueous phase in emulsion formation, *Journal of Molecular Liquids*, 2022, 362, 119783.
104. Metoda piknometryczna – kompletny przewodnik po pomiarach gęstości dostępny na: <https://tenslab.pl/metoda-piknometryczna> (ostatni dostęp: listopad 2024)
105. Żbikowska, A., Sokół, A., Szymańska, I., Żbikowska, K., Kowalska, M., & Religa, A. Charakterystyka wybranych metod badań stabilności układów emulsyjnych. *Przemysł Spożywczy*, 2022, 76.
106. Kelm, G.R. Stability Testing for Topical Formulation Development. In *Handbook of Formulating Dermal Applications: A Definitive Practical Guide*; Dayan, N., Ed.; Scrivener Publishing LLC: Beverly, MA, USA, 2016; Chapter 16, pp. 425–462. <https://doi.org/10.1002/9781119364221.ch16>.
107. Serrano-Lotina, A.; Portela, R.; Baeza, P.; Alcolea-Rodriguez, V.; Villarroel, M.; Ávila, P. Zeta potential as a tool for functional materials development. *Cat. Today*, 2023, 423, 113862.
108. Kamble, S.; Agrawal, S.; Cherumukkil, S.; Sharma, V.; Jasra, R.V.; Munshi, P. Revisiting Zeta Potential, the Key Feature of Interfacial Phenomena, with Applications and Recent Advancements. *ChemistrySelect*, 2022, 7, e202103084.
109. Niu, H.; Wang, W.; Dou, Z.; Chen, X.; Chen, X.; Chen, H.; Fu, X. Multiscale combined techniques for evaluating emulsion stability: A critical review. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2023, 311, 102813.
110. Badruddoza, A.Z.M.; Yeoh, T.; Shah, J.C.; Walsh, T. Assessing and Predicting Physical Stability of Emulsion-Based Topical Semisolid Products: A Review. *J. Pharm. Sci.*, 2023, 112, 1772–1793.
111. Akhter, A.; Shirazi, J.H.; Shoaib khan, H.M.; Hussain, M.D.; Kazi, M. Development and evaluation of nanoemulsion gel loaded with bioactive extract of *Cucumis melo* var. *agrestis*: A novel approach for enhanced skin permeability and antifungal activity. *Heliyon*, 2024, 10, e35069.

112. Soe, H.M.S.H.; Luckanagul, J.A.; Pavasant, P.; Jansook, P. Development of in situ gel containing asiaticoside/cyclodextrin complexes. Evaluation in culture human periodontal ligament cells (HPLDCs). *Int. J. Pharm*, 2020, 586, 119589.
113. Zainal, H.; Jamil, A.; Nor, N.M.; Tang, M.M. Skin pH mapping and its relationship with transepidermal water loss, hydration and disease severity in adult patients with atopic dermatitis. *Ski. Res. Technol.*, 2020, 26, 91–98.
114. Lukić, M.; Pantelić, I.; Savić, S.D. Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. *Cosmetics*, 2021, 8, 69.
115. Costa, P.; Sousa Lobo, J.M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2001, 13, 123–133.
116. Matos, P.; Batista, M.T.; Veiga, F.; Figueirinha, A.; Figueiras, A. *Acanthus mollis* Formulations for Transdermal Delivery: From Hydrogels to Emulsions. *Gels*, 2024, 10, 36.
117. Adu, S. A., Twigg, M. S., Naughton, P. J., Marchant, R., & Banat, I. M. Glycolipid biosurfactants in skincare applications: challenges and recommendations for future exploitation. *Molecules*, 2023, 28(11), 4463.
118. Madankar, C. S., & Borde, P. K. Review on sophorolipids—a promising microbial bio-surfactant. *Tenside Surfactants Detergents* 2023, 60, 2, 95-105.
119. Balamurugan, S., Lakshmanan, P., Piramuthu, L., Geetha, D. Novelty of glycoside surfactant derivatives for sustainable development: A new perspective. *Vietnam Journal of Chemistry*, 2023, 61, 2, 135-146.
120. Hanifin J.M.; Rajka, G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1980; pp. 44-7.
121. Camilion, J. V.; Khanna, S.; Anasseri, S.; Laney, C.; Mayrovitz, H. N. Physiological, pathological, and circadian factors impacting skin hydration. *Cureus*, 2022, 14, 8, 27666.
122. Iyer, V.; Raut, J.; Dasgupta, A. Impact of pH on growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* in vitro, *Journal of Medical Microbiology* 2021, 70, 9, 001421.
123. Choi, E. H.; Kang, H. Importance of stratum corneum acidification to restore skin barrier function in eczematous diseases. *Annals of Dermatology* 2024, 36, 1, 1.
124. Blaak, J.; Dähnhardt, D.; Bielfeldt, S.; Theiss, C.; Simon, I.; Wilhelm, K.-P.; Dähnhardt-Pfeiffer, S.; Staib, P. Improvement of Human Epidermal Barrier Structure and Lipid Profile in Xerotic- and Atopic-Prone Skin via Application of a Plant-Oil and Urea Containing pH 4.5 Emulsion. *Cosmetics* 2023, 10, 95.
125. Brinke, A., Mehlich, A., Doberenz, C., Janssens-Böcker, C. Acidification of the Skin and Maintenance of the Physiological Skin pH Value by Buffered Skin Care Products Formulated around pH 4. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 2021, 11, 44-57.

126. Ratz-Lyko, A.; Arct, J.; Pytkowska, K. Moisturizing and Antiinflammatory Properties of Cosmetic Formulations Containing *Centella asiatica* Extract, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016, 78, 1, 27-33.
127. Schmid-Wendtner, M.H.; Korting, H.C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacology and Physiology* 2006, 19, 296–302.
128. Chopra, R., Silverberg, J. I. Assessing the severity of atopic dermatitis in clinical trials and practice. *Clinics in Dermatology*, 2018, 36, 5, 606-615.
129. Damkerngsuntorn, W.; Rerknimitr, P.; Panchaprateep, R.; Tangkijngamvong, N.; Kumtornrut, C.; Kerr, S. J.; Khemawoot, P. The effects of a standardized extract of *Centella asiatica* on postlaser resurfacing wound healing on the face: A split-face, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2020, 26, 6, 529-536.
130. Shukla, A., Rasik, A. M., Jain, G. K., Shankar, R., Kulshrestha, D. K., & Dhawan, B. N., In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of ethnopharmacology*, 1999, 65, 1, 1-11.
131. Lynde, C.W.; Andriessen, A.; Bertucci, V.; McCuaig, C.; Skotnicki, S.; Weinstein, M.; Wiseman, M.; Zip, C. The Skin Microbiome in Atopic Dermatitis and Its Relationship to Emollients. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* 2016, 20, 1, 21-28.
132. Stalder, J.F.; Fluhr, J.W.; Foster, T.; Glatz, M.; Proksch, E. The emerging role of skin microbiome in atopic dermatitis and its clinical implication, *Journal of Dermatological Treatment* 2018, 30, 4, 357–364.
133. Fluhr, J.W.; Menzel, P.; Schwarzer, R.; Kaestle, B.; Arens-Corell, M.; Praefke, L.; Tsankov, N.K.; Nikolaeva, D.G.; Misery, L.; Darlensk, R. Acidic Skin Care Promotes Cutaneous Microbiome Recovery and Skin Physiology in an Acute Stratum Corneum Stress Model, *Skin Pharmacology and Physiology* 2022, 35, 266–277.
134. Khmaladze, I.; Butler, E.; Fabre, S.; Gillbro, J.M. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938—A comparative study on the effect of probiotics and lysates on human skin, *Experimental Dermatology* 2019, 28, 7: 822-828.
135. Geoghegan, J.A.; Irvine, A.D.; Foster, T.J. *Staphylococcus aureus* and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship, *Trends in Microbiology* 2017, 26, 6, p. 484-497.
136. Princea, T.; McBainb, T.A.; O'Neill, C.A. *Lactobacillus reuteri* Protects Epidermal Keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-Induced Cell Death by Competitive Exclusion, *Applied and environmental Microbiology* 2012, 78, 15, 5119-5126.
137. Nakatsuji, T.; Chen, T.H.; Narala, S.; Chun, K.A.; Two, A.M.; Yun, T.; Shafiq, F.; et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis, *Science Translational Medicine* 2017, 22, 9, 378.

138. Ochlich, D.; Rademacher, F.; Drerup, K.A.; Gläser, R.; Harder, J. The influence of the commensal skin bacterium *Staphylococcus epidermidis* on the epidermal barrier and inflammation: Implications for atopic dermatitis, *Experimental Dermatology* 2023, 32, 555–561.
139. Harun, N.H.; Septama, A.W.; Ahmad, W.A.N.W.; Suppian, R. The Potential of *Centella asiatica* (Linn.) Urban as an Anti-Microbial and Immunomodulator Agent: A Review, *Natural Product Sciences* 2019, 25, 2 92-102.
140. Spada, F., Harrison, I. P., Barnes, T. M., Greive, K. A., Daniels, D., Townley, J. P., Shumack, S. A daily regimen of a ceramide-dominant moisturizing cream and cleanser restores the skin permeability barrier in adults with moderate eczema: a randomized trial. *Dermatologic Therapy* 2021, 34, 4, e14970.
141. Favrel, S., Mielewczyk, E., Liberek, A., Paw, E., Chabowska, I., Sirvent, A., Delarue, A. A high-emollient liquid cleanser for very dry and atopic-prone skin: Results of an in-use tolerance and efficacy study conducted under dermatological, pediatric, and ophthalmological supervision. *Journal of Cosmetic Dermatology* 2020, 19, 5, 1155-1160.
142. Lee, C. S., Safdar, N. A. B. M., & Jamil, A. (2018). The effect and tolerability of a low pH skin cleanser in children with atopic dermatitis. *Malays J Dermatol*, 41, 21-27.

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI [D1]

Poznań, 30.12.2024

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

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Use of Waste from the Food Industry and Applications of the Fermentation Process to Create Sustainable Cosmetic Products: A Review**, *Sustainability* 2024, 16, 2757; doi.org/10.3390/su16072757 (IF = 3.3, punkty MNiSW = 100).

mój własny udział obejmował:

- współudział w opracowaniu koncepcji badawczej
- współudział w przygotowaniu metodologii
- współudział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników
- współudział w wizualizacji
- współudział w przygotowaniu manuskryptu i edycji
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje

Monika Krzyżostan

Mgr Monika Krzyżostan

Izabela Nowak
Zakład Chemii Stosowanej
prof. dr hab. Izabela Nowak

Poznań, 30.12.2024

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

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Use of Waste from the Food Industry and Applications of the Fermentation Process to Create Sustainable Cosmetic Products: A Review**, *Sustainability* 2024, 16, 2757; doi.org/10.3390/su16072757 (IF = 3.3, punkty MNiSW = 100).

mój własny udział obejmował:

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

Dr Agata Wawrzyńczak

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

Poznań, 30.12.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Use of Waste from the Food Industry and Applications of the Fermentation Process to Create Sustainable Cosmetic Products: A Review**, *Sustainability* 2024, 16, 2757; doi.org/10.3390/su16072757 (IF=3.3, punkty MNiSW=100)

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pracy doktorskiej mgr Moniki Krzyżostan, a mój własny udział obejmował:

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


.....
Prof. dr hab. Izabela Nowak

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI [D2]

Poznań, 30.12.2024

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

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Monika Krzyżostan, Izabela Nowak, **Saponiny triterpenowe pochodzące z *Centella asiatica* L.**, Przemysł Chemiczny 2024, 103, 4, 499-503; <https://doi.org/10.15199/62.2024.4.3> (IF=0.464, punkty MNiSW=70).

mój własny udział obejmował:

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

Monika Krzyżostan

Mgr Monika Krzyżostan

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, 30.12.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

Monika Krzyżostan, Izabela Nowak, **Saponiny triterpenowe pochodzące z *Centella asiatica* L.**, Przemysł Chemiczny 2024, 103/4; DOI: 10.15199/62.2024.4.3 (IF = 0.464 , punkty MNiSW = 70)

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pracy doktorskiej mgr Moniki Krzyżostan, a mój własny udział obejmował:

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


.....
Prof. dr hab. Izabela Nowak

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI [D3]

Poznań, 30.12.2024

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

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Controlled release of madecassoside and asiaticoside of Centella asiatica L. origin from sustainable cold-processed topical formulations**, *Molecules* **2024**, *29*, *23*, 5583; <https://doi.org/10.3390/molecules29235583> (IF = 4.2, punkty MNiSW = 140).

mój własny udział obejmował:

- współudział w opracowaniu koncepcji badawczej
- współudział w przygotowaniu metodologii
- współudział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników
- współudział w wizualizacji
- współudział w przygotowaniu manuskryptu i edycji
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje

Monika Krzyżostan

Mgr Monika Krzyżostan

Kierownik
Zakładu Chemii Stosowanej
Izabela Nowak
prof. dr hab. Izabela Nowak

Poznań, 30.12.2024

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

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Controlled release of madecassoside and asiaticoside of Centella asiatica L. origin from sustainable cold-processed topical formulations**, *Molecules* 2024, 29, 23, 5583; <https://doi.org/10.3390/molecules29235583> (IF = 4.2, punkty MNiSW = 140).

mój własny udział obejmował:

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


Dr Agata Wawrzyńczak

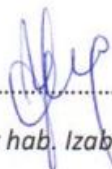
OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Controlled release of madecassoside and asiaticoside of Centella asiatica L. origin from sustainable cold-processed topical formulations**, Molecules 2024, 29, 23, 5583;
<https://doi.org/10.3390/molecules29235583>, (IF=4.2, punkty MNiSW=140)

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pracy doktorskiej mgr Moniki Krzyżostan, 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

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI [D4]

Poznań, 30.12.2024

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

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Wpływ kosmetyków zawierających ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej na wybrane parametry bariery naskórkowej u chorych na atopowe zapalenie skóry**, *Chemik* 2024, 3, 73, 185-189. DOI: 10.15199/4.2024.3.5 (punkty MNiSW = 20).

mój własny udział obejmował:

- współudział w opracowaniu koncepcji badawczej
- współudział w przygotowaniu metodologii
- współudział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników
- współudział w wizualizacji
- współudział w przygotowaniu manuskryptu i edycji
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje

.....Monika Krzyżostan

Mgr Monika Krzyżostan

Kierownik
Zakładu Chemii Stosowanej
prof. dr hab. Izabela Nowak

Poznań, 30.12.2024

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

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Wpływ kosmetyków zawierających ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej na wybrane parametry bariery naskórkowej u chorych na atopowe zapalenie skóry**, *Chemicz* 2024, 3, 73, 185-189. <https://doi.org/10.15199/4.2024.3.5> (punkty MNiSW = 20).

mój własny udział obejmował:

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

Dr Agata Wawrzyńczak

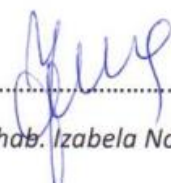
OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Wpływ kosmetyków zawierających ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej na wybrane parametry bariery naskórkowej u chorych na atopowe zapalenie skóry**, Chemik 2024, 3, 73, 2-6. <https://doi.org/10.15199/4.2024.3.5> punkty MNiSW=20).

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pracy doktorskiej mgr Moniki Krzyżostan, 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

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI [D5]

Poznań, 30.12.2024

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

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with Centella asiatica L. bioferment and extract**, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology - wysłane do wydawnictwa (IF = 8.5, punkty MNiSW = 140)

mój własny udział obejmował:

- współudział w opracowaniu koncepcji badawczej
- współudział w przygotowaniu metodologii
- współudział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników
- współudział w wizualizacji
- współudział w przygotowaniu manuskryptu i edycji
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje

Monika Krzyżostan

Mgr Monika Krzyżostan

Kierownik
Zakładu Chemii Stosowanej
Izabela Nowak
prof. dr hab. Izabela Nowak

Poznań, 30.12.2024

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

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with Centella asiatica L. bioferment and extract**, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology - wysłane do wydawnictwa (IF = 8.5, punkty MNiSW = 140)

mój własny udział obejmował:

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

Dr Agata Wawrzyńczak

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

Poznań, 30.12.2024

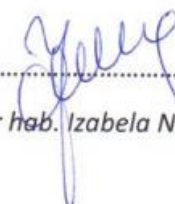
OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

Monika Krzyżostan, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak, **Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with Centella asiatica L. bioferment and extract**, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 2025 (IF=8,5 punkty MNiSW = 140)

-wysłane do wydawnictwa. Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pracy doktorskiej mgr Moniki Krzyżostan, 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

PRZEDRUK PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

- D1** Use of Waste from the Food Industry and Applications of the Fermentation Process to Create Sustainable Cosmetic Products: A Review
- D2** Saponiny triterpenowe pochodzące z *Centella asiatica* L.
- D3** Controlled release of madecassoside and asiaticoside of *Centella asiatica* L. origin from sustainable cold-processed topical formulations
- D4** Wpływ kosmetyków zawierających ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej na wybrane parametry bariery naskórkowej u chorych na atopowe zapalenie skóry
- D5** Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract

Review

Use of Waste from the Food Industry and Applications of the Fermentation Process to Create Sustainable Cosmetic Products: A Review

Monika Krzyżostan ^{1,2}, Agata Wawrzyniczak ^{1,*}  and Izabela Nowak ¹ 

¹ Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland; monika.krzyzostan@amu.edu.pl (M.K.); nowakiza@amu.edu.pl (I.N.)

² Dr Koziej Instytut Badań Kosmetyków, Czerniakowska 58, 00-717 Warsaw, Poland

* Correspondence: agata.wawrzyniczak@amu.edu.pl



Citation: Krzyżostan, M.; Wawrzyniczak, A.; Nowak, I. Use of Waste from the Food Industry and Applications of the Fermentation Process to Create Sustainable Cosmetic Products: A Review. *Sustainability* **2024**, *16*, 2757. <https://doi.org/10.3390/su16072757>

Academic Editors: Ibukun Oluwoye, Xihong Zhang and Anita Parbhakar-Fox

Received: 1 February 2024

Revised: 18 March 2024

Accepted: 21 March 2024

Published: 27 March 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/>).

Abstract: In recent years, the sustainability of cosmetic products has received growing interest from the cosmetic industry and consumers due to the recommendation of the implementation of the circular economy and the European Green Deal. The sustainable development strategy takes into account the reduction of waste and energy consumption, and covers all processes of producing and using cosmetics, starting from the method of obtaining raw materials, through to the process of producing cosmetics bulk, to the selection of packaging. Particularly, the selection of raw materials has a large impact on sustainability of cosmetic emulsion. One way of resource recovery is the use of agro-food by-products and discarded waste to produce cosmetic raw materials, because most of them possess value-added bioactive compounds, such as enzymes and nutrients with high functionality. Their recovery may be performed by more sustainable extraction processes, leading to natural oils, extracts, polymers, phytosterols, vitamins, minerals, and unsaturated fatty acids. A relatively new and innovative form of designing sustainable and bioavailable cosmetic raw materials is fermentation, where bioferments are obtained from plant-based and food waste raw materials. In addition, optimization of the emulsification process by applying low-energy methods is a crucial step in obtaining sustainable cosmetics. This allows not only a reduction in the carbon footprint, but also the preservation of the valuable properties of the used raw materials. The following paper discusses methods of creating sustainable cosmetic emulsions with energy-saving procedures and by using raw materials from food waste and the fermentation process.

Keywords: cosmetic industry; sustainable raw materials; resource recovery; food waste; fermentation; circular economy; carbon footprint

1. Introduction

The term of sustainability has many interpretations, but the widely accepted definition comes from the report created in 1987, entitled ‘Our Common Future’. According to this definition, sustainability arises from the concept of sustainable development, which is defined as the development that can meet the current needs of the population without compromising the needs of future generations [1]. Sustainability has three pillars/dimensions: environmental, social, and economic [1,2]. Living within our environmental limits is one of the central principles of sustainable development and requires that natural capital remain intact. It assumes that the source and sink function of the environment should not be degraded [2]. The social area includes all kinds of activities for local communities, charity activities, ethical labour, as well as equal and dignified treatment of employees regardless of country of origin. This area takes into account the individual needs, such as access to employment and safe working conditions, health and wellness benefits, nutrition, education, training, and cultural expression. There is also the idea of fair trade aimed at supporting the development of small local producers, especially from African, Asian and Latin American

countries. Economic development involves, for example, the creation of new jobs at the local level and business partnership. Cooperation with customers, employees, producers and suppliers play an important role in economic dimension. Economically sustainable practices lead to long-term benefits and economic development [1,2].

Sustainability has now become the priority for many businesses. The cosmetic industry is a growing economic sector, that will reach a global market value of 378 billion dollars in 2022 [3]. Due to its highly innovative, science-driven, and dynamic development, the cosmetic industry generates high levels of consumption in natural resources, such as water and energy, and is often criticized for its selection and use of raw materials, environmental impact and safety issues of final products [2,4]. However, the consumers are more and more aware of health and environmental threats and they demand products that do not harm their skin and planet [5]. Due to this fact, cosmetic sector requires a long-term vision and developing agenda of activities in order to manage sustainability issues. Nowadays the development of the company depends strongly on good practice of sustainability. For environmental performance, the crucial aspect is how companies process raw materials and plan technological procedures and logistics, and how they cooperate with customers, employees, producers, suppliers, or competitors. In the cosmetics industry, the idea of sustainable development focuses mainly on environmentally friendly activities and reducing the carbon footprint, slightly neglecting the economic and social dimensions. It covers the use of sustainable raw materials and renewable energy sources, the consumption of less water and energy in production processes, the planning of logistics in such a way as to reduce gas emissions, and the protection of ecosystems and biodiversity [1–6].

Each company should have evidence of the integration of sustainable initiatives in its business, products, and processes. The basis for systemic and integrated sustainability implementation is to provide a proper method of evaluating and reporting. It is necessary to facilitate decision making and to evaluate by cosmetic professionals the impact of existing strategies, products, and technologies. There are three ways to assess and report sustainability actions performed by companies: Corporate Social Responsibility (CSR), Design for Sustainability (DfS), and depth analysis of the Cosmetic Product Life Cycle [4,6,7]. Those methods have been developed by independent research teams and are helpful in the case of the cosmetics industry, when sustainability regulation and guidelines are not harmonized [7]. The principles of CSR and DfS consider environmental, economic, and social aspects of sustainability. The idea of CSR is that companies are responsible for societies in which they operate, and beyond making profits they must behave ethically and follow the law. There are five dimensions of CSR, namely environmental, economic, social, stakeholder, and voluntary [4]. The environmental dimension is related to the environmental management which leads to cleaner environment, while the economic dimension focuses on economic development preserving profitability at the local level. The social dimension pays attention to a social concern in business operations, whereas the stakeholder dimension involves interaction with employees, suppliers, customers, and communities. On the other hand, voluntary dimension is based on the ethical values which are beyond regulatory requirements [4,7,8]. The idea of DfS is a holistic approach which integrates and evaluates the sustainability at different stages of the product development, such as process incorporation, the life cycle perspective, and the assessment of long-term global impact based on the environmental, social, and economic dimensions. DfS considers also fundamental questions about efficiency of production and consumption by improving the usage efficiency of the product [7]. The Cosmetic Product Life Cycle model was proposed by Bom et al. and considers the life cycle phases with a sustainable approach, namely design and Life Cycle Thinking (LCT), sourcing, manufacturing, packaging, distribution, consumer use, and post-consumer use [4,7]. Taking into account these classifications, an analysis of the single life cycle stage of the cosmetic product should be carried out. This strategy is widely adopted in the cosmetics industry, and allows us to develop a cosmetic product with an improved environmental profile. Companies use different approaches to assess the impact of a cosmetic product on the environment, such as assessment of the

product life cycle and its carbon and water-footprint [4,8]. Bom et al. created a spreadsheet for companies to help them evaluate their environmental performance for any cosmetic product [9].

It is well-recognized that the cosmetics industry needs functional and sustainable ingredients from renewable sources [7,10]. Consumers are looking for products made of renewable and bio-based ingredients which are commonly considered to be non-toxic and biodegradable. Meanwhile, the food industry produces a large amount of food waste, which ends up in landfills, participating in the global emission of carbon and anthropogenic methane and contributing to the development of global warming [5,11]. However, this waste has a large potential to be used in the cosmetic industry as a raw material rich in antioxidants, polyphenols, proteins, minerals, vitamins, carotenoids, lignans, polysaccharides, natural-derived polymers, and other substances (Figure 1). Eliminating waste from the food industry and turning it into valuable products became a necessity to save natural resources and avoid methane and carbon dioxide emissions, thus helping to boost a circular economy [12].

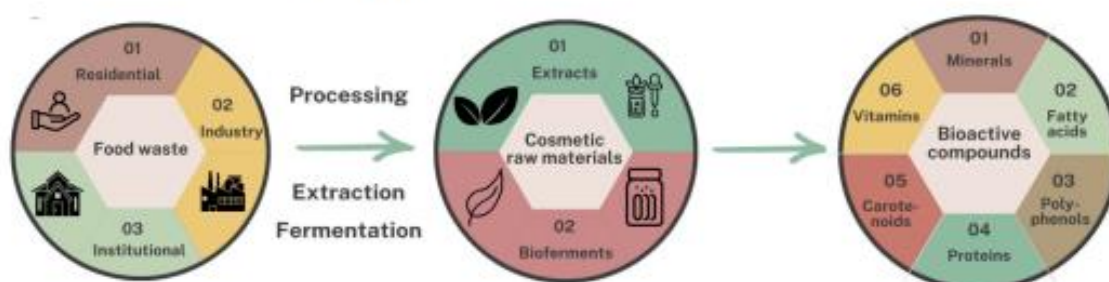


Figure 1. Schematic representation of the possible cycle of using food waste in obtaining cosmetic raw materials.

In this paper special attention has been paid to the following aspects of sustainability in the cosmetic industry: (I) using of bio-based raw materials obtained from fermentation or the waste from food industry, and (II) processing by low-energy methods. Therefore, the possibilities of using waste from the food industry and biotechnological methods of fermentation, which are compatible with Green Chemistry guidelines, for the production of cosmetic raw materials have been studied on the basis of the literature review. Methods suitable to diminish the environmental impact of the cosmetic industry by reduction in the energy consumption levels have also been considered, especially in the context of using upcycled raw-materials.

Our study not only presents the potential of using raw materials derived from upcycling food waste, but also indicates the possibility of obtaining specific groups of chemicals with already proven skin-care potential from food-waste of plant and animal origin. In addition, unlike many review papers on the food waste processing published up to date, our work does not focus exclusively on ingredients obtained by extraction process, but also takes into account biotechnological methods of processing food waste leading to bioferments, which popularity in the cosmetics industry has been steadily increasing for several years (Figure 2).

The following comprehensive literature review can be beneficial for cosmetic industry specialist who want to focus on more sustainable products to remain competitive for customers who value nature-based solutions and materials. Moreover, a tabular listing of cosmetic properties of bioactive compounds from by-products and wastes in fruit, vegetable processing, as well as fermented raw materials from plants, dairy, and the marine industry, will make it easier to reach the relevant source material.

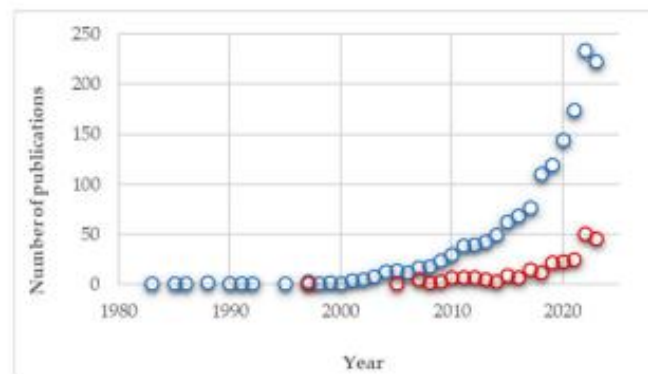


Figure 2. Scopus search results from the title, abstract or keywords with “cosmetic” AND “fermentation” (blue) compared with “cosmetic” AND “fermentation” AND “waste” (red).

2. Methods

Bibliographic positions related to the topic of the following review paper were obtained from Scopus and Google Scholar databases. The retrieval period was limited to years 2020–2024 and language to English. The search strategy included the following phrases and Boolean strings: “cosmetics” OR “cosmetic products” AND “food waste” OR “food loss” AND “sustainability” NOT “packaging” NOT “food application”; “cosmetics” AND “food waste” AND “fermentation” AND “bioactive”; “cosmetics” AND “green deal” AND “circular economy” AND “raw materials”.

After preliminary search, the obtained literature positions were screened manually on the basis of their title, abstracts, and keywords. Articles should include information on the possibility of obtaining chemicals by the valorisation of waste and by-products from the agro and food industry and examples of their use in cosmetic products. Issues concerning the use of the fermentation process of food-waste-derived materials in order to obtain raw materials with skin care effects should also be included. Both papers involving *in vitro* and application tests for sustainable raw materials and cosmetic formulations were considered. Moreover, the literature search also included issues related to circular economy and the European Green Deal, which emerged in the context of sustainable cosmetic life cycle model and converting food and agricultural waste into high-value chemicals with potential for use in cosmetic products. In addition, the collected literature data was also expanded with references in citing papers. Rejected, in turn, were publications in which the products of agro and food waste processing were used to obtain packaging and other resources for the food industry. Finally, 169 related articles were selected as a basis for our review paper.

3. Results and Discussion

3.1. European Green Deal

The European Green Deal is a compendium announced by the European Commission in December 2019, which assumes that the economy of the European Union will become zero-emission by the year 2050 and the economic growth will be decoupled from the consumed resources [13]. The aim of this strategy is to eliminate or reduce the negative impact of human activity on the environment in the long-term perspective, making it climate-neutral, and indicating directions of economic development without increasing the consumption of natural resources [14–17]. To achieve this goals, the Green Deal involves assurance of resource efficiency in a circular economy, protection and restoring of ecosystems, preserving biodiversity by limited use of pesticides, antibiotics, and excessive fertilization in agriculture. Furthermore, the Green Deal includes a sustainable diet and consumption (‘From Farm to Fork’), as well as a decrease in environmental pollution by reducing greenhouse gas emissions by at least 55% (when compared to 1990) by 2030 [17].

The main pillars of the Green Deal, which apply to the cosmetics industry, are circular economy and zero pollutions [18]. In order to meet these assumptions, several changes in the cosmetic industry will be necessary. The implementation of the European Green Deal strategy will be possible with the participation of all stakeholders from different sectors and it will require their solidarity and dialogue, as well as application of innovations, new technological solutions, and digital technologies [14].

Stakeholder engagement requires building awareness of ecosystem protection, and is necessary to promote changes in corporation culture, practice sustainability principles, and satisfy economic, social, and environmental expectations. An open and respectful dialogue, a continuous commitment to joint problem solving, as well as comprehensive information sharing, are helpful in achieving this goal. Creating sustainable development in the cosmetics industry begins with the activities of raw material producers. They can successfully implement Green Deal norms by designing processes for obtaining environmentally friendly raw materials, involving for example chemicals and procedures consistent with the Green Chemistry approach by applying biotechnological processes including microorganisms, or by using simple physical processes such as pressing, grinding, and extraction [19].

Cosmetic technologists also have great opportunities to influence sustainable development. The process of creating cosmetic formula gives technologists the possibility of selecting raw materials, with a special emphasis on the method of their obtaining, their sources, and the degree of biodegradability and toxicity to aquatic organisms. Also, suppliers' engagement can promote the transition toward the sustainability by distributing raw materials from renewable resources in supply chains established in accordance with a circular economy [20]. Consumers, whose ecological and health awareness has increased significantly during recent years, also play an important role in the implementation of the Green Deal goals. When making purchasing choices, consumers should also think about future generations; hence they more often choose ecological products containing sustainable ingredients and recyclable or biologically degradable packaging instead of plastic ones. Moreover, consumers have a decisive influence on the final fate of cosmetics packaging, as it is up to them whether it is properly segregated and recycled. Consumers' behaviour can lead to significant cost savings achieved by recycling and material reuse processes [21]. Significant responsibility also lies on the shoulders of government and university units, because they play an active role in promoting culture of sustainability by practicing environmentally and socially responsible behaviours such as financing and performing student education, and studying and publishing scientific papers on the circular economy [22].

Finally, implementation of the Green Deal requires revision and reformulation of the legal framework for action related to all identified areas, as well as quite significant financial commitment. Some larger beauty companies have committed to sustainability efforts, covering areas such as reducing gas emissions, providing sustainable product sourcing, reducing plastics usage, and inspiring consumers to consume in a more sustainable manner. Activities of Cosmetics Europe member companies, such as L'Oreal, Beiersdorf, Colgate-Palmolive, The Estée Lauder Companies, Henkel, Natura & Co., P&G Beauty, and Unilever involve setting a number of ambitious goals for sustainable development. Beiersdorf's goals are reduction energy-related greenhouse gas emissions by 30% in absolute terms and to cut supply chain emissions by 10% by year 2025. Moreover, Consumer Business Segment production sites are to become climate-neutral by 2030. These goals are to be achieved by switching from fossil fuels to renewable energy sources, and researching innovative ways of capturing greenhouse gases from the atmosphere to use them in the future product development [23]. The Estée Lauder Companies, on the other hand, focus on sustainable development in product formulas using the principles of Green Chemistry. The company concentrates on training chemists on green principles and practices, developing internal processes, goals, and tasks leading to the use of green chemistry at work [24]. An interesting way to promote sustainable development is to educate consumers about the impact of cosmetic products on the environment. This strategy has been implemented by L'Oreal, which has carefully assessed the product's impact on the environment and has

taken actions to reduce it. The company has developed a Product Impact Labelling system to offer consumers information about the environmental and social impact of the cosmetic they purchase. This labelling system was introduced at first in 2020 for L’Oreal products available in France, and then in 2021 in Germany for Garnier hair-care products [25].

Industry needs harmonised requirements, which will be applicable across the board, and their proper enforcement. The European Parliament and the Council are working on regulations which will establish a framework for setting eco-design requirements for sustainable products and repealing Directive 2009/125/EC. The primary objective of this document is to introduce principles that will lead to more sustainable products. On 30 March 2022, the European Commission adopted a proposal for a Regulation of the European Parliament and the Council, number 16723/23, which establishes a framework for setting eco-design requirements for sustainable products [26]. The regulation is a set of general requirements covering almost all product categories, and most likely it will become effective in the second quarter of 2024. On the other hand, detailed sectoral law will be introduced through separate legal acts. The priority products for which sectoral acts will be developed at first are detergents and chemicals. The regulation is intended to be in line with the assumptions of green transformation and extend the life cycles of products in accordance with the principles of the circular economy [14,17].

Nevertheless, according to the literature review by Pérez-Rivero et al. there are already examples of collaboration between the food industry and cosmetic manufactures which promote the circular economy and reducing agri-food waste [27]. NoPalm Ingredients in the Netherlands valorises agricultural wastes and other by-product streams as a nutrient source for oil-producing yeast. Recently, this company has signed a collaboration agreement with Colgate-Palmolive under which it will intensify their pilot studies and scaling-up efforts. On the other hand, Clean Food Group has lately signed an agreement with Doehler group to accelerate commercialization of their process based on fermentation of ready-to-waste food stocks with a non-GM yeast to produce palm oil substitutes for food and cosmetics applications. Similarly, Genomatica and Unilever plan to join their forces to scale plant-based alternatives based on biotechnology in order to obtain value-added chemicals with potential application in the beauty and personal care products [27]. Furthermore, the Korean company LABIO ferments vegetable oils with *Pseudozymas* spp. In order to obtain emollients with enhanced properties, namely with beneficial influence on the cheek resident skin microbiota. The results show improved microbiome composition and enhanced alpha-diversity, which is the factor determining a healthier microbial ecosystem [28].

3.2. Sustainable Cosmetic Products

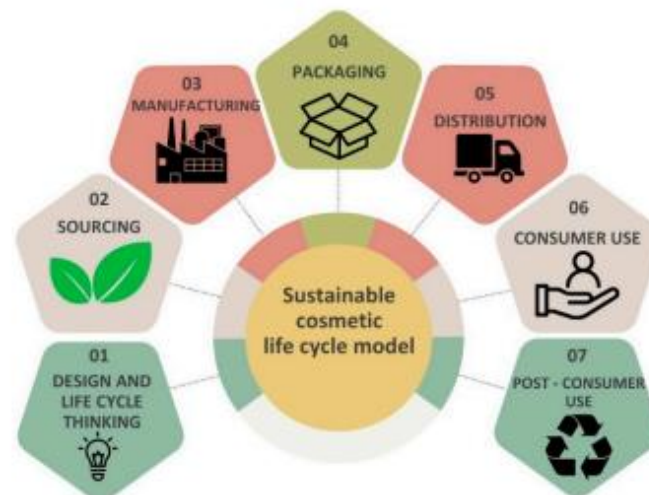
Sustainable cosmetic products are a response to the introduction of the European Green Deal. While sustainable development is a commonly known term in the literature, the concept of sustainable cosmetics has no definition and legal regulations.

The legal gap is currently filled by the ISO 16128 standard [29,30] which provides some guidelines on definition and criteria for natural and organic cosmetic ingredients and products [31]. It is divided into two parts: Part 1 covers definitions for ingredients (published February 2016), whereas Part 2 defines rules for calculation of the natural and organic content in ingredients and products (published August 2017). The list of processes and solvents included in the ISO standard is only informative; there is no restrictive approach in this matter. Similarly, the process of certification and certification body have not been specified. Unfortunately, ISO 16128 is not applicable when it comes to product communication, such as claims and labelling, human and environmental safety, and socio-economic considerations, e.g., fair trade, characteristic of packaging materials, and regulatory requirements applicable for cosmetics. Another option to confirm the naturalness of a cosmetic is certification by well-known certification bodies like Ecocert, Ecocert Greenlife, Cosmebio, BDIH, ICEA, and the Soil Association, which verify products according to the uniform COSMOS (Cosmetic Organic Standard) standards [32]. The differences between ISO 16128 and COSMOS standards are presented in Table 1.

Table 1. The differences between ISO 16128 and COSMOS standards.

ISO 16128 Standard	COSMOS Standard
The guide does not contain precise requirements and criteria.	The guide contain precise requirements and criteria.
Risk of different interpretations of the guidelines.	A clear interpretation of the standard.
It only applies to raw materials and cosmetic formulas.	A comprehensive approach to: raw materials, recipes, packaging, marketing claims, production and storage of cosmetics, as well as environmental aspects.
Lack of external control.	Audit once a year.
There are no definitions of natural and organic cosmetics, there are only definitions of natural and organic raw materials.	A clear definition of naturality for both finished products and raw materials.
It contains only recommendations regarding the use of natural solvents and the principles of Green Chemistry.	It contains requirements regarding the use of natural solvents and the principles of Green Chemistry.
It does not regulate the issue of preservatives permitted in natural cosmetics, allowing the use of all preservatives in accordance with the legislation, including: parabens and phenoxyethanol.	It precisely defines the preservatives allowed in natural and organic cosmetics.
No requirements for fragrance substances, which makes possible using, for example, synthetic fragrance compositions.	Strictly defined requirements for fragrances.

Nevertheless, the Green Deal most broadly brings all the aspects of sustainable cosmetics at every stage of its creation, and thus, created sustainable cosmetics may act as stimulators of sustainable development in the cosmetics industry. According to the literature, there are no raw materials, packaging materials, or practices that can be considered 100% sustainable [9]. However, it is possible to significantly reduce the impact of the cosmetic product on the environment by integrating three major domains: social, economic, and environmental. The term ‘sustainable cosmetic product’ can be explained through a holistic approach applied to the entire process of the production and use of cosmetics. It should be also referred to the Cosmetic Product Life Cycle model proposed by Bom et al., which includes design and Life Cycle Thinking (LCT), sourcing, manufacturing, packaging, distribution, consumer use, and post-consumer use (Figure 3) [1,7,9].

**Figure 3.** Sustainable cosmetic life cycle model.

3.2.1. Design and Life Cycle Thinking (LCT)

The phase of the design of cosmetics products significantly affects the environment, and decisions made at this point will affect the remaining phases of the product life cycle [4,7,9]. LCT's goal is to improve sustainability dimensions of cosmetic products in a prominent and holistic manner. It covers the planning of how to improve individual phases of the product life cycle in order to minimize the negative impact on the environment at all stages [15,16,33]. Designing sustainable cosmetics includes embarking on a proper transformation of the cosmetic business. This should lead to more mindful corporates, not only in environmental issues, such as climate change, resource and energy savings, reduction of waste and carbon footprint, and responsible production and consumption, but also in social and economic dimensions, such as fair trade and ethical sourcing [9]. Research shows that international cosmetic companies pursue initiatives to improve sustainability dimensions holistically, taking into account the entire product life cycle, while small or medium local companies focus on the use of natural, green, or organic ingredients as main part of their sustainable products. The reason for this situation is the lack of resources and a holistic understanding of the impact of the life cycle [9,33–36]. Life cycle assessment is also a valuable environmental management tool to assess waste management in the food industry [37]. One of the solutions to reuse by-products discarded by several agro-industries is their use as a source of sustainable cosmetic raw materials [38].

3.2.2. Sourcing of Raw Materials

The selection of raw materials is the most complex and important process for assessing the impact of a cosmetic on the environment. It refers to all the procedures necessary to extract raw materials, process them, and deliver them to the cosmetic manufacturer [7]. Considering the fact that raw materials are extracted or synthesized in many different parts of the world, and are delivered to the cosmetic manufacturer not only by the producer but also through several distributors, the evaluation of sustainability in this phase of the product life cycle is very complicated [7,9].

Due to the need to consider multiple parameters, the decision-making process in the selection of the cosmetic raw material and its supplier may be extremely complex. Developing and implementing appropriate hybrid multi-criteria decision-making (MCDM) approach could be helpful in this matter, what has been already proven in other branches of industry [39].

There are several key aspects that should be considered when selecting sustainable raw materials. First is the origin of the raw material, which can be synthetic as well as of plant or animal origin, but also may come from upcycling and renewable source. In the case of obtaining plant-based raw materials, e.g., for extracts production, the way in which the plant was cultivated and propagated (agriculture/wild origin) should also be taken into account. Plant growth should take place in the laboratory conditions, preferably in bioreactors, which will help preserve biodiversity and water resources. It is worth keeping in mind that the ingredients referred to as natural, naturally derived, organic, and green, which are quite often associated with sustainable cosmetic products, may result in a less preferable environmental profile of the cosmetic if assessed from a life cycle perspective [7,9]. The lack of a single definition of natural ingredient causes that several groups of producers came out with their own guidelines regarding raw materials and their extraction procedures. Therefore, each of such ingredients should be examined by a holistic view concerning ethical, social, and economic responsibility. Nevertheless, bio-based composition of the ingredients may bring positive contributions to the environment [40].

Another aspect in selecting sustainable cosmetic raw materials is deciding on the raw material processing method. Raw materials used to produce cosmetics may be obtained as a result of various physical processes and chemical reactions. Sustainable methods of obtaining raw materials are those that leave a low carbon footprint in the environment, and include biotechnological processes involving microorganisms, and physical processes such as grinding, pressing, extraction, and chemical reactions consistent with Green Chemistry

guidelines. In addition, an important role in the sustainability of raw materials plays their biodegradability and toxicity to aquatic organisms [6,7,9]. Moreover, from a social point of view, fair trade of raw materials is a very important aspect [7]. In the stage of selecting raw materials, the formulator should be able to assess the impact of all choices on sustainability for any type of cosmetic product [9]. The proposed criteria for evaluating the sustainability of raw materials are presented in Table 2.

Table 2. Criteria for evaluating the sustainability of raw materials.

Criteria	Rating
Origin of the raw material	Natural (from agriculture or wild origin) Produced by microorganisms Upcycled
Method of processing the raw material	Physical processes (grinding, pressing, extraction) Chemical reaction according to the Green Chemistry approach Biotechnological processes
Biodegradability of raw material	Readily biodegradable according to OECD 301 A, B, C, D, E, F regulations: if 60% (or 70% for some tests) of the organic carbon in the material is converted to CO ₂ within a 10-day window, and 100% within 28 days.
Toxicity to aquatic organisms	Non-toxic
Fair trade	The raw material comes from fair trade

3.2.3. Manufacturing

There are many aspects in the cosmetics production that can be improved in order to reduce the environmental impact. One of the main issues is the reduction in post-manufacturing wastes and the increase in their biodegradability [38]. Conventional disposal of cosmetic industry waste consists of incineration and reprocessing through coagulation/flocculation or pressure flotation, which all involve environmental, energetic, and economic costs [38]. Therefore, an introduction of innovative and sustainable technologies of waste processing is necessary. One of them is anaerobic digestion for waste-to-energy production, where pre-treatments are aimed at increasing biogas yields [38,41]. An example of a company that processes waste generated during the production of emulsifiers by means of the methanation process, and which involves the decomposition of organic matter under the influence of microorganisms in anaerobic conditions, is the Seppic company. The result of the waste methanation process is biogas used to generate energy, as well as bioferment, used as fertilizer. This is a good example of optimal use of both the production process and waste post-production for the good of the environment. Thanks to the methanation process of the waste, the company reduces greenhouse gas emissions by 100 T per year when compared to the combustion process [42].

Waste materials derived from cosmetics production are generally characterized by a high content of suspended solids, fats, oils, and detergents, which are non-readily biodegradable compounds, and require physicochemical pre-treatment, e.g., thermosonication to increase available organic matter [38,41].

Another aspect of the manufacturing process is greenhouse gas emissions and energy consumption. The latter needs to be reduced by using renewable sources of energy, such as solar (photovoltaic) or wind power plants [1,41]. Furthermore, industry accounts in total for about 20% of all water withdrawals. Water is also a key element in the cosmetic industry [43,44]. It is one of the main ingredients in the cosmetic formulations, and is present at all stages of the cosmetic product life cycle. Water is necessary in the manufacturing process for the heating and cooling of cosmetic bulk, the cleaning of equipment, as well as the production of raw and packaging materials. It leads to high consumption levels of this natural resource; therefore, a commitment to reduce the water footprint is absolutely necessary. The recommended actions to reduce water consumption in the cosmetic industry

are: developing waterless or concentrated cosmetics, adopting circular water management in factories, using sustainable raw materials, optimizing manufacturing processes by reducing heating and cooling processes, changing cleaning procedures, looking for alternative water sources in cosmetic formulations by using fruit or vegetable water, and collecting and reusing wastewater. Moreover, the use of biodegradable, recyclable and reusable packaging and the introduction of changes in the distribution of products, for example, by reducing the frequency of delivery and miles of transportation, also allows for reducing water consumption [43,44]. The appropriate handling of wastewater from the cosmetic industry, namely using purification methods, such as coagulation, advanced oxidation, or biological treatment, allows reducing the toxicity of wastewater [45].

3.2.4. Packaging

Despite the existence of waste management systems, plastic packaging is the most often used option in the industry due to its flexibility and light weight [46,47]. It causes the pollution of land and marine ecosystems and has a negative influence on human health [46,48]. Due to the fact that the market for recycled plastics is still weak and the cost of treatment and waste disposal is high, the recycling of plastic packaging is still a challenge. According to the European Strategy for plastics in a circular economy introduced by the European Commission, all plastic packaging must be 100% recyclable (or reusable) and 55% should be recycled by 2030 [49]. To make packaging more sustainable, it should have an increased recycling rate, based on the effective amount of plastic waste turned into secondary plastics [46–50]. Another solution in terms of alternative packaging is the use of bio-based materials derived from bamboo, seaweed, corn starch, mushroom fibres, and avocado nuts [51]. According to a survey conducted by Bom et al., the following packaging materials have an impact on sustainability (starting with the one with the greatest impact): non-renewable materials, plastic/polymeric materials, aluminium, wood, glass, recycled materials, and biopolymers or plant-based plastics [9].

3.2.5. Distribution

Transportation of ingredients, materials, packaging, or final products and related emission of CO₂ have a large influence on the environment. Due to the fact that fuel consumption accounts for at least 30% of transport operating costs, a change in the type of transport system from road to rail and from air to sea is highly recommended [6,9]. Using of electric or hybrid vehicles, choosing the best route of travel, minimizing the frequency of deliveries, and avoiding unnecessary wheel load, such as transporting glass packaging, can significantly reduce CO₂ emissions during cosmetic distribution [6,52,53].

3.2.6. Consumer and Post-Consumer Use

The influence of consumer use varies according to the product category because it depends mainly on the depletion of water resources and the energy consumption needed to heat the water and rinse off the cosmetic product. The highest water consumption was observed when using rinse or wash-off cosmetics, such as shampoos, conditioners, shower gels, and soaps. To minimize the environmental impact of this phase of the product life cycle, 2-in-1 products that do not require extensive rinsing should be introduced on the market [7,53]. Consumer education in terms of sustainable consumption, such as dosing the correct amount of the product and using less water to rinse off the cosmetics, is necessary because, according to the researchers, approximately 90% of the CO₂ emission generated during the life cycle of the product comes from consumer use [7,9].

The post-consumer use phase concerns the handling of packaging waste after the product has been used. Customers should be aware of the proper segregation of packaging waste, because the system that supports the collection and recycling at the end of the product's useful life is an essential element of packaging sustainability [9,33]. The following strategies may also be implemented: packaging reuse (e.g., refilling) and recycling, incineration with energy recovery, or composting [9]. Another issue is the impact of rinse-off

cosmetics, which are released to the aquatic environment after being used. In order to assess their toxicity to aquatic organisms, the most widely used parameters are: acute aquatic toxicity, chronic aquatic toxicity, bioaccumulation, and biodegradation [7].

3.3. Food Waste as Sustainable Raw Materials

When in 2015 the European Commission adopted the first Circular Economy Action Plan, food waste management was identified as a priority [54]. The depletion of non-renewable resources and the need for better management of post-production waste were identified as a criterion for sustainable production. Therefore, the search for green resources, such as waste from other industries and biomass, should be taken into account [37,54,55]. Cosmetic industry needs to find its way to reduce the use of virgin raw ingredient and maintain socio-economic profile [56,57]. The mainstreaming of the idea of upcycling in food systems has a large potential to improve circularity in the food system and offers new opportunities to create sustainable raw materials for the cosmetics industry [58–61]. A large number of food industry wastes is recovered as value-added products by more sustainable and innovative extraction processes, with a potential of being incorporated into cosmetic products [62]. Extracts from food waste, especially those from organic farming, are effective and bio-sustainable as they do not contain residual pesticides or potentially toxic chemicals, and therefore represent a valid alternative to regular plant-derived extracts [55].

3.3.1. Upcycling

Many imperfect vegetables and fruits are rejected from sale due to the use of aesthetics to classify and accept fresh food for sale and consumption. It is estimated that more than a third of total farm production is lost due to aesthetic standards in Europe and the UK, which corresponds to approximately 1.3 billion tonnes per year [52,53,63]. Food waste accounts for 8–10% of total anthropogenic greenhouse gas emissions, demonstrating that agriculture puts a strain on planetary ecosystems [58]. The residues from the agro and food industry include seeds, kernels, fruits and vegetables skin, shells, peelings, bran, plant leaves, fruit pulp, and residues remaining after extraction of juice, oil, starch, and sugar, which can all be rich in bioactive compounds such as vitamins, minerals, and phenolic compounds. Unfortunately, residues end up most often in landfills, significantly contributing to global pollution levels by producing significant amounts of methane, which consequently leads to greenhouse gas emissions [52,53,58,64,65].

The interest in proper waste management is increasing worldwide, as reuse of waste plays an important role to overcome environmental pollution. Many initiatives are needed to limit food waste across the value chain and in public-private partnerships [58]. The answer to food waste problems seems to be upcycling [60,66,67]. Upcycling is a method of reuse of industrial by-products with the aim of generating new raw materials with added values [52,58,64,68]. In response to the Green Deal and consumer demand for bio-based and natural cosmetic products, for several years there has been a growing interest to utilize agricultural waste as cosmetic raw materials [69]. As a result of upcycling, orange, lemon, banana, and mango peels, as well as grapes and olive oil pomaces, sugarcane bagasse, coffee grounds, wheat straw, and seeds and kernels of fruits, stemming from specific processes such as pulping, peeling, straining, and branching, are reused and processed into cosmetic raw materials [12,64].

The recycling and reuse of agro-waste using green technologies will reduce water consumption, greenhouse gas emissions, and worldwide total pollution [70,71]. As a result of biotechnological transformations of waste from the food industry, various products such as biofuels, biomass, biofertilizers, biosorbents, and value-added components can be produced via anaerobic digestion, fermentation, and composting technologies [64,65,72]. Valorisation of wastes and by-products can contribute to minimal waste generation or fulfil the popular 'zero waste' concept. Furthermore, this approach is in accordance with current circular economy assumptions in the context of using industrial waste as the starting material to extract compounds with high value added [57,59,73]. The upcycling of food

waste is a transformation that may lead to stable ecosystems and a circular economy by reducing environmental impact and climate change, as well as creating a more sustainable food system [71,74,75]. However, upcycling of waste also brings several challenges, e.g., the logistics of high amounts of waste is still a roadblock to scalability and stability of food waste ingredients, especially when they are processed out of place of their natural origin.

Too few companies dealing with waste upcycling mean that waste often has to be transported from another country, which is a very expensive approach. Waste from the food or dairy industry very often is microbiologically contaminated and requires appropriate separation of unwanted microorganisms, which is also a cost-generating process. Lack of quality protocols and standards for upcycling is another barrier which the upcycling industries have to deal with. Additionally, current standards for upcycling focus only on conventional materials and techniques, and the governments usually do not support small upcycling businesses. A potential solution that will help to address these barriers could be a financial support for upcycling businesses from the governments [76]. Also the maintenance of bioactive properties of upcycled raw materials in the cosmetics formula may be a challenge. However, this topic still requires further study [53,61,62].

3.3.2. Extraction Methods of Recovering Bioactive Compounds from Food Waste

It is extremely important to implement so-called “green procedures”, which include environmentally friendly chemical processes and synthetic methodologies that reduce or eliminate the use of hazardous and toxic chemicals at each stage of sustainable cosmetic raw materials production. Therefore, only those extraction procedures will be defined as “green” when they reduce energy consumption, ensure safety and high quality of the extract, and use solvents with low environmental impact [77]. Value-added components are selectively extracted from the food matrix through biochemical, chemical, or thermal/physical methods [69,72]. The main techniques in the bioactive compounds recovery for the cosmetics industry are the extraction methods, mainly based on solvent extraction, supercritical fluid extraction, subcritical water extraction, use of enzymes, and some non-conventional techniques, like pulsed electric field ultrasound and microwave assisted extractions [68,78].

In solvent extraction, a proper amount of raw material is exposed to different organic solvents, which dissolve active ingredients and also other flavouring and colouring agents, such as anthocyanins [68,78,79]. To remove solid residues, samples are usually centrifuged and filtered. The benefits of this type of extraction methods are the low processing cost and ease of operation. Unfortunately, they have also several drawbacks, such as necessity of applying elevated temperatures and long processing time, which can cause degradation of natural bioactive components. Moreover, an evaporation process is required to concentrate the extracts [68,78,79]. A green alternative to the organic solvents is to use deep eutectic solvents (DES), obtained via mixing natural and renewable materials, such as glycerol and salts of organic acids. DES can be used effectively for the extraction of bioactive compounds, namely polyphenols from food industry by-products [65]. A kind of solvent extraction is the Soxhlet extraction, which involves repeated washing of the matrix with a fresh solvent. The advantages of this extraction type are: higher solubilization of the analyte due to the use of hot solvent and the possibility to apply it to many food matrices [68,79].

Another method of solvent extraction, which is considered as the most environmentally friendly, is supercritical fluid extraction. The solvent used in this method is supercritical carbon dioxide (SC-CO₂), which is a non-explosive, non-toxic, and inexpensive alternative to the organic solvents [78]. SC-CO₂ has ability to solubilise lipophilic substances and it can be easily removed from the final extract. There is also a wide range of compounds which can be used as cosolvents in this technique, and SC-CO₂ can be modified with ethanol or methanol in order to obtain higher extraction yields in the case of some active ingredients. The supercritical fluid extraction process involves placing the raw material in an extraction container equipped with temperature and pressure controllers. Next, the extraction container is pressurized with the fluid by a pump [68,78,79]. Finally, fluid and dissolved compounds are transported to the separators and, after that, the fluid is

regenerated and recycled or released to the environment. The advantage of carbon dioxide is that it reaches the supercritical state at relatively low temperatures, just above 31 °C. This allows to obtain plant extracts without degrading them or losing their properties, which often happens at higher temperatures. Supercritical CO₂ extraction is currently the most effective method to extract nonpolar compounds such as oils [79].

The promising alternative technology for the extraction of phenolic compounds from different sources, especially plants and algae, is subcritical water extraction. Subcritical water refers to water at a temperature between 100 °C and 374 °C, and a pressure below the critical pressure of 22 MPa. This method is characterized by a shorter extraction time, lower solvent cost, higher quality of the extracts, and, most importantly, it does not generate wastes destructive to the environment [68,78].

Enzyme-assisted extraction is a method of extraction which is used to facilitate the release of bioactive compounds from plant cells present in the food waste. Enzymes such as cellulase, β -glucosidase, xylanase, β -glucanase, and pectinase help to degrade plant cell walls, which act as barriers to the release of intracellular substances, and which still contain polysaccharides such as cellulose, hemicellulose, and pectins. The solvent of this method is water, rather than often harmful organic chemicals [78].

Another method that increases extraction efficiency is ultrasound-assisted extraction (UAE). The release of bioactive compounds is facilitated due to the disruption of the cell walls caused by ultrasounds, which induce a greater diffusion of solvent into cellular materials [78,80]. The extraction technique that significantly reduces processing time is microwave-assisted extraction (MAE) that combines microwave and traditional solvent extraction [78,79,81].

Among the extraction methods used in sustainable acquiring bioactive components from plant material, pressurised liquid extraction (PLE) should also be mentioned. It is based on operating with conventional solvents under high temperature and pressure. The instant controlled pressure-drop (DIC) method which, combines short duration time, elevated temperature, and quick depressurization toward a vacuum, also allows to obtain extracts with superior quality and prevents their thermal degradation, especially in the case of polyphenols-rich mixtures. On the other hand, response surface methodology (RSM) as a statistical tool for optimization of extraction procedures can also be used. RSM is an experimental modelling which allows process optimization, for example by reducing the experimental runs. It also helps to find the most positive response for the specific extraction strategy, consequently offering the most sustainable procedure [82].

It is difficult to clearly indicate the most efficient extraction method. The choice of methodology is dictated not only by its advantages or drawbacks, but also by the physicochemical characteristics of the materials and the type of bioactive compounds to be extracted. In the case of oil compounds extraction, the most efficient method seems to be supercritical CO₂ extraction. However, in the case of polyphenolic compounds, the most effective method seems to be supercritical fluid extraction (SFE) with the use of deep eutectic solvents (DES) as emerging green solvents. Moreover, SFE has the ability to induce chemical transformations of agri-food materials, such as hemicellulose hydrolysis. Those methods are environmentally friendly and do not release toxic substances to the environment [83].

Another important aspect in the extraction process is moving from the laboratory to the industrial scale. The green extraction processes have the potential to permit feasible scaling up to industrial extraction [84]. When scaling up, several factors should be taken into account, namely: instrumentation, batch/flow process, kinetics, economics, and energy consumption. Increasing the scale of extraction can start with the use of mathematical models that are based on kinetics-based approaches and solubility-based approaches. The goal in the industrial-scale process is to obtain processing conditions and parameters which will result in similar yields and composition of extracts when compared with the laboratory-scale setup [85].

There are also several methods for qualitative and quantitative analysis of functional extracts obtained from food waste. One of them are advanced chromatographic and spectroscopic techniques, such as High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC), Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS), or Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy, applicable to the compounds such as fatty acids methyl esters, cinnamic acid derivatives, and glycerine [65,86].

3.3.3. Cosmetic Properties of Phytochemicals Derived from Agri-Food Waste

Agro-food wastes, which most often are peels, seeds, shells, pomace, and leaves, can be considered a rich source of chemicals with significant skin-care potential, such as carotenoids, tocopherols, glucosinolates, phenolic compounds, and fatty acids. They exhibit a broad spectrum of action on the skin and can be incorporated into cosmetic products, particularly those with moisturizing, anti-aging, and antimicrobial properties. Products containing such bioactives can benefit the skin with various dysfunctions, including dryness, aging, or acne. Raw materials extracted from agri-food wastes are often richer in bioactive compounds than their counterparts extracted from fresh raw materials, e.g., the waste from the olive industry could be a greater source of polyphenols than the olive oil itself [79]. Additionally, they allow the valorisation of agri-food residues, leading to more nature-based cosmetic products. The growing drive to obtain cosmetics based on sustainable ingredients is reflected in numerous research papers on the skincare effects of bioactive compounds extracted from food waste.

The work by Pereira et al. provides a valuable overview of the possibility of using agri-food waste as a source for phytochemicals with antibacterial activity [87]. Among them, the prominent one is the research conducted on the activity of essential oil obtained from *Citrus reticulata* Blanco peel against *Cutibacterium acnes*, the bacteria responsible for the formation of skin acne. The results obtained by the researchers indicate that the antibacterial activity of this oil against *C. acnes* is higher even than that of synthetic antibiotics commonly used to treat acne, such as erythromycin, clindamycin, and tetracycline. This indicates the great application potential of essential oils extracted from citrus fruit peels [88].

In turn, Ferreyra et al. points to the possibility of using grapevine woody by-products, such as bunch stems and canes, as a source of bioactive phenolic compounds with well-recognized antioxidant, antimicrobial, antifungal, and anti-aging properties [89]. Particularly noteworthy in this group of compounds is trans-resveratrol, which is used in cosmetic formulations as an anti-aging and anti-hyperpigmentation ingredient which prevents skin discoloration by suppressing tyrosinase activity during melanogenesis [90–92]. Another phytochemical with strong antioxidant activity is ferulic acid, which can be also stabilized in cosmetic products in the form of lipid carriers [86] and liposomes [93]. It has been proved that ferulic acid does not exhibit toxicity even at higher concentrations. Moreover, the regeneration studies have shown a significant improvement in skin condition during application of a liposomal nanosystem containing ferulic acid. Importantly, the source of ferulic acid was brewers' spent grain, which is one of the most abundant by-products in the beer industry, causing vast environmental problems [93].

Among many potential skincare applications of compounds extracted from agri-food wastes, the research on skin photoaging treatment is worth mentioning [94]. Martínez-Inda et al. studied the phenolic composition of 18 different vegetable residues collected from household wastes and containing, among others: tomato, potato, and garlic peels; cabbage and eggplant peels and stems; avocado peel and pit; beet leaves, peels and stems; strawberry leaves; pear, orange, tangerine, and kiwi peels; and peanut shells. Extraction procedures applied by researchers led to the mixtures rich in phenolic compounds like caffeic acid, chlorogenic acid, p-coumaric acid, and protocatechuic acid with high antioxidant activity. Moreover, the authors demonstrated that phenolic compounds from food waste extracts may offer a significant photoprotective action, and established a regression model correlating the total phenolic content of the extracts with their photoprotective action (SPF) [95]. Value-added phytochemicals derived from food waste can also be used

in wound healing formulations. Bassam et al. developed a gel incorporated with chitosan nanoparticles loaded with ethanolic extracts of kiwi peels or yucca seeds. The high content of antioxidants, vitamins and anti-inflammatory agents resulted in the enhancement of skin burn healing performance [96].

It is worth noting that a significant number of compounds derived from agri-food industry waste are already patented as anti-aging, moisturizing, and sun protection agents with potential for cosmetic and dermatological application. This can be confirmed by a literature study conducted by de Mello et al., who studied patent applications for coffee and coffee by-products as active ingredients in cosmetics. They showed that of the fifty-two patents relating to coffee and coffee by-product used in cosmetics, three were for coffee silverskin processing, one for peel and pulp, one for pulp, and one for beans together with leaves [97].

The on-going interest of researchers in the fermentation is also reflected in obtaining sustainable cosmetic formulations, as biocompatibility is considered the major advantage of cosmetic ingredients derived from fermentation processes. Furthermore, the fermentation can be perceived as an innovative tool in the synthesis of new active compounds or tailor-made ingredients to solve specific skin problems [98,99].

One of the frequently used cosmetic ingredients is lactobionic acid, which acts as an anti-aging and keratinizing agent. It has been demonstrated that *Pseudomonas taetrolens* was able to produce high-purity lactobionic acid when cultivated in the fed-batch culture under co-feeding conditions using highly concentrated whey with yeast extract and peptone [100].

Similarly, exopolysaccharides (EPS) have also been proved beneficial in the skin-care products due to their biocompatibility, anti-microbial, anti-oxidative, and anti-photoaging effect [101]. Sun et al. reported highly efficient synthesis of EPS by the *Zunongwangia profunda* SM-A87 strain in whey. Their study revealed also that the obtained EPS were characterized by significant moisture-retention ability and antioxidant activity, indicating their great application potential in skincare products [102].

The combination of producing β -glucosidase *Schizophyllum commune* mycelia and the aqueous extracts of *Citrus unshiu* peel containing flavonoid glycosides were used to obtain value-added chemicals with biological activity. The photoprotective potential of fermented *C. unshiu* peel extract with *S. commune* was tested in human dermal fibroblasts exposed to UVA radiation, and it was revealed that it had an inhibitory effect on human interstitial collagenase expression. This allows to speculate that the material under study may exhibit protective potential against photoaging-induced dermal collagen loss [103].

Low-cost by-products and residues of agri-food industry origin have also proved their potential in production of different pigments and aroma compounds by the fermentation process with diverse group microorganisms. Carotenoids from grape waste fermented with *Monascus purpureus* and fruity aroma (mixture of alcohols and esters) from sugarcane bagasse and sugar beet molasses fermented with *Kluyveromyces marxianus* are only a few examples of possible application of bioferments in the cosmetic products [104–106].

Natural loss of collagen that progresses with age causes morphological, structural, and functional skin deterioration, bringing a challenge to the cosmetic industry. However, the use of cosmetic products enriched with collagen has proven to be a fine solution. In recent years, fish collagen, which shows many advantages over mammalian-based collagen, has gained the special attention of researchers. Application of fish collagen reduces zoonosis transmission risk and cultural-religious limitations, but also brings the cost-effectiveness of manufacturing process and high bioavailability. Recently, the attention of researchers has focused primarily on the use of fish wastes (i.e., skin, scales) as a cheap and environmentally friendly source of collagen [107].

For the extraction of collagen peptides, fish waste fermentation with *Lactobacillus* bacteria could be applied. Khan et al. tested biological activity, namely the cellular cytotoxicity and proliferative effect of such-obtained fish collagen by using HaCaT (Cultured Human Keratinocyte) cells. The results demonstrated that the fish collagen achieved by

fermentation was non-toxic, and visibly stimulated the proliferation of HaCaT cells when compared to the control group [108].

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin fermentation followed by extraction could also be applied as a time-saving and environmentally friendly method for obtaining fish-based collagen with a potential application in skin-care products [109].

The latest research by Costa et al. revealed that also by-products from the fermentation process can be applied as a sustainable and rich secondary source of bioactives with skincare potential, such as phenolic compounds and peptides. They applied engineered spent yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) waste streams from the biotechnological production of β -farnesene. The results showed that the obtained peptide fractions had potential as possible future solutions for cosmetic applications, as they were not cytotoxic even at the highest concentration for the tested cell lines, namely human keratinocytes and primary dermal fibroblasts. Moreover, all peptide fractions showed a positive effect in the modulation of various cosmetically relevant metabolites (pro-collagen I α I, hyaluronic acid, fibronectin, cytokeratin-14, elastin, and aquaporin-9) [110].

3.4. Bioactive Compounds from Fruits Waste

Most of the fruit-based wastes and by-products arise after pressing the juice or after producing value-added products. Fruit waste after beverage production, namely pulp, skin, seeds, and stem mixture, take the form of pomace, which is very unstable [65]. Pomaces are most often used as biofertilizers (via composting) and as a potential source of biomass in the production of biofuels. However, because of their chemical richness and heterogeneity, they can also be used in the cosmetic industry as a source of active ingredients. In the non-edible parts of fruits (peels or twigs), the content of bioactive compounds, such as polyphenols, is often higher than in the edible parts (pulp) [65,73].

3.4.1. Citrus Waste

Citrus fruits, such as oranges, lemons, limes, grapefruits, and tangerines, are the most abundant fruit crop in the world. They are produced in an amount of 115 million tons per year. Over 30 million tons are industrially processed into juice, from which remaining 50% is waste, mainly in the form of citrus peels, and residues from segments and seeds after pressing [68,73,111]. Citrus peels are a rich source of essential oils, which are often produced directly in juice production plants as a co-product. Essential oils obtained from citrus peels have strong antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory properties [55]. Tangerine peel extract can be combined within green biosynthesis to produce silver nanoparticles (AgNP's) [56]. After dropwise adding of the tangerine peel extract to the 1 millimolar solution of silver nitrate (AgNO₃) and stirring for few hours under dark conditions, a mixture with well dispersed AgNP's is created. It can also be used in cosmetic products due to the well-known antimicrobial properties of silver [56]. The ability of the ethanol extract of *Citrus unshiu* (mainly grown in Jeju Island, Korea) to inhibit melanin content, tyrosinase activity, and the protein expression profile of TRP-1, TRP-2, and MITF in murine melanocytes, was tested. The study confirmed that treatment with citrus pomace extracts significantly reduced the cellular melanin content by inhibiting tyrosinase activity and the transcription factors TRP-1 and TRP-2, and thus it can be used to reduce skin pigmentation disorders. Moreover, the essential oil of *Citrus unshiu* peels has anti-inflammatory and antimicrobial properties [55,103].

3.4.2. Banana Waste

Banana (*Musa sapientum*) is a tropical fruit that belongs to the *Musaceae* botanical family, and grows in more than 122 countries around the world. The annual production of bananas is 107.1 million tons, with 20% discarded due to the damage, inappropriate size, and other defects [111]. The main part of the banana that is suitable for reuse is the peels. Recently, banana peels have been used in various industrial applications, including biofuel, biosorbents, pulp and paper production, as well as energy-related activities, organic

fertilizers, environmental cleaning, biotechnology-related processes, and ingredients of cosmetic products [112]. The main component of the green bananas peels is starch, which constitutes about 70–80% of the dry weight. However, this amount changes significantly during ripening due to the transformation of starch to fruit sugars [113]. The natural starch from banana peels has been used in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries, minimizing the environmental problems related to this type of waste [113]. In the cosmetic industry, banana starch can be used as a thickening and gelling agent as well as a stabilizer to avoid phase separation in the emulsions. Starch also improves smoothness of the emulsions during application on the skin, and it can replace talc in formulations of face and body powders. The starch granule is a water-insoluble compound that acts as gelling and stabilizing agent. It can be hydrated at higher temperatures around 77 °C. It can be used in a maximum dose of 15% w/w in powder products [113]. Another raw material obtained from banana peel is extract. It has been confirmed in the literature that ethanol is the best solvent for the extraction of bioactive agents from banana peels. The high value added compounds present in banana peel extract include glycosides, alkaloids, saponins, carotenoids, biogenic amines, tannins, anthocyanins, epicatechin, catechin, flavonoids, phytate, and 18 different types of amino acids [112,114]. The banana peel extract also contains minerals such as iron, calcium, sodium, phosphorus, and magnesium. Moreover, it is a rich source of polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids, namely linoleic and linolenic acids [114]. It has antioxidant and anti-inflammatory properties. Banana peel extracts show firming, anti-aging, and skin brightening effects [112]. The antibacterial properties of banana peel ethanolic extract in both Gram-positive and Gram-negative bacteria, such as *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*, have been confirmed by Ehiowemwenguan et al. [115]. The banana peel can also be used as a substrate to obtain lactic acid by fermentation process. Lactic acid is a valuable raw material in the cosmetic and pharmaceutical industry, serving as a pH adjuster and moisturising agent [112].

3.4.3. Mango Waste

Mango (*Mangifera indica* L.) processing waste is up to 40–50% by weight, with 20–60% of seed waste, which is a source of edible oil. Due to the fact that the fatty acid profile of mango is similar to that of cocoa butter and shea butter, it can be considered as a source of oleic, stearic, and palmitic acid [64,116]. Mango seed butter contains phenolic compounds and phospholipids, which gives it an anti-tyrosinase and antioxidant capacity [116]. The bioactive compounds present in mango peels are phenolic compounds, carotenoids, vitamin C, and dietary fibres [78]. Additionally, mango peels are a very good substrate for the preparation of lactic acid. Among the peels of many fruits, such as orange, mango, banana, and pineapple that were subjected to lactic fermentation by *Lactobacillus plantarum* as the starter culture, the highest amount of lactic acid (10.08 g/L) was obtained from the mango peel [112].

3.4.4. Apple Waste

Apple (*Malus domestica* Borkh.) is a widely consumed and well-recognized fruit, and its global production exceeds 83 million tons. A large portion of apple production is converted into value-added food products, such as processed juice or cider, in which about 25% of the weight of fresh fruits is a pomace by-product. Apple pomace constitutes an important source of pectins, which are widely used in the food, cosmetics, and pharmaceutical industries as a natural thickener, gelling agent, and stabilizer [65,73]. Apple pomace contains active compounds such as triterpenoids, phenolic acids, flavanols, flavanols, flavones, anthocyanins, dihydrochalcones, and hydroxycinnamic acid, quite often in amounts higher than in the whole fruit [117]. Extracts of apple pomace possess antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties, so they can be of great help in maintaining a healthy skin condition. In addition, they contain polyphenols, which inhibit specific pro-inflammatory mediators such as nitric oxide, inducible nitric oxide synthase, reactive oxygen species

(ROS), cytokines, prostaglandins, or cyclooxygenases, and eliminate the inflammation process in the skin [117]. The in vitro study validated the inhibition capacity of apple-based phenols in sebum production in sebaceous glands, which alleviated skin diseases such as acne. Several in vitro and in vivo studies have also reported the positive effects of apple pomace phenolic compounds on skin damages such as wounds or burns, premature skin aging, psoriasis, rosacea, and atopic dermatitis [117].

3.4.5. Avocado Waste

Avocado (*Persea americana* Mill.) is a tropical and subtropical fruit that is grown mainly in Mexico and Central America. The pulp of this fruit contains insoluble (70%) and soluble (30%) fibres, lipids, mainly glycolipids and phospholipids, monounsaturated fatty acids, and proteins in quantities greater than in many other fruits [118]. Moreover, avocado pulp contains sugars and proteins, as well as pigments, tannins, polyphenols, phytoestrogens, and perseitol [118]. The high oil content is particularly important, as it contains monounsaturated fatty acids (oleic and palmitoleic acids), low quantities of polyunsaturated fatty acids (linoleic acid), and a significant quantity of saturated fatty acids (palmitic and stearic acids), with small proportion of myristic, linolenic, and eicosenoic acids [118]. Another important component of avocado pulp are minerals, especially high amounts of potassium and less of phosphorus, magnesium, calcium, sodium, iron, and zinc. Vitamins, such as β -carotene, vitamin E, retinol, ascorbic acid, thiamine, riboflavin, niacin, pyridoxine, and folic acid are also present [56]. About 20–30% of the processed avocado pulp consisting of seeds, peels, and exhausted pulp from the extraction of avocado oils is discarded as waste [118]. These residues contain mainly carbohydrates, such as fibres, hemicellulose, and starch, and have a great antioxidant capacity due to the high content of polyphenols such as quercetin glycosides, type A and B procyanidin dimers, type A procyanidin trimers, catechin, caffeoylquinic acid, and coumaroylquinic acid. Because of the low cost and great properties, avocado residues are potential source of oils, essential oils, and fibres for use in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries [118]. Avocado residue extracts possess antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria (*Salmonella enteritidis*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium*, *Listeria monocytogenes*), and also antifungal properties (against *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Malassezia*); therefore, it can be used in cosmetic formulations. Moreover, fatty alcohols extracted from the seed and pulp of avocados have photo-protective properties against UV induced damage in skin cells [118].

3.4.6. Olive Waste

The annual production of edible olive oil from *Olea europaea* L. is about 3.26 million tons [70]. This generates 4.5 million tons of by-products, such as the wastewater of the olive mill, the pomace, the leaves, branches, and seeds, which are rich in fatty acids, tocopherols, polyphenols, phytosterols, and squalene [79,111]. The waste from the olive industry is a greater source of polyphenols than the olive oil itself [79]. The main phenolic compounds in olives are as follows: hydroxytyrosol, tyrosol, oleuropein, verbascoside, and their derivatives, which have powerful antioxidant activity in both vivo and in vitro studies [55,79,119,120]. Moreover, hydroxytyrosol and oleuropein have anti-inflammatory, anti-atherogenic, antimicrobial, and antiviral properties. These compounds are soluble in water, and thus only a low percentage dissolves in the lipidic fraction of the olives. Rich in hydroxytyrosol aqueous olive extract inhibited the production of inflammatory mediators, such as nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (PGE2) cytokines, as well as chemokines [55]. Olive polyphenols may contribute to the skin photoprotection as a booster of UV filters. They increase the sun protection factor (SPF) and UVA absorption when combined with UV filters, such as TiO_2 , benzophenone-3, diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol, octocrylene, octyl-metoxycinnamate, and octyl dimethyl para-aminobenzoic acid (OD-PABA) [79,119,120].

Due to the antimicrobial properties of olive derivatives, they can be used in cosmetics as preservative boosters. Phenolic compounds found in olive wastes, like olive leaf extract, pomace, and oil industry by-products extracts, have antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis* [79,119,120]. Lipophilic compounds from olive waste have emollient, moisturizing, and protective properties, and they repair the function of the skin lipid barrier. They have capacity to remain on the surface of the skin for long periods of time and act as lubricants. Also improvement in the condition of the skin impact with dermatosis, such as atopic dermatitis, psoriasis, eczema, and very dry skin could be observed after applying cosmetic formula containing olive wastes, giving the sensation of soft, elastic, and hydrated skin [79,119]. Olive wastes are rich in fatty acids, especially oleic acid, and essential polyunsaturated fatty acids (EFAs) such as linoleic (C18:2) and linolenic (C18:3) acids, which have anti-irritant and anti-inflammatory effects and replenish the lipids of the skin epidermal barrier [79]. *Olea europaea* is also the main source of squalene, which is a lipid from the family of triterpene, being the most abundant on the skin's surface and possessing emollient, antioxidant, antibacterial, and antifungal properties [79,119,120]. Olive waste such as pomace, olive leaves, and oil industry by-product extracts may also serve as a source of natural vitamin E, mainly α -tocopherol, which is non-enzymatic antioxidant. The leaves of *Olea europaea* contain carotene, which is a natural pigment with high antioxidant capacity. Rich-in-carotene olive waste extract used topically on the skin reduces free radicals, prevents UVA damage in the skin cells, and shows anti-inflammatory effects [79,119,120].

3.4.7. Grapes Waste

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is a fruit crop used for fresh consumption and production of wine, juice, dried fruits, and distilled liquor. Approximately 80% of its production is destined for winemaking by pressing and macerating grapes, which in Europe creates approximately 4.5 million tons of wastes per year [121]. Grape pomace is composed of grape seeds (25%), stalks (25%), and skins (50%). It has low pH, high organic carbon content, and significant concentration of phenolic compounds. Due to this fact, it can resist biological degradation and cause unbalance in the ecosystem. The extraction process is an effective method of grape waste valorisation, resulting in raw materials with antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory properties [121,122]. For the needs of the cosmetic industry, extracts are obtained from seed and oil, pomace, grape skins, shoot, stalk lees, stem cells, and seed paste. Grape pomace by-product contains unsaturated fatty acids, dietary fibres, vitamins, and natural antioxidants, especially polyphenols such as phenolic acids (hydroxybenzoic, hydroxycinnamic acids), flavonoids (catechin and epicatechin), stilbenes (trans-resveratrol), tannins, and proanthocyanins [123]. Grape seeds and grape pomace can also be used as raw materials to obtain oils composed of unsaturated fatty acids, like linoleic acid (which accounts about 70–75% of total oleic fraction), oleic acid, and palmitic acid [122]. Due to the low content of linolenic acid, grape seed oil has longer durability. Grape seed oil is also rich in tocopherols (α , β , γ , δ) and tocotrienols (α , β , γ , δ) [122,124]. Both grape extract and grape seed oil as a by-product from the grape waste give a beneficial effect on the skin. Grape seed extract has antioxidant, anti-tyrosinase, anti-ageing, anti-microbial (against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*), antifungal, anti-acne, and anti-inflammatory activity, and protects skin cells against UVA damage [121,122,124]. Moreover, grape seed oil has antioxidant and antimicrobial activities, whereas grape seed powder has an abrasive and exfoliant properties [121,122,124].

3.4.8. Pomegranate Waste

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is a fruit used in the food industry for juice extraction. Pomegranate's rind and seeds, which account for roughly 54% of the fruit, are the waste components rich in bioactive compounds with antioxidant and antimicrobial activity, and therefore they can be converted to various value-added products [125,126]. Global pomegranate production reaches 3 million tons per year, resulting in approximately

1.62 million tons of waste rich in bioactive and nutritional components, such as flavonoids (e.g., anthocyanins), hydrolysable tannins (e.g., punicalagin and ellagic acid), and fatty acids (mainly punicic, linoleic, oleic, stearic, and palmitic acid). Pomegranate oil is extracted from pomegranate seeds and has anti-inflammatory properties. It is also effective in fighting against UV-induced stress, both in tested animal skins and in vitro models [125]. Pomegranate extracts and oil have antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, and anti-pain properties; they also enhance the healing process of burns and wounds by increasing collagen content in cells. Whitening effect on skin pigmentations caused by UVB irradiation has been proved, as well. It is the results of high content of ellagic acid, which also has an anti-aging effect against skin wrinkling, and can increase skin elasticity due to the inhibition of the glycation process [125,126].

3.4.9. Coffee Waste

Around 103 million tons of coffee are produced worldwide every year, resulting in about 18 million tons of wet, spent coffee grounds [52,111,127–129]. The residues that remain after coffee brewing are one of the most wide-spread by-products which can be reused. The chemical composition of the coffee waste includes polyphenols and tannins, which total amount represent around 6% and 4%, respectively. It has been proved that 60% methanol is the best solvent in the extraction process leading to the highest amounts of gallic acid equivalents per gram of spent coffee grounds [78]. The waste from the coffee industry, namely pulp, husks, grounds, and unripe coffee beans, can be processed into cosmetic raw materials. The coffee grounds can be used as scrub for body care [111]. They also contain high amounts of lipids which can be extracted by supercritical carbon dioxide extraction process and subsequently used in cosmetic formulations improving skin hydration [56]. Moreover, coffee is a good source of bioactive compounds such as chlorogenic acids, caffeine, melanoidins, and other antioxidants [56]. These active ingredients show anti-inflammatory, antimicrobial, and anti-cellulite properties, improve blood circulation in the small capillaries, and protect skin cells against UV damage [56,111,127–129]. Coffee extract can be used in anti-aging cosmetics, as well as in shampoos and conditioners, to stimulate hair growth on the scalp [127–129].

3.5. Bioactive Compounds from Vegetable Waste

Vegetables establish an important source of active ingredients which may also be found in the inedible parts, such as leaves, twigs, or stems. Common vegetables like potatoes, tomatoes, carrots, broccoli, or cucumbers have been extensively used in the food industry, generating enormous amounts of waste which can be further processed into cosmetic raw materials [130].

3.5.1. Tomato Waste

Tomatoes (*Solanum lycopersicum*) contain high amounts of bioactive compounds such as carotenoids, fibre, proteins, and pectins. Tomato seeds are one of the most abundant residues due to a large production of tomato sauce. On a global scale, the annual production of fresh tomatoes accounts to approximately 160 million tons [55]. This vegetable is rich in fatty acids, especially linoleic acid. On the other hand, tomato peel contains lycopene, which is a strong antioxidant [64]. Tomatoes have already been proved as vegetables with high antioxidant potential due to the presence of polyphenols, which are located specifically in the peels [130]. The example is lycopene, whose concentration is up to five times higher in the waste peels than in the pulp. In order to increase the efficiency of lycopene extraction, tomato peels are subjected to enzymatic pre-treatment with pectinolytic enzyme preparations followed by surfactant-assisted extraction [55,131].

3.5.2. Carrot Waste

Carrot (*Daucus carota* L.) is an important vegetable source of bioactive compounds, with a worldwide production of more than 37 million tons every year [132–134]. Car-

rot processing generates waste in the form of peels and pomaces, which contain high amounts of residual bioactives, mainly carotenoids (with about 50% of β -carotene), phenolics, polyacetylenes, ascorbic acid, terpenoids, and tocopherols. Carotenoids, especially apocarotenoids, have characteristic orange colour, so they can be used as natural colourant and aroma in cosmetic products [132,133]. Oil and water extract of carrot pomace has good anti-inflammatory and antioxidative properties due to the presence of β -carotene, lutein, and zeaxanthin, and gives anti-aging effects due to the free-radical scavenging [134,135].

3.5.3. Potato Waste

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth main crop produced globally, after rice, wheat, and corn, with over 388 million tons every year. This generates a large amount of wastes, such as peels and pulp. Potato by-products have antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory properties [130,136]. Potato peel is a source of bioactive compounds; it contains much higher amounts of phenolic compounds than the tuber (the inner part of the vegetable). Phenolic acids from potato peels, mainly chlorogenic acid, have antioxidant and antibacterial properties, while glycoalkaloids have anti-carcinogenic potential via the induction of cytotoxicity and apoptosis in cancer cell lines [136]. Good antioxidant activity also forms a residue from the process of starch extraction, which can be a source of pectins. It is also possible to obtain biosurfactants from potato peels and pulp waste by using mutated *Bacillus subtilis* DDU20161. Such biosurfactants have lower toxicity, higher biodegradability, and show effectiveness at extreme temperatures, salinities, and pH values when compared with synthetic ones. This green alternative to synthetic surfactants can be used in the cosmetic industry as well [137]. Moreover, potato peel can be transformed to lactic acid through the fermentation process [138].

Currently, a lot of research is being conducted on the possibilities of managing waste from the food industry in order to obtain valuable raw materials for cosmetics formulations. Table 3 shows selected examples of results of such studies that have been published in the last few years.

Table 3. Bioactive compounds from by-products and wastes in fruit and vegetable processing.

Source of Food Waste	Type of Waste	Cosmetic Ingredients	Bioactive Components	Properties	Refs.
Citrus fruit	Peel, Pulp, Seeds	Extracts, active powder, peeling	Phenolic acids (hydroxybenzoic acid, caffeic acid), flavones (apigenin-glucoside, diosmetin-glucoside), flavanones (hesperidin, naringin, eriocitrin, narirutin)	Antioxidant, anti-inflammatory, anti-bacterial	[88]
Grapes	Seeds and peels	Extracts, Oil	Coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, cinnamic acid, neochlorogenic acid, p-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, gallic acid, proanthocyanidins, quercetin 3-O-glucuronide, quercetin, stilbenes (resveratrol)	Antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial against <i>Staphylococcus aureus</i> , sun protection factor (SPF) booster, anti-tyrosinase activities (skin whitening), anti-elastase, anti-collagenase activities (anti-aging), cellular protective effect against oxidative damage, anti-acne	[121,122,124]
Banana	Peels, Pulp	Extracts, powder starch	Gallocatechin, anthocyanins, delphinidin, cyaniding, catecholamine	Starch: thickener, stabilizer, gelling agent	[112–114]
Mango	Peels and kernel	Extracts, butter	Gallic acid, ellagic acid, gallates, gallotannins, condensed tannins, quercetin, isoquercetin, fisetin, mangiferin	Antioxidant, anti-bacterial, hydrating, reducing transepidermal water loss (TEWL)	[78,116,139]

Table 3. Cont.

Source of Food Waste	Type of Waste	Cosmetic Ingredients	Bioactive Components	Properties	Refs.
Apple	Peels and pomace	Extracts, emollients, active powder	Pectins, epicatechin, catechins, anthocyanins, quercetin glycosides, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, hydroxycinnamates, phloretin, glycosides, procyanidins, triterpenoids (ursolic acid, oleanolic acid)	Pectins: thickener, stabilizer	[117]
Pomegranate	Peels and pericarp	Extracts, oil	Gallic acid, cyanidin-3,5-diglucoside, cyanidin-3-diglucoside, delphinidin-3,5-diglucoside	Anti-inflammatory, anti-pain, burn wound healing, whitening, antibacterial, antifungal, anti-aging, inhibition of glycation	[125,126]
Avocado	Peels and seeds	Extracts, oil	Epicatechin, catechin, gallic acid, chlorogenic acid, cyanidin 3-glucoside, homogentisic acid	Antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial, anti-fungal, photo-protective	[118]
Olive	Leaves, pomace, seeds	Extracts, oil	Pectins and oligosaccharides, sugars: mannitol, cellulose, hemicellulose; phenols and polyphenols, triterpenes, fatty acids, squalene, essential amino acids, malonic acid, carotenoids, tocopherols, minerals (K, Ca, Na)	Pectins, oligosaccharides: Improvement in physical/structural properties of emulsions, oxidative stability, viscosity, texture, sensory characteristics, and shelf-life of products	[79,119,120]
Carrot	Pomace	Extract, oil	Phenols, β -carotene	Antioxidant, anti-ageing, colorant, aroma	[132–135]
Potato	Peels	Extract	Gallic acid, caffeic acid, vanillic acid, pectins, chlorogenic acid, carotene, lycopene, lutein	Antioxidant, anti-microbial, anti-inflammatory	[130,136,137]
Tomato	Seed, pomace	Extract, oil	Carotenoids (lycopene), phenolic acids, chlorogenic acid, gallic acid, ferulic acid, quercetin	Antioxidant, anti-inflammatory, antifungal	[131]
Coffee	Grounds, pulp, husks, beans	Extracts, peeling	Polyphenols, tannins, chlorogenic acids, caffeine, melanoidins	Anti-inflammatory, antimicrobial, anti-cellulite, improvement in blood circulation	[127–129]
Hazelnuts	Skin and roasted husk	Extract	Phenolic compounds (proanthocyanidins A and B)	Antioxidant, antifungal	[140]

3.6. Bioactive Compounds from Animal Waste

Bioactive compounds isolated from animal-based waste include mainly peptides. In the dairy industry, it is mainly those from whey and colostrum [65,141]. Whey is the main by-product obtained during cheese production from all types of milk, namely goat, sheep, camel, buffalo, and, most commonly, cow milk [138]. Whey contains about 55% of milk nutrients, such as proteins, β -lactoglobulin, α -lactalbumin, bovine serum albumin, immunoglobulins, and macropeptides. Every year, approximately 300–320 million tons of whey ends up in wastewaters [141]. However, during the purification procedure specific fractions from whey may be obtained. Lactose from whey can be fermented to produce biomass and lactic acid, which can be used as cosmetic ingredients. Moreover, protein-rich fractions are reused and applied as cosmetic raw materials with ability to counteract skin damage, preserve skin integrity, and reduce drawbacks related to the dermal dryness [138].

In the marine sector, bioactives could be obtained from fish and shellfish processing, as well as from seaweeds [65,142,143]. Hot-water extraction of pulverized oyster shell gives polypeptides with tyrosinase inhibitory activity; therefore, it can be used as an ingredient of cosmetics that lighten skin discolorations [68,142]. Shrimp and crab shells can be recovered for obtaining chitosan, which is a natural polymer used in the skin and hair care. It has antibacterial, antioxidant, protective, smoothing, and soothing properties. It also shows the ability to accelerate skin regeneration processes, so it could be used in the production of wound-dressing materials [144]. Furthermore, calcium carbonate from oyster shells can be used as a calcium supplement [68,142]. On the other hand, astaxanthin is a chromophore

that can be extracted from shrimp shells. It has strong antioxidant properties with an efficacy of 500 times higher than that of vitamin E; thus, astaxanthin can be used in anti-ageing cosmetic products [145]. Collagen from fish waste, such as skin, bones, and scales, has nutraceutical, cosmeceutical, and bio-medical applications because it is a source of many amino acids. It also possess antioxidant, antimicrobial, and anti-aging properties, which are highly desirable in the cosmetic industry [146,147].

3.7. Bioferments

Bioferments are raw materials obtained using a fermentation process carried out with appropriate strains of microorganisms, such as bacteria and/or yeast (Figure 4). Processing food waste by microorganisms is a sustainable and eco-friendly solution in food waste management. It may generate biofuels, electrical energy, biosurfactants, bioplastics, and biofertilizers, and also cosmetic raw materials such as prebiotics and postbiotics, fermented extracts, or fermented whey. Microbial fermentation can be used in processing of crops, fruits and vegetables, dairy products, edible oil, meat, poultry, eggs, sea food, and other aquatic organisms [148,149]. Microbial processing of food waste has opened new horizons for value addition to conventional extraction [148]. It needs renewable feedstock, such as biomass, and requires mild conditions of temperature and pressure to carry out the process, giving a lower environmental footprint than conventional chemical synthesis [27]. Many fermented products and fermentation by-products have already been introduced to the market, including fermented beverages, single cell proteins, single-cell oils, polysaccharides, dietary fibres, polyphenols, bio-pigments (carotenoids), fragrances, flavours (vanillin), essential oils, biopesticides, plant growth regulators, and enzymes. Biohydrogen, bioethanol, and biogas are also produced from waste of fruits and vegetables containing starch, cellulose, and hemicelluloses, which are at first hydrolysed to soluble sugars and further fermented [148,149].

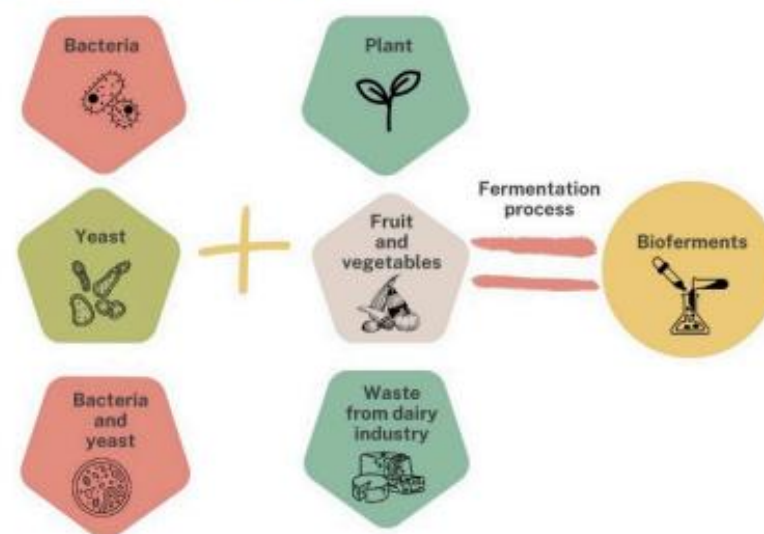


Figure 4. Schematic representation of the biofermentation process.

3.8. Bioferments in the Cosmetic Industry

For the needs of the cosmetic industry, fermented raw materials are obtained from plants, fruits, vegetables, oils, and substrates from the dairy industry. The use of ingredients derived from wastes generated by the food and dairy industry, as well as from plant-based biomass, allows for resourcing, reducing of carbon footprint, and supports the circular

economy [98,150]. Due to the fact that fermentation converts high-molecular compounds into low-molecular structures, the bioavailability of ingredients is significantly higher [98]. Moreover, specific microbial strains used in the fermentation process produce additional active substances such as proteins, ceramides, amino acids, acids, and antioxidants, thanks to which the final raw material shows increased bioactivity and biocompatibility [150,151]. The efficiency of the fermentation process and content of bioactive ingredients depends on the type of microorganism strains and conditions under which the process is carried out [98]. During the fermentation process, metabolites of bacteria and yeast are formed, such as malic, fumaric, and citric acids, which are intermediates in the Krebs cycle and act as rapid energy substrates for skin-cell mitochondria [27]. Fermentation-derived ingredients have many advantages when compared to those obtained by conventional chemical synthesis. First of all, the fermentation process uses renewable sources as substrates and requires mild processing conditions. Moreover, it reduces waste, and the obtained products are biodegradable [27,99]. The use of fermented raw materials also has many benefits for the skin [152]. Due to the smaller molecular structures of active substances in fermented raw materials, antioxidant and anti-inflammatory properties may be increased by improved bioavailability [149,152–154]. Bioferments in cosmetic products may stimulate natural skin defence mechanisms, reduce consequences of photodamage, whiten the skin, help in rebuilding the skin barrier, support the wound healing process, reduce the symptoms of acne, and protect the skin against pollution and oxidative stress [92,155]. It is worth mentioning that fermentation is also used in order to obtain biosurfactants from kitchen waste oil, whey, utilized soy molasses, and olive oil mill waste. Biosurfactants, unlike surfactants produced in the chemical synthesis, are fully biodegradable and non-toxic to aquatic organisms [148]. Examples of current studies on fermented plants, fruits, vegetables, and dairy products serving as bioferments with cosmetic applications are presented in Table 4.

Table 4. Cosmetic properties of fermented raw materials from plants, fruit, vegetables, as well as dairy and marine industry by-products.

Raw Material	Microorganisms	Properties	Refs.
Citrus unshiu peel	<i>Schizophyllum commune</i> QG143	Anti-aging, anti-photoaging	[103]
Lemon peel	<i>Lactobacillus lactis</i>	Skin whitening, reduction of discoloration, antioxidant	[156]
Goji berry (<i>Lycium barbarum</i> L.)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Bacillus velezensis</i> or <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bacillus velezensis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Anti-oxidant, anti-aging, skin whitening	[157]
Plum pomace and seeds	<i>Aspergillus niger</i> and <i>Rhizopus oligosporus</i>	Anti-oxidant, moisturizing	[158]
Camellia sinensis (Miang tea)	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Anti-oxidant, tyrosinase inhibition (skin whitening), reduction of discoloration, collagenase inhibition (anti-aging)	[159]
Jasminum sambac flowers	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Antioxidant, anti-aging, anti-photoaging induced by UVB radiation,	[160]
<i>Angelica gigas</i> , <i>Lonicera japonica</i> , <i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz., <i>D. opposita</i> Thunb., <i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> , <i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i> Aschers., <i>Xanthium strumarium</i> L., <i>Cnidium officinale</i> , <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Protection against UVB-induced damage, anti-inflammatory	[161]

Table 4. Cont.

Raw Material	Microorganisms	Properties	Refs.
Soybean	<i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Improved skin hydration and elasticity, anti-oxidant, skin whitening and reduction of discoloration	[162]
Red ginseng	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Anti-wrinkle, skincare, anti-inflammatory, anti-allergenic	[27,151]
Red ginseng marc	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Rhodobacter capsulatus</i>	Promoting effects on the hair growth cycle	[163]
Carrot root	<i>Bacillus ginsengisoli</i>	Anti-oxidant, reduced skin dullness, anti-aging, anti-wrinkle	[132]
Radish root	<i>Lactobacillus casei</i>	Anti-oxidant, anti-aging, healing of damaged cells, toxin removal, skin nourishing	[148]
Wine industry by-products	Kombucha SCOBY (Symbiotic Cultures of Bacteria and Yeasts) consortium	Moisturizing, anti-oxidant, anti-aging	[164]
Agro-industrial waste cane molasses	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> MTCC 3523	Moisturizing, anti-aging	[165]
Whey	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus jensenii</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Antioxidant, anti-inflammatory	[166]
Yogurt whey	<i>Lactocaseibacillus casei</i>	Increased production of lactic acid, hydrating properties	[166]
Waste shrimp shells	<i>Paenibacillus jamilae</i> BAT1	Antimicrobial and antioxidant	[167]

In general, the fermentation process uses microorganism to increase the biochemical and physiological activity of the substrate by converting high-molecular compounds into low-molecular structures. Microorganisms are biocompatible, and very often they simplify the synthesis, improve and give consistent quality of products, and reduce the environmental footprint. Many biological molecules may be involved, directly or indirectly, in the production of various fermented raw materials with valuable compounds, such as polyphenols, carotenoids, fatty acids, enzymes, or vitamins.

The chemical composition and quality of raw materials obtained using fermentation depends on many factors, but primarily depends on the type of microorganisms used. In the case of cosmetic raw materials, obtaining biosurfactants containing fatty acids, glycolipids, neutral lipids, and lipopeptides can occur in the presence of the following strains of fungi and bacteria: *Pseudozyma antarctica*, *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, and *Pseudozyma parantarctica*, as well as *Bacillus pumilus* A, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, and *Bacillus subtilis*. On the other hand, glycosylides are mainly produced by *Candida albicans*, *Agaricus bisporus*, and *Armillaria tabescens*. Biosynthesis with strains like *Bacillus subtilis* 313, *Brevibacterium* sp. Strain 9605, *Brevibacillus brevis* CD 162, and *Microbacterium terrae* KNR 9 allows us to obtain cyclodextrins, which are a group of compounds often used in cosmetic products as fragrance-stabilizing agents. The *Saccharomyces cerevisiae* strain is used in obtaining ceramides of microbial origin [98]. *Paracoccus*, *Agrobacterium aurantiacum*, and *Corynebacterium autotrophicum* are bacterial strains applied in the synthesis of cosmetic pigments like astaxanthin and zeaxanthin, respectively. In turn, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Azotobacter vinelandii*, *Xanthomonas* spp., *Sinorhizobium meliloti* M5N1CS, *Gluconacetobacter hansenii*, and *Streptococcus thermophilus* are responsible for the bioengineered synthesis of exopolysaccharides like dextran, alginate, xanthan, glucuronan, and hyaluronic acid. Furthermore, bacteria like

Clostridium histolyticum, *Vibrio alginolyticus*, *Bacillus cerus*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Chrysosporium*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniform*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Marinomonas*, and *Thermus thermophilus* have been proved to be an effective tool in fermentation leading to different enzymes with high cosmetic values, namely collagenases (skin regeneration) and keratinases (excess hair removal), as well as superoxide dismutase, catalases, and glutathione peroxidase (antioxidants, free radical scavenging, anti-aging) [168].

In order to ensure the repeatability of the composition of a given bioferment, it is necessary to optimize the parameters of the fermentation process, such as pH, temperature, appropriately selected bacterial strains, and the duration of the fermentation process. Then, the obtained bioferment should be subjected to a detailed analysis in terms of composition, which can be performed using chromatographic methods. Particular attention should be paid to the content of biogenic amines, methanol, formaldehyde, and nitrites. If they occur in the bioferment, additional techniques should be applied to support their removal, e.g., appropriate enzymes or bacteria strains decomposing those chemicals should be introduced [27]. The allergenic potential of bioferment is usually assessed by the Safety Assessor. The tests are based on the toxicological assessment of the ingredients of bioferments, and then are performed as dermatological patch tests. Nevertheless, it should be emphasised that fermentation of plant raw materials is widely used in the food industry, and the allergenic potential of these products is low [169].

4. Summary and Future Directions

The main pillars of the Green Deal which apply to the cosmetics industry are circular economy and zero pollutions, which means reduction in the greenhouse gas emission, assurance of resource efficiency in a circular economy, the protection and restoration of ecosystems, and biodiversity. The answer to these expectations is using waste from the food industry to produce valuable raw materials that can be applied in the cosmetic industry, for example. This solution allows reducing carbon footprint and has a large potential for improving circularity in the food system. It also offers new opportunities to create sustainable raw materials for the cosmetics industry. Upcycling of food industry waste is not only advantageous to the environment, but also provides many bioactive ingredients that have a beneficial effect on the skin. Wastes from fruits and vegetables such as peels, seeds, grounds, and pomace often contain higher amounts of bioactive compounds when compared to the pulp. Polyphenols, vitamins, and minerals can be effectively extracted by environmental friendly procedures and used as cosmetic raw materials.

Despite many advantages of compounds obtained from food waste, there are still some challenges related to the waste processing. It is necessary to develop efficient methods of extraction, purification, and characterization in order to obtain the valuable active compounds from the waste materials. Another challenge is to create scalable production methods with reproducible batches of extracts. This is due to the variability of the composition of agri-food waste, which affects the composition as well as quality and quantity of the extracted compounds.

Application of bioferments is the innovative trend in the cosmetics industry that does not bring any negative impact on the environment. Fermentation can provide the cosmetic industry with countless alternatives, replacing controversial ingredients. Thanks to fermentation, it is possible to obtain not only cosmetic active ingredients, such as ubiquinol, resveratrol, or hyaluronic acid, but also very common ingredients such as thickeners, preservatives, emollients, humectants, and biosurfactants. Active substances obtained during fermentation process show increased bioactivity and biocompatibility, and present good biodegradability profile.

The fermentation process of plant-based materials involves several risks, including the possibility of producing potentially toxic compounds as by-products, namely biogenic amines, methanol, formaldehyde, and nitrite. Moreover, the constant control of microbial safety, the lack of trace elements, and storage stability is necessary. To reduce the risk of bio-

genic amines production, microbial strains or enzymes that decompose these compounds should be used. To reduce the content of methanol and formaldehyde, the temperature of the fermentation process should be optimized.

Although bioferments have been shown to have a beneficial effect on the skin, there is still little research in this direction, and the development of new testing methodology still need to be addressed. It is expected that, in the next coming years, the use of extracts based on upcycled raw materials and bioferments will constantly increase. Therefore, research on the effectiveness of fermented raw materials on skin cells should also be intensified in order to confirm skin nourishing effects.

Author Contributions: Conceptualization, M.K., A.W. and I.N.; resources, M.K., writing—original draft preparation, M.K.; writing—review and editing, A.W. and I.N.; visualization, M.K.; supervision, A.W. and I.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: Author Monika Krzyżośtan was employed by the company Dr Koziej Instytut Badań Kosmetyków. 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

- Bom, S.; Jorge, J.; Ribeiro, H.M.; Marto, J. A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review. *J. Clean. Prod.* **2019**, *225*, 270–290. [CrossRef]
- Sahota, A. *Sustainability: How the Cosmetics Industry is Greening Up*, 1st ed.; John Wiley & Sons Ltd.: London, UK, 2014.
- precedenceresearch.com. Available online: <https://www.precedenceresearch.com/cosmetics-market> (accessed on 31 January 2024).
- Kolling, C.; Ribeiro, J.L.D.; De Medeiros, J.F. Performance of the cosmetics industry from the perspective of Corporate Social Responsibility and Design for Sustainability. *Sustain. Prod. Consum.* **2022**, *30*, 171–185. [CrossRef]
- Acharya, S.; Bali, S.; Bhatia, B.S. Exploring Consumer Behavior towards Sustainability of Green Cosmetics. In Proceedings of the International Conference on Advances in Electrical, Computing, Communication and Sustainable Technologies (ICAECT), Bhilai, India, 19–20 February 2021.
- Fortunati, S.; Martiniello, L.; Morea, D. The Strategic Role of the Corporate Social Responsibility and Circular Economy in the Cosmetic Industry. *Sustainability* **2020**, *12*, 5120. [CrossRef]
- Rocca, R.; Acerbi, F.; Fumagalli, L.; Taisch, M. Sustainability paradigm in the cosmetics industry: State of the art. *Clean. Waste Syst.* **2022**, *3*, 100057. [CrossRef]
- cosmeticeurope.eu. Available online: https://www.cosmeticeurope.eu/files/4214/6521/4452/GSP_Brochure.pdf (accessed on 31 January 2024).
- Bom, S.; Ribeiro, H.M.; Marto, J. Sustainability Calculator: A Tool to Assess Sustainability in Cosmetic Products. *Sustainability* **2020**, *12*, 1437. [CrossRef]
- Goyal, N.; Jerold, F. Biocosmetics: Technological advances and future outlook. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2023**, *30*, 25148–25169. [CrossRef]
- Fang, X.; Gao, B.; Zhong, D.; Wang, L.; Borrión, A.; Huang, W.; Xu, S.; Cui, S. Closing the food waste loop: Analysis of the agronomic performance and potential of food waste disposal products. *J. Clean. Prod.* **2023**, *382*, 135174. [CrossRef]
- Morganti, P.F.; Gao, X.; Vukovic, N.; Gagliardini, A.; Lohani, A.; Morganti, G. Food Loss and Food Waste for Green Cosmetics and Medical Devices for a Cleaner Planet. *Cosmetics* **2022**, *9*, 19. [CrossRef]
- Communication from the Commission to the European Parliament, The European Council, The Council, The European Economic and Social Committee and The Committee of the Regions. The European Green Deal. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=COM:2019:640:FIN> (accessed on 15 March 2024).
- Szpilko, D.; Ejdyś, J. European green deal-research directions. A systematic literature review. *Ekon. I Sr.* **2022**, *82*, 8–38. [CrossRef]
- Leskinen, S. Sustainability in the Cosmetic Industry Value Chain. Bachelor's Thesis, International Business Oulu University of Applied Sciences, Oulu, Finland, 2020.
- Eckert, E.; Kovalevska, O. Sustainability in the European Union: Analyzing the Discourse of the European Green Deal. *J. Risk Financ. Manag.* **2021**, *14*, 80. [CrossRef]
- On the Path to a Climate-Neutral Europe by 2050. Available online: https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal/delivering-european-green-deal_en (accessed on 15 March 2024).

18. Communication from the Commission to the European Parliament, The European Council, The Council, The European Economic and Social Committee and The Committee of the Regions. Chemicals Strategy for Sustainability Towards a Toxic-Free Environment. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:52020DC0667> (accessed on 15 March 2024).
19. Hitce, J.; Xu, J.; Brossat, M.; Frantz, M.C.; Dublanchet, A.-C.; Philippe, M.; Dalko-Csiba, M. UN sustainable development goals: How can sustainable/green chemistry contribute? Green chemistry as a source of sustainable innovations in the cosmetic industry. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2018**, *13*, 164–169. [CrossRef]
20. Salvioni, D.M.; Almici, A. Transitioning Toward a Circular Economy: The Impact of Stakeholder Engagement on Sustainability Culture. *Sustainability* **2020**, *12*, 8641. [CrossRef]
21. Amberg, N.; Fogarassy, C. Green Consumer Behavior in the Cosmetics Market. *Resources* **2019**, *8*, 137. [CrossRef]
22. Kolling, C.; Ribeiro, J.L.D.; Morea, D.; Iazzolino, G. Corporate social responsibility and circular economy from the perspective of consumers: A cross-cultural analysis in the cosmetic industry. *Corp. Soc. Responsib. Environ. Manag.* **2023**, *30*, 1226–1243. [CrossRef]
23. cosmeticseurope.eu. Available online: <https://cosmeticseurope.eu/green-action-case-studies-environmental-sustainability-cosmetics-industry/beiersdorf/> (accessed on 15 March 2024).
24. cosmeticseurope.eu. Available online: <https://cosmeticseurope.eu/green-action-case-studies-environmental-sustainability-cosmetics-industry/estee-lauder/> (accessed on 15 March 2024).
25. cosmeticseurope.eu. Available online: <https://cosmeticseurope.eu/green-action-case-studies-environmental-sustainability-cosmetics-industry/loreal/> (accessed on 15 March 2024).
26. The Official Website of the Council of the EU and the European Council. Available online: <https://www.consilium.europa.eu/media/69109/st16723-en23.pdf> (accessed on 15 March 2024).
27. Pérez-Rivero, C.; López-Gómez, J.P. Unlocking the Potential of Fermentation in Cosmetics: A Review. *Fermentation* **2023**, *9*, 463. [CrossRef]
28. Ciardiello, T.; Pinto, D.; Marotta, L.; Giuliani, G.; Rinaldi, F. Effects of Fermented Oils on Alpha-Biodiversity and Relative Abundance of Cheek Resident Skin Microbiota. *Cosmetics* **2020**, *7*, 34. [CrossRef]
29. ISO 16128-1:2016(en); Guidelines on Technical Definitions and Criteria for Natural and Organic Cosmetic Ingredients and Products—Part 1: Definitions for Ingredients. International Organization for Standardization (ISO): Geneva, Switzerland, 2016.
30. ISO 16128-2:2017(en); Cosmetics—Guidelines on Technical Definitions and Criteria for Natural and Organic Cosmetic Ingredients—Part 2: Criteria for Ingredients and Products. International Organization for Standardization (ISO): Geneva, Switzerland, 2017.
31. Lee, M.S.J.; Kwon, K.H. Future perspective safe cosmetics: Focused on associated with ISO natural organic index. *J. Cosmet. Dermatol.* **2022**, *21*, 6619–6627. [CrossRef]
32. Bozza, A.; Campi, C.; Garelli, S.; Ugazio, E.; Battaglia, L. Current regulatory and market frameworks in green cosmetics: The role of certification. *Sustain. Chem. Pharm.* **2022**, *30*, 100851. [CrossRef]
33. Suphasomboon, T.; Vassanadumrongdee, S. Multi-stakeholder perspectives on sustainability transitions in the cosmetic industry. *Sustain. Prod. Consum.* **2023**, *38*, 225–240. [CrossRef]
34. Amrina, U.; Hidayatno, A.; Zagloel, T.Y.M. A Model-Based Strategy for Developing Sustainable Cosmetics Small and Medium Industries with System Dynamics. *J. Open Innov. Technol. Mark. Complex.* **2021**, *7*, 225. [CrossRef]
35. Shapiro, K.G.; White, A.L. Right from the start: Product stewardship through life-cycle design. *Corp. Environ. Strategy* **1999**, *6*, 15–23. [CrossRef]
36. Rocca, R.; Acerbi, F.; Fumagalli, L.; Taisch, M. Development of an LCA-based tool to assess the environmental sustainability level of cosmetics products. *Int. J. Life Cycle Assess.* **2023**, *28*, 1261–1285. [CrossRef]
37. Herrero, M.; Laca, A.; Laca, A.; Diaz, M. Chapter 15—Application of life cycle assessment to food industry wastes. In *Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities*, 2nd ed.; Kosseva, M.R., Webb, C., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 331–353. [CrossRef]
38. Demichelis, F.; Fiore, S.; Onofrio, M. Pre-treatments aimed at increasing the biodegradability of cosmetic industrial waste. *Process Saf. Environ. Prot.* **2018**, *118*, 245–253. [CrossRef]
39. Ordu, M.; Der, O. Polymeric Materials Selection for Flexible Pulsating Heat Pipe Manufacturing Using a Comparative Hybrid MCDM Approach. *Polymers* **2023**, *15*, 2933. [CrossRef]
40. Mondello, A.; Salomone, R.; Mondello, G. Exploring circular economy in the cosmetic industry: Insights from a literature review. *Environ. Impact Assess. Rev.* **2024**, *105*, 107443. [CrossRef]
41. Longo, S.; Cellura, M.; Liu, L.Q.; Nguyen, T.Q.; Rincione, R.; Guarino, F. Circular economy and life cycle thinking applied to the biomass supply chain: A review. *Renew. Energy* **2024**, *220*, 119598. [CrossRef]
42. Guilbot, J.; Kerverdo, S.; Milius, A.; Escolac, R.; Pomrehn, F. Life cycle assessment of surfactants: The case of an alkyl polyglucoside used as a self-emulsifier in cosmetics. *Green Chem.* **2013**, *15*, 3337. [CrossRef]
43. Aguiar, J.B.; Martins, A.M.; Almeida, C.; Ribeiro, H.M.; Marto, J. Water sustainability: A waterless life cycle for cosmetic products. *Sustain. Prod. Consum.* **2022**, *32*, 35–51. [CrossRef]
44. Philippe, M.; Didillon, B.; Gilbert, L. Industrial commitment to green and sustainable chemistry: Using renewable materials & developing eco-friendly processes and ingredients in cosmetics. *Green Chem.* **2012**, *14*, 952–956. [CrossRef]

45. Michel, M.M.; Tytkowska, M.; Reczek, L.; Trach, Y.; Siwiec, T. Technological Conditions for the Coagulation of Wastewater from Cosmetic Industry. *J. Ecol. Eng.* **2019**, *20*, 78–85. [\[CrossRef\]](#)
46. Foschi, E. System Innovation and Life Cycle Thinking in Packaging Value Chain: The Circularity of Plastics. Ph.D. Thesis, University of Bologna, Bologna, Italy, 2020. [\[CrossRef\]](#)
47. Cinelli, P.; Coltelli, M.B.; Signori, F.; Morganti, P.; Lazzeri, A. Cosmetic Packaging to Save the Environment: Future Perspectives. *Cosmetics* **2019**, *6*, 26. [\[CrossRef\]](#)
48. Ibrahim, I.D.; Hamam, Y.; Sadiku, E.R.; Ndambuki, J.M.; Kupolati, W.K.; Jamiru, T.; Eze, A.A.; Snyman, J. Need for Sustainable Packaging: An Overview. *Polymers* **2022**, *14*, 4430. [\[CrossRef\]](#)
49. Gatt, I.J.; Refalo, P. Reusability and recyclability of plastic cosmetic packaging: A life cycle assessment. *Resour. Conserv. Recycl. Adv.* **2022**, *15*, 200098. [\[CrossRef\]](#)
50. Drobac, J.; Alivojvodic, V.; Maksic, P.; Stamenovic, M. Green Face of Packaging-Sustainability Issues of the Cosmetic Industry Packaging. In Proceedings of the 7th International Conference of Materials and Manufacturing Engineering, Thessaloniki, Greece, 2–3 July 2020.
51. Saha, T.; Hoque, E.; Mahbub, T. Chapter 13—Biopolymers for Sustainable Packaging in Food, Cosmetics, and Pharmaceuticals. In *Advanced Processing, Properties, and Applications of Starch and Other Bio-Based Polymers*; Al-Oqla, F.M., Sapuan, S.M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 197–214. [\[CrossRef\]](#)
52. Pereira de Carvalho, A.; Barbieri, J.C. Innovation and Sustainability in the Supply Chain of a Cosmetics Company: A Case Study. *J. Technol. Manag. Innov.* **2012**, *7*, 2. [\[CrossRef\]](#)
53. Martins, A.M.; Marto, J.M. A sustainable life cycle for cosmetics: From design and development to post-use phase. *Sustain. Chem. Pharm.* **2023**, *35*, 101178. [\[CrossRef\]](#)
54. Jaouhari, Y.; Travaglia, E.; Giovannelli, L.; Picco, A.; Bordiga, M. From Industrial Food Waste to Bioactive Ingredients: A Review on the Sustainable Management and Transformation of Plant-Derived Food Waste. *Foods* **2023**, *12*, 2183. [\[CrossRef\]](#)
55. Barbulova, A.; Colucci, G.; Fabio Apone, F. New Trends in Cosmetics: By-Products of Plant Origin and Their Potential Use as Cosmetic Active Ingredients. *Cosmetics* **2015**, *2*, 82–92. [\[CrossRef\]](#)
56. Singh, A.; Gajbhiye, S. Upcycling ingredients in cosmetic industry. *Int. J. Curr. Sci.* **2022**, *12*, 474–479.
57. Difonzo, G.; Grassi, S.; Paciulli, M. Upcycling of Agro-Food Chain By-Products to Obtain High-Value-Added Foods. *Foods* **2022**, *11*, 2043. [\[CrossRef\]](#)
58. Aschemann-Witzel, J.; Asioli, D.; Banovic, M.; Perito, M.A.; Peschel, A.O.; Stancu, V. Defining upcycled food: The dual role of upcycling in reducing food loss and waste. *Trends Food Sci. Technol.* **2023**, *132*, 132–137. [\[CrossRef\]](#)
59. Rakesh, B.; Mahendran, R. Upcycling of food waste and food loss—A sustainable approach in the food sector. *Trends Food Sci. Technol.* **2024**, *143*, 104274. [\[CrossRef\]](#)
60. Reid, J. What a Waste! Exploring the Circular Economy for Cosmetics Products. Ph.D. Thesis, The University of Auckland, Auckland, New Zealand, 2022.
61. Altintzoglou, T.; Aschemann-Witzel, J. Trade-offs in food systems; How does upcycling edible resources fit in the big picture? *Trends Food Sci. Technol.* **2024**, *143*, 104246. [\[CrossRef\]](#)
62. Faria-Silva, C.; Ascenso, A.; Costa, A.M.; Marto, J.; Carvalheiro, M.; Ribeiro, H.M.; Simões, S. Feeding the skin: A new trend in food and cosmetics convergence. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *95*, 21–32. [\[CrossRef\]](#)
63. Porter, S.D.; Reay, D.S.; Bomberg, E.; Higgins, P. Avoidable food losses and associated production-phase greenhouse gas emissions arising from application of cosmetic standards to fresh fruit and vegetables in Europe and the UK. *J. Clean. Prod.* **2018**, *10*, 869–878. [\[CrossRef\]](#)
64. Del Río Osorio, L.L.; Flórez-López, E.; Grande-Tovar, C.D. The Potential of Selected Agri-Food Loss and Waste to Contribute to a Circular Economy: Applications in the Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Molecules* **2021**, *26*, 515. [\[CrossRef\]](#)
65. Ben-Othman, S.; Joudou, I.; Bhat, R. Bioactives from Agri-Food Wastes: Present Insights and Future Challenges. *Molecules* **2020**, *25*, 510. [\[CrossRef\]](#)
66. Fernández-Ochoa, A.; Leyva-Jiménez, F.J.; Pimentel-Moral, S.; Villegas-Aguilar, M.C.; Alañón, M.E.; Segura-Carretero, A.; Cádiz-Gurrea, M. Revalorisation of Agro-Industrial Wastes into High Value-Added Products. In *Sustainable Bioconversion of Waste to Value Added Products*; Inamuddin Khan, A., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2021; pp. 229–245. [\[CrossRef\]](#)
67. Sharma, C.; Deutsch, J.M. Upcycling in the context of biotechnology-based solutions for food quality, loss, and consumer perception. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2023**, *81*, 102920. [\[CrossRef\]](#)
68. Baiano, A. Recovery of Biomolecules from Food Wastes—A Review. *Molecules* **2014**, *19*, 14821–14842. [\[CrossRef\]](#)
69. Pinto, D.; Cádiz-Gurrea, M.; Silva, A.M.; Delerue-Matos, C.; Rodrigues, F. Chapter 25—Cosmetics-food waste recovery. In *Food Waste Recovery*, 2nd ed.; Galanakis, C.M., Cockle, C., Eds.; Processing Technologies, Industrial Techniques, and Applications; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2021; pp. 503–528. [\[CrossRef\]](#)
70. Mellou, F.; Varvaresou, A.; Papageorgiou, S. Renewable sources: Applications in personal care formulations. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2019**, *41*, 517–525. [\[CrossRef\]](#)
71. Chauhan, S.; Pandit, N.K.; Mohanty, A.; Meena, S.S. Resource recovery of bioactive compounds from food waste and their diverse industrial applications. *Biomass Convers. Biorefin.* **2023**. [\[CrossRef\]](#)
72. Nayak, A.; Bhushan, B. An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes. *J. Environ. Manag.* **2019**, *233*, 352–370. [\[CrossRef\]](#)

73. Rodrigues de Albuquerque, B.; Gomes Corrêa, R.C.; De Lima Sampaio, S.; Barros, L. Bioactive Compounds from Food and Its By-products: Current Applications and Future Perspectives. In *Food Waste Conversion*; Gonzalez, C.N.A., Gómez-García, R., Kuddus, M., Eds.; Humana: New York, NY, USA, 2023; Volume 7, pp. 3–41. [\[CrossRef\]](#)
74. Bangar, S.P.; Chaudhary, V.; Kajla, P.; Balakrishnan, G.; Phimolsiripol, Y. Strategies for upcycling food waste in the food production and supply chain. *Trends Food Sci. Technol.* **2024**, *143*, 104314. [\[CrossRef\]](#)
75. Bridgens, B.; Powell, M.; Farmer, G.; Walsh, C.; Reed, E.; Royapoor, M.; Gosling, P.; Hall, J.; Heidrich, O. Creative upcycling: Reconnecting people, materials and place through making. *J. Clean. Prod.* **2018**, *189*, 145–154. [\[CrossRef\]](#)
76. Caldera, S.; Jayasinghe, R.; Desha, C.; Dawes, L.; Ferguson, S. Evaluating Barriers, Enablers and Opportunities for Closing the Loop through 'Waste Upcycling': A Systematic Literature Review, Journal of Sustainable Development of Energy. *Water Environ. Syst.* **2022**, *10*, 1080367. [\[CrossRef\]](#)
77. Da Silva, R.F.; Carneiro, C.N.; de Sousa, C.B.D.C.; Gomez, F.J.; Espino, M.; Boiteux, J.; Fernández, M.D.L.Á.; Silva, M.F.; Dias, F.D.S. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review. *Microchem. J.* **2022**, *175*, 107184. [\[CrossRef\]](#)
78. Kumar, K.; Yadav, A.N.; Kumar, V.; Vyas, P.; Dhaliwal, H.S. Food waste: A potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresour. Bioprocess.* **2017**, *4*, 18. [\[CrossRef\]](#)
79. Dauber, C.; Parente, E.; Zucca, M.P.; Gámbaro, A.; Vieitez, I. *Olea europaea* and By-Products: Extraction Methods and Cosmetic Applications. *Cosmetics* **2023**, *10*, 112. [\[CrossRef\]](#)
80. Donno, D.; Turrini, F.; Boggia, R.; Guido, M.; Gamba, G.; Mellano, M.G.; Riondato, I.; Beccaro, G.L. *Vitis vinifera* L. Pruning Waste for Bud-Preparations as Source of Phenolic Compounds—Traditional and Innovative Extraction Techniques to Produce New Natural Products. *Plants* **2021**, *10*, 2233. [\[CrossRef\]](#)
81. Dikmetas, D.N.; Devecioglu, D.; Özünal, Z.G.; Demiroz, A.; Yavuz, E.; Sirkeci, C.B.; Karbancioglu-Guler, F.; Kahveci, D. From waste to remedy: Extraction and utilization of food waste-derived bioactive components in wound healing. *Trends Food Sci. Technol.* **2024**, *145*, 104347. [\[CrossRef\]](#)
82. Kumar, M.; Dahuja, A.; Tiwari, S.; Punia, S.; Tak, Y.; Amarowicz, R.; Bhoite, A.G.; Singh, S.; Joshi, S.; Panesar, P.S.; et al. Recent trends in extraction of plant bioactives using green technologies: A review. *Food Chem.* **2021**, *353*, 129431. [\[CrossRef\]](#)
83. Panzella, L.; Moccia, F.; Nasti, R.; Marzorati, S.; Verotta, L.; Napolitano, A. Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable Extraction Methodologies. *Front. Nutr.* **2020**, *7*, 60. [\[CrossRef\]](#)
84. More, P.R.; Jambak, A.R.; Arya, S.S. Green, environment-friendly and sustainable techniques for extraction of food bioactive compounds and waste valorization. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *128*, 296–315. [\[CrossRef\]](#)
85. Belwal, T.; Chemat, F.; Venskutonis, P.R.; Cravotto, G.; Jaiswal, D.K.; Bhatt, I.D.; Devkota, H.P.; Luo, Z. Recent advances in scaling-up of non-conventional extraction techniques: Learning from successes and failures. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *127*, 115895. [\[CrossRef\]](#)
86. Ludek, S.; Wawrzyńczak, A.; Nowak, I.; Feliczyk-Guzik, A. Synthesis of Lipid Nanoparticles Incorporated with *Ferula assa-foetida* L. Extract. *Cosmetics* **2022**, *9*, 129. [\[CrossRef\]](#)
87. Pereira, J.A.M.; Berenguer, C.V.; Câmara, J.S. Delving into Agri-Food Waste Composition for Antibacterial Phytochemicals. *Metabolites* **2023**, *13*, 634. [\[CrossRef\]](#)
88. Hou, H.S.; Bonku, E.M.; Zhai, R.; Zeng, R.; Hou, Y.L.; Yang, Z.H.; Quan, C. Extraction of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco peel and its antibacterial activity against *Cutibacterium acnes* (formerly *Propionibacterium acnes*). *Heliyon* **2019**, *5*, e02947. [\[CrossRef\]](#)
89. Ferreyra, S.; Bottini, R.; Fontana, A. Background and Perspectives on the Utilization of Canes' and Bunch Stems' Residues from Wine Industry as Sources of Bioactive Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71*, 8699–8730. [\[CrossRef\]](#)
90. Matos, M.S.; Romero-Díez, R.; Álvarez, A.; Bronze, M.R.; Rodríguez-Rojo, S.; Mato, R.B.; Cocero, M.J.; Matias, A.A. Polyphenol-Rich Extracts Obtained from Winemaking Waste Streams as Natural Ingredients with Cosmeceutical Potential. *Antioxidants* **2019**, *8*, 355. [\[CrossRef\]](#)
91. Anna Malinowska, M.; Billet, K.; Drouet, S.; Mursch, T.; Unlubayir, M.; Tungmunnithum, D.; Giglioli-Guivarc'h, N.; Hano, C.; Lanoue, A. Grape Cane Extracts as Multifunctional Rejuvenating Cosmetic Ingredient: Evaluation of Sirtuin Activity, Tyrosinase Inhibition and Bioavailability Potential. *Molecules* **2020**, *25*, 2203. [\[CrossRef\]](#)
92. Wawrzyńczak, A. Cosmetic and Pharmaceutical Products with Selected Natural and Synthetic Substances for Melasma Treatment and Methods of Their Analysis. *Cosmetics* **2023**, *10*, 86. [\[CrossRef\]](#)
93. Bucci, P.L.; Santos, M.V.; Montanari, J.; Zaritzky, N. Nanoferulic: From a by-product of the beer industry toward the regeneration of the skin. *J. Cosmet. Dermatol.* **2020**, *19*, 2958–2964. [\[CrossRef\]](#)
94. Parisi, M.; Verrillo, M.; Luciano, M.A.; Caiazza, G.; Quaranta, M.; Scognamiglio, F.; Di Meo, V.; Villani, A.; Cantelli, M.; Gallo, L.; et al. Use of Natural Agents and Agrifood Wastes for the Treatment of Skin Photoaging. *Plants* **2023**, *12*, 840. [\[CrossRef\]](#)
95. Martínez-Inda, B.; Esparza, I.; Moler, J.A.; Jiménez-Moreno, N.; Ancin-Azpilicueta, C. Valorization of agri-food waste through the extraction of bioactive molecules. Prediction of their sunscreen action. *J. Environ. Manag.* **2023**, *325*, 116460. [\[CrossRef\]](#)
96. Bassam, S.M.; Ali, D.E.; Awwad, Z.M.; Mahmoud, S.A.; Abou-Taleb, B.A. Development and characterization of plant derived wastes Nano-formulation loaded in thermo-reversible gel for burn healing: An effort towards Sustainable Development. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2024**, *95*, 105543. [\[CrossRef\]](#)
97. de Mello, V.; de Mesquita Júnior, G.A.; Alvim, J.G.E.; Costa, J.D.C.D.; Vilela, F.M.P. Recent patent applications for coffee and coffee by-products as active ingredients in cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2023**, *45*, 267–287. [\[CrossRef\]](#)

98. Majchrzak, W.; Motyl, I.; Smigielski, K. Biological and Cosmological Importance of Fermented Raw Materials: An Overview. *Molecules* **2022**, *27*, 4845. [\[CrossRef\]](#)
99. Faria, D.J.; Azevedo de Carvalho, A.P.; Conte-Junior, C.A. Valorization of Fermented Food Wastes and Byproducts: Bioactive and Valuable Compounds, Bioproduct Synthesis, and Applications. *Fermentation* **2023**, *9*, 920. [\[CrossRef\]](#)
100. Alonso, S.; Rendueles, M.; Díaz, M. Feeding strategies for enhanced lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresour. Technol.* **2013**, *134*, 134–142. [\[CrossRef\]](#)
101. Bhatia, S.K.; Panesar, P.S.; Mehariya, S. (Eds.) *Microbial Exopolysaccharides: Production and Applications*, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2024. [\[CrossRef\]](#)
102. Sun, M.L.; Liu, S.B.; Qiao, L.P.; Chen, X.L.; Pang, X.; Shi, M.; Zhang, X.Y.; Qin, Q.L.; Zhou, B.C.; Zhang, Y.Z. A novel exopolysaccharide from deep-sea bacterium *Zamouguangia profunda* SM-A87: Low-cost fermentation, moisture retention, and antioxidant activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 7437–7445. [\[CrossRef\]](#)
103. Bae, J.T.; Ko, H.J.; Kim, G.B.; Pyo, H.B.; Lee, G.S. Protective Effects of Fermented Citrus unshiu Peel Extract against Ultraviolet-A-induced Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 1851–1856. [\[CrossRef\]](#)
104. Venil, C.K.; Devi, P.R.; Ahmad, W.A. Agro-Industrial Waste as Substrates for the Production of Bacterial Pigment. In *Valorisation of Agro-Industrial Residues—Volume I: Biological Approaches. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future*; Zakaria, Z., Boopathy, R., Dib, J., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2020. [\[CrossRef\]](#)
105. Martínez, O.; Sánchez, A.; Font, X.; Barrena, R. Enhancing the bioproduction of value-added aroma compounds via solid-state fermentation of sugarcane bagasse and sugar beet molasses: Operational strategies and scaling-up of the process. *Bioresour. Technol.* **2018**, *263*, 136–144. [\[CrossRef\]](#)
106. Hadj Saadoun, J.; Bertani, G.; Levante, A.; Vezzosi, F.; Ricci, A.; Bernini, V.; Lazzi, C. Fermentation of Agri-Food Waste: A Promising Route for the Production of Aroma Compounds. *Foods* **2021**, *10*, 707. [\[CrossRef\]](#)
107. Rajabimashhadi, Z.; Gallo, N.; Salvatore, L.; Lionetto, F. Collagen Derived from Fish Industry Waste: Progresses and Challenges. *Polymers* **2023**, *15*, 544. [\[CrossRef\]](#)
108. Khan, S.; Tauseef, I.; Ikram, M.; Rauf, S.; Saeed, R.F.; Sadiqi, S.; Lone, N.A.; Ali, L.; Subhan, F. Extraction of Fish Collagen Peptides from Fish Waste Through Fermentation Using *Lactobacillus bacteria*. *Life Sci.* **2023**, *4*, 365–371. [\[CrossRef\]](#)
109. Song, Z.; Liu, H.; Chen, L.; Chen, L.; Zhou, C.; Hong, P.; Deng, C. Characterization and comparison of collagen extracted from the skin of the Nile tilapia by fermentation and chemical pre-treatment. *Food Chem.* **2021**, *340*, 128139. [\[CrossRef\]](#)
110. Costa, E.M.; Oliveira, A.S.; Silva, S.; Ribeiro, A.B.; Pereira, C.F.; Ferreira, C.; Casanova, F.; Pereira, J.O.; Freixo, R.; Pintado, M.E.; et al. Spent Yeast Waste Streams as a Sustainable Source of Bioactive Peptides for Skin Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2253. [\[CrossRef\]](#)
111. Wanninger, A.; Deckenhoff, V.; Goj, C.; Jackszis, L.; Pastewski, J.; Rajabi, S.; Rubbert, L.V.; Niederrhein, H.H. Upcycling of plant residuals to cosmetic ingredients. *Int. J. Agric. Eng. Technol. Soc. Sci.* **2022**, *1*, 1.
112. Rana, G.K.; Singh, Y.; Mishra, S.P.; Rahangdale, H.K. Potential Use of Banana and Its By-products: A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2018**, *7*, 1827–1832. [\[CrossRef\]](#)
113. Thanyapanich, N.; Jimtaisong, A.; Rawdkuen, S. Functional Properties of Banana Starch (*Musa* spp.) and Its Utilization in Cosmetics. *Molecules* **2021**, *26*, 3637. [\[CrossRef\]](#)
114. Bhavania, M.; Moryab, S.; Saxena, D.; Awuchi, C.G. Bioactive, antioxidant, industrial, and nutraceutical applications of banana peel. *Int. J. Food Prop.* **2023**, *26*, 1277–1289. [\[CrossRef\]](#)
115. Ehiowemwenguan, G.; Emoghene, A.O.; Inetianbo, R.J.E. Antibacterial and phytochemical analysis of Banana fruit peel. *J. Pharm.* **2014**, *4*, 18–25. [\[CrossRef\]](#)
116. Klinkajorn, S.; Sukhasem, S. Production of mango seed butter for cosmetic use. In Proceedings of the III Asian Horticultural Congress—AHC, Bangkok, Thailand, 15–17 December 2020. [\[CrossRef\]](#)
117. Barreira, J.C.M.; Arraibi, A.A.; Ferreira, L.C.F.R. Bioactive and functional compounds in apple pomace from juice and cider manufacturing: Potential use in dermal formulations. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *90*, 76–87. [\[CrossRef\]](#)
118. Araújo, R.G.; Rodríguez-Jasso, R.M.; Ruiza, H.A.; Pintado, M.M.E.; Aguilera, C.N. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *80*, 51–60. [\[CrossRef\]](#)
119. Buzzi, R.; Gugel, I.; Costa, S.; Molesini, S.; Boreale, S.; Baldini, E.; Marchetti, N.; Vertuani, S.; Pinelli, P.; Urciuoli, S.; et al. Up-Cycling of *Olea europaea* L. Ancient Cultivars Side Products: Study of a Combined Cosmetic–Food Supplement Treatment Based on Leaves and Olive Mill Wastewater Extracts. *Life* **2023**, *13*, 1509. [\[CrossRef\]](#)
120. Cádiz-Gurrea, M.D.L.; Pinto, D.; Delerue-Matos, C.; Rodrigues, F. Olive Fruit and Leaf Wastes as Bioactive Ingredients for Cosmetics—A Preliminary Study. *Antioxidants* **2021**, *10*, 245. [\[CrossRef\]](#)
121. Castro, M.L.; Ferreira, J.P.; Pintado, M.; Ramos, O.L.; Borgesand, S.; Baptista-Silva, S. Grape By-Products in Sustainable Cosmetics: Nanoencapsulation and Market Trends. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 9168. [\[CrossRef\]](#)
122. Ferreira, S.M.; Santos, L. A Potential Valorization Strategy of Wine Industry by-Products and Their Application in Cosmetics-Case Study: Grape Pomace and Grapeseed. *Molecules* **2022**, *27*, 969. [\[CrossRef\]](#)
123. Dini, I.; Laneri, S. The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. *Molecules* **2021**, *26*, 3921. [\[CrossRef\]](#)

124. Wasilewski, T.; Hordyjewicz-Baran, Z.; Zarębska, M.; Stanek, N.; Zajszy-Turko, E.; Tomaka, M.; Bujak, T.; Nizioł-Lukaszewska, Z. Sustainable Green Processing of Grape Pomace Using Micellar Extraction for the Production of Value-Added Hygiene Cosmetics. *Molecules* **2022**, *27*, 2444. [CrossRef]
125. Ko, K.; Dadmohammadi, Y.; Abbaspourrad, A. Nutritional and Bioactive Components of Pomegranate Waste Used in Food and Cosmetic Applications: A Review. *Foods* **2021**, *10*, 657. [CrossRef]
126. Boggia, R.; Turrini, F.; Villa, C.; Lacapra, C.; Zunin, P.; Parod, B. Green Extraction from Pomegranate Marcs for the Production of Functional Foods and Cosmetics. *Pharmaceuticals* **2016**, *9*, 63. [CrossRef]
127. Rodrigues, R.; Oliveira, M.B.P.P.; Alves, R.C. Chlorogenic Acids and Caffeine from Coffee By-Products: A Review on Skincare Applications. *Cosmetics* **2023**, *10*, 12. [CrossRef]
128. Ramos da Costa, A.K. Design of a Cosmetic Formulation with a Deep Eutectic System Coffee Extract. Master's Thesis, NOVA University Lisbon, Lisbon, Portugal, 2022.
129. Ballesteros, L.F.; Ramirez, M.J.; Orrego, C.E.; Teixeira, J.A.; Mussatto, S.I. Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *J. Food Eng.* **2017**, *199*, 1–8. [CrossRef]
130. Peschel, W.; Sanchez-Rabaneda, F.; Diekmann, W.; Plescher, A.; Gartzia, I.; Jimenez, D.; Lamuela-Raventos, R.; Buxaderas, S.; Codina, C.C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* **2006**, *97*, 137–150. [CrossRef]
131. Vasyliov, G.; Khrokalo, L.; Hladun, K.; Skiba, M.; Vorobyova, V. Valorization of tomato pomace: Extraction of value-added components by deep eutectic solvents and their application in the formulation of cosmetic emulsions. *Biomass Convers. Biorefinery* **2022**, *12*, 95–111. [CrossRef]
132. Šeregelj, V.; Vulić, J.; Četković, G.; Čanadanović-Brunet, J.; Šaponjac, V.T.; Stajčić, S. Chapter 9—Natural bioactive compounds in carrot waste for food applications and health benefits. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Rahman, A., Ed.; Elsevier: Abingdon, UK, 2020; Volume 67, pp. 307–344. [CrossRef]
133. Igielska-Kalwat, J.; Wawrzyńczak, A.; Nowak, I. β -Carotene as an exemplary carotenoid and its application in cosmetic industry. *Chemik* **2012**, *66*, 140–144.
134. Tiwari, S.; Yawale, P.; Upadhyay, N. Carotenoids: Extraction strategies and potential applications for valorization of under-utilized waste biomass. *Food Biosci.* **2022**, *48*, 101812. [CrossRef]
135. Ikram, A.; Rasheed, A.; Khan, A.A.; Khan, R.; Ahmad, M.; Bashir, R.; Mohamed, M.H. Exploring the health benefits and utility of carrots and carrot pomace: A systematic review. *Int. J. Food Prop.* **2024**, *27*, 180–193. [CrossRef]
136. Kowalczyński, P.L.; Olejnik, A.; Świtek, S.; Bzducha-Wróbel, A.; Kubiak, P.; Kujawska, M.; Lewandowicz, G. Bioactive compounds of potato (*Solanum tuberosum* L.) juice: From industry waste to food and medical applications. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2022**, *41*, 52–89. [CrossRef]
137. Vishala, P.; Vipula, P.; Priyanka, S.; Unnatic, P. Biosynthesis and Development of Novel Method for Commercial Production of Biosurfactant utilizing waste potato peels. *Indian Drugs* **2020**, *57*, 1. [CrossRef]
138. RedCorn, R.; Fatemi, S.; Engelberth, A.S. Comparing End-Use Potential for Industrial Food-Waste Sources. *Engineering* **2018**, *4*, 371–380. [CrossRef]
139. Kaur, B.; Panesar, P.S.; Anal, A.K.; Chu-Ky, S. Recent Trends in the Management of Mango By-products. *Food Rev. Int.* **2023**, *39*, 4159–4179. [CrossRef]
140. Di Michele, A.; Pagano, C.; Allegrini, A.; Blasi, F.; Cossignani, L.; Raimo, E.D.; Faieta, M.; Oliva, E.; Pittia, P.; Primavilla, S.; et al. Hazelnut Shells as Source of Active Ingredients: Extracts Preparation and Characterization. *Molecules* **2021**, *26*, 6607. [CrossRef]
141. Alfano, A.; D'ambrosio, S.; Cimini, D.; Falco, L.; D'Agostino, M.; Finamore, R.; Schiraldi, C. No Waste from Waste: Membrane-Based Fractionation of Second Cheese Whey for Potential Nutraceutical and Cosmeceutical Applications, and as Renewable Substrate for Fermentation Processes Development. *Fermentation* **2022**, *8*, 514. [CrossRef]
142. Dini, I. The Potential of Algae in the Nutricosmetic Sector. *Molecules* **2023**, *28*, 4032. [CrossRef]
143. Altintzoglou, T.; Honkanen, P.; Whitaker, R.D. Influence of the involvement in food waste reduction on attitudes towards sustainable products containing seafood by-products. *J. Clean. Prod.* **2021**, *285*, 125487. [CrossRef]
144. Kulka, K.; Sionkowska, A. Chitosan Based Materials in Cosmetic Applications: A Review. *Molecules* **2023**, *28*, 1817. [CrossRef]
145. Chintong, S.; Phatvej, W.; Rerk-Am, U.; Waiprib, Y.; Klaypradit, W. In Vitro Antioxidant, Antityrosinase, and Cytotoxic Activities of Astaxanthin from Shrimp Waste. *Antioxidants* **2019**, *8*, 128. [CrossRef]
146. Ahmed, M.; Verma, A.K.; Patel, R. Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. *Sustain. Chem. Pharm.* **2020**, *18*, 100315. [CrossRef]
147. Sionkowska, A.; Adamiak, K.; Musiał, K.; Gadomska, M. Collagen Based Materials in Cosmetic Applications: A Review. *Materials* **2020**, *13*, 4217. [CrossRef]
148. Sharma, P.; Gaurb, V.K.; Kimd, S.-H.; Pandeye, A. Microbial strategies for bio-transforming food waste into resources. *Bioresour. Technol.* **2020**, *299*, 122580. [CrossRef]
149. Waqas, M.; Rehan, M.; Khan, M.; Nizami, D.A.-S. Conversion of food waste to fermentation products. In *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*; Ferranti, P., Berry, E., Jock, A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 501–509.
150. Yoseph, C.; Avanti, C.; Hadiwidjaja, M.; Briliani, K. The importance of fermented plant extract for anti-aging in cosmetics product. *World J. Pharm. Res.* **2021**, *10*, 1330–1343. Available online: https://www.wjpr.net/abstract_file/17168 (accessed on 15 March 2024).

151. Sivamaruthi, B.S.; Chaiyasut, C.; Kesika, P. Cosmeceutical Importance Of Fermented Plant Extracts: A Short Review. *Int. J. Appl. Pharm.* **2018**, *10*, 31–34. [\[CrossRef\]](#)
152. Singh, V.K. Bioferments in beauty infusing antioxidant and microbiome benefits into skin. *Cosmet. Toilet.* **2022**, *137*, 59–68.
153. Otsuka, A.; Moriguchi, C.; Shigematsu, Y.; Tanabe, K.; Haraguchi, N.; Iwashita, S.; Tokudome, Y.; Kitagaki, H. Fermented Cosmetics and Metabolites of Skin Microbiota—A New Approach to Skin Health. *Fermentation* **2022**, *8*, 703. [\[CrossRef\]](#)
154. Nga, H.S.; Keea, P.E.; Yima, H.S.; Chenb, P.-T.; Weic, Y.-H.; Chi-Wei Lan, J. Recent advances on the sustainable approaches for conversion and reutilization of food wastes to valuable bioproducts. *Bioresour. Technol.* **2020**, *302*, 122889. [\[CrossRef\]](#)
155. Herman, A.; Herman, A.O. Biological Activity of Fermented Plant Extracts for Potential Dermal Applications. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2775. [\[CrossRef\]](#)
156. Yuan, Y.; Zhou, J.; Zhang, N.; Xing, X.; Zhao, L.; Zhou, F. In vivo study of orange peel fermentation and improvement of androgen overproduction causing acne. *Food Biosci.* **2023**, *56*, 103124. [\[CrossRef\]](#)
157. Liu, Y.; Cheng, H.; Liu, H.; Ma, R.; Ma, J.; Fang, H. Fermentation by Multiple Bacterial Strains Improves the Production of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Goji Juice. *Molecules* **2019**, *24*, 3519. [\[CrossRef\]](#)
158. Dulf, F.V.; Vodnar, D.C.; Socaciu, C. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food Chem.* **2016**, *209*, 27–36. [\[CrossRef\]](#)
159. Makhmureang, N.; Raiwa, A.; Jiaranaikulwanitch, J.; Kaewarsar, E.; Butrungrud, W.; Sirilun, S. Beneficial Bio-Extract of *Camellia sinensis* var. *assamica* Fermented with a Combination of Probiotics as a Potential Ingredient for Skin Care. *Cosmetics* **2023**, *10*, 85. [\[CrossRef\]](#)
160. Ho, C.-C.; Ng, S.-C.; Chuang, H.-L.; Wen, C.S.-Y.; Mahalakshmi, C.-H.B.; Huang, C.-Y.; Kuo, W.-W. Extracts of *Jasminum sambac* flowers fermented by *Lactobacillus rhamnosus* inhibit H₂O₂- and UVB-induced aging in human dermal fibroblasts. *Environ. Toxicol.* **2021**, *36*, 607–619. [\[CrossRef\]](#)
161. Her, Y.; Lee, T.K.; Ahn, J.H.; Lim, S.S.; Kang, B.G.; Park, J.S.; Kim, B.; Sim, H.; Lee, J.C.; Kim, H.S.; et al. Chemical Composition of a Novel Distillate from Fermented Mixture of Nine Anti-Inflammatory Herbs and Its UVB-Protective Efficacy in Mouse Dorsal Skin via Attenuating Collagen Disruption and Inflammation. *Molecules* **2020**, *26*, 124. [\[CrossRef\]](#)
162. Chae, G.Y.; Ha, B.J. The Comparative Evaluation of Fermented and Non-fermented Soybean Extract on Antioxidation and Whitening. *Toxicol. Res.* **2011**, *27*, 205–209. [\[CrossRef\]](#)
163. Song, P.H.; Park, G.-R.; Kim, Y.-H.; Jung, D.H.; Ku, S.-K.; Song, C.-H. Hair-Growth-Promoting Effects of Fermented Red Ginseng Marc and Traditional Polyherb Formula in C57BL/6 Mice. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1195. [\[CrossRef\]](#)
164. Stanek-Wandzel, N.; Zarebska, M.; Wasilewski, T.; Hordyjewicz-Baran, Z.; Zajszy-Turko, E.; Tomaka, M.; Bujak, T.; Ziemlewska, A.; Nizioł-Lukaszewska, Z. Kombucha fermentation as a modern way of processing vineyard by-products into cosmetic raw materials. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2023**, *45*, 834–850. [\[CrossRef\]](#)
165. Shukla, P.; Anand, S.; Srivastava, P.; Mishra, A. Hyaluronic acid production by utilizing agro-industrial waste cane molasses. *3 Biotech* **2022**, *12*, 208. [\[CrossRef\]](#)
166. Minervini, F.; Comitini, F.; De Boni, A.; Fiorino, G.M.; Rodrigues, F.; Tlais, A.Z.A.; Carafa, I.; De Angelis, M. Sustainable and Health-Protecting Food Ingredients from Bioprocessed Food by-Products and Wastes. *Sustainability* **2022**, *14*, 15283. [\[CrossRef\]](#)
167. Taser, B.; Ozkan, H.; Adiguzel, A.; Orak, T.; Baltaci, M.O.; Taskin, M. Preparation of chitosan from waste shrimp shells fermented with *Paenibacillus jamilae* BAT1. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *183*, 1191–1199. [\[CrossRef\]](#)
168. Gupta, P.L.; Rajput, M.; Oza TTrivedi, U.; Sanghvi, G. Eminence of Microbial Products in Cosmetic Industry. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2019**, *9*, 267–278. [\[CrossRef\]](#)
169. Sharma, R.; Garg, P.; Kumar, P.; Bhatia, S.K.; Kulshrestha, S. Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods. *Fermentation* **2020**, *6*, 106. [\[CrossRef\]](#)

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.

Monika Krzyżośtan^{a,b,*}, Izabela Nowak^a^aUniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; ^bDr Koziej Instytut Badań Kosmetyków, Warszawa*Triterpenoid saponins derived from Centella asiatica L.*Saponiny triterpenowe pochodzące z *Centella asiatica* L.

DOI: 10.15199/62.2024.4.3

A review, with 26 refs., of the qual. compn. of extracts from the plant *Centella asiatica* L. The physicochem. properties of main components, i.e. triterpene saponins, were discussed. The use of madecassoside, madecassic acid, asiaticoside and asiatic acid in the treatment of diseases was presented.

Keywords: *Centella asiatica*, triterpene saponins, madecassoside, asiaticoside, madecassic acid, asiatic acid

Przegląd literaturowy dotyczący składu ekstraktów z wąkroty azjatyckiej (*Centella asiatica* L.). Omówiono właściwości fizykochemiczne głównych składników, czyli saponin triterpenowych. Przedstawiono zastosowanie madekasozydu, kwasu madekasowego, azjatykozydu oraz kwasu azjatykowego.

Słowa kluczowe: wąkrota azjatycka, saponiny triterpenowe, madekasozyd, azjatykozyd, kwas madekasowy, kwas azjatykowy

Wąkrota azjatycka (*Centella asiatica* L.) jest rośliną należącą do rodziny *Apiaceae* (selerowate), występującą w tropikalnych i subtropikalnych krajach południowo-wschodniej Azji, głównie w Indiach, Chinach, Japonii, Malezji i Indonezji, a także w Południowej Afryce, na Madagaskarze, w Australii oraz w Południowej i Środkowej Ameryce^{1,2}. Za wielokierunkowe działanie wąkroty azjatyckiej odpowiadają zawarte w liściach saponiny triterpenowe, głównie madekasozyd, kwas madekasowy, azjatykozyd oraz kwas azjatykowy. Szczególne działanie na skórę, w tym przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, antyoksydacyjne oraz pobudzające proliferację fibroblastów i syntezę kolagenu, wykazują madekasozyd i azjatykozyd.

Centella asiatica – charakterystyka rośliny

Centella asiatica L., syn. *Hydrocotyle asiatica* L. (Indian Pennywort, Indian Hydrocotyle), zwana również wąkrotą azjatycką, tygrysim zielem, Gotu Kola, a w medycynie ajurwedyjskiej w Indiach zwana Brahmi, należy do rodziny *Apiaceae* (selerowatych) i rodzaju *Centella* (Linn.). Jest to wieloletnia, płożąca bylina

o nerkowatych, licznych liściach, występująca w skupiskach, wokół zbiorników wodnych^{2,3}. Od czasów prehistorycznych roślina była szeroko wykorzystywana w medycynie Dalekiego Wschodu, głównie w leczeniu chorób skóry, ran, owrzodzeń, oparzeń, egzem, trądu, twardziny, łuszczycy, bielactwa i trądziku^{1,3,4}. Poza zastosowaniem miejscowym, *Centella asiatica* L. była również stosowana doustnie w leczeniu chorób ośrodkowego układu nerwowego, takich jak zaburzenia snu, pamięci i kojarzenia, a także w depresji. W XIX w. surowiec ten został wprowadzony do farmakopei indyjskiej i z powodzeniem jest stosowany w leczeniu chorób skóry, w zaburzeniach krążenia, nadciśnieniu, chorobach wrzodowej przewodu pokarmowego, zaburzeniach trawienia, malarii, a także zalecany w okresach wzmoczonego wysiłku umysłowego, pomocniczo w bólach mięśni, zapaleniu stawów, cukrzycy, zapaleniu dróg moczowych, żółtaczce, a także w leczeniu hemoroidów¹⁻⁴. Surowcem leczniczym są zarówno liście, jak i cała roślina wraz z korzeniami, pozyskiwane przez cały rok, przede wszystkim z miejsc jej naturalnego występowania, czyli Indii, Sri Lanki, Madagaskaru i Afryki Południowej. Następnie zbiory są



Mgr Monika KRZYŻOŚTAN (ORCID: 0000-0002-6116-6325) w roku 2011 ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Jest doktorantką w Zakładzie Chemii Stosowanej na tym samym wydziale. Pracuje w Instytucie Badań Kosmetyków dr Koziej na stanowisku kierownika laboratorium badawczo-rozwojowego. Specjalność – tworzenie receptur kosmetyków, szczególnie przeznaczonych dla skór z dermatozami.

* Adres do korespondencji:

Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, e-mail: mk73594@st.amu.edu.pl



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 mezooporowatych 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.

suszone powietrznie, na słońcu. Surowiec charakteryzuje się słabo wyczuwalnym, korzennym smakiem i jest prawie bezwonny^{1-3, 5, 6)}. Głównymi składnikami czynnymi o działaniu terapeutycznym są saponiny (glikozydy) triterpenowe, zwane azjatykozydami, do których należą: azjatykozyl, madekasozyd (azjatykozyl A), azjatykozyl B, centellozyd, centella saponiny A, B, C, D, bramozyd, braminozyd, tankunizyl i scefoleozyl^{3, 5, 7)}. Ponadto w roślinie licznie występują kwasy triterpenowe, takie jak azjatykowy, madekasowy, betulinowy, izobramowy, centellowy, centykowy, centelikowy i tankunikowy. Do innych substancji wyizolowanych z ziela *Centella asiatica* należą monoterypeny, seskwiterpeny, garbniki, fitosterole (kampesterol, β -stigmasterol, β -sitosterol), flawonoidy (kwercetyna, kemferol i ich pochodne glikozydowe, katechiny, naringenina, apigenina i luteolina), aminokwasy, związki kumarynowe, żywice, witaminy A, E, C, K, magnez oraz olejki eteryczne^{3, 5, 8, 9)}. Zawartość poszczególnych substancji w roślinie jest zróżnicowana i zależy od takich czynników, jak miejsce występowania rośliny i czas zbiorów. W uprawach rosnących w Indiach zaobserwowano przewagę kwasu azjatykowego i madekasowego oraz ich pochodnych. W Chinach i na Madagaskarze występują odmiany *Centella asiatica* zawierające więcej pochodnych kwasu madekasowego. Zawartość całej frakcji saponin triterpenowych waha się w zależności od miejsca zbioru w granicach 1–8% mas.^{1, 4, 8)}. Surowcem farmaceutycznym są wysuszone i rozdrobnione części nadziemne *Centella asiatica* L. Z nich otrzymywane są ekstrakty alkoholowe oraz wodne, a także rozcieńczone gliceryną lub glikolem propylenowym, stężone ekstrakty alkoholowe. Poszczególne triterpeny w ekstraktach oznaczane są za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV-VIS. Ma to istotne znaczenie dla zapewnienia powtarzalności sporządzanych ekstraktów, a co się z tym wiąże również skuteczności działania. Dzięki identyfikacji i oznaczeniu ilościowemu saponin triterpenowych w ekstraktach możliwe jest celowane zastosowanie wyciągów z *Centella asiatica* we wspomaganiu leczenia konkretnych schorzeń. Ponadto z rośliny można wyizolować pojedyncze związki, takie jak madekasozyd, azjatykozyl, kwas madekasowy i kwas azjatykowy, dostępne pod nazwami: TECA (titrated extract of *Centella asiatica*) o nazwie handlowej Madecassol®, TTFCA (total triterpenoid fraction of *Centella asiatica*), TTF (total triterpenic fraction) o nazwie handlowej Centellase® i Blastestimulina®, a także CATTF (*Centella asiatica* total terpenic fraction) oraz ETCA (estratto titolato di *Centella asiatica*). TECA i TTFCA zawierają kwas azjatykowy (30% mas.), kwas madekasowy (30% mas.) i azjatykozyl (40% mas.). TTF zawiera 60% mas. mieszaniny kwasu azjatykowego i madekasowego oraz 40% mas. azjatykozylu. W ekstraktach CATTF i ETCA procentowa zawartość związków triterpenowych nie została oznaczona^{1, 3, 8, 9)}.

Saponiny triterpenowe

Triterpeny obejmują szeroką grupę czynnych substancji chemicznych, które odgrywają istotną rolę w mechanizmach działania farmakologicznego wielu roślin leczniczych. Stanowią one najliczniejszą grupę substancji zawartych w ziele *Centella asiatica*, stanowiącą do 8% mas. składowych rośliny. Największą aktywność biologiczną wykazują pochodne ursanu, azjatykozyl i madekasozyd, oraz ich aglikony, takie jak kwas azjatykowy i kwas madekasowy (rysunek). Substancje te charakteryzują się szerokim spektrum działania ogólnoustrojowego i wykazują właściwości przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwtłumiące, przeciwwirusowe, antybakteryjne, immunomodulujące i wspomagające ziarninowanie¹¹⁾. Podsumowanie właściwości terapeutycznych saponin triterpenowych przedstawiono w tabeli. Szczególną uwagę poświęcono działaniu triterpenów na skórę.

Table. Therapeutic properties of triterpene saponins isolated from *Centella asiatica* L. herb and their use in the treatment of diseases¹⁰⁻¹²⁾

Tabela. Właściwości terapeutyczne saponin triterpenowych wyizolowanych z ziela *Centella asiatica* L. oraz zastosowanie ich w leczeniu chorób¹⁰⁻¹²⁾

Saponiny triterpenowe	Właściwości oraz wykorzystanie w leczeniu chorób
Azjatykozyl	właściwości: przyspieszające gojenie ran, owrzodzeń i oparzeń skóry, przeciwzapalne, stymulujące syntezę kolagenu i antyoksydacyjne leczenie chorób: trudno gojące się rany, choroby neurodegeneracyjne, depresja
Madekasozyd	właściwości: neuroprotektoryjne, psychoaktywne, hepatoprotektoryjne, nefroprotektoryjne, ochronne dla płuc, hipoałergiczne, przeciwzapalne, antyoksydacyjne, immunomodulujące, wspomagające gojenie ran, chroniące przed promieniowaniem ultrafioletowym, antybakteryjne (przeciwko <i>P. acnes</i>) leczenie chorób: bielactwo, trądzik, fotostarczenie, rany oparzeniowe, blizny, atopowe zapalenie skóry
Kwas azjatykowy	właściwości: antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwpasożytnicze, spazmolityczne, plemnikobójcze, przyspieszające gojenie ran leczenie chorób: keloidy, rany, atopowe zapalenie skóry, fotostarczenie, choroby kardiologiczne, osteoporoza, hiperlipidemia i choroby wątroby, choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, neuropatie, udar niedokrwieny, epilepsja, upośledzenie funkcji poznawczych, zapalenie przyzębia, cukrzyca
Kwas madekasowy	właściwości: spowalniające procesy starzenia się skóry (anti-aging) leczenie chorób: starzenie skóry

Madekasozyd

Madekasozyd, zwany również azjatykozylem A, jest pięciocyklicznym glikozydem triterpenowym o wzorze sumarycznym $C_{48}H_{78}O_{20}$ i masie cząsteczkowej 975,1 g/mol. Wzór strukturalny madekasozydu przedstawio-

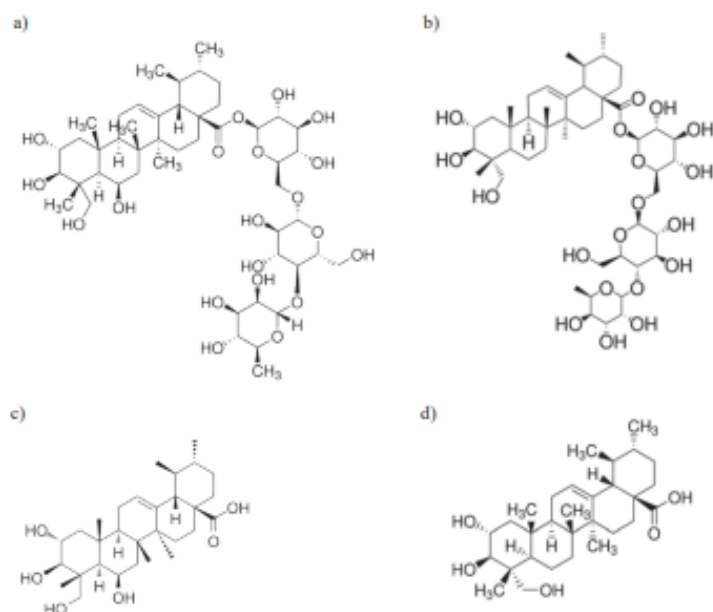


Figure. Chemical formula of madecassoside (a), asiaticoside (b), madecassic acid (c), asiatic acid (d)
 Rysunek. Wzór chemiczny madekasozydu (a), azjatykozydu (b), kwasu madekasowego (c), kwasu azjatykowego (d)

no na rysunku a. Jest związkiem dobrze rozpuszczalnym w wodzie i etanolu (100 mg/mL w 25°C).

Spośród wszystkich saponin triterpenowych madekasozyd występuje w *Centella asiatica* w największej ilości, stanowiącej ok. 8% mas.¹²⁾ Ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie przyjmowany doustnie jest związkiem o dużej biodostępności^{1, 12)}. W badaniach przeprowadzonych przez Hanapi i współpracowników¹³⁾ sprawdzano aktywność ekstraktów z *C. asiatica* przeciwko chorobie Parkinsona na komórkach myszy, traktowanych neurotoksyną MPTP (1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna), która niszczy neurony dopaminergiczne i indukuje tworzenie się wolnych rodników (ROS). W badaniu potwierdzono właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z *C. asiatica*, które zapobiegały utlenianiu lipidów oraz wykazywały działanie neuroprotektoryjne. Wykazano szczególnie wysoki potencjał antyoksydacyjny madekasozydu, który chronił komórki PBEC (*primary human bronchial epithelial cell*) przed stresem oksydacyjnym wywołanym nadtlenkiem wodoru¹³⁾. Madekasozyd należy do składników wpływających na aktywację szlaku sygnalizacyjnego białek Smad i zwiększenie ekspresji genów odpowiedzialnych za proces syntezy kolagenu w fibroblastach⁹⁾. W badaniach *in vitro* potwierdzono większą, w porównaniu z azjatykozydem, skuteczność madekasozydu w stymulowaniu syntezy prokolagenu typu III, a tym samym w szybszym gojeniu się ran⁹⁾. W badaniach przeprowadzonych przez Ling i współpracowników¹⁴⁾ wykazano, że madekasozyd chroni strukturę

mitochondriów przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez nadtlenek wodoru oraz osłabia uszkodzenia oksydacyjne w melanocytach poprzez aktywowanie procesu autofagii. W związku z tym stanowi alternatywną metodę leczenia bielactwa. W badaniu przeprowadzonym przez Shen i współpracowników¹⁵⁾ udowodniono, że madekasozyd hamuje proces zapalny w skórze z trądzikiem poprzez zmniejszenie wydzielania cytokin prozapalnych, IL-1 β oraz receptora toll-podobnego (TLR2), uwalnianych pod wpływem działania bakterii *Propionibacterium acnes* ze stymulowanych przez nie ludzkich komórek monocytowych linii THP-1. Ponadto madekasozyd poprawiał stopień nawilżenia naskórka zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*, a także wykazywał działanie antybakteryjne przeciw *P. acnes*¹⁵⁾. Jung i współpracownicy¹⁶⁾ przeprowadzili badania, w których potwierdzili skuteczność madekasozydu w hamowaniu syntezy melaniny indukowanej promieniowaniem ultrafioletowym.

Azjatykozyd

Azjatykozyd to pięciocykliczny glikozyd triterpenowy o wzorze sumarycznym C₄₈H₇₈O₁₉ (rysunek b) i masie cząsteczkowej 959,1 g/mol. Jest związkiem nierozpuszczalnym w wodzie i etanolu. Rozpuszcza się w dimetylosulfotlenku DMSO (100 mg/mL w temp. 25°C).

Azjatykozyd po raz pierwszy został wyizolowany z *Centella asiatica* na początku lat 50. XX w.⁹⁾ Przypisuje się mu przede wszystkim właściwości leczenia trudno gojących się ran, co wykazano w testach modelowych *in vitro* i *in vivo*⁹⁾. Pierwsze badania nad rolą azjatykozydu w leczeniu ran i owrzodzeń przeprowadzono w latach 50. XX w. Udowodniono również wpływ azjatykozydu na dojrzewanie kolagenu i ograniczenie powstawania blizn w przypadku oparzeń u szczurów dzięki regulowaniu ekspresji białka szoku cieplnego 47. Jako molekularny chaperon kolagenu azjatykozyd wiąże się szczególnie na prokolagencie w retikulum endoplazmatycznym oraz uczestniczy w powstawaniu, modyfikacji i transporcie prokolagenu, który jest ściśle powiązany z syntezą kolagenu¹⁷⁾. W badaniu przeprowadzonym przez Zhang i współpracowników¹⁷⁾ wykazano na modelu szczurzym, że azjatykozyd może przyspieszyć gojenie się skóry w przypadku owrzodzeń cukrzycowych, indukuje wytwarzanie tkanki łożyskowej i przyspiesza angiogenezę. Po 14 dniach od podania azjatykozydu zaobserwowano prawie całkowite zagojenie uszkodzonego naskórka szczurów, a fibrobla-

sty w komórkach efektorowych szybko proliferowały¹⁷⁾. Związek ten działa ponadto przeciwzapalnie (m.in. w artretyzmie), anksjolitycznie, jako przeciwutleniacz oraz hamuje tworzenie się wrzodów¹¹⁾. W badaniach przeprowadzonych przez Wan i współpracowników¹⁸⁾ udowodniono, że azjatykozyd w eksperymentalnych dawkach, w badaniu na modelach zwierzęcych hamował gorączkę i reakcję zapalną wywołaną lipopolisacharydami (LPS), w tym wytwarzanie TNF- α i IL-6 w surowicy, aktywność mieloperoksydazy wątrobowej (MPO), ekspresję białka COX-2 w mózgu i wytwarzanie prostaglandyny E (PGE). Doniesiono także, że azjatykozyd G wykazuje właściwości przeciwzapalne w komórkach RAW 264.7 stymulowanych LPS¹⁹⁾. Azjatykozyd może łagodzić uszkodzenia neuronów, wykazuje działanie przeciwlękowe i może zachowywać się jak środek przeciwdepresyjny¹²⁾. Razem z madekasozydem odgrywają rolę w leczeniu urazów niedotleniowo-niedokrwiennych mózgu oraz są stosowane w leczeniu różnych chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera¹²⁾.

Kwas madekasowy

Kwas madekasowy jest aglikonem madekasozydu o wzorze sumarycznym $C_{30}H_{48}O_6$ (rysunek c) oraz masie cząsteczkowej 504,70 g/mol¹⁹⁾. Jest związkiem nierozpuszczalnym w wodzie, natomiast rozpuszcza się w DMSO (100 mg/mL) oraz częściowo w etanolu (16 mg/mL). Wykazuje działanie antyoksydacyjne, łagodzące, regenerujące i przeciwzapalne. Stymuluje syntezę kolagenu w skórze⁹⁾.

Kwas azjatykowy

Kwas azjatykowy, pięciocykliczny triterpen, jest aglikonem azjatykozydu, o wzorze sumarycznym $C_{30}H_{48}O_5$ i masie cząsteczkowej 488,70 g/mol^{9, 11)}. Wzór strukturalny kwasu azjatykowego przedstawiono na rysunku d. Jest związkiem trudno rozpuszczalnym w wodzie ($5,98 \cdot 10^{-2}$ mg/L w 25°C). Kwas azjatykowy może powstawać z azjatykozydu w wyniku hydrolitycznej degradacji ugrupowań cukrowych¹¹⁾. Wykazuje działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnadciśnieniowe, antibakteryjne, neuroprotektoryjne, kardioprotektoryjne, przeciwnowotworowe i regulujące apoptozę¹¹⁾. W licznych badaniach *in vitro* oraz *in vivo* potwierdzono wpływ kwasu azjatykowego na wiele enzymów, takich jak receptory, czynniki wzrostu, czynniki transkrypcyjne i białka apoptotyczne. Wykazano, że kwas azjatykowy wspomaga gojenie ran oraz może być stosowany w chorobach, takich jak zwłóknienie wątroby, niedokrwienie mózgu, otyłość, choroba Parkinsona i Alzheimera^{11, 19)}. Niestety, związek ten w organizmie łatwo ulega metabolizmowi, dlatego jego biodostępność ustna jest dość mała¹¹⁾. Na przestrzeni ostatnich lat pojawiło się wiele badań *in vitro* oraz *in*

vivo opisujących farmakologiczny i molekularny mechanizm działania kwasu azjatykowego. Z punktu widzenia dysfunkcji zachodzących w skórze szczególne znaczenie ma modulacja enzymów i receptorów metaloproteiny macierzy (MMP-2) oraz receptorów końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGE), potwierdzone w badaniu fotostarzenia skóry z wykorzystaniem indukowanego promieniowaniem UVA²⁰⁾, indukcja plazminogenu-1 oraz receptora PPAR- γ , mających znaczenie w powstawaniu keloidów^{10, 11, 21)}, hamowanie cyklooksygenazy-2 (COX-2) oraz syntazy tlenku azotu (NOS), indukujących stan zapalny w przebiegu procesu powstawania rany oraz atopowego zapalenia skóry^{11, 21)}. Kwas azjatykowy blokuje indukowaną przez UVA aktywację MMP-2, genu p53, wytwarzanie ROS, a tym samym hamuje peroksydację lipidów, chroniąc skórę przed fotostarzeniem²⁰⁾. Badania przeprowadzone przez Tang i współpracowników²²⁾ wykazały, że kwas azjatykowy hamuje odkładanie kolagenu w fibroblastach obecnych w keloidach (bliznowcach) poprzez tłumienie ekspresji inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1), aktywując receptor gamma (PPAR- γ). Aktywacja PPAR- γ hamuje sygnalizację transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β) oraz czynników transkrypcyjnych Smad, dzięki czemu zmniejsza odkładanie kolagenu w tkance bliznowca i włóknienie nabłonka mezenchymalnego^{11, 22)}. W badaniach przeprowadzonych przez Somboonwong i współpracowników²³⁾ na szczurach udowodniono, że ekstrakty zawierające kwas azjatykowy i inne triterpeny z *Centella asiatica* wspomagają gojenie się ran, również oparzeniowych, poprzez pobudzanie proliferacji fibroblastów i syntezy kolagenu typu I i III^{5, 9, 11, 19, 23)}. Jednak to kwas azjatykowy i azjatykozyd w największym stopniu wpływają na zwiększenie proliferacji fibroblastów oraz ilości hydroksyprowiny po zastosowaniu bezpośrednio na ranę^{5, 19, 21)}. Ponadto kwas azjatykowy bezpośrednio wpływa na zmniejszenie rozstępów i blizn skórnych, a także zapobiega ich powstawaniu⁹⁾. Podawany doustnie myszom stymulował proliferację komórek i przywracał równowagę MMP-1/TIMP-1 regulujących szlak sygnałowy TGF- β /Smad^{11, 24-26)}. Kwas azjatykowy aktywuje geny czynników wzrostu oraz geny odpowiedzialne za proces angiogenezy i przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej^{5, 11)}.

Podsumowanie

Na przestrzeni kilkunastu lat badania nad działaniem ekstraktu z *Centella asiatica* L. skupiały się głównie na jego wpływie na proces gojenia ran oraz hamowania tworzenia się blizn. W licznych badaniach potwierdzono również działanie przeciwzapalne oraz immunomodulujące ekstraktu oraz wyizolowanych z niego saponin triterpenowych.

Otrzymano: 27-02-2024

LITERATURA

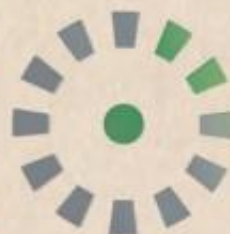
- [1] K. Karłowicz-Bodalska, S. Han, T. Han, M. Miranowicz, A. Bodalska, *Post. Fitoter.* 2013, **13**, nr 4, 225.
- [2] W. Bylika, P. Znajdek-Awizeń, E. Studzińska-Sroka, M. Brzezińska, *Post. Derm. Alergol.* 2013, **30**, nr 1, 46.
- [3] A. Ratz-Łyko, J. Arct, *Kosmetyczne, Pol. J. Cosmetol.* 2015, **18**, 25.
- [4] D.C. Roy, S.K. Barman, M.M. Shaik, *Med. Plant Res.* 2013, **3**, 20.
- [5] M. Wyszowska-Kolatko, P. Koczurkiewicz, K. Wójcik, E. Pękala, *Post. Fitoter.* 2015, **15**, nr 3, 184.
- [6] M. Liu, Y. Dai, Y. Li i in., *Planta Med.* 2008, **74**, 809.
- [7] H. Matsuda, T. Morikawa, H. Ueda, M. Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull.* 2001, **49**, 1368.
- [8] B. Sun, L. Wu, Y. Wu, C. Zhang, L. Qin, M. Hayashi, M. Kudo, M. Gao, T. Liu, *Front. Pharmacol.* 2020, **11**, 1.
- [9] H.Y. Alfara, M. Nor Omar, *Int. J. Biosci.* 2013, **3**, 49.
- [10] D. Bian, J. Zhang, X. Wu, Y. Dou, Y. Yang, Q. Tan i in., *Int. J. Biol. Sci.* 2013, **9**, 1032.
- [11] M.F.N. Meeran, S.N. Goyal, K. Suchal, C. Sharma, C.R. Patil, S.K. Ojha, *Front. Pharmacol.* 2018, **9**, 892.
- [12] S. Bandopadhyay, S. Mandal, M. Ghorai, N. Kumar Jha, M. Kumar i in., *J. Cell Mol. Med.* 2023, **27**, 593.
- [13] N.A. Hanapi, A.S. Mohamad Arshad, J.M. Abdullah, T.S. Tengku, S.R. Yusof, *J. Pharm. Sci.* 2021, **110**, 698.
- [14] Y. Ling, Q. Gong, X. Xiong i in., *Oncotarget* 2017, **8**, 51066.
- [15] X. Shen, M. Guo, H. Yu, D. Liu, Z. Lu, Y. Lu, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2019, **83**, 561.
- [16] E. Jung, J.A. Lee, S. Shin, K.B. Roh, J.H. Kim, D. Park, *Molecules* 2013, **18**, 15724.
- [17] D.D. Zhang, H. Zhang, J.F. Zhao, H.J. Shi, J.W. Yang, X.Q. Nie, *Chin. Pharm. J.* 2017, **52**, 643.
- [18] J.Y. Wan, X. Gong, R. Jiang, Z. Zhang, L. Zhang, *Phytother. Res.* 2012, **27**, 1136.
- [19] L.R. Leite Diniz, L.L. Calado, A.B.S. Duarte, D. Pergentino de Sousa, *Metabolites* 2023, **13**, 276.
- [20] Y. Soo Lee, D.Q. Jin, S.M. Beak, E.S. Lee, J.A. Kim, *Eur. J. Pharmacol.* 2003, **476**, 173.
- [21] G.H. Moon, Y. Lee, E.K. Kim, K.H. Chung, K.J. Lee, *Nutrients* 2021, **13**, 2448.
- [22] B. Tang, B. Zhu, Y. Liang, L. Bi, Z. Hu, B. Chen i in., *Arch. Dermatol. Res.* 2011, **303**, 563.
- [23] J. Somboonwong, M. Kankaisre, B. Tantisira, M.H. Tantisira, *BMC Complement. Altern. Med.* 2012, **20**, 103.
- [24] P. Lin, H.-Y. Shi, Y.-Y. Lu, J. Lin, *J. Ethnopharmacol.* 2023, **317**, 116746.
- [25] Ö. Kukula, S. Kirmizikan, E.S. Tiryaki, M.N. Çiçekli, C. Günaydin, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2022, **44**, 367.
- [26] B. Brinkhaus, M. Lindner, D. Schuppan, E.G. Hahn, *Phytomedicine* 2000, **7**, 427.

Międzynarodowe Targi Ekologii i Ochrony Środowiska INTARG® EKO 2024

INTARG® EKO



21–23 maja 2024



Międzynarodowe Centrum Kongresowe w Katowicach



Article

Controlled Release of Madecassoside and Asiaticoside of *Centella asiatica* L. Origin from Sustainable Cold-Processed Topical Formulations

Monika Krzyżośtan ^{1,2} , Agata Wawrzyńczak ^{1,*}  and Izabela Nowak ^{1,*} 

¹ Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland; monika.krzyzostan@amu.edu.pl

² Dr Koziej Instytut Badań Kosmetyków, Czerniakowska 58, 00-717 Warsaw, Poland

* Correspondence: agata.wawrzynczak@amu.edu.pl (A.W.); nowakiza@amu.edu.pl (I.N.)

Abstract: *Centella asiatica* L. extract is a promising natural agent for the treatment of atopic dermatitis. It significantly reduces inflammation due to its immunomodulatory properties, mainly attributed to the presence of pentacyclic triterpenes, namely madecassoside and asiaticoside. Their incorporation into sustainable cold-processed topical formulations, such as emollient-rich emulsions and cosmetic gel containing natural hydrophilic polymers, should inhibit inflammation in atopic skin. Therefore, the objective of this study is to investigate the controlled release of madecassoside and asiaticoside isolated from *Centella asiatica* L., loaded into topical formulations, namely emollient-rich O/W and W/O emulsions and cosmetic gel, which could support the treatment of atopic dermatitis. The carriers of active substances have been prepared with sustainable emulsifiers, active substances, and emollients obtained by green technologies from food industry wastes. Low-energy methods during the carrier emulsification process were applied to reduce carbon footprints and preserve the valuable properties of the raw materials used. The influence of the *Centella asiatica* L. extract on the physicochemical properties of the formulations was studied, showing a satisfactory degree of stability of the formulations obtained. Moreover, factors that may influence the mechanism and kinetics of the release of madecassoside and asiaticoside, such as the concentration of the active substance, the pH of the dissolution medium, and the type of the carrier, have been tested and widely discussed.

Keywords: madecassoside; asiaticoside; *Centella asiatica* L.; sustainable topical formulations; low-energy emulsification; controlled release; kinetic parameters



Citation: Krzyżośtan, M.;

Wawrzyńczak, A.; Nowak, I.

Controlled Release of Madecassoside

and Asiaticoside of *Centella asiatica* L.

Origin from Sustainable Cold-

Processed Topical Formulations.

Molecules 2024, 29, 5583. <https://doi.org/10.3390/molecules29235583>

Academic Editors: Katarzyna

Gawel-Bęben and Anna Nowak

Received: 21 October 2024

Revised: 18 November 2024

Accepted: 19 November 2024

Published: 26 November 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

Centella asiatica L. is a herbal plant from the Apiaceae family and Asiatica Linn. Species [1,2]. It is a perennial plant growing around water reservoirs throughout the majority of tropical and subtropical regions, such as India, Pakistan, Sri Lanka, Madagascar, South Africa, China, Korea, Japan, and Taiwan [3,4]. *Centella asiatica* L. has been widely used in Ayurvedic medicine for thousands of years to treat skin diseases, such as acne, leprosy, lupus, ulcers, eczema, psoriasis, scleroderma, vitiligo, burns, wounds, and scars [2,5]. Moreover, it has a long history of internal use as a treatment for nervous system illnesses, such as sleep disorders, depression, and Alzheimer's disease, due to its calming effect, improving memory and concentration [6]. The main bioactive compounds of *Centella asiatica* L. responsible for the therapeutic effects of the plant are pentacyclic triterpenoids, namely asiaticoside and madecassoside, and their aglycones, such as asiatic acid and madecassic acid [4,5,7]. The content of the triterpene saponin fraction varies from 1 wt.% to 8 wt.%, depending on the plant's growth location [5]. Madecassoside (asiaticoside A) represents ursane-type triterpene glycoside and is the most abundant triterpenoid of this plant, with an asiaticoside as a second one. Other substances isolated from the aerial part of *Centella asiatica* L. include monoterpenes, sesquiterpenes, tannins, phytosterols, flavonoids,

essential oils, amino acids, and vitamins, such as vitamin C, vitamin B1, and vitamin B2 [4,5]. Pentacyclic triterpenoids offer a wide range of pharmacological properties related to the anti-inflammatory, immunomodulatory, antioxidant, antiviral, antibacterial, wound healing, neuroprotective, cardioprotective, hepatoprotective, anxiolytic, antifibrotic, anti-arthritis, anti-tumor, and anti-depressant activities [5,7]. Over the years, numerous studies have been conducted on the release of madecassoside and asiaticoside from intravenously or orally administered carriers, such as nanogels [8], alginate-chitosan nanoparticles [9,10], solid dispersion [11,12], capsules [13], and phospholipid-based nanovesicles [14].

Centella asiatica L. extracts containing asiaticoside and madecassoside, due to the ability to stimulate collagen synthesis in human fibroblasts and lipolytic, anti-inflammatory, immunomodulatory, antibacterial, and antioxidant activities, are widely used in dermatology and cosmetology for treatment of acne, burns, wounds, psoriasis, vitiligo, and as a preventive agent against stretch marks and skin aging [4,6,7]. Moreover, *Centella asiatica* L. has been used in skin care products for restoration of skin firmness and elasticity, as well as in body care products to reduce cellulite and stretch marks [5,15]. Due to its numerous applications in the treatment of skin diseases, the possibility of using a standardized *Centella asiatica* L. extract in dealing with atopic dermatitis has also been explored. Characteristic symptoms of atopic dermatitis are erythematous and papulovesicular eruptions, which frequently develop into oozing, crusting, and persistent and severe itching, resulting from dry skin [16]. Madecassoside and asiaticoside, present in the standardized ethanolic extract of *Centella asiatica* L. or isolated from this plant as pure chemical compounds, act as a responsive factor to the key inflammatory processes occurring in the skin with atopic dermatitis. The immunomodulatory and anti-inflammatory properties of *Centella asiatica* L. extract and isolated triterpenoids were confirmed using in vitro and in vivo studies conducted by independent research groups [17–19]. 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced skin inflammation has been tested by Lee et al. by using in vitro and in vivo mouse models of atopic dermatitis skin [17]. In addition, the effect of the titrated extract of *Centella asiatica* L. (TECA) in a phthalic anhydride-induced atopic dermatitis animal model was studied by Park et al. [18]. Both groups confirmed that *Centella asiatica* L. extract inhibits hyperkeratosis and infiltration of inflammatory cells in atopic dermatitis lesions. These studies indicate that extracts of *Centella asiatica* L. or triterpene saponins isolated from this plant can be considered safe and effective therapeutic agents supporting atopic dermatitis treatment. Opposite to the glucocorticosteroids or calcineurin inhibitors commonly used during atopic dermatitis treatment, they do not show any side effects, such as skin atrophy or burning and stretch marks [19]. Therefore, studies on the release of triterpenoids from *Centella asiatica* L. from a variety of carriers applied to the skin have been recently conducted [20]. Among them, specific types of nanocarriers have been applied, namely nanoemulsions [21], solid lipid nanoparticles (SLN) [22], nanostructured lipid carriers (NLC) [23], polymeric nanoparticles [24], and liposomes [25]. Also, film-forming polymeric solutions (FFPS) [26,27], bilayer microneedles [28], ultra-fine cellulose acetate fiber mats [29], and electrospun double-layered nanocomposite membranes [30] were tested as topical carriers for the *Centella asiatica* L. extracts.

Due to the increasing consumers' demands and obligations of the European Green Deal implementation, the recent trends in the cosmetic industry strongly move towards sustainability, which plays an important role in protecting ecosystems and biodiversity as it brings the possibility of obtaining environmentally friendly raw materials. This may be achieved by reducing carbon footprint and waste production, optimizing production processes, using green technologies, and applying ingredients obtained from agro-food wastes [31]. However, designing and marketing high-quality sustainable, eco-friendly, and biodegradable formulations stands as a big challenge to the cosmetic industry. There are several strategies for achieving sustainability in cosmetic products, with one based on replacing synthetic raw materials with those processed according to the green chemistry principles or COSMOS-approved natural ingredients [32]. Another strategy is based on lowering energy consumption during the acquisition of raw materials and production

of cosmetics. This approach brings the reduction of the amount of greenhouse gases released, expressed as carbon dioxide equivalent units. As a result, studies regarding the development of sustainable cosmetic carriers using low-energy processes appear [33,34]. The study conducted by Tamburic et al. confirmed that using hot-cold emulsification, which is between the cold and hot manufacturing process of emulsions, saved approximately 82% (for O/W type emulsion) and 86% (for W/O type emulsion) of thermal energy in comparison to the hot process [33]. Moreover, Raposo et al. compared costs of the cold emulsification to the hot process and found that cold-processed O/W emulsions saved 67% in electrical, 36.7% in water, and 17.1% in the total production expenses [34]. The cold-processed emulsions allow not only to optimize production costs and minimize the carbon footprint but also enable the preservation of the valuable properties of natural ingredients, specifically oils used in the formulation, since oil-based ingredients under high temperature conditions are particularly susceptible to the oxidation process, resulting in the formation of free radicals [35,36]. The use of carriers based on oxidized oils can intensify inflammation on the skin, especially with atopic dermatitis [37]. Low-temperature emulsions processing, which supports the stability of lipid-based raw materials, becomes even more important when dealing with lipid-rich cosmetic formulations, so-called “emollient plus” products. The treatment of atopic dermatitis can also be supported by the dermal application of this type of product, as they minimize systemic effects and give good results in achieving remission of disease [38,39].

Conventional carriers such as W/O, O/W emulsions, and gels are the most commonly used types of formulations in the cosmetic industry. Therefore, studying the release of triterpenoids from *Centella asiatica* L. with high anti-inflammatory and immunomodulatory potential will provide important information on the potential of the most optimal type of carriers. However, there is very limited research available on the release of anti-inflammatory triterpenoids, such as madecassoside and asiaticoside, from sustainable, environmentally friendly, and cold-processed conventional topical formulations, which can support the treatment of atopic dermatitis. For this reason, we have developed three types of topical carriers obtained by a cold process with low energy consumption and a noteworthy reduction in carbon footprint. A variety of emollient-rich carriers, namely O/W and W/O emulsions, were designed, taking into account the needs of the atopic skin, as they contained 31 wt.% and 21 wt.% of emollients for W/O and O/W emulsion types, respectively. Special emphasis was paid on replacing the conventional raw materials with their substitutes obtained in accordance with the green chemistry principles or derived from the agro-food industry waste. The high potential of their biodegradability and low toxicity to aquatic organisms was taken into account, as well. All of the raw materials used to prepare the formulations were COSMOS-approved and met the requirements of Ecocert standards. The obtained topical formulations were evaluated towards their suitability for madecassoside and asiaticoside controlled release, with a special emphasis on the possibility of applying to skin suffering from atopic dermatitis. An important aspect of our research was also to verify the effect of pH on the release profile of madecassoside and asiaticoside from the tested carriers, which will have a direct influence on the therapeutic effectiveness of the topical formulations used, as one of the elements of pathophysiology of atopic dermatitis is an imbalance in the pH of the skin acidic mantle, which has been recognized as a regulating factor of skin barrier permeability and homeostasis of stratum corneum [40,41]. To the best of our knowledge, there is very little data available on the parameter optimization (e.g., pH of the medium, concentration of the active substance) and kinetic study for the controlled release from cold-processed topical formulations serving as carriers for triterpenoids of *Centella asiatica* L. origin with a potentially therapeutic effect in the atopic skin.

2. Results and Discussion

2.1. Characteristic of Cold-Processed Emulsions and Gel

2.1.1. Sustainability of the Topical Formulations

During the development and preparation of carriers for saponin triterpenoids derived from *Centella asiatica* L., special emphasis was paid on replacing conventional raw materials with their substitutes obtained in accordance with the green chemistry principles, derived from the food industry by-products, and characterized by high values of biodegradability (at least 60% in 28 days, according to OECD methods). Moreover, low toxicity to aquatic organisms was also taken into account. It was not only to follow the requirements of the modern cosmetic market but also to take into account the potential applications of the obtained products as cosmetics for atopic skin. Emulsions and gel were obtained with COSMOS-approved raw materials, meeting the requirements of Ecocert standards. Therefore, the obtained topical formulations can be recognized as sustainable [42]. They contain vegan ingredients of natural origin that were obtained by physical, biotechnological, or chemical methods in accordance with the principles of green chemistry. At least 10% of all raw materials used in each formulation come from upcycling of agro-food by-products. For example, Tocomix L70-IP Organic CO contains tocopherols with antioxidant properties derived from by-products in the refinery process of soybean oil, whereas polymeric emollient Citropol H was obtained from side-stream turpentine generated during the paper-making process. Moreover, E-Leen green C is a vegetal-based preservative that contains 100% renewable carbon. It shows two-in-one action, namely, it protects formulations against microbiological contamination, especially from bacteria and yeasts, and it has a beneficial effect on the skin epidermal barrier thanks to its moisturizing and re-fattening properties. Besides pentylene glycol, it also contains glyceryl caprylate/caprate, serving as a humectant and a non-ionic co-emulsifying emollient that is mild to the skin. On the other hand, the hemp oil used in the manufacturing of Galehemp® OW is certified as a non-psychoactive ingredient according to European regulations, as it comes from the European type of hemp, which is a non-psychoactive plant (THC less than 0.2 wt.%). The details regarding the origin of the raw materials, their production methods, biodegradability, and toxicity to aquatic organisms are presented in Table 1.

Table 1. Sustainability parameters of raw materials used in formulations (based on Material Safety Data Sheets and documentation shared by producers of raw materials).

Trade Name of Raw Material	Origin of Ingredients	Green Technology	Food Waste Origin	Bio-Degradability	Toxicity to Aquatic Organisms
TEGO® Natural Madecassoside	Vegetable: <i>Centella asiatica</i> L. leaves	Extraction and purification of <i>Centella asiatica</i> L.	---	No data available	No data available
Asiaticoside®	<i>Centella asiatica</i> L. leaves	Extraction, drying	---	No data available	No data available
EWO—Vegetable Emulsifier	Olive oil fatty acids	Olive oil fatty acids collected from olive oil refineries and purified into olive oil unsaponifiable	Olives from industry by-products	Readily biodegradable: 69–95% in 28 days (OECD 301B).	No data available
Softigen®Pura	Vegetable: seeds from rapeseed, palm kernel oil or seed coconut oil	Refined, blanched, deodorized	---	No data available	No data available

Table 1. Cont.

Trade Name of Raw Material	Origin of Ingredients	Green Technology	Food Waste Origin	Bio-Degradability	Toxicity to Aquatic Organisms
Phytosqualan®	Vegetable: olives	Esterification, distillation, saponification, hydrogenation, winterization	Olives from food waste	Readily biodegradable: 67% in 28 days (OECD 301B)	No data available
Synovea® EL	Vegetable: safflower seed oil	Green esterification	---	Readily biodegradable: 100% in 28 days (OECD 301B)	No data available
LIPEX® Omega 3/6™	Vegetable oils	Mechanical extraction, refining, deodorizing	---	Readily biodegradable (OECD 301B)	Non-toxic to freshwater algae and low acute aquatic toxicity
LIPEX® PreAct™	Vegetable: seeds from rapeseed	Mechanical pressing, deodorizing, hydrogenation, filtration, solvent extraction	---	Readily biodegradable (OECD 301B)	Non-toxic to freshwater algae and low acute aquatic toxicity
Akogel™	Vegetable: fruit from coconut nucifera, seeds of <i>Glycine max</i> , <i>Brassica napus</i> , and <i>Arecaceae</i> .	Mechanical extraction, solvent extraction, refining, deodorizing, hydrogenation	---	Readily biodegradable (OECD 301F)	Non-toxic to freshwater algae and low acute aquatic toxicity
Raspberry Necta®	Vegetable: raspberries seeds	Cold-processed extraction	Raspberries pulp as a waste product of the juice production industry.	Readily biodegradable (OECD 301F)	Not determined
Emotion® Light	Vegetable: <i>Silybum marianum</i> seed oil	Pure pelargonic acid: distillation and hydrolysis of <i>Silybum marianum</i> seed oil; sustainable esters: high-temperature esterification	---	Readily biodegradable: 81.23% in 28 days (OECD 301B)	Not classified for environmental hazards. Aquatic acute toxicity: EC50 (10 days) <i>Desmodesmus subspicatus</i> > 4.4 mg/L
CeraFluid®	Vegetable: triolein and glyceryl dioleate from <i>Olea europaea</i> ; Biotechnology: Ceramide NP	Triolein and glyceryl dioleate: distillation of olive fruit oil for pure fatty acids and their esterification. Ceramide NP: amidation reaction of vegetal stearic acid on phytosphingosine, obtained through bio-fermentation process using yeasts on vegetable substrate.	Olive fruit from food waste.	Readily biodegradable (OECD 301B)	Short term toxicity to fish: LC50 (48 h) 1–10 g/L Short term toxicity to aquatic invertebrates: EL50 (48 h) 100 mg/L Long term toxicity to aquatic invertebrates: NOELR (21 days) 10 mg/L, LOELR (21 days) 10 mg/L Toxicity to aquatic algae and cyanobacteria: EL50 (72 h) 296–320 mg/L

Table 1. Cont.

Trade Name of Raw Material	Origin of Ingredients	Green Technology	Food Waste Origin	Bio-Degradability	Toxicity to Aquatic Organisms
Ceramidone®	Vegetable: L-glutamic acid	Cyclization of L-glutamic acid to L-pyrrolidone carboxylic acid (L-PCA); esterification of L-PCA to octyldodecyl ester.	---	Readily biodegradable (OECD 301D)	Not considered harmful to aquatic organisms; not causing long-term adverse effects on the environment: EC50 <i>Daphnia magna</i> : 2.6 mg/L; EC50 (72 h) algae: 12 mg/L.
Tocomix L70-IP Organic CO	Tocopherol: soy beans; <i>Helianthus annuus</i> seed oil: sunflower seeds	Tocopherol: separation in refining stream, purification; <i>Helianthus annuus</i> seed oil: pressing of seeds, refining of crude oil.	From a stream by-product in the refinery process of soybean oil.	Inherently biodegradable (OECD 301F)	Not considered harmful to aquatic organisms: LC50 (96 h) fish: >10 mg/L; EC50 (72 h) algae: >25.8 mg/L
ZEMEA®	Vegetable: industrial corn converted to technical starch and next converted to glucose	Fermentation process	---	Readily biodegradable: 70.5% in 28 days (OECD 301B)	Not considered harmful to aquatic organisms: LC 50 (96 h) fish: >9.72 mg/L
RonaCare® Magnesium Sulphate	Mineral	Naturally occurring	---	Biodegradability assessment methods do not apply to inorganic substances.	LC50 (48 h) <i>Daphnia magna</i> : 720 mg/L; EC50 (18 days) <i>Chlorella vulgaris</i> : 2.7 mg/L
E-Leen Green C	Vegetal: Pentylene Glycol: sugar cane bagasse; Glyceryl Caprylate/Caprate: palm kernel oil (seeds of the fruit of the oil palm), coconut oil (fruits of the coconut palm), rapeseed oil (<i>Brassica napus</i>), sunflower oil (<i>Helianthus annuus</i>).	Pentylene glycol: steam distillation of sugarcane bagasse (<i>Saccharum officinarum</i>), catalytic hydrogenation, purification; Glyceryl Caprylate/Caprate from vegetable origin melted at 40–50 °C, added to Pentylene Glycol and stirred at ambient temperature.	---	Readily biodegradable: Pentylene Glycol: 73% within 28 days (OECD 301E); Glyceryl Caprylate/Caprate: 82.6% within 28 days (OECD 301B)	Pentylene glycol: OECD 203—LC50 (96 h) zebra fish: >1096 mg/L; EU Directive 79/831/EWG Appendix V—EC50 (48 h) <i>Daphnia magna</i> : >500 mg/L; Glyceryl Caprylate/Caprate: short-term toxicity to fish and aquatic invertebrates: no toxicity up to the limit of water solubility; toxicity to aquatic algae and cyanobacteria: ErL50 (72 h) nominal, loading rate = 49 mg/L; NOErLR (72 h), nominal, loading rate = 20.7 mg/L; NOEC (72 h), measured concentration = 1.19 mg/L

Table 1. Cont.

Trade Name of Raw Material	Origin of Ingredients	Green Technology	Food Waste Origin	Bio-Degradability	Toxicity to Aquatic Organisms
Galehemp OW	Polyglycerine-4—mixture of refined polyglycerols of vegetable origin; hemp seed oil—product extracted by mechanical pressing from the fruits of <i>Cannabis sativa</i> L.; Caprylyl/Capryl Glucoside—mild, non-ionic surfactant obtained from renewable raw materials.	Transesterification of Polyglycerine-4 and <i>Cannabis sativa</i> seed oil resulting in <i>Cannabis sativa</i> seed oil polyglyceryl-4 esters; mixing with caprylyl/capryl glucoside and water resulting in trans-esters between tetraglycerol and hemp seed oil.	---	Readily biodegradable (OECD 301B)	No data available
Citropol H	Raw material terpenes from Forest Stewardship Council (FSC) certified pine.	Intensified continuous etherification	Side-stream turpentine from the paper making process	Inherently biodegradable (OECD 301B)	No data available
Instathix®	Xanthan Gum: biotechnological process; Tapioca Starch: naturally derived from tapioca; Algin: naturally derived from brown seaweed; Sodium Stearoyl Lactylate: biotechnological processes.	Xanthan Gum: fermentation of glucose by <i>Xanthomonas campestris</i> ; Tapioca Starch: physical processing of tapioca; Algin: physical extraction of brown seaweed; Sodium Stearoyl Lactylate: esterification of palm oil (RSPO Mass Balance) with biotechnologically obtained lactic acid.	---	Readily biodegradable (OECD 301B)	Low toxicity to invertebrates, fish and algae.
HyaCare® Tremella	Vegetable	Extraction followed by purification of <i>Tremella fuciformis</i> sporocarp	---	No data available	No data available

When designing and processing sustainable carriers of active substances, both in the cosmetic and pharmaceutical industries, low energy consumption is essential for reducing the carbon footprint in the environment and should become a standard. For this reason, we have developed three types of sustainable topical carriers for madecassoside and asiaticoside, namely O/W and W/O emulsions and gel, which were obtained by cold processes. Cold-processed emulsions are more difficult to stabilize due to the lack of possibility of using solid wax thickeners in the oil phase. Therefore, other solutions are required to obtain a stable product. A thorough screening of the raw materials market allowed us to select

and test modern non-ionic emulsifiers, which enabled us to perform the cold emulsification process. The non-ionic EWO emulsifier was selected for obtaining W/O emulsion because of its natural origin and ability to stabilize such systems. Moreover, it gives a long-lasting moisturizing effect, and it is characterized by good compatibility with sensitive skin, which is especially important in cosmetic products dedicated to people suffering from atopic dermatitis. On the other hand, the non-ionic emulsifier Galehemp OW was applied during O/W emulsion synthesis. Apart from its emulsifying properties, it provides emollient and moisturizing properties. As one of the few O/W emulsifiers, it is suitable for preparing cold-processed emulsions. Cold-processed emulsification with non-ionic emulsifiers did not require the thermal energy normally used to heat the phases of emulsions and only mechanical energy for the dispersion of droplets and their homogenization was necessary. As a result, energy consumption and economic costs for obtaining emulsion-type carriers for testing controlled release of madecassoside and asiaticoside were significantly reduced. In the case of preparing gel-type carriers highly efficient in the cold process, natural polymers, such as xanthan gum, alginate, and tapioca starch, were used.

By paying special attention to the environmental aspects of designing and formulation of topical carriers, we were also able to respond to the global trends and the European Green Deal principles, which assume that the EU economy will become zero-emission by 2050 [43]. In addition, the implementation of low-energy processing during emulsion synthesis is cost-efficient because it allows us to reduce the emulsification temperature by more than 50 °C when compared to the conventional processes commonly used in the cosmetic and pharmaceutical industries. According to Raposo et al., cold emulsification gives a reduction of 67% in electrical, 36.7% in water, and 17.1% in total production expenses when compared to the hot process [34].

2.1.2. Organoleptic Assessment and Physicochemical Properties of Topical Formulations

The initial physicochemical parameters, such as pH, viscosity, and density, in the formulations prepared were measured. The results are given in Table 2.

Table 2. Physicochemical parameters of topical formulations containing 10 wt.% of *Centella asiatica* L. extract.

Color, Odor	pH	Viscosity, cP *	Density, g/mL
white to cream, homogeneous bulk, with odor characteristic to use raw materials	Emulsion O/W		
	5.45 ± 0.01	605.40 ± 4.84	0.999 ± 0.001
	Emulsion O/W + 10 wt.% of <i>Centella asiatica</i> L. extract		
	5.30 ± 0.01	394.20 ± 5.45	0.998 ± 0.001
white to cream, homogeneous bulk, with odor characteristic to use raw materials	Emulsion W/O		
	5.32 ± 0.01	6548.20 ± 13.32	1.000 ± 0.002
	Emulsion W/O + 10 wt.% of <i>Centella asiatica</i> L. extract		
	5.10 ± 0.01	4993.60 ± 15.32	1.000 ± 0.001
semi-transparent, opalescence, and homogeneous gel, without specific odor	Gel		
	4.93 ± 0.01	1230.13 ± 7.80	0.999 ± 0.001
	Gel + 10 wt.% of <i>Centella asiatica</i> L. extract		
	4.80 ± 0.02	1050.03 ± 8.60	0.999 ± 0.001

* SC4-29 with 100 rpm for W/O emulsion and SC4-21 with 100 rpm for O/W emulsion and gel.

All of the synthesized topical emulsions were homogeneous, characterized by a light color and a delicate odor, typical of the raw materials used. The gel, on the other hand, was a homogeneous, semi-transparent, and opalescence product without any odor (Figure S1). The appearance of the initial formulations did not differ from that of the formulations after

the introduction of 10 wt.% of *Centella asiatica* L. extract. Also, the density of all products was similar and oscillated around the value of 1 g/mL.

As can be seen in Table 2, the pH of the obtained formulations ranges from 5.45 and 5.32 for the O/W and W/O emulsions, respectively, to a value of 4.93 for the gel. These differences are mainly due to the ingredients used to obtain the products. The introduction of the extract results in a slight decrease in the pH value of all formulations. The lower pH of the gel is most likely due to the Instathix® thickener used, which is based on a lactic acid derivative. As shown, topical formulations of an acidic nature can lower the pH of the skin without destroying its protective barrier [44]. Additionally, we may assume that the higher acidity of the gel-based formulation can have a positive effect on the skin affected by atopy, where pH is usually elevated. This was demonstrated in a recent study by Andrew et al., where the use of a formulation with pH = 4.0 helped to maintain the acidic pH of the skin surface and supported the delivery of physiologic lipids, giving a reduction in sensitivity to irritants and allergens, which is typical to atopic dermatitis [45]. Nevertheless, the pH of all formulations obtained is within the range considered to be the optimal pH of the human skin, i.e., 4.1–5.8 [46].

Due to their physicochemical form and the raw materials used, the resulting formulations differed markedly in viscosity, reaching 605.40 cP for the O/W emulsion and 6548.20 cP for the W/O emulsion (Table 2). Moreover, these values decreased noticeably when 10 wt.% of *Centella asiatica* L. extract was added to the formulation, yielding 394.20 cP and 4993.60 cP for the O/W and W/O emulsion, respectively. Such high viscosity values for W/O emulsions are mainly due to the fact that the formulations rich in oils and lipids naturally generate higher viscosity products. In addition, most commercially available viscosity modifiers are soluble in the aqueous phase, and their performance in the W/O emulsions is limited. Viscosity-modifying agents influence the microscopic structure of the formulation, like droplet size distribution, which, in turn, impacts the macroscopic behavior of the product. Many other parameters can also affect the final viscosity of the resulting products, including the speed of the rotation and temperature during homogenization [47].

2.1.3. Stability Tests of O/W and W/O Emulsions and Gel with *Centella asiatica* L. Extract

The accelerated stability testing gives some predictions of long-term product stability under ambient conditions in shorter time periods. Storage of topical formulations at conditions exceeding ambient temperature can result in significant changes in their physical characteristics, namely particle size, rheology, and product structure. These changes significantly influence the stability of the product and are, among others, due to fluctuations in the components' solubility, such as rheology-modifying agents or variations in the size of particulates and emulsion droplets [48]. Consequently, one of the parameters determining the stability of cosmetic emulsions is the uniform dispersion of their internal phase. An image of the emulsion particles (droplets) size distribution (PSD) can be obtained by the measurements based on the laser diffraction. The results of such measurements carried out for emulsions containing 10 wt.% of *Centella asiatica* L. extract are shown in Figure 1.

For all O/W emulsion-based samples, a clearly bimodal PSD of the dispersed phase could be observed (Figure 1a) with a first maximum around 1 µm and the second one ranging from 76.0 µm ($t = 84$ days) to 144.5 µm ($t = 0$). Moreover, no drastic changes in the PSD can be detected when the emulsion is stored at elevated temperatures. It can be seen that the smaller droplets of the internal phase were stabilized very well by the emulsifiers used. More distinct changes can only be noticed in the PSD of larger droplets and for measurements taken immediately after preparation of emulsion ($t = 0$) and after 14 days of its storage at 45 °C, resulting in the peak maximum shift from 144.5 µm to 91.0 µm. After the emulsion was stabilized by the emulsifiers used, subsequent measurements showed a stable droplet size distribution of the dispersed phase. The results show that stable products were obtained in which the formulation components, as well as the emulsification and homogenization conditions, were properly selected. As Kim et al. have shown, a suitable selection of these elements is vital for the stability of O/W emulsions, since a

high shear mixing rate in emulsification may induce Brownian flocculation, which, in turn, accelerates the coalescence of tiny droplets, leading to a decrease in the long-term stability of the cosmetic O/W emulsion [49].

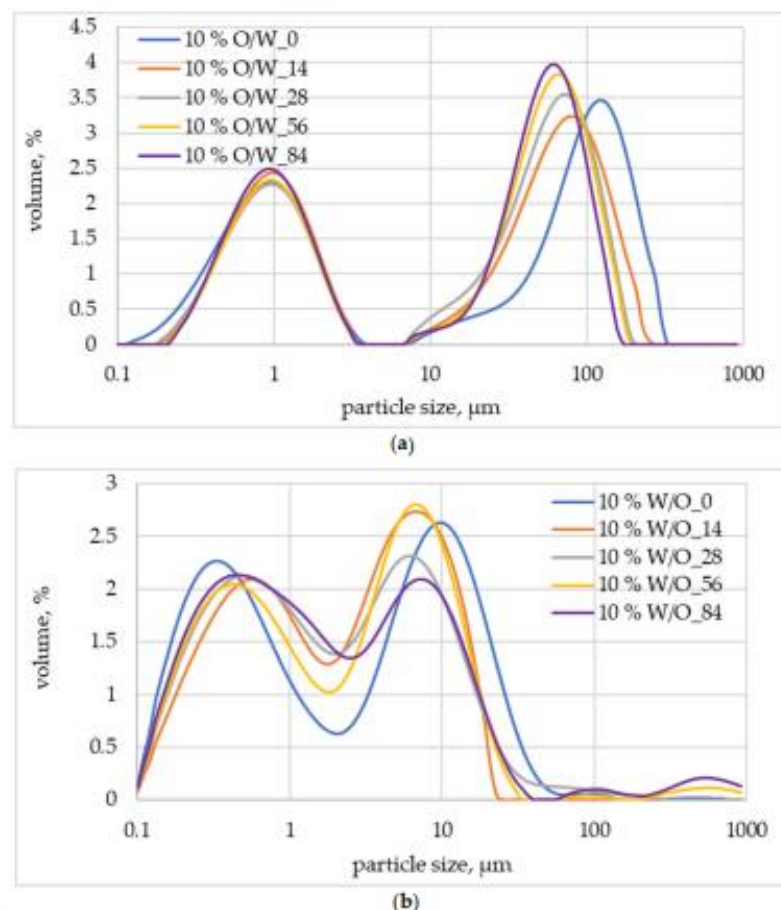


Figure 1. Particles (droplets) size distributions of O/W (a) and W/O (b) emulsions containing 10 wt.% of *Centella asiatica* L. extract; the digit at the end of the symbol indicates the number of days the sample was stored at elevated temperature (45 °C).

In contrast, a wider particle size distribution (0.1–60.0 μm) was obtained for the W/O emulsion-based product (Figure 1b), with two marked maxima at about 0.6 μm and 8.0 μm. A more pronounced difference can be observed between the freshly obtained emulsion and the emulsion stored for 14 days at elevated temperature, for which the peak maxima shift from 0.35 μm and 10.0 μm ($t = 0$) to 0.50 μm and 6.5 μm ($t = 14$ days). Moreover, for samples stored for 56 days and 84 days, a minor tendency toward agglomeration of the inner phase droplets can be assumed, as manifested by the appearance of small peaks at values of about 100 μm and 550 μm. Such an unfavorable increase in the particle size of the dispersed phase, which can affect the stability of the product, is caused not only by an increase in the absolute size of individual droplets (coalescence), but it may also involve the formation of aggregated structures of the dispersed phase, which consequently increase effective droplet size. This phenomenon, called flocculation, can be induced by many factors and is

difficult to predict, although it is very often triggered by large differences in the density of the emulsion's two phases [48]. Given this, a slightly higher tendency in W/O emulsion to destabilize over time may be anticipated when compared with its O/W counterpart.

Another parameter to assess the stability of the emulsion is zeta potential (ZP), which determines the repulsive forces of particles in the colloidal systems. Zeta potential analysis is performed based on ELS phenomena and measures electrophoretic mobility, which is the speed of movement of charged particles suspended in a liquid under the influence of an electric field. Then the electrophoretic mobility is converted into a zeta potential value, which can be used as a measure of the colloidal system's stability [50]. Suspension samples with ZP greater than ± 30 mV may be considered moderately stable, whereas ZP value close to zero suggest instability resulting from flocculation or coagulation processes. In general, the higher the zeta potential, the more probable the preservation of dispersion stability [51]. In the course of our research, the zeta potential was measured for samples of cosmetic emulsions and gel containing *Centella asiatica* L. extract immediately after their preparation and during their storage for 84 days under elevated temperature conditions (45 °C). Thus, the long-term stability of the obtained sustainable cold-processed topical formulations containing madecassoside and asiaticoside of *Centella asiatica* L. origin could be evaluated.

As follows from the data in Figure 2, the emulsion-based samples immediately after preparation were characterized by satisfactory stability, as reflected by ZP values of -33.5 mV and -36.6 mV for W/O and O/W samples, respectively. Moreover, these values (expressed as modulus) increased over time and after 84 days reached -43.2 mV and -59.4 mV for W/O and O/W samples, respectively. Higher ZP values indicate stronger electrostatic interactions, so particles of the dispersed phase of the colloidal system undergoing such interactions will be strongly separated from each other, and this will result in higher dispersion stability. The highest stability, expressed as ZP value, was obtained for O/W cold-processed emulsion, which indicates the proper choice of emulsifier. This is worth noting, as the stabilization of this type of system is challenging without the classic emulsifiers normally used in the hot-processed emulsions. Thus, it can be concluded that the synthesized sustainable cold-processed W/O and O/W emulsions are long-term stable systems and can be used as carriers for active substances such as madecassoside and asiaticoside.

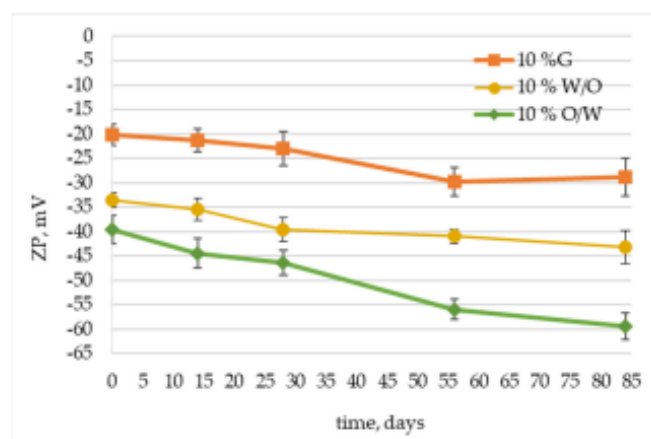


Figure 2. Zeta potential values measured in samples of oil-in-water (O/W) and water-in-oil (W/O) emulsions and gel (G) containing 10 wt.% of *Centella asiatica* L. extract.

The gel sample had slightly lower ZP values ranging between -21.3 mV and -28.9 mV for the initial sample and the sample stored at 45°C for 84 days, respectively (Figure 2). However, in the case of gels, such ZP values may also indicate a satisfactory level of stability. Gels constitute a specific example of colloids, as they are formed when there are so many particles of the dispersed phase present that they form a spatial network. Additional stabilization of the dispersed phase particles can be achieved by the chemical crosslinking reaction occurring in the case of gels formed by polymers. It is the case of the studied gel samples, as for the preparation of which natural polymers of plant origin, namely xanthan gum, alginate, and tapioca starch, were used. Therefore, gel-based formulations usually present a lower ZP value, as they are stabilized rather sterically than by electrostatic repulsions [52]. As such, despite ZP values that differ from those indicated in the literature for stable suspensions [51], the tested sustainable gel-based formulation can be used as a relatively stable carrier for active substances.

As mentioned before, physical changes observed at accelerated testing at elevated temperatures can be beneficial in establishing the stability of a product. However, quite often the instability of a product is initially not visible to the human eye, which can result in a false positive assessment of its long-term stability. In this situation, one of the solutions is to use the measurement based on static light scattering, where the backward reflected light results from multiple scattering of the photons on the suspension particles (droplets). It enables the quantification of light backscattering and transmission values, as well as the prediction of the long-term stability of suspensions without any manipulation, dilution, or disruption of samples [53]. Based on the results of light backscattering and transmission measurements, calculation of the TSI (Turbiscan stability index) parameter can be performed. TSI summarizes all the fluctuations of backscattering and transmission values in the sample and enables the evaluation of sedimentation, creaming, or flocculation occurrence. The changes in the TSI parameter in subsequent measurements indicate ongoing destabilization of the cosmetic sample. Consequently, the sample is stable when TSI tends toward zero and unstable when it reaches higher values [54].

Figure 3 shows the results of our tests of the static light scattering for O/W, W/O emulsions, and gel samples containing 10 wt.% of *Centella asiatica* L. extract and stored for 84 days at elevated temperature (45°C). The presented curves indicate some differences in the stability of the topical formulations obtained. The O/W emulsion-based sample appears as the most stable system, as the TSI parameter does not change throughout the accelerated stability test. At the initial stage of the study, the gel-based sample was also characterized by low TSI values, but after 30 days of storage, its stability deteriorated, as manifested by an increase in TSI values from 3.8 to 8.9 and a progressive increase in the value of this parameter up to $\text{TSI} = 15.7$ after 84 days. This is probably due to changes in the charge of the thickening agent used, which makes the repulsion forces in the gel matrix smaller, and therefore, the aggregation of particles may occur. Similar observations were also made by Ziółkowska et al. in the formulations based on carrageenan and poly(diallyldimethylammonium chloride) [55]. Our assumption can also be confirmed by the results of zeta potential measurements (Figure 2), where a change in the plot after 30 days of the sample's storage is visible. Nevertheless, a certain degree of stabilization may still be provided by the dense packing of the gel network stabilized by the organic polymers present in the thickener used [52]. W/O emulsion appears to be the least stable system, as manifested by the steadily increasing value of the TSI parameter, which reaches 27.7 after 84 days of the accelerated stability test. This reduced stability was already indicated by measurements of the particle size distribution (Figure 1b), where additional peaks appeared in the range of higher values of PSD, indicating the beginning of the flocculation for samples stored for 56 and 84 days at elevated temperature. The larger the droplet size, the higher the velocity of creaming or sedimentation processes exhibited by increased TSI values. All these phenomena are disadvantageous to the emulsion's long-term stability.

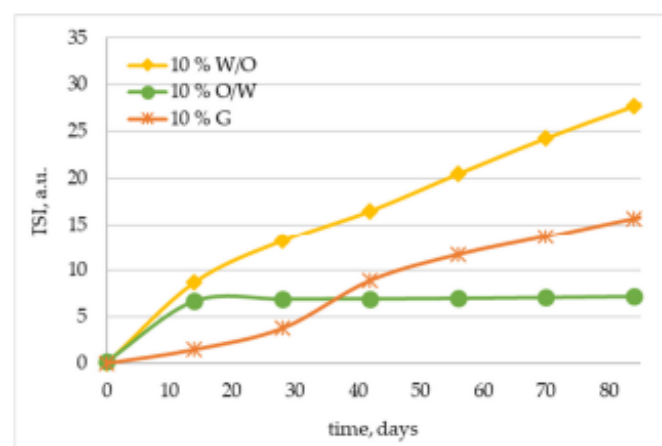


Figure 3. Stability of oil-in-water (O/W) and water-in-oil (W/O) emulsions and gel (G) containing 10 wt.% of *Centella asiatica* L. extract expressed as TSI values vs. time.

2.2. Controlled Release of Madecassoside and Asiaticoside from Sustainable Cold-Processed Topical Formulations

2.2.1. HPLC Method Validation

To determine the amount of triterpenoids, i.e., madecassoside and asiaticoside, released from the various topical formulations, the HPLC technique was applied. The developed HPLC method was subjected to some validation tests to ensure the reliability of the analysis. As a first step, peaks from substances that can leach from the various cosmetic carriers were checked for potential overlapping with peaks from the analyzed active substances. Chromatograms obtained for formulations containing no active substances did not show the presence of peaks with retention times similar to that characteristic of the analyzed triterpenoids. Additionally, good separation of the peaks originating from madecassoside and asiaticoside was achieved, reaching 7.3 min and 11.5 min, respectively. Therefore, a simultaneous determination of both triterpenoids was feasible.

Table 3 shows the linear equations for calibration curves, their R^2 parameters, LOD and LOQ values, as well as precision and accuracy, which were expressed as a percentage of recovery. Calibration curves for madecassoside and asiaticoside quantification are shown in Figure S2.

Table 3. Linearity parameters, the limit of detection (LOD), the limit of quantitation (LOQ), precision, and accuracy of madecassoside and asiaticoside analysis.

	Madecassoside	Asiaticoside
Linear equation	$y = 54.6823 \cdot x - 0.0694$	$y = 54.0976 \cdot x - 0.0640$
R^2 coefficient	0.9987	0.9985
Test range, mg/mL	0.03–0.10	0.03–0.10
LOD, mg/mL	0.0045	0.0053
LOQ, mg/mL	0.0136	0.0159
Precision, % RSD	0.87	1.29
Accuracy/recovery, %	104.71 ± 1.35	111.95 ± 0.98

The developed HPLC method for simultaneous analysis of madecassoside and asiaticoside showed good linearity, with R^2 values reaching 0.999. LOD and LOQ were

0.0045 mg/mL and 0.0136 mg/mL for madecassoside and 0.0053 mg/mL and 0.0159 mg/mL for asiaticoside, respectively. Moreover, the HPLC method used can be considered precise and accurate, as RSD was 0.87% for madecassoside and 1.29% for asiaticoside analysis, whereas the accuracy was close to 100% with the percent recoveries of madecassoside and asiaticoside as high as 104.71 ± 1.35 and 111.95 ± 0.98 , respectively.

2.2.2. Controlled Release Profiles

The foundation of the dissolution test was set at the end of the 19th century by Noyes and Whitney and applied to the diffusion-controlled dissolution process. However, up to this date, several other models of dissolution have been proposed [56]. As such, testing the release of triterpenoids from *Centella asiatica* L. can be a valuable source of information on the selection of the best type of carrier, the concentration of the active substance, and pH values, at which madecassoside and asiaticoside obtain optimal release profiles. During our research, a methodology based on spikes with active substance standards was used. The prepared cosmetic formulations were enriched with 2 wt.% and 5 wt.% of madecassoside and asiaticoside and subjected to dissolution tests in two different buffer solutions at pH = 5.8 and pH = 7.4. Interestingly, as can be seen from the graphs in Figure 4, the introduction of larger amounts of active substances does not increase their cumulative release from the cosmetic matrix. Giuliano et al. also observed a similar correlation in the release profiles of rutin from Poloxamer 407-based hydrogels, which was not influenced by the increasing amount of active ingredient introduced into the cosmetic matrix [57]. Soe et al. indicate in their study that this might be explained in terms of the viscosity and the particle size of the carrier [58].

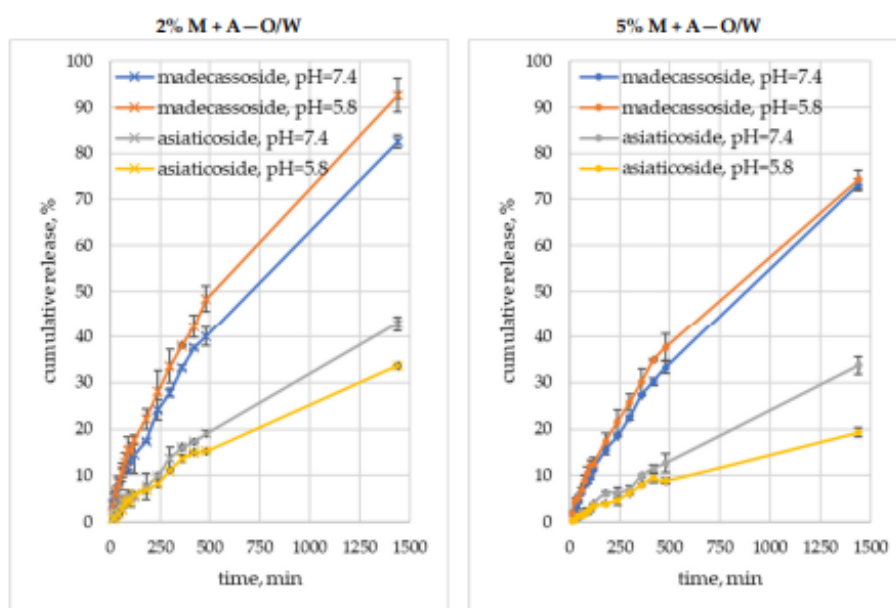


Figure 4. Cont.

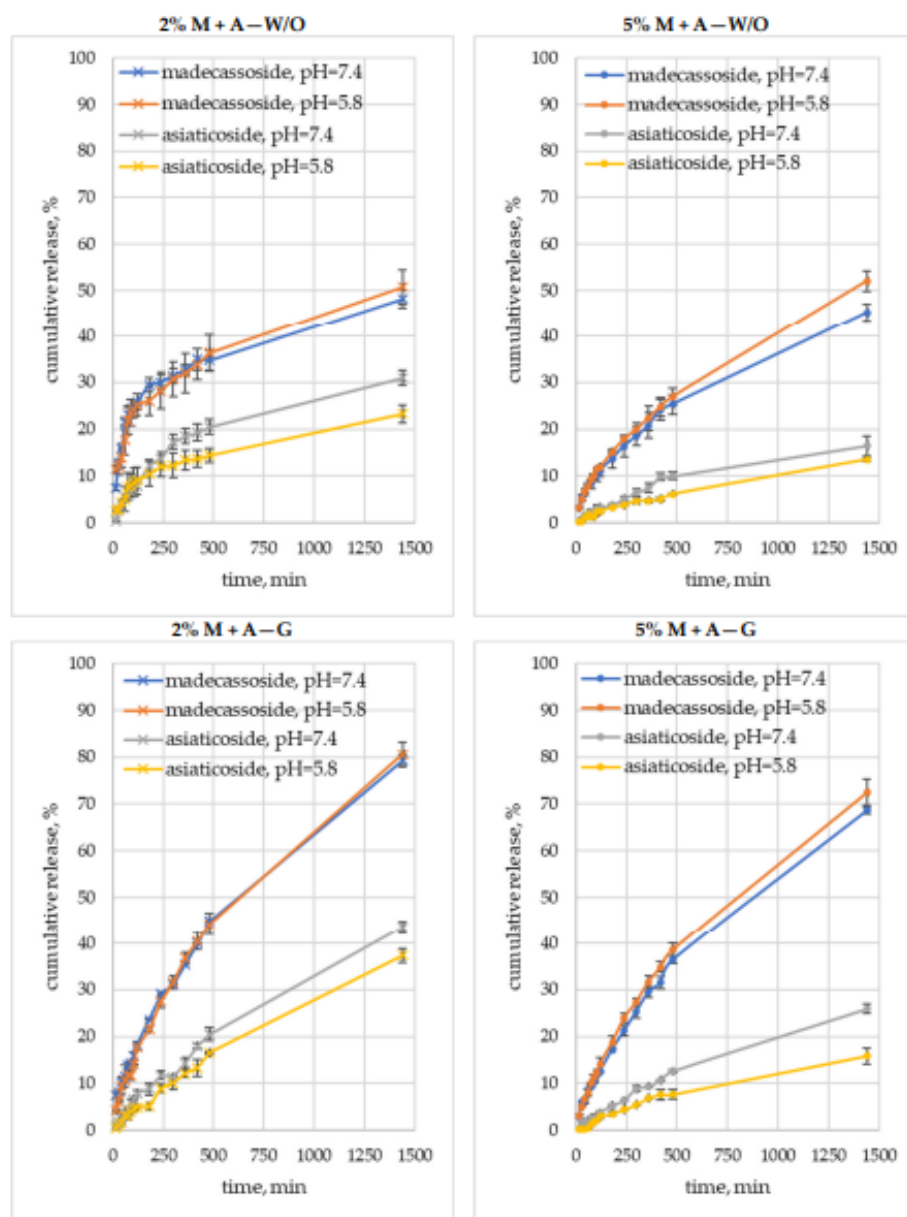


Figure 4. Controlled release profiles of madecassoside (M) and asiaticoside (A) from sustainable topical formulations in different acceptor fluids; O/W, W/O, and G abbreviations stand for oil-in-water or water-in-oil emulsions and gel, respectively.

Nevertheless, the influence of the formulation type on the release profile is evident (Figure 4), indicating the O/W emulsion as the best carrier for the controlled release of triterpenoids tested. The highest amounts of madecassoside and asiaticoside were released

from this system ($\approx 90\%$ and $\approx 40\%$, respectively) during 1440 min (24 h) of the test run. The second carrier that allowed the release of significant amounts of active substances was a gel, from which $\approx 80\%$ and $\approx 40\%$ of madecassoside and asiaticoside, respectively, were finally released. The least favorable environment for the release of triterpenoids found in *Centella asiatica* L. extract is created by the W/O emulsion. This is most likely due to the high viscosity of this matrix, as indicated by the data in Table 2. Increased viscosity of the matrix inhibits migration of the active substance to the boundary layer; hence, diffusion through the carrier may become the main parameter controlling the release processes. A similar relationship was observed by Dymek et al. when they studied the release of astaxanthin from different types of emulsions in topical application [59]. When comparing the release profiles of active substances from different emulsions, it is clear that the release of madecassoside, which has good solubility in hydrophilic systems, is favored by the more hydrophilic nature of the carrier. On the other hand, for W/O emulsions, in which the outer phase is lipophilic in nature, the difference between released madecassoside and asiaticoside is the smallest, which is due to the better solubility of asiaticoside in lipophilic systems, resulting in its easier access to the acceptor medium.

Since the physiology of atopic skin is strongly disturbed by the inflammation processes, it is commonly characterized by deviations in pH values [40,41]. Thus, when studying the release of active substances, the effect of the acceptor medium pH on the release profile should be considered [8].

In our study, the pH values of the acceptor solutions were selected in relation to the pH values of skin affected by atopic dermatitis (pH = 7.4) and healthy skin (pH = 5.8). Based on the correlations depicted in Figure 4, it can be seen that the influence of the acceptor medium pH is particularly marked in the case of the release of asiaticoside, making it possible to obtain higher release values of this substance at pH = 7.4. This may be advantageous in the care of atopic skin, especially at the beginning of the treatment, when the pH is still elevated due to the inflammatory processes taking place in the skin. With this course of asiaticoside release, it will be possible to apply its significant amounts, which will promote the leveling of inflammation and lowering of skin pH. Furthermore, the topical formulations we have prepared are characterized by a pH close to 5 (Table 2), which will naturally lower the pH of atopic skin during the treatment and promote the restoration of the skin's natural acidic barrier. As can be seen from the release profiles shown in Figure 4, lowering the pH will slightly reduce the amount of asiaticoside released but will still promote the release of the second active ingredient, namely madecassoside. Our study not only gives information on the degree of released madecassoside and asiaticoside, but at the same time indicates good stability of these substances in the tested pH ranges. It is in good agreement with the results obtained by Puttarak et al., who also found that madecassoside and asiaticoside are rather stable in acidic and neutral pH and decompose under basic conditions with pH as high as 8.2 [60]. Thus, it can be considered that the topical formulations containing *Centella asiatica* L. extract obtained in the course of our study will enable comprehensive care of skin affected by atopy and with disturbed pH.

The trends described above were also confirmed by the data in Tables 4–6, which include the $t_{20\%}$ and $X_{480\text{min}}$ parameters, indicating, respectively, the time at which the cumulative release value reached 20% and the release percentage achieved after 480 min of the dissolution test. It shows that the fastest 20% release of madecassoside was achieved for the W/O emulsion. In contrast, 480 min (8 h) after application of the formulation to the skin, the highest release from the O/W formulation can be expected, namely 48.3% and 15.2% for madecassoside and asiaticoside, respectively. The release values we achieved, especially those after 480 min (8 h), which is the time the formulation is usually kept on the skin during the day, should be considered satisfactory, given the data available in the literature. For example, Suksaeree et al. revealed low content of madecassoside and asiaticoside released from film-forming polymeric solutions (FFPS) using a Franz-type diffusion cell. The maximum release of madecassoside and asiaticoside after 8 h of testing was 13.4 and 14.8%, respectively [26]. In vitro experiments performed by Soe et al.

demonstrated that the release of asiaticoside from in situ-created gel formulations through a semi-permeable membrane in the modified Franz diffusion cell does not exceed 10% after 8 h of testing [58]. On the other hand, in vitro release of asiaticoside from nanostructured lipid carriers containing dried (NLC-D) and glycolic (NLC-G) *Centella asiatica* L. extracts showed that after 8 h the release from NLC-D was approximately 20%, while release from NLC-G was 2-times higher during the same period of time [23]. In addition, a study by Suwantong et al. demonstrates that after 8 h of dissolution tests at 37 °C with electrospun cellulose acetate fiber mats containing asiaticoside, it is possible to achieve about 25% of asiaticoside cumulative release [29]. In a study conducted by Chowdhalli et al., the release of asiaticoside from solid lipid nanoparticles (SLN) incorporated in hydrogel was investigated by using the dialysis bag method. The release of asiaticoside in a sustained manner during 8 h was confirmed, and the amount of released substance was 88% [22]. High values of asiaticoside cumulative release after 8 h (approximately 50% to 60%) were also shown by Wichayapreechar et al. They used the dialysis method in phosphate buffered saline and applied it to niosomes and hyaluronic acid-modified niosomes loaded with *Centella asiatica* L. extract [61]. Contrary, Suhail et al. performed in vitro assessment of chitosan-based polymeric pH-responsive nanogels for sustained delivery of madecassoside, obtaining approximately 60% of cumulative release after 8 h of testing at pH = 7.4 [8]. Moreover, Lu et al. conducted an in vitro study of madecassoside release from nanoemulsions and showed that around 65% of madecassoside was released after 8 h [21].

Table 4. Release parameters from O/W support according to different kinetic models.

Active Substance	pH Value of the Release Medium	$t_{20\%}$, min	$X_{480\text{min}}$, %	Kinetic Model	R^2	Kinetic Parameters	
						K	n
2% M	5.8	150	48.3	First-order kinetics	0.6222	$K_1 = 0.0018$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9957	$K_K = 0.5780$	0.7081
				Higuchi	0.9823	$K_H = 0.0248$	---
				Hixson-Crowell	0.9985	$K_\beta = 0.0004$	---
	7.4	200	40.0	First-order kinetics	0.6777	$K_1 = 0.0018$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9930	$K_K = 0.6361$	0.6650
				Higuchi	0.9740	$K_H = 0.0220$	---
				Hixson-Crowell	0.9978	$K_\beta = 0.0003$	---
5% M	5.8	210	37.6	First-order kinetics	0.5833	$K_1 = 0.0021$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9883	$K_K = 0.6461$	0.8047
				Higuchi	0.9790	$K_H = 0.0512$	---
				Hixson-Crowell	0.9929	$K_\beta = 0.0013$	---
	7.4	270	33.2	First-order kinetics	0.6221	$K_1 = 0.0021$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9963	$K_K = 0.5448$	0.8135
				Higuchi	0.9647	$K_H = 0.0491$	---
				Hixson-Crowell	0.9766	$K_\beta = 0.0013$	---

Table 4. Cont.

Active Substance	pH Value of the Release Medium	$t_{20\%}$, min	$X_{480\text{min}}$, %	Kinetic Model	R^2	Kinetic Parameters	
						K	n
2% A	5.8	750	15.2	First-order kinetics	0.5538	$K_1 = 0.0023$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9756	$K_K = 0.0682$	0.8879
				Higuchi	0.9695	$K_H = 0.0092$	---
				Hixson-Crowell	0.9726	$K_\beta = 0.0001$	---
	7.4	500	19.0	First-order kinetics	0.6317	$K_1 = 0.0021$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9853	$K_K = 0.1462$	0.7872
				Higuchi	0.9556	$K_H = 0.0114$	---
				Hixson-Crowell	0.9894	$K_\beta = 0.0001$	---
5% A	5.8	1440	8.8	First-order kinetics	0.5218	$K_1 = 0.0023$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9665	$K_K = 0.0629$	0.9647
				Higuchi	0.9672	$K_H = 0.0134$	---
				Hixson-Crowell	0.9722	$K_\beta = 0.0001$	---
	7.4	835	12.6	First-order kinetics	0.5637	$K_1 = 0.0028$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9709	$K_K = 0.0474$	1.0622
				Higuchi	0.9185	$K_H = 0.0220$	---
				Hixson-Crowell	0.9888	$K_\beta = 0.0003$	---

Table 5. Release parameters from W/O support according to different kinetic models.

Active Substance	pH Value of the Release Medium	$t_{20\%}$, min	$X_{480\text{min}}$, %	Kinetic Model	R^2	Kinetic Parameters	
						K	n
2% M	5.8	75	36.4	First-order kinetics	0.5762	$K_1 = 0.0009$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9527	$K_K = 4.4402$	0.3405
				Higuchi	0.9271	$K_H = 0.0125$	---
				Hixson-Crowell	0.7724	$K_\beta = 0.0001$	---
	7.4	60	34.7	First-order kinetics	0.4365	$K_1 = 0.0009$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9005	$K_K = 3.9857$	0.3656
				Higuchi	0.8756	$K_H = 0.0121$	---
				Hixson-Crowell	0.6835	$K_\beta = 0.0001$	---
5% M	5.8	300	27.0	First-order kinetics	0.6459	$K_1 = 0.0016$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9985	$K_K = 1.6466$	0.6024
				Higuchi	0.9922	$K_H = 0.0344$	---
				Hixson-Crowell	0.9548	$K_\beta = 0.0011$	---
	7.4	350	25.3	First-order kinetics	0.6510	$K_1 = 0.0016$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9968	$K_K = 1.8450$	0.5686
				Higuchi	0.9953	$K_H = 0.0303$	---
				Hixson-Crowell	0.9559	$K_\beta = 0.0010$	---

Table 5. Cont.

Active Substance	pH Value of the Release Medium	$t_{20\%}$, min	X_{480min} , %	Kinetic Model	R^2	Kinetic Parameters	
						K	n
2% A	5.8	1125	14.4	First-order kinetics	0.5206	$K_1 = 0.0012$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9484	$K_K = 0.7303$	0.4966
				Higuchi	0.9661	$K_H = 0.0062$	---
				Hixson-Crowell	0.8017	$K_\beta = 0.0001$	---
	7.4	480	20.0	First-order kinetics	0.4084	$K_1 = 0.0018$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9068	$K_K = 0.1323$	0.8296
				Higuchi	0.9656	$K_H = 0.0093$	---
				Hixson-Crowell	0.8206	$K_\beta = 0.0001$	---
5% A	5.8	>1440	6.2	First-order kinetics	0.5044	$K_1 = 0.0023$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9316	$K_K = 0.0646$	0.9002
				Higuchi	0.9629	$K_H = 0.0090$	---
				Hixson-Crowell	0.9762	$K_\beta = 0.0001$	---
	7.4	>1440	10.0	First-order kinetics	0.4741	$K_1 = 0.0021$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9315	$K_K = 0.1050$	0.8820
				Higuchi	0.9709	$K_H = 0.0120$	---
				Hixson-Crowell	0.9168	$K_\beta = 0.0001$	---

Table 6. Release parameters from gel (G) support according to different kinetic models.

Active Substance	pH Value of the Release Medium	$t_{20\%}$, min	X_{480min} , %	Kinetic Model	R^2	Kinetic Parameters	
						K	n
2% M	5.8	150	44.3	First-order kinetics	0.6284	$K_1 = 0.0018$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9924	$K_K = 0.6789$	0.6681
				Higuchi	0.9880	$K_H = 0.0221$	---
				Hixson-Crowell	0.9836	$K_\beta = 0.0003$	---
	7.4	200	45.0	First-order kinetics	0.6889	$K_1 = 0.0016$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9823	$K_K = 1.2428$	0.5670
				Higuchi	0.9907	$K_H = 0.0214$	---
				Hixson-Crowell	0.9848	$K_\beta = 0.0003$	---
5% M	5.8	210	38.6	First-order kinetics	0.6172	$K_1 = 0.0018$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9974	$K_K = 1.1280$	0.7148
				Higuchi	0.9867	$K_H = 0.0500$	---
				Hixson-Crowell	0.9950	$K_\beta = 0.0013$	---
	7.4	270	36.4	First-order kinetics	0.6368	$K_1 = 0.0018$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9932	$K_K = 1.2025$	0.6900
				Higuchi	0.9831	$K_H = 0.0465$	---
				Hixson-Crowell	0.9873	$K_\beta = 0.0013$	---

Table 6. Cont.

Active Substance	pH Value of the Release Medium	$t_{20\%}$, min	$X_{480\text{min}}$, %	Kinetic Model	R^2	Kinetic Parameters	
						K	n
2% A	5.8	750	16.5	First-order kinetics	0.5861	$K_1 = 0.0023$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9804	$K_K = 0.0512$	0.9291
				Higuchi	0.9424	$K_H = 0.0099$	---
				Hixson-Crowell	0.9919	$K_B = 0.0004$	---
	7.4	500	20.5	First-order kinetics	0.5873	$K_1 = 0.0020$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9817	$K_K = 0.1107$	0.8410
				Higuchi	0.9569	$K_H = 0.0116$	---
				Hixson-Crowell	0.9857	$K_B = 0.0001$	---
5% A	5.8	1440	7.7	First-order kinetics	0.4737	$K_1 = 0.0028$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9165	$K_K = 0.0182$	1.1399
				Higuchi	0.9690	$K_H = 0.0114$	---
				Hixson-Crowell	0.9548	$K_B = 0.0001$	---
	7.4	835	12.6	First-order kinetics	0.5165	$K_1 = 0.0023$	---
				Korsmeyer-Peppas	0.9406	$K_K = 0.0896$	0.9483
				Higuchi	0.9637	$K_H = 0.0176$	---
				Hixson-Crowell	0.9924	$K_B = 0.0002$	---

2.2.3. Kinetics of Madecassoside and Asiaticoside Release

The quantitative interpretation of the results obtained during release tests can be supported with mathematical equations and kinetic models in which the released amount of the substance tested is expressed as a function of the test time. Zero and first-order analysis, as well as Higuchi, Hixson–Crowell, and Korsmeyer–Peppas models, are usually used as analytical definitions of the $Q(t)$ function. To assess the fitting of a model equation to the experimental data, the regression coefficient R^2 is commonly used with R^2 values close to 1, indicating the most suitable model of kinetics [62].

In the course of our study, four different kinetic models were evaluated for their fit with the experimental results obtained. As can be seen from the data in Table 4 and Figures S3 and S6, for release studies from samples based on O/W support, the dominant role plays the Korsmeyer–Peppas model, for which the fit expressed as the R^2 value is the highest and ranges between 0.9985 and 0.9665. Moreover, n values of all formulations following the Korsmeyer–Peppas model are within the range of 0.6650 to 0.8879, indicating non-Fickian diffusion [62]. This semiempirical model relates exponentially the drug release to the elapsed time, and it is used to evaluate the release of the active substance when the release mechanism is not well recognized or when more than one type of release phenomenon can be involved. However, the Hixson–Crowell model also shows a high degree of fit, which is particularly evident in the release of asiaticoside. According to this model, the rate of release of active substances is limited by the dissolution rate rather than the diffusion through the matrix. Since asiaticoside has distinctly better solubility in non-polar systems, encapsulation in an O/W emulsion gives its higher concentration in the inner phase of the carrier. Thus, its release requires first entering the external phase of the emulsion, in which the solubility of asiaticoside is lower. Only then will the substance be able to be released from the topical formulation at the target site. In general, the Hixson–Crowell model applies to systems where the dissolution occurs parallel to the surface and the carrier's dimensions diminish proportionally while keeping constant the initial geometrical form throughout all the release tests. A plot of the cubic root of the unreleased fraction of active substance vs. time will be linear if the equilibrium conditions are not

reached and if the geometrical shape of the carrier form diminishes proportionally over time [63]. It can be assumed that an O/W emulsion, the outer phase of which is composed of hydrophilic substances, can partially degrade during dissolution tests. Hence the better fit of the Hixson–Crowell model in the case of asiaticoside release, especially when it was introduced into the carrier at a higher concentration (Table 4). These results are in good agreement with the report of Matos et al., where the release of active compounds from *Acanthus mollis* L. leaf extract embedded in oil-in-water topical formulation was investigated [64].

Evaluating the results of the controlled release of madecassoside and asiaticoside from W/O emulsion as support (Table 5), it can be concluded that each of the active substances follows a different kinetic model. Madecassoside release pattern gives a good fit with the Korsmeyer–Peppas model (Figure S4), especially when a higher concentration of this substance is introduced (Figure S7). Values of the n parameter reach 0.6024 and indicate anomalous transport of madecassoside, which is released according to the non-Fickian diffusion [62]. Moreover, due to the localization of madecassoside in the deeper parts of the carrier, the effect of the concentration of the active ingredient on the release kinetics is clearly visible. Due to its better solubility in water, madecassoside is encapsulated mostly in droplets of the dispersed phase. Therefore, its amount penetrating into the external phase of the carrier at lower concentrations makes that even for the best kinetic model (Korsmeyer–Peppas), the R^2 correlation parameter reaches only 0.9527 and 0.9005 for tests conducted at an acceptor medium with pH = 5.8 and pH = 7.4, respectively. Nevertheless, as the loading of the carrier with the active substance increases to 5 wt.% of madecassoside, the fitting parameter R^2 exceeds 0.9974 (Table 5). Also, values of the n parameter increase and may indicate the anomalous diffusion, which is controlled by more than one process. On the contrary, for asiaticoside release from W/O emulsion, a good fit with the Higuchi model can be observed, which proves that the release process is controlled by the diffusion of active substances through the carrier. Based on a pseudo-steady-state approach, a direct proportionality between the cumulative amount of the substance released and the square root of time can be plotted (Figures S3 and S6). [65]. Taking into account the good solubility of asiaticoside in the non-polar systems, the outer phase of the emulsion acts as a reservoir with prolonged release toward the acceptor fluid and reaches a pseudo-infinite dose release model. This observation is in good correlation with previously obtained results for active substances released from emulsion-based systems [59,66,67].

In the case of the gel-based carrier, kinetic parameters follow a pattern similar to that observed for samples based on the O/W emulsion. For madecassoside release studies, the Korsmeyer–Peppas model plays the dominant role, as the fit expressed as the R^2 value is the highest and ranges between 0.9974 and 0.9823. Also, n values are within the range of 0.5670 to 0.7148, indicating non-Fickian diffusion (Table 6). However, the Hixson–Crowell model can also be considered, as it specifically addresses the fact that the surface of a carrier often changes with time. This can be likely observed in a hydrogel-based carrier supported by natural polymers. The use of this type of carrier in an aqueous acceptor medium that easily penetrates and erodes the polymeric matrix makes it easy to release the substance in the case of water-soluble madecassoside. Moreover, it can be assumed that the release from the carrier to the acceptor medium is fast, and the whole process is controlled mainly by diffusion through the matrix [64]. On the contrary, in the case of asiaticoside, whose solubility in aqueous media is lower, the penetration of the acceptor medium deep into the matrix and its swelling begin to play a key role, as the diffusion through the matrix becomes the main parameter controlling the release of the active substance [68]. Therefore, the Hixson–Crowell is the best model describing the release of asiaticoside from the gel-based topical formulation (Figures S5 and S8).

2.3. Stability of Madecassoside and Asiaticoside in W/O Emulsion, O/W Emulsion and Gel

Accelerated stability testing enables not only the estimation of the shelf life of the cosmetic products but also the evaluation of active substances thermal stability. Results

of HPLC-based determination of madecassoside and asiaticoside content remaining in the different formulations kept at the elevated temperature are depicted in Figure 5. It shows moderate variations of madecassoside and asiaticoside amounts for the conditions studied (2 months, 45 °C). The concentrations of madecassoside and asiaticoside remained almost constant over time, proving that the carriers applied were effective in protecting the active substance.

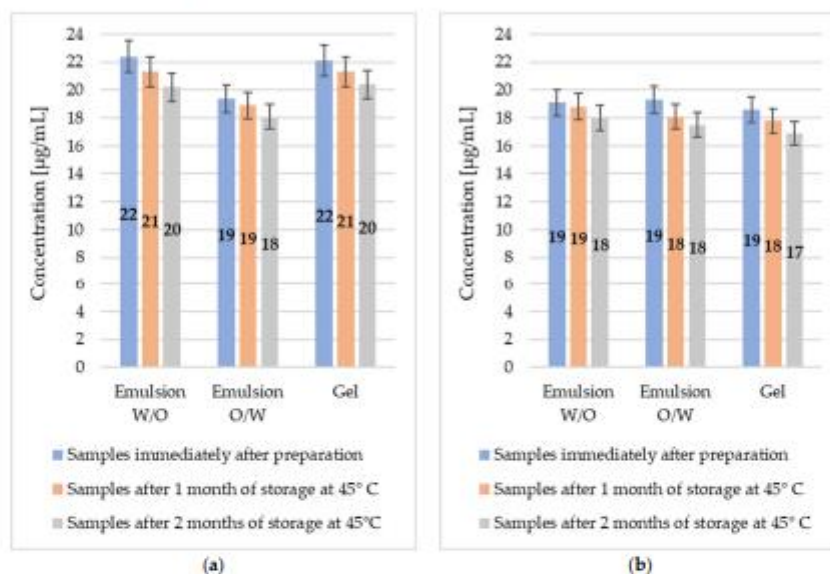


Figure 5. Results of quantitative determination of madecassoside (a) and asiaticoside (b) of *Centella asiatica* L. origin, introduced to the sustainable topical formulations.

Our findings are similar to the result of the previous work of Gomes et al., who investigated the stability of *Centella asiatica* L. extract entrapped in the polymeric colloidal nanocarriers. They found that madecassoside concentration did not change significantly during 60 days of storage in the evaluated temperature (40 °C) [69]. These results are important also in the context of studies indicating low thermal stability of the tested active substances, for which higher concentrations are obtained in the case of extractions of *Centella asiatica* L. conducted at lower temperatures [70]. On the other hand, Monton et al., who tested stability of madecassoside and asiaticoside in film-forming polymeric dispersions, observed high fluctuations of madecassoside and asiaticoside content in the formulations stored at 40 °C [71]. Similar observations were made by Puttarak et al. during stability investigations of the standardized centelloids-enriched *Centella asiatica* L. extract. They found that the amount of madecassoside and asiaticoside was decreased by approximately 20% within twelve weeks of storage under light-protected conditions. Additionally, increased storage temperature substantially accelerated the degradation process [60].

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

3.1.1. Active Substances Present in Emulsions and Gel

A highly refined triterpenoid saponin from *Centella asiatica* L., namely madecassoside (trade name: TEGO® Natural Madecassoside) and asiaticoside (trade name: Asiaticoside®), were obtained from Evonik Operations GmbH, Essen, Germany, and Givaudan Interna-

tional SA, Kempital, Switzerland, respectively. *Centella asiatica* L. extract with a trade name CICA EX (INCI: Butylene Glycol, Aqua, *Centella asiatica* L. Extract, Madecassoside, Asiaticoside) used in the determination of madecassoside and asiaticoside stability in W/O and O/W emulsions and gel was produced by RADIANT, Chuncheon, Republic of Korea, and obtained from DKSH, Warsaw, Poland.

3.1.2. Raw Materials Used to Obtain Oil-in-Water (O/W) Emulsion

The non-ionic emulsifier Galehemp OW (INCI: Polyglyceryl 4 Hemp Seedate, Caprylyl Capryl Glucoside, Aqua) was produced by Gale & Cosm S.r.l. (Bollate, Italy) and supplied by Aston Chemicals Ltd. (Aylesbury, UK). Instathix® (INCI: Xanthan Gum, Sodium Stearoyl Lactylate, Tapioca Starch, Algin) was produced by Alchemy (Ascot, Berkshire, England) and supplied by IMPAG Chemicals Poland Sp. z o. o. (Warsaw, Poland). HyaCare® Tremella (INCI: Tremella Fuciformis Sporocarp Extract) was produced by Evonik Operations GmbH and supplied by PPU Adara Sp. z o. o. (Warsaw, Poland). Natural origin emollients: Phytosqualan® (INCI: Squalane) and Synovea® EL (INCI: Ethyl Linoleate, Ethyl Palmitate, Ethyl Oleate, and Ethyl Linolenate) were produced by Biesterfeld Spezialchemie GmbH (Köln-Rodenkirchen, Germany) and supplied by Biesterfeld Chemia Specjalna Sp. z o. o. (Warsaw, Poland). LIPEX® PreAct™ (INCI: Canola Oil) and Akogel™ (INCI: Hydrogenated Vegetable Oil) were supplied by Nordmann, Rassmann GmbH (Hamburg, Germany). Raspberry Necta® (INCI: Rubus Idaeus Seed Oil) and CeraFluid® (INCI: Triolein, Glyceryl Dioleate, Ceramide NP) were supplied by Amita Health Care, Warszawa, Poland. Citropol H (INCI: Polycitronellol) and E-Leen Green C (INCI: Pentyleneglycol, Glyceryl Caprylate/Caprate) were supplied by Safic-Alcan, Warszawa, Poland. Tocomix L70-IP Organic CO (INCI: Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil) and ZEMEA® Propanediol (INCI: Propanediol) were supplied by IMCD Group (Rotterdam, The Netherlands). Ceramidone® (INCI: Octyldodecyl PCA) was produced by Solabia Group (Ile-de-France, France) and supplied by Aston Chemicals Ltd. All reagents were of analytical purity and were used without any pretreatment. The aqueous phase was prepared using distilled water.

3.1.3. Raw Materials Used to Obtain Water-in-Oil (W/O) Emulsion

The non-ionic emulsifier, EWO Vegetable Emulsifier (INCI: Glyceryl Oleate, Polyglyceryl-3-Polyricinoleate, Olea Europea Oil Unsaponifiables), was produced by EfpBiotek (Figueira da Foz, Portugal) and supplied by IMPAG Chemicals Poland Sp. z o. o. Natural origin emollients: Softigen® Pura (INCI: Caprylic/Capric Triglyceride, Hydrogenated Rapeseed Oil), Phytosqualan® (INCI: Squalane), and Synovea® EL (INCI: Ethyl Linoleate, Ethyl Palmitate, Ethyl Oleate, and Ethyl Linolenate) were supplied by Biesterfeld Spezialchemie GmbH. Natural oils: LIPEX® Omega 3/6™ (INCI: Olus Oil, Camelina Sativa Seed Oil), LIPEX® PreAct™ (INCI: Canola Oil) and Akogel™ (INCI: Hydrogenated Vegetable Oil) were produced by AAK Sweden AB (Malmö, Sweden) and supplied by Nordmann, Rassmann GmbH. Natural oil Raspberry Necta® (INCI: Rubus Idaeus Seed Oil), emollient Emotion® Light (INCI: Tripelargonin), and a mix of ceramide and triolein—CeraFluid® (INCI: Triolein, Glyceryl Dioleate, and Ceramide NP) were supplied by Amita Health Care Poland. Ceramidone® (INCI: Octyldodecyl PCA) was produced by Solabia Group and supplied by Aston Chemicals Ltd. Tocomix L70-IP Organic CO (INCI: Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil) and ZEMEA® Propanediol (INCI: Propanediol) were supplied by IMCD Group. RonaCare® Magnesium Sulphate (INCI: Magnesium Sulfate) was produced and supplied by Merck (Rahway, NJ, USA) and supplied by Barentz Sp. z o. o. (Warsaw, Poland). E-Leen Green C (INCI: Pentyleneglycol, Glyceryl Caprylate/Caprate) was supplied by Safic-Alcan Poland. All reagents were of analytical purity and were used without any pretreatment. The aqueous phase was prepared using distilled water.

3.1.4. Raw Materials Used to Obtain Gel (G)

Instathix® thickener (INCI: Xanthan Gum, Sodium Stearoyl Lactylate, Tapioca Starch, Algin) was produced by Alchemy and obtained from IMPAG Chemicals Poland Sp. z

o. o. ZEMEA® Propanediol (INCI: Propanediol) was supplied by IMCD Group. E-Leen Green C (INCI: Pentyleneglycol, Glyceryl Caprylate/Caprate) was supplied by Safic-Alcan Poland. All reagents were of analytical purity and were used without any pretreatment. The aqueous phase was prepared using distilled water.

3.1.5. Chemicals Used in the Controlled Release Tests and HPLC Analysis

Ethanol 99.8% was supplied by POCh, Gliwice, Poland. Analytical standards of madecassoside (98.0%) and asiaticoside (98.0%) were supplied by Biopurify Phytochemicals Ltd., Chengdu, China. HPLC-grade trifluoroacetic acid and acetonitrile were supplied by Honeywell Chemicals (Charlotte, NC, USA) and Merck KGaA (Darmstadt, Germany), respectively. Buffer solutions with pH 5.80 and pH 7.40 were obtained from Honeywell Chemicals.

3.2. Preparation of Cold-Processed Emulsions and Gel

O/W emulsion was prepared at room temperature (25 °C) by addition of the oil phase containing emulsifier to the water phase containing a specified amount (2 wt.% or 5 wt.%) of madecassoside and asiaticoside. The process was performed under continuous stirring with a Hei-Torque 100 Value stirrer (Heidolph Scientific Products GmbH, Schwabach, Germany), followed by homogenization with an IKA Ultra Turrax T 18 Digital (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany). The synthesis resulted in samples labeled as 2% A + M—W/O and 5% A + M—W/O, respectively.

W/O emulsion was prepared at room temperature (25 °C) by stepwise addition of the water phase containing a specified amount (2 wt.% or 5 wt.%) of madecassoside and asiaticoside to the oil phase containing the emulsifier under continuous stirring using a Hei-Torque 100 Value stirrer. The resulting mixture was homogenized using an IKA Ultra Turrax T 18 Digital homogenizer. The synthesis resulted in samples labeled as 2% A + M—O/W and 5% A + M—O/W, respectively.

Cosmetic gel was prepared at 25 °C by the addition of thickener to the water phase containing preservative and 2 wt.% or 5 wt.% of madecassoside and asiaticoside. The resulting mixture was kept under continuous stirring with a Hei-Torque 100 Value stirrer until a homogeneous gel was obtained. The synthesis resulted in samples labeled as 2% A + M—G and 5% A + M—G, respectively.

3.3. Physicochemical Properties and Stability Test of Cold-Processed Cosmetic Emulsions and Gel

The initial physicochemical properties, namely pH value, viscosity, and density of the emulsions and gel with 10 wt.% of *Centella asiatica* L. extract, were investigated. The pH values were assessed with a Fisherbrand™ Accumet AB 150 pH-meter (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Viscosity was evaluated using a DV2T viscometer (AMETEK Brookfield, Middleboro, MA, USA) equipped with a small sample adapter. The spindle no. SC4-29 (for W/O emulsion) and the spindle no. SC4-21 (for O/W emulsion and gel) were used. Density was measured using a P-1 metal pycnometer (Pol-Zaf s.c., Wrocław, Poland). All the measurements were done in triplicate, and the averaged values with SD ($n = 3$) were reported. Additionally, parameters such as color, smell, and appearance of the cosmetic formulations were also evaluated organoleptically.

Stability of the cosmetic formulations was investigated by a variety of techniques, such as laser diffraction (LD), electrophoretic light scattering (ELS), and static multiple light scattering (SMLS). All of the tests were conducted directly after the preparation of the samples as well as after their incubation for 2–3 months at 45 °C, regarding both pure cosmetic carriers and their counterparts containing active substances, namely madecassoside and asiaticoside.

The particle size distributions of the emulsions were analyzed by means of LD technique using Mastersizer 2000 apparatus (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) with a wet dispersion unit. For each sample, the measurements were repeated five times. Before the analysis, the refractive index of each sample was determined by using the Refracto™ 30GS portable refractometer (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland).

Zeta potential was quantified using a Zetasizer Nano-ZS analyzer (Malvern Panalytical Ltd., UK), which operates under the ELS technique. Prior to the measurement, 0.05 g of emulsion or gel was suspended in 5 g of distilled water by using an ultrasonic bath, and the resulting mixture was further diluted (60 µL of emulsions or 120 µL of gel in 15 mL of H₂O) to avoid multiple scattering effects. The samples were then placed in the suitable PS cuvettes and subjected to ELS measurements at 25 °C using the Smoluchowski model. The resulting values ($n = 10$) were then averaged, and the standard deviation was calculated.

The Turbiscan^{LAB} Expert device (Formulation, Toulouse, France) was used to evaluate the backscattering (ΔBS) and transmission (ΔT) profiles of emulsions and gel-based formulations as a function of incubation time at elevated temperature (45 °C). The samples tested were placed directly into calibrated borosilicated cylindrical glass vials with stoppers and scanned from bottom to top for a total of 5 min, with one scan at every 30 s ($n = 10$). The obtained data were processed by a Turby Soft 2.0 software and reported as Turbiscan Stability Index (TSI) vs. time. TSI is a statistical parameter that can be used to estimate the stability of samples. It is expressed by the following Equation (1):

$$TSI(t) = \frac{1}{N_h} \sum_{t_1=1}^{t_{max}} \sum_{z_i=z_{min}}^{z_{max}} |BST(t_i, z_i) - BST(t_{i-1}, z_i)| \quad (1)$$

where: $N_h = [(z_{max} - z_{min}) / \Delta h]$ —the number of height positions in the selected zone of the scan; t_{max} —the measurement point corresponding to the time t at which the TSI is calculated; z_{min} and z_{max} —the lower and upper selected height limits, respectively; BST —the considered signal (BS if $T < 0.2\%$, T otherwise) [72].

3.4. Stability Test of Madecassoside and Asiaticoside in O/W and W/O Emulsion and Gel

The stability test of madecassoside and asiaticoside in W/O and O/W emulsions and gel involved the incorporation of *Centella asiatica* L. extract containing the active substances into the samples of both types of emulsions and gel. 10 wt.% of *Centella asiatica* L. extract has been added to the water phase of O/W and W/O emulsions and gel during their preparation, as it has been described in Section 2.2. The formulations obtained were used for the determination of madecassoside and asiaticoside content by HPLC method (see Section 3.6) immediately after preparing the carriers and after 1 and 2 months of storing the samples in the elevated temperature (45 °C). Samples for the stability test of madecassoside and asiaticoside in the cosmetic supports were prepared by the extraction method using 1.0 g of O/W, W/O emulsions, or gel containing *Centella asiatica* L. extract and 10 mL of ethanol. Each sample was shaken manually for 10 min and then treated in the ultrasonic bath for 15 min. The resulting solution was filtered several times through a PTFE syringe filter with a pore size of 0.22 µm. Then 1.5 mL of clear solution was transferred to a glass vial for HPLC analysis.

3.5. Controlled Release of Madecassoside and Asiaticoside

The in vitro release study of madecassoside and asiaticoside from the W/O and O/W emulsion and gel as carriers was conducted with a Varian Vankel 7010 apparatus (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The formulations, prepared as described in Section 2.2, contained 2 wt.% of madecassoside and 2 wt.% of asiaticoside, or 5 wt.% of madecassoside and 5 wt.% of asiaticoside. The experiments were performed using flow-through cells and a membrane made of regenerated cellulose (Cuprophane[®], Mediatech International Ltd., London, UK). The membrane was soaked for 10 min in a respective buffer solution (pH = 5.8 or pH = 7.4) before use. Approximately 1 g of the tested formulation was placed in the diffusion cell and fitted with a cellulose membrane, followed by placing the diffusion cell in the acceptor chambers filled with 100 mL of the acceptor medium. Phosphate and borate buffers with pH values of 5.8 and 7.4, respectively, stirred at 100 rpm, were used as acceptor fluids with temperature maintained at 37 °C ± 0.5 °C. The release tests were carried out for 24 h with 1 mL sample of acceptor medium taken every 15 min (during

the first 2 h) and every 60 min (during the next 6 h). The last sample was taken after 24 h. After each sampling, the acceptor medium was immediately supplemented with 1 mL of the fresh buffer solution. The sampled acceptor medium was filtered through a syringe PTFE filter with a pore diameter of 0.22 µm and transferred to a glass vial for HPLC analysis. The concentrations of madecassoside and asiaticoside were determined according to the procedure described in Section 3.6, and the release profiles were constructed. Each formulation was duplicated in order to check the reproducibility of the release test, and the obtained results were averaged.

To determine the release mechanism of madecassoside and asiaticoside from the synthesized topical formulations, selected kinetic models were investigated by applying Equations (2)–(5):

$$\text{First order kinetics } \log \frac{Q_t}{Q_0} = \frac{K_1}{2.303} \cdot t \quad (2)$$

$$\text{Higuchi model } \frac{Q_t}{Q_0} = K_H \sqrt{t} \quad (3)$$

$$\text{Korsmeyer–Peppas model } \log \frac{Q_t}{Q_0} = n \cdot \log t + \log K_K \quad (4)$$

$$\text{Hixson–Crowell model } \left(1 - \frac{Q_t}{Q_0}\right)^{\frac{1}{3}} = 1 - K_{\beta} \cdot t \quad (5)$$

Q_t —amount of the active substance released from the carrier, mg/mL

Q_0 —initial amount of the active substance on the carrier, mg/mL

t —duration of the release process, min

K_1, K_H, K_K, K_{β} —coefficients specific to the particular kinetic model.

3.6. Determination of Madecassoside and Asiaticoside by HPLC Analysis

3.6.1. Chromatographic Conditions

Qualitative and quantitative determination of the madecassoside and asiaticoside was performed using a Varian 920-LC high-performance liquid chromatograph (Agilent Technologies, USA) equipped with an automatic sample changer and UV-VIS detector working at the wavelength of 205 nm. A 0.1 wt.% solution of trifluoroacetic acid (TFA) in water and acetonitrile in the volumetric ratio of 72:28 was used as a mobile phase, with an isocratic flow of 1.0 mL/min. The amount of 20 µL of each sample was injected into the TSK gel C18 column (250 × 4.6 mm, with 5 µm width of the film). Each of the samples tested was subjected to three injections, and the arithmetic mean was calculated from the results obtained. The concentrations of madecassoside and asiaticoside in the samples were estimated from the calibration standard curve.

3.6.2. Preparation of Standard Solutions

A stock solution of madecassoside and asiaticoside at a concentration of 0.1 mg/mL was prepared in a 50-mL volumetric flask by using ethanol as a solvent. Madecassoside and asiaticoside standard solutions of 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, and 0.03 mg/mL were then prepared from the stock solution by successive dilutions in the 10 mL volumetric flask. The standard solutions were filtered through a 0.45 µm pore-size PTFE syringe filter and analyzed by the HPLC instrument in triplicate for each injection ($n = 3$). The calibration curves of madecassoside and asiaticoside with R^2 coefficients equal to 0.999 were prepared by plotting the peak area against the concentration of madecassoside and asiaticoside standards.

3.6.3. Method Validation

The blank sample was analyzed by an HPLC instrument ($n = 6$). LOD and LOQ were calculated according to Equations (6) and (7), using a standard deviation of the peak area of the blank sample (B_{STD}) and the slope of the calibration curve (S).

$$LOD = (3.3 \times B_{STD})/S \quad (6)$$

$$LOQ = (10 \times B_{STD})/S \quad (7)$$

Precision was calculated using the relative standard deviation from HPLC analysis ($n = 3$) of standard solutions with concentrations of 0.050, 0.070, and 0.090 mg/mL. It was reported as the percent relative standard deviation (% RSD) of the analysis. The recovery method was used to calculate accuracy by spiking *Centella asiatica* L. extract with madecassoside and asiaticoside standards at concentrations of 0.050, 0.070, and 0.090 mg/mL. The samples obtained were then analyzed ($n = 3$) by the HPLC instrument, and the percent of recovery was reported.

4. Summary

During our study, sustainable cold-processed topical formulations supporting the treatment of atopic dermatitis were obtained. Different types of carriers were designed, taking into account the needs of atopic skin. The W/O emulsion contained the largest amount of emollients (31%); the O/W emulsion contained 21% of emollients, whereas the gel did not contain emollients. All carriers were obtained with carefully selected sustainable raw materials and by using low-energy processes that eliminate heating of the components. Stability tests showed that the formulations obtained had good stability, especially the O/W system, which showed no major changes in the particle size of the dispersed phase even after 84 days of storage at elevated temperatures. For emulsions obtained by the cold process, obtaining good stability is difficult due to the limited number of emulsifiers operating at ambient temperatures. Nevertheless, low temperature supports the stability of the active substances introduced, as our accelerated stability tests showed that madecassoside and asiaticoside introduced into cold-processed formulations were characterized by good stability even during storage at elevated temperatures. In addition, factors influencing release profiles from different carriers, such as active substance concentration and pH of the acceptor medium, have been tested, considering the physiology of atopic skin and its needs. The pH values of acceptor media were selected in relation to the pH values observed in the healthy skin (pH = 5.8) as well as the skin with atopic dermatitis (pH = 7.4). The results showed that the pH value of the acceptor medium did not play a significant role during the release study of madecassoside. In contrast, it becomes apparent in the case of asiaticoside release. However, such complementarity can be a major advantage for products designed for atopic skin, in which pH is disturbed. Moreover, regardless of the type of carrier, increasing the concentration of active ingredients from 2 wt.% to 5 wt.% did not affect the cumulative release of madecassoside and asiaticoside. The largest amounts of madecassoside were released from carriers with a large amount of hydrophilic phase, as the amount of lipid-based emollients present in the formulation regulates the viscosity of the carrier and consequently influences the release profiles. The varied physicochemical properties of the carriers and the active substances caused that the release profiles followed different mechanisms, indicating that more than one type of release phenomenon can be involved. Our study shows that the kinetics and release profiles of triterpenoids from *Centella asiatica* L. may provide important information on the most optimal type of carrier, the pH of the medium, and the concentration of the active substance. Furthermore, they indicate that the synthesized formulations can be successfully used as carriers of triterpenoids present in *Centella asiatica* L. extract. Furthermore, it is important to point out that obtaining madecassoside and asiaticoside carriers in a low-temperature process undoubtedly promotes the durability of both the active substances and the lipid-based substances

(emollients) used, of which a significant amount is advisable for products intended for atopic skin.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules29235583/s1>, Figure S1: Photographs of the prepared topical formulations containing 10 wt.% of *Centella asiatica* L. extract, Figure S2: Calibration curves for HPLC analysis of madecassoside (A) and asiaticoside (B), Figure S3: Graphic representation of kinetic models applied to the release profiles from 2% M + A—O/W sample, Figure S4: Graphic representation of kinetic models applied to the release profiles from 2% M + A—W/O sample, Figure S5: Graphic representation of kinetic models applied to the release profiles from 2% M + A—G sample, Figure S6: Graphic representation of kinetic models applied to the release profiles from 5% M + A—O/W sample, Figure S7: Graphic representation of kinetic models applied to the release profiles from 5% M + A—W/O sample, Figure S8: Graphic representation of kinetic models applied to the release profiles from 5% M + A—G sample.

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

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Dataset available on request from the authors.

Acknowledgments: M.K. would like to thank all suppliers who provided free samples of raw materials for the preparation of carriers, namely C.H. Erbslöh Poland, Adara Poland, IMPAG Chemicals Poland, Biesterfeld Spezialchemie GmbH, Nordmann, Rassmann Poland, Amita Health Care Poland, Aston Chemicals Ltd. Poland Department, IMCD Poland, Barentz Sp. z o. o., Poland, and Safic-Alcan Poland.

Conflicts of Interest: Author Monika Krzyżostan was employed by the company Dr Koziej Instytut Badań Kosmetyków. 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

1. Sun, B.; Wu, L.; Wu, Y.; Zhang, C.; Qin, L.; Hayashi, M.; Kudo, M.; Gao, M.; Liu, T. Therapeutic Potential of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 568032. [CrossRef] [PubMed]
2. Hoque, M.M.; Rafi, I.K.; Hossain, M.S. *Centella asiatica*: A mini review of its medicinal properties and different uses. *World J. Adv. Res. Rev.* **2023**, *19*, 1185–1191. [CrossRef]
3. Torbati, F.A.; Ramezani, M.; Dehghan, R.; Amiri, M.S.; Moghadam, A.T.; Shakour, N.; Elyasi, S.; Sahebkar, A.; Emami, S.A. Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacological Features of *Centella asiatica*: A Comprehensive Review. In *Pharmacological Properties of Plant-Derived Natural Products and Implications for Human Health, Advances in Experimental Medicine and Biology*; Barreto, G.E., Sahebkar, A., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2021; Volume 1308, pp. 451–499. [CrossRef]
4. Park, K.S. Pharmacological Effects of *Centella asiatica* on Skin Diseases: Evidence and Possible Mechanisms. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2021**, *2021*, 5462633. [CrossRef] [PubMed]
5. Krzyżostan, M.; Nowak, I. Triterpenoid saponins derived from *Centella asiatica* L. *Przem. Chem.* **2024**, *103*, 499–503. [CrossRef]
6. Zagórska-Dziok, M.; Ziemińska, A.; Bujak, T.; Nizioł-Lukaszewska, Z.; Hordyjewicz-Baran, Z. Cosmetic and Dermatological Properties of Selected Ayurvedic Plant Extracts. *Molecules* **2021**, *26*, 614. [CrossRef]
7. Bandopadhyay, S.; Mandal, S.; Ghorai, M.; Kumar Jha, N.; Kumar, M.; Radha, G.; Ghosh, A.; Proćków, J.; Pérez de la Lastra, J.M.; Dey, A. Therapeutic properties and pharmacological activities of asiaticoside and madecassoside: A review. *J. Cell. Mol. Med.* **2023**, *27*, 593–608. [CrossRef]
8. Suhail, M.; Chiu, L.H.; Ullah, A.; Khan, A.; Ullah, H.; Al-Sowayan, N.S.; Wu, P.C. Formulation and In Vitro Assessment of Polymeric pH-Responsive Nanogels of Chitosan for Sustained Delivery of Madecassoside. *ACS Omega* **2024**, *9*, 19345–19352. [CrossRef]

9. Kunjumon, R.; Viswanathan, G.; Jayasree, D.V.; Biju, P.G.; Prakash, P.; Sasidharan, B.C.P.; Baby, S. Madecassoside encapsulated in alginate chitosan nanoparticles exerts anti-excitotoxicity effects in pilocarpine-induced seizure. *Phytomed. Plus* **2021**, *1*, 100004. [\[CrossRef\]](#)
10. Kunjumon, R.; Viswanathan, G.; Jayasree, D.V.; Biju, P.G.; Prakash, P.; Sasidharan, B.C.P.; Baby, S. Anti-excitotoxicity and neuroprotective action of asiaticoside encapsulated polymeric nanoparticles in pilocarpine rodent seizure model. *Can. J. Chem.* **2022**, *100*, 396–404. [\[CrossRef\]](#)
11. Wannasari, S.; Puttarak, P.; Kaewkroek, K.; Wiwattanapatapee, R. Strategies for Improving Healing of the Gastric Epithelium Using Oral Solid Dispersions Loaded with Pentacyclic Triterpene-Rich Centella Extract. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*, 277. [\[CrossRef\]](#)
12. Wannasari, S.; Mahattanadul, S.; Issarachot, O.; Puttarak, P.; Wiwattanapatapee, R. Raft-forming gastro-retentive formulations based on Centella asiatica extract-solid dispersions for gastric ulcer treatment. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *143*, 105204. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Songvut, P.; Chariyavilaskul, P.; Tantisira, M.H.; Khemawoot, P. Safety and Pharmacokinetics of Standardized Extract of Centella asiatica (Eca 233) Capsules in Healthy Thai Volunteers: A Phase 1 Clinical Study. *Planta Med.* **2019**, *85*, 483–490. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Saoji, S.D.; Raut, N.A.; Pradip, W.; Dhore, P.W.; Borkar, C.D.; Popielarczyk, M.; Dave, V.S. Preparation and Evaluation of Phospholipid-Based Complex of Standardized Centella Extract (SCE) for the Enhanced Delivery of Phytoconstituents. *AAPS J.* **2015**, *18*, 102–114. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Bylka, W.; Znajdek-Awizien, P.; Studzińska-Sroka, E.; Brzezińska, M. Centella asiatica in cosmetology. *Adv. Dermatol. Allergol.* **2013**, *30*, 46–49. [\[CrossRef\]](#)
16. Tanei, R. Atopic Dermatitis in Older Adults: A Review of Treatment Options. *Drugs Aging* **2020**, *37*, 149–160. [\[CrossRef\]](#)
17. Lee, Y.; Choi, H.K.; N'deh, K.P.; Choi, Y.J.; Fan, M.; Kim, E.K.; Kim, E.-K.; Chung, K.H.; An, J.H. Inhibitory effect of Centella asiatica extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice. *Nutrients* **2020**, *12*, 411. [\[CrossRef\]](#)
18. Park, J.H.; Choi, J.Y.; Son, D.J.; Park, E.K.; Song, M.J.; Hellström, M.; Hong, J.T. Anti-Inflammatory Effect of Titrated Extract of Centella asiatica in Phthalic Anhydride-Induced Allergic Dermatitis Animal Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 738. [\[CrossRef\]](#)
19. Tungsukruthai, S.; Pochairach, R.; Krajarng, A.; Jampa-ngern, P.; Tungsukruthai, P. The Investigation of The Network Pharmacology and Mechanism of Action of Centella Asiatica Extract on The Atopic Dermatitis Model. *Pharmacogn. J.* **2023**, *15*, 881–890. [\[CrossRef\]](#)
20. Bansal, K.; Bhati, H.; Vanshita; Bajpai, M. Recent insights into therapeutic potential and nanostructured carrier systems of Centella asiatica: An evidence-based review. *Pharmacol. Res.-Mod. Chin. Med.* **2024**, *10*, 100403. [\[CrossRef\]](#)
21. Lu, W.; Luo, D.; Chen, D.; Zhang, S.; Chen, X.; Zhou, H.; Liu, Q.; Chen, S.; Liu, W. Systematic Study of Paeonol/Madecassoside Co-Delivery Nanoemulsion Transdermal Delivery System for Enhancing Barrier Repair and Anti-Inflammatory Efficacy. *Molecules* **2023**, *28*, 5275. [\[CrossRef\]](#)
22. Chowdhalli, S.; Kumar, S. Solid Lipid Nanoparticles Containing Asiaticoside: Development of Topical Delivery Formulation. *J. Pharm. Sci.* **2018**, *8*, 32–44. [\[CrossRef\]](#)
23. Rodrigues Da Rocha, P.B.; Souza, B.S.; Andrade, L.M.; Dos Anjos, J.L.V.; Mendanha, S.A.; Alonso, A.; Marreto, R.N.; Taveira, S.F. Enhanced asiaticoside skin permeation by Centella asiatica-loaded lipid nanoparticles: Effects of extract type and study of stratum corneum lipid dynamics. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *50*, 305–312. [\[CrossRef\]](#)
24. Narisepalli, S.; Salunkhe, S.A.; Chitkara, D.; Mittal, A. Asiaticoside polymeric nanoparticles for effective diabetic wound healing through increased collagen biosynthesis: In-vitro and in-vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* **2023**, *631*, 122508. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Ho, P.J.; Sung, J.J.; Cheon, K.K.; Tae, H.J. Anti-inflammatory effect of Centella asiatica phytosome in a mouse model of phthalic anhydride-induced atopic dermatitis. *Phytomedicine* **2018**, *43*, 110–119. [\[CrossRef\]](#)
26. Suksaeree, J.; Luprasong, C.; Monton, C. Madecassoside and Asiaticoside-Loaded Film-Forming Polymeric Solutions based on Hypromellose E5 and Eudragit® NE 30D. *Trends Sci.* **2022**, *19*, 796. [\[CrossRef\]](#)
27. Changsan, N.; Srichana, T.; Atipairin, A.; Sawatdee, S. Wound healing efficacy of a polymeric spray film solution containing Centella asiatica leaf extract on acute wounds. *J. Wound Care* **2023**, *32*, S22–S32. [\[CrossRef\]](#)
28. Lv, J.; Ma, H.; Ye, G.; Jia, S.; Hea, J.; Jiaduo, W.; Ma, J.; Que, Y.; Gou, K.; Zenga, R. Bilayer microneedles based on Bletilla striata polysaccharide containing asiaticoside effectively promotes carless wound healing. *Mater. Des.* **2023**, *226*, 111655. [\[CrossRef\]](#)
29. Suwanton, O.; Ruktanonchai, U.; Supaphol, P. Electrospun cellulose acetate fiber mats containing asiaticoside or Centella asiatica crude extract and the release characteristics of asiaticoside. *Polymer* **2008**, *49*, 4239–4247. [\[CrossRef\]](#)
30. Mouro, C.; Figueiro, R.; Gouveia, I.C. Preparation and Characterization of Electrospun Double-layered Nanocomposites Membranes as a Carrier for Centella asiatica (L.). *Polymers* **2020**, *12*, 2653. [\[CrossRef\]](#)
31. Krzyżostan, M.; Wawrzyńczyk, A.; Nowak, I. Use of Waste from the Food Industry and Applications of the Fermentation Process to Create Sustainable Cosmetic Products: A Review. *Sustainability* **2024**, *16*, 2757. [\[CrossRef\]](#)
32. Bom, S.; Fitas, M.; Martins, A.M.; Pinto, P.; Ribeiro, H.M.; Marto, J. Replacing Synthetic Ingredients by Sustainable Natural Alternatives: A Case Study Using Topical O/W Emulsions. *Molecules* **2020**, *25*, 4887. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Tamburic, S.; Fröhlich, J.; Mistry, S.; Fischer, L.J.; Barbary, T.; Bunyan, S.; Dufton, E. Sustainability by Reduced Energy Consumption during Manufacturing: The Case of Cosmetic Emulsions. *Cosmetics* **2023**, *10*, 132. [\[CrossRef\]](#)

34. Raposo, S.; Salgado, A.; Eccleston, G.; Urbano, M.; Ribeiro, H.M. Cold processed oil-in-water emulsions for dermatological purpose: Formulation design and structure analysis. *Pharm. Dev. Technol.* **2014**, *19*, 417–429. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Thomsen, B.R.; Taylor, R.; Hyldig, G.; Blenkiron, P.; Jacobsen, C. Lipid Oxidation and Degradation Products in Raw Materials: Low-Fat Topical Skin-Care Formulations. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2018**, *7*, 853–864. [\[CrossRef\]](#)
36. Niki, E. Lipid oxidation in the skin. *Free Radic. Res.* **2014**, *49*, 7. [\[CrossRef\]](#)
37. Moore, E.M.; Wagner, C.; Komarnytsky, S. The Enigma of Bioactivity and Toxicity of Botanical Oils for Skin Care. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 785. [\[CrossRef\]](#)
38. Elias, P.M. Optimizing emollient therapy for skin barrier repair in atopic dermatitis, American College of Allergy. *Asthma Immunol.* **2022**, *128*, 505–511. [\[CrossRef\]](#)
39. Grzesik-Kaczyńska, M.; Petrus-Halicka, J.; Kaczyński, S.; Bartuzi, Z.; Ukleja-Sokolowska, N. Should Emollients Be Recommended for the Prevention of Atopic Dermatitis?—New Evidence and Current State of Knowledge. *J. Clin. Med.* **2024**, *13*, 863. [\[CrossRef\]](#)
40. Zainal, H.; Jamil, A.; Nor, N.M.; Tang, M.M. Skin pH mapping and its relationship with transepidermal water loss, hydration and disease severity in adult patients with atopic dermatitis. *Ski. Res. Technol.* **2020**, *26*, 91–98. [\[CrossRef\]](#)
41. Lukic, M.; Pantelić, I.; Savić, S.D. Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. *Cosmetics* **2021**, *8*, 69. [\[CrossRef\]](#)
42. Bozza, A.; Campi, C.; Ugazio, E.; Battaglia, L. Current regulatory and market frameworks in green cosmetics: The role of certification. *Sustain. Chem. Pharm.* **2022**, *30*, 100851. [\[CrossRef\]](#)
43. Paleari, S. The Impact of the European Green Deal on EU Environmental Policy. *J. Environ. Dev.* **2022**, *31*, 196–220. [\[CrossRef\]](#)
44. Lukic, M.; Filipovic, M.; Pajic, N.; Lunter, D.; Bozic, D.; Savić, S. Formulation of topical acidic products and acidification of the skin—Contribution of glycolic acid. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2021**, *43*, 419–431. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Andrew, P.V.; Pinnock, A.; Poyner, A.; Brown, K.; Chittock, J.; Kay, L.J.; Cork, M.J.; Danby, S.G. Maintenance of an Acidic Skin Surface with a Novel Zinc Lactobionate Emollient Preparation Improves Skin Barrier Function in Patients with Atopic Dermatitis. *Dermatol. Ther.* **2024**, *14*, 391–408. [\[CrossRef\]](#)
46. Proksch, E. pH in nature, humans and skin. *J. Dermatol.* **2018**, *45*, 1044–1052. [\[CrossRef\]](#)
47. Calvo, F.; Gómez, J.M.; Ricardéz-Sandoval, L.; Alvarez, O. Integrated design of emulsified cosmetic products: A review. *Chem. Eng. Res. Des.* **2020**, *161*, 279–303. [\[CrossRef\]](#)
48. Kelm, G.R. Stability Testing for Topical Formulation Development. In *Handbook of Formulating Dermal Applications: A Definitive Practical Guide*; Dayan, N., Ed.; Scrivener Publishing LLC: Beverly, MA, USA, 2016. [\[CrossRef\]](#)
49. Kim, K.M.; Oh, H.M.; Lee, J.H. Controlling the emulsion stability of cosmetics through shear mixing process. *Korea-Aust. Rheol. J.* **2020**, *32*, 243–249. [\[CrossRef\]](#)
50. Serrano-Lotina, A.; Portela, R.; Baeza, P.; Alcolea-Rodríguez, V.; Villarreal, M.; Ávila, P. Zeta potential as a tool for functional materials development. *Catal. Today* **2023**, *423*, 113862. [\[CrossRef\]](#)
51. Kamble, S.; Agrawal, S.; Cherumukil, S.; Sharma, V.; Jasra, R.V.; Munshi, P. Revisiting Zeta Potential, the Key Feature of Interfacial Phenomena, with Applications and Recent Advancements. *ChemistrySelect* **2022**, *7*, e202103084. [\[CrossRef\]](#)
52. Akhter, A.; Shirazi, J.H.; Shoaib Khan, H.M.; Hussain, M.D.; Kazi, M. Development and evaluation of nanoemulsion gel loaded with bioactive extract of *Cucumis melo* var. *agrestis*: A novel approach for enhanced skin permeability and antifungal activity. *Heliyon* **2024**, *10*, e35069. [\[CrossRef\]](#)
53. Badrudoza, A.Z.M.; Yeoh, T.; Shah, J.C.; Walsh, T. Assessing and Predicting Physical Stability of Emulsion-Based Topical Semisolid Products: A Review. *J. Pharm. Sci.* **2023**, *112*, 1772–1793. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Niu, H.; Wang, W.; Dou, Z.; Chen, X.; Chen, X.; Chen, H.; Fu, X. Multiscale combined techniques for evaluating emulsion stability: A critical review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2023**, *311*, 102813. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Ziolkowska, D.; Lamkiewicz, J.; Shyichuk, A. Structure and Flocculation of Ion Associates of Carrageenan and Poly (diallyldimethylammonium chloride) Depending on the Component Ratio. *Molecules* **2022**, *27*, 8075. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Dokoumetzidis, A.; Papadopoulou, V.; Macheras, P. Analysis of dissolution data using modified versions of Noyes-Whitney equation and the Weibull function. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 256–261. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Giuliano, E.; Paolino, D.; Cristiano, M.C.; Fresta, M.; Cosco, D. Rutin-Loaded Poloxamer 407-Based Hydrogels for In Situ Administration: Stability Profiles and Rheological Properties. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1069. [\[CrossRef\]](#)
58. Soe, H.M.S.H.; Luckanagul, J.A.; Pavasant, P.; Jansook, P. Development of in situ gel containing asiaticoside/cyclodextrin complexes. Evaluation in culture human periodontal ligament cells (HPLDCs). *Int. J. Pharm.* **2020**, *586*, 119589. [\[CrossRef\]](#)
59. Dymek, M.; Sikora, E. Emulsions as vehicles for the controlled release of astaxanthin in topical application. *Chem. Process Eng.* **2021**, *42*, 439–450. [\[CrossRef\]](#)
60. Puttarak, P.; Brantner, A.; Panichayupakaranant, P. Biological activities and stability of a standardized pentacyclic triterpene enriched *Centella asiatica* extract. *Nat. Prod. Sci.* **2016**, *22*, 20–24. [\[CrossRef\]](#)
61. Wichayapreechar, P.; Anuchapreeda, S.; Phongpradist, R.; Rungseewijitprapa, W.; Ampasavate, C. Dermal targeting of *Centella asiatica* extract using hyaluronic acid surface modified niosomes. *J. Liposome Res.* **2019**, *30*, 197–207. [\[CrossRef\]](#)
62. Costa, P.; Sousa Lobo, J.M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 123–133. [\[CrossRef\]](#)
63. Siepmann, J.; Siepmann, F. Mathematical modeling of drug dissolution. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 12–24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Matos, P.; Batista, M.T.; Veiga, F.; Figueirinha, A.; Figueiras, A. *Acanthus mollis* Formulations for Transdermal Delivery: From Hydrogels to Emulsions. *Gels* **2024**, *10*, 36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

65. Siepmann, J.; Peppas, N.A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *Int. J. Pharm.* **2011**, *418*, 6–12. [CrossRef] [PubMed]
66. Hiranphinyophat, S.; Otake, A.; Asaumi, Y.; Fujii, S.; Iwasaki, Y. Particle-stabilized oil-in-water emulsions as a platform for topical lipophilic drug delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, *197*, 111423. [CrossRef]
67. Suñer-Carbó, J.; Calpena-Campmany, A.; Halbaut-Bellowa, L.; Clares-Naveros, B.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Barbolini, E.; Zamarbide-Losada, J.; Boix-Montañés, A. Biopharmaceutical Development of a Bifonazole Multiple Emulsion for Enhanced Epidermal Delivery. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 66. [CrossRef]
68. Fitri, A.M.N.; Mahfufah, U.; Abd Aziz, S.B.; Sultan, N.A.F.; Sya'ban Mahfud, M.A.; Saputra, M.D.; Elim, D.; Bakri, N.F.; Arjuna, A.; Sari, Y.W.; et al. Enhancement of skin localization of β -carotene from red fruit (*Pandanus conoideus* Lam.) using solid dispersion-thermo-responsive gel delivered via polymeric solid microneedles. *Int. J. Pharm.* **2024**, *660*, 124307. [CrossRef]
69. Gomes, A.; Perez, M.; Mileski Machado, J.; Manhani, K.C.; Leo, P.; Noriega, P.; Ambrosio Zanin, M.H. Polymeric colloidal nanocarriers entrapped with *Centella asiatica* extract. *SN Appl. Sci.* **2020**, *2*, 1918. [CrossRef]
70. Plengmuankhae, W.; Tantitadapitak, C. Low temperature and water dehydration increase the levels of asiaticoside and madecassoside in *Centella asiatica* (L.) Urban. *S. Afr. J. Bot.* **2015**, *97*, 196–203. [CrossRef]
71. Monton, C.; Luprasong, C.; Suksaeree, J.; Songsak, T. Validated high performance liquid chromatography for simultaneous determination of stability of madecassoside and asiaticoside in film forming polymeric dispersions. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2018**, *28*, 289–293. [CrossRef]
72. 0220_F_Turbiscan Application Note. Available online: <https://www.microtrac.com/files/322978/tsi-calculation-explanation.pdf> (accessed on 26 September 2024).

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.

**Monika KRZYŻOSTAN**

Wydział Chemii, Uniwersytet im.
Adama Mickiewicza w Poznaniu,
Uniwersytetu Poznańskiego 8,
61-614 Poznań, Poland;
Dr Koziej Instytut Badań Kosme-
tyków, Czerniakowska 58,
00-717 Warszawa, Poland
monika.krzyzostan@amu.edu.pl

**Agata WAWRZYŃCZAK**

Wydział Chemii, Uniwersytet im.
Adama Mickiewicza w Poznaniu,
Uniwersytetu Poznańskiego 8,
61-614 Poznań, Poland;
agata.wawrzynczak@amu.edu.pl

**Izabela NOWAK**

Wydział Chemii, Uniwersytet im.
Adama Mickiewicza w Poznaniu,
Uniwersytetu Poznańskiego 8,
61-614 Poznań, Poland;
nowakiza@amu.edu.pl

Wpływ kosmetyków zawierających ekstrakt i bioferment z wąkroty azjatyckiej na wybrane parametry bariery naskórkowej u chorych na atopowe zapalenie skóry

Effect of cosmetics containing extract and bioferment of *Centella Asiatica* on selected epidermal barrier parameters in patients with atopic dermatitis

DOI: 10.15199/4.2024.3.5

Bariera naskórkowa to pierwsza linia obrony organizmu przed patogenami, alergenami, toksynami oraz innymi zanieczyszczeniami środowiskowymi. Jej dysfunkcja jest początkowym etapem rozwoju atopowego zapalenia skóry (AZS) i polega na występowaniu nieprawidłowości w składzie i funkcjonowaniu naskórka. Konsekwencją tego jest między innymi zwiększona transepidermalna utrata wody (TEWL), podwyższenie pH powierzchni skóry, spadek nawilżenia oraz zaburzenia w składzie mikrobiomu skóry. Wykorzystanie ekstraktu i biofermentu z wąkroty azjatyckiej (*Centella asiatica* L.) w produktach do pielęgnacji skóry atopowej wydaje się być szczególnie obiecujące ze względu na zawartość postbiotyków i saponin triterpenowych, które wykazują działanie przeciwzapalne, immunomodulujące i równoważące mikrobiom skóry. Dlatego też celem niniejszego badania było przygotowanie i scharakteryzowanie parametrów fizykochemicznych preparatów do stosowania miejscowego, a mianowicie balsamu do ciała, kremu do rąk i kremu do twarzy zawierających ekstrakt (5 % wag.) i bioferment (7 % wag.) z *Centella asiatica* L. Ponadto, przeprowadzono badania *in vivo* wpływu produktów kosmetycznych na wartości TEWL u osób dorosłych z atopowym zapaleniem skóry o przebiegu od łagodnego do umiarkowanego. Słowa kluczowe: przemaskórkowa utrata wody, *Centella asiatica* L., sfermentowany ekstrakt, atopowe zapalenie skóry, dysfunkcja bariery skórnej

The epidermal barrier is the body's first defence against pathogens, allergens, toxins, and other environmental pollutants. Its dysfunction is the initial stage in the development of atopic dermatitis (AD) and involves abnormalities in the composition and function of the epidermis. Consequences include increased transepidermal water loss (TEWL), an increase in the pH of the skin surface, a decrease in hydration, and a disruption in the composition of the skin microbiome. The use of *Centella asiatica* L. extract and bioferment in atopic skin care products appears to be particularly promising due to its content of postbiotics and triterpene saponins, which show anti-inflammatory, immunomodulatory, and balancing effects on the skin microbiome. Therefore, the present study aimed to prepare and characterise the physicochemical parameters of topical preparations, namely a body lotion, a hand cream, and a face cream containing an extract (5 wt. %) and a bioferment (7 wt. %) from *Centella asiatica* L. In addition, an *in vivo* study of the effects of cosmetic products on TEWL values in adults with mild-to-moderate atopic dermatitis was conducted.

Key words: transepidermal water loss, *Centella asiatica* L., fermented extract, atopic dermatitis, skin barrier dysfunction

Wstęp

Atopowe zapalenie skóry (AZS) to choroba zapalna o przewlekłym i nawrotnym przebiegu, która rozpoczyna się zazwyczaj we wczesnym dzieciństwie i może utrzymywać się lub powstawać *de novo* w wieku dorosłym. Charakterystycznymi objawami AZS są zmiany skórne, takie jak rumień, grudki, przeczasy, nadżerki i pęcherzyki, które nierzadko przechodzą w sączące się zmiany pokryte strupami. Chorobie towarzyszy uporczywy i silny świąd wynikający z nadmiernej suchości skóry, prowadzący do ciągłego drapania, a w konsekwencji prowadzący do lichenizacji i pogrubienia naskórka. Patogeneza AZS jest złożona i obejmuje czynniki genetyczne, zaburzenia układu immunologicznego, nieprawidłowości w składzie mikrobiomu skóry oraz dysfunkcję bariery naskórkowej [1-3]. Ponadto występuje stan zapalny związany z brakiem równowagi pomiędzy

limfocytami Th1 i Th2. W fazie ostrej zapalenia przeważają limfocyty Th2, natomiast w fazie przewlekłej dominują limfocyty Th1 [4].

Sucha i fuszcząca się skóra w przebiegu AZS charakteryzuje się zmniejszoną miękkością i gładkością, obniżonym poziomem lipidów w warstwie rogowej oraz zwiększoną szorstkością. Dochodzi także do podwyższenia wartości transepidermalnej utraty wody (TEWL) oraz pH skóry. Wszystkie te zmiany wynikają z uszkodzeń bariery naskórkowej, której zadaniem jest ograniczanie pasywnej utraty wody, a także ochrona przed przenikaniem alergenów, patogenów i substancji środowiskowych. Utrzymanie integralności warstwy rogowej naskórka jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania bariery naskórkowej.

W zdrowej skórze procesy takie jak wytwarzanie naturalnego czynnika nawilżającego (NMF) dzięki przekształcaniu białka filagryny, produkcja lipidów cementu międzykomórkowego do których

należą ceramidy, cholesterol i wolne kwasy tłuszczowe, prawidłowa aktywność enzymów, m.in. proteazy serynowej oraz ich inhibitorów, wydzielanie peptydów antybakteryjnych, obecność komensalnych bakterii, a także prawidłowa odpowiedź immunologiczna na alergen pokarmowe i środowiskowe wspierają funkcję bariery naskórkowej. W przypadku AZS występuje szereg zaburzeń w funkcjonowaniu naskórka, które obejmują m.in. mutacje w genie i obniżenie poziomu filagryny, zaburzenia w składzie i ilości lipidów oraz peptydów antybakteryjnych, wzrost aktywności proteazy serynowej przy jednoczesnym zmniejszeniu działania jej inhibitorów oraz mutacje w genie kodującym białko o nazwie kładyna, co skutkuje zaburzeniem ścisłych połączeń pomiędzy keratynocytami warstwy ziarnistej naskórka [4-5].

Filagryna odgrywa istotną rolę w integralności bariery naskórkowej, a mutacja w genie tego białka jest uznawana za główny czynnik predysponujący do rozwoju AZS. Rozpad filagryny na aminokwasy lub jej konwersja do kwasu urokanowego odgrywa istotną rolę w utrzymaniu kwasowości skóry. Z kolei przekształcenie filagryny w kwas pirrolidynokarboksylowy wspiera odpowiedni poziom nawilżenia. Nieprawidłowa ilość filagryny lub całkowity jej brak w naskórku przyczyniają się do zwiększenia wartości TEWL oraz pH skóry.

Pomiar TEWL, będący prostym i nieinwazyjnym testem, umożliwia ocenę stanu bariery naskórkowej. U osób z AZS zmiany w składzie lipidowym naskórka, zmniejszona ilość ceramidów oraz osłabione połączenia międzykomórkowe prowadzą do powstawania mikrouszkodzeń w warstwie rogowej naskórka, co skutkuje zwiększeniem TEWL [4-5]. W związku z tym bardzo istotna jest odpowiednia pielęgnacja skóry atopowej za pomocą preparatów zawierających emolienty uzupełniające lipidy cementu międzykomórkowego w naskórku oraz substancje aktywne zmniejszające stan zapalny w skórze.

Na przestrzeni lat liczne badania udowodniły szeroki zakres właściwości farmakologicznych wąkroty azjatyckiej (*Centella asiatica* L.) związanych z działaniem przeciwutleniającym, przeciwzapalnym, immunomodulującym, przeciwbakteryjnym, przywracającym równowagę mikrobioty jelitowej, neuroprotektynym, kardioprotektynym, hepatoprotektynym, przeciwlękowym, przeciwartretycznym, przeciwnowotworowym i przeciwdepresyjnym [6]. Obecnie, na potrzeby przemysłu kosmetycznego liście wąkroty azjatyckiej są przetwarzane w procesach ekstrakcji i biofermentacji w celu uzyskania surowców zawierających licznie występujące w roślinie składniki czynne, z których największą grupę stanowią saponiny triterpenowe, takie jak madekasozyd i azjatykozzyd [7]. Proces fermentacji z użyciem mikroorganizmów, głównie bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, dodatkowo dostarcza produktów metabolizmu tychże bakterii, takich jak kwas mlekowy i inne kwasy, aminokwasy, białka, ceramidy, oraz antyoksydanty. W surowcu otrzymanym metodą fermentacji materiału roślinnego obecne są również lizaty bakterii biorących udział w procesie, które wykazują działanie postbiotyczne [8]. Najnowsze badania sugerują, że miejscowe preparaty zawierające lizaty bakterii zostały skutecznie zastosowane u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry, ponieważ modulują funkcje bariery naskórkowej oraz odpowiadają immunologiczną, zapobiegając rozwojowi i nawrotom choroby [9].

Biorąc pod uwagę liczne badania nad właściwościami wąkroty azjatyckiej, można założyć, że połączenie saponin triterpenowych i postbiotyków pochodzących z ekstrakcji i fermentacji liści *Centella asiatica* L. wraz z emolientami, które mogą odbudować barierę naskórkową i zmniejszyć stan zapalny, zapewni kompleksową pielęgnację skóry twarzy i ciała dotkniętej atopowym zapaleniem skóry.

Metodyka badań:

Formulacje balsamu do ciała i kremu do rąk zostały opracowane jako emulsje typu woda w oleju (W/O). Próbkę kontrolną (A) przygotowano według następujących kroków: składniki fazy wodnej, takie jak woda, Massocare Propanediol Nat MB, RonaCare® Magnesium Sulphate i E-Leen Green C, zostały odważone i połączone za pomocą mieszadła mechanicznego. Faza olejowa balsamu do ciała składała się z EWO-Vegetable Emulsifier, Softigen® Pura, Phytosqualan®, Synovea® EL, LIPEX® Omega 3/6™, LIPEX® PreAct™, Akogel™, Raspberry Necta®, Emotion® Light, CeraFluid®, Ceramidone® i Tocomix L70-IP Organic CO. Natomiast faza olejowa kremu do rąk zawierała EWO-Vegetable Emulsifier, Softigen® Pura, Phytosqualan®, Synovea® EL, LIPEX® Omega 3/6™, LIPEX® PreAct™, Raspberry Necta®, Ceramidone®, Tocomix L70-IP Organic CO, Apricot Kernel Oil RBDW oraz Citropol H. Składniki fazy olejowej zostały odważone, wymieszane przy użyciu mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100, a następnie zhomogenizowane za pomocą homogenizatora IKA Ultra Turrax T 18 Digital. Następnie fazy wodna i olejowa zostały połączone w temperaturze pokojowej (25 °C) poprzez stopniowe dodawanie fazy wodnej do fazy olejowej i jednoczesne mieszanie za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100. Mieszanie trwało 15 minut, po czym przeprowadzono homogenizację za pomocą homogenizatora IKA Ultra Turrax T 18 Digital. Po kilku minutach uzyskano gęstą, lepką emulsję. Próbkę eksperymentalną (B) przygotowano według tej samej procedury, z tą różnicą, że do fazy wodnej dodano ekstrakt i bioferment z *Centella asiatica* L.

Formulacja kremu do twarzy została opracowana jako emulsja typu olej w wodzie (O/W). Próbkę kontrolną (A) została przygotowana w następujący sposób: faza wodna, składająca się z wody, Massocare Propanediol Nat MB, Instathix® i HyaCare® Tremella, została odważona i wymieszana za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100. Faza olejowa zawierała: Galehemp OW, Phytosqualan®, Synovea® EL, LIPEX® PreAct™, Akogel™, Raspberry Necta®, CeraFluid®, Ceramidone®, Tocomix L70-IP Organic CO i Citropol H. Składniki fazy olejowej zostały odważone, wymieszane przy użyciu mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100 i zhomogenizowane za pomocą homogenizatora IKA Ultra Turrax T 18 Digital. Następnie faza olejowa była stopniowo dodawana do fazy wodnej w temperaturze pokojowej (25 °C) przy ciągłym mieszaniu za pomocą mieszadła mechanicznego Hei-Torque 100. Proces mieszania trwał 5 minut, po czym przeprowadzono homogenizację za pomocą homogenizatora IKA Ultra Turrax T 18 Digital. Następnie do emulsji dodano E-Leen Green C, a mieszanie i homogenizacja zostały powtórzone, aż uzyskano gęstą i stabilną emulsję. Próbkę eksperymentalną (B) przygotowano według tej samej procedury, z tą różnicą, że do fazy wodnej dodano ekstrakt i bioferment z *Centella asiatica* L.

Warto nadmienić, że zgodnie z normą ISO 16128, każdy surowiec użyty w recepturze kosmetyku ma wskaźnik naturalnego pochodzenia (NOI) równy 1, co wskazuje, że każdy z przygotowanych produktów, a mianowicie balsam do ciała, krem do rąk i krem do twarzy, zawiera 100 % składników pochodzenia naturalnego.

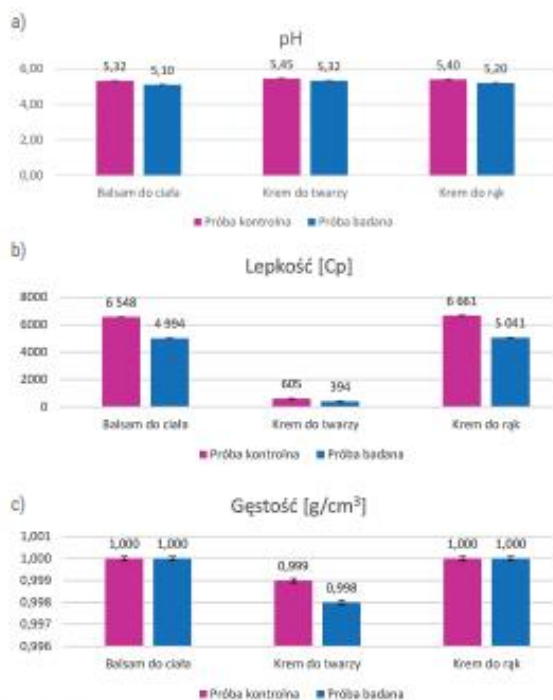
Badania in vivo zostały przeprowadzone na grupie 20 ochotników w wieku od 21 do 54 lat, którą stanowili: 1 mężczyzna (5%) i 19 kobiet (95%) z wrażliwą skórą, dotkniętą atopowym zapaleniem skóry. Ochotników podzielono na dwie grupy: tzn. grupę badaną, która otrzymała produkty zawierające substancje aktywne pochodzące z *Centella asiatica* L. oraz grupę kontrolną stosującą produkty bez substancji aktywnych. Grupa badana obejmowała 10 kobiet, podczas gdy grupa kontrolna składała się z 9 kobiet i 1 mężczyzny. Pomiar instrumentalny przeprowadzono na wybranym obszarze skóry ciała,

dłoni i twarzy przed rozpoczęciem aplikacji (stan wyjściowy) oraz po 2 i 4 tygodniach stosowania produktów. Testy instrumentalne przeprowadzono w standardowych warunkach środowiskowych temperatury (20-25 °C) i wilgotności względnej (40-60 %), przy użyciu profesjonalnego sprzętu pomiarowego firmy Courage+Khazaka electronic GmbH (Niemcy). Przenaskórkową utratę wody mierzono za pomocą urządzenia Tewameter TM HEX oceniającego gradient gęstości parowania wody ze skóry, który jest proporcjonalny do wartości TEWL.

Analiza statystyczna: wszystkie pomiary wykonano trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako średnią i odchylenie standardowe ($\pm$ SD). Do analizy statystycznej wykorzystano IBM SPSS Statistics 28. Wartość $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotną. Wybrano test Shapiro-Wilka, aby sprawdzić, czy dane podlegają rozkładowi normalnemu, a test Levene'a wykorzystano do oceny jednorodności wariancji. Aby zbadać różnice w danych ilościowych między grupą kontrolną a eksperymentalną, wybrano parametryczny test t-Studenta. Aby porównać stan parametrów skóry po 14 dniach i 30 dniach z wartościami wyjściowymi oddzielnie w grupie badanej i kontrolnej, wybrano zarówno parametryczny test ANOVA, jak i test Wilcoxon.

Wyniki badań i dyskusja:

Ocena organoleptyczna wskazała, że wszystkie preparaty były jednorodne i miały delikatny zapach, który był charakterystyczny dla użytych surowców, głównie emolientów. Porównując parametry fizykochemiczne, takie jak pH, gęstość i lepkość dla próby badanej i kontrolnej (wykres 1), wykazano nieznaczne różnice w wartościach



Wykres 1. Podstawowe parametry fizykochemiczne preparatów kosmetycznych przygotowanych w ramach badań: (a) pH, (b) lepkość, (c) gęstość.

pH i nieco bardziej wyraźne w przypadku lepkości, na co mogła wpłynąć obecność w recepturze ekstraktu oraz biofermentu z wąkroty.

Analiza TEWL stanowi kluczową, nieinwazyjną metodę pomiarową *in vivo*, która pozwala na ocenę utraty wody przez warstwę rógową naskórka, co jest istotne w kontekście funkcji bariery ochronnej skóry. Zmiany w składzie lipidowym naskórka, obniżony poziom ceramidów oraz dysfunkcja połączeń ścisłych, które odpowiadają za spójność komórkową, prowadzą do mikrouszkodzeń naskórka u pacjentów z AZS [7]. Uszkodzenia te skutkują wzrostem wartości TEWL [10].

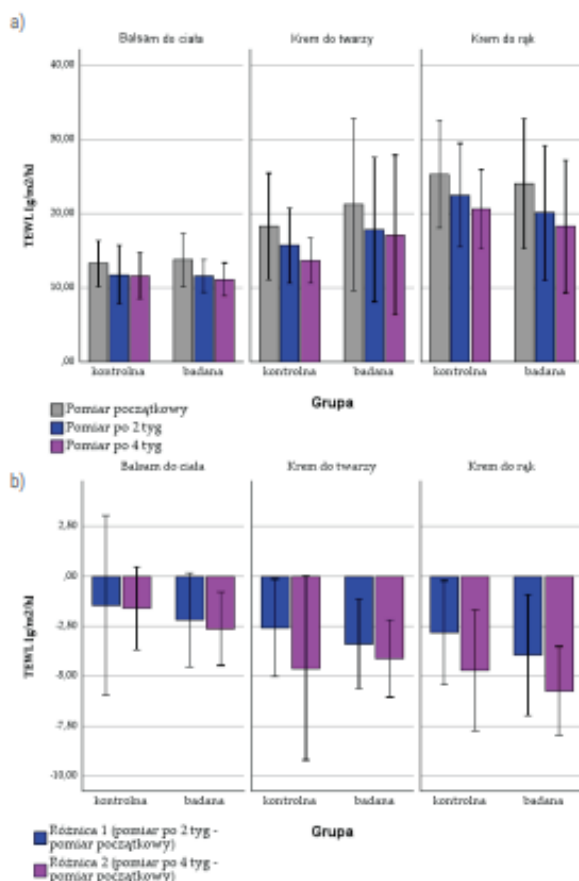
Na wykresie 2a zilustrowano zmiany wartości TEWL w grupie badanej i kontrolnej po 2 i 4 tygodniach stosowania testowanych produktów. Przeprowadzono również porównania różnic w wartościach TEWL między pomiarami początkowymi a wynikami po 2 i 4 tygodniach w obu grupach (wykres 2b). Wartości ujemne wskazują na obniżenie poziomu TEWL.

Wykres 2a ukazuje, że średnia wartość TEWL zmniejszyła się w obu grupach po 2 i 4 tygodniach stosowania testowanych produktów kosmetycznych. W grupie kontrolnej używającej balsamu do ciała odnotowano 11 % redukcję TEWL po 2 tygodniach (z 13,25 do 11,78 g/m²/h) oraz 12 % redukcję po 4 tygodniach (z 13,25 do 11,65 g/m²/h). Analiza statystyczna nie wykazała jednak istotnych różnic między kolejnymi pomiarami ($p = 0,202$). W grupie badanej, po 2 tygodniach stosowania balsamu, wartość TEWL zmniejszyła się o 16 % (z 13,76 do 11,59 g/m²/h), z wynikiem bliskim istotności statystycznej ($p = 0,059$). Po 4 tygodniach redukcja wyniosła 19 % (z 13,76 do 11,13 g/m²/h) i była statystycznie istotna ($p = 0,002$). Porównania między grupą badaną i kontrolną nie wykazały istotnych różnic, pomimo, iż spadek wartości TEWL w grupie badanej był bardziej wyraźny zarówno po 2 tygodniach ($p = 0,680$), jak i po 4 tygodniach stosowania produktów ($p = 0,267$).

Po 2 tygodniach stosowania kremu do twarzy w grupie badanej zaobserwowano istotną redukcję TEWL o 16 % (z 21,22 do 17,83 g/m²/h; $p = 0,014$), natomiast po 4 tygodniach redukcja TEWL wyniosła 19 % (z 21,22 do 17,11 g/m²/h; $p < 0,001$). W grupie kontrolnej zaobserwowano istotną 4 % redukcję TEWL (z 18,26 do 15,68 g/m²/h; $p = 0,025$) po 2 tygodniach stosowania kremu do twarzy, natomiast po 4 tygodniach zaobserwowano 25 % redukcję TEWL (z 18,26 do 13,66 g/m²/h; $p < 0,001$). Porównując różnice między grupą badaną i kontrolną, nie były one statystycznie istotne zarówno po 2 tygodniach ($p = 0,448$), jak i po 4 tygodniach ($p = 0,761$) stosowania kremu do twarzy.

W przypadku stosowania kremu do rąk, w grupie badanej TEWL obniżył się o 16 % po 2 tygodniach (z 24,02 do 20,08 g/m²/h; $p = 0,044$) oraz o 24 % po 4 tygodniach (z 24,02 do 18,27 g/m²/h; $p < 0,010$). W grupie kontrolnej zmniejszenie TEWL wyniosło 11 % po 2 tygodniach (z 25,30 do 22,47 g/m²/h; $p = 0,025$) i 19 % po 4 tygodniach (z 25,30 do 20,58 g/m²/h; $p < 0,010$). Różnice między grupami były jednak statystycznie nieistotne, zarówno po 2 tygodniach ($p = 0,390$), jak i po 4 tygodniach ($p = 0,400$) stosowania kremu do rąk.

Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że tylko w przypadku balsamu do ciała w grupie kontrolnej nie odnotowano istotnych statystycznie zmian w redukcji TEWL po 2 i 4 tygodniach stosowania produktu. Wnioskuje się, że zarówno próbki badane, zawierające ekstrakt i bioferment z *Centella asiatica* L., jak i próbki kontrolne, które nie zawierały tych aktywnych składników, mogą skutecznie obniżyć poziom TEWL u osób z AZS poprzez poprawę funkcji bariery naskórkowej. Pomimo, iż w grupie badanej zaobserwowano większą redukcję TEWL w porównaniu do wartości początkowej, różnice między grupą badaną a kontrolną nie osiągnęły istotności



Wykres 2. Zmiany wartości TEWL u dorosłych ochotników z AZS w grupie badanej i kontrolnej; (a) wartości TEWL (średnia $\pm$ SD) przed zastosowaniem preparatów oraz po 2 tygodniach i 4 tygodniach stosowania balsamu do ciała, kremu do twarzy i kremu do rąk; (b) różnice w wartościach TEWL: po 2 tygodniach stosowania preparatów względem wartości wyjściowej oraz po 4 tygodniach stosowania preparatów względem wartości wyjściowej.

statystycznej (Wykres 2b). Duże odchylenia standardowe zauważalne w uzyskiwanych wynikach można tłumaczyć znaczną zmiennością osobniczą uczestników badania oraz stosunkowo niewielką liczebnością grup badanej i kontrolnej. U osób z łagodną postacią AZS stwierdzono niższe początkowe wartości TEWL w porównaniu do osób z umiarkowanym AZS, co jest związane z mniejszym nasileniem stanu zapalnego skóry. Podobne obserwacje poczyniono w badaniu Polańskiej i współautorów [11], gdzie również analizowano TEWL u pacjentów z AZS. Odkryto istotne statystycznie różnice w średnich wartościach TEWL między grupami pacjentów z różnym nasileniem zapalenia skóry, określanym przy użyciu wskaźnika W-AZS. Wyniki wskazują, że pacjenci z bardziej nasilonym stanem zapalnym charakteryzują się wyższymi wartościami TEWL [11].

Jurak et al. poczynili podobne obserwacje w badaniach porównujących wartości TEWL oraz pH skóry u pacjentów z AZS i osób zdrowych. Stwierdzono, że zarówno skóra zmieniona chorobowo, jak i niezmieniona u pacjentów z AZS charakteryzuje się wyższymi wartościami TEWL i pH [12].

Przeprowadzone badanie wykazało, że próbki badane zawierające substancje aktywne nie były znacząco lepsze od próbek kontrolnych w zakresie redukcji TEWL. Wynika to z faktu, że zarówno próbki badane, jak i kontrolne zawierały podobne emolienty w niemal identycznych proporcjach. Dowiedzono, że emolienty stanowią podstawowe składniki formułacji kosmetycznych, które wspomagają odbudowę bariery naskórkowej i zapobiegają nawrotom AZS [13,14].

Emolienty zawarte w produktach przygotowanych w ramach niniejszych badań, w tym lipidy fizjologiczne, takie jak ceramidy i trójglicerydy, wykazały szczególnie korzystny wpływ na odbudowę bariery naskórkowej. W porównaniu do emolientów na bazie parafiny, które powszechnie stosuje się w leczeniu AZS, lipidy fizjologiczne nie tworzą warstwy okluzyjnej na powierzchni warstwy rogowej. Dzięki ich zgodności z lipidami obecnymi w warstwie rogowej, są szybko wchłaniane przez komórki warstwy kolczystej i ziarnistej naskórka [15]. W badaniu przeprowadzonym przez Danby i współpracowników porównano krem na bazie emolientów zawierający lipidy fizjologiczne, takie jak ceramidy, trójglicerydy i cholesterol, z kremem na bazie parafiny. Wykazano, że emolient na bazie lipidów fizjologicznych jest skuteczniejszy w odbudowie integralności bariery skórnej niż krem parafinowy. Potwierdzono to poprzez znaczącą poprawę parametrów skóry, takich jak TEWL, nawilżenie, wrażliwość na siarczan sodu i zaczerwienienie skóry [16]. Dodatkowo, badanie przeprowadzone przez Anggraeni et al. porównało skuteczność kremu zawierającego ekstrakt z *Centella asiatica* L. oraz kremu z ceramidami w redukcji TEWL u indonezyjskich pracowników batik, którzy cierpieli na suchość skóry. Nie zaobserwowano istotnych różnic między tymi dwoma kremami [17]. Potwierdza to, że najistotniejsze działanie w przypadku obniżania wartości TEWL mają emolienty na bazie lipidów fizjologicznych, natomiast zawartość w produkcie ekstraktu i biofermentu z wąkroty azjatyckiej nie będzie wpływała na istotny statystycznie sposób na TEWL.

Podsumowanie:

Utrzymanie integralności warstwy rogowej naskórka jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania bariery naskórkowej, której zadaniem jest ograniczanie pasywnej utraty wody, a także ochrona przed przenikaniem alergenów i patogenów środowiskowych. W przypadku AZS występuje szereg zaburzeń w funkcjonowaniu naskórka, które skutkują uszkodzeniem ścisłych połączeń pomiędzy keratynocytami warstwy ziarnistej naskórka oraz pomiędzy korneocytami warstwy rogowej. Dlatego odpowiednia pielęgnacja skóry atopowej powinna opierać się na preparatach bogatych w emolienty uzupełniające lipidy cementu międzykomórkowego w naskórku oraz w substancje aktywne redukujące stan zapalny w skórze.

W ramach przeprowadzonych badań przygotowano serię produktów kosmetycznych, tzn. balsam do ciała, krem do rąk i krem do twarzy, które w 100 % bazują na składnikach pochodzenia naturalnego. Testy aplikacyjne z ich udziałem pozwalają zauważyć, że zarówno produkty zawierające bioferment i ekstrakt z *Centella asiatica* L., jak i próbki kontrolne, które nie zawierały tych składników aktywnych, mogą skutecznie obniżyć poziom TEWL. Emolienty zawarte w badanych produktach, w tym lipidy fizjologiczne, takie jak ceramidy i trójglicerydy, wykazują szczególnie korzystny wpływ na odbudowę bariery naskórkowej, co ma kluczowe znaczenie w terapii skóry dotkniętej AZS.

Mgr Monika KRZYŻOSTAN (ORCID: 0000-0002-6116-6325) w 2009 roku ukończyła studia licencjackie z kosmetologii na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, a w roku 2011 studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza. Jest doktorantką w Zakładzie Chemii Stosowanej na tym samym wydziale. Pracuje w Instytucie Badań Kosmetyków dr Koziej na stanowisku kierownika laboratorium badawczo-rozwojowego. Specjalność – tworzenie receptur kosmetyków, szczególnie przeznaczonych dla skór z dermatozami.

Dr Agata Wawrzyńczak (ORCID: 0000-0003-3815-4841) stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w 2007 roku na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W 2011 roku odbyła staż podoktorski na Wydziale Technologii Chemicznej i Katalizy Heterogenicznej w RWTH Aachen University (Niemcy). Obecnie pracuje jako starszy wykładowca na Wydziale Chemii UAM. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się na syntezie, modyfikacji, charakterystyce i zastosowaniu uporządkowanych materiałów nanoporowatych, a także na tematach związanych z nowoczesnymi strategiami syntezy i badań kosmetyków oraz ich składników.

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 mezooporowatych 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 kosmeceutyków.

LITERATURA:

- [1] Sroka-Tomaszewska, J.; Trzeciak, M. **Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis**. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 4130.
- [2] Torres, T.; Ferreira, E. O.; Gonçalo, M.; Mendes-Bastos, P.; Selores, M.; & Filipe, P. (2019). **Update on atopic dermatitis**. *Acta medica portuguesa*, 32(9), 606-613.
- [3] Bylund, S., von Kobyletzki, L. B., Svalstedt, M., & Svensson, Å. **Prevalence and incidence of atopic dermatitis: a systematic review**. *Acta dermato-venereologica*, 100(12): 5765. Doi:10.2340/00015555-3510
- [4] Li, H., Zhang, Z., Zhang, H., Guo, Y., & Yao, Z. (2021). **Update on the pathogenesis and therapy of atopic dermatitis**. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 61, 324–338.
- [5] Fujii, M. **Current understanding of pathophysiological mechanisms of atopic dermatitis: interactions among skin barrier dysfunction, immune abnormalities and pruritus**.
- [6] Hoque M., Rafi I.K., Hossain M.S., **Centella asiatica: A mini review of its medicinal properties and different uses**, *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 2023, 19(02), 1185–1191.
- [7] Krzyżostan, M.; Nowak, I. **Triterpenoid saponins derived from Centella asiatica L.**, *Przemysł Chemiczny* 2024, 103 (4), 499-503. Doi: 10.15199/62.2024.4.3
- [8] Pérez-Rivero, C., López-Gómez, J.P. **Unlocking the Potential of Fermentation in Cosmetics: A Review**. *Fermentation* 2023, 9, 463.
- [9] Alam, M.J.; Xie, L.; Yap, Y.-A.; Marques, F.Z.; Robert, R. **Manipulating Microbiota to Treat Atopic Dermatitis: Functions and Therapies**. *Pathogens* 2022, 11, 642. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060642>
- [10] Montero-Vilchez, T.; Segura-Fernández-Nogueras, M.-V.; Pérez-Rodríguez, I.; Soler-Gongora, M.; Martínez-López, A.; Fernández-González, A.; Molina-Leyva, A.; Arias-Santiago, S. **Skin Barrier Function in Psoriasis and Atopic Dermatitis: Transepidermal Water Loss and Temperature as Useful Tools to Assess Disease Severity**. *J. Clin. Med.* 2021, 10, 359.
- [11] Polańska, A., Dańczak-Pazdrowska, A., Silny, W., Jenerowicz, D., Osmola-Markowska, A., & Olek-Hrab, K. **Evaluation of selected skin barrier functions in atopic dermatitis in relation to the disease severity and pruritus**. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 2012, 29(5), 373-377.
- [12] Jurakic Toncic, R.; Jakasa, I.; Sun, Y.; Hurault, G.; Ljubovic Hadzavdic, S.; Tanaka, R.J.; Pavicic, B.; Balic, A.; Zuzul, K.; Petkovic, M.; et al. **Stratum corneum markers of innate and T helper cell-related immunity and their relation to the disease severity in Croatian patients with atopic dermatitis**. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2021, 35, 1186–1196.
- [13] Araviiskaia E., Pincelli C., Sparavigna A., Luger T., **The Role of a Novel Generation of Emollients, 'Emollients Plus', in Atopic Dermatitis**, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2022, 15, 2705–2719.
- [14] Zhang, J., Xu, X., Wang, X., Zhang, L., Hu, M., Le, Y., ... & Zheng, J. **Topical emollient prevents the development of atopic dermatitis and atopic march in mice**. *Experimental Dermatology*, 2023, 32(7), 1007-1015.
- [15] Elias P.M., **Optimizing emollient therapy for skin barrier repair in atopic dermatitis**, *American College of Allergy, Asthma & Immunology*, 2022, 128:505-511.
- [16] Danby, S. G., Andrew, P. V., Kay, L. J., Pinnock, A., Chittock, J., Brown, K., Williams S.F., Cork, M. J., **Enhancement of stratum corneum lipid structure improves skin barrier function and protects against irritation in adults with dry, eczema prone skin**. *British Journal of Dermatology*, 2022, 186(5), 875-886.
- [17] Anggraeni, S., Umborowati, M.A., Damayanti, D., Endaryanto, A., Prakoeswa, C.C.R.S., **Role of Centella asiatica and ceramide in skin barrier improvement: a double blind clinical trial of Indonesian batik workers**, *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, vol. 32, no. 4, 2021, pp. 589-593.



Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract

Journal:	<i>Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Keywords:	atopic dermatitis, skin barrier dysfunction, skin topographic parameters, <i>Centella asiatica</i> L. fermented extract, sustainable cosmetics, emollient plus formulations

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **Article type:** Original article

2 **Title:** Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L.

3 bioferment and extract

4 **Running title:** Skin barrier function in AD

5 Monika Krzyżostan, MS^{1,2}, Agata Wawrzyńczak, PhD¹, Izabela Nowak, Prof.¹

6 ¹ Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614

7 Poznań, Poland

8 ² Dr Koziej Instytut Badań Kosmetyków, Czerniakowska 58, 00-717 Warsaw, Poland

9 **Corresponding author:**

10 Izabela Nowak, Prof.

11 Faculty of Chemistry, AMU

12 Uniwersytetu Poznańskiego 8

13 61-614 Poznań, Poland

14 Email: nowakiza@amu.edu.pl

15

16 **Funding information:** None

17

18 **Conflicts of Interest:** None declared.

19

20 **Ethical Approval:** This study was conducted with the approval of the bioethics committee (consent no.

21 478/24 by decision of the Bioethics Commission at the Medical University of Karol Marcinkowski in Poznań,

22 Poland).

23

24 **Ethics statement:** All volunteers gave their informed consent for inclusion before the participation in the

25 study.

26

27 **Data availability statement:** The data that support the findings of this study are available from the

28 corresponding author upon reasonable request.

29

30 **Author contribution:** **Monika Krzyżostan:** Conceptualization, Methodology, Formal Analysis,

31 Investigation, Resources, Data curation, Writing-Original draft preparation, Visualization; **Agata**

32 **Wawrzyńczak:** Methodology, Validation, Formal Analysis, Writing-Original Draft Preparation, Writing-

33 Review & Editing, Supervision; **Izabela Nowak:** Conceptualization, Validation, Resources, Writing-Review

34 & Editing, Supervision.

35

36 **Manuscript word count:** 3167 words

37 **Abstract word count:** 299

38 **References:** 46

39 **Figures:** 6

40 Supplementary figures: 0

41 **Tables:** 2

42 Supplementary tables: 3

43

Keywords: atopic dermatitis; skin barrier dysfunction; skin topographic parameters; *Centella asiatica* L.
fermented extract, sustainable cosmetics, emollient plus formulations.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59

47 **Abstract**

48 *Background:* Atopic dermatitis (AD) is one of the most common allergic and inflammatory skin diseases
49 with a complex aetiology. However, there is no data available in the literature on the use of emollients
50 combined with the extract and bioferment of *Centella asiatica* L. in topical formulations obtained in the
51 cold emulsification process from natural, plant-derived, and upcycled raw materials, supporting the AD
52 treatment.

53 *Objective:* The objective was to develop a collection of sustainable, cold-processed emollient plus topical
54 formulations with an in vivo-proven influence on the key symptoms of AD, restoring the proper functions
55 of the epidermal barrier, thus supporting the treatment of AD in adults.

56 *Methods:* Three types of emulsion-based products were prepared, both as control and experimental
57 samples. 20 volunteers aged between 21 and 54 years with sensitive skin affected by AD according to
58 the major diagnostic criteria of Hanifin & Rajka, were recruited. A randomized, single-blind, placebo-
59 controlled study was performed with volunteers randomly divided into the experimental group (n = 10)
60 using formulations based only on lipids and the control group (n = 10) using products containing
61 additionally extract (5 wt.%) and bioferment (7 wt.%) of *Centella asiatica* L.. Skin hydration, roughness,
62 smoothness, and desquamation index were determined instrumentally after 2 and 4 weeks of products
63 application.

64 *Results:* Measurements of the epidermis hydration, roughness, and smoothness showed
65 statistically significant differences ($p < 0.05$) between the experimental and control groups after
66 2 or 4 weeks of products application. Skin desquamation decreased significantly compared to
67 the baseline in both the experimental and control groups after 4 weeks of using formulations
68 tested ($p < 0.001$).

69 *Conclusion:* Emollient-rich, cold-processed, and sustainable topical formulations based on physiological
70 lipids and containing the extract and bioferment of *Centella asiatica* L. are a promising strategy to
71 support the treatment of AD by rebuilding the epidermal barrier and preventing the disease's relapse.

72

73

74 **Key Points:**

- 75 • Lack of data from in vivo studies on emollients combined with *Centella asiatica* L.
76 extract/bioferment supporting the treatment of AD.
- 77 • Necessity of a sustainable approach in topical formulations dedicated to AD-affected skin.
- 78 • In vivo proven ability of sustainable emollient plus topical formulations to rebuild the epidermal
79 barrier and influence the key symptoms of AD.
- 80 • Emollient plus formulations with physiological lipids combined with *Centella asiatica* L. extract
81 and bioferment as a promising strategy to support the treatment of AD.

82

83

1
2
3 84 **Main text:**
4
5 85 **Introduction**
6
7
8 86 Atopic dermatitis (AD) is a common inflammatory skin disease with a relapsing course^{1,2} and
9
10 87 characteristic symptoms like lesions, such as erythematous and papulovesicular eruptions, which
11
12 88 frequently develop into oozing and crusting with persistent, and severe itching resulting from skin
13
14 89 dryness^{3,4}. The complex pathogenesis of AD includes genetic factors, immune system dysregulation,
15
16 90 skin, gut microbiome abnormalities, and dysfunction of the epidermal barrier⁵⁻⁷. Scaly, xerotic, and dry
17
18 91 skin is characterized by reduced softness, smoothness, and lipid content in the stratum corneum, with
19
20 92 increased roughness, transepidermal water loss (TEWL), and dysfunctional pH and microbiome of the
21
22 93 skin surface⁸.
23
24
25 94 One of the basic goal of AD therapy is to restore the proper functions of the epidermal barrier^{9,10}.
26
27 95 Therefore, it is crucial to develop skincare products, that contain emollients and natural bioactive
28
29 96 substances with the potential to reduce inflammation. This type of products, that besides physiological
30
31 97 lipids, such as ceramides and polyunsaturated fatty acids, also contain active substances, such as
32
33 98 saponins, flavonoids with an anti-inflammatory effect derived from cytokine inhibition, are called
34
35 99 emollients plus formulations¹¹. Numerous studies have shown that regular usage of emollient plus
36
37 100 products can restore skin barrier function, decrease cytokine production, and reduce mast cell
38
39 101 hypertrophy, degranulation, and epidermal hyperplasia. Moreover, emollient-rich therapy can delay
40
41 102 the onset of disease and decrease the topical corticosteroid demand in the treatment of patients with
42
43 103 moderate to severe AD. Emollient plus regimen can also significantly reduce pruritus and erythema
44
45 104 while increasing hydration of the skin in adults suffering from AD¹²⁻¹⁵.
46
47 105 The main active ingredients responsible for the multidirectional action of *Centella asiatica* L. are
48
49 106 ursane-type pentacyclic triterpenoids (asiatic and madecassic acids), and ursane-type triterpene
50
51 107 glycosides (asiaticoside and madecassoside)^{16,17}. Over the last decade, several in vitro and in vivo
52
53
54
55
56
57
58
59

studies conducted on mouse models of AD skin have demonstrated that *Centella asiatica* L. extract inhibits hyperkeratosis and infiltration of inflammatory cells in AD lesions¹⁸⁻²⁴. Bioferment of *Centella asiatica* L. is a combination of active triterpenoids derived from the plant and postbiotic obtained as a result of fermentation process by *Lactobacillus reuteri*. It has been proven that fermented plant extracts have antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, anti-melanogenic, and wound-healing properties²⁵⁻²⁷. Due to this fact, incorporation of postbiotics to formulations of cosmetics seems to be a promising approach supporting the AD treatment.

In the case of emollient-rich products intended for atopic skin, in which oils constitute 30-50 % of the composition, protection of oils and temperature-sensitive active substances is crucial and can be achieved by applying cold emulsification process. It protects the skin from the effects of free radicals resulting from oil oxidation. Upcycling by using agro-food wastes in obtaining raw materials also supports a sustainable approach in the cosmetic industry²⁸.

Therefore, the main objective of our study was to develop a collection of sustainable and cold-processed emollient plus formulations for topical application supporting the treatment of AD in adults. We assumed that the combination of emollients that can rebuild the epidermal barrier together with the triterpene saponins and postbiotics resulting from the extraction and fermentation of *Centella asiatica* L. leaves will set a comprehensive support in the treatment to the skin affected by AD. Moreover, the cold-processing strategy during the emulsification process helped to improve the sustainability and reduce the impact of resulting products on the environment.

Materials and Methods

Characterization of the participants of the study

20 volunteers aged between 21 and 54 years, including 1 male (5 %) and 19 females (95 %), with sensitive skin, affected by AD according to the major diagnostic criteria of Hanifin & Rajka²⁹, were recruited into the study. There were no statistical differences between the experimental and control

groups in the age of the participants (t-test, $p = 0.356$) (Table 1). A single-blind, placebo-controlled study with simple randomization was performed. Volunteers were randomly (flipping the coin) divided into 2 groups, namely the control group ($n = 10$, 9 women and 1 man) using lipid-based formulations and the experimental group ($n = 10$, only women) using lipid-based formulations with 5 wt. % of the *Centella asiatica* L. extract and 7 wt. % of the *Centella asiatica* L. bioferment. Control samples had the same color and consistency as experimental samples. They were packed in identical, sequentially numbered containers.

Table 1. The age characteristics of the control and experimental groups.

	AGE		
	Control group	Experimental group	Total group
Mean	43	39	41
Median	44	32	42
SD	8.7	9.7	9.2
Minimum age	29	21	21
Maximum age	54	51	54
p-value	0.356		-

All volunteers consented to join the study on a voluntary basis. Although the scoring AD (SCORAD) index was not checked, all volunteers had skin lesions typical of mild and moderate AD. Patients with severe AD were excluded from the study. Detailed participation criteria for in vivo tests are collected in

Table 2.

Table 2. Participation criteria defined for in vivo tests.

The inclusion criteria	The exclusion criteria
Age: 18 years or more;	Pregnancy or breastfeeding;
Mild to moderate atopic dermatitis and sensitive skin;	Severe atopic dermatitis;
Chronic or recurrent, pruritic lesions with characteristic distribution on the skin;	Pharmacological therapy.
Positive family history of allergic conditions;	

No need for pharmacological treatment during the product testing;

Lack of any other accompanying skin diseases.

146

147 The homogeneity between the experimental and control groups was statistically evaluated employing a
 148 parametric t-test. Statistically significant differences were not observed between the control and the
 149 experimental group in skin parameters such as hydration, skin roughness, smoothness, and degree of
 150 epidermis exfoliation at the beginning of the study (baseline, $p > 0,05$, t-test).

151 **Instruments and procedure of the in vivo study**

152 The study was carried out under the supervision of a qualified examiner and dermatologist. Volunteers
 153 tested products under home conditions, according to the procedure described in Data S1. Instrumental
 154 measurements were performed on the selected skin area of the body, hand, and face before starting
 155 the application (baseline) and after 2 and 4 weeks of using the products, namely body lotion (BL), hand
 156 cream (HC), and face cream (FC). Instrumental tests were performed under standardized
 157 environmental conditions of temperature (20-25 °C) and relative humidity (40-60 %), using professional
 158 measuring equipment from Courage+Khazaka electronic GmbH (Germany). Hydration of the epidermis
 159 was determined by a Corneometer CM825 probe and expressed in the measurement units of the
 160 device, indicating the electrostatic capacity and reflecting the degree of hydration of the stratum
 161 corneum. Skin smoothness (SEsm), roughness (SEr), and desquamation index were determined by a
 162 Visioscan VC20-plus with the support of a Corneofix F20 adhesive foil collecting corneocytes for skin
 163 exfoliation measurements.

164 **Statistical analysis**

165 All measurements were performed in triplicate and the results are presented as mean value with
 166 standard deviation ($\pm$ SD). For statistical analysis, IBM SPSS Statistics 28 software was used. The p-value
 167 < 0.05 was considered statistically significant. The Shapiro-Wilk test was chosen to examine whether

1
2
3
4 168 the data followed a normal distribution, and Levene's test was used to assess the homogeneity of
5
6 169 variances. To examine differences in the quantitative data between the control and experimental
7
8 170 group, the parametric Student's t-test for instrumental measurement was selected. To compare the
9
10 171 status of the skin parameters (separately in the experimental and control group) after 2 weeks and 4
11
12 172 weeks to the baseline, both the parametric ANOVA test and the Wilcoxon signed-rank test were
13
14 173 selected (for the ANOVA test, Bonferroni's post-hoc test was used).

15 16 17 174 **Results and Discussion**

18 19 175 **Sustainability and naturalness of the emollient plus formulations**

20
21 176 During formulation of products, special emphasis was paid on the reduction in waste and carbon
22
23 177 footprint, on biodiversity, the protection and restoration of ecosystems³⁰. According to the literature
24
25 178 data, cold processed O/W emulsions can help to save 67 % in electrical costs, 36.7 % in water, and 17.1
26
27 179 % in total production expenses, when compared to the hot process³¹. Therefore, we have applied a
28
29
30 180 cold emulsification process to all formulations (Data S1), even though it is a challenging task because of
31
32 181 the impossibility of using stabilizers of oil-phase emulsions, such as solid waxes, and necessity of using
33
34 182 the specific emulsifier not requiring additional thickeners. Another advantage of cold emulsification is
35
36 183 the preservation of the natural active ingredients and oils used in the formulations, which are sensitive
37
38 184 to high temperatures and susceptible to the oxidation process. It is crucial to provide oxidation-stable
39
40 185 ingredients, as the oxidation products in the cosmetic formulation will contribute to the exacerbation
41
42
43 186 of skin inflammation.
44
45 187 Additional sustainable solution was the use of environmentally friendly raw materials obtained by
46
47 188 green technologies. All lipid-based ingredients in the synthesized emollient plus formulations are of
48
49 189 vegetable origin (Table S3). Synthetic mineral oils were substituted with their counterparts obtained by
50
51
52 190 upcycling of food waste by physical or chemical processing performed according to the principles of
53
54
55
56
57
58
59
60

191 green chemistry. Moreover, the bioferment of *Centella asiatica* L. was obtained biotechnologically,
192 using the fermentation process.

193 **In vivo studies**

194 All volunteers assigned to the study were analyzed for the outcome among originally assigned groups.

195 The function of the epidermal barrier of volunteers suffering from AD was evaluated by measuring

196 hydration of the stratum corneum, as it is the parameter that assesses the condition of the epidermal

197 barrier³². Additionally, the roughness, smoothness, and desquamation of the epidermis, were

198 measured as the parameters that confirm the rebuilding of the epidermal barrier function³³.

199 **In vivo skin irritation test (patch tests)**

200 In vivo patch test showed that no irritation was observed in any of the test volunteers after 48 h and 72

201 h of application of each of the products. Thus, all products meet the requirements of the skin tolerance

202 test and may be considered non-irritant. According to the published results, *Centella asiatica* L. leaf

203 extract at a specific concentration is safe for topical application on the skin³⁴⁻³⁶. Consequently, we

204 conclude that our formulations containing *Centella asiatica* L. extract and bioferment can be

205 considered safe for use in people with AD.

206 **Stratum corneum hydration (SCH)**

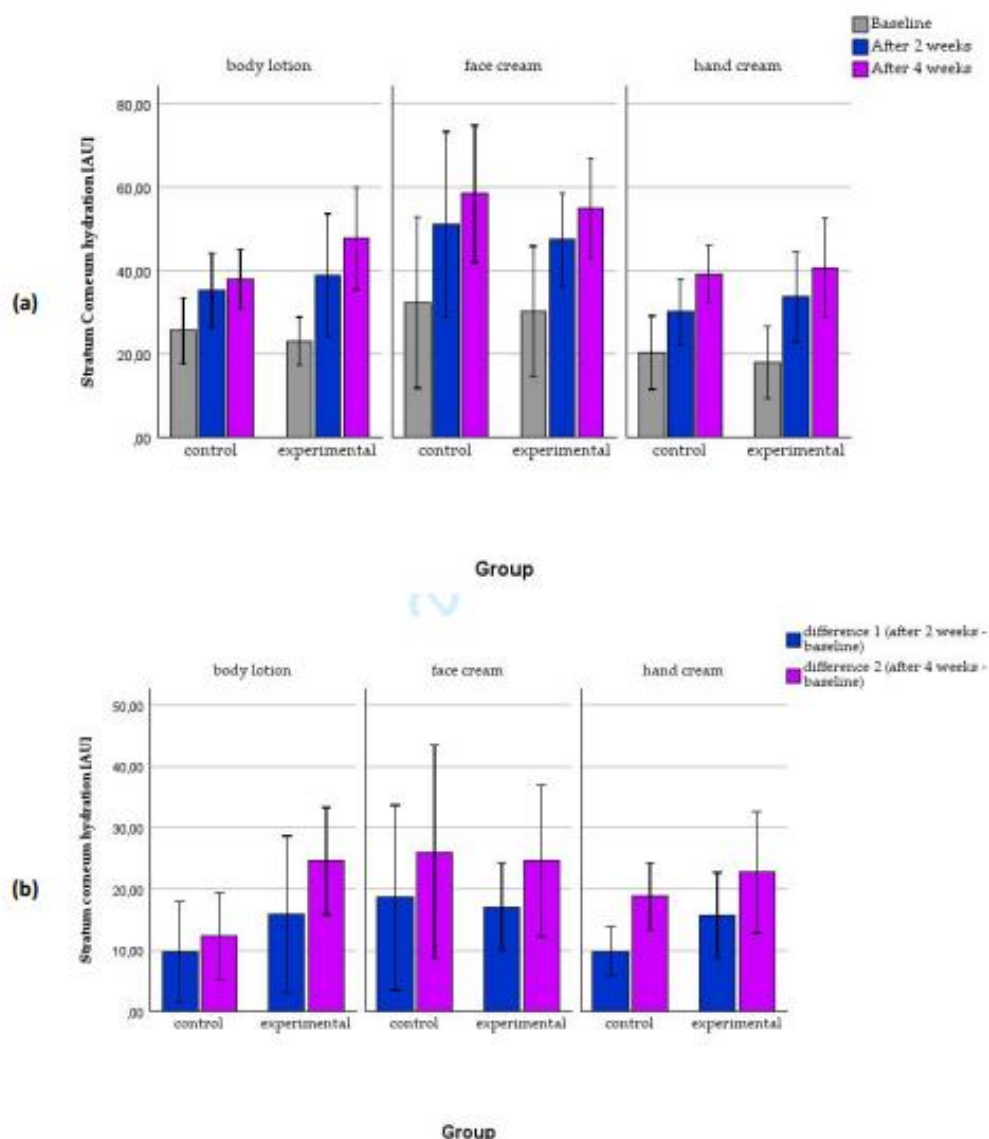


Figure 1. Stratum corneum hydration in the experimental ($n = 10$) and control ($n = 10$) groups of adult volunteers with AD; (a) SCH values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2 weeks and 4 weeks of using body lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SCH values (2 weeks vs. baseline and 4

210 weeks vs. baseline). Lower values of SCH are frequently associated with the dysfunction of the skin
211 barrier.
212
213 As follows from the data presented in Figure 1a, the mean value of SCH increased significantly in both
214 the experimental and control groups after 4 weeks of using BL, HC, and FC ($p < 0.001$). SCH in the
215 experimental group increased by 106 % (from 23.10 to 47.66 AU) after use of BL, by 126 % (from 17.94
216 to 40.63 AU) after use of HC, and by 81 % (from 30.26 to 54.87 AU) after use of FC. In the control group,
217 the value of SCH increased after 4 weeks by 48 % (from 25.56 to 37.86 AU), by 92 % (from 20.30 to
218 39.06 AU), and by 80 % (from 32.36 to 58.37 AU) after BL, HC, and FC use, respectively. A significant (p
219 < 0.025) increase in SCH was observed after just 2 weeks of use of the synthesized products and it was
220 as follows: 38 % (from 25.56 to 35.26 AU), 48 % (from 20.30 to 30.08 AU), and 57 % (from 32.36 to
221 50.94 AU) after the application of BL, HC, and FC, respectively.
222 The comparison between the experimental and control group (Figure 1b) showed statistically
223 significant differences in SCH values after 2 weeks of using HC with an increase by 88 % and 48 %,
224 respectively ($p = 0.031$), and after 4 weeks of using BL with an increase by 106 % and 48 %; respectively
225 ($p = 0.004$). However, there are no significant differences in the SCH value between the experimental
226 and control groups after 2 weeks ($p = 0.778$) and 4 weeks ($p = 0.838$) of FC use
227 The results of our study suggest the influence of the extract and bioferment of *Centella asiatica* L. in
228 topical formulations on the hydration of stratum corneum. It was observed especially in the body and
229 hand area after using experimental samples of BL and HC, while it was not the case in the control
230 group. A similar relationship was observed during the study on the moisturizing effect of topical
231 formulations containing different concentrations of *Centella asiatica* L. extract³⁷. Furthermore, several
232 independent studies have also confirmed the moisturizing effect of topical products containing *Centella*
233 *asiatica* L. extract in the treatment of dry skin in patients with diabetes or psoriasis and during wound

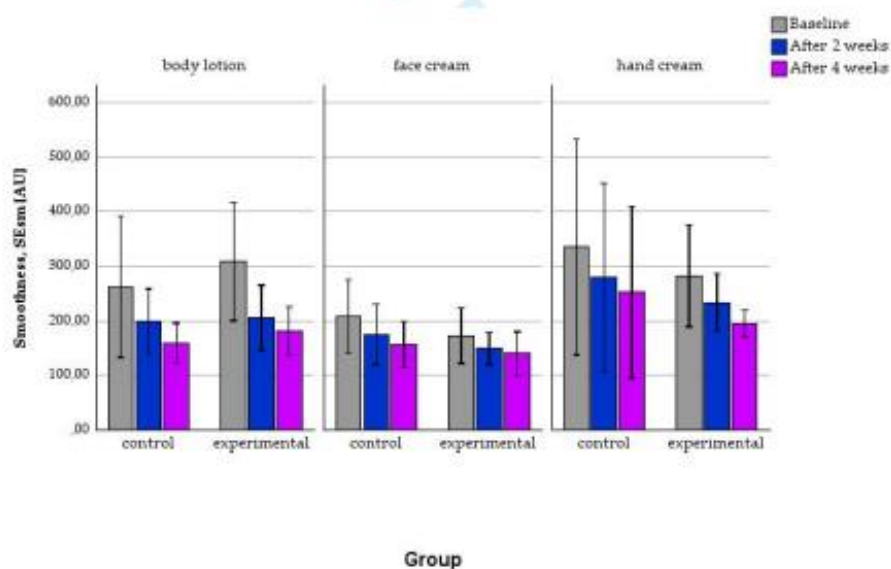
healing³⁸⁻⁴². In general, it can be concluded that cosmetic products with *Centella asiatica* L. extract and bioferment can significantly improve stratum corneum moisturization, which is important for restoring the epidermal barrier in skin affected with AD. Moreover, the barrier function of the skin can be supported by the type of emulsion, which in the case of BL and HC was W/O. It confirms the impact of emollient plus composition on the reconstruction of the epidermal barrier.

Skin topographic parameters

Smoothness (SEsm)

All study participants had increased SEsm values during the baseline measurements (Figure 2a). It was especially recognized in eczematous lesions on the skin of arms, legs, inner elbow, anterior neck and hands surface, indicating the unsmooth surface of the epidermis associated with its high dryness and dysfunction of the epidermal barrier of the skin. Similar observations were made during in vivo study performed by Pretel-Lara et al.⁴³.

(a)



(b)

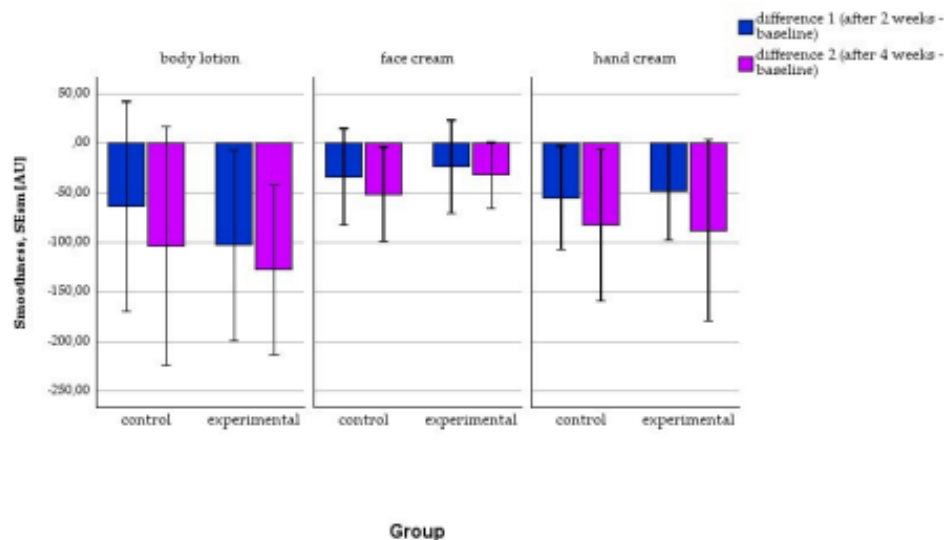


Figure 2. Smoothness of epidermis (expressed as SEsm parameter, AU) in the experimental ($n = 10$) and control ($n = 10$) groups of adult volunteers with AD; (a) SEsm values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2 weeks and 4 weeks of using body lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SEsm values (2 weeks vs. baseline and 4 weeks vs. baseline). The lower the value of the SEsm parameter, the smoother the skin.

After 4 weeks of treatment with BL, HC, and FC an eminent improvement in skin smoothness can be observed (Figure 2a), resulting in a statistically significant ($p \leq 0.004$) decrease in the value of the SEsm parameter, both in the experimental and control groups. In the experimental group, the mean value of the SEsm parameter decreased by 41 % (from 308.96 AU to 181.41 AU) after use of BL and by 25 %, namely from 334.96 AU to 252.51 AU and from 208.41 AU to 157.14 AU, after use of HC and FC, respectively. The positive effects were also noticeable after 2 weeks of application of the products, reaching statistically significant differences in the experimental group using BL ($p = 0.007$) and HC ($p = 0.014$).

1
2
3
4 260 Comparison between the groups (Figure 2b) showed that after 2 weeks of testing the experimental
5
6 261 group had a markedly higher decrease in the SEsm parameter after use of BL (by 33 %) and FC (by 16 %)
7
8 262 than the control group (by 24 % and 14 %, respectively). These changes indicate a greater smoothness
9
10 263 of the skin after treatment with products containing active ingredients from *Centella asiatica* L.
11
12 264 However, after 4 weeks of using the experimental and control samples, a significant reduction in the
13
14 265 SEsm parameter was observed only after using FC (decrease in the SEsm value by 25 % and 18 % for
15
16 266 the experimental and control groups, respectively; $p = 0.030$).
17
18
19 267 As can be seen in Figure 3, at the beginning of the study the smoothness was affected in the areas of
20
21 268 the body (1a) and in the dorsal parts of the hand (2a), but it was not so much disturbed in the cheek
22
23 269 (3a), indicating a lower incidence of active lesions on the face than on the body. A similar relationship
24
25 270 was also observed in a population-based, cross-sectional study in adults with AD, conducted in the
26
27
28 271 United States⁴⁴. Our results show the distinct improvement in skin smoothness after 4 weeks of use of
29
30 272 BL, HC, and FC. It is consistent with the SEsm parameter measurements (Figure 2).
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

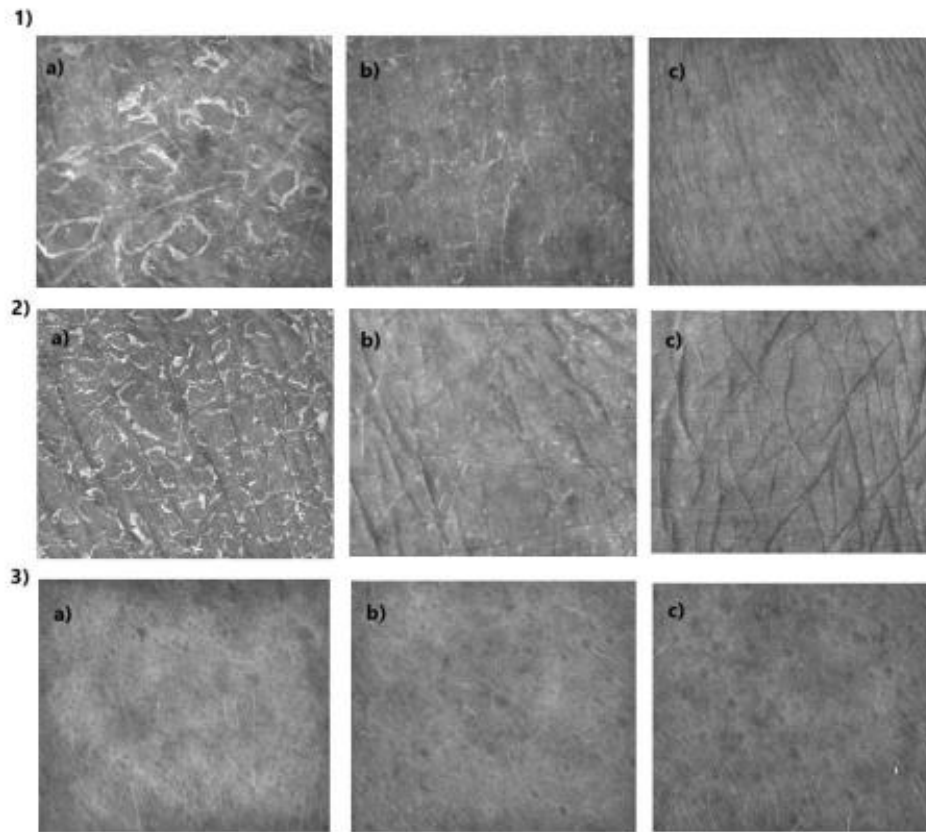


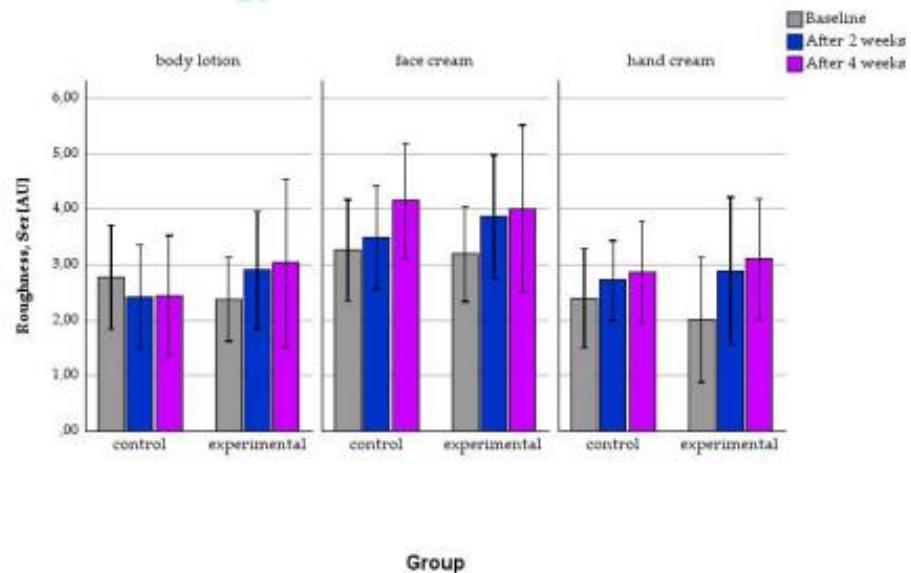
Figure 3. Measurements of smoothness on AD skin in one of the volunteers, performed by VISIOSCAN® VC20 plus camera; pictures (1)-(3) taken after using body lotion, hand cream, and face cream, respectively; images (a)-(c) for the baseline and 2 weeks or 4 weeks of use of the experimental product, respectively. The dark grays represent lines and wrinkles on the skin, whereas the bright colors represent extremely dry areas of the epidermis.

Roughness (SEr)

As shown in Figure 4a, the mean value of the SEr parameter increased in the experimental group after 2 weeks and 4 weeks of BL, HC, and FC use, but reached statistically significant differences only in the

case of HC ($p = 0.006$). After the first 2 weeks of its use, the SEr parameter increased by 44 % (from 2.01 AU to 2.89 AU, $p = 0.025$), while after 4 weeks it increased by 54 % (from 2.01 AU to 3.10 AU, $p = 0.002$). In the control group, the SEr parameter increased to a lesser extent, reaching statistically significant differences after 4 weeks of using HC ($p = 0.014$) and FC ($p = 0.002$), increasing by 19 % (from 2.40 AU to 2.72 AU) and 27 % (from 3.26 AU to 4.15 AU), respectively. Surprisingly, after 2 weeks of BL use, the SEr value decreased from 2.78 AU to 2.42 AU and this value remained at the same level after 4 weeks. This may indicate the importance of active ingredients in the formulation of BL.

(a)



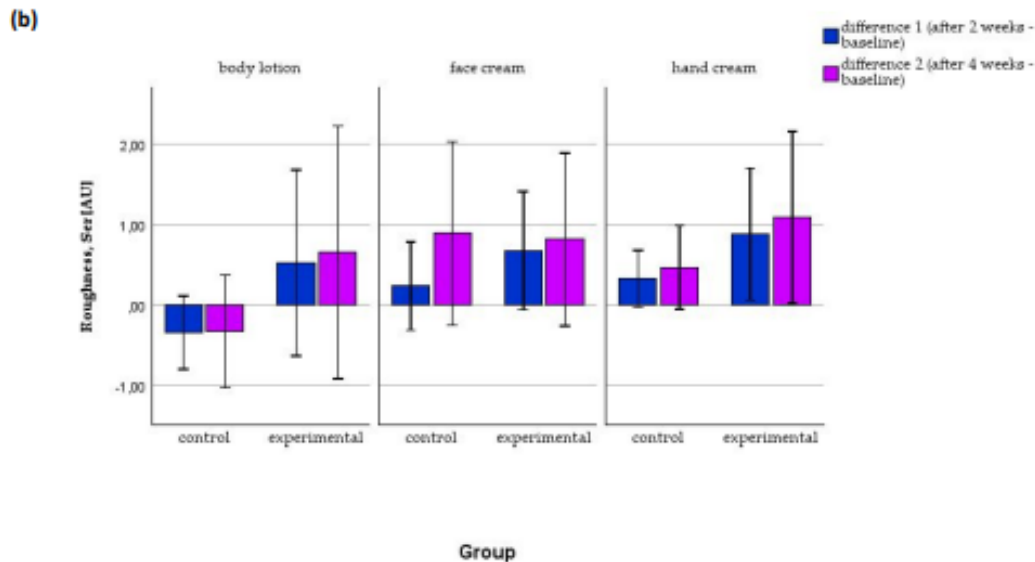


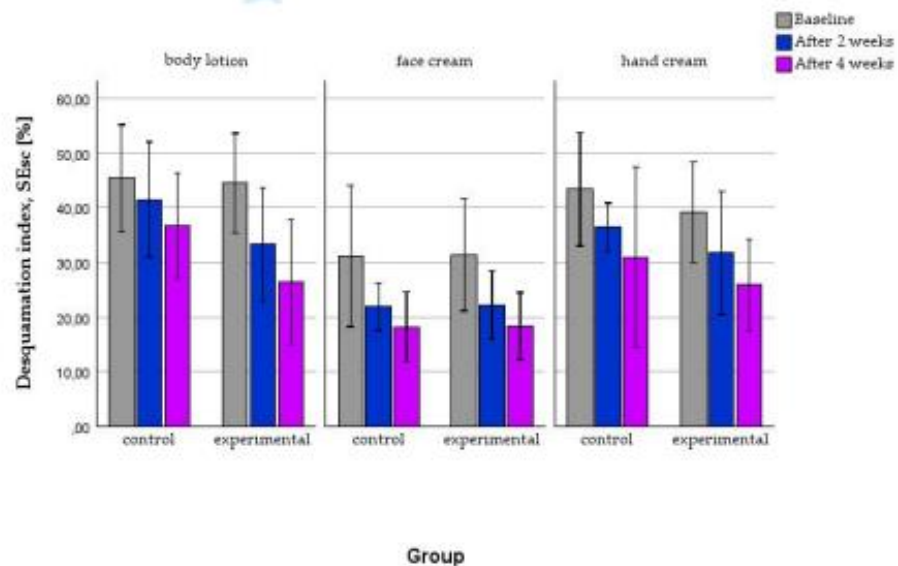
Figure 4. Roughness of epidermis (expressed as SEr parameter, AU) in the experimental ($n = 10$) and control ($n = 10$) groups of adult volunteers with AD; (a) SEr values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2 weeks and 4 weeks of using body lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SEr values (2 weeks vs. baseline and 4 weeks vs. baseline). An increase in the value of the SEr parameter indicates a decrease in the skin roughness.

In comparison to control samples, all *Centella asiatica*-based products remarkably reduced the roughness of AD skin just after 2 weeks of treatment (Figure 4b), reaching statistically significant differences ($p < 0.050$). After the first 2 weeks of BL use, the SEr parameter increased by 22 % in the experimental group, while decreasing by 12 % in the control group ($p = 0.049$). Similarly, a statistically significant difference ($p = 0.047$) between the experimental and control groups was also observed after 2 weeks of FC use, when the SEr parameter increased by 21 % and by 7 %, respectively. Moreover, 2 and 4 weeks of HC use showed statistically significant differences ($p \leq 0.043$) in the mean value of the SEr parameter between the experimental and control groups.

Our study shows that all tested products containing *Centella asiatica* L. extract and bioferment clearly reduce skin roughness compared to control products. This effect may be due to the regenerative properties of triterpenoids present in the *Centella asiatica* L. extract, which can preserve the physiological state of the cells and inhibit a decrease in cell adhesion force caused by cell damage. It was confirmed in the in vitro study conducted on damaged HaCaT cells⁴⁵. Due to these properties, the extract can contribute to the reconstruction of the connections between corneocytes in the stratum corneum and thus reinforce the epidermal barrier³⁷.

Desquamation index (SEsc)

(a)



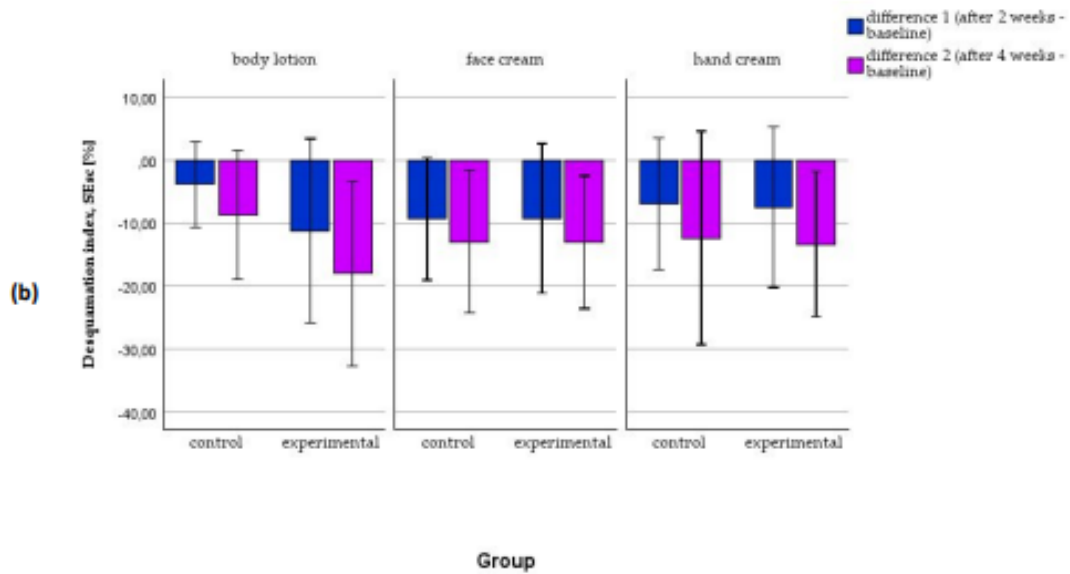


Figure 5. Desquamation index (expressed as SEsc parameter) in the experimental ($n = 10$) and control ($n = 10$) groups of adult volunteers with AD; (a) SEsc values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2 weeks and 4 weeks of using body lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SEsc values (2 weeks vs. baseline and 4 weeks vs. baseline). The lower the SEsc value, the more hydrated the epidermis.

Skin desquamation (SEsc) decreased significantly ($p < 0.001$) compared to the baseline in both the experimental and control groups after 4 weeks of use of BL, HC, and FC (Figure 5a). A decrease was observed just after 2 weeks of the application of the experimental and control products, although statistical significance was not reached ($p \geq 0.074$).

The SEsc index decreased more after the application of emulsions with *Centella asiatica* extract and bioferment, though the comparison between the experimental and control groups did not show a statistically significant difference (Figure 5b). Thus, we can suggest that the main influence on the reduction of scaliness is exerted by the emollients present in both the experimental and control

1
2
3 325 samples. The study by Lucas et al. also showed a decrease in flaking in children with mild to moderate
4
5 326 AD after 28 days of using an emollient plus product⁴⁶.
6
7
8 327 Desquamation of individual corneocytes or their fine flakes is an essential part of epidermal physiology,
9
10 328 which is disrupted in patients with AD due to abnormal cohesion of the corneocytes, resulting in dry
11
12 329 skin, scaliness, fissured appearance of the upper layers of the epidermis, and a significant decrease in
13
14 330 skin moisturization. At the beginning of the study, dehydrated and damaged skin was observed,
15
16 331 characterized by very thick flakes of corneocytes with different size, especially on the body (Figure 6,
17
18 332 image 1(a)) and hand (Figure 6, image 2(a)) areas. However, just after 2 weeks of using of BL, HC, and
19
20
21 333 FC, the flakes of corneocytes significantly diminished. After 4 weeks of application of products, only
22
23 334 small, regular corneocytes can be observed, that indicates an increase in skin moisturization. It is in
24
25 335 good agreement with the results obtained by the SEsc index measurements.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

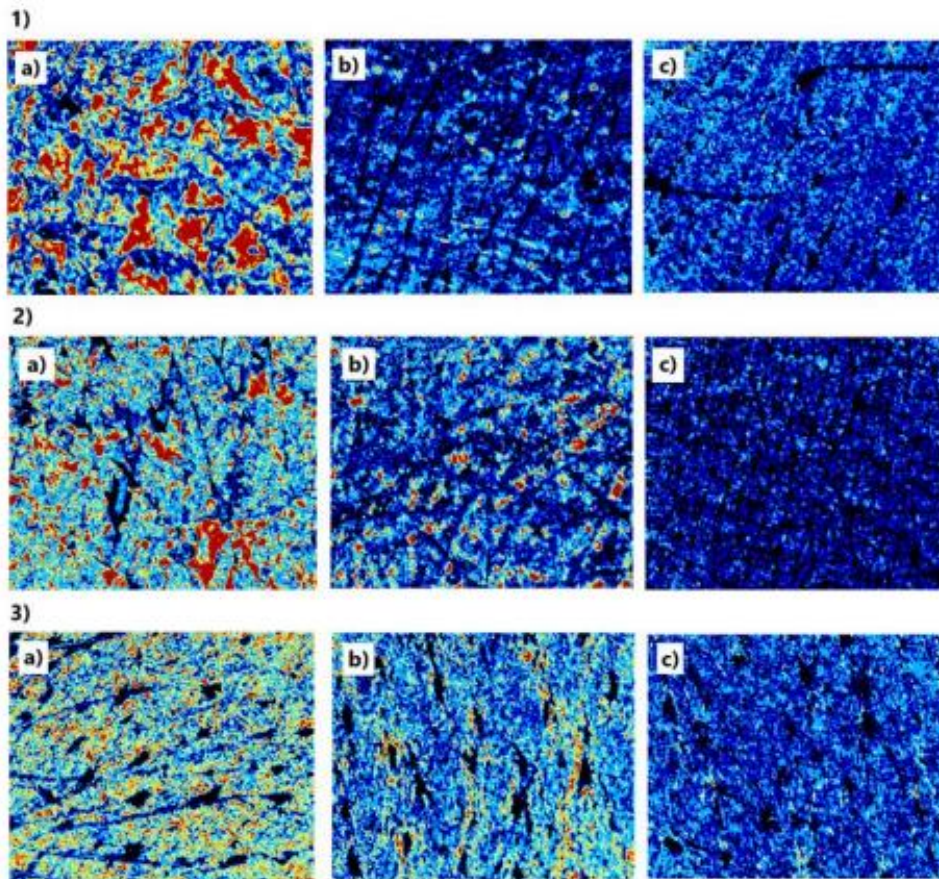


Figure 6. Desquamation of corneocytes measured with Corneofix® F20 tape and Visioscan® VC20 plus camera. The special adhesive foil is applied to the skin and then removed to collect the corneocytes and assess the desquamation index; the software takes into account the number, size and thickness of the corneocytes. Images of the AD skin of one volunteer after use of experimental products: body lotion (1), hand cream (2), and face cream (3); images (a)-(c) for the baseline, 2 weeks, or 4 weeks of use of the experimental product, respectively. Different colors indicate five different levels of thickness of the corneocytes flakes: red – very thick flakes, orange – thick flakes, green – medium thickness, light and dark blue – the least thickness; black color shows the background.

1
2
3 345
4
5 346 **Summary**
6
7
8 347 Both control and experimental products have the ability to significantly reduce epidermis roughness
9
10 348 and desquamation and improve skin hydration and smoothness. It can be achieved primarily due to the
11
12 349 presence of physiological lipids. However, control products that are based only on naturally derived
13
14 350 emollients rebuild the function of the skin barrier to a lesser extent than products that additionally
15
16 351 contain *Centella asiatica* L. extract and bioferment. Therefore, we can suggest that sustainable
17
18 352 emollient plus topical formulations containing *Centella asiatica* L. extract and bioferment are a
19
20 353 promising strategy to support the treatment of AD in adults.
21
22
23 354
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Sroka-Tomaszewska J, Trzeciak M. Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4130. <https://doi.org/10.3390/ijms22084130>.
2. Vestergaard C, Skovsgaard C, Johansen C, Deleuran M, Thyssen JP. Treat-to-Target in Atopic Dermatitis. *Am J Clin Dermatol.* 2024;25:91–98. <https://doi.org/10.1007/s40257-023-00827-y>
3. Torres T, Ferreira EO, Gonçalo M, Mendes-Bastos P, Selores M, Filipe P. Update on atopic dermatitis. *Acta Med Port.* 2019;32(9):606–613. <https://doi.org/10.20344/amp.11963>
4. Bylund S, von Kobyletzki LB, Svalstedt M, Svensson Å. Prevalence and incidence of atopic dermatitis: a systematic review. *Acta Derm Venereol.* 2020;100(12):5765. <https://doi.org/10.2340/00015555-3510>
5. Li H, Zhang Z, Zhang H, Guo Y, Yao Z. Update on the pathogenesis and therapy of atopic dermatitis. *Clin. Rev Allergy Immunol.* 2021;61:324–338. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08880-3>
6. Fujii M. Current understanding of pathophysiological mechanisms of atopic dermatitis: interactions among skin barrier dysfunction, immune abnormalities and pruritus. *Biol Pharm Bull.* 2020;43(1):12–19. <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00088>
7. Hrestak D, Matijašić CM, Čipčić Paljetak H, Ledić Drvar D, Ljubojević Hadžavdić S, Perić M. Skin Microbiota in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3503. <https://doi.org/10.3390/ijms23073503>
8. Yang G, Seok JK, Kang HC, Cho YY, Lee HS, Lee JY. Skin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2867. <https://doi.org/10.3390/ijms21082867>
9. Elias PM. Optimizing emollient therapy for skin barrier repair in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2022;128(5):505–511. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2022.01.012>
10. Eui Kim BE, Leung DYM. Significance of Skin Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2018;10(3):207–215. <https://doi.org/10.4168/aaair.2018.10.3.207>
11. Grześk-Kaczyńska M, Petrus-Halicka J, Kaczyński S, Bartuzi Z, Ukleja-Sokołowska N. Should Emollients Be Recommended for the Prevention of Atopic Dermatitis? –New Evidence and Current State of Knowledge. *J Clin Med.* 2024;13:863. <https://doi.org/10.3390/jcm13030863>
12. Magnolo N, Jaenicke T, Tsianakas A, Czech W, Thači D, Pinter A, et al. Comparison of different skin care regimens in patients with moderate to severe atopic dermatitis receiving systemic treatment: A randomized controlled trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2023;37(Suppl. 5):18–26. <https://doi.org/10.1111/jdv.18949>
13. Cestari S, Correia P, Kerob D. Emollients “Plus” are Beneficial in Both the Short and Long Term in Mild Atopic Dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2023;16:2093–2102. <https://doi.org/10.2147/CCID.S417622>
14. Zhang J, Xu X, Wang X, Zhang L, Hu M, Le Y, et al. Topical emollient prevents the development of atopic dermatitis and atopic march in mice. *Exp Dermatol.* 2023;32(7):1007–1015. <https://doi.org/10.1111/exd.14806>
15. Danby SG, Andrew PV, Kay LJ, Pinnock A, Chittock J, Brown K, et al. Enhancement of stratum corneum lipid structure improves skin barrier function and protects against irritation in adults with dry, eczema-prone skin. *Br J Dermatol.* 2022;186(5):875–886. <https://doi.org/10.1111/bjd.20955>
16. Min DH, Yu YB, Kim TH, Kim H, Lee S. Pharmacological effects of pentacyclic triterpenoids isolated from *Centella asiatica*. *Hortic Environ Biotechnol.* 2024;65(2):189–197. <https://doi.org/10.1007/s13580-023-00561-8>
17. Krzyżostan M, Nowak, I. Triterpenoid saponins derived from *Centella asiatica* L. *Przem Chem.* 2024;103(4):499–503. <https://doi.org/10.15199/62.2024.4.3>

18. Lee Y, Choi HK, N'deh KPU, Choi YJ, Fan M, Kim EK, et al. Inhibitory effect of *Centella asiatica* extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice. *Nutrients*. 2020;12(2):411. <https://doi.org/10.3390/nu12020411>
19. Park JH, Choi IY, Son DJ, Park EK, Song MJ, Hellström M, et al. Anti-Inflammatory Effect of Titrated Extract of *Centella asiatica* in Phthalic Anhydride-Induced Allergic Dermatitis Animal Model. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4):738. <https://doi.org/10.3390/ijms18040738>
20. Park JH, Jang JS, Kim KC, Hong JT. Anti-inflammatory effect of *Centella asiatica* phytosome in a mouse model of phthalic anhydride-induced atopic dermatitis. *Phytomedicine*. 2018;43(1):110–119. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.013>
21. Park JH, Yeo U, Jang JS, Kim KC, Park MH, Lee HP, et al. Combination effect of titrated extract of *Centella asiatica* and astaxanthin in a mouse model of phthalic anhydride-induced atopic dermatitis. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2019;11(4):548–559. <https://doi.org/10.4168/aair.2019.11.4.548>
22. Moon GH, Lee Y, Kim EK, Chung KH, Lee KJ, An JH. Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effects of Asiatic Acid in a DNCB-Induced Atopic Dermatitis Animal Model. *Nutrients*. 2021;13(7):2448. <https://doi.org/10.3390/nu13072448>
23. Bhuyar P, Rahim MH, Maniam GP, Natanamurugaraj G. Isolation and characterization of bioactive compounds in medicinal plant *Centella asiatica* and study the effects on fungal activities. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*. 2021;10(4):631–635. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2021.10.4.631-635>
24. Zhang Y, Yang Z, Cock IE. *Centella asiatica* (L.) Urban Leaf Extracts Inhibit the Growth of Bacterial Triggers of Selected Autoimmune Inflammatory Diseases and Potentiate the Activity of Conventional Antibiotics. *Pharmacogn Commun*. 2020;10(3):119–129. <https://doi.org/10.5530/pc.2020.3.24>
25. De Almeida CV, Antiga E, Lulli M. Oral and Topical Probiotics and Postbiotics in Skincare and Dermatological Therapy: A Concise Review. *Microorganisms*. 2023;11(6):1420. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061420>
26. Golkar N, Ashoori Y, Heidari R, Omidifar N, Abootalebi SN, Mohkam M, et al. A novel effective formulation of bioactive compounds for wound healing: preparation, in vivo characterization, and comparison of various postbiotics cold creams in a rat model. *Evid-Based Complement Altern Med*. 2021;8577116. <https://doi.org/10.1155/2021/8577116>
27. Herman A, Herman AP. Biological Activity of Fermented Plant Extracts for Potential Dermal Applications. *Pharmaceutics*. 2023;15:2775. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122775>
28. Krzyżostan M, Wawrzyńczak A, Nowak I. Use of Waste from the Food Industry and Applications of the Fermentation Process to Create Sustainable Cosmetic Products: A Review. *Sustainability*. 2024;16:2757. <https://doi.org/10.3390/su16072757>
29. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1980;44–47.
30. Communication from the Commission to the European Parliament, The European Council, The Council, The European Economic and Social Committee and The Committee of the Regions. The European Green Deal. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=COM:2019:640:FIN> (accessed on 10 January 2025)
31. Raposo S, Salgado A, Eccleston G, Urbano M, Ribeiro HM. Cold processed oil-in-water emulsions for dermatological purpose: Formulation design and structure analysis. *Pharm Dev Technol*. 2014;19(4):417–429. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.788516>
32. Camilion JV, Khanna S, Anasseri S, Laney C, Mayrovitz HN. Physiological, pathological, and circadian factors impacting skin hydration. *Cureus*. 2022;14(8):27666. <https://doi.org/10.7759/cureus.27666>
33. Montero-Vilche T, Cuenca-Barrales C, Rodríguez-Pozo JA, Díaz-Calvillo P, Tercedor-Sánchez J, Martínez-López A, et al. Epidermal Barrier Function and Skin Homeostasis in Atopic Dermatitis: The Impact of Age. *Life*. 2022;12(1):132. <https://doi.org/10.3390/life12010132>

34. Johnson Jr W, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, et al. Safety assessment of Centella asiatica-derived ingredients as used in cosmetics. *Int J Toxicol*. 2023;42(1_suppl):55-225. <https://doi.org/10.1177/109158182311582>
35. Su N, An Q, Zhao D, Zheng H, Yang L, Li X, et al. Assessment and Comparison of the Skin Irritation Potential of Five Plant Extracts Using In Vitro and In Vivo Methods. *Am J Biomed Sci*. 2017;9(1):20-28. <https://doi.org/10.5099/aj170100020>
36. Gonzalez-Guerra E, Pajuelo Lorenzo F. Efficacy, Tolerability, and Acceptability of a Skin Repair Product Containing Active Extracts of Centella asiatica. *Journal of Cosmetic Sci*. 2021;72(6):611-622.
37. Ratz-Lyko A, Arct J, Pytkowska K. Moisturizing and Antiinflammatory Properties of Cosmetic Formulations Containing Centella asiatica Extract. *Indian J Pharm Sci*. 2016;78(1):27-33. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.180247>
38. Anggraeni S, Umborowati MA, Damayanti D, Endaryanto A, Prakoeswa CCRS. Role of Centella asiatica and ceramide in skin barrier improvement: a double blind clinical trial of Indonesian batik workers. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2021;32(4):589-593. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0510>
39. Legiawati, L.; Bramono, K.; Indriatmi, W.; Yunir, E.; Setiati, S.; Jusman, S. W. A. et al. Oral and topical Centella asiatica in type 2 diabetes mellitus patients with dry skin: A Three-Arm prospective randomized Double-Blind controlled trial. *Evid-Based Complement Altern Med*. 2020;7253560. <https://doi.org/10.1155/2020/7253560>
40. Lin P, Shi HY, Lu YY, Lin J. Centella asiatica alleviates psoriasis through JAK/STAT3-mediated inflammation: An in vitro and in vivo study. *J Ethnopharmacol*. 2023;317:116746. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116746>
41. Changsan N, Srichana T, Atipairin A, Sawatdee S. Wound healing efficacy of a polymeric spray film solution containing Centella asiatica leaf extract on acute wounds. *J Wound Care*. 2023;32(Suppl. S12):S22-S32. <https://doi.org/10.12968/jowc.2023.32.Sup12.S22>
42. Jenwitheesuk K, Rojsanga P, Chowchuen B, Surakunprapha P. A Prospective Randomized, Controlled, Double-Blind Trial of the Efficacy Using Centella Cream for Scar Improvement. *Evid-Based Complement Altern Med*. 2018;9525624. 5. <https://doi.org/10.1155/2018/9525624>
43. Pretel-Lara C, Sanabria-de la Torre R, Arias-Santiago S, Montero-Vilchez T. Skin Barrier Function and Microtopography in Patients with Atopic Dermatitis. *J Clin Med*. 2024;13(19):5861. <https://doi.org/10.3390/jcm13195861>
44. Silverberg JI, Margolis DJ, Boguniewicz M, Fonacier L, Grayson MH, Ong PY, et al. Distribution of atopic dermatitis lesions in United States adults. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(7):1341-1348. <https://doi.org/10.1111/jdv.15574>
45. Wan L, Song Z, Wang Z, Dong J, Chen Y, Hu J. Repair effect of Centella asiatica (L.) extract on damaged HaCaT cells studied by atomic force microscopy. *J Microsc*. 2023;292(3):148-157. <https://doi.org/10.1111/jmi.13238>
46. de Lucas R, García-Millán C, Pérez-Davó A, Moreno E, Redondo P. New cosmetic formulation for the treatment of mild to moderate infantile atopic dermatitis. *Children*. 2019;6(2):17. <https://doi.org/10.3390/children6020017>

Figure legend

489

490 Figure 1. "Stratum corneum hydration in the experimental and control groups of adult volunteers with
491 AD; (a) SCH values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2 weeks and 4 weeks of using body
492 lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SCH values (2 weeks vs. baseline and 4 weeks vs.
493 baseline). Lower values of SCH are frequently associated with the dysfunction of the skin barrier."

494

495 Figure 2. "Smoothness of epidermis (expressed as SEsm parameter, AU) in the experimental and control
496 groups of adult volunteers with AD; (a) SEsm values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2
497 weeks and 4 weeks of using body lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SEsm values (2
498 weeks vs. baseline and 4 weeks vs. baseline). The lower the value of the SEsm parameter, the smoother
499 the skin."

500

501 Figure 3. "Measurements of smoothness on AD skin in one of the volunteers, performed by VISIOSCAN®
502 VC20 plus camera; pictures (1)-(3) taken after using body lotion, hand cream, and face cream,
503 respectively; images (a)-(c) for the baseline and 2 weeks or 4 weeks of use of the experimental product,
504 respectively. The dark grays represent lines and wrinkles on the skin, whereas the bright colors
505 represent extremely dry areas of the epidermis."

506

507 Figure 4. "Roughness of epidermis (expressed as SEr parameter, AU) in the experimental and control
508 groups of adult volunteers with AD; (a) SEr values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2
509 weeks and 4 weeks of using body lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SEr values (2 weeks
510 vs. baseline and 4 weeks vs. baseline). An increase in the value of the SEr parameter indicates a decrease
511 in the skin roughness."

512

513 Figure 5. "Desquamation index (expressed as SEsc parameter) in the experimental and control groups of
514 adult volunteers with AD; (a) SEsc values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2 weeks and 4
515 weeks of using body lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SEsc values (2 weeks vs. baseline
516 and 4 weeks vs. baseline). The lower the SEsc value, the more hydrated the epidermis."

517

518 Figure 6. "Desquamation of corneocytes measured with Corneofix® F20 tape and Visioscan® VC20 plus
519 camera. The special adhesive foil is applied to the skin and then removed to collect the corneocytes and
520 assess the desquamation index; the software takes into account the number, size and thickness of the
521 corneocytes. Images of the AD skin of one volunteer after use of experimental products: body lotion (1),
522 hand cream (2), and face cream (3); images (a)-(c) for the baseline, 2 weeks, or 4 weeks of use of the
523 experimental product, respectively. Different colors indicate five different levels of thickness of the
524 corneocytes flakes: red – very thick flakes, orange – thick flakes, green – medium thickness, light and
525 dark blue – the least thickness; black color shows the background."

526

527

Table legend

529

530 Table 1. "The age characteristics of the control and experimental groups."

531

532 Table 2. "Participation criteria specified for in vivo tests."

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract

Monika Krzyżostan^{1,2}, Agata Wawrzyniak¹, Izabela Nowak^{1*}

¹ Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland; monika.krzyzostan@amu.edu.pl (M.K.); agata.wawrzyniak@amu.edu.pl (A.W.); nowakiza@amu.edu.pl (I.N.)

² Dr Koziej Instytut Badań Kosmetyków, Czerniakowska 58, 00-717 Warsaw, Poland

* Correspondence: nowakiza@amu.edu.pl

Data S1

1. Synthesis of sustainable, cold-processed emollient plus formulations

1.1. Chemicals

The sustainable, cold-processed formulations of body lotion (BL), hand cream (HC), and face cream (FC) were obtained with the biodegradable, vegan, and COSMOS-approved raw materials of cosmetic grade, as shown in Table S1. They were obtained in a sustainable manner, using a variety of physical processes (pressing and extraction), biotechnological processes (fermentation), and chemical reactions performed according to the Green Chemistry approach.

The prepared emulsions were divided into two groups, namely control samples (A) and experimental samples (B). In the first group (A), there were lipid-based formulations, whereas samples from the second group (B) additionally contained 5 wt. % of the *Centella asiatica* L. extract (INCI: Propanediol, *Centella asiatica* Extract) and 7 wt. % of the *Centella asiatica* (GEO) bioferment (INCI: Aqua, *Lactobacillus/Centella asiatica* Extract Ferment, Gluconolactone, Sodium Benzoate, Calcium Gluconate, Lactic Acid, Acetic acid, Protocatechic Acid, Caffeic Acid, Gallic Acid, and Reuterin), both manufactured by Symbiosis Laboratory, Poznań, Poland. The leaves of *Centella asiatica* L. were subjected to extraction with ethanol, and the fermentation process with *Lactobacillus reuteri* bacteria.

1.2. Procedures for preparing emollient plus formulations

Formulations of the body lotion (BL) and hand cream (HC) were developed as water-in-oil (W/O) emulsions, whereas the face cream (FC) was an oil-in-water (O/W) emulsion. Control samples (A) were prepared in the following steps: the aqueous phase ingredients (according to Table S1) were weighted and combined using Hei-Torque 100 Value stirrer. The oil phase with composition shown in Table S1 were weighted, combined using Hei-Torque 100 Value stirrer, and homogenized using IKA Ultra Turrax T 18 Digital homogenizer. The water and oil phases were subsequently combined at room temperature (25 °C) by stepwise addition of the water phase to the oil phase or oil phase to the water phase in the case of W/O and O/W formulations, respectively, while stirring by Hei-Torque 100 Value stirrer. The stirring continued for 15 minutes and was followed by homogenization with IKA Ultra Turrax T 18 Digital. After a few minutes, a viscous bulk was

obtained. Experimental samples (B) were prepared according to the same procedure, with the difference of adding the extract and bioferment of *Centella asiatica* L. to the water phase. Control samples had the same color and consistency as experimental samples and were packed in the same packages.

2. In vivo skin irritation test (Patch Tests):

To determine the irritating or sensitizing properties of all of the prepared formulations, a semi-open contact test was performed. The study of each formulation was conducted according to the Jadassohn-Bloch method (modified by Rudzki)⁵¹ on a group of 20 healthy adult volunteers aged 23-76 years, with sensitive skin and a history of skin allergy. 75 % of the volunteers were women and 25 % were men. All tests were performed under the supervision of a dermatologist and with the voluntary consent of the volunteers. The tested products were applied to a filter paper in Finn Chamber and then the whole patch was applied to the volunteer's skin on the arm, thigh, or back. The samples were removed after 48 h and the first reading was taken after 15 minutes, and the second after 72 h. The result of the test was interpreted according to the generally accepted scale in dermatological testing, taking into account the severity of the erythema (Table S2). A positive reaction of the skin (erythema) confirms the irritating properties of the product, whereas a negative reaction (no erythema) confirms the absence of irritating properties.

3. Home panel details:

Participants were blinded after the assignment to the study regarding the type of samples used (control or experimental). Each volunteer received one package of body lotion (BL), hand cream (HC), and face cream (FC) and was required to use them regularly, twice a day, for 30 days. The experimental and control groups applied products to the cleaned skin of the face and body, most often the forearms, inner elbow, lower limbs, abdomen, or hands, where the AD symptoms can potentially appear. All participants were instructed to refrain from using other products with identical or analogous purposes and topical medications throughout the study period. They were also informed about the need to immediately discontinue the use of the product in the event of negative symptoms or sensations at the place of use and report them to the investigator. In addition, each participant was scheduled for follow-up at 2 and 4 weeks during which selected skin parameters were measured.

References:

S1. Lachapelle, J.M. Historical Aspects. In: Johansen, J.; Mahler, V.; Lepoittevin, J.P.; Frosch, P. (eds) Contact Dermatitis. Springer, Cham. 2019, https://doi.org/10.1007/978-3-319-72451-5_1-1

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract

Monika Krzyżostan^{1,2}, Agata Wawrzyńczak¹, Izabela Nowak^{1*}

¹ Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland; monika.krzyzostan@amu.edu.pl (M.K.); agata.wawrzynczak@amu.edu.pl (A.W.); nowakiza@amu.edu.pl (I.N.)

² Dr Koziej Instytut Badań Kosmetyków, Czerniakowska 58, 00-717 Warsaw, Poland

* Correspondence: nowakiza@amu.edu.pl

Table S1

Table S1. Raw materials used during synthesis of cosmetic formulations.

Trade name of raw material	Ingredients/ INCI	Producer / Supplier	Function	Body Lotion (BL)	Face cream (FC)	Hand cream (HC)
				Type of emulsion		
				W/O	O/W	W/O
Purified water	Aqua	-	Solubilizer	x	x	x
Galehemp OW	Polyglyceryl 4 Hemp Seedate, Caprylyl Capryl Glucoside, Aqua	Gale & Cosm S.r.l./ Aston Chemicals Ltd.	Emulsifier	-	x	-
EWO-Vegetable Emulsifier	Glyceryl Oleate, Polyglyceryl-3-Polyricinoleate, Olea Europea Oil Unsaponifiables	EfpBiotek/ Impag Group	Emulsifier	x	-	x
Softigen®Pura	Caprylic/Capric Triglyceride, Hydrogenated Rapeseed Oil	IOI Oleochemical/ Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emollient	x	-	x
Phytosqualan®	Squalane	Sophim/ Biesterfeld Spezialchemie GmbH	Emollient	x	x	x
Synovea® EL	Ethyl Linoleate, Ethyl Palmitate,	Sytheon/ Biesterfeld	Emollient, ceramide	v	v	v

LIPEX® Omega 3/6™	Olus Oil, Camelina Sativa Seed Oil	AAK Sweden AB/ Nordmann, Rassmann GmbH	Emollient	x	-	x
LIPEX® PreAct™	Canola Oil	AAK Sweden AB/ Nordmann, Rassmann GmbH	Emollient	x	x	x
Akogel™	Hydrogenated Vegetable Oil	AAK Sweden AB/ Nordmann, Rassmann GmbH	Emollient	x	x	-
Raspberry Necta®	Rubus Idaeus Seed Oil	Upycled Beauty Ltd/ Amita Health Care Poland	Emollient	x	x	x
Emotion® Light	Tripelargonin	Roelmi HPC S.r.l./ Amita Health Care Poland	Emollient	x	-	-
CeraFluid®	Triolein, Glyceryl Dioleate, Ceramide NP	Roelmi HPC S.r.l./ Amita Health Care Poland	Emollient, Ceramid	x	x	-
Ceramidone®	Octyldodecyl PCA	Solabia Group/ Aston Chemicals Ltd.	Stimulation the synthesis of lipids and ceramides	x	x	x
Tocomix L70-IP Organic CO	Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil	Jan Dekker/ IMCD Group	Antioxidant	x	x	x
Massocare Propanediol Nat MB	Propanediol	Comercial Quimica Masso	Humectant	x	x	x
Apricot Kernel Oil RBDW	Prunus Armeniaca Kernel Oil	Jan Dekker/ IMCD Group	Emollient	-	-	x
RonaCare® Magnesium Sulphate	Magnesium Sulfate	Merck/ Azelis	Bulking, viscosity controlling	x	-	x
E-Leen Green C	Pentylene Glycol, Glyceryl Caprylate/ Caprate	Minasolve®/ Safic- Alcan Poland	Preservative	x	x	x
Citropol H	Polycitronellol	Safic- Alcan Poland	Emollient	-	x	x
Instathix®	Xanthan Gum, Sodium Stearoyl Lactylate, Tapioca Starch, Algin	Alchemy/ Impag Group	Thickener	-	x	-

HyaCare® Tremella	Tremella Fuciformis Sporocarp Extract	Evonik Operations GmbH/ Adara Poland	Active, Thickener	-	x	-
------------------------------	---	---	----------------------	---	---	---

For Peer Review

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract

Monika Krzyżostan^{1,2}, Agata Wawrzyńczak¹, Izabela Nowak^{1*}

¹ Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland; monika.krzyzostan@amu.edu.pl (M.K.); agata.wawrzynczak@amu.edu.pl (A.W.); nowakiza@amu.edu.pl (I.N.)

² Dr Koziej Instytut Badań Kosmetyków, Czerniakowska 58, 00-717 Warsaw, Poland

* Correspondence: nowakiza@amu.edu.pl

Table S2

Table S2. Score scale for in vivo skin irritation tests according to the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG).

Classification	Description of erythema	Interpretation
-	No skin reaction	Negative
+/-	Faint, nonpalpable erythema	Doubtful reaction
+	Palpable erythema	Slightly irritating
++	Strong erythema, papules	Strong reaction
+++	Strong erythema, papules, vesicles or/and ulceration	Extreme reaction
IR	Inflammation sharply limited to the exposed area, lack of infiltrate, small petechiae, pustules and lesions other than papules and vesicles	Irritant reaction, this kind of reactions may cause many problems upon interpretation

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract

Monika Krzyżostan^{1,2}, Agata Wawrzyniak¹, Izabela Nowak^{1*}

¹ Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland; monika.krzyzostan@amu.edu.pl (M.K.); agata.wawrzyniak@amu.edu.pl (A.W.); nowakiza@amu.edu.pl (I.N.)

² Dr Koziej Instytut Badań Kosmetyków, Czerniakowska 58, 00-717 Warsaw, Poland

* Correspondence: nowakiza@amu.edu.pl

Table S3

Table S3. Sustainability and naturalness parameters of the raw materials used in emollient plus formulations (based on the available supplier information).

Trade name of raw material	Ingredients/INCI	Source of the raw material	Green technology	Agro-food origin	Natural Origin Index (NOI) according to ISO 16128	PPAI ¹ or CPAI ² according to the COSMOS standard
Centella Asiatica Extract	Propanediol, <i>Centella Asiatica</i> L. Extract	<i>Centella asiatica</i> L. leaves	Green solvent extraction	---	1	**
Bioferment of Centella Asiatica (GEO)	Aqua, <i>Lactobacillus/Centella Asiatica</i> L. Extract Ferment, Gluconolactone, Sodium Benzoate, Calcium Gluconate, Lactic acid, Acetic acid, Protocatechic acid, Caffeic acid, Gallic acid, Reuterin	<i>Centella asiatica</i> L. leaves and <i>Lactobacillus reuteri</i>	Biofermentation	---	1	**
EWO-Vegetable Emulsifier	Glyceryl Oleate, Polyglyceryl-3-Polyricinoleate, Olea Europea Oil Unsaponifiables	Green olives	Purification of olive oil fatty acids into olive oil unsaponifiables	Olives from food industry	1	PPAI=20 % CPAI=80 %

Galehemp OW	Polyglyceryl 4 Hemp Seedate, Caprylyl Capryl Glucoside, Aqua	Polyglycerine-4 - a mixture of refined polyglycerols of vegetable origin; Hemp seed oil - a product extracted by mechanical process (pressing) from the fruits of <i>Cannabis sativa</i> L.; Caprylyl/ Capryl Glucoside - a mild non-ionic surfactant obtained from renewable raw materials.	Transesterification of Polyglycerin-4 and <i>Cannabis sativa</i> L. seed oil receiving <i>Cannabis sativa</i> seed oil polyglyceryl-4 esters. Next mixing them with Caprylyl/capryl glucoside and water to obtain trans-ester between tetraglycerol and hemp seed oil.	---	1	CPAI=80 % PPAI=0 %
Softigen® Pura	Caprylic/Capric Triglyceride, Hydrogenated Rapeseed Oil	Vegetable: rapeseed seed, palm kernel oil or Coconut oil (seed)	Refined, blanched, deodorized	---	1	CPAI=100 % PPAI=0 %
Phytosqualan®	Squalane	Vegetable: Olives	Esterification, distillation, saponification, hydrogenation, winterisation	Olives from food waste	1	CPAI=100 % PPAI=0 %
Synovea® EL	Ethyl Linoleate, Ethyl Palmitate, Ethyl Oleate, Ethyl Linolenate	Vegetable: safflower seed oil	Green esterification	---	1	CPAI=100 % PPAI=0 %
LIPEX® Omega 3/6™	Olus Oil, <i>Camelina Sativa</i> Seed Oil	Vegetable oils	Mechanical extraction, refining, deodorising	---	1	PPAI=5 % CPAI=95 %
LIPEX® PreAct™	Canola Oil	Vegetable: seeds from rapeseed	Mechanical pressing, deodorising, hydrogenation, filtration, solvent fractionation	---	1	CPAI=100 % PPAI=0 %
Akogel™	Hydrogenated Vegetable Oil	Vegetable: fruit of <i>cocos nucifera</i> , seeds of <i>Glycine max</i> , <i>Brassica napus</i> <i>arecaceae</i>	Mechanical extraction, solvent extraction, refining, deodorizing, hydrogenation.	---	1	CPAI=100 % PPAI=0 %
Raspberry Necta®	<i>Rubus Idaeus</i> Seed Oil	Raspberries seeds	Cold-processed extraction	Rasp-berries pulp as a waste product of the juice	1	PPAI=100 % CPAI=0 %

				production industry		
Emotion® Light	Tripelargonin	Vegetable: <i>Silybum marianum</i> seed oil	Distillation/ Hydrolysis of <i>Silybum marianum</i> seed oil receiving pure pelargonic acid. Next step: estrification in high temperature to obtain sustainable ester.	---	1	**
CeraFluid®	Triolein, Glycerol Dioleate, Ceramide NP	Triolein and Glycerol Dioleate - Vegetable (<i>Olea europaea</i>); Ceramide NP - biotechnology	Triolein and Glycerol Dioleate - distillation process of olive fruit oil receiving pure fatty acids and next esterification of fatty acids. Ceramide NP - amidation reaction of vegetal stearic acids on phytosphingosine, obtained through bio-fermentation process using yeasts on vegetable substrate.	Olive fruit from food waste	1	**
Ceramidone®	Octyldodecyl PCA	Beetroot (L-glutamic Acid); octyldodecanol - vegetal origin	Cyclization of the L-glutamic acid receiving L-pyrrolidone carboxylic acid (L-PCA). Esterification of L-PCA to octyldodecyl ester of L-PCA.	---	1	CPAI=100 % PPAI=0 %
Tocomix L70-IP Organic CO	Tocopherol, <i>Helianthus annuus</i> Seed Oil	Tocopherol: soy beans; <i>Helianthus annuus</i> Seed Oil: sunflower seeds	Tocopherol: separation techniques of refining stream, purification; <i>Helianthus annuus</i> Seed Oil: pressing of seeds, refining techniques of crude oil.	Obtained from a stream-by product in the refinery process of soybean oil. The stream contains tocopherols	1	PPAI=100 % CPAI=0 %
Apricot Kernel Oil RBDW	<i>Prunus armeniaca</i> Kernel Oil	Apricot seeds/ kernels	Pressing kernels, refining techniques of crude oil	Kernels - food-by product	1	PPAI=100 % CPAI=0 %
Massocare Propanediol Nat MB	Propanediol	Vegetable: palm oil (RSPO)	Fermentation process of glycerol from palm oil	Not	1	CPAI=99.5 % PPAI=0 %
RonaCare® Magnesium Sulfate	Magnesium Sulfate	Minerals	Naturally existing	Not	1	PPAI=0 % CPAI=0 %
E-Leen Green C	Pentylene Glycol, Glycerol	Vegetal: Pentylene Glycol: sugar	Pentylene glycol: steam distillation of sugarcane bagasse	---	1	CPAI=100 % PPAI=0 %

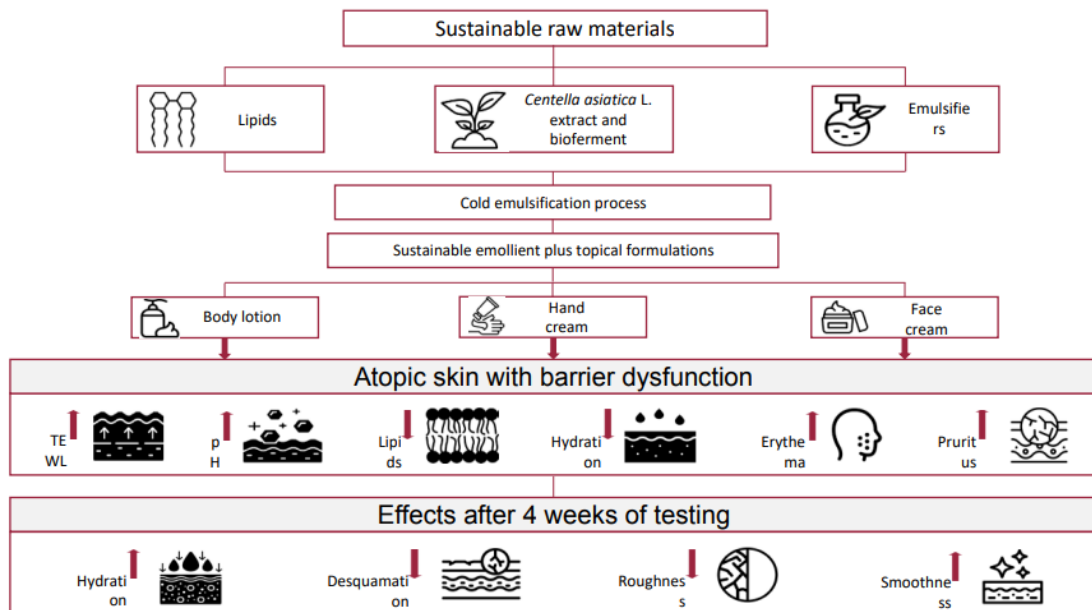
	Caprylate/ Caprate	cane bagasse; Glyceryl Caprylate/ Caprate: palm kernel oil (seeds of the fruit of the oil palm), coconut oil (fruits of the coconut palm), rapeseed oil (<i>Brassica napus</i>), sunflower oil (<i>Helianthus annuus</i>)	(<i>Saccharum officinarum</i>), catalytic hydrogenation, purification; Glyceryl Caprylate/Caprate from vegetable origin is melting at 40-50 °C and added to Pentylene Glycol, and finally mixing at ambient temperature.			
Citropol H	Polycitronellol	The raw material terpenes from pine certified by Forest Stewardship Council (FSC)	Continuous etherification	side-stream turpentine from the paper making process	1	**
Instathix®	Xanthan Gum, Sodium Stearoyl Lactylate, Tapioca Starch, Algin	Xanthan Gum: biotechnology; Tapioca Starch: naturally derived from tapioca; Algin: naturally derived from brown seaweed; Sodium Stearoyl Lactylate: biotechnology.	Xanthan Gum: fermentation of glucose by <i>Xanthomonas campestris</i> ; Tapioca Starch: physical processing of tapioca; Algin: physical extraction of brown seaweed; Sodium Stearoyl Lactylate: esterification of palm oil (RSPO Mass Balance) with biotechnologically obtained lactic acid.	---	1	PPAI=5 % CPAI=95 %
HyaCare® Tremella	<i>Tremella Fuciformis</i> Sporocarp Extract	Vegetable	Extraction followed by purification of <i>Tremella fuciformis</i> sporocarp.	---	1	PPAI=100 % CPAI=0 %

¹PPAI: Physically Processed Agro-Ingredients;

²CPAI: Chemically Processed Agro-Ingredients.

* raw materials certified and approved by COSMOS

** raw materials approved by COSMOS for use, not certified.



Skin barrier in atopic dermatitis: impact of sustainable emollients with *Centella asiatica* L. bioferment and extract

Our study exemplifies a significant reduction in epidermis roughness and desquamation with considerably improved skin hydration and smoothness. Therefore, we demonstrate the in vivo proven ability of sustainable emollient plus topical formulations with *Centella asiatica* L. extract/bioferment to rebuild the epidermal barrier and influence key symptoms of AD.

For Peer Review

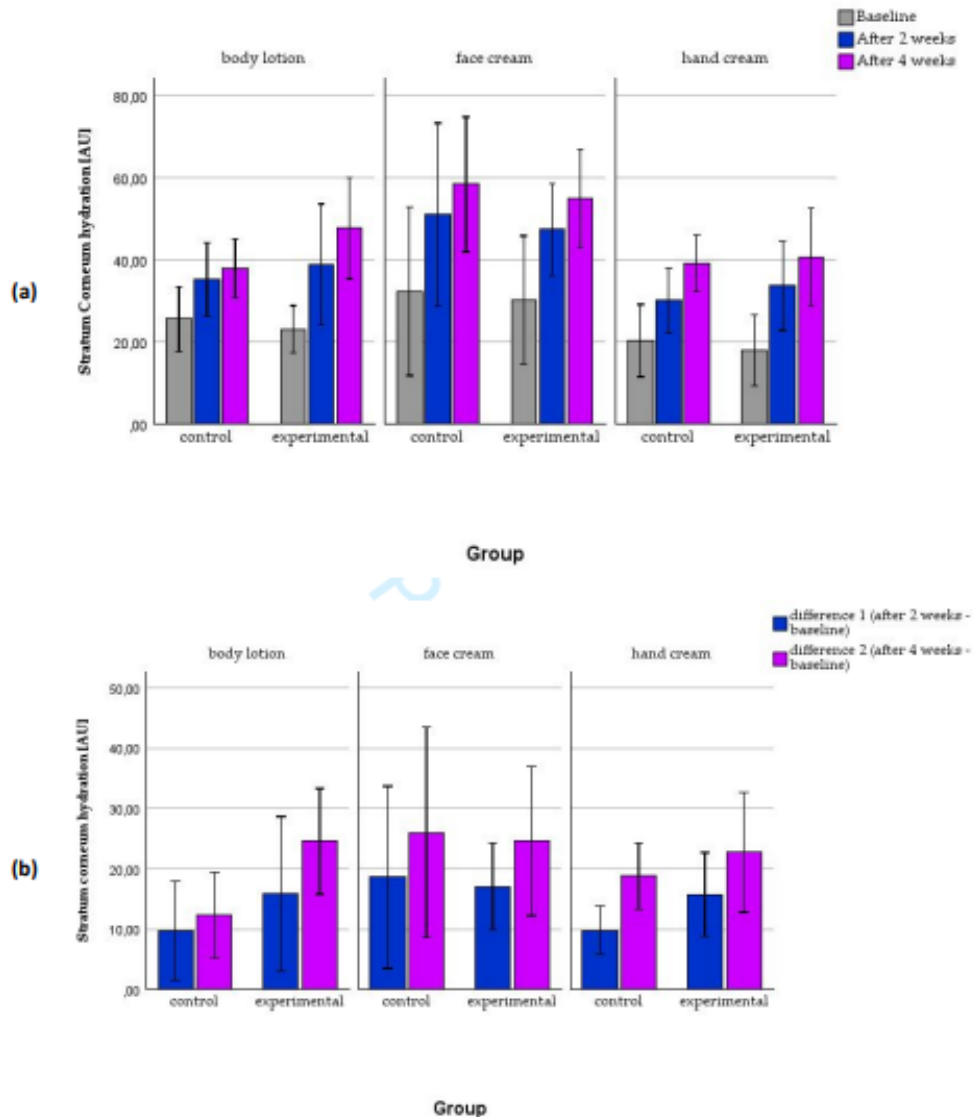


Figure 1. Stratum corneum hydration in the experimental ($n = 10$) and control ($n = 10$) groups of adult volunteers with AD; (a) SCH values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2 weeks and 4 weeks of using body lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SCH values (2 weeks vs. baseline and 4 weeks vs. baseline). Lower values of SCH are frequently associated with the dysfunction of the skin barrier.

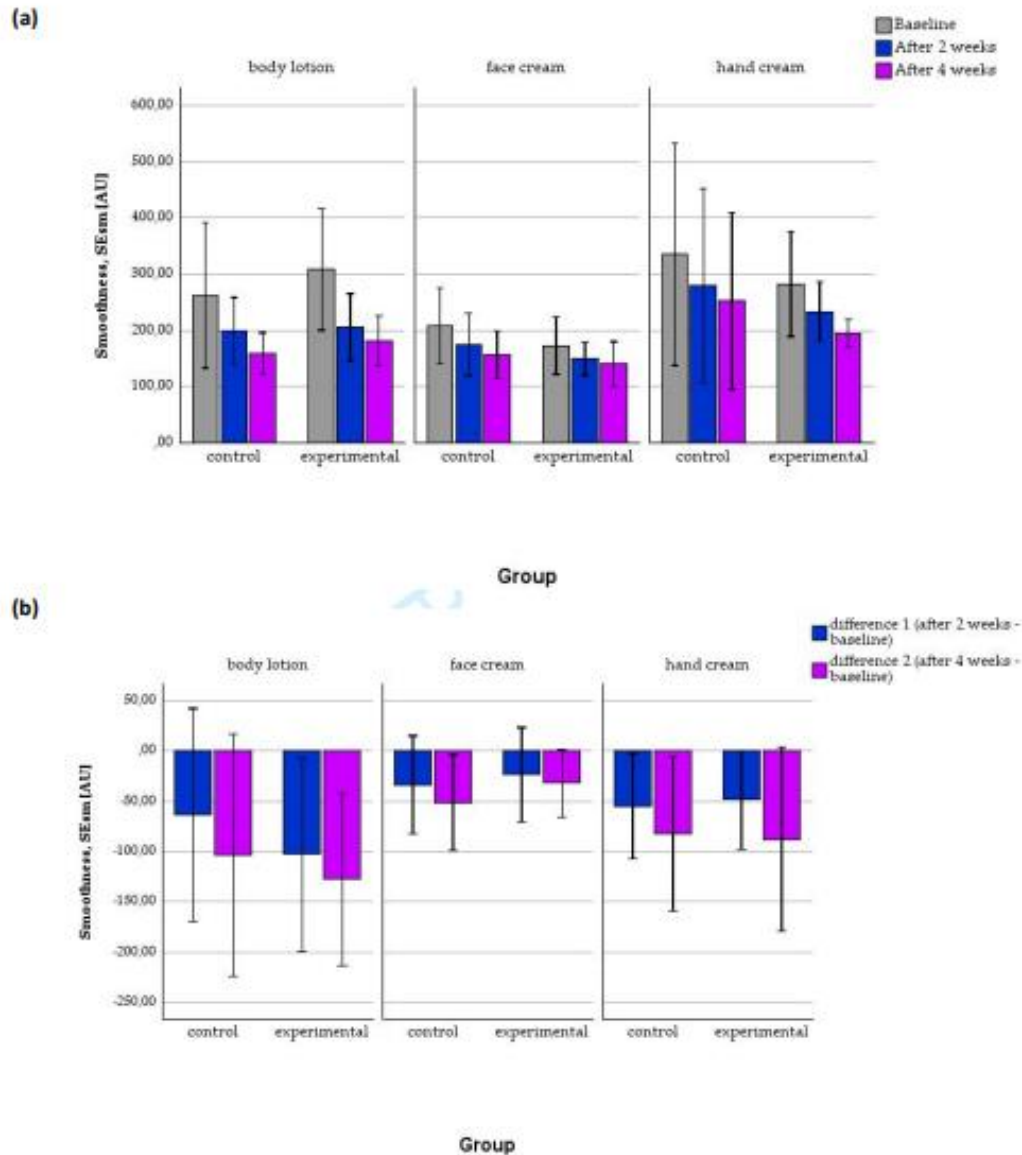


Figure 2. Smoothness of epidermis (expressed as SEsm parameter, AU) in the experimental ($n = 10$) and control ($n = 10$) groups of adult volunteers with AD; (a) SEsm values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2 weeks and 4 weeks of using body lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SEsm values (2 weeks vs. baseline and 4 weeks vs. baseline). The lower the value of the SEsm parameter, the smoother the skin.

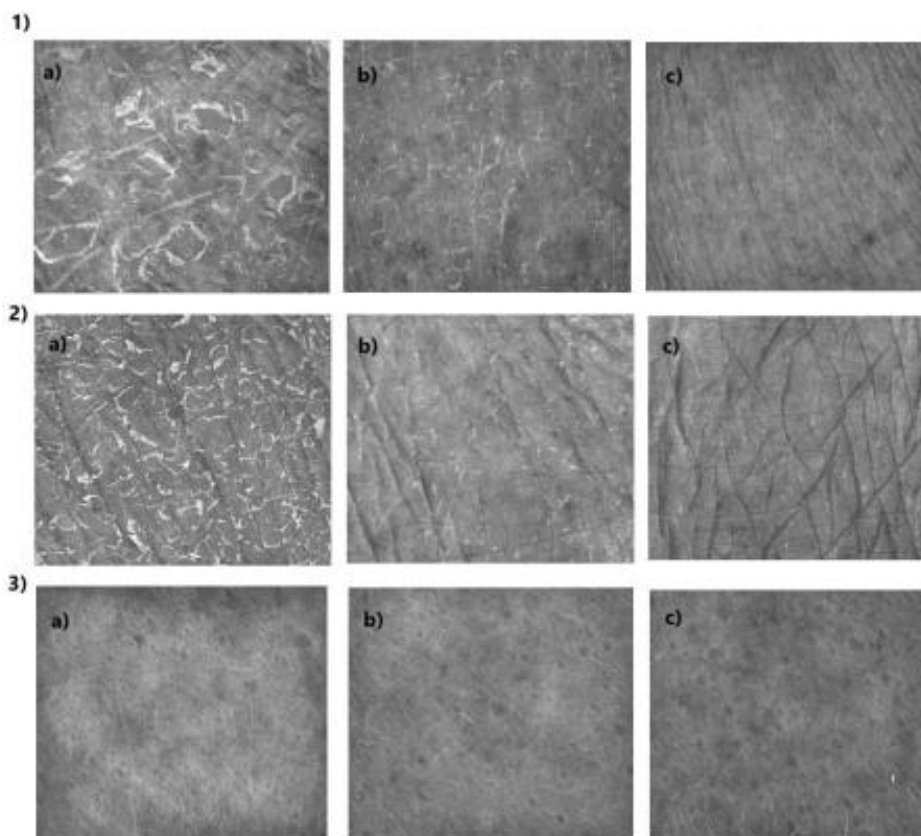


Figure 3. Measurements of smoothness on AD skin in one of the volunteers, performed by VISIOSCAN® VC20 plus camera; pictures (1)-(3) taken after using body lotion, hand cream, and face cream, respectively; images (a)-(c) for the baseline and 2 weeks or 4 weeks of use of the experimental product, respectively. The dark grays represent lines and wrinkles on the skin, whereas the bright colors represent extremely dry areas of the epidermis.

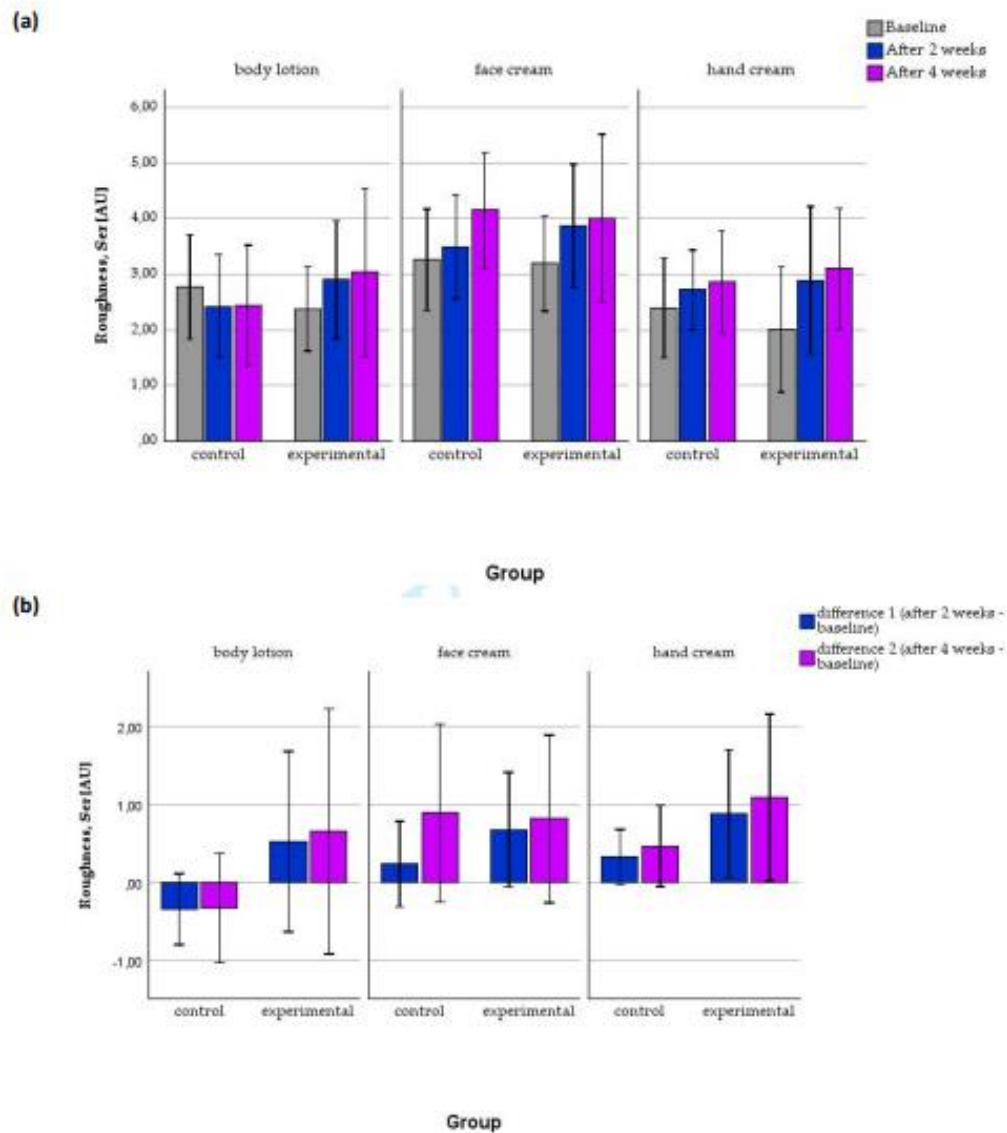


Figure 4. Roughness of epidermis (expressed as SEr parameter, AU) in the experimental ($n = 10$) and control ($n = 10$) groups of adult volunteers with AD; (a) SEr values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2 weeks and 4 weeks of using body lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SEr values (2 weeks vs. baseline and 4 weeks vs. baseline). An increase in the value of the SEr parameter indicates a decrease in the skin roughness.

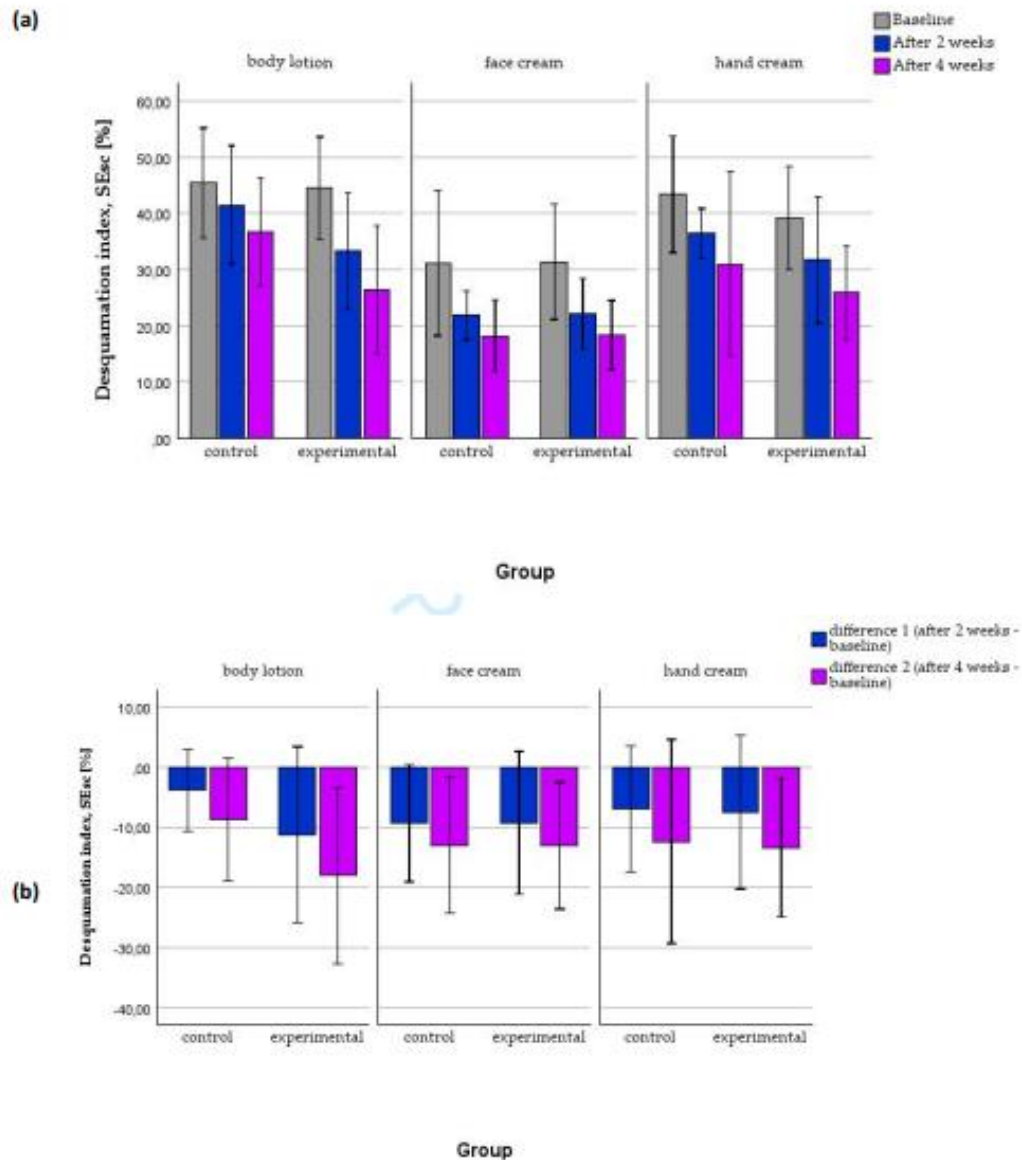


Figure 5. Desquamation index (expressed as SEsc parameter) in the experimental ($n = 10$) and control ($n = 10$) groups of adult volunteers with AD; (a) SEsc values (mean $\pm$ SD) for the non-treated skin and after 2 weeks and 4 weeks of using body lotion, face cream, and hand cream; (b) changes in SEsc values (2 weeks vs. baseline and 4 weeks vs. baseline). The lower the SEsc value, the more hydrated the epidermis.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

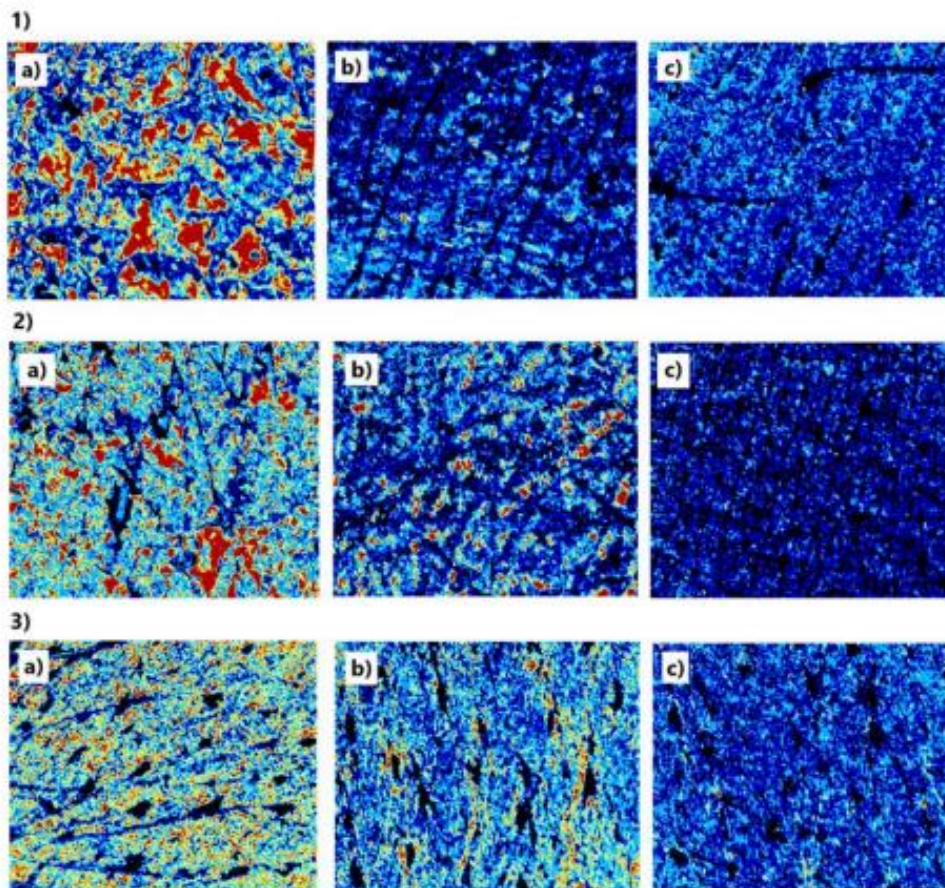


Figure 6. Desquamation of corneocytes measured with Corneofix® F20 tape and Visioscan® VC20 plus camera. The special adhesive foil is applied to the skin and then removed to collect the corneocytes and assess the desquamation index; the software takes into account the number, size and thickness of the corneocytes. Images of the AD skin of one volunteer after use of experimental products: body lotion (1), hand cream (2), and face cream (3); images (a)-(c) for the baseline, 2 weeks, or 4 weeks of use of the experimental product, respectively. Different colors indicate five different levels of thickness of the corneocytes flakes: red – very thick flakes, orange – thick flakes, green – medium thickness, light and dark blue – the least thickness; black color shows the background.

Table 1. The age characteristics of the control and experimental groups.

	AGE		
	Control group	Experimental group	Total group
Mean	43	39	41
Median	44	32	42
SD	8.7	9.7	9.2
Minimum age	29	21	21
Maximum age	54	51	54
p-value	0.356		-

Table 2. Participation criteria defined for in vivo tests.

The inclusion criteria	The exclusion criteria
Age: 18 years or more;	Pregnancy or breastfeeding;
Mild to moderate atopic dermatitis and sensitive skin;	Severe atopic dermatitis;
Chronic or recurrent, pruritic lesions with characteristic distribution on the skin;	Pharmacological therapy.
Positive family history of allergic conditions;	
No need for pharmacological treatment during the product testing;	
Lack of any other accompanying skin diseases.	



CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomised trial*

Section/Topic	Item No	Checklist item	Reported on page No
Title and abstract			
	1a	Identification as a randomised trial in the title	No
	1b	Structured summary of trial design, methods, results, and conclusions (for specific guidance see CONSORT for abstracts)	Yes – p.3
Introduction			
Background and objectives	2a	Scientific background and explanation of rationale	Yes – p.5
	2b	Specific objectives or hypotheses	Yes – p.6
Methods			
Trial design	3a	Description of trial design (such as parallel, factorial) including allocation ratio	Yes – p.7
	3b	Important changes to methods after trial commencement (such as eligibility criteria), with reasons	N/A
Participants	4a	Eligibility criteria for participants	Yes – p.7
	4b	Settings and locations where the data were collected	Yes – p.8 + Data S1
Interventions	5	The interventions for each group with sufficient details to allow replication, including how and when they were actually administered	Yes – p.8
Outcomes	6a	Completely defined pre-specified primary and secondary outcome measures, including how and when they were assessed	Yes – p.8
	6b	Any changes to trial outcomes after the trial commenced, with reasons	N/A
Sample size	7a	How sample size was determined	N/A
	7b	When applicable, explanation of any interim analyses and stopping guidelines	N/A
Randomisation:			
Sequence generation	8a	Method used to generate the random allocation sequence	Yes – p.7
	8b	Type of randomisation; details of any restriction (such as blocking and block size)	N/A
Allocation concealment mechanism	9	Mechanism used to implement the random allocation sequence (such as sequentially numbered containers), describing any steps taken to conceal the sequence until interventions were assigned	Yes – p.7
Implementation	10	Who generated the random allocation sequence, who enrolled participants, and who assigned participants to interventions	Yes – p.8
Blinding	11a	If done, who was blinded after assignment to interventions (for example, participants, care providers, those	Yes – Data S1

		assessing outcomes) and how	
1			
2		11b If relevant, description of the similarity of interventions	N/A
3	Statistical methods	12a Statistical methods used to compare groups for primary and secondary outcomes	Yes – p.8-9
4		12b Methods for additional analyses, such as subgroup analyses and adjusted analyses	N/A
5			
6	Results		
7	Participant flow (a	13a For each group, the numbers of participants who were randomly assigned, received intended treatment, and	Yes – p.10
8	diagram is strongly	were analysed for the primary outcome	
9	recommended)	13b For each group, losses and exclusions after randomisation, together with reasons	N/A
10	Recruitment	14a Dates defining the periods of recruitment and follow-up	Yes – Data S1
11		14b Why the trial ended or was stopped	N/A
12	Baseline data	15 A table showing baseline demographic and clinical characteristics for each group	Yes – p.7
13	Numbers analysed	16 For each group, number of participants (denominator) included in each analysis and whether the analysis	Yes – p.10-21
14		was by original assigned groups	
15			
16	Outcomes and	17a For each primary and secondary outcome, results for each group, and the estimated effect size and its	Yes – p.11-21
17	estimation	precision (such as 95% confidence interval)	
18		17b For binary outcomes, presentation of both absolute and relative effect sizes is recommended	N/A
19	Ancillary analyses	18 Results of any other analyses performed, including subgroup analyses and adjusted analyses,	Yes – p.10
20		distinguishing pre-specified from exploratory	
21			
22	Harms	19 All important harms or unintended effects in each group (for specific guidance see CONSORT for harms)	N/A
23			
24	Discussion		
25	Limitations	20 Trial limitations, addressing sources of potential bias, imprecision, and, if relevant, multiplicity of analyses	N/A
26	Generalisability	21 Generalisability (external validity, applicability) of the trial findings	Yes – p.23
27	Interpretation	22 Interpretation consistent with results, balancing benefits and harms, and considering other relevant evidence	Yes – p.11-22
28			
29	Other information		
30	Registration	23 Registration number and name of trial registry	Yes – Title Page
31	Protocol	24 Where the full trial protocol can be accessed, if available	N/A
32	Funding	25 Sources of funding and other support (such as supply of drugs), role of funders	N/A
33			

*We strongly recommend reading this statement in conjunction with the CONSORT 2010 Explanation and Elaboration for important clarifications on all the items. If relevant, we also recommend reading CONSORT extensions for cluster randomised trials, non-inferiority and equivalence trials, non-pharmacological treatments, herbal interventions, and pragmatic trials. Additional extensions are forthcoming: for those and for up to date references relevant to this checklist, see www.consort-statement.org.

