



**Opracowanie produktów dermokosmetycznych na bazie
wyselekcjonowanych ekstraktów roślinnych, olejków
eterycznych i substancji o wysokim potencjale łagodzącym
i regeneracyjnym względem urazów i chorób zwyrodnieniowych
stawów**

Development of dermocosmetic products based on selected plant
extracts, essential oils and substances with a high soothing
and regenerative potential in relation to injuries and degenerative
diseases of the joints

KATARZYNA PIKOSZ

Promotor: Prof. UAM dr hab. Agnieszka Feliczak-Guzik

Promotor pomocniczy: dr Paulina Szczyglewska

Opiekun naukowy z ramienia firmy Invanto Sp. z o.o.: dr Anna Krause

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

Nr umowy:
DWD/4/33/2020

Pragnę serdecznie podziękować Pani promotor
prof. UAM dr hab. Agnieszce Feliczak-Guzik
za Pani zaangażowanie, cierpliwość, życzliwość
i opiekę naukową w ciągu czterech lat współpracy.
Pani Agnieszko, dziękuję za każdą udzieloną radę
i wielowymiarową pomoc podczas
realizacji tej pracy doktorskiej oraz za to,
że mimo ogromu swoich obowiązków
zawsze znalazła Pani dla mnie czas.

Dziękuję także Pani dr Paulinie Szczyglewskiej
za wsparcie naukowe, serdeczność i pomoc merytoryczną
od samego początku rozpoczęcia studiów doktorskich.

Dziękuję także moim wspólnikom i serdecznym kolegom z pracy
Markowi Przybylskiemu i Pawłowi Musiałowi
za motywację, wyrozumiałość, wasze wsparcie
oraz nieocenioną pomoc merytoryczną i edytorską.
Kochani, bez was realizacja tej pracy nie byłaby możliwa.

Sredeczne podziękowania składam także
Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego
oraz firmie Invanto Sp. z o.o.
za możliwość realizacji doktoratu wdrożeniowego i rozwoju naukowego
oraz współpracę przez cały okres trwania projektu.

SPIS AKRONIMÓW

SPIS AKRONIMÓW STOSOWANYCH W ROZPRAWIE DOKTORSKIEJ

AKRONIM	ROZWINIĘCIE
ACN	Acetonitrile (acetonitryl)
ALC	Approximate lethal concentration (średnie stężenie śmiertelne)
aw	Aktywność wody
BHP	Bezpieczeństwo i higiena pracy
CAS	Chemical Abstracts Service (amerykańska organizacja, pozwalająca na identyfikację substancji)
CET	Cetrymide agar (agar z cetrymidem)
CGS	Centymetr, Gram, Sekunda (układ jednostek miar)
ChZS	Choroba zwyrodnieniowa stawów
CI	Chemical ionisation (jonizacja chemiczna)
CIR	Cosmetic Ingredient Review (przegląd składników kosmetycznych)
CLP	Classification, Labelling and Packaging (rozporządzenie wprowadzające w Unii Europejskiej nowy system klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin)
CMA	Corn meal agar (agar kukurydziany)
CMR	Carcinogenic, Mutagenic, Reprotoxic (rakotwórcze, mutagenne, działające szkodliwie na rozrodczość)
CPNP	Cosmetic Products Notification Portal (portal powiadomień o produktach kosmetycznych)
DAa	Absorcja dermalna [%]
DAD	The Diode Array Detector (detektor z układem diodowym)
DAP	Absorcja dermalna [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$]
DART	Developmental and Reproductive Toxicology (baza danych dotycząca rozwojowej i reprodukcyjnej toksykologii)
DEA	Diethanolamine (dietańolamina)
DMSO	Dimethyl sulfoxide (dimetylosulfotlenek)
ECHA	European Chemicals Agency (Europejska Agencja Chemikaliów)
EI	Electron ionisation (jonizacja elektronowa)
EINECS	European Inventory of Existing Commercial chemical Substances (Europejski spis istniejących substancji chemicznych o znaczeniu komercyjnym)
ELINCS	European List of Notified Chemical Substances (Europejski wykaz notyfikowanych substancji chemicznych)
EMB	Eosine methylene blue (agar z eozyną i błękitem metylenowym)
ESI	Electrospray (elektrozpylanie)
F	Frequency (częstotliwość stosowania gotowego produktu/dzień)
FA	Formic acid (kwas mrówkowy)
FDA	Food and Drug Administration (Administracja Jedzenia i Leków)
FT-IR	Fourier-transform infrared (spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera)
GC	Gas chromatography (chromatografia gazowa)
GMP	Good Manufacturing Practice (dobra praktyka produkcyjna)
GRAS	Generally Recognised As Safe (lista substancji uważanych za bezpieczne)
GUS	Główny Urząd Statystyczny

SPIS AKRONIMÓW

HERA	Human and Environmental Risk Assessment (baza danych dotycząca oceny ryzyka dla ludzi i środowiska)
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance (równowaga wodno-lipidowa)
HPLC	High-performance liquid chromatography (wysokosprawna chromatografia cieczowa)
ICH	The International Council for Harmonisation (Międzynarodowa Rada ds. Harmonizacji)
IFN, IFN-γ	Interferon, Interferon- γ
IFSCC	International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (Międzynarodowa Federacja Stowarzyszeń Chemików Kosmetycznych)
IL	Interleukin (interleukiny)
<i>In vitro</i>	„w szkle”
<i>In vivo</i>	na żywym „organizmie”
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (Międzynarodowe nazewnictwo składników kosmetyków)
IR	Infrared (promieniowanie z zakresu podczerwieni)
ISO	International Organization for Standardization (Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna)
LD	Laser desorption (desorpcja laserowa)
LD50	Lethal dose (dawka powodująca zgon połowy narażonych osobników)
LOAEL	Lowest Observable Adverse Effects Level (najniższa dawka, w przypadku której obserwuje się działania niepożądane)
MAC	MacConkey agar (agar MacConkey)
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorpcja/ionizacja laserowa wspomaganą matrycą)
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 (białko chemoatraktacyjne monocytów-1)
MLS	Multiple Light Scattering (metoda wielokrotnego rozpraszania światła)
MoS	Margin of Safety (margines bezpieczeństwa)
MS	Mass spectrometry (spektrometria mas)
MSA	Mannitol salt agar (podłoże Chapmana)
MSM	Metylosulfonylometan
MTT	Bromek 3-[4,5,-dimetylotiazol-2-ilo]-2,5-difenylotetrazoliowego
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells (czynnik jądrowy aktywowanych komórek T)
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B)
NIR	Near infrared (promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni)
NLPZ	Niesteroidowe leki przeciwzapalne
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego)
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków)
NOEL	No Observable Effect Level (najwyższa dawka leku, która nie ma zauważalnego działania)
NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (niesteroidowe leki przeciwzapalne)
OA	Osteoarthritis (choroba zwyrodnieniowa stawów)
O/W	Emulsja typu olej w wodzie

SPIS AKRONIMÓW

O/W/O	Emulsja wielokrotna typu olej-woda-olej
PABA	p-aminobenzoic acid (kwas para-aminobenzoesowy)
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (równoległy test przepuszczalności sztucznej membrany)
PAO	Period After Opening (czas przydatności do użycia po otwarciu opakowania)
PAP	<i>Pseudomonas</i> agar P (agar dla <i>Pseudomonas</i>)
PDA	Potato dextrose agar (agar dekstrozowo-ziemniaczany)
PDMS	Polydimethylsiloxane (polidimetylosiloksan)
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand, (ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B)
RID	Refractive Index Detector (detektor refraktometryczny)
RTECS	Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (Rejestr toksycznych efektów substancji chemicznych)
SCCP	Scientific Committee on Consumer Products (Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Produktów)
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety (Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów)
SCCNFP	Scientific Committee for Cosmetic Products and Non-food Products intended for Consumers (Komitet Naukowy ds. Produktów Kosmetycznych i Produktów Nieżywnościowych przeznaczonych dla Konsumentów)
SCS	Sodium coco sulfate (sól sodowa siarczanu alkoholi tłuszczowych z oleju kokosowego)
SDA	Sabouraud dextrose agar (agar Sabouraud z dekstrozą)
SDCA	Sabouraud dextrose chloramphenicol agar (agar Sabouraud z chloramfenikolem)
SED	Systemic exposure dose (ogólnoustrojowa dawka ekspozycyjna)
SFC	Supercritical Fluid Chromatography (nadkrytyczna chromatografia cieczowa)
SLES	Sodium Laureth Sulfate (sól sodowa siarczanu oksyetylenowanego alkoholu laurylowego)
SLS	Sodium Lauryl Sulfate (laurylosiarczan sodu)
SOX9	SRY-box transcription factor 9 (czynnik transkrypcyjny SRY-box 9, SRY (ang. sex-determining region Y (gen determinujący płeć znajdujący się na chromosomie Y))
SS	Skin Surface (powierzchnia skóry)
SYSADOA	Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis (objawowe wolnodziałające leki przeciwko chorobie zwyrodnieniowej stawów)
TD_{Lo}	Toxic Dose Low (najniższa opublikowana dawka toksyczna)
TE	Thermospray (termospray)
TEA	Triethanolamine (trójetanoloamina)
TEWL	Transepidermal Water Loss (przezskórkowa utrata wody)
TNF	Tumor necrosis factor (czynnik martwicy nowotworu)
TNF-α	Tumor necrosis factor – α (czynnik martwicy nowotworu alfa)
TRP	Transient receptor potential (receptor przejściowego potencjału)
TRPA	Transient receptor potential ankyrin (receptor anakirynowy przejściowego potencjału)
TRPM	Transient receptor potential melastatin (receptor melastatynowy przejściowego potencjału)

SPIS AKRONIMÓW

TRPV	Transient receptor potential vanilloid (receptor waniloidowy przejściowego potencjału)
TSA	Tryptone soy agar (agar tryptonowo-sojowy)
TRP	Transient Receptor Potential (grupa kanałów receptora przejściowego potencjału)
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography (ultraszybna chromatografia cieczowa)
UV	Ultraviolet (promieniowanie z zakresu ultrafioletu)
VBE	Vanillyl Butyl Ether (eter butylowy kwasu waniliowego)
VIS	Visible (promieniowanie z zakresu światła widzialnego)
WHO	World Health Organization (Światowa Organizacja Zdrowia)
W/O	Emulsja typu woda w oleju
W/O/W	Emulsja wielokrotna typu woda-olej-woda
% RH	% Relative Humidity (% wilgotności względnej)

SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP.....	23
2.	CZEŚĆ LITERATUROWA.....	27
2.1.	Połączenia stawowe kości.....	29
2.1.1.	Budowa stawów	29
2.1.2.	Struktury ochronne	30
2.1.2.1.	Tkanki chrzęstne.....	30
2.1.2.2.	Płyn synowialny (maź stawowa, płyn stawowy).....	31
2.2.	Choroby zwyrodnieniowe.....	32
2.2.1.	Etiopatogeneza choroby zwyrodnieniowej stawów	32
2.2.2.	Objawy/obraz kliniczny ChZS.....	33
2.2.3.	Dane epidemiologiczne.....	33
2.2.4.	Leczenie ChZS	34
2.2.4.1.	Niesteroidowe leki przeciwzapalne	35
2.2.4.2.	Wolno działające leki objawowe.....	35
2.2.4.2.1.	Glukozamina.....	36
2.2.4.2.2.	Chondroityna	38
2.2.4.2.3.	Ekstrakt z zioła <i>Epimedium Koreanum</i> i zawarta w nim ikaryna	39
2.2.4.3.	Terapia zimnem i ciepłem - geneza bólu	41
2.3.	Rynek kosmetyczny w odniesieniu do problemów kostno-stawowych.....	46
2.4.	Budowa i podstawowe funkcje skóry.....	47
2.4.1.	Budowa skóry.....	47
2.4.1.1.	Naskórek	47
2.4.1.2.	Warstwa hydrolipidowa.....	48
2.4.1.3.	Skóra właściwa.....	48
2.4.1.4.	Warstwa podskórna.....	49
2.5.	Drogi przenikania substancji aktywnych przez barierę skórną	49
2.5.1.	Transport transfolikularny.....	49
2.5.2.	Transport transepidermalny	50
2.6.	Metody badania przenikania transepidermalnego.....	50
2.6.1.	Metody teoretyczne	50
2.6.2.	Przenikanie <i>in vivo</i>	51
2.6.3.	Przenikanie <i>in vitro</i>	51
2.6.3.1.	Membrany wykorzystywane w badaniach przenikania <i>in vitro</i>	52
2.6.3.2.	Aparatura wykorzystywana do badania przenikania <i>in vitro</i>	54
2.6.3.3.	Medium akceptorowe.....	56
2.6.4.	Czynniki warunkujące efektywność przenikania	57

SPIS TREŚCI

2.6.4.1.	Właściwości substancji aktywnej	57
2.6.4.2.	Właściwości nośnika	57
2.6.4.3.	Promotory przenikania	58
2.6.4.4.	Parametry biologiczne skóry	59
2.6.4.5.	Czynniki fizyczne	60
2.7.	Tworzenie formułacji kosmetycznych.....	62
2.7.1.	Rodzaje najpopularniejszych postaci kosmetycznych dostępnych na rynku	63
2.7.1.1.	Emulsja	63
2.7.1.2.	Żel	66
2.7.1.3.	Maść	67
2.7.1.4.	Inne postaci kosmetyków	68
2.8.	Aspekty prawne i bezpieczeństwo.....	69
2.8.1.	Badania mikrobiologiczne i testy konserwacji.....	70
2.8.2.	Badania dermatologiczne	71
2.8.3.	Badania stabilności i kompatybilności z opakowaniem.....	72
2.8.3.1.	Testy w komorach klimatycznych	73
2.8.3.2.	Ocena organoleptyczna	74
2.8.3.3.	pH.....	75
2.8.3.4.	Lepkość.....	76
2.8.3.5.	Gęstość	78
2.8.3.6.	Aktywność wody.....	79
2.8.3.7.	Stabilność wirówkowa	80
2.8.3.8.	Stabilność z wykorzystaniem wielokrotnego rozpraszania światła	80
2.8.3.9.	Określenie typu emulsji.....	81
2.8.4.	Badania skuteczności produktu	82
2.8.4.1.	Badania aplikacyjne ankietowe	82
2.8.4.2.	Badania aplikacyjne aparaturowe	83
2.8.5.	Oznaczenie zawartości składnika aktywnego w masie gotowego produktu	85
2.8.5.1.	Metody chromatograficzne.....	85
2.8.5.2.	Metody spektroskopowe.....	87
2.8.6.	Raport bezpieczeństwa	91
2.8.6.1.	Część A.....	91
2.8.6.2.	Część B.....	93
3.	CEL PRACY	95
4.	METODYKA PRACY	99
4.1.	Analiza rynku oraz analiza literaturowa i wytypowanie surowców o pożądanym właściwościach łagodzących i regeneracyjnych.....	101

SPIS TREŚCI

4.2.	Analiza ilościowa ikaryny w ekstrakcie z <i>Epimedium Koreanum</i> metodą HPLC- MS.....	101
4.2.1.	Warunki analizy	102
4.2.2.	Wyznaczenie krzywej kalibracyjnej dla ikaryny i walidacja metody analitycznej.....	102
4.3.	Preparatyka założonych formułacji.....	102
4.3.1.	Wykorzystana aparatura.....	103
4.3.2.	Surowce.....	103
4.3.3.	Przygotowanie emulsji typu O/W	103
4.3.4.	Przygotowanie żelu.....	105
4.3.4.1.	Preparatyka formułacji żelowej 1	105
4.3.4.2.	Preparatyka formułacji żelowej 2	106
4.3.4.3.	Preparatyka formułacji żelowej 3	107
4.3.5.	Przygotowanie maści	108
4.4.	Specyfikacja fizykochemiczna opracowywanych produktów wraz z metodyką analityczną.....	110
4.4.1.	Pomiar pH	110
4.4.2.	Pomiar gęstości.....	110
4.4.3.	Oznaczenie lepkości dynamicznej otrzymanych formułacji.....	111
4.4.4.	Ocena sensoryczna badanych formułacji.....	111
4.4.5.	Stabilność wirówkowa emulsji.....	113
4.4.6.	Określenie stabilności produktów metodą wielokrotnego rozpraszania światła – Turbiscan.....	114
4.4.7.	Ocena mikroskopowa emulsji i określenie typu emulsji metodą mikroskopową	114
4.4.8.	Oznaczenie aktywności wody w maści	114
4.5.	Wykonanie badań przenikania przez naskórkowego <i>in vitro</i> opracowanych formułacji wybranych form aplikacyjnych	115
4.5.1.	Badanie uwalniania ikaryny oraz ocena kinetyki jej przenikania przez barierę imitującą skórę	115
4.5.2.	Przenikanie <i>in vitro</i> w komorze Franz'a - siarczan glukozaminy	116
4.5.3.	Przenikanie <i>in vitro</i> w komorze Franz'a - ikaryna	117
4.6.	Optymalizacja procesu otrzymywania produktów kosmetycznych i podniesienie skali ich wytwarzania do skali półtechnicznej	118
4.6.1.	Optymalizacja procesu wytwarzania i podniesienie skali wytwarzania formułacji żelowej.....	118
4.6.1.1.	Opracowanie i optymalizacja technologii otrzymywania formułacji w skali laboratoryjnej	119
4.6.1.2.	Opracowanie i optymalizacja technologii otrzymywania formułacji w skali półtechnicznej	120
4.6.1.3.	Optymalizacja procesu mieszania w skali półtechnicznej	121

SPIS TREŚCI

4.6.2.	Optymalizacja otrzymywania formulacji emulsyjnej i podniesienie skali jej wytwarzania do laboratoryjnej i półtechnicznej.....	123
4.6.2.1.	Skala laboratoryjna.....	124
4.6.2.2.	Skala półtechniczna.....	125
4.6.2.3.	Optymalizacja procesu mieszania i homogenizacji	126
4.7.	Testy czystości mikrobiologicznej	128
4.7.1.	Oznaczenie bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	128
4.7.2.	Oznaczenie bakterii <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	129
4.7.3.	Oznaczenie bakterii <i>Escherichia Coli</i>	131
4.7.4.	Oznaczenie grzybów <i>Candida Albicans</i>	132
4.7.5.	Ogólna liczba drożdży i pleśni	134
4.7.6.	Ogólna liczba mezofilnych mikroorganizmów tlenowych	136
4.8.	Testy konserwacji (Challenge tests)	137
4.9.	Testy stabilności i kompatybilności	138
4.10.	Badanie dermatologiczne (potencjał drażniący)	140
4.10.1.	Dobór ochotników do badań	140
4.10.2.	Test płatkowy	141
4.10.3.	Średni wskaźnik podrażnienia	142
4.11.	Badanie aplikacyjne ankietowe	143
4.11.1.	Zakres badań.....	143
4.11.2.	Dobór ochotników.....	143
4.11.3.	Metodyka badań aplikacyjnych	144
4.11.4.	Badanie aplikacyjne żelu chłodzącego (kontuzje stawowe)	144
4.11.5.	Badanie aplikacyjne emulsji rozgrzewającej (zwyrodnienia)	146
4.12.	Ocena bezpieczeństwa z analizą toksykologiczną	147
4.13.	Kontrola jakości.....	151
4.13.1.	Pobieranie prób.....	151
4.13.2.	Próbki archiwalne	152
4.13.3.	Zakres badań kontroli jakości.....	152
5.	WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA.....	153
5.1.	Analiza rynku oraz analiza literaturowa i wytypowanie surowców o pożądanych właściwościach łagodzących i regeneracyjnych.....	155
5.2.	Analiza zawartości ikaryny w ekstrakcie z <i>Epimedium Koreanum</i> z zastosowaniem HPLC-MS.....	160
5.3.	Preparatyka założonych formulacji	162

SPIS TREŚCI

5.4.	Opracowanie specyfikacji fizykochemicznych opracowywanych produktów	164
5.4.1.	Pomiar pH	164
5.4.2.	Oznaczenie gęstości i lepkości dynamicznej otrzymanych formułacji	165
5.4.3.	Ocena sensoryczna badanych formułacji.....	167
5.4.4.	Określenie stabilności emulsji.....	169
5.4.5.	Ocena mikroskopowa emulsji	170
5.4.6.	Oznaczenie aktywności wody w maści	171
5.5.	Badanie przenikania przeznaskórkowego <i>in vitro</i> opracowanych formułacji w wybranych formach aplikacyjnych	172
5.5.1.	Określenie stopnia uwalniania ikaryny z zastosowaniem aparatu łopatkowego.....	172
5.5.2.	Przenikanie <i>in vitro</i> siarczanu glukozaminy w komorze Franz'a	173
5.5.3.	Przenikanie <i>in vitro</i> ikaryny w komorze Franz'a	180
5.6.	Optymalizacja procesu otrzymywania formułacji i podniesienie skali jej wytwarzania w skali półtechnicznej	183
5.7.	Zaprojektowanie pakietu badań wdrożeniowych dla opracowanych produktów kosmetycznych	190
5.7.1.	Badania mikrobiologiczne	190
5.7.2.	Testy stabilności i kompatybilności	193
5.7.3.	Badanie dermatologiczne (potencjał drażniący)	200
5.7.4.	Badanie aplikacyjne - ankietowe zrealizowane w laboratorium zewnętrznym	202
5.7.5.	Ocena bezpieczeństwa z analizą toksykologiczną	210
5.7.5.1.	Narażenie na działanie produktu kosmetycznego	211
5.7.5.2.	Profil toksykologiczny substancji.....	214
5.7.5.3.	Ocena bezpieczeństwa substancji lub mieszanin.....	255
5.7.5.4.	Ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego.....	255
6.	WNIOSKI.....	261
7.	PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ	267
8.	OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE.....	271
9.	ZAŁĄCZNIKI.....	275
10.	STRESZCZENIA PRACY.....	345
11.	WYKAZ RYSUNKÓW I TABEL	353
12.	SPIS LITERATURY.....	359

1. WSTEP

Choroba zwyrodnieniowa stawów (ang. OA, ChZS) jest progresywną i chroniczną chorobą, która powoduje trwałą utratę chrząstki w obrębie stawu. Objawy kliniczne to przede wszystkim ból związany zwłaszcza z rozpoczęciem ruchu, ale także ograniczona ruchomość stawu, sztywność po bezruchu i opuchlizna. Do dziś nie opracowano skutecznego leczenia przyczynowego choroby zwyrodnieniowej stawów. W związku ze zmianami demograficznymi zachodzącymi na świecie oraz stopniową zmianą stylu życia, coraz więcej osób cierpi na ChZS, co w połączeniu z brakiem skutecznych metod leczenia mobilizuje do nieustannego poszukiwania alternatywnych terapii. Najczęściej stosowana terapia obejmuje zmniejszenie bólu, zahamowanie progresji choroby i poprawę funkcji stawów, poprzez połączenie metod farmakologicznych, nefarmakologicznych i leczenia chirurgicznego.

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej miały na celu opracowanie dwóch produktów dermokosmetycznych do stosowania miejscowego na bazie wyselekcjonowanych ekstraktów roślinnych, olejków eterycznych i substancji o wysokim potencjale łagodzącym i regeneracyjnym względem urazów oraz chorób zwyrodnieniowych stawów, w wybranych postaciach dermokosmetycznych o potwierdzonym przenikaniu przezskórnym.

Na podstawie przeprowadzonej analizy przeglądowej dostępnych składników aktywnych nasunął się pomysł wykorzystania ikaryny, substancji o potencjalnie wysokiej zdolności do aktywacji chondrogenyzy i regeneracji macierzy międzykomórkowej przez chondrocyty w dotychczas niezbadanym miejscowym zastosowaniu, co daje nowe spojrzenie na możliwości wykorzystania ikaryny i jej właściwości w leczeniu ChZS. Dodatkowo, innowacyjne połączenie drugą substancją, siarczanem glukozaminy, może przyczynić się do synergicznego działania obu substancji. Siarczan glukozaminy jest substancją endogenną, typowym składnikiem łańcuchów polisacharydowych macierzy chrząstki i glukozaminoglikanów mazi stawowej. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że glukozamina i jej pochodne stymulują syntezę fizjologicznych glikozaminoglikanów i proteoglikanów przez chondrocyty oraz kwasu hialuronowego przez synowioocyty. W obu przypadkach (ikaryna i siarczan glukozaminy), długotrwałe podawanie doustne nie jest zalecane ze względu na niepożądane skutki uboczne ze strony układu pokarmowego i wykazaną niską biodostępność związaną z efektem pierwszego przejścia przez wątrobę i rozkładem substancji czynnych, co sprawia, że stosowanie miejscowe może dawać lepsze efekty terapeutyczne.

Wyzwaniem podczas opracowywania nowych formułacji jest stworzenie stabilnej masy, która jednocześnie będzie stanowić doskonały nośnik dla zawartych w nim składników aktywnych, zapewniający ich odpowiednie uwalnianie i możliwie wysoką biodostępność. W tym przypadku, wykorzystane substancje aktywne charakteryzują się odmiennym powinowactwem do substancji hydro- i lipofilowych oraz parametrami rozpuszczalności, co stanowiło dodatkową trudność w doborze składników bazowych oraz promotorów przenikania, w taki sposób, aby zapewnić wyżej wymienione parametry dla jednej substancji bez zakłócenia ich, w przypadku drugiego ze składników.

WSTĘP

Opracowane formułacje kosmetyczne poddano szerokiej charakterystyce fizykochemicznej oraz badaniom *in vitro* przenikania przez membrany imitujące skórę, na podstawie których, wybrano prototypy do dalszych badań. Ponadto dla wybranych formułacji opracowane zostały procesy technologiczne z podniesieniem skali do półtechnicznej i optymalizacją procesu ich wytwarzania, a także przeprowadzono wszystkie badania niezbędne do wdrożenia produktu na rynek. W tym zostały wykonane badania czystości mikrobiologicznej i zakonserwowania produktu, badania stabilności i kompatybilności produktu z opakowaniem, testy dermatologiczne, badania aplikacyjne oraz wykonano ocenę toksykologiczną wybranych formułacji.

W przyszłości przeprowadzone badania mogą być pierwszym krokiem do rozpoczęcia badań klinicznych nad leczniczym działaniem ikaryny w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów.

2. CZĘŚĆ LITERATUROWA

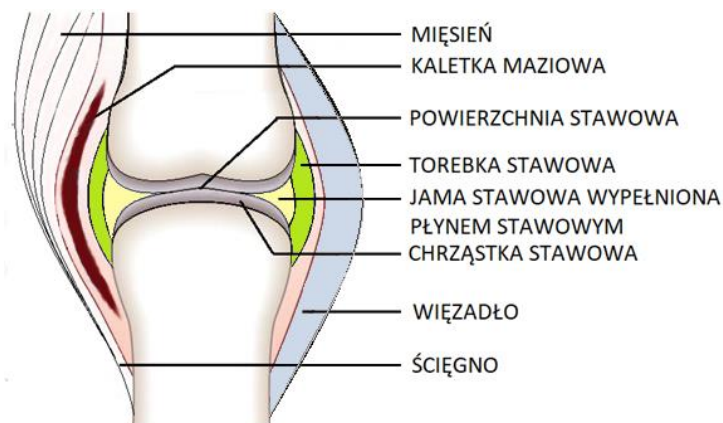
2.1. Połączenia stawowe kości

Za stabilizację i ruch szkieletu ludzkiego odpowiadają ściśle (nieruchome) i wolne (ruchome) połączenia między kośćmi, które razem z więzadłami, mięśniami, ścięgnami tworzą układ ruchu człowieka. Nieruchome połączenia kości i połączenia o niewielkim stopniu ruchomości to głównie chrząstkozrosty, więzozrosty i kościorosty, które uniemożliwiają przemieszczanie się kości względem siebie i występują między innymi w sklepieniu czaszki czy połączeniu żeber z mostkiem. W przeciwieństwie do połączeń stałych, każdy nawet najmniejszy ruch, wymaga pracy przynajmniej jednego połączenia dwóch lub więcej kości. Ruchome połączenia między elementami szkieletu, czyli stawy umożliwiają poruszanie ciałem w różnych płaszczyznach: zginanie, prostowanie, odwodzenie, przywodzenie, rotacja, pozwalają na utrzymywanie stabilnej postawy ciała w całym zakresie ruchu, a także zapewniają amortyzację wstrząsów [1]. Stawy można podzielić z uwagi na liczbę kości wchodzących w skład stawu oraz liczbę osi względem których możliwy jest ruch. Według pierwszego podziału wyróżnić można stawy proste zbudowane z dwóch kości oraz stawy złożone, w których skład wchodzi minimum 3 kości. Podział pod kątem osi ruchu obejmuje stawy jednoosiowe umożliwiające ruch wyłącznie w jednej płaszczyźnie np. zawiasowe stawy międzypaliczkowe, stawy dwuosiowe pozwalające na ruch w dwóch płaszczyznach, takie jak: elipsoidalny staw promieniowo - nadgarstkowy czy siodełkowy staw nadgarstkowo-śródręczny kciuka oraz stawy wieloosiowe obejmujące np. stawy kuliste, nieregularne czy płaskie [2].

2.1.1. Budowa stawów

W zależności od miejsca, w którym stawy występują w organizmie, połączenia kostne różnią się między sobą ruchomością i budową. Podstawowy element każdego stawu stanowią powierzchnie stawowe – czyli zakończenia kości pokryte cienką warstwą chrząstki stawowej. Najczęściej jest to wklęsła część jednej z kości, czyli panewka i wypukła część drugiej – główka, choć można wyróżnić także płaskie powierzchnie stawowe (np. kość krzyżowa z miednicą). Typowymi elementami stawu są także torebka i jama stawowa. Torebka stawowa stanowi dwuwarstwową, elastyczną osłonę stawu, łączącą powierzchnie stawowe kości. Jej zewnętrzną warstwę stanowi błona zbudowana z włóknistej tkanki łącznej, składająca się w większości z włókien kolagenowych [3]. Wewnętrzną warstwę stanowi błona maziowa, zawierająca silnie unaczynione i unerwione kosmki maziowe, wydzielające ciecz synowialną (płyn stawowy, maź stawowa) do jamy stawowej, czyli szczelinowatej wolnej przestrzeni, znajdującej się między powierzchniami stawowymi wewnątrz torebki stawowej [4]. Poza podstawowymi elementami, strukturę stawu, w niektórych przypadkach mogą dopełniać dodatkowe elementy stabilizujące, takie jak: więzadła, krążki i obrąbki stawowe, łąkotki, kaletki maziowe czy trzeszczki [5]. Na rysunku 1 przedstawiono schemat budowy stawu człowieka.

Rys. 1. Schemat budowy stawu człowieka [opracowanie własne]



2.1.2. Struktury ochronne

Prawidłowe funkcjonowanie i zachowanie niezmięnionej chorobowo, naturalnej struktury stawu, odgrywa bardzo dużą rolę w sprawności każdego organizmu. W fizjologii stawów problemem jest znaczące tarcie, napięcia i obciążenia, którym poddaje się stawy podczas wykonywanych czynności [6]. Aby ochronić stawy przed następstwami destrukcyjnych czynników, organizm wykształcił szereg cech i mechanizmów, poprawiających amortyzację i poślizg między elementami stawu, tak by minimalizować zużywanie się elementów niepodlegających regeneracji [7], [8].

2.1.2.1. Tkanki chrzęstne

Tkanki chrzęstne są zaklasyfikowane do grupy tkanek łącznych oporowych, które cechują się znaczącą elastycznością i sprężystością, dzięki czemu, poza funkcją strukturalną, pełnią także funkcje ochronne i wbudowane są w ludzkim ciele w miejscach najbardziej narażonych na obciążenia i tarcie [9]. Pośród nich wyróżnić można tkankę chrzęstną sprężystą, szklaną i włóknistą. W ludzkich stawach można znaleźć, zarówno tkankę włóknistą, która może być składnikiem strukturalnym więzadeł stawowych, jak i tkankę szklaną, która wyściela powierzchnie stawowe. Najistotniejszą rolę w ochronie stawów odgrywa jednak tkanka chrzęstna szklana, która poprzez odpowiedni rozkład obciążenia na możliwie największej powierzchni i własnej budowie minimalizującej opory tarcia, zapewnia odpowiednią elastyczność i wytrzymałość całej strukturze [10]. Jej unikatowe cechy wynikają bezpośrednio z budowy, orientacji włókien i wysokiej gęstości substancji pozakomórkowej. W skład jej struktury wchodzi macierz chrzęstna tworzona przez liczne grupy komórek chondrocytów przeplatanych nieregularnie ułożonymi włóknami kolagenowymi (głównie typu II), proteoglikanów i kwasu hialuronowego oraz wody stanowiących razem macierz pozakomórkową [11]. Układ włókien kolagenowych w całym przekroju tkanki jest wielowarstwowy i przy powierzchni określany jest splotowatym, gdzie liczne włókna ułożone stycznie do powierzchni otaczają małe komórki chondrocytarne [12]. Kolejna warstwa zbudowana jest z ciasno utkanych wiązek włókien kolagenu, ułożonych

zwykle równoległe do powierzchni chrząstki, zazwyczaj występuje w niej duża ilość kwasu hialuronowego, natomiast uboga jest w glukozaminoglikany i chondrocyty. Następne dwie warstwy zawierają ułożone kolejno, skośnie i prostopadle do powierzchni, włókna kolagenowe. Najbliżej styku kości, nad podchrzęstną, znajduje się warstwa zmineralizowana chrząstki. Ułożenie włókien nie jest przypadkowe i wynika z sił, jakie działają na poszczególne warstwy chrząstki [13]. W wierzchniej warstwie dominują naprężenia styczne do powierzchni, związane z tarciem jakie pojawia się między powierzchniami stawowymi. Powodują one orientację włókien w kierunku równoległym do kierunku działania tych naprężeń, natomiast w głębszych warstwach działające naprężenia powodowane ściskaniem chrząstki, wymuszają ułożenie włókien zgodnie z kierunkiem działających sił. Płyn pozakomórkowy zawiera duże ilości wody (60 % wag. - 80 % wag. całej masy) bogatej w jony, która wiązana jest przez proteoglikany, takie jak: siarczan chondroityny, siarczan keratanu i agrekan [14]. Nadaje to chrząstce odpowiednią sztywność i sprężystość, ale jednocześnie znacznie utrudnia dyfuzję składników odżywczych. Spowodowane jest to tym, że większość wody w tkance chrzęstnej szklistej jest aktywnie związana [15], [16]. Chrząstka stawowa jest nieunerwiona i charakteryzuje się bardzo słabym ukrwieniem, dlatego w transporcie składników odżywczych dużą rolę odgrywa płyn stawowy, umożliwiający ich wymianę i dystrybucję na zasadzie dyfuzji.

2.1.2.2. Płyn synowialny (maź stawowa, płyn stawowy)

Podobnie, jak w przypadku tkanki chrzęstnej, skład i struktura płynu stawowego nie są przypadkowe i są ściśle skorelowane z zadaniami jakie spełnia w stawie. Główną rolą płynu synowialnego jest minimalizowanie tarcia występującego na styku powierzchni stawowych, umożliwienie płynnego poruszania stawami i ochrona powierzchni stawowych. Pełni on rolę swoistego lubrykantu. Z drugiej strony bierze również udział w odżywianiu tkanki chrzęstnej stawowej jako medium transportowe dla składników odżywczych. Jest on wysoko lepka, zwykle przejrzystą lub opalizującą, bezbarwną lub lekko żółtą cieczą, wydzielaną do jamy stawowej przez błonę maziową torebki stawowej. Powstaje jako dializat osocza krwi pozbawiony fibrynogenu i hemoglobiny. Jego bazę stanowi woda, natomiast pozostałą część stanowi kwas hialuronowy, białka (albuminy i globuliny), gliko- i lipo-proteiny, w tym szczególnie istotna lubrycyna (proteoglikan 4) i mucyny, fosfolipidy, glukoza, kwas moczowy oraz leukocyty, choć w zależności od stanu zdrowia i wieku skład ten może ulegać zmianom [17]. Zdania na temat tego, który ze składników, w największym stopniu, odpowiada za właściwości ślizgowe są podzielone. Początkowo jako kluczowy składnik wskazywano kwas hialuronowy [18], choć szczególnie w przypadku większych obciążeń stawu, ważniejsze wydawały się być gliko- i lipoproteiny zawieszane w całej masie płynu [19], [20], [21]. W związku z dużą liczbą badań potwierdzających wpływ wyżej wymienionych składników płynu stawowego na jego ochronne właściwości, obecnie uważa się, że jego właściwości nie wynikają z obecności jednego z tych składników, tylko z występowania ich w kombinacji, która wzmacnia jego działanie ślizgowe i ochronne [22], [23], [24]. Ta złożona kombinacja różnych grup składników zapewnia unikatowe właściwości reologiczne [2]:

- tiksotropowe, charakterystyczne dla cieczy nienewtonowskich, takie jak: zmniejszanie lepkości i struktury masy wraz ze wzrostem szybkości ścinania (w przypadku stawów ułatwia to smarowanie powierzchni podczas ruchu),
- właściwości sprężyste, co klasyfikuje płyn stawowy także jako ciecz lepkosprężystą (pomagające w ochronie przed siłami działającymi na tkanki chrzęstnej).

2.2. Choroby zwyrodnieniowe

Ludzki organizm podlega genetycznie kontrolowanym procesom biochemicznym. Wraz z wiekiem wystawiony jest na działanie szeregu czynników środowiskowych, w tym stylu życia, odżywiania, aktywności fizycznej, stresu, narażenia na substancje toksyczne oraz szkodliwych warunków, takich jak: promieniowanie czy obecność wirusów. Zmiany zachodzące w tym czasie to proces starzenia, czyli skutek kumulacji wewnątrzkomórkowych uszkodzeń i mutacji, których organizm nie jest w stanie naprawić. Zakłócenie równowagi wewnętrznej pomiędzy komórkami prawidłowymi i uszkodzonymi znacznie zwiększa ryzyko chorób zwyrodnieniowych obejmujących postępujące procesy patologiczne na poziomie komórkowym, skutkujące znaczącymi zmianami w strukturze tkanek [25]. W przypadku przekroczenia możliwości regeneracyjnych organizmu, funkcjonalność narządu zostaje zakłócona, co w niektórych przypadkach może znacząco obniżyć jakość życia i utrudnić funkcjonowanie. W związku z tym, że procesy patologiczne mogą zachodzić w każdej tkance, istnieje szeroka gama chorób zwyrodnieniowych, począwszy od chorób układu nerwowego (np. choroba Alzheimera, Parkinsona, choroba Huntingtona), poprzez układ krążenia (np. choroba niedokrwienna serca), tkanki kostnej (np. osteoporoza, zwyrodnienia stawów, reumatoidalne zapalenie stawów), choroby metaboliczne (np. cukrzyca typu 2) oraz nowotwory. Choroby układu mięśniowo-szkieletowego są drugą najczęstszą przyczyną niepełnosprawności osób starszych na świecie [26]. Wśród nich, najczęstszą jest choroba zwyrodnieniowa stawów (ChZS; osteoarthritis; OA), która dotyka około 237 milionów ludzi na całym świecie [27] i została przez FDA (ang. Food and Drug Administration; Administracja Jedzenia i Leków) uznana za chorobę ciężką z uwagi na stwarzanie problemów w aspektach: medycznym, społecznym, biologicznym, psychosocjalnym i ekonomicznym.

2.2.1. Etiopatogeneza choroby zwyrodnieniowej stawów

Choroba zwyrodnieniowa stawów (ChZS; osteoarthritis; OA) to zespół postępujących, trwałych i dopełniających się zaburzeń składu, struktury i właściwości tkanek w obrębie stawu, które pomimo różnych etiologii prowadzą do zaburzeń pomiędzy procesami degradacji i regeneracji chrząstki stawowej dając podobny obraz kliniczny. Ze względu na brak chrzęstnej, naczyń krwionośnych i nerwów, uszkodzona tkanka chrzęstna szklista w stawie ma bardzo ograniczone zdolności regeneracyjne [28]. Uszkodzenia obejmujące jedynie tkankę chrzęstną nie ulegają odbudowie [29], dopiero w przypadku uszkodzeń dotykających warstwę podchrzęstną pojawiają się możliwości naprawcze. W drugim przypadku obecność nieodróżnionych komórek mezenchymalnych pozwala na zróżnicowanie ich w kierunku osteoblastów formujących tkankę kostną lub fibroblastów

tworzących tkankę chrzęstną włóknistą lub szklistopodobną [30], których właściwości niestety nie dorównują pierwotnej strukturze, przez co osłabiają pracę całej tkanki. Zwykle do uszkodzeń dochodzi w skutek mechanicznych przeciążeń tkanki chrzęstnej, które pobudzają chondrocyty do produkcji cytokin i czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α aktywujących syntezę metaloproteinaz, tkankowego aktywatora plazminogenu, plazmin i innych proteaz biorących udział w niszczeniu tkanek) [31]. Efektem tego jest przesunięcie równowagi pomiędzy produkcją enzymów i ich inhibitorów, które regulują proces tworzenia chrząstki, na korzyść efektu destrukcyjnego, uniemożliwiającego skuteczną regenerację. W miarę zmniejszania się objętości chrząstki i pojawiania się w niej znaczących ubytków, uszkodzeniu mogą ulegać również kości znajdujące się pod chrząstką, co prowadzi do ich przebudowy, sklerotyzacji i powstawania wyrostki kostnych i osteofitów [32]. Całemu procesowi towarzyszy także stan zapalny błony maziowej, związany z naciekami limfocytami i monocytarnymi oraz fagocytozą uszkodzonych mechanicznie fragmentów chrząstki stawowej. Dochodzi wtedy do ogólnego zapalenia wszystkich otaczających struktur, czyli torebki stawowej, więzadeł, ścięgien i mięśni należących do zajętego stawu.

2.2.2. Objawy/obraz kliniczny ChZS

Do objawów klinicznych ChZS zalicza się przede wszystkim ból związany zwłaszcza z rozpoczęciem ruchu, ale także ograniczoną ruchomość stawu, sztywność po bezruchu, trzeszczenia, niestabilność, wysięki, obrzęk i zgrubienie oraz widoczne zmiany w zarysie stawu. Ból może być spowodowany uszkodzeniem różnych tkanek i może wiązać się z podrażnieniem zakończeń nerwowych okostnej, uszkodzeniem warstwy podchrzęstnej kości, długotrwałym napięciem mięśni lub niewłaściwym napięciem innych struktur stabilizujących staw oraz może również wynikać z obecności stanu zapalnego. W badaniu fizykalnym można zauważyć pojawienie się guzków i torbieli, a także zanik mięśni i siły mięśniowej. Z kolei w badaniu obrazowym widoczne jest zwężenie szpary stawowej, sklerotyzacja warstwy podchrzęstnej, zniekształcenia obrysu kości i podwichnięcia, mogą pojawić się także geody zwyrodnieniowe i osteofity [33]. W przypadkach pojawienia się stanu zapalnego można zaobserwować podwyższone wartości wskaźników zapalnych, a także zmiany zawartości leukocytów i obecność kryształów wapnia w płynie stawowym [34].

2.2.3. Dane epidemiologiczne

Wskazuje się, że na chorobę zwyrodnieniową stawów cierpi ok. 15 % populacji ludzi. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) definiuje czynnik ryzyka jako dowolną cechę lub narażenie jednostki, co zwiększa prawdopodobieństwo zachorowania [35]. Badania epidemiologiczne prowadzone na populacjach ludzi z całego świata pozwoliły zaobserwować różnice w zapadalności na OA i przyjrzeć się czynnikom zwiększającym ryzyko wystąpienia choroby zwyrodnieniowej stawów, takich jak: wiek, tryb życia, środowisko, płeć czy przebyte kontuzje, które mogą mieć powiązanie z występowaniem OA [36], [37], [38]. Najczęściej najbardziej uciążliwe dla ludzi są zwyrodnienia stawu

kolanowego, biodrowego i dłoni [39]. Badania epidemiologiczne przeprowadzone w Polsce przez Główny Urząd Statystyczny (GUS) w 2019 r. potwierdziły korelację postępu choroby wraz z wiekiem i wykazały jego wpływ jako czynnika zwiększającego ryzyko [40]. W tym przypadku, u 15,5 % osób w wieku powyżej osiemnastego roku życia, stwierdzono występowanie choroby, w przypadku osób w wieku 70-79 lat było to odpowiednio 44 %, a u osób w wieku powyżej 80 roku życia – 82 %. W tym samym badaniu wskazano również zależność częstości występowania OA uwarunkowanej płcią, gdzie niezależnie od wieku, dwukrotnie wyższą zachorowalność można było zaobserwować wśród kobiet. Inne, niezależne badanie, również wskazało płeć jako czynnik predysponujący, gdzie spośród 3906 osób powyżej 55 roku życia, na zwyrodnienia dłoni cierpiało 67 % kobiet i 55 % mężczyzn, natomiast wśród osób powyżej 80 roku życia obecność zwyrodnień stawu kolanowego zadeklarowało 53 % kobiet i 33 % mężczyzn [41]. Podobne wyniki uzyskano także w standaryzowanym, pod względem wieku i płci badaniu, gdzie kobiety miały znacznie wyższe współczynniki zachorowalności na OA niż mężczyźni, zwłaszcza po 50. roku życia a do wyrównania dochodziło dopiero wśród osób w wieku ok. 80 lat [39]. Jednak nie do wszystkich typów choroby zwyrodnieniowej bardziej predysponowane są kobiety, w przypadku zwyrodnień kręgosłupa szyjnego wyższy wskaźnik zachorowań uzyskano dla mężczyzn [42]. Zauważono także różnice rasowe i etniczne mające wpływ na wystąpienie OA, gdzie szczególnie narażone są osoby pochodzenia afroamerykańskiego [43], [44]. Duże znaczenie ma także obciążenie genetyczne, które posiada każdy człowiek. Szacuje się, że ok. 30 % - 65 % ryzyka wystąpienia choroby jest zdeterminowanych genetycznie [42], [45]. Co istotne, podczas badania skanowania ludzkiego genomu zidentyfikowano 21 niezależnych loci, odpowiadających za podatność na choroby zwyrodnieniowe [46]. Jako kluczowe podaje się także, takie czynniki jak: otyłość czy zaburzenia metaboliczne oraz niedobory mineralne i witaminowe, a także czynniki na poziomie stawowym, takie jak: kształt, masa i gęstość kości, siła mięśniowa, obciążenia oraz przebyte kontuzje i urazy [47].

2.2.4. Leczenie ChZS

Do chwili obecnej nie opracowano efektywnego leczenia choroby zwyrodnieniowej stawów. Powszechnie stosowane terapie obejmują działanie objawowe obejmujące zmniejszenie bólu, hamowanie progresu choroby i poprawę funkcjonowania stawów poprzez połączenie metod farmakologicznych, nefarmakologicznych i leczenia chirurgicznego. Do metod nefarmakologicznych zalicza się modyfikacje stylu życia, redukcję otyłości w przypadku jej współistnienia, korekcję wad postawy, terapie termiczne (leczenie ciepłem i zimnem), rehabilitację (kinezyterapia, fizjoterapia itp.), stosowanie odciążających środków ortopedycznych, takich jak: ortezy czy kule, które sumarycznie poprawiają funkcjonowanie i wspomagają procesy regeneracyjne stawu. W skrajnie zaawansowanych przypadkach choroby zwyrodnieniowej, niepozwalających na samodzielne funkcjonowanie i poruszanie się, zalecana jest endoprotezoplastyka. Leczenie objawowe obejmuje także leczenie farmakologiczne, oparte głównie na terapii przeciwbólowej będącej połączeniem różnych metod dających synergistyczny efekt z jednoczesnym minimalizowaniem wystąpienia działań niepożądanych. Regeneracja tkanek przy chorobie zwyrodnieniowej jest procesem długotrwałym a dobranie skutecznej

strategii leczenia do indywidualnych potrzeb pacjenta jest trudne i wymaga wielodyscyplinarnej diagnostyki, oceny predyspozycji do postępu choroby, stopnia jej zaawansowania i ryzyka wystąpienia działań niepożądanych, a także sumiennej współpracy z pacjentem.

2.2.4.1. Niesteroidowe leki przeciwzapalne

W leczeniu objawowym choroby zwyrodnieniowej stawów stosuje się ogólnie dostępne leki przeciwbólowe, takie jak: acetaminofen (paracetamol), a w przypadku silnego bólu i stanów zapalnych, leki z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) np. ibuprofen, diklofenak, naproksen i wiele innych [48]. Aktywność tych leków polega na hamowaniu aktywności enzymu z grupy cyklooksygenaz, co prowadzi do ograniczania wytwarzania prostaglandyn, odpowiedzialnych za odczuwanie bólu i tworzenie obrzęków [49]. Z uwagi na występowanie szeregu skutków ubocznych NLPZ, takich jak: podrażnienia żołądka, wrzody, uszkodzenia i niewydolność wątroby, zawał mięśnia sercowego czy miejscowe podrażnienia, zaleca się raczej ich krótkotrwałe stosowanie. W skrajnych przypadkach bólowych, gdy wymienione dotychczas metody nie pomagają, dopuszcza się zastosowanie tramadolu lub leków opioidowych zawierających takie substancje, jak: kodeina, oksykodon czy hydrokodon [48]. Działanie tych substancji polega na wyciszeniu reakcji mózgu poprzez hamowanie przekazywania bodźców bólowych do ośrodkowego układu nerwowego [50]. Podobnie, jak w przypadku niesteroidowych leków przeciwzapalnych, ich długotrwałe spożycie może skutkować występowaniem szeregu skutków ubocznych: wymiotów, nudności, senności, zaparc, drgawek i rozwojem większej tolerancji organizmu na lek. W ciężkich przypadkach choroby zwyrodnieniowej i fazach zaostrenia objawów towarzyszących, kiedy ból uniemożliwia funkcjonowanie, jego uśmierzanie może opierać się także na dostawowym podawaniu sterydów, tzw. blokad, które skutecznie zmniejszają dolegliwości nawet do kilku miesięcy [51], [52].

2.2.4.2. Wolno działające leki objawowe

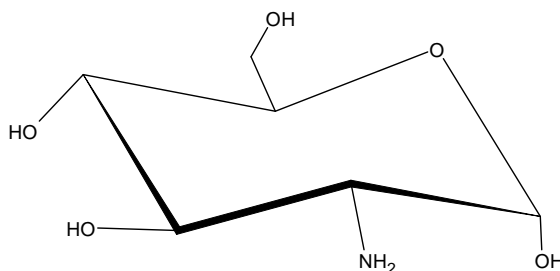
Alternatywną grupę substancji, o nieco niższej toksyczności, stanowią objawowe wolno działające leki (SYSADOA, ang. Symptomatic Slow-Acting Drugs for Osteoarthritis) [53]. Terminem tym określane są zarówno leki, jak i suplementy diety, których długoterminowe spożywanie łagodzi objawy zwyrodnień stawów. Wśród nich znajdują się zarówno substancje naturalne, jak i syntetyczne, które można podawać doustnie, dostawowo lub miejscowo. Początkowo skuteczność tych środków spotykała się ze sceptycyzmem, jednak dostępne wyniki wielu badań klinicznych zdecydowanie sugerują terapeutyczny efekt ich stosowania [54]. Korzyści jakie niesie terapia przy użyciu SYSADOA to pomoc przy odbudowie macierzy chrzęstnej w stawach, zmniejszenie dolegliwości bólowych, przez co jednocześnie dochodzi do zmniejszenia zapotrzebowania na NLPZ, zahamowany zostaje postęp choroby a nawet dochodzi do poprawy płynności funkcjonowania stawów. Pośród środków SYSADOA najczęściej wymienia się takie substancje, jak: siarczan chondroityny, siarczan glukozaminy i diacereinę, ale badania wskazują także na korzystne działanie kwasu hialuronowego, kolagenu, L-karnozyny, witaminy C i E, metylosulfonylometanu (MSM;

utleniona forma dimetylosulfotlenku (DMSO)) a także wielu roślinnych ekstraktów (np. ekstrakty z kadzidłowca, diabelskiego pazura, dzikiej róży, imbiru, piołunu, arniki, nagietka itp.) i wielu innych. Z uwagi na to, że jest to bardzo szeroka grupa substancji, różnego pochodzenia, ich mechanizmy działania mogą obejmować różne kierunki i działać synergicznie, dlatego często zalecane jest przyjmowanie kilku substancji jednocześnie, jak również łączy się je z terapią przeciwbólową NLPZ, dla uzyskania możliwie najlepszego efektu terapeutycznego [55].

2.2.4.2.1. Glukozamina

Jedną z potencjalnie bardzo pomocnych substancji w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów jest glukozamina (Rys. 2), która jest naturalnie występującym aminomonosacharydem i prekursorem w biochemicznej syntezie glikozyłowanych białek lub lipidów. Glukozamina jest substancją endogenną, typowym składnikiem łańcuchów polisacharydowych macierzy chrząstki i glukozaminoglikanów płynu stawowego [56]. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że glukozamina stymuluje syntezę fizjologicznych glikozaminoglikanów i proteoglikanów przez chondrocyty oraz kwasu hialuronowego przez synowioocyty. Mechanizm działania glukozaminy u człowieka wciąż nie jest do końca poznany, co uniemożliwia oszacowanie czasu potrzebnego na reakcję organizmu po podaniu preparatu. Glukozamina jest stosunkowo małą cząsteczką (masa cząsteczkowa 179,17 g/mol, chlorowodorek glukozaminy 215,63 g/mol, a siarczan glukozaminy – 456,42 g/mol), jest łatwo rozpuszczalna w wodzie i hydrofilowych rozpuszczalnikach organicznych.

Rys. 2. Wzór strukturalny glukozaminy [opracowanie własne ChemSketch]



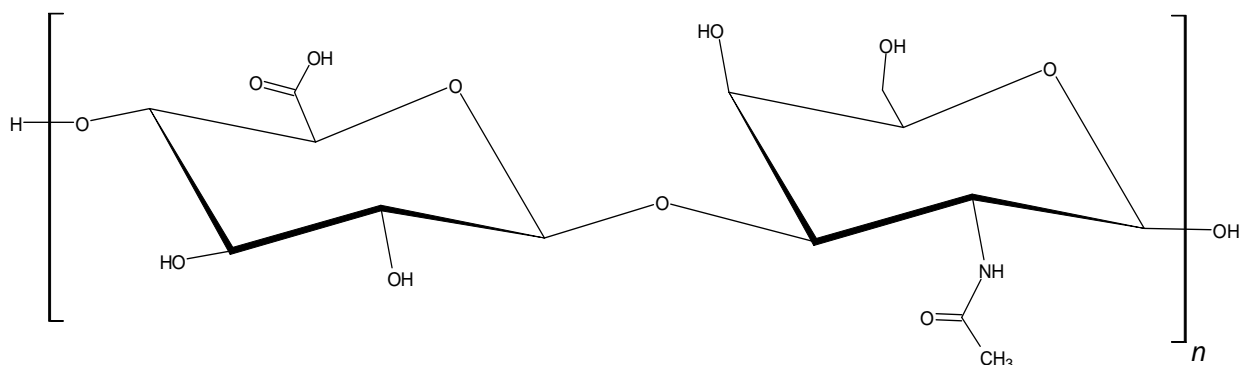
Dostępne są jedynie ograniczone informacje na temat farmakokinetyki glukozaminy, natomiast wskazano na wyższą biodostępność glukozaminy podawanej w formie siarczanu niż chlorowodoru. Najpowszechniej sprzedawaną formą glukozaminy, która wykazuje znaczące działanie terapeutyczne jest siarczan glukozaminy [57], [58], [59], który stymuluje syntezę proteoglikanów przez chondrocyty [60] i wykazuje działanie przeciwzapalne, co wielokrotnie udowodniono na różnych modelach zwierzęcych *in vivo* [61], [62]. Badania kliniczne wykazały jej działanie w odniesieniu do placebo w krótkotrwałym leczeniu bólu związanego z OA i ograniczeniem ruchu [57], [63], [64], a także wykazano, że długotrwałe (3-letnie) doustne leczenie siarczanem glukozaminy może opóźnić postęp choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego [58]. Nie wszyscy badacze byli entuzjastycznie nastawieni do stosowania glukozaminy w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów z uwagi na podejrzenia niskiego poziomu biodostępności [65]. Podczas badań klinicznych

prowadzonych przez Persiani odnotowano podwyższenie stężenia glukozaminy w osoczu i płynie stawowym po podaniu doustnym zarówno u osób zdrowych, jak i chorych na OA, jednak uzyskane stężenia u osób chorych były nadal poniżej poziomu wymaganego do regeneracyjnego działania na chrząstkę [66], [67]. Niższa biodostępność po doustnym podaniu glukozaminy wiąże się z metabolizmem leku w organizmie, w tym przypadku efektem pierwszego przejścia przez wątrobę [65], który odpowiada za degradację substancji. Całkowita biodostępność nie jest znana. Pomimo stosunkowo wysokiej wchłaniałości z przewodu pokarmowego ok. 90 %, bezwzględna biodostępność po podaniu pojedynczej, doustnej dawki znakowanej radioaktywnie wynosi około 25 % [68], [69]. Dużo wyższe biodostępności uzyskiwano przy podaniu dożylnym, domięśniowym czy nawet miejscowym [68], [69]. Glukozamina z uwagi na swoje właściwości fizykochemiczne i niską masę cząsteczkową, każdej z opisanych wcześniej form (glukozamina, siarczan glukozaminy i chlorowodrek glukozaminy), mieszczącą się w przedziale poniżej 500 g/mol, wykazuje zdolność do przenikania bariery skórnej, dzięki czemu poza podaniem doustnym czy dożylnym, może być podawana także miejscowo. Duże nadzieje przyniosły badania, które wykazały, że miejscowo można uzyskać znacznie wyższe stężenia glukozaminy niż przy podaniu doustnym [70] i może przenikać aż do płynu stawowego [71]. Powszechnie wiadomo, że podawanie przezskórne (miejscowe) dzięki pominięciu układu pokarmowego ma wiele zalet w porównaniu z podaniem doustnym. Poza możliwością uzyskania korzystniejszej biodostępności w przypadku niektórych substancji, zwłaszcza w przypadku celowanego podawania leku – miejscowe użycie pozwala uniknąć większości niepożądanych skutków ubocznych, takich jak: nudności, biegunka, wrzody i zapalenie żołądka, a także jest znacznie bezpieczniejsze w długotrwałym leczeniu [72]. W badaniach farmakologicznych nie odnotowano wpływu siarczanu glukozaminy na układ sercowo-naczyniowy, oddechowy, ośrodkowy i autonomiczny układ nerwowy. W badaniach klinicznych produkt był dobrze tolerowany, a działania niepożądane miały przeważnie charakter przemijający i łagodnie ciężki, gdzie efekty uboczne obejmowały głównie zaburzenia żołądkowo-jelitowe, takie jak: niestrawność, wzdęcia, bóle brzucha, zaparcia, biegunka i nudności. Podczas długotrwałego stosowania zgłaszano przypadki hipercholesterolemii, ale nie wykazano związku przyczynowego. Badania na zwierzętach *in vitro* i *in vivo* pokazują, że glukozamina może zmniejszać wydzielanie insuliny i zwiększa insulinooporność, prawdopodobnie poprzez hamowanie aktywności glukokinazy w komórkach beta [73]. Chociaż badania *in vitro* na gryzoniach wzbudziły obawy, że glukozamina może niekorzystnie wpływać na metabolizm glukozy, dokładne badania na ludziach nie wskazują na niekorzystny wpływ na homeostazę glukozy [74]. W badaniach klinicznych wykazano bezpieczeństwo stosowania oraz nie zgłoszono żadnego niepożądanego wpływu glukozaminy na skład chemiczny krwi, parametry hematologiczne, analizę moczu, krew utajoną w kale ani parametry sercowo-naczyniowe, a co ciekawe, objawy lub działania niepożądane zgłaszano znacznie rzadziej – o 24 % mniej w przypadku glukozaminy niż w przypadku placebo [75].

2.2.4.2.2. Chondroityna

Chondroityna (Rys. 3) jest nierozgałęzionym polisacharydem o zmiennej długości, należącym do grupy glikozaminoglikanów, który składa się z dwóch, różnie siarczanowanych, występujących naprzemiennie disacharydów: kwasu D-glukuronowego i reszty N-acetylo-D-galaktozaminy, połączonych wiązaniem β -1,3-glikozydowym [76].

Rys. 3. Wzór strukturalny chondroityny [opracowanie własne ChemSketch]



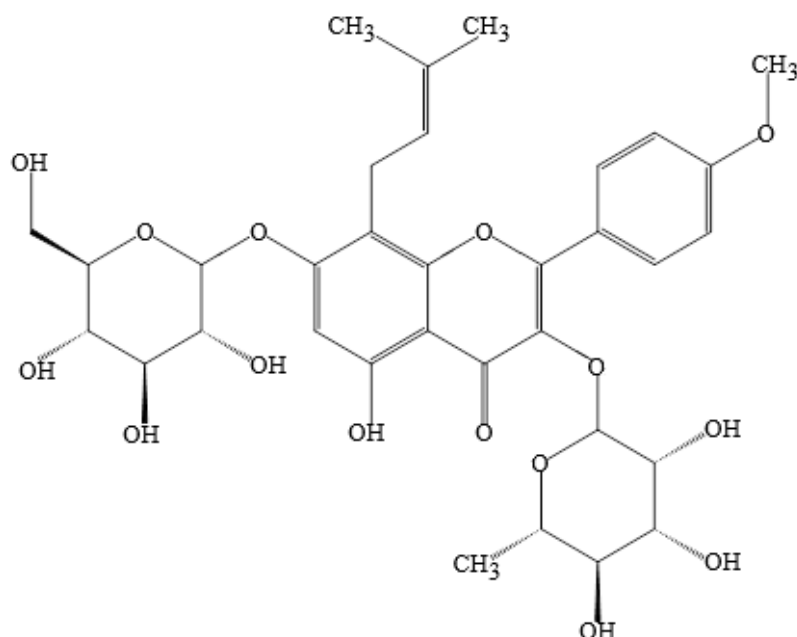
Jest jednym z głównych składników chrząstki, ponieważ wchodzi w skład najważniejszych białek tworzących tkankę chrząstną w stawie, od których zależą właściwości mechaniczne i elastyczne chrząstki [77]. Efekt terapeutyczny siarczanu chondroityny u pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów obejmuje cały szereg korzystnych aktywności. Wykazano właściwości przeciwzapalne na poziomie komórkowym, zdolność stymulacji endogennej syntezy proteoglikanów, kwasu hialuronowego i kolagenu typu II [78], wpływ na zmniejszenie aktywności katabolicznej chondrocytów poprzez hamowanie niektórych enzymów proteolitycznych (np. kolagenazy, elastazy, proteoglikanazy, fosfatazy A2, N-acetyloglikozaminidazy) [79], a także zmniejszenie nacieków komórek prozapalnych i stresu oksydacyjnego oraz hamowanie tworzenia innych substancji np. czynnik martwicy nowotworu uszkodzających chrząstkę [80], [81]. Siarczan chondroityny jest pozyskiwany najczęściej w postaci odzwierzęcej z chrząstki wołowej, wieprzowej, drobiowej a także ryb chrzęstnoszkieletowych. Jakość gotowego produktu w dużej mierze zależy od materiału wyjściowego, procesu obróbki i obecności zanieczyszczeń, dlatego dostępne na rynku produkty będą różniły się masą molekularną oraz biodostępnością. Badania Ronca i współpracowników wykazały niską biodostępność chondroityny na poziomie 15 % - 24 %, jednak zaobserwowano przy tym dotarcie znakowanego siarczanu chondroityny do płynu stawowego i tkanek chrzęstnych, co jednoznacznie sugeruje korzystny wpływ spożywania siarczanu chondroityny na regenerację stawów [82]. Podobnie, jak w przypadku glukozaminy wskazuje to na metabolizm substancji z efektem pierwszego przejścia w wątrobie. Badania kliniczne u pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów wykazały, że leczenie siarczanem chondroityny łagodzi objawy choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego lub biodrowego, takie, jak: ból i ograniczenia ruchu, a jego działanie jest zbliżone lub przewyższające działanie celekoksybu [83], [84]. Niektóre z prowadzonych badań nad skutecznością siarczanu chondroityny w leczeniu OA sugerują brak jego skuteczności. Diametralne

różnice w wynikach badań klinicznych mogą być związane z różną jakością stosowanej substancji, a deklarowane przez producentów zawartości substancji aktywnej znajdujące się na opakowaniach często odbiegają od rzeczywistej zawartości w produkcie. W jednym z badań wykryto szereg nieprawidłowości, gdzie na 25 przebadanych preparatów siarczanu chondroityny dostępnych komercyjnie aż w 19 z nich, zawartość siarczanu chondroityny była niższa od zadeklarowanej [85]. Inne badanie wskazało na zawartość w produkcie od 10 % do 110 % zawartości podanej na etykiecie [86]. Zwracając uwagę na powyższe analizy, można wnioskować, że tak diametralne różnice w wynikach badań klinicznych i wykazany brak różnic pomiędzy siarczanem chondroityny a placebo mogą mieć bezpośredni związek z jakością i biodostępnością podawanego produktu. Jednakże przegląd dostępnej literatury u pacjentów przyjmujących długoterminowo preparat siarczanu chondroityny i doniesień o działaniach niepożądanych, takich, jak: zaburzenia układu pokarmowego, reakcje skórne, obrzęk i zatrzymanie płynów wskazują na pewne ograniczenia w stosowaniu doustnego siarczanu chondroityny. Niestety duża wielkość cząsteczki siarczanu chondroityny, która w zależności od źródła pochodzenia może się znacząco różnić długością łańcuchów i ilością reszt siarczanowych (przekrój wartości 14 000 g/mol - 70 000 g/mol) [76], uniemożliwia miejscowe zastosowanie z powodu niemożliwości pokonania bariery skórnej przez tak duże cząsteczki.

2.2.4.2.3. Ekstrakt z ziela *Epimedium Koreanum* i zawarta w nim ikaryna

Pośród ogromnej ilości ekstraktów roślinnych stosowanych podczas leczenia wszelkich dysfunkcji kości i stawów na szczególną uwagę zasługuje ikaryna zawarta w ekstrakcie z rośliny *Epimedium Koreanum*. Do rodzaju *Epimedium L.* zalicza się szereg bylin z rodziny berberysowatych występujących powszechnie na terenie Azji, stanowi jedno z najczęściej stosowanych ziół używanych w tradycyjnej medycynie chińskiej do odnowy złamań kości oraz wzmacniania i regeneracji tkanek kostnych w osteoporozie [87]. Zdecydowaną większość składu ziela *Epimedium Koreanum* stanowią flawonoidy, w tym flawonoidy glikozydowe, ale można w nim także znaleźć fenylopropanoidy, alkaloidy, polisacharydy, ligniny i seskwiterpeny [88], przy czym za najistotniejsze składniki aktywne uważane są epimedyny A, B, C, ikaryzyd II i ikaryna (Rys. 4), które stanowią ponad 50 % całkowitej zawartości flawonoidów [89].

Rys. 4. Wzór strukturalny ikaryny [opracowanie własne ChemSketch]



Badania farmakologiczne wykazały, że ziele *Epimedium Koreanum* ma szereg prozdrowotnych właściwości, w tym przeciwzapalnych, przeciwutleniających i hamujących rozwój nowotworów [90], a badania kliniczne sugerują korzystny wpływ w leczeniu depresji, chorób układu krążenia, cukrzycy, impotencji, osteoporozy, reumatoidalnego zapalenia stawów i choroby zwyrodnieniowej stawów [90], [91], [92], [93], [94], [95]. W leczeniu chorób układu mięśniowo-szkieletowego wskazuje się, że to właśnie ikaryna ma największy wpływ na regenerację kości spośród innych składników i może brać udział w regulacji wielu szlaków sygnałowych i procesów biochemicznych [92]. Ikaryna należy do flawonoidów glikozydowych o działaniu fitoestrogenowym i jest 8-prenyłową pochodną 3,7- O - diglukozydu kemferolu o masie 676,7 g/mol. Badania *in vitro* wykazały, że ikaryna ma potencjał w inżynierii tkanek kostnych poprzez inicjowanie bezpośredniego i stabilnego różnicowania chondrocytów w kierunku macierzy pozakomórkowej oraz ogranicza ich apoptozę, co sugeruje, że może być skutecznym stymulatorem czynników wzrostu dla chrząstki [96], [97]. Silny efekt chondrogeny może być spowodowany zwiększeniem poziomu ekspresji genów glikozaminoglikanów, agrekanu, kolagenu II i SOX9 oraz zmniejszeniem poziomu ekspresji genu kolagenu typu I [98]. Wskazuje się, że ochrona przed degradacją chrząstki i kości jest powiązana ze zdolnością ikaryny do hamowania aktywności proteazy katepsyny K [99]. Stwierdza się także, że ikaryna może mieć wpływ na regulację ekspresji aktywatora receptora czynnika B RANKL i ekspresji osteoprotegryny OPG [100], [101], a także może wpływać na regulację produkcji cytokin prozapalnych IL-1, IL-6, IL-8 i MCP-1 indukowanych przez TNF- α i IFN- γ [102]. Pomimo wielu obiecujących badań *in vitro* i zakwalifikowaniu substancji jako bezpiecznej i nietoksycznej [103], dane z badań klinicznych ikaryny u ludzi są bardzo ograniczone. Należy pamiętać, że ikaryna ma działanie fitoestrogenowe, zatem szczególnie przy podaniu doustnym istnieje potencjalne ryzyko efektów ubocznych spowodowanych zakłóceniem działania układu hormonalnego i powiązanych z nim szlaków, ale fakt ten podkreśla również wyższość stosowania

miejscowego. Niestety nie ma zbyt wielu badań klinicznych sugerujących, że ikaryna może być pomocna w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów, zwłaszcza poprzez podawanie miejscowe, dlatego obszar ten wymaga dalszych badań.

2.2.4.3. Terapia zimnem i ciepłem - geneza bólu

Odbieranie informacji ze środowiska, zarówno zewnętrznego, jak i wewnętrznego organizmu, możliwe jest dzięki obecnym w ludzkim ciele wyspecjalizowanym komórkom – receptorom, zdolnym do przekształcania bodźców w impulsy nerwowe przekazywane przez ośrodkowy układ nerwowy do docelowych ośrodków, co umożliwi organizmowi reagowanie i przystosowanie się. Ból jest kluczowym objawem choroby zwyrodnieniowej stawów, o największej uciążliwości dla chorujących, dlatego jego minimalizowanie pozwala na zachowanie lepszej mobilności i sprawności fizycznej. Uszkodzenia tkanek do jakich dochodzi podczas postępu choroby zwyrodnieniowej prowadzą do uwolnienia obwodowych mediatorów inicjujących reakcję zapalną oraz aktywujących receptory bólowe – nocyceptory [104]. Nocyceptory to wyspecjalizowane, wolne zakończenia nerwowe, transmitujące sygnały nerwowe do mózgu, gdzie dochodzi do rozpoznania uszkodzeń jako odczucie bólu. W odpowiedzi na ból, neuroprzekaźniki generują wydzielanie cytokin prozapalnych i odruchy rdzeniowe, prowadzące do wzrostu aktywności motorycznej i napięcia mięśni w postaci skurczu w miejscu urazu [105]. Długotrwałe skurcze mogą skutkować pogłębieniem pierwotnych uszkodzeń w skutek zmniejszonego przepływu krwi i niedotlenienia tkanek. Nocyceptory mogą być pobudzane w skutek działania mechanicznych uszkodzeń oraz czynników termicznych, chemicznych i elektrycznych, które nie muszą powodować rzeczywistych uszkodzeń, a jedynie mogą drażnić zakończenia nerwowe receptorów [106]. Ta właściwość wykorzystywana jest do łagodzenia bólu poprzez blokowanie nocycepcji w skutek zmienionej interpretacji sygnałów wywoływanych kilkoma jednoczesnymi bodźcami np. bólowym związanym z rzeczywistym uszkodzeniem mechanicznym oraz maskującym bodźcem temperaturowym prowadzącym do desensytyzacji nocyceptorów. Odwrażliwienie receptorów związane jest ze zmianą przepuszczalności jonowej komórek prowadząc do zablokowania przekazywania synaptycznego, a w efekcie ograniczenia odczuwania bólu. W ludzkim ciele obecnych jest wiele receptorów z grupy receptorów potencjału przejściowego (TRP, ang. Transient Receptor Potential) biorących udział w przenoszeniu i modulowaniu bólu oraz odczuwaniu temperatur, których kilka przykładów, przytoczono poniżej:

- TRPV1 – receptor waniloidowy przejściowego potencjału 1, który jest nieselektywnym kanałem jonowym, jednak faworyzującym jony Ca^{2+} , wrażliwym na szeroki zakres bodźców, jak przyłączone ligandy (allicyna, kapsaicyna, piperyna, kamfora i wiele innych), temperaturę powyżej 43 °C czy pH [107], [108]. Jego aktywacja prowadzi do otwarcia kanału jonowego i napływu jonów wapnia, czego następstwem jest uwolnienie do przestrzeni międzysynaptycznej neuropeptydów prozapalnych. W efekcie wytwarzany jest impuls bólowy lub informacja o ciepłe powodującym podrażnienie, rozszerzenie naczyń krwionośnych, a tym samym miejscowe przekrwienie i zwiększenie cyrkulacji krwi [109]. Mechanizm desensytyzacji związany jest ze zmianą konformacji TRPV1, prowadzącą do

CZEŚĆ LITERATUROWA

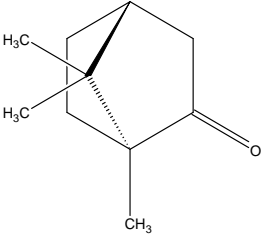
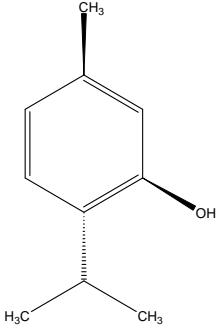
zamknięcia kanału jonowego, w skutek wcześniejszego napływu jonów wapnia i utworzenia kompleksu z kalmoduliną i kalcyneuryną przyczyniając się do uaktywnienia kalcyneuryny, zaangażowanej w defosforylację kanału jonowego [110], [111]. Czasowe zamknięcie kanału jonowego blokuje jego funkcjonowanie i uniemożliwia dalsze przesyłanie sygnałów bólowych. Wskazuje się także na skuteczność antagonistów TRPV1 w zmniejszaniu nocycypcji w modelach bólu zapalnego i neuropatycznego u szczurów [112], jak również w przypadku ludzi wykazano możliwość stosowania związków reagujących z TRPV1 w leczeniu bólu neuropatycznego czy bólu zależnego od stanu zapalnego, na przykład w chorobie zwyrodnieniowej [113],

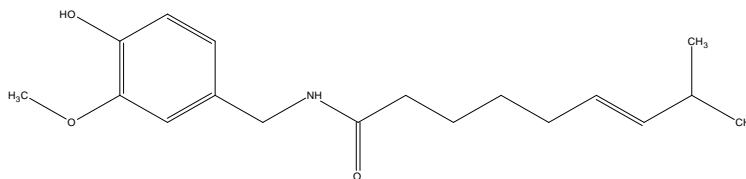
- TRPV2,3 i 4 - receptory waniloidowe przejściowego potencjału 2, 3 i 4, podobnie jak poprzedni, należą do tej samej podrodziny. Są nieselektywnymi kanałami jonowymi aktywowanymi podwyższoną temperaturą, w tym przypadku powyżej 52 °C dla TRPV2, 34 °C – 38 °C dla TRPV3 oraz 27 °C – 35 °C w przypadku TRPV4 [114]. Mogą być także aktywowane specyficznymi ligandami, mechanicznym stresem [115]. TRPV2 oraz TRPV4 nazywane jest także osmoreceptorami wrażliwymi na zmiany ciśnienia osmotycznego,
- TRPM8 – receptor melastatyny przejściowego potencjału 8, znany również jako receptor zimna i mentolu 1, który jest głównym receptorem rozpoznającym zimno i odgrywającym rolę w utrzymywaniu temperatury. Podobnie, jak poprzednio opisane receptory, z rodziny TRP, jest kationowym nieselektywnym kanałem jonowym o największej przepuszczalności dla jonów Ca^{2+} , jednak w odróżnieniu od poprzedników podlega aktywacji przy obniżeniu temperatury poniżej 26 °C, po kontakcie ze związkami specyficznymi dla TRPM8, takimi jak: substancje chłodzące (mentol czy icylina), niektóre związki lipidowe, a także po rozpoznaniu zmian napięcia, ciśnienia czy osmolarności [116],
- TRPA1 - receptor przejściowego potencjału z podrodziny ankyrin 1, występujący większościowo w nocycyptywnych włóknach nerwowych. Przypisuje mu się funkcję wzmocnienia sygnalizacji bólowej oraz nadwrażliwości na ból wywołany zimnem. Do aktywacji dochodzi poprzez sygnały endogenne związane z uszkodzeniami i stanami zapalnymi, niską temperaturą oraz wrażliwością na specyficzne substancje (np. z grupy izotiosyanianów, kannabinoidów). W praktyce wykorzystuje się zdolność inhibicji TRPA1 przez wiele związków będących antagonistami TRPA1 (np. leki przeciwbólowe, w tym acetaminofen), prowadząc do zablokowania sygnalizacji tego receptora, a tym samym zmniejszonego odczuwania bólu [117].

Istnieje wiele substancji, zarówno pochodzenia roślinnego, jak i syntetycznego, jak: mentol, kamfora, eter butylowy kwasu waniliowego (VBE, ang. Vanillyl Butyl Ether) czy kapsaicyna, które są zdolne do wiązania z termoreceptorami, jednak mogą wykazywać różne mechanizmy działania (antagonizm/agonizm). Z kolei wolne zakończenia nerwowe termoreceptorów cechują się swoistą specyficznością wrażliwości na określone substancje chemiczne, co decyduje o ich wybiórczym działaniu [118]. W tabeli 1 przedstawiono właściwości wybranych substancji, wykazujących zdolność do wiązania z termoreceptorami.

CZĘŚĆ LITERATUROWA

Tab. 1. Właściwości wybranych substancji, wykazujących zdolności do wiązania z termoreceptorami

Nazwa	Masa cząsteczkowa [g/mol]	Wzór strukturalny	Działanie
			
Kamfora	152,23	<p>Należy do grupy terpenów, jest substancją o charakterystycznym, orzeźwiająco-drzewnym zapachu, sublimującą w temperaturze pokojowej, doskonale przenikającą przez skórę. W zależności od bazy produktu może wywoływać uczucie zimna lub rozgrzewanie. Pozyskiwana może być naturalnie z drzewa cynamonowca kamforowego, poprzez biosyntezę z pirofosforanu geraniolu albo syntetycznie z α - pinenu. Mechanizm jej działania może obejmować aktywację receptorów TRPV1, TRPV3 i TRPM8 oraz antagonizm receptora TRPA1 [119].</p>	
			
Mentol	156,27	<p>Należy do grupy alkoholi terpenowych, izolowany z olejków pochodzących z różnych gatunków mięty, choć występuje także w składzie olejków innych roślin. Obecnie pozyskuje się go z naturalnych olejków eterycznych lub otrzymuje się go w wyniku chemicznej syntezy. Od wieków stosowany jest jako miejscowy lek przeciwbólowy z uwagi na właściwości znieczulające i zmniejszające podrażnienie błon śluzowych. Jest charakterystycznym agonistą receptora TRPM8 [120]. W stężeniach poniżej 1 % osłabia nocycepcję skóry oraz może znieczulać receptory, w wysokich stężeniach mentol działa drażniąco [121], [122].</p>	

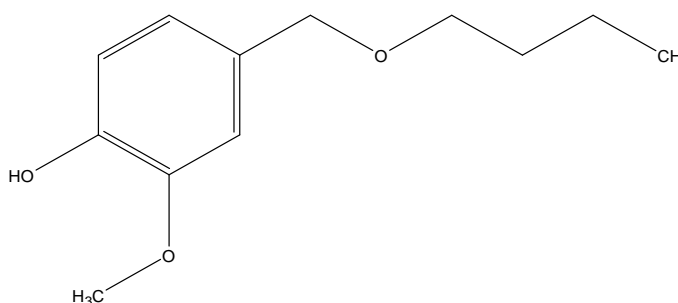


Kapsaicyna 305,41

Kapsaicyna jest organicznym związkiem chemicznym przypisywanym do grupy alkaloidów, o ostrym, piekącym smaku, pozyskiwaną z roślin z grupy *Capsicum*. Mechanizm jej działania związany jest z oddziaływaniem na receptor waniloidowy TRPV1, prowadzącym do wywołania uczucia ciepła, pieczenia, klucia lub swędzenia [123]. Działanie kapsaicyny jest odwracalne, jednak długotrwała, wielokrotna ekspozycja na kapsaicynę przyczynia się do skuteczności przeciwbólowej, na zasadzie czasowej defunkcjonalizacji receptora [124]. Silne właściwości drażniące oraz potencjał kancerogeny spowodowały poszukiwanie zamienników substancji o łagodniejszym działaniu.

**Eter
butylowy
kwasu
waniliowego**

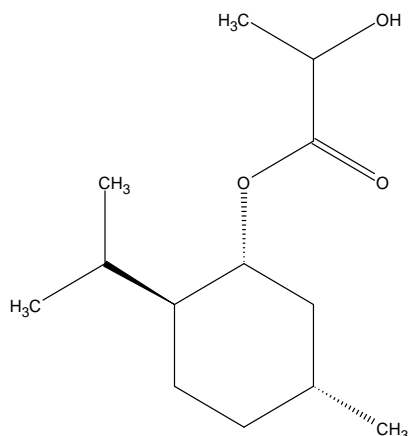
210,27



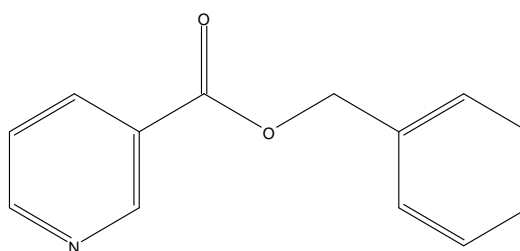
Wykazuje działanie drażniące zakończenia nerwowe, rozgrzewające, jest substancją o charakterystycznym waniliowo ostrym smaku, popularnie wykorzystywaną w formułacjach kosmetycznych oraz w przemyśle spożywczym. Z uwagi na podobieństwo ugrupowania waniloidowego i szkieletu związku do kapsaicyny, obie substancje wykazują podobny mechanizm działania, obejmujący wiązanie z receptorem TRPV1, jednak wskazuje się na mniej drażniące działanie eteru butylowego kwasu waniliowego [125].

**Mleczan
mentylu**

104,11



Pochodna mentolu, wykorzystywana jako jego łagodniejszy zamiennik. Z uwagi na podobieństwo ugrupowań do mentolu, wykazuje ten sam mechanizm działania jako agonista TRPM8 [126]. Wskazuje się na jego delikatniejsze działanie dla skóry i błon śluzowych oraz właściwości odświeżające, chłodzące i znieczulające. Z uwagi na wysoką cenę jest jednak często zastępowany tańszymi składnikami o zbliżonym działaniu.

**Nikotynian
benzylu**

213,24

Nikotynian benzylu to substancja czynna, wywołująca zaczerwienienie, rozgrzewanie, stymulująca krążenie krwi, stosowana do miejscowego leczenia bólu mięśni, stawów i więzadeł [127]. Wskazuje się także na działanie na zasadzie proleku, który po przeniknięciu przez skórę, w wyniku hydrolizy enzymatycznej, uwalnia niacynę (witaminę B3) [128]. Podobnie, jak mleczan mentylu, z uwagi na stosunkowo wysoką cenę nie jest tak popularny, jak pozostałe substancje rozgrzewające stosowane w produktach kosmetycznych.

Substancje zawarte w ekstraktach roślinnych, olejkach eterycznych i inne związki pochodzenia syntetycznego mogą pobudzać także receptory czucia głębokiego tzw. proprioceptory występujące w mięśniach szkieletowych, ścięgnach i stawach. Aktywność proprioceptorów opiera się na wykrywaniu ruchu i zmian ciśnienia w tkankach, przy czym ich aktywacja reguluje napięcie mięśniowe, działa rozluźniająco i wzmacnia

przepływ krwi, co jest podobnie, jak w przypadku termoreceptorów, wykorzystywane do łagodzenia dolegliwości bólowych i wpływania na stopień rozluźnienia mięśni [129].

2.3. Rynek kosmetyczny w odniesieniu do problemów kostno - stawowych

Jako kosmetyki kwalifikowane są wszystkie produkty do użytku zewnętrznego o zastosowaniu pielęgnacyjnym, obejmującym oczyszczanie, poprawę wyglądu, perfumowanie, ochronę i poprawę kondycji skóry [130]. Dermokosmetykami, z kolei, potocznie nazywa się produkty kosmetyczne dedykowane konkretnym schorzeniom, których miejscowa aplikacja powinna wpływać na poprawę stanu wyjściowego czy przyniesienie ulgi. Należy pamiętać jednak, że dermokosmetyki nie są lekami i w świetle prawa nie mogą zawierać substancji leczniczych, choć wykorzystuje się w nich biologicznie aktywne substancje, które mogą wykazywać działanie zbliżone do leków. Rosnące zainteresowanie efektywnymi dermokosmetykami ujawnia nisze rynkowe i generuje potrzebę tworzenia nowych produktów oraz wskazuje kierunki rynkowych trendów. Falowo dochodzi do wprowadzania na rynek gotowych wyrobów z konkretną substancją aktywną, cieszącą się w danym momencie dużym zainteresowaniem, do czasu wysycenia rynku i pojawienia następnej, nowej, marketingowo korzystnej substancji, która wypiera poprzedników. Takie działanie rynku zmusza producentów do stałego poszukiwania nowych, innowacyjnych surowców i modyfikowania obecnych w kierunku ulepszenia ich właściwości, aplikacji czy łatwości przetwarzania, co warunkuje ich późniejszy popyt i poziom sprzedaży. W ostatnich latach branża kosmetyczna kładzie duży nacisk na stopień naturalności produktu i osiąganie jak najwyższych wartości pochodzenia naturalnego, surowców wykorzystywanych do produkcji, dlatego to właśnie w tej grupie surowców poszukuje się nowych możliwości zastosowań oraz odpowiedników syntetycznych związków. W przypadku zwyrodnień i urazów branża kosmetyczna oferuje szereg maści, żeli i kremów zarówno rozgrzewających, jak i chłodzących, przy czym w największej ilości apteki i drogerie oferują maści końskie, tygrysie i niedźwiedzie, będące mieszaninami różnych ekstraktów roślinnych i olejków eterycznych. Ich działanie opisywane jest jako łagodzenie uczucia bólu i dyskomfortu, przynoszenie ulgi w stanach napięcia mięśniowego, wspomaganie regeneracji, miejscową poprawę krążenia oraz zmniejszenie opuchnięć wpływając tym samym na większą ruchomość stawów. Takie właściwości produktów przeznaczonych do stosowania miejscowego, mieszczących się w kategorii kosmetyków, do tej pory uzyskiwane były przy pomocy substancji wpływających na odczuwanie bólu poprzez manipulacje odczuć termicznych [131], takich jak: mentol, kamfora, eter butylowy kwasu waniliowego, mleczan mentylu czy olejków eterycznych np. cynamonowego, jałowcowego, imbirowego, miętoowego, eukaliptusowego oraz poprzez działanie roślinnych ekstraktów i syntetycznych związków wykazujących pozytywny wpływ na funkcjonowanie stawów. W przypadku roślinnych ekstraktów w produktach kosmetycznych dedykowanych zwyrodnieniom wskazuje się na korzystne działanie miejscowo stosowanych żeli i preparatów zawierających ekstrakty roślinne np. ekstrakt z żywokostu, czarciego pazura, wiązówki błotnej, arniki, imbiru i wielu innych [132], [133], [134], [135]. Ich aktywność

może obejmować szereg szlaków i jest zależna od składu jakościowego i ilościowego ekstraktów [132].

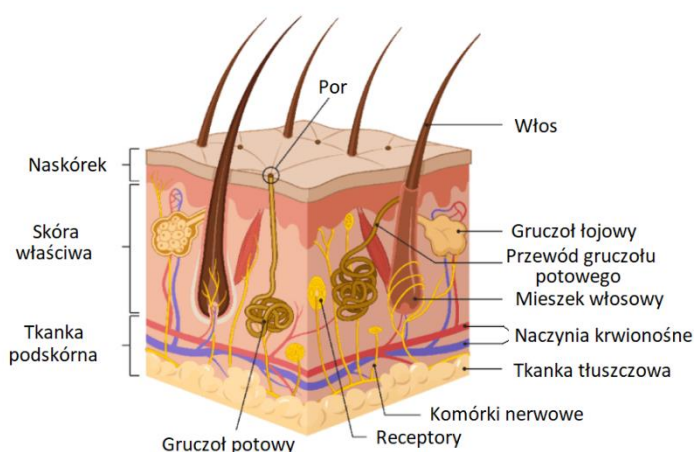
2.4. Budowa i podstawowe funkcje skóry

Skóra jest narządem pokrywającym całe ciało człowieka, który z uwagi na znaczne wyspecjalizowanie w kierunku pełnionych funkcji posiada wysoce złożoną budowę. Przede wszystkim pełni ona rolę ochronną, gdzie stanowi fizyczną i mechaniczną barierę izolującą narządy wewnętrzne od środowiska zewnętrznego w tym szkodliwych i chorobotwórczych czynników i drobnoustrojów, pozwalając na zachowanie homeostazy organizmu [136]. Jej wielowarstwowa struktura oraz obecność dodatkowych elementów, takich jak: gruczoły łojowe i potowe, receptory, nerwy, naczynia krwionośne i limfatyczne, umożliwia jej udział w gospodarce wodno-elektrolitowej, tłuszczowej i witaminowej, wymianie gazowej, termoregulacji, percepcji bodźców ze środowiska zewnętrznego, melanogenezie oraz co najistotniejsze dla tej pracy umożliwia transport i wchłanianie niektórych substancji przez skórę. Skóra człowieka ma budowę niejednorodną i w zależności od miejsca występowania i pełnionej funkcji może różnić się budową i grubością [137].

2.4.1. Budowa skóry

Podstawowy podział warstw skóry (Rys. 5) obejmuje naskórek pokryty hydrolipidowym filmem, warstwę skóry właściwej oraz tkankę podskórną. Każda z tych warstw charakteryzuje się specyficzną budową umożliwiającą pełnienie określonych funkcji.

Rys. 5. Schemat budowy skóry [139]



2.4.1.1. Naskórek

Naskórek stanowi najbardziej zewnętrzną warstwę skóry. Zbudowany jest z rogowaciejącego nabłonka składającego się głównie z przyległe ułożonych, płaskich, bezjądrzastych komórek - keratynocytów w górnych warstwach, natomiast w głębszych -

sześciennych lub walcowatych [138]. Poza keratynocytami, w naskórku znajdują się także komórki Merkla (receptory dotyku) pozwalające na odbiór bodźców czuciowych, melanocyty, czyli komórki pigmentowe oraz komórki dendrytyczne. Naskórek również charakteryzuje się budową warstwową. Wyróżnić w nim można pięć warstw, zaczynając od najbardziej zewnętrznej - rogowej, następnie jasnej, ziarnistej, kolczystej i podstawnej poprzerinkanych przez mieszki włosowe czy pory gruczołów. Warstwa rogowa naskórka podlega stałemu rogowaceniu dzięki czemu nieprzerwanie ulega odnawianiu [138]. Właściwości ochronne oraz umożliwienie transportu zapewnia także cement międzykomórkowy, który stanowi lipidowe spoiwo wypełniające i uszczelniające przestrzenie między komórkami, stanowiąc jednocześnie barierę dla wody. Skład cementu międzykomórkowego w warstwie rogowej, w porównaniu do głębiej położonych warstw, charakteryzuje się niższą ilością fosfolipidów, na korzyść zwiększenia ilości ceramidów, kwasów tłuszczowych oraz cholesterolu i jego estrów [139].

2.4.1.2. Warstwa hydrolipidowa

Warstwę naskórkową dodatkowo pokrywa film hydrolipidowy, który stanowi barierę ochronną i odpowiada za pierwszy kontakt ze środowiskiem zewnętrznym, chociaż jednocześnie nie stanowi absolutnej bariery dla przenikania wody czy substancji egzogennych [140]. Okrywa hydrolipidowa składa się z wody, sebum, potu i lipidów zawierających głównie skwalan, estry wosku bazujące głównie na prostolącuchowych, nasyconych lub jednonienasyconych kwasach tłuszczowych i alkoholach tłuszczowych o długości od 24 do 42 węgli, triacyloglicerole (triglicerydy), cholesterol i wolne kwasy tłuszczowe, których zawartość i proporcje są ściśle skorelowane z pełnioną funkcją, a każde ich zaburzenie może prowadzić do dysfunkcji [141], [142]. Skład powłoki hydrolipidowej jest cechą osobniczą i może się różnić w zależności od rasy i pochodzenia etnicznego a także wielokrotnie zmienia się w ciągu życia wraz ze złuszczeniem naskórka w zależności od trybu życia, diety i wielu innych czynników.

2.4.1.3. Skóra właściwa

Skóra właściwa stanowi środkową warstwę skóry człowieka, zbudowaną z tkanki łącznej zawierającej znaczne ilości włókien kolagenowych, głównie typu I, III, IV i V oraz elastynowych i retikuliny, dzięki czemu zyskuje charakterystyczne cechy odporności mechanicznej, takie jak: sprężystość, elastyczność i wytrzymałość [143]. Od naskórka oddziela ją warstwa błony podstawnej składającej się z macierzy pozakomórkowej. Zewnętrzna, pofałdowana warstwa skóry właściwej nazywana jest warstwą brodawkowatą, natomiast głębiej położona i bardziej zbita warstwa, sięgająca aż do warstwy podskórnej, to warstwa siateczkowata. Istotę tkanki łącznej stanowią fibroblasty odpowiedzialne za produkcję substancji międzykomórkowej i włókien, ale obecne są także fibrocyty, histocyty, komórki tuczne i limfocyty. Skóra właściwa przepłataną jest siecią naczyń krwionośnych, limfatycznych zakończeń nerwowych a także występują w niej gruczoły (potowe, łojowe), mieszki włosowe oraz komórki mięśniowe gładkie tworzące mięśnie przywłosowe [144].

2.4.1.4. Warstwa podskórna

Pośród warstw tworzących skórę, najgłębiej położona jest tkanka podskórna, która zbudowana jest głównie z dużej ilości tkanki tłuszczowej tworzonej przez liczne ugrupowania adipocytów tzw. zrazików tłuszczowych. Tkanka tłuszczowa stanowi magazyn energetyczny organizmu i izolację termiczną, a w przypadku tkanki podskórnej przeplatana jest luźną tkanką łączną włóknistą, dzięki czemu pełni także funkcję strukturalną i ochronną [138]. Skład tkanki podskórnej jest osobniczo zmienny a także może się znacząco różnić na przestrzeni lat, w zależności od płci, wieku, trybu życia, diety, środowiska bytowania czy narażenia na czynniki zewnętrzne [145].

2.5. Drogi przenikania substancji aktywnych przez barierę skórą

Skóra ma charakter wybiórczej, półprzepuszczalnej bariery, aby mogła pełnić funkcję odżywczą, ochronną oraz transportową, zarówno dla substancji endogennych, jak i egzogennych [146]. Organizm ludzki wytworzył naturalne mechanizmy transportu substancji służące do regulacji parametrów i właściwości skóry. Ludzie od wieków wykorzystują półprzepuszczalny charakter skóry do aplikacji miejscowej leków i produktów dermatologicznych z uwagi na szereg korzyści jakie taka aplikacja ze sobą niesie. Działanie naniesionej na skórę substancji aktywnej można zaobserwować nie tylko w skórze, ale także w tkankach położonych głębiej, nawet w mięśniach i w stawach, a także może mieć działanie ogólnoustrojowe, po przedostaniu się do krwioobiegu, dlatego stanowi alternatywę dla konwencjonalnych metod podawania leków [147]. W pierwszej kolejności zwrócić należy uwagę na łatwość aplikacji produktu, a także fakt uniknięcia metabolizmu leków w wątrobie (efektu pierwszego przejścia), dzięki czemu często można zaobserwować wyższą biodostępność substancji aktywnych i docelowo podawać ich mniejsze dawki [71], [148]. Pomijanie układu pokarmowego pozwala także na uniknięcie szeregu efektów niepożądanych i interakcji z innymi lekami podawanymi doustnie czy substancjami przyjmowanymi z pokarmem [149]. Niestety istnieje również cały szereg ograniczeń możliwości zastosowania aplikacji miejscowej dotyczących barierowości skóry, która limituje przenikanie substancji aktywnych, zarówno pod kątem wielkości cząsteczek jak również ich charakteru. Przenikanie substancji aktywnych przez barierę skórą może zachodzić na zasadzie transportu transepidermalnego lub transfolikularnego [150].

2.5.1. Transport transfolikularny

Transport transfolikularny obejmuje transport substancji przez przydatki skóry, takie jak: gruczoły łojowe, potowe i mieszki włosowe, na zasadzie przenikania substancji, szczególnie lipofilowych, dobrze rozpuszczalnych w wydzielinach gruczołów aż do warstwy siateczkowej skóry [151]. Przypisuje się mu jednak znikome znaczenie dla całkowitego transportu substancji z uwagi na stosunkowo niską powierzchnię, jaką zajmują te struktury w skórze [152]. Jakkolwiek stanowi on istotną drogę przenikania dla substancji, które nie są w stanie pokonać bariery skórnej na zasadzie dyfuzji np. jony, metale ciężkie i duże polarne cząsteczki [153], [154].

2.5.2. Transport transepidermalny

Transport przez tkanki skórne możliwy jest dzięki dyfuzji [156], gdzie cząsteczki substancji przemieszczają się zgodnie z gradientem stężeń, do wyrównania ich, po obu stronach błony. W zależności od tego czy transportowana substancja jest rozpuszczalna w cemencie międzykomórkowym czy nie [155] mogą one przenikać skórę drogą transcelularną, przechodząc przez komórki lub intercelularną, przenikając przez cement międzykomórkowy, między komórkami. W obu przypadkach, w określonym stopniu, cząsteczki penetrujące powłoki skórne mają kontakt z cementem międzykomórkowym, wypełniającym wszystkie wolne przestrzenie, dlatego z uwagi na jego lipofilowy charakter, powinowactwo do tłuszczów jest uważane za główny wskaźnik zdolności substancji do przenikania przezskórnego [156].

2.6. Metody badania przenikania transepidermalnego

Wiele korzyści, jakie niesie za sobą miejscowa aplikacja produktu w stosunku do podania doustnego, otwiera naukowcom drogę do poszerzenia spektrum leków, aplikowanych naskórnice, stanowiąc alternatywę dla dostępnych na rynku produktów, z wyeliminowaniem części ich wad czy efektów ubocznych związanych z przyjmowaniem doustnym. Poznanie możliwości transportu cząsteczek przez skórę jest niezwykle istotne w odniesieniu do zdolności przewidywania ich właściwości permeacyjnych w określonych warunkach stosowania i efektywności ich działania. Z uwagi na trudność zaprojektowania badań przenikania substancji aktywnych i stopień ich skomplikowania, otrzymanie miarodajnych wyników, może być problematyczne, jednak uzyskane dane pozwalają na dobór metod poprawiających właściwości przenikania i umożliwiają rzetelną ocenę ryzyka stosowania produktu. Obecnie, do przewidywania zdolności permeacyjnych składników aktywnych wykorzystuje się szereg metod, zaczynając od teoretycznych modeli matematycznych kończąc na badaniach *in vitro* i *in vivo* [157], [158], [159].

2.6.1. Metody teoretyczne

W celu oszacowania zdolności permeacyjnych substancji opracowanych zostało wiele matematycznych modeli, często empirycznych i bardzo dokładnych, uwzględniających wiele czynników mających wpływ na permeację, jednak mimo to niewiele z nich odzwierciedla rzeczywiste wyniki otrzymywane podczas stosowania metod *in vivo* [160]. Część z tych modeli pozwala określić jedynie zdolność cząsteczek do przenikania przez skórę bez wskazań ilościowych, na podstawie obliczeń współczynnika przenikania związków czy względnego współczynnika polarności, współczynnika załamania światła, polarności i współczynnika podziału $\log P$ [156], [161], [162]. Metody te, często też będą wiarygodne jedynie w przypadku kilkuskładnikowych formułacji, co w praktyce jest coraz mniej spotykane, a większość produktów dostępnych na rynku to wieloskładnikowe mieszaniny, których składniki mogą ze sobą wzajemnie reagować [163].

2.6.2. Przenikanie *in vivo*

Obecnie na podstawie 7. Poprawki do Dyrektywy Kosmetycznej Unii Europejskiej (Dyrektywa 76/768/EEC), w 2009 r. wystosowano całkowity zakaz prowadzenia badań na zwierzętach substancji i preparatów kosmetycznych dla oznaczenia ich potencjalnego działania na zdrowie człowieka [164]. Badania prowadzone na ludziach są dopuszczalne, jednak budzą dużo kontrowersji i są przedmiotem wielu etycznych rozważań. Z racji tego są mniej powszechne niż badania prowadzone *in vitro* i raczej mają zastosowanie w przypadku badania potencjalnych substancji leczniczych niż produktów kosmetycznych. Najczęściej badanie prowadzone jest na grupie ochotników, którym aplikuje się badany produkt, gdzie zależnie od metody badania ochotnicy mogą podlegać monitorowaniu stanu naskórka za pomocą badań aplikacyjno – aparaturowych lub badanie może obejmować oznaczanie substancji aktywnej np. z zerwanego naskórka, krwi, płynu stawowego lub innego miejsca docelowego do którego ma dotrzeć dana substancja. W zależności od stopnia złożoności badania i stopnia ingerencji, a także eksperymentalnego charakteru badań może być wymagana zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie tego typu badań. W krajach Unii Europejskiej, jeśli badania produktów dermokosmetycznych są prowadzone zgodnie z aktualnie obowiązującymi polskimi i europejskimi przepisami prawnymi tj.:

- Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1223/2009 z dn. 30 listopada 2009 r. dotyczącym produktów kosmetycznych, w tym z:
- Cosmetics Europe - The Personal Care Association „Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products 2008”,
- WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (wyd. 1964 - 2013),
- Ustawą z dn. 4 października 2018 r. o Produktach Kosmetycznych, Dz.U. 2018 poz. 2227, i badania nie wykraczają poza zakres produktów kosmetycznych, wyżej wymieniona zgoda nie jest wymagana.

2.6.3. Przenikanie *in vitro*

Aby dokładniej przewidzieć zdolność substancji do przenikania transepidermalnego oraz móc określić ją ilościowo stosuje się metody wykorzystujące różne modele imitujące funkcjonowanie i właściwości ludzkiej skóry. Badania *in vitro* obejmują bardzo szeroką gamę badań eksperymentalnych, podczas których stosowane są modelowe skóry, zarówno ludzkie, zwierzęce oraz hodowle tkankowe, jak i syntetyczne membrany i błony oraz ich wszelkie modyfikacje. Aby uzyskać wyniki najbardziej zbliżone do rzeczywistego stanu trzeba podczas badania uwzględnić szereg czynników wpływających na barierowość skóry i zdolności permeacyjne cząsteczek. Z uwagi na złożoność badania, powstało wiele przewodników po badaniach przenikania *in vitro* takich jak: „7. Skin Absorption: *in vitro* Method”, czy wydany przez FDA projekt przewodnika po badaniach *in vitro*, które systematyzują metody i wskazują na najistotniejsze kwestie mogące mieć wpływ na rzetelność i wiarygodność otrzymanych wyników. Głównym celem badań *in vitro* jest wyznaczenie mierzalnych parametrów przenikania substancji, natomiast efekt ten można osiągnąć z wykorzystaniem różnych aparatów, metod i membran. W celu sprawdzenia

potencjalnych zdolności przenikania substancji na podstawie badania uwalniania substancji aktywnych z masy produktu dla półpłynnych postaci kosmetycznych, takich jak: emulsje, żele czy maści powszechnie wykorzystuje się specjalistyczne, zarówno statyczne, jak i dynamiczne komory dyfuzyjne. Mechanizm działania komór dyfuzyjnych polega na badaniu zdolności związku do dyfundowania poprzez półprzepuszczalne membrany (naturalne lub syntetyczne). Aparaty zwykle zawierają dwie części: donorową oraz akceptorową, które w zależności od aparatu mogą mieć różną konfigurację i oddzielone są od siebie odpowiednio dobraną membraną. Badanie uwalniania substancji aktywnych polega na naniesieniu dawki produktu w komorze donorowej, a następnie określeniu stężenia substancji, której udało się przeniknąć przez membranę do znajdującego się w komorze akceptorowej medium, w ustalonych odstępach czasu. Podczas prowadzenia badania istotne jest uwzględnienie fizjologicznej temperatury, jaka występuje na powierzchni skóry i w jej wierzchnich warstwach *in vivo*, gdzie zakłada się, że wynosi ona średnio 32 °C [165]. W tym celu stosowane są płaszcze wodne czy komory z ciepłym powietrzem. Na podstawie uzyskanych stężeń substancji aktywnych można wyznaczyć krzywą zależności uwalniania substancji aktywnej od czasu czyli tzw. profil uwalniania oraz kinetykę procesu [166], [167].

2.6.3.1. Membrany wykorzystywane w badaniach przenikania *in vitro*

- Membrany pochodzenia naturalnego

Najdoskonalszy model do badań przenikania stanowi ludzka skóra, jednak trudność w jej pozyskiwaniu stanowi poważne ograniczenie. Stosowanie ludzkiej skóry jest akceptowalne, choć cały czas stanowi to przedmiot rozważań etycznych, dlatego jej wykorzystywanie podlega wielu regulacjom prawnym i etycznym [168]. Ludzkie tkanki mogą być pozyskiwane pośmiertnie, z biopsji, z amputacji oraz z pozostałości po operacjach plastycznych związanych z redukcją tkanek, gdzie wycięta skóra stanowi produkt odpadowy. W krajach Unii Europejskiej wprowadzono zakaz czerpania korzyści finansowych związanych z wykorzystaniem ludzkich tkanek w badaniach *in vitro*, co wraz z ograniczeniami prawnymi, etycznymi i finansowymi, doprowadziło do niskiej popularności ich stosowania. Alternatywę dla ludzkiej skóry stanowią skóry odzwierzęce. Dostępne publikacje naukowe wskazują na prowadzenie badań na skórkach gryzoni, takich jak: królik, mysz czy szczur, a także skórkach świni [169]. Tkanki pochodzące od gryzoni wykorzystywano z uwagi na ich łatwiejszą dostępność, niski koszt i niewielkie rozmiary. Pozwalały one sprawdzić zdolności przenikania substancji aktywnych przez naskórek. Niestety z uwagi na różnice gatunkowe pomiędzy gryzoniami i ludźmi nie stanowiła modelu reprezentatywnego dla skóry człowieka [170], [171]. Z kolei skóra świni, z uwagi na wiele podobieństw genetycznych i histologicznych, wykazuje zbliżone właściwości barierowe i stanowi najbardziej reprezentatywny zwierzęcy model w stosunku do ludzkiego. Jednak w przypadku badań na tkankach odzwierzęcych występuje ograniczenie w postaci technologicznie trudnej obsługi i utrzymania tych tkanek i ich mniejszej stabilności [172]. W obu przypadkach, zarówno membran pochodzenia ludzkiego czy odzwierzęcego, istnieje także problem standaryzacji błon biologicznych, które są specyficzne dla każdego

organizmu i cechują się swoistą oryginalnością. Kolejną alternatywę stanowią zwierzęce lub ludzkie hodowle tkankowe, czyli modele powstające poprzez izolację i hodowlę wybranego rodzaju komórek. W celu uzyskania wyników jak najbardziej odzwierciedlających rzeczywiste wartości, wybierane są linie komórkowe najbardziej zbliżone genotypowo i fenotypowo do prawidłowych komórek występujących *in vivo* [173]. Wybrane linie komórkowe powinny charakteryzować się wysoką powtarzalnością i korelacją wyników *in vivo* z wynikami *in vitro*, choć trzeba brać pod uwagę, że pracując na komórkach w warunkach *in vitro* ciężko jest odtworzyć złożoność tkanki i wszystkie zachodzące w niej mechanizmy. Badania przenikania prowadzone na liniach komórkowych pozwalają skrócić czas prowadzenia badań w odniesieniu do badań *in vivo*, są od nich mniej kontrowersyjne i pozwalają na wielokierunkowe wykorzystanie między innymi do oceny mechanizmu transportu, oznaczania stężeń, obserwacji zachodzących interakcji, a także do badań nad poprawą biodostępności substancji aktywnych. Obecnie komercyjnie dostępnych jest wiele modeli skóry:

- obejmujących imitację warstw naskórka stworzonych na bazie ludzkich keratynocytów, charakteryzujących się trójwymiarową budową, strukturalnie bardzo zbliżoną do naturalnej tkanki. Zwykle są to uproszczone modele, które nie podlegają rogowaceni i pomimo wielu podobieństw nie są w stanie w 100 % odzwierciedlić naturalnego naskórka. Wykazują szereg odchyśleń dotyczących grubości warstw, ich przepuszczalności, odmienny poziom glukozyloceramidów i nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz obecność kropelek lipidowych w warstwie podstawnej [174],
- imitacje pełnej struktury skóry, które poza wszystkimi warstwami naskórka zawierają także warstwę imitującą skórę właściwą tworzoną przez fibroblasty oraz błonę podstawną. Podobnie, jak w powyższym przykładzie, komórki warstw naskórka nie ulegają rogowaceni, dlatego z czasem membrana ulega pogrubieniu. Z uwagi na obecność żywych fibroblastów, markerów różnicowania keratynocytów, zbliżony profil lipidowy do występującego *in vivo* oraz obecność interakcji pomiędzy warstwami, ten rodzaj błony odznacza się wysokim stopniem skorelowania wyników *in vitro* i *in vivo* [175].

▪ Membrany syntetyczne

W przypadku badania produktów kosmetycznych, z uwagi na dużą dostępność, łatwość wykonania badania i utrzymania określonych warunków doświadczenia, znacznie niższy koszt oraz krótszy czas prowadzenia badań, najczęściej wykorzystuje się membrany syntetyczne, które w wysokim stopniu mają imitować właściwości ludzkiej skóry i uwzględniać jej fizjologiczne funkcje. Dzięki zastosowaniu membran syntetycznych można uzyskać dobre wyniki, bliskie warunkom *in vivo*, jednak niezwykle istotne jest właściwe dobranie membrany do panujących podczas eksperymentu warunków. Komercyjnie dostępnych jest wiele membran różnego pochodzenia, mających zastosowanie w badaniach przenikania, w tym membrany zbudowane z:

- syntetycznych elastomerów (membrany polidimetylosiloksanowe (PDMS), nitrylowe, akrylonitrylowe) o wyraźnie hydrofobowym charakterze, co przybliży je właściwościami do struktur cementu międzykomórkowego,

CZEŚĆ LITERATUROWA

- naturalnych polimerów, takich jak: celuloza i jej pochodne, które wykazują charakter hydrofilowy, naturalną porowatość oraz niską zdolność do tworzenia wiązań z permeantem,
- syntetycznych polimerów np. polipropylen, polietylen, polichlorek winylu, polisulfon, poliwęglan, stanowiących najczęściej odporne chemicznie monowarstwy o naturalnie porowatych strukturach,
- lipidów i lipofilowych substancji imitujących substancję międzykomórkową warstwy naskórka.

Wyniki badań są zwykle ściśle powiązane z doбором określonej membrany do konkretnego doświadczenia z uwzględnieniem charakteru oraz właściwości badanej substancji i płynu akceptorowego. Odnotowano także doświadczenia, w których wykazano brak zasadności wyboru danej membrany (uzyskane wyniki odbiegały od tych uzyskiwanych *in vivo* czy na tkankach odzwierzęcych) [176], [177], dlatego niezwykle ważne jest uwzględnienie wszystkich aspektów już na etapie projektowania doświadczenia.

2.6.3.2. Aparatura wykorzystywana do badania przenikania *in vitro*

- Komora dyfuzyjna Franz'a

Jednym z najpopularniej stosowanych aparatów, rekomendowanym do badania uwalniania półpłynnych postaci kosmetycznych, jest komora dyfuzyjna Franz'a [178]. Aparat zbudowany jest z wertykalnie ułożonych komór, jedna nad drugą, oddzielonych od siebie membraną, gdzie w górnej części znajduje się komora donorowa, do której nakładany jest badany produkt, natomiast pod membraną znajduje się komora akceptorowa zawierająca medium akceptorowe, do którego, na zasadzie dyfuzji, przenikają substancje z badanego produktu. Całość otoczona jest płaszczem grzejnym w celu utrzymania stałej temperatury podczas badania. Dodatkowo w komorze akceptorowej umieszczone jest mieszadełko magnetyczne umożliwiające wyrównanie stężenia w całej objętości płynu akceptorowego oraz szyjka umożliwiająca pobór medium akceptorowego. Zaletą tego aparatu jest łatwość jego użycia, możliwość szybkiego i jednocześnie precyzyjnego pobierania próbek do badań oraz bardziej zbliżona aplikacja produktu do badań *in vivo*, w porównaniu do aparatów łopatkowych. Wynika to z budowy aparatu, który pozwala na kontakt powietrza i innych czynników zewnętrznych z membraną, stanowiąc, tak jak w przypadku skóry, otwartą powierzchnię. Dodatkowo, budowa aparatu pozwala na bezpośrednie nakładanie cienkich warstw produktu i tworzenie warstw okluzyjnych na powierzchni membrany, tak samo, jak w przypadku miejscowej aplikacji na skórę [179]. Problematyczna może okazać się w niektórych przypadkach rozpuszczalność, w hydrofilowym płynie akceptorowym, niektórych cząsteczek, dlatego w tych przypadkach dodaje się do płynu akceptorowego organiczne rozpuszczalniki czy związki powierzchniowo czynne mające na celu poprawienie rozpuszczalności substancji. Jednakże, mogą one oddziaływać na membranę i zakłócać przenikanie substancji [180]. Podstawowy model dyfuzyjnej komory Franz'a jest aparatem bazującym na dyfuzyjnej komorze statycznej, jednak w niektórych, bardziej zaawansowanych modelach możliwe jest mierzenie dyfuzji z wykorzystaniem układu

przepływowego, kierującego płyn akceptorowy bezpośrednio do analizatora. Aparat Franz'a z układem przepływowym ma dodatkową zaletę, jaką jest automatyzacja poboru próbki, która w przypadku klasycznego modelu musi być pobierana manualnie z komory akceptorowej.

- Komora Flynn'a

Komora Flynn'a stanowi model aparatu, w którym membrana umieszczona jest między horyzontalnie i stycznie ułożonymi komorami, gdzie dochodzi do dyfuzji substancji aktywnej z płynu donorowego do akceptorowego [181]. Próbki mogą być pobierane z jednej lub obydwu komór w ustalonym czasie. Ponownie, jak w przypadku komory dyfuzyjnej Franz'a, problemem w tym przypadku może być rozpuszczalność substancji aktywnej w najczęściej hydrofilowym medium, a także dodatkowo, w tym przypadku, komora donorowa, która odizolowana jest od środowiska zewnętrznego płynem donorowym, przez co może dochodzić do nadmiernej hydratacji membrany w skutek długotrwałego działania na nią płynu donorowego. Komora ta, nie jest powszechnie stosowana w przypadku badania produktów kosmetycznych [179].

- Aparat przepływowy na przykładzie komory Bronaugh

Aparat przepływowy wykorzystywany jest zwykle do badania substancji o słabej rozpuszczalności w wodzie a także wieloskładnikowych mieszanin, z uwagi na to że przez komorę, do której dyfunduje badany produkt, stale przepływają nowe dawki medium akceptorowego, wymywające kolejne partie badanej substancji [182]. Kluczowy podczas badania uwalniania substancji aktywnej, z wykorzystaniem tego aparatu, może być właściwy dobór prędkości przepływu medium akceptorowego [183]. Zaletą tego aparatu jest dłuższa żywotność membran z uwagi na ciągłą wymianę medium akceptorowego, jednak proces ten może także prowadzić do niekorzystnych zmian w membranach poprzez wymywanie jej składników, co może prowadzić do zwiększenia jej przepuszczalności i tym samym dawać zafałszowane wyniki [184], [185].

- Aparat łopatkowy, koszyczkowy i ich modyfikacje

Oba aparaty charakteryzują się podobną budową - zbudowane są z 6-8 okrągłodennych, zamykanych zlewek umieszczonych w łaźni wodnej i stosowane są najczęściej do uwalniania substancji aktywnych z postaci tabletkowanych [186]. W przypadku aparatu koszyczkowego, badany produkt umieszcza się wewnątrz obrotowego koszyczka, natomiast w przypadku aparatu łopatkowego, koszyczek zastąpiony jest mieszadłem łopatkowym, a tabletkę umieszcza się na dnie zlewki. Oba aparaty, z uwagi na możliwości badania postaci stałych, raczej nie znajdują zastosowania w badaniu produktów kosmetycznych, z wyjątkiem aparatu łopatkowego z komorą ekstrakcyjną, w której możliwe jest badanie półstałych postaci produktów kosmetycznych [187], [188]. W tym przypadku, na dnie zlewki z płynem akceptorowym, umieszcza się dodatkowy element, komorę

wypełnioną produktem, od zewnątrz otoczoną półprzepuszczalną membraną i zabezpieczoną pierścieniem przed zsunięciem membrany.

- PAMPA - Parallel Artificial Membrane Permeability Assay

W ostatnim czasie coraz powszechniejsze staje się stosowanie do badań uwalniania substancji aktywnych systemu PAMPA (ang. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) [189]. System ten zbudowany jest z dwóch części: płyty z 72 dołkami, w których umieszcza się roztwór donorowy oraz drugiej pasującej kształtem powierzchnią zamykającą, zawierającą odpowiadające pierwszej płycie zagłębienia, w których umieszcza się płyn akceptorowy. Dna dołków drugiej części buduje membrana, zwykle imitująca substancję międzykomórkową naskórka, co pozwala na dyfuzję substancji z jednej części do drugiej. Zaletą tej metody jest łatwość użycia i powtarzalność wyników, natomiast kłopotliwe może okazać się opracowanie profilu przenikania, dlatego najczęściej wykorzystuje się ją do badań o charakterze przesiewowym [190].

2.6.3.3. Medium akceptorowe

W związku z tym, że przenikanie przezskórne odbywa się najczęściej na zasadzie dyfuzji biernej, transport składników aktywnych, w dużej mierze uzależniony jest od różnicy jej stężeń, jaka występuje po obu stronach skóry, dlatego w przypadku badania uwalniania ma to bezpośrednie odwzorowanie w korelacji różnicy stężeń między częścią donorową i akceptorową z wynikami uwalniania substancji [191]. W związku z powyższym, w celu zapewnienia warunków jak najbardziej zbliżonych do tych występujących *in vivo*, niezwykle istotny może okazać się wybór składu płynu akceptorowego pod kątem jego właściwości, który poza znaczeniem w kontekście dyfuzji, może wchodzić w interakcje z samą membraną oddziałując na jej kondycję i zużywanie. Do uwalniania hydrofilowych substancji najpopularniej wykorzystywane są roztwory jak najbardziej zbliżone do występujących w organizmie, czyli płyny o fizjologicznych parametrach pH lub buforowe roztwory izotoniczne [192], natomiast dla substancji lipofilowych dobór właściwych medium receptorowych jest trudniejszy. Wskazuje się, że związki te są zdolne do absorpcji, natomiast ich przenikanie przez półprzepuszczalne błony jest niezwykle powolne dając minimalne wartości lub nie dając ich wcale. Dlatego by otrzymać rzetelne wyniki, wykorzystuje się płyny akceptorowe z dodatkiem rozpuszczalników np. alkoholi, środków powierzchniowo czynnych lub białek i inne rodzaje płynów receptorowych, które ułatwiają przenikanie substancji aktywnych [193]. Niewłaściwie dobrane medium akceptorowe może wspomagać transport związków innych niż pożądanego, z jednoczesnym blokowaniem właściwych cząsteczek, a także wpływać na skład membrany, gdzie poprzez wypłukiwanie jej lipofilowych składników prowadzi do utraty jej właściwości, aktywności metabolicznej i szybkiego zużycia.

2.6.4. Czynniki warunkujące efektywność przenikania

2.6.4.1. Właściwości substancji aktywnej

Ogromne znaczenie dla przenikania substancji aktywnych mają właściwości jej własnych cząsteczek. Bariere lipidową naskórka z dużą łatwością pokonują niepolarne i niejonowe cząsteczki o masie cząsteczkowej do 500 g/mol i współczynnika podziału log P pomiędzy 1 i 3 [194], [195]. Badania wskazują także, że cząsteczki o wyższej masie cząsteczkowej, między 500 g/mol a 1000 g/mol również mogą przenikać przez skórę, jednak może się to wiązać z mniejszą efektywnością, choć niewątpliwie wielkość cząsteczek może znacznie ułatwić lub utrudnić ich przenikanie. Logarytm dziesiętny współczynnika podziału z kolei charakteryzuje związki pod kątem ich lipofilowości, gdzie na podstawie jego wartości można przewidywać zdolności permeacyjne danej substancji. Współczynnik podziału stanowi stosunek stężeń równowagowych w układzie dwóch, niemieszających się rozpuszczalników, który w warunkach równowagi termodynamicznej, przy stałym ciśnieniu i temperaturze ma stałą wartość charakterystyczną dla konkretnej substancji będącej w danym układzie rozpuszczalników [196]. Cząsteczki charakteryzujące się wysoką lipofilowością doskonale przenikają do warstwy rogowej naskórka, natomiast z uwagi na bardziej hydrofilowy charakter głębszych warstw, ich dalszy transport będzie znacznie ograniczony. Z kolei cząsteczki wykazujące hydrofilowość mogą mieć problem z pokonaniem warstwy rogowej naskórka, za to, jeśli ją pokonają przenikanie głębszych warstw nie stanowi dla nich problemu [197]. W przypadku substancji charakteryzujących się budową jonową, transport transepidermalny jest praktycznie niemożliwy, dlatego dyfundują one głównie transfolikularnie przez gruczoły czy mieszki włosowe. Na zdolność permeacji cząsteczek ma wpływ także ich kształt, stereoizomeria i stan skupienia. Wskazuje się na promowanie substancji o owalnych kształtach oraz unikanie cząsteczek o długiej, rozgałęzionej budowie, która z dużym prawdopodobieństwem może mieć trudności z pokonaniem warstwy rogowej naskórka. Większą efektywnością przenikania charakteryzują się także ciecze i substancje lotne w porównaniu do ciał stałych.

2.6.4.2. Właściwości nośnika

Kolejnym istotnym elementem o dużym znaczeniu dla efektywności przenikania przez barierę skórną są właściwości nośnika, w którym znajduje się substancja czynna [198]. Ponownie, jak w przypadku samej substancji rozważyć należy dobór nośnika pod kątem jego powinowactwa do poszczególnych warstw skóry, biorąc pod uwagę do jakiej warstwy ma on przeniknąć oraz powinowactwo bazy do samej substancji aktywnej. W mikroemulsjach i nanoemulsjach, z uwagi na niewielkie rozmiary cząstek i obecność składników lipofilowych, a także dużą ilość związków powierzchniowo czynnych uzyskuje się lepsze wyniki przenikania substancji przez barierę skórną do głębszych warstw w porównaniu do żeli czy makroemulsji [198], [199]. Dodatkowym atutem form emulsyjnych jest fakt, że za ich pomocą można uzyskać homogenny układ różnych, niemieszających się składników. Z kolei podłoża maściowe zawierające woski, parafinę czy wazelinę tworzą na powierzchni naskórka dodatkową, okluzyjną warstwę tłuszczową i wiążąc się silnie z cementem

międzykomórkowym działają głównie w naskórku, nie pozwalając na dalszy transport składników lipofilowych, choć w przypadku okluzji możliwe staje się przenikanie zawartych w tym podłożu związków hydrofilowych [200]. Istotna jest także lepkość podłoża, gdzie zauważono, że wraz ze spadkiem lepkości poprawia się zdolność przenikania substancji aktywnych [201], [202]. Projektowanie nośnika substancji aktywnych powinno też obejmować uwzględnienie surowców ułatwiających przenikanie, takich jak: substancje powierzchniowo czynne czy promotory przenikania, rozluźniające strukturę cementu międzykomórkowego, jak również substancji regulujących nawodnienie naskórka. Podczas tworzenia koncepcji produktu, warto pamiętać też o tym, aby składnik aktywny nie miał zbyt dużego powinowactwa do składników nośnika, z uwagi na utrudnione uwalnianie z masy produktu do skóry [203], [204].

2.6.4.3. Promotory przenikania

Istnieje cały szereg zróżnicowanych substancji ułatwiających lub umożliwiających przenikanie przezskórne cząsteczek, tzw. promotorów przenikania, które odwracalnie zaburzą strukturę warstwy naskórkowej czyniąc ją tym samym bardziej przepuszczalną dla endogennych składników aktywnych. Promotory te, powinny działać w sposób odwracalny, aby nie zakłócać możliwości prawidłowego funkcjonowania bariery skórnej, powinny być również niereaktywne, niedrażniące, nieuczulające i wykazywać się brakiem toksyczności, aby ich stosowanie było bezpieczne. Dla lepszych właściwości sensorycznych produktu najlepiej, gdyby były bezwonne i bezbarwne [205]. Mechanizm ich działania obejmuje zmniejszenie funkcji barierowej naskórka, jednakże poszczególne związki charakteryzują się różnymi mechanizmami działania, dzięki czemu można na tej podstawie dokonać ich klasyfikacji. Niskocząsteczkowe alkohole, takie jak: etanol czy izopropanol oraz glikole np. glikol propylenowy posiadają zdolność ekstrakcji lipidów prowadząc do wymywania lipidów macierzy międzykomórkowej, zwiększając rozpuszczalność matrycy a tym samym składników aktywnych w naskórku i mogą wpływać na funkcjonowanie białek, w tym keratyny zmieniając jej stopień hydratacji [206]. Działanie alkoholi monohydroksylowych posiada jednak pewne ograniczenia, zwykle zaleca się ich stosowanie w połączeniu z substancjami hydrofilowymi, natomiast w przypadku cząsteczek hydrofobowych mogą utrudniać ich przenikanie [207]. Ich obecność na skórze jest krótkotrwała i jest ograniczona do ich odparowywania z matrycy. Glikole posiadają bardzo zbliżony mechanizm działania do alkoholi monohydroksylowych i działają jako czynniki poprawiające rozpuszczalność substancji aktywnych, jednak najczęściej są stosowane jako pomocniczy promotor przenikania i dla uzyskania pożądanego efektu wymagają współdziałania innego promotora [208]. Kwasy tłuszczowe, takie jak: kwas oleinowy, palmitynowy czy stearynowy oraz estry kwasów tłuszczowych z uwagi na swoją zbliżoną budowę do lipidów skóry, zwiększają powinowactwo nośnika do cementu międzykomórkowego. Terpeny, takie jak: mentol, limonen, cyneol i inne zawarte w naturalnych olejkach eterycznych mogą z uwagi na swoje wielokierunkowe właściwości pełnić dwójaką rolę w masie produktu, gdzie na przykład mogą być jednocześnie składnikiem aktywnym o działaniu chłodzącym i promotorem przenikania dla innych składników formułacji. Mentol tworzy z wieloma substancjami (np. kamfora czy tymol)

mieszaniny eutektyczne, gdzie poprzez obniżenie temperatury topnienia mieszaniny tych składników, a tym samym przejścia z formy krystalicznej do płynnej, zwiększa się rozpuszczalność obu składników tej mieszaniny. Terpeny zaburzają także właściwości ochronne warstwy rogowej naskórka w skutek ekstrakcji lipidów i rozluźnienia wiązań wodorowych pomiędzy ceramidami w cemencie komórkowym, prowadząc do jego upłynnienia [209]. Do promotorów przenikania zalicza się także wiele rozpuszczalników organicznych, takich jak: DMSO (Dimetylosulfotlenek), które zmieniają strukturę macierzy międzykomórkowej. Podobnie, jak w przypadku terpenów, na skutek ekstrakcji lipidów, ich działanie obejmuje też dehydratację naskórka, denaturację białek oraz rozluźnienie połączeń między zrogowaciałymi komórkami [210], [211]. Innym związkiem, mającym korzystny wpływ na przenikanie jest mocznik, który z uwagi na swoje właściwości higroskopijne oraz keratolityczne wykazuje doskonałe cechy nawilżające, co może być szczególnie pomocne w przypadku przenikania cząsteczek hydrofilowych [212]. W działaniu keratolitycznym na naskórek i jego rozluźnieniu mogą być także przydatne kwasy np. kwas glikolowy, azelainowy czy mlekowy [213], [214], [215]. Wykorzystuje się także zdolności rozgrzewające niektórych substancji np. nikotynianu metylu, gdzie w skutek miejscowego podniesienia temperatury dochodzi do szybszego wchłaniania cząsteczek do naczyń krwionośnych. Innym przykładem mogą być również związki powierzchniowo czynne, które poza właściwościami solubilizacyjnymi czy emulgacyjnymi, poprzez oddziaływania z białkowymi składnikami warstwy rogowej, prowadzą do rozpulchnienia całej struktury [216]. Taką funkcję może także pełnić cholesterol, który z uwagi na duże powinowactwo do cementu międzykomórkowego, wbudowuje się w jego strukturę, zwiększając tym samym powierzchnię stref hydrofilowych. Dzięki temu ułatwia on kontakt polarnych grup ceramidów zawartych w cemencie międzykomórkowym z substancjami hydrofilowymi, dostarczonymi podczas aplikacji produktów kosmetycznych. Wszystkie powyższe przykłady ukazują, jak bardzo istotne jest poznanie charakteru wykorzystywanych substancji pod kątem projektowania właściwego nośnika i doboru odpowiednich promotorów. Wielokrotnie wskazywano, że w zależności od charakteru cząsteczek, promotor przenikania, może działać promująco lub hamująco na jego absorpcję [217], a dobra znajomość właściwości wykorzystywanych substancji pozwala na poprawienie nawet kilkunastokrotne zdolności permeacyjnych danego składnika aktywnego i doprowadzenie do synergii działania promotorów [218].

2.6.4.4. Parametry biologiczne skóry

Przenikanie poszczególnych składników aktywnych przez skórę różnych ludzi może dawać odmienne wyniki badań. Uwarunkowania genetyczne i parametry biologiczne skóry są osobniczo swoiste i niepowtarzalne, przez co pozwalają wyróżnić szereg cech mających wpływ na zdolności absorpcyjne skóry. Kluczowe znaczenie ma stan i jakość skóry oraz jej stopień nawilżenia [219]. Ponadto zmiany w różnicach przenikania przez skórę można także zaobserwować w różnym wieku, gdzie jej skład zmienia się wraz ze starzeniem organizmu [220]. W przypadku występowania otyłości, w odniesieniu do osób bez stwierdzonych patologii, większa ilość tkanki tłuszczowej może utrudniać transport substancji i wydłużać drogę do pokonania. Korzystnie, na przenikanie substancji wpływają także wszelkiego

rodzaju patologie skórne obejmujące zaburzenia funkcjonowania naturalnej bariery ochronnej naskórka, gdzie pozbawienie płaszcza hydrolipidowego czy mechaniczne uszkodzenia warstwy rogowej powodują wzrost szybkości przenikania substancji w głąb tkanek [221], [222], co często wykorzystuje się podczas projektowania produktu oraz aplikacji, uprzedzając ją złuszczeniem naskórka.

2.6.4.5. Czynniki fizyczne

Nieco mniejszy, ale jednak nadal istotny wpływ na przenikanie substancji wywierają także czynniki zewnętrzne, takie jak: temperatura otoczenia, pora dnia, wilgotność czy środowisko. Parametry te, często wykorzystuje się do stworzenia najlepszego otoczenia dla działania produktu. Uwzględniając fizjologiczne aspekty, badanie przenikania przezskórnego prowadzi się zwykle w medium o temperaturze od 22 °C (temperatura otoczenia) do 37 °C (temperatura ludzkiego ciała), przy czym najczęściej przyjmuje się temperaturę 32 °C, która jest najbliższa temperaturze skóry człowieka [173]. Wskazuje się, że wahnięcia temperatur podczas eksperymentów mogą powodować istotne zmiany przenikania substancji aktywnych przez membrany, zarówno szybkości, jak i wyników ilościowych [223], [224], [225]. Może to być związane ze zmianą energii cząsteczek w roztworach po obu stronach błony i zmianami właściwości nanoszonego produktu np. lepkości, jak również samej substancji aktywnych, wpływając na ich rozpuszczalność, czy powodując w niektórych przypadkach degradację. Dla poprawy przenikania przezskórnego stosowane są powszechnie masaże i miejscowe rozgrzewanie, rozszerzające naczynia krwionośne i poprawiające krążenie czy okluzję, która w zależności od zastosowanego nośnika może wpływać na hydratację naskórka prowadząc do jego rozpułchnienia a tym samym ułatwienia transportu substancjom hydrofilowym. Dla poprawy przenikania substancji aktywnych stosuje się także szereg innych technik, takich jak: okluzja, jonoforeza, elektroporacja czy sonoforeza, które opisano poniżej [226].

- Okluzja

Stosowanie okluzji polega na nałożeniu na skórę warstwy nieprzepuszczającej wody, najczęściej maści, silikonów lub bariery mechanicznej np. specjalnych opatrunków czy folii, dzięki czemu dochodzi do zmodyfikowania warstwy rogowej naskórka [227]. Mimo tego, że w warstwie rogowej naskórka zawartość wody mieści się na poziomie od 5 % do 10 %, to wypełniająca keratynocyty, keratyna, posiada zdolności do wiązania wody, podnosząc uwodnienie naskórka nawet do 80 % [228]. W skutek uniemożliwienia parowania wody dochodzi do rozpułchnienia i zwiększonej hydratacji skóry [229]. Zastosowanie okluzji zwykle prowadzi do miejscowego podwyższenia temperatury powierzchni skóry i rozszerzenia naczyń krwionośnych, wpływając tym samym na poprawę krążenia i ułatwienie przenikania przezskórnego substancji [230]. Niestety, długotrwałe stosowanie okluzji nie jest wskazane, z uwagi na możliwość wystąpienia efektów niepożądanych w postaci maceracji i zaniku skóry, a także rozwoju bakterii związanego z długotrwałe podwyższoną wilgotnością [231].

CZĘŚĆ LITERATUROWA

- Jonoforeza

Z uwagi na wcześniej wspomniane trudności w przenikaniu cząsteczek o charakterze jonowym, ich przenikanie może być wzmacniane przy użyciu jonoforezy. Cząsteczki podlegające dysocjacji elektrolitycznej, występujące w postaci jonów w produkcie, aplikowane są na skórę w taki sposób, by pozostawać w stałym kontakcie z elektrodą o takim samym ładunku, natomiast druga elektroda zamyka obwód. W metodzie tej wykorzystywany jest prąd elektryczny, który prowokuje migrację cząsteczek do elektrody o przeciwnym ładunku. Przy długotrwałym działaniu elektrod w jednym miejscu skóry (do 48 h) cząsteczki mogą się przedostawać do skóry właściwej i naczyń krwionośnych [228]. Wskazuje się, że szybkość przenikania jonów przez skórę uwarunkowana jest napięciem prądu stałego oraz rodzajem jonów. Kationy wykazują lepsze właściwości permeacyjne niż aniony [232].

- Sonoforeza

W tej metodzie do przyspieszania transportu substancji aktywnych wykorzystywane są ultradźwięki, wprowadzające substancje tkankowe i aplikowany produkt w ruch oscylacyjny, pod wpływem, którego w przestrzeniach międzykomórkowych powstają pęcherzyki gazu, zakłócające struktury lipidowe, powiększające przestrzenie międzykomórkowe [233]. Podczas działania ultradźwięków dochodzi także do wzrostu temperatury, co dodatkowo poprawia krążenie w miejscu aplikacji. Z uwagi na zwiększenie przestrzeni międzykomórkowych, sonoforezę wykorzystuje się do transportu substancji o dużej masie cząsteczkowej oraz polarnych, takich jak: białka czy witaminy i wielu leków [234], [235].

- Elektroporacja

Elektroporacja wykorzystywana jest do wspomagania transepidermalnego transportu substancji z przestrzeni międzykomórkowej dzięki wytwarzaniu krótkotrwałych kanałków tzw. elektroforów. Występują one pod postacią dodatkowych przestrzeni, powstających pod wpływem pola elektromagnetycznego i stanowią alternatywną drogę wnikania składników aktywnych. W tym celu wykorzystuje się krótkie impulsy elektryczne o wysokim napięciu do 1000V powodujące dezintegrację a nawet topnienie lipidów [233]. Elektroporacja może być szczególnie przydatna przy próbach poprawy przenikania substancji wielcząsteczkowych, jednak należy pamiętać o odpowiednim doborze napięcia, które przy zbyt niskich wartościach może nie dać pożądanego efektu a w przypadku zbyt wysokich wartości może prowadzić do nieodwracalnych efektów w błonach komórkowych [236].

- Inne techniki poprawiania przenikania substancji aktywnych

Poza uprzednio wymienionymi promotorami przenikania oraz właściwym zaprojektowaniem nośnika a także fizycznymi technikami, takimi jak: okluzja, elektroporacja i jono- czy sonoforeza, istnieje szereg metod, które można wykorzystywać

w celu poprawienia zdolności permeacyjnych substancji. W pierwszej kolejności należy zwrócić uwagę na możliwości modyfikacji samych substancji aktywnych. Biorąc pod uwagę, że największe trudności w pokonaniu bariery skórnej dotyczą substancji hydrofilowych, najczęściej modyfikuje się je poprzez dołączenie do nich łańcuchów alkilowych i arylowych np. poprzez estryfikację, alkoksylację, amidowanie czy tworzenie par jonowych. W przypadku wysoce lipofilowych cząsteczek zastosowanie podstawników zdolnych do dysocjacji może obniżać ich lipofilowość [230]. Takie modyfikacje pozwalają składnikom aktywnym pokonać barierę naskórkową, a w dalszych etapach umożliwiają ich przekształcenie do pierwotnej formy, np. poprzez hydrolizę lipofilowego podstawnika. Kolejną możliwość daje wprowadzanie substancji aktywnych do środka specjalnych nośników, które z łatwością penetrują struktury skóry. Wyróżnić tu można: układy liposomowe, transferosomowe, etosomowe czy polimerosomowe, zbudowane z lipofilowych lub amfifilowych pęcherzyków, w których wnętrzach zamyka się hydrofilowe substancje [237], [238]. Na podobnej zasadzie otrzymuje się także niosomy i katesomy, gdzie w przypadku niosomów jako otoczkę wykorzystuje się niejonowe środki powierzchniowo czynne, a w przypadku katesomów stosuje się niefosfolipidowe substancje o dodatnim ładunku [239]. Istotny w przypadku przenikania jest także stopień nasycenia produktu substancją aktywną, z uwagi na to, że cząsteczka zyskuje wtedy najwyższą aktywność termodynamiczną, co pozwala uzyskać najwyższe zdolności permeacyjne [155].

2.7. Tworzenie formułacji kosmetycznych

Polski rynek produktów kosmetycznych charakteryzuje się swoistą dynamiką i stale reaguje na zmieniające się wymagania konsumentów chłonąc nowości z rynków: europejskiego, azjatyckiego i amerykańskiego, zwracając uwagę na dbałość o wysoką jakość i bezpieczeństwo wytwarzanych wyrobów. Wybór formy aplikacyjnej i opracowanie formułacji dla docelowego produktu kosmetycznego stanowi wyzwanie pod kątem uzyskania idealnej kombinacji pożądaných cech, w tym: przenikania substancji aktywnych i zapewnienia im korzystnego środowiska działania, kosztu masy produktu oraz produkcji, oczekiwań aplikacyjno - sensorycznych konsumentów, możliwości technologicznych zakładu, dostępności surowców czy uwzględnienia obowiązujących regulacji prawnych. Prawidłowe opracowanie formułacji zapewnia bezpieczeństwo jego stosowania oraz odtwarzalność z zachowaniem stałości parametrów sensorycznych, aplikacyjnych i fizykochemicznych, niezależnie od miejsca i podmiotu realizującego proces produkcyjny. W pierwszej kolejności, na etapie projektowania bazy, należy rozważyć właściwości substancji aktywnych pod kątem utrzymania ich aktywności i zdolności do uwalniania z danego podłoża kosmetycznego. Szczególnie trudnym przypadkiem może okazać się opracowywanie formułacji wieloskładnikowych, zawierających kombinację wielu substancji aktywnych, gdzie konieczne jest rozpatrzenie wszystkich składników pod kątem ich kompatybilności względem całej mieszaniny. Poza aspektem charakterystycznych cech substancji aktywnych dobór pozostałych składników uwarunkowany może być również ich dostępnością, ceną, obecnymi trendami np. procentem pochodzenia naturalnego, łatwością stosowania procesowego oraz kompatybilnością z resztą składników. Tworząc składy nowych produktów, aby nadążyć za zasypującymi rynek trendami, warto jest korzystać

z innowacyjnych, niestandardowych lub ulepszonych surowców, które stale dostarczają dystrybutorzy. Wybierając nieznaną surowce warto opierać się na dostarczonej wraz z nimi dokumentacji, która pomoże przewidzieć jej zachowanie wśród pozostałych składników oraz wskazuje oczekiwane efekty. Korzystając z surowców doświadczonych dystrybutorów można również liczyć na próbki technologiczne, pomoc działu technologicznego w razie problemów formułacyjnych oraz doradztwo w zakresie formułowania, co często pozwala zaoszczędzić czas i zredukować koszty związane z niepowodzeniami. Rynek kosmetyczny obejmuje całą gamę różnych postaci produktów, przy czym najpopularniej wykorzystuje się żele, emulsje, płyny, aerozole, formy stałe i półstałe, w tym maści a także całą gamę surowców pozwalających na stworzenie wyżej wymienionych form. W każdym produkcie, składniki można podzielić na kilka grup z uwagi na funkcję jaką w nim pełnią. Składniki bazowe tworzą większość masy produktu i pozwalają na utrzymanie jej formy, stanowią nośnik dla składników aktywnych i odpowiadają za większość właściwości aplikacyjnych. Ta grupa substancji obejmuje rozpuszczalniki, nośniki substancji, wypełniacze i składniki konsystencjotwórcze. Substancje aktywne obejmują ogromną grupę związków, zarówno pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznego, zapewniających pożądane działanie produktu. Kolejna grupa substancji jest opcjonalna, jednak znacząco wpływa na stabilność i działanie gotowego produktu. W tej grupie znajdują się związki powierzchniowo czynne, promotory przenikania, stabilizatory, regulatory pH czy konserwanty, które w zależności od formułacji mogą być konieczne do uzyskania bezpiecznego i odpornego na starzenie produktu.

2.7.1. Rodzaje najpopularniejszych postaci kosmetycznych dostępnych na rynku

Rozwój formy masy kosmetycznej pozwala na osiągnięcie pożądanego poziomu działania kosmetyku, a dopasowanie postaci produktu do konkretnej substancji czynnej zapewnia jej stabilność, bezpieczeństwo stosowania i atrakcyjność aplikacyjną. Dzisiejszy rynek kosmetyczny jest zbiorem wielu form, różniących się funkcją, właściwościami, aplikacją i przede wszystkim składem, jednak wszystkie tworzone są z zamiarem spełniania oczekiwań konsumentów.

2.7.1.1. Emulsja

Emulsje są jedną z najpopularniejszych postaci kosmetycznych z uwagi na możliwość zastosowania w ich przypadku szerokiej gamy surowców o różnej lipofilowości. Klasyczna definicja emulsji określa ją jako układ dwóch niemieszających się cieczy, z których jedną charakter hydrofilowy (stanowi fazę wodną), a druga - charakter hydrofobowy (stanowi fazę tłuszczową), przy czym jedna z faz ulega dyspersji w drugiej, gdzie cząstki fazy rozpraszanej ulegają zawieszeniu w fazie rozpraszającej na skutek mechanicznego mieszania obu faz, dzięki dodatkowi substancji emulgujących [240]. Najczęściej wykorzystuje się działanie substancji powierzchniowo czynnych, które opiera się na zmianie charakteru oddziaływań międzycząsteczkowych na granicy faz w wyniku

CZEŚĆ LITERATUROWA

obniżenia napięcia powierzchniowego. Poprzez adsorpcję na granicy powierzchni kropeł emulsji, tworzą trwałą powłokę ochronną, zapobiegającą zlewaniu się kropeł fazy wewnętrznej. Podstawowe typy emulsji obejmują:

- Emulsję O/W - w której faza olejowa stanowi mniejszość masy, jej cząstki są zdyspergowane w zewnętrznej fazie wodnej, zwykle wykorzystywana jest do tworzenia lekkich postaci emulsyjnych,
- Emulsję W/O – w której faza olejowa stanowi bazę dyspergującą dla składników hydrofilowych w niej rozproszonych, zwykle wykorzystywana jest do tworzenia tłustych, sensorycznie ciężkich emulsji,
- Emulsje wielokrotne – inaczej emulsje wielofazowe, podwójne, w których cząstki fazy zewnętrznej zawieszono są także w kroplach fazy zdyspergowanej, mogą tu występować emulsje typu O/W/O oraz W/O/W, w zależności od charakteru faz.

Początkowo wskazywano, że na tworzenie rodzaju faz, poza procentowością udziału danej fazy w masie produktu, wpływ ma wybór substancji powierzchniowo czynnej. Według prawa Bancroft's'a przyjmuje się, że fazę zewnętrzną stanowi faza, która jest lepszym rozpuszczalnikiem dla zastosowanej substancji powierzchniowo czynnej [241]. Jakkolwiek powyższa reguła może być zwodnicza z uwagi na wpływ substancji powierzchniowo czynnej, która potrafi zmienić powinowactwo występujące w układzie binarnym (gdzie występują jedynie dwie fazy) [242]. Inne badania obejmowały próby mierzenia równowagi wodno-lipidowej (HLB - ang. Hydrophile - Lipophile Balance) w celu przewidywania możliwości utworzenia konkretnego typu emulsji i obecnie właśnie ta metoda wykorzystywana jest jako podstawa wyboru substancji emulgujących [243]. Środki powierzchniowo czynne mogą pełnić funkcje emulgujące z uwagi na posiadanie w swojej budowie części lipofilowej i hydrofilowej, a współczynnik HLB z uwagi na obecność obu typów ugrupowań, wyraża stopień polarności substancji. Emulgatory o niskich wartościach HLB stabilizują emulsje typu W/O, natomiast te bardziej hydrofilowe tworzą emulsje typu O/W. Znajomość HLB wybranego emulgatora, nie gwarantuje skuteczności dla zaprojektowanej formulacji. Ponieważ, poszczególne składniki fazy tłuszczowej, posiadają swoje indywidualne wartości HLB, do otrzymania stabilnej emulsji należy dobrać emulgator lub ich mieszaninę o wartości HLB zbliżonej do wymaganej przez fazę hydrofobową emulsji, uwzględniając, zarówno rodzaj, jak i zawartość poszczególnych związków. Emulsje też można podzielić z uwagi na rozmiar ich cząstek na: makro-, mikro- i nanoemulsje, gdzie wielkość tworzonych kropli wynosi odpowiednio od 1 μm do 100 μm , od 10 nm do 100 nm i od 20 nm do 500 nm [244]. Wielkość cząstek fazy rozproszonej jest jednym z czynników warunkujących właściwości optyczne emulsji oraz ma istotne znaczenie dla stabilności emulsji [244]. Z termodynamicznego punktu widzenia emulsje są układami dynamicznymi, które wraz z upływającym czasem podlegają procesowi rozdzielania faz. Czas starzenia i destabilizacji emulsji może być różny w zależności od mechanizmu destabilizacji, zawartości środków emulgujących, stopnia homogenizacji czy działania czynników zewnętrznych, takich jak np. temperatura czy wilgotność. Proces starzenia układów emulsyjnych zwykle obejmuje zachodzenie powolnych przemian fizycznych w kierunku zwiększania wielkości cząstek fazy zdyspergowanej, ostatecznie dążąc do uzyskania

możliwie najniższej entropii, co jest podstawową przyczyną niestabilności emulsji i całkowitego rozdzielenia obu faz [245]. Do mechanizmów destabilizacji emulsji zalicza się:

- sedymentację, polegającą na grawitacyjnym opadaniu fazy wewnętrznej w skutek różnic w ciężarze właściwym cząsteczek,
- śmietanowanie, podobnie jak sedymentacja, obejmuje grawitacyjne przemieszczanie fazy wewnętrznej, jednak w tym przypadku w kierunku powierzchni i jej gromadzenie w górnej części masy produktu,
- flokulację, czyli proces tworzenia agregatów cząsteczek fazy wewnętrznej, w wyniku ruchu cząstek ku sobie, na skutek oddziaływań van der Waalsa,
- koalescencję, obejmującą powstawanie agregatów cząstek fazy zdyspergowanej w formie większych skupisk poszczególnych cząstek, które następnie poprzez łączenie się ze sobą nawzajem, tworzą większe krople. Na skutek zwiększania różnic ciężaru właściwego kropli dochodzi do sedymentacji i całkowitego rozdziału faz emulsji. Rolę w procesie koalescencji odgrywają oddziaływania van der Waalsa oraz zjawiska Ostwalda,
- inwersję faz polegającą na nagłej zmianie typu emulsji, gdzie faza wewnętrzna staje się fazą dyspergującą, natomiast faza zewnętrzna ulega dyspersji. Odwrócenie faz może być spowodowane czynnikami zewnętrznymi, takimi jak narażenie na wysoką temperaturę lub wewnętrznymi np. użycia zbyt małej ilości środka powierzchniowo czynnego, czy zastosowanie niewłaściwej proporcji objętości faz lub zmiany w tych proporcjach (np. w skutek odparowania rozpuszczalnika),
- oswaldowskie dojrzewanie emulsji, prowadzi do dyfuzji składników emulsji fazy wewnętrznej z mniejszych miceli do większych, w wyniku różnicy ciśnień między wnętrzem miceli, a fazą rozpraszającą, w skutek czego powstają coraz większe krople, ostatecznie prowadząc do separacji obu faz [246].

Niestabilność emulsji może drastycznie wpływać na ocenę produktu i jego przydatność, dlatego pożądane jest tworzenie trwałych emulsji, stabilnych przez długi czas, odpornych na działanie czynników zewnętrznych. Spowolnienie tempa destabilizacji emulsji można osiągnąć poprzez wykorzystanie wiedzy o przygotowywanej formulacji i powszechnych metod stabilizacji:

- **wybór właściwego emulgatora, koemulgatora i innych stabilizatorów emulsji**

Z uwagi na fakt, że emulgator umożliwia powstawanie emulsji, jego wybór jest kluczowy. W przypadku złożonych mieszanin może być wymagany dodatek koemulgatorów i innych stabilizatorów emulsji, takich jak: cząstki stałe czy polimery np. guma ksantanowa, guma guar, białka. Ich obecność wpływa na właściwości reologiczne masy np. zagęszczenie, zmiany lepkości emulsji, zminimalizowanie różnic w gęstości faz czy też stopnia upakowania cząsteczek w przestrzeni masy produktu prowadząc do zmniejszenia ruchliwości cząstek fazy zdyspergowanej, a tym samym spowalniają procesy starzenia emulsji [247],

- **temperatura przechowywania**

Wraz ze wzrostem temperatury maleje lepkość emulsji. Zgodnie z regułą van't Hoffa prowadzi to do wzrostu energii kinetycznej mieszaniny, a tym samym szybkości poruszania się miceli fazy zewnętrznej i częstości ich zderzeń. Szybkość reakcji chemicznej w reakcjach jednofazowych wraz ze wzrostem temperatury o 10 °C rośnie 2 – 4 - krotnie, co w konsekwencji może prowadzić do zmian właściwości składników formułacji, w tym właściwości emulgujących substancji powierzchniowo czynnych [248],

- **uzyskanie odpowiedniego stopnia dyspersji**

Emulsje powstają w skutek mieszania dwóch faz przy obecności emulgatora. Aby uzyskać jak najbardziej jednorodną, stabilną emulsję podczas produkcji emulsji wykorzystuje się metody homogenizacji, które pozwalają na uzyskanie odpowiedniego rozdrobnienia cząstek oraz manipulację właściwościami reologicznymi emulsji [249]. W przypadku homogenizacji, wpływ na uzyskany wynik będzie miał dobór aparatury, czas i warunki atmosferyczne, w tym szczególnie temperatura i ciśnienie panujące podczas prowadzenia procesu [250]. Wskazuje się na wyższą stabilność emulsji uzyskiwaną poprzez zastosowanie homogenizatorów wysokociśnieniowych w porównaniu do konwencjonalnych, mechanicznych homogenizatorów [251]. Istotne znaczenie dla uzyskania właściwej mikronizacji cząstek będzie też miała temperatura procesu, z uwagi na to, że zarówno lepkość, jak i napięcie międzyfazowe zmniejszają się wraz ze wzrostem temperatury [252],

- **zapewnienie masie produktu właściwej ochrony**

Istotnym elementem wpływającym na stabilność produktu jest jego opakowanie, które zabezpiecza produkt i chroni masę kosmetyku przed nadmiernym gromadzeniem się powietrza oraz czynnikami zewnętrznymi np. wilgotnością czy promieniowaniem UV [253], [254]. W przypadku wyboru opakowania należy uwzględnić skład i formę aplikacyjną produktu. Aby przedłużyć stabilność emulsji, tworzywo, z którego wykonane jest opakowanie powinno być kompatybilne z masą kosmetyczną i nie reagować ze składnikami masy kosmetycznej, a także stanowić dobrze dobraną barierę przed wpływem środowiska zewnętrznego. Niestety do tej pory nie ustanowiono norm obejmujących ocenę bezpieczeństwa opakowań produktów kosmetycznych, dlatego obecnie podlegają one normom opakowań przeznaczonych do kontaktu z żywnością [253].

2.7.1.2. Żel

Odpowiedni wybór postaci kosmetyku zapewnia bezpieczeństwo, skuteczność działania oraz atrakcyjność sensoryczną. Żele kosmetyczne, cieszące się dużym zainteresowaniem z uwagi na swoje właściwości, „gęsty” wygląd sugerujący bogactwo składników aktywnych, lekkość podczas nakładania i przyjemne rozprowadzanie, zachęcają do wyboru właśnie tej postaci. Do formy żelu zaliczają się wszystkie układy minimum dwuskładnikowe, w którym każdy ze składników tworzy oddzielną, ciągłą fazę znajdującą się w całej objętości masy. Żele powstają na skutek koagulacji zolu, czyli gdy cząsteczki jednej z faz stykają się ze sobą i łączą, tworząc przestrzenną, porowatą strukturę

unieruchamiającą drugą fazę. Formułacje żelowe można podzielić pod kątem charakteru fazy rozpraszającej na: (i) hydrożele, gdzie najczęściej bazę stanowi woda, (ii) oleożele, w których fazę rozpraszającą stanowią substancje tłuszczowe oraz (iii) organożele zawierające rozpuszczalniki organiczne np. alkohole. Wiele z dostępnych na rynku kosmetyków w formie żelu to heterożele zawierające w swoim składzie różne chemicznie fazy. W kosmetyce najczęściej wykorzystywane są żele tworzone głównie na bazie polimerów (większość żeli do twarzy, układania włosów) lub środków powierzchniowo czynnych (żele do kąpieli, szampony, mydła w płynie). Do tworzenia żelu może dochodzić pod wpływem dodatku elektrolitów, temperatury, zmian pH lub na skutek zachodzących w mieszaninie reakcji chemicznych i oddziaływań, w odpowiedzi na działanie czynników zewnętrznych [255]. Wymienione żele opisano poniżej.

- Żele polimerowe – ich właściwości elastyczne wynikają z usieciowania włókien polimerowych, gdzie grupy w łańcuchach polimeru zaczynają ze sobą reagować, tworząc przestrzenną sieć. Polimery mogą podlegać sieciowaniu poprzez wiązania wodorowe, oddziaływania van der Waalsa lub wiązania kowalencyjne. W branży kosmetycznej popularnie stosuje się karbomery, celulozę i jej pochodne, poliakrylan sodu, które mogą podlegać samoistnemu sieciowaniu lub po zapewnieniu odpowiednich warunków np. pH lub temperatury,
- Żele tworzone przy pomocy środków powierzchniowo czynnych - związki te są zdolne do samoorganizacji cząsteczek w rozmaite mikrostruktury, różne rodzaje miceli, pęcherzyki i elastyczne dwuwarstwy [256]. Układ jaki utworzy środek powierzchniowo czynny może w określonych warunkach, np. przy odpowiednim stężeniu środka powierzchniowo czynnego (surfaktantu) lub z dodatkiem niektórych substancji (soli, regulatorów pH, kosurfaktantów) wpływać na właściwości reologiczne mieszaniny, zmieniając jej lepkość i nadając żelowe zachowanie. Wiele środków powierzchniowo czynnych wykorzystywanych w przemyśle kosmetycznym, takich jak: Sodium Lauryl Sulfate (SLS), Sodium Laureth Sulfate (SLES), Sodium Coco Sulfate (SCS) czy betaina w czystych roztworach wodnych, stanowią nisko lepkie mieszaniny, natomiast po zapewnieniu odpowiednich warunków są zdolne do żelowania. W ich przypadku wystarczy np. dodatek soli, który prowadzi do reorganizacji miceli np. poprzez zmianę ich kształtu i przestrzennego rozmieszczenia, w skutek odpychania pomiędzy naładowanymi grupami środków powierzchniowo czynnych, prowadząc do formowania izotropowych miceli cylindrycznych przypominających pręciki [257].

2.7.1.3. Maść

Produktom w formie maści, z uwagi na swą tłustą postać, dość ciężko jej się przebić na rynek kosmetyczny, jednak w wielu przypadkach znajdują zastosowanie w farmacji, gdzie wskazuje się na jej atrakcyjne cechy np. ułatwienia uwalniania z postaci produktu, czy łatwiejszego przenikania niektórych substancji aktywnej w głąb skóry [203], [204], [258]. Zarówno dostępność farmaceutyczna, jak i dostępność biologiczna świadczą o skuteczności maści jako nośnika dla substancji aktywnych, gdzie dostępność farmaceutyczna opisywana jest jako kinetyka i stopień uwalniania substancji aktywnej, natomiast zdolność przenikania

transepidermalnego, określana jest jako biodostępność [259], [260]. W kosmetyce, maści wykorzystywane są do pielęgnacji skóry problematycznej, bardzo suchej, atopowej, skłonnej do podrażnień lub przy innych patologicznych stanach, gdzie pożądana jest odbudowa warstwy ochronnej skóry lub pewien stopień okluzji. Ze względu na niewielką liczbę składników, poza nośnikiem, tej formie przypisuje się niskie ryzyko uczulenia i podrażnienia. Maścią określa się homogeniczny układ substancji w lepkiej formie półstałej, występujący najczęściej w postaci mieszaniny związków lipofilowych lub emulsji W/O o dużej zawartości oleju [261]. Maści można podzielić z uwagi na jej postać fizykochemiczną [258], [262] na:

- maści w postaci roztworów, gdzie substancje aktywne rozpuszczone są w nośniku, zwykle wykorzystuje się roztwory nienasycone, aby zapobiec wytrącaniu podczas przechowywania (np. maści mentolowe, z olejkami eterycznymi np. majerankowa czy z witaminami),
- maści w postaci emulsji stanowią szczególny przykład emulsji W/O, w których zawartość fazy tłuszczowej stanowi nawet 80 %. Występuje w postaci gęstych, tłustych kremów,
- maści w postaci zawiesin stanowią układ, w którym cząstki stałe zawieszono są w nośniku i nie rozpuszczają się w żadnym ze składników formacji. Substancje stałe zawarte w maściach powinny być drobno sproszkowane lub zmikronizowane, tak by nie przekraczać średnicy 90 μm [263], [203]. Układy te mogą być dwufazowe, gdy substancja nierozpuszczalna zawieszona jest w bazie produktu stanowiącej układ jednorodny lub wielofazowe, gdy bazę stanowi podłoże emulsyjne. W przypadku, gdy objętość cząstek stałych przekracza 40 % objętości całej masy produktu taką formę określa się jako pasta [203].

2.7.1.4. Inne postaci kosmetyków

Różnorodność postaci kosmetycznych pozwala na wielokierunkowe manipulacje właściwościami fizykochemicznymi i sensorycznymi produktów, w zakresie ich aplikacji i działania. Poza wcześniej wspomnianymi formami produktów na rynku kosmetycznym dostępne są także kosmetyki w postaci płynnej, ciał stałych i aerozole [264]. Płyny obejmują przede wszystkim toniki, płyny oczyszczające ze spieniaczem, wody lamelarne, płyny micelarne, płukanki i wcierki do włosów, olejki do masażu, hydrolaty do twarzy i ciała, w których nośnik dla substancji aktywnych stanowi woda, olej lub rozpuszczalniki organiczne. Najczęściej są to produkty jednofazowe, w których rozpuszczone są składniki aktywne, choć dostępne są także, szczególnie w przypadku produktów do demakijażu i do pielęgnacji włosów, płyny dwufazowe z widoczną granicą faz. Inny przykład różnorodności form aplikacyjnych stanowią produkty w postaci stałej, do której wliczają się wszystkie twarde mydła, szampony i odżywki w kostce czy kule kąpielowe, które przeznaczone są do użytku po uprzednim rozcieńczeniu wodą. Kolejną grupę postaci wyrobów kosmetycznych stanowią aerozole występujące w postaci sprężonych pod ciśnieniem gazów. W tej grupie znajdują się lakiery do włosów, dezodoranty, suche szampony, produkty do włosów i stóp, które charakteryzują się dużą wydajnością przy jednocześnie łatwej aplikacji.

2.8. Aspekty prawne i bezpieczeństwo

Opracowywane formułacje z uwagi na ich aplikację i przeznaczenie do bezpośredniego kontaktu ze skórą mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumentów [265], [266]. Aby temu zapobiec branża kosmetyczna podlega szeregowi restrykcyjnych regulacji prawnych, zgodnie z którymi należy postępować podczas wszystkich etapów wprowadzania produktu na rynek i obrotu nim. Obowiązujące w Polsce regulacje znajdują się w dwóch zasadniczych aktach prawnych, na poziomie krajowym normy przedstawione są w Ustawie o Produktach Kosmetycznych z dnia 4 października 2018 r., Dz.U. 2018 poz. 2227., natomiast na poziomie unijnym w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczącym produktów kosmetycznych. Powyższe dokumenty, poza ogólnymi wytycznymi dotyczącymi oznakowania, odpowiedzialności i konieczności niektórych badań, precyzyjnie wskazują składniki kosmetyczne, które objęte są ograniczeniami stosowania (dotyczące ich dopuszczalnych stężeń) oraz wskazują listę substancji zakazanych. Listy są często aktualizowane przez Komisję Europejską, na podstawie nowych badań i doniesień, dlatego ogromny wpływ na bezpieczeństwo stosowania produktów ma monitorowanie wprowadzanych zmian legislacyjnych. Dla uregulowania procedur panujących podczas produkcji kosmetyków w krajach Unii Europejskiej wprowadzone zostały zasady określające Standardy Dobrej Praktyki Produkcyjnej (GMP – ang. Good Manufacturing Practice), które opublikowane zostały w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej, a do ich stosowania obliguje również wyżej wymienione Rozporządzenie 1223/2009. Zasady ujęte w GMP obejmują całkowitą kontrolę przestrzegania higieny w miejscu pracy i dbania o jakość produktu, poczynając od momentu zakupu surowców, ich przechowywania, produkcji masy kosmetycznej, konfekcjonowania, magazynowania gotowego produktu aż do jego sprzedaży na rynek [267]. Tworzone są specjalistyczne procedury, obejmujące cały proces produkcji, zarówno dla pracy maszyn, pracy zatrudnionych ludzi, jak i miejsca pracy. Określają one zasady i warunki konieczne do spełnienia, których przestrzeganie zapewnia wysoką kontrolę nad pracą zakładu i wyeliminowanie lub zminimalizowanie przypadkowych zdarzeń. Dla potwierdzenia bezpieczeństwa i jakości produktu kosmetycznego rozporządzenie obliguje również osobę odpowiedzialną do wykonania szeregu badań wskazujących czystość mikrobiologiczną, właściwe zakonserwowanie, wartość potencjału drażniącego na podstawie badań dermatologicznych, stabilność produktu kosmetycznego i jego kompatybilność z opakowaniem, właściwości aplikacyjne oraz całkowitą ocenę bezpieczeństwa produktu w oparciu o analizę toksykologiczną formułacji i uzyskane wyżej wymienione badania produktu [268]. Każdy podmiot pełniący funkcję osoby odpowiedzialnej zobowiązany jest także do zarejestrowania produktu za pośrednictwem portalu CPNP (ang. Cosmetic Products Notification Portal) przed wprowadzeniem go do obrotu na terenie krajów Unii Europejskiej.

2.8.1. Badania mikrobiologiczne i testy konserwacji

Czystość produktów kosmetycznych jest kluczowym parametrem poświadczającym wymagany stopień jakości zapewniający konsumentom bezpieczeństwo stosowania. Aby ją potwierdzić przeprowadzane są testy mikrobiologiczne, w tym podstawowe i obligatoryjne badanie czystości mikrobiologicznej dla wszystkich produktów kosmetycznych oraz testy konserwacji, które w niektórych przypadkach mogą zostać pominięte [269]. W przypadku określenia czystości mikrobiologicznej badania mają za zadanie potwierdzić, że kosmetyk jest wolny od mikroorganizmów lub nie zostały w nim przekroczone dopuszczalne limity [270]. W tym przypadku chodzi o wykrycie skażeń pierwotnych, które mogły pojawić się w produkcji w skutek użycia zanieczyszczonych surowców oraz zanieczyszczenia podczas procesu produkcji lub konfekcjonowania. Pracując zgodnie z dobrą praktyką produkcji, zakażenia na poziomie samego procesu produkcyjnego zwykle się nie zdarzają, jednak warto zwrócić uwagę na potencjalne zagrożenia. Zakażenia mogą wynikać z niedostatecznej higieny w miejscu pracy związanej z niedokładnym czyszczeniem sprzętu używanego do produkcji oraz nieprzestrzeganiem zasad panujących podczas procesu, dlatego niezwykle ważne jest przestrzeganie wszystkich procedur panujących w zakładzie i w razie potrzeby ich bieżąca aktualizacja [271], [272]. Potencjalnym źródłem infekcji mogą być również surowce o dużej zawartości wody, które stanowią doskonałe medium do rozwoju mikroorganizmów, szczególnie w przypadku, gdy surowiec używany jest wielokrotnie, w pewnych odstępach czasu a jego opakowanie jest wielokrotnie otwierane narażając na ponową możliwość jego zainfekowania [273]. Produkty pochodzenia roślinnego, z uwagi na znaczną ilość związków organicznych, różnorodność ich pochodzenia, metod pozyskiwania, przechowywania i przetwarzania podobnie, jak surowce o wysokiej hydratacji mogą stanowić potencjalne źródło niebezpieczeństwa skażenia mikrobiologicznego nawet już w trakcie pozyskiwania materiału roślinnego do ekstrakcji [274]. Surowce, które mogłyby stanowić potencjalne zagrożenie, dystrybutorzy zabezpieczają konserwantami i innymi dodatkami, które mają za zadanie zapewnić im stabilność mikrobiologiczną w całym zakresie terminu przydatności do użycia [275]. Rzetelni dystrybutorzy wraz z surowcami dostarczają całą dokumentację dotyczącą bezpieczeństwa, wykorzystania i technologii. W celu uniknięcia późniejszych komplikacji, warto się z nimi dokładnie zapoznać przed wyborem danego surowca. Aby sprawdzić czystość mikrobiologiczną produktu przeprowadza się analizy ilościowe oraz jakościowe pozwalające na wykrycie obecności i identyfikację niepożądanych tlenowych bakterii mezofilnych, drożdży i innych mikroorganizmów chorobotwórczych, takich jak: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans* [276], [277], [278], [279]. Drugi rodzaj występujących infekcji stanowią zakażenia wtórne, które związane są z zanieczyszczeniem produktu podczas jego użytkowania, co może wiązać się z brakiem obecności konserwantu, jego złym doborem lub niewłaściwym stężeniem [275]. Większość produktów, dla zapewnienia bezpieczeństwa ich stosowania, wymaga w swoim składzie obecności konserwantów, choć istnieją pewne grupy produktów, które określa się mianem niskiego ryzyka mikrobiologicznego. Produkty te są zwykle odporne na zanieczyszczenia z uwagi na wyjątkowo niekorzystne środowisko do rozwoju mikroorganizmów, jak skrajne wartości pH, niska aktywność wody, czy odpowiednia zawartość alkoholu [269]. W przypadku

wykazania w produkcie cech niskiego ryzyka mikrobiologicznego zgodnie z normą ISO 29621:2017, zakonserwowanie i testy konserwacji mogą zostać pominięte. W przypadku produktów znajdujących się w grupie ryzyka mikrobiologicznego konieczne jest przeprowadzenie testu zakonserwowania produktu, którego zadaniem jest potwierdzenie zdolności zastosowanego konserwantu w konkretnym stężeniu do zabezpieczenia produktu przed wtórnym zakażeniem [275]. W tym celu prowadzone są testy obciążeniowe polegające na celowej kontaminacji produktu wybranymi szczepami patogenów, a następnie obserwacji redukcji patogenów w czasie. Używanie skażonego produktu może być bardzo niebezpieczne dla konsumentów i prowadzić do uszczerbku na zdrowiu [272], [280], [281], [282]. Z uwagi na obecność patogenów, produkt poza możliwością utraty swoich właściwości, może podlegać pewnym zmianom fizykochemicznym np. zmianom pH na skutek produkcji metabolitów przez obecne w produkcie mikroorganizmy [272]. Obecność patogenów może wywoływać zakażenia skóry oraz błon śluzowych i oczu, prowadzić do podrażnienia, zaczerwienienia, obrzęków czy uszkodzeń naskórka, a także dalszych konsekwencji zdrowotnych [283]. Z tego powodu niezwykle istotne jest uwzględnianie wszystkich procedur produkcyjnych, korzystanie z surowców pochodzących z rzetelnych źródeł oraz sumienne prowadzenie badań, nie tylko przed wdrożeniem, ale również podczas kontroli jakości każdej partii produktu kosmetycznego.

2.8.2. Badania dermatologiczne

Kolejnym etapem procedury potwierdzającej bezpieczeństwo stosowania produktu kosmetycznego jest badanie dermatologiczne, polegające na ocenie potencjału drażniącego i alergizującego gotowej formułacji [268]. Z uwagi na indywidualną wrażliwość ludzi na kontakt z substancjami chemicznymi, każdy kosmetyk może stanowić potencjalne źródło zagrożenia zdrowia. Pomimo przestrzegania restrykcyjnych procedur dopuszczających produkty do obrotu stale są zgłaszane działania niepożądane ich stosowania, które rozumiane są jako jakkolwiek niekorzystny wpływ na zdrowie ludzkie, będący wynikiem normalnego lub dającego się racjonalnie przewidzieć stosowania produktu kosmetycznego [284]. Efekty uboczne mogą być skutkiem drażniącego działania zawartych w produkcie substancji, jak również mogą wykazywać charakter nadwrażliwości osobniczej, określanej jako powtarzalna, nieprawidłowa reakcja wywoływana w skutek ekspozycji na dany czynnik w dawce dobrze tolerowanej przez osoby zdrowe [285], co oznacza, że jako podłoże wskazuje się zarówno mechanizmy immunologiczne, czyli alergie i nieimmunologiczne – nietolerancje i nadwrażliwości niealergiczne. Formułacje kosmetyków zawierają od kilku do nawet kilkudziesięciu pojedynczych składników, z których u wielu wykazano właściwości drażniące lub alergizujące. Za szczególnie powszechnie występujące związki alergenowe uważane są konserwanty [286], związki chromu, kobaltu i niklu [287], składniki kompozycji zapachowych, takie jak: limonen [288], choć z uwagi na złożoność składu zwykle ciężko jest ustalić, który z jego komponentów odpowiada za wystąpienie działań niepożądanych. Aby zminimalizować ryzyko dopuszczenia na rynek produktów mogących powodować efekty uboczne, przed wdrożeniem przeprowadzane są testy dermatologiczne. Powszechnie w tym celu wykorzystuje się naskórkowe testy płatkowe tzw. patch test, polegające na aplikacji produktu na skórę w specjalnych komorach, zabezpieczonych

wodoodpornym, hipoalergicznym plastrem [289]. Odczytu dokonuje się w ustalonych odstępach czasu zwykle po 48, 72 godzinach od aplikacji. Badanie przeprowadzane jest pod stałą opieką lekarza dermatologa, na grupie ochotników spełniających wymagania dotyczące włączenia do badań. W przypadku prowadzenia testów na osobach, u których nie stwierdzono występowania alergii na którykolwiek ze składników badanego produktu, potwierdza się, że badany produkt jest dobrze tolerowany przez skórę normalną, natomiast w przypadku niewykazania drażniącego potencjału w badaniu prowadzonym na ochotnikach ze zdiagnozowaną skórą pod kątem atopii, alergii i reakcji kontaktowych wskazuje się na właściwości hipoalergiczne i zalecenie do stosowania dla konsumentów ze skórą wrażliwą.

2.8.3. Badania stabilności i kompatybilności z opakowaniem

W teorii, stabilność obejmuje właściwości danego układu, zapewniające mu powrót do stanu równowagi, po ustaniu działania czynnika zakłócającego [248]. W przypadku produktów kosmetycznych, stanowią one układy, które muszą charakteryzować się takimi cechami odporności na działanie czynników, zarówno wewnętrznych, jak i zewnętrznych, które nie pozwolą zachwiać jego pierwotnego stanu, co oznacza, że produkty kosmetyczne powinny być trwałe, niepodatne na zmiany i wpływ czynników endo- i egzogennych podczas całego czasu przydatności do użycia [290]. Jako zmiany, w tym przypadku, określane są wszelkie wahania parametrów sensorycznych, najczęściej widoczne gołym okiem (np. wygląd, zapach, konsystencja) oraz fizykochemicznych, często leżących u podłoża zmian sensorycznych, jednak zwykle niewidocznych wizualnie (np. pH, gęstość, lepkość, aktywność wody, dezaktywacja substancji aktywnych, przeciwutleniaczy czy zmniejszenie skuteczności konserwantów) zachodzące podczas całego okresu przechowywania produktu. Znaczący wpływ na stabilność gotowego produktu ma zaprojektowana formuła, czyli dobór składników, które powinny tworzyć kompatybilną mieszaninę wraz z prawidłowo dobranym układem konserwującym działającym w odpowiednim pH, zapewniającym, zarówno właściwe warunki dla działania konserwantu, jak również bezpieczeństwo stosowania na skórę i błony śluzowe. Istotną rolę pełni także walidacja procesu technologicznego i czyszczenia urządzeń, które mogą stanowić źródło niestabilności. Nie bez znaczenia jest również dobór opakowania, które powinno być wyselekcjonowane w oparciu o rodzaj produktu oraz możliwości aplikacyjne, tak by jak najbardziej zabezpieczyć masę kosmetyczną i ograniczyć działanie potencjalnych czynników zakłócających jej stabilność. Biorąc pod uwagę powyższe założenia, badanie stabilności i kompatybilności produktu z opakowaniem obejmuje obserwację i ocenę masy kosmetycznej w określonym czasie i warunkach przechowywania imitującym racjonalnie dające się przewidzieć warunki panujące podczas magazynowania, transportu i użytkowania, mające na celu przewidzenie zdolności do zachowania jej stanu pierwotnego w czasie całego ustalonego okresu przydatności. Z uwagi na złożoność badań w planowaniu i przeprowadzaniu badań stabilności warto wspomóc się dostępnymi przewodnikami, takimi jak:

- IFSCC Monograph the Fundamentals of Stability Testing,
- ICH harmonized tripartite guideline stability testing,

- WHO stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products,
- ISO/TR 18811:2018 cosmetics – guidelines on the stability testing of cosmetic products,
- Cosmetics Europe guidelines on stability testing of cosmetic products,

w których zawarty jest wiele cennych wskazówek i wytycznych pozwalających na prowadzenie rzetelnych testów, a także ułatwiających dobór odpowiednich warunków i czasu badań. Testy stabilności wraz z badaniami mikrobiologicznymi pozwalają na ustalenie terminu przydatności analizowanego produktu, który zgodnie z rozporządzeniem 1223/2009 musi być umieszczony na etykiecie z jednoznacznie wskazaną datą. Wyjątkiem od tej reguły jest produkt, dla którego termin przydatności przekracza 30 miesięcy, wtedy na opakowaniu podawany jest czas, w jakim produkt po otwarciu jest bezpieczny dla konsumenta. Dla takich produktów badanie stabilności prowadzone jest pod kątem PAO (ang. Period After Opening), i obejmuje badanie trwałości produktu w warunkach imitujących jego użytkowanie. Z uwagi na złożoność mieszanin z jakimi obecnie mamy do czynienia na rynku kosmetycznym, podczas prowadzenia badań stabilności, do każdego produktu należy podejść indywidualnie i wybrać takie warunki i czas badania, żeby móc jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy produkt podczas używania i przechowywania będzie stabilny. Zrozumienie przyczyn pojawiających się niestabilności pozwala na zaprojektowaniu takiego produktu i doboru takiego opakowania lub wprowadzenie innych zmian w produkcji czy procesie, które zapewnią bezpieczeństwo i zadowolenie konsumentów.

2.8.3.1. Testy w komorach klimatycznych

Badanie stabilności i kompatybilności produktu z opakowaniem jest kluczowym elementem bezpieczeństwa produktu kosmetycznego, pozwala określić trwałość i odporność gotowego produktu na procesy starzenia wynikające z działania, zarówno czynników wewnętrznych, jak i zewnętrznych. W celu przeprowadzenia testów stabilnościowych, w tym długookresowych w czasie rzeczywistym, przyspieszonych testów starzeniowych, czy testów odporności na skrajne warunki wykorzystywane są komory klimatyczne, pozwalające na wytworzenie, utrzymanie i monitorowanie danego, ściśle określonego mikroklimatu podczas trwania całego badania [291]. W komorach klimatycznych z łatwością można osiągnąć określone warunki, np. środowiska naturalnego z uwzględnieniem różnic między porami dnia, czy też zmian następujących zgodnie z porami roku, jak również sztucznych warunków w szerokim zakresie temperatur, wilgotności, ciśnienia, promieniowania oraz wielu innych parametrów. Obecnie, dostępne na rynku komory klimatyczne są wysoce zaawansowanymi urządzeniami pozwalającymi na pracę zgodnie ze standardami GMP odnośnie kontroli i rejestrowania warunków w każdej chwili badania oraz są wyposażone w dodatkowe systemy zabezpieczające przed ich niekontrolowanymi zmianami. Możliwość regulacji wartości zadanych parametrów i precyzyjnego ich utrzymywania przez długi czas, często przekraczający kilka miesięcy, umożliwia przeprowadzenie rzetelnej oceny wpływu czynników zewnętrznych na procesy

starzenia się badanych produktów, jak również jego stabilność. Według prawa Arrheniusa szybkość zachodzących reakcji podwaja się wraz ze wzrostem temperatury o każde 10 °C, natomiast zgodnie z regułą van't Hoff'a wraz ze wzrostem temperatury wzrasta średnia prędkość cząstek, ich energia kinetyczna oraz liczba efektywnych zderzeń, przypisując wzrostowi temperatury o 10 °C, nawet 2 - 4-krotnie przyspieszenie szybkości reakcji [291]. W związku z powyższymi regułami, w praktyce często przyjmuje się, że produkt przechowywany przez okres od 8 do 12 tygodni w temperaturze ok. 45 °C, który nie wskazuje na zachodzące w nim znaczące zmiany względem specyfikacji, jest wyznacznikiem stabilności przez 2 lata w warunkach temperatury pokojowej [248], [291]. W bardziej skomplikowanych przypadkach (produkty wieloskładnikowe), gdzie znacznie trudniej jest przewidzieć zachodzące reakcje, przyjmuje się, że ich stabilność przy przechowywaniu przez 12 tygodni w temperaturze ok. 40 °C, będzie odpowiadać rocznej stabilności w temperaturze pokojowej. Produkty przechowywane w komorach stabilności, najczęściej po okresie sezonowania, poddawane są analizom z wykorzystaniem metod organoleptycznych, pomiarów fizykochemicznych i analitycznych w celu wykazania zachodzących zmian.

2.8.3.2. Ocena organoleptyczna

Ocena organoleptyczna stanowi podstawową metodę oceny stabilności produktów kosmetycznych obejmującą subiektywną opinię osoby dokonującej analizy produktów na podstawie doświadczeń i odczuć sensorycznych, poprzez wykorzystanie zmysłów wzroku, dotyku, smaku, zapachu i dźwięku [292]. Dużą wadą oceny sensorycznej jest jej subiektywizm, dlatego analizy powinny być wykonywane przez przeszkolonych oceniających lub grupę ekspertów, którzy korzystają z ustalonych kryteriów oceny celem uzyskania miarodajnych wyników [293]. Metody oceny organoleptycznej, pod kątem badań stabilności, obejmują analizę opisową oraz porównawczą, gdzie na początku badań dokonywana jest charakterystyka sensoryczna analizowanego produktu, a następnie po okresie sezonowania w określonych warunkach, oceniający porównuje produkt z jego próbką referencyjną, sprawdzając zgodność obu opisów. Na powtarzalność oceny organoleptycznej i rzetelność jej wyników, w odniesieniu do oceny stabilności kosmetyków, wpływa wiele czynników, takich jak: stan zdrowia osoby dokonującej oceny, szczególnie samopoczucie fizyczne i psychiczne wpływające na wrażliwość zmysłową oraz warunki w jakich prowadzone jest badanie, w tym miejsce, oświetlenie, temperatura, pora dnia i wiele innych [292]. Badanie sensoryczne stanowi istotną część procesu produkcyjnego, pomagając już na różnych etapach: (i) w ocenie produktu pod kątem jego atrakcyjności i ustaleniu jego sensorycznych standardów jakościowych przed wdrożeniem na rynek, (ii) sprawdzeniu jego stabilności podczas procesu wdrażania, a także (iii) w kontroli jakości podczas wytwarzania kolejnych partii. W przypadku kosmetyków ze względów praktycznych oraz bezpieczeństwa, do oceny sensorycznej, wykorzystuje się jedynie wzrok, zapach oraz dotyk, które zgodnie z przeznaczeniem produktu łącznie dają wystarczający obraz produktu i jego aplikacji do stwierdzenia wystąpienia zmian w produkcie względem próbki referencyjnej. W celu opracowania charakterystyki sensorycznej pod uwagę brane są właściwości produktu [294]:

CZĘŚĆ LITERATUROWA

- wygląd – określający grupę właściwości produktu, które można zauważyć gołym okiem, opisujących wizualne cechy masy kosmetycznej, w tym jej kolor pod kątem barwy, połysku i jednolitości w całej objętości. Produkt oceniany jest pod kątem widocznej niejednorodności masy i obecności zanieczyszczeń mechanicznych oraz rozwarstwienia faz,
- zapach – obejmujący cechy produktu wyczuwalne przy pomocy węchu, wykrywanie nut zapachowych, trwałość i intensywność. Szczególną uwagę należy zwrócić na pojawienie się obcych nut zapachowych, czy utratę intensywności pierwotnego zapachu,
- tekstura – będąca formą właściwości strukturalnych i reologicznych masy kosmetyku, ze zwróceniem szczególnej uwagi na konsystencję, w tym jej gładkość, obecność grudek, rozsmarowywalność.

Wszelkie odchylenia od stanu pierwotnego, takie jak: pojawienie się rozwarstwień, strączeń, obecności dodatkowych faz, zmiany koloru czy obecność grudek wskazują na niestabilność ocenianego produktu i jego nieprzydatność do użycia, choć w niektórych przypadkach, o ile zachodzące w produkcji zmiany są jedynie wadą sensoryczną i nie zagrażają bezpieczeństwu jego stosowania, nie stanowią kryterium niedopuszczenia do obrotu. Pojawiające się zmiany mogą świadczyć o niewłaściwym doborze surowców, ich złej jakości lub niedostatecznym zabezpieczeniu produktu przed utlenianiem, rozpadem termicznym lub hydrolizą składników prowadzących do ich degradacji i dezaktywacji [295].

2.8.3.3. pH

Wartość pH stanowi podstawowy parametr fizjologiczny skóry mający odzwierciedlenie w jej kondycji i utrzymaniu funkcji barierowości, a tym samym odnosi się do bezpieczeństwa użytkowania kosmetyków [296]. Prawidłowe pH skóry jest kwasowe i wynosi średnio od 4,1 do 5,8, choć warto mieć na uwadze, że jest to parametr swoisty i może się różnić w zależności od wieku, płci, rasy i innych czynników środowiskowych [297], [298]. W związku z korelacją pH naskórka z utrzymaniem funkcji ochronnej i stałego mikrobiomu stosowanie kosmetyków o niekompatybilnym z powierzchnią skóry pH, może mieć niekorzystny wpływ na stan naskórka, a nawet pojawienie się podrażnień infekcji i stanów zapalnych [299], [300]. Pomiar pH polega na określeniu stopnia kwasowości lub zasadowości produktów, na podstawie aktywności jonów wodorowych, którą ocenia się poprzez pomiar siły elektromotorycznej dzięki sondzie zbudowanej z dwóch elektrod: wskaźnikowej, której potencjał zależy od stężenia jonów wodorowych i elektrody referencyjnej, o stałym potencjale w czasie trwania pomiarów [301]. W związku z tym, że pomiar pH ma zastosowanie jedynie w odniesieniu do roztworów wodnych w przypadku kosmetyków, odpowiednio można wobec powyższego analizować pH w formułacjach wodnych i emulsjach O/W. W przypadku formułacji bezwodnych lub o niskiej zawartości wody do oceny parametrów fizykochemicznych wykorzystywane są pozostałe metody instrumentalne. Pierwotnie kosmetyki do pielęgnacji twarzy i ciała wdrażane na rynek powinny mieć wyregulowane pH, tak by nie wpływać na zaburzenie fizjologicznych

parametrów skóry. Nie zawsze jest to jednak możliwe z uwagi na obecność składników np. kwasowych (w przypadku produktów złuszczących) lub buforujących, gdzie próby regulacji pH skończyłyby się dezaktywacją działania produktu lub destabilizacją reologiczną. W takich przypadkach, zgodnie z zaleceniami zawartymi w rozporządzeniu o kosmetykach, na opakowaniach umieszcza się specjalne ostrzeżenia dotyczące zawartości produktu i jego stosowania [268]. Problem stanowią produkty, które początkowo charakteryzują się właściwą wartością pH dla stosowania na skórę, jednak w czasie przechowywania dochodzi do drastycznych zmian. Takie przemiany świadczą o ewidentnej niestabilności produktu, która może być wynikiem reakcji zachodzących w masie kosmetycznej, jak również wzrostu mikroorganizmów, których obecność i wytwarzanych przez nie metabolitów powoduje zmiany pH. Ustabilizowane pH w produkcie kosmetycznym przy codziennym stosowaniu może przyczynić się do utrzymania zdrowia skóry poprzez korygowanie jej wartości pH, a w przypadku wystąpienia stanów chorobowych może stanowić też narzędzie terapeutyczne pomagające w przywracaniu prawidłowej bariery ochronnej skóry [302].

2.8.3.4. Lepkość

Lepkość stanowi istotny parametr opisujący właściwości masy kosmetycznej z uwagi na wpływ na kinetykę przenikania substancji z formułacji przez kolejne warstwy naskórka oraz nadanie odpowiednich cech aplikacyjnych, w tym rozsmarowanie produktu czy łatwość wydostania z opakowania np. tubki. Lepkością określaną jest charakterystyczna właściwość, specyficzna dla ciekłych układów, obejmująca występowanie oporów przepływu podczas płynięcia, które są skutkiem sił tarcia wewnętrznego pomiędzy przesuwanymi się względem siebie warstwami cząsteczek tworzących układ. Zdolność płynów do przenoszenia naprężeń stycznych obserwowalna jest wyłącznie podczas ruchu i stanowi odpowiednik współczynnika tarcia występującego w przypadku układu ciał stałych. Lepkość wyrażana jest w postaci siły stycznej na jednostkę powierzchni niezbędnej do równoległego przesunięcia się względem siebie warstw cieczy przy prędkości 1 m/s, na odległość 1 m.

- Lepkość dynamiczna – będąca miarą przepływu, określająca stosunek naprężeń ścinających do szybkości ścinania (Równanie 1) wyrażona w układzie SI w Paskalosekundach [kg/(m*s)] lub w układzie CGS jako Puaz [Pa*s]

Równanie 1. Równanie opisujące lepkość dynamiczną

$$\eta = \tau / \left(\frac{dv}{dx} \right)$$

gdzie:

η - współczynnik lepkości dynamicznej,

τ - naprężenia styczne,

dv/dx – szybkość ścinana określana stosunkiem gradientu prędkości do odległości przesunięcia.

CZĘŚĆ LITERATUROWA

- Lepkość kinematyczna – opisująca korelację pomiędzy lepkością dynamiczną i gęstością badanej substancji, wyrażona w układzie SI w [m²/s] lub w układzie CGS jako Stokes [cm²/s] (Równanie 2).

Równanie 2. Równanie opisujące lepkość kinematyczną

$$\nu = \eta/\rho$$

gdzie:

ν - lepkość kinematyczna,

η - współczynnik lepkości dynamicznej,

ρ - gęstość substancji.

- Lepkość względna – określająca stosunek lepkości dynamicznej badanej substancji do lepkości dynamicznej wzorca, wyznaczana najczęściej poprzez porównanie czasu wypływu obu cieczy przez kubek wypływowy lub przy pomocy lepkościomierza porównawczego.

Lepkość cieczy związana jest z oddziaływaniami międzycząsteczkowymi, gdzie powstające opory cieczy powodowane są wzajemnym przyciąganiem cząsteczek w układzie. W związku z wpływem temperatury na energię kinetyczną cząsteczek i ich siły przyciągania, wartość lepkości substancji w dużej mierze uzależniona jest od temperatury, dlatego podczas prezentowania wyników konieczne jest podanie, w jakiej temperaturze wykonano oznaczenie [303]. Do pomiaru lepkości wykorzystywane są wiskozymetry, z których najpopularniejsze to [304]:

- wiskozymetry kapilarne, mierzące czas przepływu cieczy przez skalibrowaną rurkę kapilarną,
- wiskozymetry rotacyjne, analizujące siłę oporu, jaką wywołuje badana ciecz umieszczona pomiędzy dwoma umieszczonymi współosiowo cylindrami (wrzecionami) wprawionymi w ruch obrotowy,
- reowiskozymetry, określające czas opadania, najczęściej pod wpływem siły ciężkości, standaryzowanej kulki w przezroczystej rurce wypełnionej badaną substancją.

W badaniu lepkości produktów kosmetycznych najczęściej wykorzystuje się pomiary lepkości dynamicznej [305] przy pomocy wiskozymetrów rotacyjnych, w których miarą lepkości cieczy jest prędkość obrotowa, wskazana po przyłożeniu określonego momentu obrotowego. Wartość wskazań wiskozymetru zależna jest od szybkości, kształtu i wielkości wrzeciona, których odpowiednia kombinacja zapewnia szeroki zakres możliwości pomiarowych. Wiskozymetry rotacyjne charakteryzują się dużą dokładnością i możliwością analizowania substancji w różnych postaciach kosmetycznych: od płynnych emulsji czy żeli do półstałych form maściowych, dzięki czemu są powszechnie wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym i badaniach rozwojowych do kontroli jakości wytwarzanych form [306], [307].

2.8.3.5. Gęstość

Gęstością określa się stosunek masy badanej substancji do objętości jaką zajmuje (Równanie 3) [308]. Wyrażana jest w jednostkach wg układu SI [kg/m^3] lub wg układu CGS [g/cm^3] czy [g/ml] i jest wartością stałą dla danej substancji, w określonych warunkach otoczenia: temperatury i ciśnienia.

Równanie 3. Równanie podstawowe opisujące gęstość substancji

$$d = \frac{m_s}{V_s}$$

gdzie:

d - gęstość,

m_s - masa badanej substancji,

v_s - objętość badanej substancji.

W przypadku cieczy i ciał stałych zmiany gęstości powodowane różnicami czynników fizycznych nie są tak znaczne, jak w przypadku gazów, co często jest wykorzystywane w kosmetykach w sprayu pakowanych pod ciśnieniem, aby zajmowały mniejszą objętość i by zyskać znaczne upakowanie opakowania substancją [309], [310]. Potocznie, w języku polskim, często gęstość mylona jest z lepkością substancji i jako gęste określane są substancje o większych oporach płynięcia, które ciężko zmieszać. Warto natomiast zwrócić uwagę na fakt, że gęstość ma związek z ciężarem substancji, a nie jej zdolnością do płynięcia [311]. Informacja o gęstości stanowi cenną wskazówkę, pozwalającą na identyfikację substancji, choć pomimo dostępności wielu tabeli gęstości wybranych substancji, wiele całkiem różnych fizykochemicznie substancji może posiadać zbliżone gęstości. W kosmetykach wiedza o gęstości początkowej masy produktu i obserwowanie zachodzących zmian, często wykorzystywane jest podczas badań kontroli jakości gotowych wyrobów, oceny stabilności i jednorodności produktu oraz podczas badań surowców, co pozwala na określenie ich jakości. Zmiany gęstości informują, w tym przypadku, o zachodzących zmianach na poziomie cząsteczkowym, które zachodzą w skutek starzenia produktu lub obecności zanieczyszczeń lub mikroorganizmów i ich metabolitów [305]. Do określenia gęstości najczęściej wykorzystuje się procedury grawimetryczne, opierające się na sile wyporu lub metody piknometryczne. W przypadku kosmetyków, z uwagi na łatwość oznaczenia, najczęściej wykorzystuje się szklane lub metalowe piknometry, czyli specjalne kalibrowane pojemniki o znanej objętości. Pomiar polega na zważeniu masy produktu i wyliczeniu gęstości na podstawie znanej objętości naczynia pomiarowego (piknometru). W oznaczeniach wykonywanych przy pomocy wagi najczęściej uwzględnia się współczynnik korygujący masy (0,99985) do przeliczenia wagi z uwzględnieniem ciśnienia atmosferycznego i gęstość powietrza (0,0012) z uwagi na wykonywanie pomiaru w powietrzu, gdzie podstawowy wzór ulega przekształceniu do (Równanie 4) [312]:

Równanie 4. Równanie opisujące gęstość z uwzględnieniem ciśnienia atmosferycznego i gęstości powietrza

$$d = 0,99985 \frac{m_s}{V_s} + 0,0012$$

Pośród badań kosmetyków oznaczenie gęstości najczęściej wykonuje się dla form płynnych, półpłynnych i stałych w postaci proszków czy granulek. Dla form stałych np. soli do kąpieli, pudrów, glinek określana jest gęstość nasypowa określająca liczbę cząstek zawartych w mierzonej objętości z uwzględnieniem pustych przestrzeni pomiędzy cząsteczkami wypełnionymi powietrzem. Gęstość nasypowa jednego surowca może być różna w zależności od sposobu mierzenia, gdzie każde wstrząśnięcie masą powodujące zmianę ułożenia cząsteczek względem siebie może zmieniać ilość cząsteczek zajmujących daną objętość, a tym samym jego gęstość nasypową [313].

2.8.3.6. Aktywność wody

Woda jest jednym z najważniejszych czynników warunkujących wzrost drobnoustrojów, dlatego ilość dostępnej, niezwiązanej w produkcie wody jest parametrem informującym o ryzyku mikrobiologicznym. Niektóre substancje w produkcie ulegają hydratacji, gdzie zwiększając siły międzycząsteczkowe, wiążą cząsteczki wody i tworzą wodne otoczki wokół cząsteczek oraz jonów rozpuszczonych w wodzie. Takie związanie zawartej w produkcie wody ogranicza jej dostępność, dlatego ilość wody dostarczonej podczas procesu produkcyjnego nie jest równa zawartości wody aktywnej. Aktywność wody nazywana równowagową wilgotnością względną obliczana jest na podstawie ilorazu prężności pary wodnej nad badaną substancją do prężności pary wodnej nad czystą chemicznie wodą mierzone w tych samych warunkach atmosferycznych (Równanie 5) [314], [315].

Równanie 5. Równanie opisujące aktywność wody

$$a_w = \left(\frac{P}{P_0} \right)_{P,T}$$

gdzie:

a_w - aktywność wody,

P , P_0 - odpowiednio prężność pary nad badaną substancją i nad czystym rozpuszczalnikiem,

P , T - ciśnienie i temperatura otoczenia.

Aktywność wody dla czystej wody posiada wartość równą 1, natomiast wraz ze wzrostem stężenia rozpuszczonych w niej związków aktywność wody spada, aż do wartości 0 dla substancji pozbawionych wody [316]. Minimalna aktywność wody pozwalająca na wzrost większości mikroorganizmów wynosi 0,91, im bliżej aktywności czystej wody tym korzystniejsze są warunki do rozwoju drobnoustrojów. Istnieją jednak gatunki, takie jak: drożdże i grzyby strzępkowe zdolne do rozwoju przy znacznie niższym poziomie wody aktywnej 0,75 – 0,60, dlatego ten poziom przyjmuje się za granicę produktów niskiego

ryzyka mikrobiologicznego, przy którym nie obserwuje się wzrostu mikroorganizmów [271]. Aktywność wody produktu zawsze będzie dążyć do osiągnięcia równowagi z otaczającą atmosferą, dlatego woda w czasie przechowywania i użytkowania będzie migrować z i do produktu, aż do uzyskania równowagi pomiędzy układami. Pomiaru aktywności wody kosmetyków dokonuje się najczęściej przy pomocy higroskopu zaopatrzonego w sondę wilgotności, określającą procent wilgotności względnej (% RH), jaki osiąga masa produktu w stanie równowagi w systemie zamkniętym i w stałej temperaturze [315].

2.8.3.7. Stabilność wirówkowa

Metoda badania stabilności przy pomocy wirówki stanowi przydatną, prostą i szybką metodę analizy układów fazowych, takich jak: emulsje czy heterożele, pozwalającą na przyspieszoną ocenę masy produktu w czasie z wykorzystaniem działania siły odśrodkowej. Po odwirowaniu próby są analizowane wizualnie pod kątem niestabilności w postaci rozwarstwień i oddzielenia faz. W zależności od rodzaju badanej substancji dobierane są parametry wirowania, w tym prędkość i czas wirowania, choć coraz częściej łączy się stabilność wirówkową z testami temperaturowymi, gdzie wykorzystywane są warunki przyspieszające potencjalne starzenie i złamanie emulsji (oznaczenia prowadzi się w podwyższonej temperaturze) [317]. W dostępnej literaturze można znaleźć stosowanie znacznie różnych parametrów wirowania, gdzie najczęściej jego czas wynosi od 10 minut do 30 minut a prędkości wirowania wahają się od 3000 rpm do 5000 rpm [318], [319], [320].

2.8.3.8. Stabilność z wykorzystaniem wielokrotnego rozpraszania światła

Z uwagi na coraz większą prędkość wdrażania kosmetyków emulsyjnych na rynek, najbardziej pożądane są metody umożliwiające ocenę długoterminowej stabilności produktu w jak najkrótszym czasie, tak by można było pominąć wielomiesięczne obserwacje próbek. Intensywny rozwój w dziedzinie otrzymywania emulsji i technik analizy ich stabilności doprowadził do opracowania szeregu metod pozwalających na obserwację zachodzących w emulsjach procesów starzenia. Z uwagi na to, że emulsje stanowią układy dyspersyjne zdolne do rozpraszania światła do badania ich właściwości coraz częściej wykorzystuje się metody spektroskopowe umożliwiające szybką i nieinwazyjną obserwację zachodzących zmian niewidocznych dla nieuzbrojonego oka. Urządzenia, takie jak np. Turbiscan wykorzystujące zjawisko wielokrotnego rozpraszania światła (MLS ang. multiple light scattering) umożliwiają analizę starzenia emulsji, w tym detekcję zachodzących zmian i niestabilności, takich jak: śmietanowanie, sedymentacja, flokulacja czy koalescencja [321]. Działanie Turbiscanu obejmuje analizę sposobu, w jaki promieniowanie jest rozpraszane przez cząsteczki na podstawie pomiaru intensywności wiązki światła, przechodzącej przez badaną próbkę i z powrotem (wsteczne rozproszenie) oraz rejestrację zachodzących zmian. Możliwe jest to dzięki ruchomej głowicy zaopatrzonej w źródło światła z zakresu bliskiej podczerwieni (λ - 880 nm), zintegrowanej z dwoma detektorami transmisji i wstecznego rozpraszania odbierających promieniowanie pod kątem odpowiednio 180° i 45° [322]. W związku z tym, że większość zachodzących zmian związanych jest z siłami

międzycząsteczkowymi i grawitacją, możliwość skanowania na całej wysokości próbki umożliwia szybkie wychwycenie pojawiających się różnic, migracji oraz zmiany wielkości cząstek na różnych wysokościach analizowanej próbki. Przy pomocy aparatu Turbiscan możliwe jest także wyznaczenie współczynnika stabilności, który obliczany jest poprzez analizę wszystkich zachodzących w próbce procesów w określonym czasie [323]. Wartość współczynnika stabilności umożliwia porównywanie prób między sobą i stanowi ilościową miarę stabilności formulacji, dzięki czemu łatwiej jest wyselekcjonować najkorzystniejszą próbkę.

2.8.3.9. Określenie typu emulsji

Rodzaj uzyskanej emulsji zależy przede wszystkim od składu formulacji, w tym rodzaju emulgatora i proporcji obu faz, a także, w mniejszym stopniu, od technologii procesu produkcyjnego. Starzenie się emulsji może prowadzić do destabilizacji układu fazowego, gdzie można zaobserwować różne procesy fizykochemiczne na poziomie międzycząsteczkowym, jak inwersja faz, dlatego wiedza o początkowym, czy też pożądanym układzie jest istotna w odniesieniu do stabilności masy wytwarzanego produktu. Do oznaczenia typu emulsji powszechnie wykorzystuje się różne metody począwszy od prostych doświadczeń możliwych do zaobserwowania gołym okiem, przez ocenę mikroskopową czy analizy przewodnictwa elektrycznego. Najprostsza do wykonania analiza określenia typu emulsji wykorzystuje charakterystyczną cechę emulsji O/W do zdolności do rozcieńczania wodą bez tworzenia aglomeratów, gdzie na szkiełku przedmiotowym umieszcza się obok siebie krople emulsji oraz wody, a następnie obserwuje się zmieszanie obu kropli. Dużą zaletą jest brak wykorzystania dodatkowej aparatury pomiarowej. Metoda ta daje jedynie wstępny, poglądowy obraz typu emulsji i nie charakteryzuje się wysoką dokładnością. Możliwość uzyskania fałszywego wyniku może wiązać się ze swoistym zachowaniem konkretnej formulacji, gdzie przy wieloskładnikowych układach, otrzymywanych np. przy pomocy innowacyjnych emulgatorów o szerokim spektrum zastosowania, ciężko jest przewidzieć zachowanie masy [324], [325].

Inną metodą dającą również poglądowy wynik, jest określenie typu emulsji z wykorzystaniem przewodności elektrycznej, która obejmuje pomiar zdolności przewodnictwa elektrycznego masy produktu z wykorzystaniem omomierza. Emulsje typu olej w wodzie z uwagi na obecność wody stanowiącej fazę zewnętrzną i jednocześnie będącą rozpuszczalnikiem dla pozostałych surowców, dostarczających elektrolitów (pochodzących np. z dysocjacji emulgatora), charakteryzują się dobrą przewodnością prądu, w przeciwieństwie do emulsji typu woda w oleju [326]. Najbardziej dokładny obraz typu emulsji można uzyskać metodą mikroskopową z wykorzystaniem mikroskopu optycznego i odpowiednich barwników, które są rozpuszczalne albo w środowisku wodnym albo w tłuszczach. Najczęściej wykorzystuje się oranż metylowy, czy błękit metylenowy rozpuszczalne w fazie wodnej, natomiast dla zabarwienia fazy tłuszczowej literatura najczęściej wskazuje na wykorzystanie Sudanu II, III lub IV [264]. Pozwala to na zabarwienie jednej z faz, gdzie przy obserwacji mikroskopowej, pod odpowiednim powiększeniem, można dokładnie zaobserwować, która z faz ulega zabarwieniu. Ocena

dokonywana jest na podstawie wiedzy o rozpuszczalności barwnika i obrazu mikroskopowego, dlatego pozwala precyzyjnie określić typ emulsji, dodatkowo umożliwia też na porównanie stopnia rozproszenia fazy zdyspergowanej i wielkości kropeł, dlatego jest niezwykle przydatna podczas oceny stabilności emulsji [304], [307], [327], [328].

2.8.4. Badania skuteczności produktu

Zgodnie z obowiązującymi normami podmiot odpowiedzialny za produkt jest zobowiązany do wykazania skuteczności jego działania oraz udowodnienia prawdziwości deklaracji marketingowych. W tym celu przeprowadzane są użytkowe badania aplikacyjne i aparaturowe, które stanowią metodę rzeczywistej oceny działania preparatu kosmetycznego na skórę. Badania aplikacyjne można podzielić z uwagi na czas aplikacji produktu, który obejmuje odczyt stanu skóry po jednokrotnej aplikacji w przypadku krótkich badań oraz w przypadku badań długich po wielokrotnej systematycznej aplikacji produktu w wyznaczonym czasie. Za ich pomocą definiuje się deklaracje marketingowe i opisy na etykietach produktowych zgodnie z rzeczywistym działaniem, które w trakcie wprowadzenia na rynek w dużej mierze wpływa na zainteresowanie produktem i jego popyt [130], [329].

2.8.4.1. Badania aplikacyjne ankietowe

Pomimo rozwoju nowoczesnych i innowacyjnych metod badawczych potwierdzających skuteczność produktów kosmetycznych, najczęściej wybieraną przez producentów formą potwierdzenia deklaracji marketingowych są badania aplikacyjne ankietowe. Badania użytkowe należą do badań prowadzonych *in vivo* na specjalnie dobranej grupie ochotników, którzy przez określony czas i w ściśle ustalony sposób stosują produkty pod nadzorem lekarza dermatologa lub w niektórych przypadkach także innych specjalistów. Ocena skuteczności i właściwości badanego kosmetyku dokonywana jest na podstawie specjalnie zaprojektowanych ankiet, zawierających indywidualne i subiektywne opinie i uwagi ochotników. Ostateczne wyniki właściwości produktu przedstawiane są w formie skali procentowej dla każdej deklaracji z osobna, gdzie ich potwierdzenie możliwe jest po osiągnięciu minimum 50 % pozytywnych opinii. Poza oceną skuteczności produktu, ankiety dają także producentowi informację zwrotną dotyczącą potencjalnego zainteresowania produktem i obecnie panujących preferencji potencjalnych konsumentów, jak również wad, które nie zostały wcześniej wykryte, a tym samym umożliwia to producentowi poprawienie słabszych punktów kosmetyku. Możliwe jest to z uwagi na zawarcie w ankietach pytań dotyczących odbioru produktu pod kątem sensorycznym, tego czy odpowiada jego barwa, zapach, konsystencja, forma aplikacji, wydajność, wchłanianie i wiele innych parametrów mających znaczenie dla ochotników. Badanie w zakresie zmian właściwości reologicznych zachodzących w produkcie podczas ich użytkowania daje możliwość udoskonalenia i poprawy właściwości, takich jak: rozprowadzanie, łatwość aplikacji, lepkość i innych odczuć pojawiających się po aplikacji, a także stanowią parametry kontrolne podczas kontroli jakości gotowego wyrobu. Badania aplikacyjne stanowią także rozszerzenie i kontynuację badań dermatologicznych

i stabilnościowych, z uwagi na sprawdzanie pojawienia się jakichkolwiek efektów niepożądanych i niewskazanych zmian zachodzących w produkcie podczas standardowego stosowania kosmetyku na kolejnej niezależnej grupie ludzi, co daje szerszy pogląd na bezpieczeństwo użytkowania i tym samym bardziej reprezentatywny wynik. Pytania ankietowe powinny być sformułowane w taki sposób, aby były zrozumiałe dla testujących oraz łatwe w ocenie, przy użyciu zwykle kilkustopniowej skali, według której kwalifikowane są poszczególne parametry produktu. Do analizy ankietowej mogą być wybierane tylko te właściwości produktu, które dają efekty danego parametru możliwe do oceny sensorycznej, natomiast w pozostałych przypadkach należy dobrać odpowiednie, zastępcze badania, np. aparaturowe lub testy *in vitro* umożliwiające jego ocenę. Warto też zaznaczyć, że deklaracje sugerowane przez działy marketingowe często odbiegają od standardów i wykraczają poza możliwości działania produktów kosmetycznych, dlatego wiedza z zakresu obowiązujących rozporządzeń i ustaw jest niezwykle istotna podczas opracowywania ankiet i ewentualnych modyfikacji zawartych w nich pytań, tak by produkt mógł być zakwalifikowany do obrotu i spełniał wszystkie wymagania uwzględnione w obowiązujących regulacjach prawnych. Za reprezentatywną grupę do badań aplikacyjnych uważa się już 10 - 15 osób, jednak im większa grupa osób będzie poddana analizie, tym zostaną uzyskane rzetelniesze wyniki [330]. Ochotnicy, chętni do wzięcia udziału w badaniach, podlegają odpowiedniej kwalifikacji i są dobierani w taki sposób, aby możliwe było dokładne określenie zakresu i skuteczności działania preparatu.

2.8.4.2. Badania aplikacyjne aparaturowe

Badania aparaturowe stanowią drugą odsłonę badań aplikacyjnych, szczególnie cennych w przypadku, kiedy ocena pożądanego parametru czy też właściwości produktu jest niemożliwa poprzez ocenę sensoryczną ochotników. W przeciwieństwie do badań ankietowych, nie opierają się one na subiektywnej ocenie konsumentów, tylko przedstawiają mierzalne instrumentalnie właściwości produktów, pozwalając na otrzymanie obiektywnych, powtarzalnych wyników wyrażony liczbowo lub obrazowo. Badanie odbywa się częściowo na podobnych zasadach, jak w przypadku badań ankietowych, czyli prowadzone jest *in vivo* na specjalnie dobranej grupie ochotników, którzy przez określony czas i w ściśle ustalony sposób stosują produkty pod nadzorem lekarzy specjalistów, z tą różnicą, że ostateczna ocena dokonywana jest poprzez wykorzystanie specjalistycznej aparatury pomiarowej [331]. W zależności od wybranego parametru, pomiarów można dokonywać po jednorazowej aplikacji na skórę lub wielokrotnej aplikacji przez dłuższy okres użytkowania produktu, gdzie pomiarów dokonuje się przed pierwszym użyciem produktu oraz po zakończeniu czasu użytkowania. Badania aparaturowe mogą dostarczać dzięki takiemu obrazowaniu, wyników przed i po aplikacji marketingowo przydatnych zdjęć, wykresów i innych porównań, które podczas późniejszych działań marketingowych zwracają uwagę potencjalnych konsumentów i zachęcają do zakupu, wpływając tym samym na powodzenie sprzedaży. Rozwój nowoczesnych technik pomiarowych pozwala obecnie na nieinwazyjne, wielokierunkowe badania skóry włosów i paznokci, w tym na przykład [332], [333]:

CZEŚĆ LITERATUROWA

- **Analiza poziomu nawilżenia**, gdzie wykorzystywane są właściwości pojemności elektrycznej skóry, zależnej od zawartości wody w skórze. Badanie przeprowadza się przy pomocy korneometru, działającego dzięki możliwości analizy przewodnictwa elektrycznego warstwy rogowej, które jest tym większe im warstwa zawiera więcej wody. W prawidłowej tkance zawartość wody waha się od 10 % do 30 %,
- **Badanie przesnaskórkowej utraty wody (TEWL, ang. Transepidermal Water Loss)**, która stanowi niezastąpiony parametr w ocenie funkcji barierowej skóry. Badanie prowadzone jest z wykorzystaniem tewametru, który zbudowany jest z cylindrycznej sondy zawierającej czujniki wilgotności oraz termometru, które mierzą gradient gęstości parowania wody ze skóry, proporcjonalny do wartości TEWL,
- **Pomiar pH** powierzchni skóry dokonywany przy pomocy pH-metru, zbudowanego z sondy kombinowanej, składającej się z dwóch elektrod: referencyjnej, będącej elektrodą odniesienia oraz z pomiarowej mającej bezpośredni kontakt ze skórą. Badanie obejmuje pomiar różnicy napięć powodowanych aktywnością jonów wodorowych,
- **Badanie jędrności i elastyczności skóry**. W tym celu może być wykorzystywanych kilka urządzeń np. kutometr, służący do pomiaru elastyczności skóry, działa na zasadzie podciśnienia, poprzez zasysanie fałd skóry oraz pomiar stopienia odkształcenia, oporu oraz szybkości powrotu do stanu pierwotnego. Balistometr, z kolei działa poprzez pomiar ilości i wysokości odbitej energii oraz pomiar ilości zaabsorbowanej energii. Twistometr pozwala na analizę odkształceń skóry wprawionej w ruch obrotowy oraz szybkości powrotu do stanu pierwotnego. Do badań nad elastycznością skóry można również wykorzystać ekstensjometr, służący do oceny jej podatności na rozciąganie poprzez pomiar siły potrzebnej do jej rozciągnięcia,
- **Analiza poziomu melaniny i przebarwień** wykonywana jest najczęściej przy pomocy meksametru wyposażonego w sondę emitującą światło o określonej długości fali. Promieniowanie pochodzące z sondy jest absorbowane przez barwniki obecne w skórze: melaninę i hemoglobinę, a analiza dokonywana jest na zasadzie pomiaru promieniowania odbitego,
- **Analiza zmarszczek i stopnia wygładzenia** przy pomocy metod profilometrycznych. Najczęściej do oceny działania przeciwzmarszczkowego wykorzystywane są mikrokamery przykładane do badanego obszaru, dające obraz, który następnie przy pomocy odpowiednich programów może być analizowany komputerowo,
- **Analiza struktury skóry i wpływu na syntezę kolagenu** przy pomocy badań obrazowych, do których wykorzystuje się ultrasonograf, którego głowica zdolna jest do emitowania ultradźwięków o wysokich częstotliwościach. Dzięki zdolności pochłaniania i odbijania fali ultradźwiękowej przez kolejne warstwy skóry powstają echa o różnych amplitudach, które urządzenie przekształca w obraz,

- **Badanie poziomu wydzielania sebum**, pozwala na analizę stanu natłuszczenia skóry i aktywności gruczołów łojowych skóry. W tym celu wykorzystywany jest najczęściej sebometr, który pozwala na pomiar fotometryczny przejrzystości specjalnej taśmy, na której, po przyłożeniu do skóry pozostała warstwa tłuszczowa,
- **Analiza właściwości rozgrzewających lub chłodzących** przy pomocy metod termograficznych, wykorzystujących emisję promieniowania podczerwonego, które zamieniane jest na impulsy elektryczne.

2.8.5. Oznaczenie zawartości składnika aktywnego w masie gotowego produktu

Utrzymanie jakości produktów kosmetycznych zapewnione jest poprzez rzetelną kontrolę jakości na każdym etapie produkcji i obrotu. Podstawowym wskaźnikiem jakości produktu, który bezpośrednio przekłada się na działanie badanej formułacji, jest jej skład jakościowy, jak również zawartość, jakość i czystość poszczególnych składników, dlatego oznaczeniom poddawane są zarówno poszczególne surowce, jak i masa gotowego wyrobu. Biorąc pod uwagę najnowsze trendy kosmetyczne, obejmujące jak najwyższą zawartość surowców naturalnych, które swoiście mogą różnić się między sobą składem chemicznym i zawartością związków aktywnych w zależności od regionu i pory pozyskiwania, procesu obróbki, producenta, decydując się na wykorzystanie tego typu surowców, konieczne jest monitorowanie każdej partii pod kątem zgodności ze specyfikacją. Duży problem stanowią surowce, które nie są standaryzowane pod kątem zawartości kluczowych składników, gdzie w zależności od źródła, skład chemiczny może się diametralnie różnić a nawet zawierać ilości pożądanego związku poniżej poziomu wykrywalności. Podobnych oznaczeń dokonuje się w przypadku sprawdzenia obecności i ilości substancji niepożądanych, jak np. metale ciężkie, pyły, pozostałości pestycydów, obecnych w surowcach przetworzonych w niewielkim stopniu, stanowiących niebezpieczeństwo dla zdrowia konsumentów. Kontrola jakości gotowego produktu pozwala także na ocenę stabilności surowców w wieloskładnikowej mieszaninie poprzez wychwycenie zachodzących w produkcji reakcji np. utleniania i rozkładu na podstawie zmian zawartości poświadczonych składników, a także pozwala na ocenę procesu produkcyjnego pod kątem mieszania i równomiernego rozprowadzenia składników w całej objętości masy kosmetycznej [334]. W tym celu wykorzystywany jest szereg metod analitycznych, spośród których wybrane zostały poniżej przedstawione.

2.8.5.1. Metody chromatograficzne

Chromatografia obejmuje obecnie jedno z najbardziej popularnych, podstawowych technik analitycznych, służących do rozdzielania i identyfikacji związków chemicznych w mieszaninie, na podstawie różnic w powinowactwie analizowanych substancji w układzie dwufazowym: faza stacjonarna i faza ruchoma. Metody chromatograficzne można podzielić z uwagi na [335]:

a) stan skupienia fazy ruchomej

- chromatografia cieczowa (LC, ang. Liquid Chromatography) – z wykorzystaniem cieczy lub mieszaniny cieczy jako fazy ruchomej,
- chromatografia gazowa (GC, ang. Gas Chromatography) – gdzie fazą ruchomą jest gaz,
- chromatografia w stanie nadkrytycznym (SFC ang. Supercritical Fluid Chromatography) - fazę ruchomą stanowi substancja w stanie nadkrytycznym, najczęściej dwutlenek węgla w stanie nadkrytycznym,

b) technikę eksperymentalną

- techniki kolumnowe – faza stacjonarna wypełnia przestrzennie kolumnę chromatograficzną, wykorzystywana może być dla wszystkich stanów skupienia fazy ruchomej,
- techniki planarne - faza stacjonarna występuje w postaci płaszczyzny, dedykowana dla chromatografii cieczowej,

c) rodzaj oddziaływań

- jonowymienna - jej podstawą jest wymiana jonowa pomiędzy jonami pochodzącymi z rozdzielanych związków oraz fazy stacjonarnej,
- podziałowa - zależna od różnic współczynników podziału substancji, gdzie istotną rolę odgrywa ich rozpuszczalność,
- adsorpcyjna - uwarunkowana różnicami we współczynnikach adsorpcji poszczególnych składników analizowanej próbki, opiera się na zdolności związków do adsorpcji na powierzchni fazy stacjonarnej, zwanej w tym przypadku adsorbentem,
- osadowa - zależna od różnych rozpuszczalności uprzednio strąconych osadów w wyniku reakcji chemicznych,
- sitowa - zależna od rozmiaru cząsteczkowego substancji.

Niewątpliwą zaletą metod chromatograficznych jest zdolność do rozdzielania wieloskładnikowych mieszanin substancji o bardzo zbliżonych właściwościach (izomery strukturalne, izomery optyczne), co poza oznaczeniem ilościowym i identyfikacją daje możliwość otrzymania określonych, czystych składników, przez co znajduje wiele zastosowań, nie tylko do celów naukowych, ale także komercyjnych, w tym również w branży kosmetycznej [336]. Obecnie, wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC (ang. High Pressure Liquid Chromatography) i chromatografia gazowa (GC, ang. Gas Chromatography) to jedne z najpopularniejszych technik analitycznych wykorzystywanych w przemyśle kosmetycznym do precyzyjnych oznaczeń jakościowych i ilościowych związków. Ich mechanizm oznaczenia opiera się na podziale substancji pomiędzy fazy układu i ich stopniowym wymywaniu z kolumny. Szybkość migracji, czas i objętość retencji poszczególnych składników jest zależny od siły oddziaływania składników z fazami układu, za którą odpowiada struktura cząsteczkowa rozdzielanych związków. Wynik rozdziału zapisywany jest jako chromatogram, w postaci pojawiających się pików, których kształt i/lub wymiary odpowiadają rozkładowi stężenia substancji. Identyfikacja poszczególnych związków w mieszaninie możliwa jest dzięki porównaniu czasów retencji próbki i wzorca

przypisanych do konkretnych pików na chromatogramie, natomiast do oznaczeń ilościowych wykorzystuje się proporcjonalność wysokości lub powierzchni pików do ilości danego składnika, których obliczeń dokonuje się metodami pomocniczymi np. metody z wykorzystaniem krzywej kalibracyjnej czy wzorca wewnętrznego lub dodatku zewnętrznego wzorca [337]. W przypadku HPLC do detekcji najczęściej wykorzystuje się detektory fotoabsorpcyjometryczne UV-VIS z pomiarem dla jednej długości fali lub diodowe detektory DAD, analizujące składniki mieszaniny w całym zakresie promieniowania UV-VIS. Z wykorzystaniem tych detektorów możliwe jest oznaczanie jedynie związków posiadających chromofory, umożliwiające pochłanianie promieniowania lub ich uprzednia derywatywacja, czyli przekształcenie do pochodnych zdolnych, w tym przypadku, do absorpcji promieniowania. W pozostałych przypadkach konieczne będzie wykorzystanie innych detektorów np. spektrofluorymetrycznych, refraktometrycznych czy chromatografów HPLC sprzężonych ze spektrometrem mas. Technika HPLC wykorzystywana jest do analizy rozległej grupy związków, np. kwasów aminowych (aminokwasy), węglowodanów, lipidów, kwasów nukleinowych, peptydów i białek [338], powszechnie obecnych w kosmetycznych surowcach produkcyjnych. Tak szerokie możliwości oznaczenia substancji zawierających odmienne grupy funkcyjne pozwala na dokładną kontrolę jakości surowców i gotowego wyrobu oraz walidację procesu technologicznego pod kątem rozkładu substancji w masie. Szczególną uwagę przykuwa wykorzystanie HPLC do oznaczania substancji zakazanych w kosmetykach lub objętych ograniczeniami np. analizy ilościowej filtrów UV – PABA (kwas p - aminobenzoesowy) [339], formaldehydu [340], konserwantów z grupy parabenów [341], zakazanych barwników i pigmentów [342] oraz wielu innych związków, których identyfikacja może powodować nałożenie wysokich kar finansowych.

Chromatografia gazowa wykorzystywana jest natomiast najczęściej do oznaczenia lotnych związków organicznych, łatwo zmieniających stan skupienia na gazowy, takich jak na przykład niskocząsteczkowe, często niepolarne węglowodory alifatyczne i aromatyczne, aldehydy, ketony, estry, terpeny, alkohole. Tych kilka przykładów stanowi jedynie część ogromnej grupy związków masowo występujących w surowcach pochodzenia roślinnego, często wykorzystywanych jako składniki aktywne o właściwościach pielęgnacyjnych lub komponenty kompozycji zapachowych i olejków eterycznych [343]. Monitoring powyższych substancji jest wskazany ze względu na potencjalne zagrożenie zdrowia konsumentów powodowane toksycznością lub działaniem alergizującym wielu z tych związków. W przypadku chromatografii gazowej w analizie produktów kosmetycznych najczęściej do detekcji wykorzystywane są chromatografy gazowe sprzężone ze spektrometrią mas, stanowiące uniwersalne narzędzie analityczne o bardzo szerokim zakresie przydatności od oznaczeń związków pożądaných w kosmetykach, do niepożądanych i zakazanych lub objętych ograniczeniami zanieczyszczeń takich jak alergeny, pestycydy czy substancje zaburzające gospodarkę hormonalną [344], [345].

2.8.5.2. Metody spektroskopowe

Wraz ze wzrostem popularności substancji pochodzenia naturalnego, o wysokiej zawartości związków organicznych, w przemyśle kosmetycznym rośnie zainteresowanie

metodami spektroskopowymi do oceny zarówno surowców, jak i gotowego produktu. Spektroskopia obejmuje wiele technik analitycznych polegających na tworzeniu i analizie widm, otrzymywanych poprzez oddziaływanie na badane substancje różnych rodzajów promieniowania. Duże zróżnicowane technik spektroskopowych pozwala na otrzymanie szerokiego zakresu informacji na temat analizowanego związku, przez co znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach, między innymi: w chemii, biologii, fizyce, medycynie, branży farmaceutycznej i kosmetycznej, gdzie wykorzystywane są możliwości identyfikacji substancji, analizy jakościowe i ilościowe związków w różnych stanach skupienia, biorąc pod uwagę dokładne informacje na temat budowy atomowej i chemicznej oraz struktury powierzchni. Metody spektroskopowe można podzielić pod kątem rodzaju użytego promieniowania UV, VIS, IR i NMR, które pozwalają na uzyskanie różnego zakresu informacji na temat budowy danego związku. Poniżej przedstawiono techniki znajdujące najwięcej zastosowań w przemyśle kosmetycznym [333], [346], [347]:

a) Spektroskopia w podczerwieni

Spektroskopia w podczerwieni IR (ang. Infrared) w zakresie 4000 cm^{-1} - 600 cm^{-1} oraz bliskiej podczerwieni NIR (ang. Near Infrared) 10000 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} dostarcza informacji na temat struktury danego składnika aktywnego. Pozwala na identyfikację określonych grup funkcyjnych, rodzaju wiązań między atomami węgla i ich oddziaływań z otoczeniem na podstawie zmiany energii oscylacyjnej cząstek związanych ze skręcaniem i rozciąganiem wiązań, a w przypadku kosmetyków powszechnie wykorzystywana jest do oznaczeń zawartości wody w produktach i naskórku [348]. Obecnie jednak, najczęściej, w przemyśle kosmetycznym wykorzystuje się spektrometry z transformacją Fouriera (FT-IR – ang. Fourier Transform Infrared Spectroscopy), która przekształca uzyskane widmo interferencyjne w widmo przedstawiające zależność natężenia promieniowania od długości fali [349]. Powyższa technika zapewnia zwiększenie granicy wykrywalności oraz precyzji pomiaru w odniesieniu do klasycznej spektrometrii IR, dzięki czemu poza samą analizą związków aktywnych, znajduje ona także zastosowanie w badaniu przenikania substancji aktywnych na podstawie analizy warstw skóry [348], [350], analizie wpływu promotorów przenikania na właściwości warstwy rogowej naskórka [351], a także oznaczeniu związków powierzchniowo czynnych, emulgatorów czy alkoholi [352], [353], [354]. Wskazuje się w tej metodzie na trudność jednoznacznej analizy widm z zakresu podczerwieni, gdzie może dochodzić do wzajemnego maskowania się sygnałów różnych związków i nachodzenia ich na siebie, dlatego w celu uzyskania precyzyjnych, jednoznacznych wyników sugeruje się połączenie kilku metod [354], [355].

b) Spektroskopia Magnetycznego Rezonansu Jądrowego

Spektroskopia Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (NMR, ang. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) obejmuje analizę widm promieniowania elektromagnetycznego powstającego w skutek wzbudzania spinów jądrowych z wykorzystaniem częstotliwości radiowych (najczęściej 60 MHz – 900 MHz) [356]. W praktyce metoda ta polega na umieszczeniu próbki w zewnętrznym polu magnetycznym, gdzie dochodzi do powstawania

promieniowania elektromagnetycznego oraz jego rejestracji i analizie. Zmiana częstotliwości rezonansowej, w skutek działania wewnątrzcząsteczkowego pola magnetycznego daje informację o szczegółach struktury elektronowej badanych związków i występujących w nich grupach funkcyjnych. Otrzymane widma są unikatowe i specyficzne dla każdej substancji, dlatego w przypadku identyfikacji związków organicznych, metoda ta stanowi bardzo cenne narzędzie o wysokiej precyzji oznaczeń jakościowych, a także w określaniu struktury analizowanych związków dzięki informacjach o położeniu atomów. Literatura wskazuje na wiele zastosowań w przemyśle kosmetycznym, szczególnie do oznaczania i monitorowania konserwantów w tym formaldehydu [357], [358], [359], wielu składników leczniczych i innych wykluczonych ze stosowania lub z nałożonymi ograniczeniami w kosmetykach z powodu ich toksyczności, alergienności czy reaktywności [358], [360], [361], [362], [363]. NMR jest również powszechnie wykorzystywany do sprawdzania jakości i czystości surowców, które z uwagi na duże zapotrzebowanie mogą podlegać fałszowaniu, jak np. olejki eteryczne, które wg. Farmakopei powinny mieć określoną zawartość komponentów [364], [365].

c) Spektrofotometria UV-VIS

Spektrofotometria z zakresu światła widzialnego i UV (200 nm - 800 nm), szczególnie w połączeniu z HPLC, stanowi jedną z najpopularniejszych technik stosowanych do detekcji, identyfikacji i oznaczeń ilościowych związków. Spektroskopia UV-VIS obejmuje analizę absorpcji promieniowania elektromagnetycznego w zakresie światła widzialnego i ultrafioletu, przedstawianych w postaci widm. Analiza możliwa jest dla substancji zawierających regiony zdolne do absorpcji promieniowania z zakresu UV-VIS tzw. chromofory, wskazujące najczęściej na obecność sprzężonych układów wiązań podwójnych i związków aromatycznych, gdzie po zastosowaniu promieniowania obserwowane są przejścia elektronowe z poziomu podstawowego do stanu wzbudzonego, czyli na poziom o wyższej energii [366]. Substancje z grupy związków organicznych mogą zawierać w swojej budowie także auksochromy np. grupa aminowa czy hydroksylowa, które nie są zdolne do pochłaniania promieniowania, ale mogą wpływać na energię chromoforu, powodując przesunięcia pasma absorpcji. Wartość pochłoniętej energii zależy od fali elektromagnetycznej, natężenia promieniowania oraz podatności cząstek na wzbudzenie [367], których powiązanie opisane jest prawem Lamberta- Beera. Przedstawia ono zależność absorbancji (przy danej długości fali) od grubości warstwy absorbującej (l), stężenia badanego roztworu (c) i molowego współczynnika absorpcji (ϵ), który jest stały dla określonej substancji, w określonej temperaturze i ciśnieniu (Równanie 6) [368]:

Równanie 6. Równanie opisujące prawo Lamberta Beera

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c l$$

A - absorbancja, zdolność do pochłaniania światła,

I_0/I - odpowiednio: wyjściowe natężenie wiązki promieniowania oraz po przejściu przez substancję absorbującą,

ϵ - molowy współczynnik absorpcji,

c - stężenie substancji absorbującej,

l - grubość warstwy absorbującej.

Widmo UV-VIS przedstawia pochłanianie promieniowania elektromagnetycznego w funkcji długości fali, gdzie zmiany pochłaniania pozwalają obliczyć ilość substancji absorbującej promieniowanie, dzięki czemu technika ta znajduje bardzo szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach: chemii, biologii, medycyny, branży farmaceutycznej i kosmetycznej, np. do oznaczania zawartości substancji promieniochronnych czy formaldehydu [369]. Szczególną użyteczność tej metody wskazuje się dla detekcji substancji podczas rozdzielania chromatograficznego HPLC, co niweluje możliwość niskiej selektywności tej techniki w przypadku mieszanin związków, pracując na rozdzielonych frakcjach substancji. Wskazuje się szczególną uciążliwość występowania wysokich zawartości środków powierzchniowo czynnych, dlatego stale prowadzone są próby eliminacji wpływu bazy produktu na oznaczenia [369].

d) Spektrometria mas (MS)

Spektrometria mas, podobnie jak metody spektroskopowe, prowadzi do generowania widm, z tą różnicą, że w spektrometrii mas wykorzystuje się rozpad cząstek pod wpływem czynników jonizujących, zamiast zdolności związków do pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego. Umożliwia to określenie stosunku masy badanego związku i fragmentów, powstających w skutek jonizacji, do ich ładunku elektrycznego. Technika znalazła do tej pory wiele zastosowań do identyfikacji i ilościowych oznaczeń śladowych ilości pierwiastków chemicznych, związków organicznych, analiz składu pierwiastkowego i izotopowego związków, pozwalających na analizę pochodzenia surowców oraz analizy powierzchni ciał stałych i makromolekuł w tym sekwencjonowanie białek, polipeptydów, oligonukleotydów, gdzie przy odpowiednim doborze techniki jonizacji możliwa jest analiza bez uszkodzenia struktur biomolekuł [370], [371], [372], [374], [374]. Najczęściej wykorzystywane techniki jonizacji obejmują działanie strumienia elektronów (EI, ang. Electron Ionisation), rozpylanie w polu elektrycznym (ESI, ang. Electrospray), jonizację chemiczną (CI, ang. Chemical Ionisation), desorpcję laserową (LD, ang. Laser Desorption), termorozpylanie (TE, ang. Termospray), desorpcję laserową z udziałem matrycy (MALDI, ang. Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation). Podobnie, jak w przypadku technik spektroskopowych, analizy obejmujące identyfikację substancji pochodzących z wieloskładnikowych mieszanin są praktycznie niemożliwe bez zastosowania dodatkowej

techniki rozdzielania mieszaniny np. przy pomocy HPLC czy GC, dlatego wskazane jest ich łączenie dla uzyskania najbardziej precyzyjnych wyników [375].

2.8.6. Raport bezpieczeństwa

Dokumentem potwierdzającym bezpieczeństwo stosowania produktów kosmetycznych, zgodnie z Rozporządzeniem o Kosmetykach 1223/2009/WE jest raport bezpieczeństwa, stanowiący podsumowanie całkowitej oceny gotowego produktu kosmetycznego opracowany przez wykwalifikowanego eksperta tzw. safety assessora. Raport bezpieczeństwa składa się z dwóch części: części A oraz B.

2.8.6.1. Część A

Część A zawiera wszystkie informacje niezbędne do opracowania oceny bezpieczeństwa. W tej części zawarte są informacje dotyczące wszystkich składników z osobna, jak i łącznie całej mieszaniny. W pierwszej kolejności przeprowadzana jest analiza składu produktu, zarówno pod kątem ilościowym, jak i jakościowym, ich chemiczna identyfikacja oraz określenie pełnionej funkcji. Następnie obejmuje ona sprawdzenie, czy w składzie produktu nie znajdują się substancje zakazane do stosowania w kosmetykach, substancje podlegające ograniczeniom, a także czy jako barwniki, konserwanty i filtry UV nie są stosowane substancje inne niż wymienione jako dozwolone do stosowania w produktach kosmetycznych. Ponadto weryfikuje się także czy w produkcie obecne są substancje zaklasyfikowane do grupy substancji mutagennych, rakotwórczych i szkodliwych na rozrodczość oznaczone jako CMR (ang. Carcinogenic, Mutagenic, Reprotoxic) [268]. W kolejnych punktach tej części, przedstawia się właściwości fizykochemiczne produktu w postaci jego specyfikacji, dane dotyczące jego stabilności w normalnych, dających się racjonalnie przewidzieć warunkach przechowywania, a także dane dotyczące czystości mikrobiologicznej i skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej. Pod kątem mikrobiologicznym, z osobna rozważane są surowce wykorzystywane podczas produkcji oraz gotowy wyrób. W przypadku surowców, dane zawarte są w dostarczonych przez producenta specyfikacjach surowców, natomiast w przypadku badanego produktu, safety assessor, klasyfikuje produkt jako wysokiej podatności na zakażenia mikrobiologiczne lub produkt niskiego ryzyka, na podstawie której wskazuje się wymagane badania mikrobiologiczne [269]. Zgodnie z wytycznymi dotyczącymi jakości mikrobiologicznej produktów gotowych, produkty kosmetyczne mogą zostać sklasyfikowane jako:

- kategoria I, która dotyczy kosmetyków przeznaczonych dla dzieci poniżej 3 roku życia oraz wyrobów przeznaczonych do stosowania w okolicach oczu i błon śluzowych, dla których całkowita liczba tlenowych mikroorganizmów mezofilnych nie powinna przekraczać 100 jtk/g lub ml, drobnoustroje patogenne (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*) nieobecne w 1 g masy produktu,

CZEŚĆ LITERATUROWA

- kategoria II dotyczy wszystkich pozostałych produktów, dla których dopuszczalna jest ilość tlenowych mikroorganizmów mezofilnych, poniżej 1000 jtk/g lub ml, drobnoustroje patogenne (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*) nieobecne w 1 g produktu [270].

Na podstawie badań oceny stabilności i kompatybilności produktu z opakowaniem możliwe jest potwierdzenie czy parametry jakościowe kosmetyku nie zmieniają się podczas przechowywania w opakowaniu jednostkowym w zadanych warunkach temperaturowych oraz czy opakowanie zabezpieczające produkt przed działaniem czynników zewnętrznych, jest stabilne w zmiennych warunkach temperaturowych (nie ulega zniszczeniu, deformacji i odbarwieniu), jak również, czy opakowanie gwarantuje funkcjonalność i szczelność. W tym punkcie załączane są także informacje dotyczące opakowania, w tym procesu produkcji opakowań, materiałów oraz deklaracje producenta dotyczące zgodności z obowiązującymi normami [253]. W tej części umieszczone są również informacje dotyczące zanieczyszczeń, ilości śladowych, alergenów i innych niezamierzonych substancji obecnych w wykorzystywanych do produkcji surowcach i opakowaniach. Następnym punktem tej części jest analiza narażenia na działanie produktu, gdzie opisane jest przewidywane stosowanie produktu oraz szacowana jest ekspozycja na produkt i narażenie na działanie poszczególnych składników formułacji na podstawie racjonalnie dającego się przewidzieć stosowania, a także biorąc pod uwagę częstotliwości używania, sposób aplikacji, miejsce i powierzchnię kontaktu, a także drogi narażenia wtórnego. Dane toksykologiczne opracowuje się na podstawie danych uzyskanych w wyniku przeglądu baz danych toksykologicznych takich jak: TOXNET, ECHA, RTECS, HERA oraz przeglądu opinii i prac naukowych dotyczących składników kosmetycznych: CIR (ang. Cosmetic Ingredient Review), SCCS (ang. The Scientific Committee on Consumer Safety), jak również danych zawartych w punktach 9 i 11 kart charakterystyki surowców. Jakość wody jest uregulowana na podstawie Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, dlatego pod względem toksykologicznym jest nieistotna. Dla pozostałych składników ważne jest określenie profilu toksykologicznego substancji i wyliczenie marginesu bezpieczeństwa ich stosowania. Pierwsza część raportu bezpieczeństwa zawiera także informacje dotyczące wystąpienia działań niepożądanych. Zgodnie z obowiązującym Rozporządzeniem 1223/2009 dotyczącym produktów kosmetycznych w przypadku wystąpienia działań niepożądanych przewiduje się ich bezzwłoczne zgłaszanie właściwym organom państwa członkowskiego, w którym wystąpiło dane działanie, oraz zgłaszanie wszelkich środków naprawczych podjętych przez osobę odpowiedzialną lub dystrybutora. Dane dotyczące ciężkich działań niepożądanych zostają włączone do raportu bezpieczeństwa produktu kosmetycznego i muszą być podane do wiadomości publicznej. W ostatnim punkcie części informacyjnej zawarte są pozostałe, dodatkowe informacje na temat produktu np. wyniki przeprowadzonych badań czy opis procesu wytwarzania [376].

2.8.6.2. Część B

W tej części raportu bezpieczeństwa zawarta jest właściwa ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego zawierająca wnioski z oceny bezpieczeństwa, ostrzeżenia i instrukcje na temat produktu kosmetycznego, a także przedstawienie toku rozumowania dla wydania oświadczenia o bezpieczeństwie produktu lub jego braku [268]. Wymaga to od safety assessora nie tylko bardzo dużej wiedzy teoretycznej, ale również praktycznej, z uwagi na wagę uzasadnienia bezpieczeństwa stosowania produktu.

3. CEL PRACY

Badania przewidziane w ramach przedkładanej dysertacji miały na celu **opracowanie dwóch produktów dermokosmetycznych do stosowania miejscowego na bazie wyselekcjonowanych ekstraktów roślinnych, olejków eterycznych i substancji o wysokim potencjale łagodzącym i regeneracyjnym względem urazów i chorób zwyrodnieniowych stawów, w wybranej postaci dermokosmetycznej o potwierdzonym przenikaniu przezskórnym.**

Opracowane produkty, w wybranej postaci dermokosmetycznej, miały charakteryzować się potwierdzonym przenikaniem przezskórnym, co z kolei miało przyczynić się do podniesienia jakości życia i ułatwienia funkcjonowania osób zmagających się z problemami układu kostno-stawowego oraz urazami, w szczególności osób aktywnie uprawiających sport, a także osób w podeszłym wieku.

Badania w niniejszej pracy prowadzono w czterech etapach, poprzez:

1. dobór odpowiednich substancji aktywnych, surowców bazowych oraz promotorów przenikania niezbędnych do opracowania receptur. Preferowane były substancje o wysokim potencjale łagodzącym, kojącym a także regenerującym, jak również mające silne działanie poprawiające mikrokrążenie podskórne, stymulujące zakończenie nerwowe poprzez rozgrzewanie lub chłodzenie miejsc urazów i dysfunkcji stawowych,

2. wybór postaci aplikacyjnej dermokosmetyków i opracowanie ich szczegółowych formułacji oraz opracowanie procedur analitycznych umożliwiających kontrolę jakości otrzymanych produktów na podstawie analiz fizykochemicznych i analitycznych przy użyciu urządzeń pomiarowych oraz oceny sensorycznej wybranych parametrów. Wyboru formy aplikacyjnej dokonano na podstawie weryfikacji zdolności przenikania przezskórnego wybranych substancji aktywnych. Na maksymalizację efektywności transportu przezskórnego istotny wpływ miał dobór promotorów przenikania,

3. opracowanie technologii wytwarzania formułacji w skali mikro (do 1 kg wsadu) oraz podniesienie skali ich wytwarzania z laboratoryjnej do półtechnicznej z uwzględnieniem optymalizacji etapów krytycznych (w tym zawartości składnika aktywnego i jego rozkładu w masie kosmetyku), mające na celu minimalizację energochłonności procesów technologicznych,

4. przeprowadzenie, dla wybranych formułacji, wszystkich niezbędnych badań wdrożeniowych, tj.:

- określenie czystości mikrobiologicznej próbek laboratoryjnych wraz z potwierdzeniem skuteczności układów konserwujących,
- oznaczenie stabilności produktów w czasie i ich kompatybilności z opakowaniami,
- określenie potencjału drażniącego i alergizującego kosmetyków,
- wykonanie badań aplikacyjnych (konsumenckie badania skuteczności),
- wykonanie oceny toksykologicznej wraz z raportem bezpieczeństwa stosowania produktu, stanowiące łącznie dokumentację rejestracyjną wybranych produktów kosmetycznych.

4. METODYKA PRACY

4.1. Analiza rynku oraz analiza literaturowa i wytypowanie surowców o pożądanym właściwościach łagodzących i regeneracyjnych

W pierwszej kolejności badań (zadania realizowane według harmonogramu prac zawartego w Indywidualnym Planie Badawczym doktoranta) przeprowadzono analizę dostępnych na rynku kosmetycznym produktów przeznaczonych do pielęgnacji, wspomagających leczenie choroby zwyrodnieniowej oraz regenerację kontuzji w obrębie stawów, która pozwoliła zdeterminować dostępne formy aplikacyjne oraz dała szersze krytycznie spojrzenie na konkurencyjność branży kosmetycznej. Analiza obejmowała gruntowny przegląd dostępnych produktów kosmetycznych oraz identyfikację i analizę tych najlepiej ocenianych, co mogłoby pozwolić na osiągnięcie przewagi konkurencyjnej i minimalizowanie ryzyka niepowodzenia i niskiego zainteresowania wdrożeniem zaproponowanego, przez firmę Invanto, produktu na rynek. Przed określeniem teoretycznych składów formułacji opracowywanych w ramach przedstawianej pracy doktorskiej, przeprowadzono także analizę literaturową umożliwiającą porównanie mechanizmów działania, właściwości i możliwości wykorzystania w produktach przeznaczonych do stosowania miejscowego substancji czynnych wykorzystywanych w produktach dedykowanych chorobie zwyrodnieniowej stawów i kontuzji w obrębie stawów, na podstawie której wytypowane zostały surowce o najbardziej pożądanym profilu działania. Za źródła literaturowe posłużyły elektroniczne bazy danych czasopism naukowych (np. ScienceDirect, PubMed czy Medline czy ResearchGATE), pozycje książkowe oraz literatura przedmiotowa prac o charakterze przeglądowym. Wyszukiwań rekordów dokonywano na podstawie zastosowania różnych kombinacji słów kluczowych ze szczególnym uwzględnieniem najnowszych i anglojęzycznych pozycji. Interesujące informacje przedstawiono w postaci tabeli 23 - 25 zawierających najważniejsze (pod kątem niniejszej pracy) dane o substancjach, na podstawie których dokonano wyboru substancji aktywnych do opracowania badanych formułacji produktowych. Na podstawie przeprowadzonych analiz, własnego doświadczenia i aktualnej dostępności surowców kosmetycznych opracowano koncepcję produktów przeznaczonych do dalszych badań i zamówiono niezbędne surowce, w tym ekstrakt z zieleń *Epimedium Koreanum*, siarczan glukozaminy i wzorzec ikaryny.

4.2. Analiza ilościowa ikaryny w ekstrakcie z *Epimedium Koreanum* metodą HPLC-MS

W celu analizy ilościowej ekstraktu z *Epimedium Koreanum* (The Garden of Natural Solution Co.), mającego na celu oznaczenie ilości ikaryny w nim zawartej, przeprowadzono analizę z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej z detektorem mas (HPLC-MS). Do analizy wykorzystano spektrometr mas typu QTOF (Impact HD, Bruker Daltonics) połączony z chromatografem ciekowym UHPLC (UltiMate 3000 Thermo Scientific/Dionex).

4.2.1. Warunki analizy

Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie analitycznej Kinetex 2,6u C18 (100 x 2.10 mm), utrzymując temperaturę kolumny 35 °C. Objętość nastrzyku wynosiła 3 µl. Jako fazę ruchomą wykorzystano:

- A: woda + 0,1 % kwas mrówkowy (FA),
- B: acetonitryl (ACN) + 0,1 % kwas mrówkowy (FA),

które gradientowo (Tab. 2) przepuszczono przez kolumnę z szybkością przepływu 0,3 ml/min.

Tab. 2 Gradientowa elucja fazy ruchomej do oznaczania ikaryny w ekstrakcie z *Epimedium Koreanum* metodą HPLC-MS

Czas [min]	A [%]	B [%]
0	75	25
1	75	25
15	55	45
16	55	45
17	10	90
22	10	90
23	75	25
28	75	25

4.2.2. Wyznaczenie krzywej kalibracyjnej dla ikaryny i walidacja metody analitycznej

Opracowano krzywą kalibracyjną analizowanego związku. W tym celu sporządzono roztwory wzorcowe ikaryny (Chengdu Biopurify Phytochemicals LTD., czystość < 98 %) poprzez rozpuszczenie zadanej ilości ikaryny (53 ng, 106 ng, 212 ng, 424 ng, 848 ng) w 1 ml metanolu. Przygotowane roztwory przefiltrowano z wykorzystaniem filtrów strzykawkowych o średnicy porów 0,45 µm i przeniesiono je do szklanych fiolek do analizy HPLC. Dla potwierdzenia powtarzalności metody oznaczenia stężenia ikaryny w ekstrakcie z *Epimedium Koreanum* przeprowadzono jej walidację. W tym celu każdą z próbek poddano serii trzech pomiarów oraz obliczono odchylenie standardowe. Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono równanie krzywej kalibracyjnej i współczynnik korelacji, zdeterminowano liniowość metody. Na podstawie porównania czasu retencji wzorca ikaryny z czasem retencji związku zawartego w badanym ekstrakcie sprawdzono również specyficzność metody.

4.3. Preparatyka założonych formułacji

Początkowo przygotowano po 100 g opracowanych formułacji według tabel 3-7 przedstawionych poniżej.

4.3.1. Wykorzystana aparatura

Wykaz sprzętu: waga KERN PLJ 3500-2NM, mieszadło mechaniczne IKA RW 20 digital, homogenizator IKA ULTRA TURRAX T25, mieszadło magnetyczne bezsilnikowe z grzaniem WIGO 1501/1502, płyta grzejna SWITCH ON CO-A0201, termometr Testo 945, szkło laboratoryjne.

4.3.2. Surowce

Wykaz wykorzystanych surowców i ich producentów/dystrybutorów (nazwa handlowa/producent): Epimedium Extract (GPD)-RSPO (The Garden of Natural Solution Co.), Glucosamine Sulfate (P.P.H. Standard Sp. z o.o.), Wormwood Extract (Melisa S.C. Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Usługowe), Methyl Sulfonyl Methane (Cardinal Pharma S.A.), Arnica Extract (Melisa S.C. Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Usługowe), Weylcare ATBS S0100 (DKSH Switzerland LTD.), Propylene Glycol (Donauchem Polska Sp. z o.o.), Menthol (Oqema Polska Sp. z o.o.), PEG-40 Hydrogenated Castor Oil (Brenntag Polska Sp. z o.o.), Rosemary Essential Oil (Przedsiębiorstwo Avicenna Oil Witold Podlaski), Eucalyptus Essential Oil (Przedsiębiorstwo Avicenna Oil Witold Podlaski), Clove Essential Oil (Przedsiębiorstwo Avicenna Oil Witold Podlaski), Sharomix 721 (Sharon Personal Care Srl), Natrosol™ 250 HHR (Ashland Polska Sp. z o.o.), Cosmedia SP (BASF Polska), Cetyl Alcohol (GHP Sp. z o.o. Sp.k.), Cetareth 25 (GHP Sp. z o.o. Sp.k.), Genemuls GS SE (GHP Sp. z o.o. Sp.k.), Lipex Shea Soft (AAK AB), Refined Grapeseed Oil (Biocosmethic), Keltrol® CG-T (CP Kelco), CetPro VBE (ProTec Ingredia).

4.3.3. Przygotowanie emulsji typu O/W

Pierwszą formułę emulsji otrzymano techniką emulgowania przy pomocy homogenizatora. Do osobnych, szklanych zlewek odważono odpowiednie ilości składników niezbędnych do przygotowania 100 g emulsji (przedstawione w tabeli 3).

Składniki stałe fazy olejowej stopiono na płycie grzejnej w temperaturze 55 °C, a część ciekłą fazy olejowej dodano po stopieniu części stałej. Siarczan glukozaminy i MSM (Metylosulfonylometan) rozpuszczono w fazie wodnej przy użyciu mieszadła magnetycznego. Po całkowitym rozpuszczeniu siarczanu glukozaminy i MSM dodano gumę ksantanową przy ciągłym mieszaniu i włączono podgrzewanie, kontynuowane do osiągnięcia przez masę temperatury 50 °C. Fazę olejową przeniesiono do fazy wodnej i homogenizowano przez 1 minutę (5000 rpm), a następnie przeniesiono masę na mieszadło mechaniczne, gdzie kontynuowano mieszanie (350 rpm), aż temperatura masy spadła do 30 °C. Dodano kolejne składniki fazy C i konserwant. Następnie kontynuowano mieszanie przez 10 minut (350 rpm).

Tab. 3. Wstępny skład formułacji emulsyjnej 1

Formułacja emulsja 1				
Faza	Kolejność składnika	Nazwa handlowa	Składnik INCI	Funkcja
A	A1	Epimedium Extract (GPD) - RSPO	Water	Składnik aktywny
			Propanediol	
	A2	Glucosamine Sulfate	<i>Epimedium Koreanum</i> Extract	Składnik aktywny
			Glucosamine Sulfate	
	A3	Wormwood Extract	Glycerin	Składnik aktywny
			Water	
	A4	Methyl Sulfonyl Methane	Butylene Glycol	Składnik aktywny
<i>Artemisia Absinthium</i> Extract				
A5	Arnica Extract	Dimethyl Sulfone	Składnik aktywny	
		Water		
A6	Propylene Glycol	Propylene Glycol	Promotor przenikania	
A7	Keltrol® Cg-T	Xanthan Gum	Modyfikator reologii	
B	B1	Cetyl Alcohol	Cetyl Alcohol	Emulgator
	B2	Genemuls Gs Se	Glycetyl Stearate	Emulgator
	B3	Cetareth 25	Cetareth 25	Emulgator
	B4	Rafined Grapeseed Oil	<i>Vitis Vinifera</i> Seed Oil	Składnik bazowy
	B5	Lipex Sheasoft	Butyrospermum Parkii Butter	Składnik bazowy
C	C1	Menthol	Menthol	Promotor przenikania, składnik chłodzący
	C2	Peg-40 Hydrogentated Castor Oil	Glycerin	Składnik powierzchniowo czynny
			Water	
	C3	Rosemary Essential Oil	<i>Rosmarinus Officinalis</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	C4	Eucalyptus Essential Oil	<i>Eucalyptus Globulus</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
C5	Clove Essential Oil	<i>Eugenia Caryophyllus</i> Bud Oil	Składnik aktywny	
K	K1	Sharomix 721	Dehydroacetic Acid Benzyl Alcohol	Konserwant

4.3.4. Przygotowanie żelu

Początkowo przygotowano 3 formułacje żelowe po 100 g każda, w celu wyłonienia najkorzystniejszego zagęstnika.

4.3.4.1. Preparatyka formułacji żelowej 1

Przy pomocy wagi KERN PLJ 3500-2NM odważono odpowiednie ilości składników każdej z faz (przedstawione w tabeli 4). Fazę wodną umieszczono w szklanej zlewce o pojemności 200 ml i mieszano przy pomocy mechanicznego mieszadła (250 rpm) do czasu rozpuszczenia siarczanu glukozaminy i MSM. Do mieszaniny dodano składnik B1 przy ciągłym mieszaniu. Następnie przeniesiono zlewkę na płytę grzejną i podgrzano do temperatury 55 °C monitorując temperaturę. Po zagęstnieniu masy stopniowo dodawano fazę C i konserwant przy ciągłym mieszaniu przez 10 minut (350 rpm).

Tab. 4. Wstępny skład formułacji żelowej nr 1

Formułacja żel 1				
Faza	Kolejność składnika	Nazwa handlowa	Składnik INCI	Funkcja
A	A1	Woda oczyszczona	Water	Składnik aktywny
	A2	Epimedium Extract (GPD)-RSPO	Water Propanediol <i>Epimedium Koreanum</i> Extract	Składnik aktywny
	A3	Glucosamine Sulfate	Glucosamine Sulfate	Składnik aktywny
	A4	Wormwood Extract	Glycerin Water Butylene Glycol <i>Artemisia Absinthium</i> Extract	Składnik aktywny
	A5	Methyl Sulfonyl Methane (MSM)	Dimethyl Sulfone	Składnik aktywny
	A6	Arnica Extract	Water Glycerin <i>Arnica Montana</i> Flower Extract Potassium Sorbate Sodium Benzoate	Składnik aktywny
	A7	Propylene Glycol	Propylene Glycol	Promotor przenikania
B	B1	Natrosol™ 250 HHR	Hydroxyethylcellulose	Modyfikator reologii, zagęstnik

METODYKA PRACY

C	C1	Menthol	Menthol	Promotor przenikania, składnik chłodzący
	C2	Peg-40 Hydrogentated Castor Oil	Peg-40 Hydrogentated Castor Oil	Składnik powierzchniowo czynny
	C3	Rosemary Essential Oil	<i>Rosmarinus Officinalis</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	C4	Eucalyptus Essential Oil	<i>Eucalyptus Globulus</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	C5	Clove Essential Oil	<i>Eugenia Caryophyllus</i> Bud Oil	Składnik aktywny
K	K1	Sharomix 721	Dehydroacetic Acid Benzyl Alcohol	Konserwant

4.3.4.2. Preparatyka formulacji żelowej 2

Odważono odpowiednie ilości składników każdej z faz (przedstawione w tabeli 5). Fazę wodną umieszczono w szklanej zlewce o pojemności 200 ml i mieszano przy pomocy mieszadła mechanicznego (250 rpm) do całkowitego rozpuszczenia siarczanu glukozaminy i MSM. Do mieszaniny dodano surowiec żelujący (składnik B1) przy ciągłym mieszaniu 250 rpm, następnie masę zżelowano poprzez dodatek trietanolaminy (faza C) i kontynuowano mieszanie. Dalej, stopniowo dodawano fazę D i konserwant przy ciągłym mieszaniu przez 10 minut (350 rpm).

Tab. 5. Wstępny skład formulacji żelowej nr 2

Formulacja żel 2				
Faza	Kolejność składnika	Nazwa handlowa	Składnik INCI	Funkcja
A	A1	Woda oczyszczona	Water	Rozpuszczalnik
	A2	Epimedium Extract (GPD) - RSPO	Water	Składnik aktywny
			Propanediol <i>Epimedium Koreanum</i> Extract	
	A3	Glucosamine Sulfate	Glucosamine Sulfate	Składnik aktywny
	A4	Wormwood Extract	Glycerin	Składnik aktywny
Water Butylene Glycol <i>Artemisia Absinthium</i> Extract				
A5	Methyl Sulfonyl Methane (MSM)	Dimethyl Sulfone	Składnik aktywny	

METODYKA PRACY

			Water	
			Glycerin	
	A6	Arnica Extract	<i>Arnica Montana</i> Flower Extract	Składnik aktywny
			Potassium Sorbate	
			Sodium Benzoate	
	A7	Propylene Glycol	Propylene Glycol	Promotor przenikania
B	B1	Carbopol	Carbomer	Zagęstnik
	C1	Menthol	Menthol	Promotor przenikania, składnik aktywny
C	C2	Peg-40 Hydrogentated Castor Oil	Peg-40 Hydrogentated Castor Oil	Składnik powierzchniowo czynny
	C3	Rosemary Essential Oil	<i>Rosmarinus Officinalis</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	C4	Eucalyptus Essential Oil	<i>Eucalyptus Globulus</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	C5	Clove Essential Oil	<i>Eugenia Caryophyllus</i> Bud Oil	Składnik aktywny
K	K1	Sharomix 721	Dehydroacetic Acid Benzyl Alcohol	Konserwant

4.3.4.3. Preparatyka formulacji żelowej 3

Odważono odpowiednie ilości składników każdej z faz (przedstawione w tabeli 6). Fazę wodną umieszczono w szklanej zlewce o pojemności 200 ml i mieszano przy pomocy mieszadła mechanicznego do całkowitego rozpuszczenia siarczanu glukozaminy i MSM. Do mieszaniny dodano zagęstnik (składnik B1) przy ciągłym mieszaniu, a następnie resztę składników kontynuując mieszanie przez 10 minut (350 rpm).

Tab. 6. Wstępny skład formulacji żelowej nr 3

Formulacja żel 3				
Faza	Kolejność składnika	Nazwa handlowa	Składnik INCI	Funkcja
	A1	Woda oczyszczona	Water	Rozpuszczalnik
A	A2	Epimedium Extract (GPD)-RSPO	Water Propanediol <i>Epimedium Koreanum</i> Extract	Składnik aktywny
	A3	Glucosamine Sulfate	Glucosamine Sulfate	Składnik aktywny

METODYKA PRACY

			Glycerin	
			Water	
A4	Wormwood Extract		Butylene Glycol	Składnik aktywny
			<i>Artemisia Absinthium</i> Extract	
A5	Methyl Sulfonyl Methane (MSM)		Dimethyl Sulfone	Składnik aktywny
			Water	
			Glycerin	
A6	Arnica Extract		<i>Arnica Montana</i> Flower Extract	Składnik aktywny
			Potassium Sorbate	
			Sodium Benzoate	
A7	Propylene Glycol		Propylene Glycol	Promotor przenikania
B	B1	Cosmedia SP	Sodium Polyacrylate	Składnik konsystencjotwórczy
	C1	Menthol	Menthol	Promotor przenikania, składnik aktywny
	C3	Rosemary Essential Oil	<i>Rosmarinus Officinalis</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
C	C4	Eucalyptus Essential Oil	<i>Eucalyptus Globulus</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	C5	Clove Essential Oil	<i>Eugenia Caryophyllus</i> Bud Oil	Składnik aktywny
K	K1	Sharomix 721	Dehydroacetic Acid	Konserwant
			Benzyl Alcohol	

4.3.5. Przygotowanie maści

Do szklanych zlewek odważono odpowiednie ilości składników niezbędnych do przygotowania 100 g maści (przedstawione w tabeli 7). Składniki stałe fazy olejowej (FAZA B) stopiono na płycie grzejnej doprowadzając do temperatury 55 °C. Siarczan glukozaminy i MSM rozpuszczono w fazie wodnej przy użyciu mieszadła magnetycznego. Po całkowitym rozpuszczeniu siarczanu glukozaminy i MSM przy ciągłym mieszaniu włączono podgrzewanie, kontynuowane do osiągnięcia przez masę temperatury 50 °C. Fazę wodną (FAZA A) przeniesiono do fazy tłuszczowej (FAZA B) i homogenizowano przez 1 minutę (5000 rpm), a następnie przeniesiono masę na mieszadło mechaniczne, gdzie kontynuowano mieszanie (250 rpm), aż temperatura masy spadła do 30 °C. Dodano kolejne składniki fazy C i konserwant, kontynuowano mieszanie przez 10 minut (350 rpm), pozostawiono masę do całkowitego ostygnięcia w temperaturze pokojowej.

Tab. 7. Wstępny skład formułacji w postaci maści

Formułacja maść 1				
Faza	Kolejność składnika	Nazwa handlowa	Składnik INCI	Funkcja
A	A2	Epimedium Extract (GPD) - RSPO	Water Propanediol <i>Epimedium Koreanum</i> Extract	Składnik aktywny
	A3	Glucosamine Sulfate	Glucosamine Sulfate	Składnik aktywny
	A4	Wormwood Extract	Glycerin Water Butylene Glycol <i>Artemisia Absinthium</i> Extract	Składnik aktywny
	A5	Methyl Sulfonyl Methane (MSM)	Dimethyl Sulfone	Składnik aktywny
	A6	Arnica Extract	Water Glycerin <i>Arnica Montana</i> Flower Extract Potassium Sorbate Sodium Benzoate	Składnik aktywny
	A7	Propylene Glycol	Propylene Glycol	Promotor przenikania
	B	B1	Petrolatum	Petrolatum
B2		Genemuls GS SE	Glyceryl Stearate	Emulgator
B3		Cetareth 25	Cetareth 25	Emulgator
B4		Cetyl Alcohol	Cetyl Alcohol	Emulgator
C	C1	Menthol	Menthol	Promotor przenikania, składnik aktywny
	C3	Rosemary Essential Oil	<i>Rosmarinus Officinalis</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	C4	Eucalyptus Essential Oil	<i>Eucalyptus Globulus</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	C5	Clove Essential Oil	<i>Eugenia Caryophyllus</i> Bud Oil	Składnik aktywny
	K	K1	Sharomix 721	Dehydroacetic Acid Benzyl Alcohol

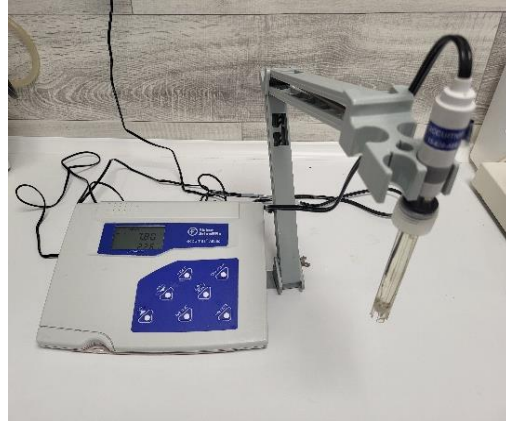
4.4. Specyfikacja fizykochemiczna opracowywanych produktów wraz z metodyką analityczną

4.4.1. Pomiar pH

Metoda ma zastosowanie do oznaczania pH produktów kosmetycznych i ich roztworów metodą potencjometryczną zgodnie z wymaganiami Ph. Eur 2.2.3 [377]. Oznaczenie pH emulsji i hydrożelu przeprowadzano bezpośrednio w preparacie po jego sporządzeniu, w trakcie badań stabilności oraz podczas kontroli jakości procesu produkcji. W przypadku wyjęcia preparatów z warunków przechowywania (temperatura pokojowa, $55\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), przed rozpoczęciem analizy, odczekano do czasu osiągnięcia przez próbkę temperatury pokojowej.

Do badania wykorzystano uprzednio skalibrowany, zgodnie z zaleceniami producenta (z wykorzystaniem buforów wzorcowych o pH 4,01, 7,00 oraz 10,00 Mettler Toledo), pH-metr Fisher Scientific Accumet AE150 (Rys. 6) wyposażony w szklaną elektrodę kombinowaną. Oznaczenie wykonano w temperaturze pokojowej według wewnętrznej metody Laboratorium INVANTO Sp. z o.o. MB/COS/04/01 - Oznaczenie pH produktów kosmetycznych metodą potencjometryczną. Do zlewki o pojemności 100 ml odważono 50 g analizowanej masy produktu, następnie elektrodę pomiarową zanurzono bezpośrednio w badanej masie, tak by cała część z membraną była zanurzona w badanej próbce. Odczytu wartości pH dokonano po ustabilizowaniu układu pomiarowego, przy braku zmian wartości pH na wyświetlaczu aparatu. Badanie powtórzono trzykrotnie, z których jako wynik wyliczono średnią wartość.

Rys. 6. Aparat do pomiaru pH Fisher Scientific Accumet AE150 [zdjęcie własne]



4.4.2. Pomiar gęstości

Metoda ma zastosowanie do oznaczenia gęstości badanego produktu metodą piknometryczną zgodnie z wymaganiami Ph. Eur. 2.2.5 [378]. Oznaczenie gęstości analizowanych formułacji przeprowadzano bezpośrednio w preparacie po sporządzeniu, w trakcie badań stabilności oraz podczas kontroli jakości procesu produkcji. Oznaczenie wykonano w temperaturze pokojowej według wewnętrznej metody Laboratorium INVANTO Sp. z o.o. MB/COS/02/01 - Oznaczenie gęstości produktów kosmetycznych metodą piknometryczną. Suchy piknometr metalowy z przykrywką P - 1 POL-ZAF S.C. (Rys. 7.)

Rys. 7. Piknometr metalowy z przykrywką P-1 POL-ZAF S.C. [zdjęcie własne]



spełniający wymagania ISO 2811 - 1 oraz dokumentacji technicznej o pojemności 100,032 cm³ wraz z badaną próbką inkubowano do czasu osiągnięcia temperatury otoczenia. Piknometr z przykrywką zważono na wadze KERN PLJ 3500-2NM i następnie wypełniono masą badanego produktu, unikając tworzenia pęcherzy powietrza. Po zamknięciu piknomtru przykrywką, bibułą usunięto nadmiar substancji i ponownie zważono. Gęstość wyliczono ze wzoru przedstawionego w równaniu nr 4, przy czym za objętość badanej substancji (v_s) przyjęto pojemność piknomtru zgodnie z wzorcowaniem 100,032 cm³. Analizę wykonano trzykrotnie, z których jako wynik wyliczono średnią wartość arytmetyczną.

4.4.3. Oznaczenie lepkości dynamicznej otrzymanych formulacji

Do oznaczenia lepkości dynamicznej wykorzystano wiskozymetr rotacyjny Brookfield LVT 58064 zaopatrzony w komplet wrzecion przeznaczonych do substancji o średnich i wysokich lepkościach, które umożliwiają pomiary w zakresie 1 - 2 mln [mPa*s] oraz termometr Testo 945. Podczas badania monitorowano temperaturę prób. Badane formulacje przeniesiono do szklanych zlewek, zmierzono ich temperaturę, a następnie zanurzono w nich odpowiednie wrzeciono wiskozymetru. Lepkość mierzono w temperaturze 23 °C za pomocą wrzeciona nr 3 dla kremów i nr 4 dla żeli, przy prędkości obrotowej wrzeciona 12 obr/min dla żeli i 1,5 obr/min dla emulsji. Dla każdej formulacji wykonano trzykrotny pomiar a na podstawie uzyskanych wyników obliczono średnią wartość arytmetyczną.

4.4.4. Ocena sensoryczna badanych formulacji

Ocenę sensoryczną przeprowadzono zgodnie z metodą opisową analizy sensorycznej z wykorzystaniem panelu 5 osób oceniających, o sprawdzonej wrażliwości sensorycznej, gdzie każdy z oceniających:

- pozytywnie przeszedł badania pod kątem zdolności rozróżniania barwy, wrażliwości węchu, czucia powierzchniowego oraz czucia głębokiego,
- został przeszkolony na temat metod i procedur prowadzenia badań sensorycznych, oznaczeń sensorycznych,
- zapoznał się z formularzami oceny oraz zapisu wyników, co do których nie zgłaszał pytań.

Badanie było prowadzone w sposób, który uniemożliwia wzajemne kontaktowanie się osób z grupy oceniających. Masy gotowych produktów kosmetycznych przeniesiono do takich samych szklanych zlewek opisanych dwucyfrowym kodem losowych liczb, tak by oceniający nie mogli wyciągnąć dodatkowych wniosków na temat badanej formulacji. Podczas badania oceniający otrzymali ankiety (załącznik 1) dotyczące cech sensorycznych przedstawionych w tabeli 8, na podstawie których utworzono uśredniony opis produktów kosmetycznych.

Tab. 8. Cechy sensoryczne i metody ich badania wykorzystane w ocenie organoleptycznej

Parametr	Definicja	Ocena	Skala
Kolor	Kolor produktu w odniesieniu do rodzaju, intensywności oraz hedonistyczna ocena	Ocena wzrokowa	Opisowa
Zapach	Zapach w odniesieniu do rodzaju, intensywności oraz hedonistyczna ocena	Opisowa ocena z wykorzystaniem węchu	Opisowa + interwałowa 1 - zapach bardzo nieprzyjemny, 2 - nieprzyjemny, 3 - średnio przyjemny, 4 - przyjemny, 5 - bardzo przyjemny
Konsystencja	Ogólny opis masy produktu jako suma sensorycznych odczuć gęstości, spoiwości i lepkości emulsji	Oceniono opisowo i interwałowo na podstawie wykorzystania wzroku oraz zmysłów czucia powierzchniowego i głębokiego	Opisowa + interwałowa 1 - bardzo ciężka, 2 - ciężka, 3 - średnia, 4 - lekka, 5 - bardzo lekka
Jednorodność	Ogólny opis masy pod kątem obecności efektów niejednorodności	Oceniono opisowo z wykorzystaniem wzroku oraz zmysłu czucia powierzchniowego	Opisowo oceniono obecność zapowietrzenia, grudek, zanieczyszczeń, rozwarstwień fazowych
Rozprowadzanie	Łatwość rozprowadzenia produktu na skórze	Oceniono z wykorzystaniem czucia powierzchniowego, ocena interwałowa	Ocena interwałowa 1 - bardzo trudne, 2 - trudne, 3 - średnio trudne, 4 - łatwe, 5 - bardzo łatwe

Tłustość	Zdolność do tworzenia tłustego filmu po wsmarowaniu w odniesieniu do wchłaniania masy produktu	Ocena interwałowa wzrokowa oraz z wykorzystaniem czucia powierzchniowego	Ocena interwałowa 1 - bardzo tłusta/bardzo ciężko się wchłania, 2 - tłusta/ciężko się wchłania, 3 - średnio tłusta/średnio się wchłania, 4 - lekko tłusta/dobrze się wchłania, 5 - brak filmu/bardzo dobrze się wchłania

4.4.5. Stabilność wirówkowa emulsji

Odważono po 3 g emulsji do każdej z 6 próbek typu Eppendorf o pojemności 5 ml. Probówki sezonowano przez 24 godziny w warunkach temperatury pokojowej (2 sztuki), 40 °C (2 sztuki), 5 °C (2 sztuki), następnie odczekano do powrotu masy do temperatury otoczenia. Probówki umieszczono w rotorze kątowym wirówki Sartorius Centrisart D - 16C (Rys. 8) następnie po zamknięciu przykrywy rotora i pokrywy wirówki próbki wirowano dwukrotnie przy 3500 rpm przez 5 minut.

Po odwirowaniu próbek oceniono wizualnie ich wygląd pod kątem wystąpienia niestabilności, w tym rozwarstwienia układu czy zmiany liczby faz. Objętość fazy niezemulgowanej porównano z całkowitą objętością próbki. Z wykorzystaniem wagi KERN PLJ 3500-2NM zważono całą masę produktu po odwirowaniu oraz masę rozwarstwienia lub wydzielonej fazy, na podstawie czego wyznaczono stabilność emulsji według wzoru (Równanie 7):

Równanie 7. Równanie opisujące stabilność emulsji

$$SE = \frac{m_0 - m}{m_0} 100 \%$$

gdzie:

SE - Stabilność emulsji [%],

m_0 - całkowita masa produktu po wirowaniu [g],

m - masa wydzielonej, niezemulgowanej fazy [g].

Rys. 8. Wirówka Sartorius Centrisart D - 16C [zdjęcie własne]



4.4.6. Określenie stabilności produktów metodą wielokrotnego rozpraszania światła – Turbiscan

W celu zobrazowania niestabilności przygotowanych formułacji emulsyjnych wykorzystano aparat Turbiscan Lab Expert Formulation. Fiolki pomiarowe wypełniono od dołu do góry przygotowaną emulsją do określonej wysokości tak by masa analizowanych substancji zajmowała około 90 % wysokości. Spłaszczono menisk poprzez delikatne stuknięcie fiolką o blat oraz sprawdzono czy nie występują puste przestrzenie wypełnione powietrzem (pęcherze powietrza), które mogłyby zaburzyć odczyt. Tak przygotowane próbki kolejno umieszczono w uchwycie urządzenia pomiarowego nastawionego na 25 °C. Pomiarów dokonywano od dnia sporządzenia preparatów przez okres 4 tygodni, w następujących dniach: 1, 5, 14 oraz 28, a następnie przeanalizowano uzyskane wyniki.

4.4.7. Ocena mikroskopowa emulsji i określenie typu emulsji metodą mikroskopową

Do oceny mikroskopowej emulsji i określenia jej typu wykorzystano metody mikroskopii optycznej.

- Przygotowanie preparatów do obserwacji

Na jedno szkiełko podstawowe naniesiono niewielką ilość czystej emulsji i przykryto szkiełkiem nakrywkowym. Do moździerza odważono 5 g badanej emulsji oraz 0,1 g oranżu metylowego, które dokładnie wymieszano przez rozcieranie w moździerzu do otrzymania jednorodnej konsystencji. Niewielką ilość mieszaniny naniesiono na szkiełko podstawowe, przykryto szkiełkiem nakrywkowym i delikatnie dociśnięto przez bibułę, tak by uniknąć efektu warstwowości i pływania emulsji.

- Ocena mikroskopowa
Wszystkie preparaty obserwowano przy użyciu mikroskopu optycznego Carl Zeiss Suzhou Co., Ltd. Axiolab 5 (Rys. 9) pod powiększeniem 1000x z wykorzystaniem immersji, gdzie obserwowano zachowanie i strukturę emulsji oraz wybarwienie faz w odniesieniu do niezabarwionego preparatu.

Rys. 9. Mikroskop optyczny Carl Zeiss Suzhou Co., Ltd. Axiolab 5 [zdjęcie własne]



4.4.8. Oznaczenie aktywności wody w maści

Metoda ma zastosowanie do oznaczenia wody aktywnej w produktach kosmetycznych zgodnie z wymaganiami Ph. Eur.2.9.39 [379]. Oznaczenie aktywności wody

analizowanych formułacji przeprowadzono bezpośrednio w masie produktu po sporządzeniu, w trakcie badań stabilności oraz podczas kontroli jakości procesu produkcji. Oznaczenie wykonano według wewnętrznej metody Laboratorium INVANTO Sp. z o.o. MB/COS/03/01 - Oznaczenie aktywności wody w produktach kosmetycznych przy pomocy stacjonarnego higroskopu Rotronic z sondą pomiarową HC2-AW-USB (Rys. 10) uprzednio skalibrowanym przy pomocy żelu krzemionkowego oraz z wykorzystaniem oprogramowania V3.2 dedykowanego dla higroskopów firmy Rotronic.

Próbki inkubowano do czasu osiągnięcia temperatury pokojowej, a następnie wypełniono pojemnik pomiarowy masą produktu. Pojemnik umieszczono w podstawie sondy i zamknięto pokrywą z sondą, po czym uruchomiono analizę w programie. Odczytu dokonano po ustabilizowaniu się układu pomiarowego, przy braku istotnych zmian wartości w programie. Pomiar wykonano trzykrotnie, z których jako wynik wyliczono średnią wartość arytmetyczną.

Rys. 10. Sonda do pomiaru aktywności wody Rotronic HC2-AW-USB [zdjęcia własne]



4.5. Wykonanie badań przenikania przeznaskórkowego *in vitro* opracowanych formułacji wybranych form aplikacyjnych

4.5.1. Badanie uwalniania ikaryny oraz ocena kinetyki jej przenikania przez barierę imitującą skórę

Test uwalniania *in vitro* ikaryny z ekstraktu *Epimedium Koreanum* przeprowadzono za pomocą aparatu łopatkowego 708-DS Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, CA, USA) wyposażonego w 8 naczyń o pojemności 250 ml, z których każde zaopatrzone jest w mieszadło łopatkowe oraz umieszczony pod nią dysk z komorą ekstrakcyjną. Aparat łopatkowy do uwalniania sprzężony był ze spektrofotometrem UV-VIS Cary Bio (Varian) w celu pomiaru uwolnionej ilości ikaryny. Jako płyn akceptorowy przygotowano bufor fosforanowy o pH 5,8. Bufor przygotowano poprzez połączenie 1464 ml (1,464 L) roztworu NaOH (Avantor, zawartość minimum 98,8%), powstałego w skutek rozpuszczenia 6,0 g wodorotlenku sodu w 1500 ml (1,5 L) wody demineralizowanej, z roztworem KH_2PO_4 ,

(Avantor, zawartość minimum 99 %), powstałym w skutek rozpuszczenia 32,5 g KH_2PO_4 w 2000 ml (2,0 L) wody demineralizowanej. Zmierzone i odnotowano pH powstałego buforu. Do badania wykorzystano syntetyczną membranę celulozową Cuprophan (Agilent) o grubości 11,5 μm , którą przed badaniem kondycjonowano w buforze akceptorowym. Odważono 1,0 g badanej formułacji z ekstraktem *Epimedium Koreanum* oraz tej samej formułacji z dodaną czystą substancją aktywną zamiast ekstraktu i umieszczono w niezależnych komorach ekstrakcyjnych, które następnie przeniesiono do naczyń aparatu wypełnionych płynem akceptorowym. Badanie uwalniania substancji aktywnej prowadzono w temperaturze 32 °C przez 96 godzin, gdzie pobór próbek następował przez pierwsze 2 godziny co 15 minut, a po tym czasie co godzinę. Prędkość mieszania wynosiła 250 obr/min. Ilość uwolnionej ikaryny obliczono poprzez pomiar zmian absorbancji w czasie przy długości fali $\lambda = 270 \text{ nm}$.

4.5.2. Przenikanie *in vitro* w komorze Franz'a - siarczan glukozaminy

Badanie przenikania *in vitro* dla siarczanu glukozaminy zostało przeprowadzone przez laboratorium zewnętrzne przy użyciu systemu Copley Scientific TM firmy Franz Vertical Diffusion Cell Test System z mieszaniem magnetycznym. W celu przeprowadzenia analizy przenikania wykorzystano syntetyczny, membranowy polisulfonowy filtr HT Tuffryn 25 mm (Pall Corporation, USA), który kondycjonowano przez 30 minut przed rozpoczęciem badania uwalniania *in vitro* w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) o pH 7,4 (PolAura). Membranę umieszczono pomiędzy komorami: akceptorową i donorową pionowych komór dyfuzyjnych. Komory akceptorowe wypełniono solą fizjologiczną buforowaną fosforanami (PBS) o pH 7,4. Do komory donorowej na membranę naniesiono 0,1 g analizowanych formułacji. Rejestrowano ilość preparatu w każdej komorze i czas. Próbkę pobierano co godzinę w ilości 200 μl przez 5 godzin. Po pobraniu każdej próbki przywracano objętość buforu fosforanowego, aby utrzymać panujące warunki. Ilość uwolnionej substancji oznaczono przy pomocy HPLC z detektorem

Rys. 11. Aparat do HPLC Waters Alliance 2695 z detektorem RID model 2489 [zdjęcie własne]



RID (Rys. 11) Kolumna Eclipse XBD-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), przy parametrach analizy:

- faza ruchoma: 55 % bufor fosforanowy (pH 3,0) (1 ml/2 L H₂O), 45 % acetonitryl (ACN),
- objętość nastrzyku: 10 μ l,
- temperatura kolumny: 28 °C,
- przepływ fazy ruchomej: 1 ml/min.

4.5.3. Przenikanie *in vitro* w komorze Franz'a - ikaryna

Badanie przenikania *in vitro* dla ikaryny przeprowadzono w zewnętrznym laboratorium przy pomocy systemu Copley Scientific TM firmy Franz Vertical Diffusion Cell Test z magnetycznym mieszaniem. W analizie wykorzystano syntetyczny filtr membranowy polisulfonowy - filtr HT Tuffryn 25 mm (Pall Corporation, USA). Membrana przez 30 minut przed badaniem była kondycjonowana w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) o pH 7,4. Następnie pomiędzy akceptorową i donorową komorę dyfuzyjną umieszczono przygotowany filtr membranowy, po czym komorę akceptorową wypełniono solą fizjologiczną buforowaną fosforanami (PBS) o pH 7,4. Na membranę ze strony komory donorowej naniesiono analizowaną formułację w ilości 0,1 g. Warunki analizy były następujące: 32 °C, mieszanie 50 rpm. Monitorowano ilość preparatu w każdej z komór i czas analizy. Poboru próbek w objętości 200 μ l dokonywano co godzinę przez 5 godzin. Pobraną ilość uzupełniano buforem fosforanowym, aby utrzymać panujące warunki. Ilość uwolnionej substancji oznaczono przy pomocy HPLC-UV (Agilent Technologies), kolumna Kolumna C18 (5 μ m, 250 mm \times 4,6 mm i.d., YMC Co. Ltd, Kyoto, Japan). Warunki prowadzenia oznaczenia przedstawiono w tabeli 10.

Tab. 10. Warunki analizy HPLC oznaczenia ikaryny z płynu akceptorowego pobranego po badaniu przenikania

Parametr	Warunki analizy
Przygotowanie próbek	Próbki oraz faza B była filtrowana przez filtr 0,45 μ m Millipore. Faza A była filtrowana przez filtr 0,22 μ m Millipore
Faza ruchoma	Metanol 54 % (Faza A); woda 46 % (Faza B)
Długość fali	270 nm
Przepływ fazy ruchomej	1,1 ml/min
Objętość nastrzyku	20 μ l
Temperatura kolumny	25 °C
Orientacyjny czas retencji ikaryny	25 min

4.6. Optymalizacja procesu otrzymywania produktów kosmetycznych i podniesienie skali ich wytwarzania do skali półtechnicznej

4.6.1. Optymalizacja procesu wytwarzania i podniesienie skali wytwarzania formułacji żelowej

Po ustaleniu dokładnego składu ilościowego składników, formułacja żelowa przedstawiała się, jak w tabeli 11. Na jej podstawie przeprowadzono optymalizację składu i podniesienie skali procesu wytwarzania do półtechnicznej.

Tab. 11. Skład wybranej formułacji żelowej po optymalizacji

Formułacja żel 1				
Faza	Kolejność składnika	Nazwa handlowa	Składnik INCI	Funkcja
A	A1	Woda oczyszczona	Water	Rozpuszczalnik
	A2	Epimedium Extract(GPD)-RSPO	Water	Składnik aktywny
			Propanediol	
			<i>Epimedium Koreanum</i> Extract	
	A3	Glucosamine sulfate	Glucosamine Sulfate	Składnik aktywny
	A4	Wormwood extract	Glycerin	Składnik aktywny
			Water	
			Butylene Glycol	
		<i>Artemisia Absinthium</i> Extract		
A5	Methyl sulfonyl methane (MSM)	Dimethyl Sulfone	Składnik aktywny	
A6	Arnica extract	Water	Składnik aktywny	
		Glycerin		
		<i>Arnica Montana</i> Flower Extract		
		Potassium Sorbate		
		Sodium Benzoate		
A7	Propylene glycol	Propylene Glycol	Promotor przenikania	
A8	Natrosol™ 250 HHR	Hydroxyethylcellulose	Modyfikator reologii, zagęstnik	
B	B1	Menthol	Menthol	Promotor przenikania, składnik aktywny

	B2	Peg-40 hydrogentated castor oil	Peg-40 Hydrogentated Castor Oil	Składnik powierzchniowo czynny
	B3	Rosemary essential oil	<i>Rosmarinus Officinalis</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	B4	Eucalyptus essential oil	<i>Eucalyptus Globulus</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	B5	Clove essential oil	<i>Eugenia Caryophyllus</i> Bud Oil	Składnik aktywny
K	K1	Sharomix 721	Dehydroacetic Acid Benzyl Alcohol	Konserwant

4.6.1.1. Opracowanie i optymalizacja technologii otrzymywania formulacji w skali laboratoryjnej

W pierwszym etapie prac opracowano technologię dla wielkości wsadu 500 g, z zachowaniem założonych parametrów naddatku procesowego w zakresie 2 % wag. – 5 % wag. oraz wydajności procesu na poziomie > 95 % wag. Podczas opracowywania technologii uwzględniono także zachowanie procesu dwufazowego i temperatury procesu 20 °C – 55 °C, tak jak w przypadku pierwotnych formulacji opracowanych dla wielkości 100 g wsadu. Do wytworzenia masy produktu wykorzystano: mieszadło mechaniczne zmiennie-obrotowe IKA RW 20 digital, mieszadło śmigłowe (6 - łopatkowe), wagę KERN PLJ 3500-2NM, płyta grzejna SwitchOn CO-A0201 oraz termometr laboratoryjny Testo 945. Przebieg procesu w skali laboratoryjnej obejmował:

- Proces – faza A

Do wody (A1) dodano naważone składniki: A2, A3, A4, A5, A6, A7, które mieszano przy 250 rpm, aż do całkowitego rozpuszczenia składników. Następnie do uzyskanego roztworu dodano partiami naważony składnik A8 (zagęstnik) i przeniesiono na płytę grzejną z jednoczesnym mieszaniem przy obrotach 350 rpm, do uzyskania przez masę 55 °C. Mieszanie kontynuowano do uzyskania jednorodnego żelu.

- Proces – faza B

Połączono ze sobą składniki B2, B3, B4 i B5 i wymieszano (przy 350 rpm) do ujednorodnienia mieszaniny, następnie dodano składnik B1 i kontynuowano mieszanie do rozpuszczenia kryształów mentolu, do całkowitego ujednorodnienia składników.

- Proces – łączenie faz A + B

Do fazy A przy ciągłym mieszaniu (obroty 350 rpm) dodawano stopniowo fazę B i kontynuowano mieszanie do całkowitego ujednorodnienia żelu.

- Konserwacja układu

Do połączonych faz A + B dodano konserwant przy ciągłym mieszaniu (obroty 350 rpm) do całkowitego ujednorodnienia mieszaniny.

4.6.1.2. Opracowanie i optymalizacja technologii otrzymywania formulacji w skali półtechnicznej

W drugim etapie prac opracowano technologię dla wielkości wsadu 50 000 g - 150 000 g, z zachowaniem założonych parametrów naddatku procesowego w zakresie 3,5 % wag.- 5,0 % wag. oraz wydajności procesu na poziomie > 96 % wag. Utrzymano także dwufazowość procesu i temperaturę etapów w zakresie 20 °C – 55 °C, tak jak w przypadku pierwotnych formulacji opracowanych dla wielkości 100 g i 500 g wsadu. Do wytworzenia masy produktu wykorzystano: mieszalnik (Rys. 12) o pojemności 50 L- 150 L wyposażony w mieszadło kotwicowe, ramowe z łamaczami fal i zgarniacze teflonowe (poziome, pionowe), młyn laboratoryjny IKA (model: M20) oraz waga OHAUS I-D33xW60C1R6.

Rys. 12. Mieszalnik P&M Promixer [zdjęcia własne]



Przebieg procesu w skali półtechnicznej obejmował:

- Proces – faza A

Do wody (składnik A1) dodano naważone składniki: A2, A3, A4, A5, A6, A7 i nastawiono mieszanie przy obrotach 20 rpm - 63 rpm, aż do całkowitego rozpuszczenia składników. Do uzyskanego roztworu dodano partiami naważony składnik A8 (zagęstnik) i mieszano przy obrotach 20 rpm - 63 rpm (optymalizacja procesu mieszania względem obrotów) i grzaniu do 55 °C, które kontynuowano do uzyskania jednorodnego żelu.

- Proces – faza B

Połączono składniki B2, B3, B4, B5 i wymieszano do ujednorodnienia mieszaniny. Dodano zmielony składnik B1 (mentol) i kontynuowano mieszanie przy obrotach 20 rpm – 63 rpm, do całkowitego zaniku kryształów – określono czas: od 2 minut do 7 minut (w zależności od rozdrobnienia kryształów, w recepturze technologicznej dodano etap mielenia kryształów składnika B1). Następnie dodano składniki B4, B5, B6 i mieszano przy wybranym wcześniej parametrze ilości rpm do całkowitego ujednorodnienia składników (etap bez optymalizacji, czas mieszania przez 2 minuty).

- Proces – łączenie faz A + B

Do fazy A przy ciągłym mieszaniu (obroty 20 rpm - 63 rpm - optymalizacja procesu mieszania względem obrotów) dodawano stopniowo fazę B i mieszano do uzyskania całkowitego ujednorodnienia żelu.

- Konserwacja układu

Do połączonych faz AB dodano składnik K (konserwant) przy kontynuowaniu mieszania przy 20 rpm - 63 rpm, do całkowitego ujednorodnienia mieszaniny.

4.6.1.3. Optymalizacja procesu mieszania w skali półtechnicznej

a) Prędkość i czas procesu mieszania

Przeprowadzono optymalizację prędkości i czasu mieszania kluczowych etapów tego procesu) sprawdzając efekty dla 4 różnych prędkości i 3 czasów mieszania (Tab. 12). Odnotowano uwagi na podstawie, których dokonano wyboru najkorzystniejszych parametrów procesu (Tab. 12).

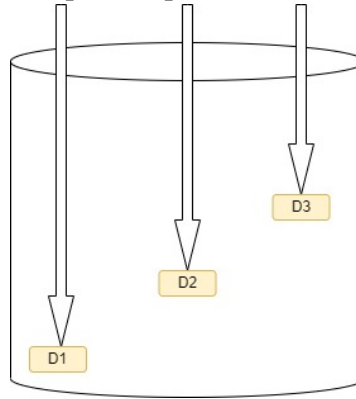
Tab. 12. Parametry optymalizacji procesu mieszania

Prędkość mieszania [rpm]	Czas trwania procesu [min]
ETAP 1	
20	3
	6
	9
35	3
	6
	9
50	3
	6
	9
63	3
	6
	9
ETAP 2	
20	8
	10
	12
35	8
	10
	12
50	8
	10
	12
63	8
	10
	12

b) Jednorodność otrzymanej mieszaniny

W procesie docelowym jako parametr jednorodności mieszaniny, zbadano zawartość składnika A2 (ikaryna) w otrzymanej mieszaninie. Pobór prób przeprowadzono zgodnie z poniższym schematem (Rys. 13).

Rys. 13. Schemat poboru prób dla formulacji żelowych



D1, D2 i D3 to punkty poboru masy do badania zawartości wybranego składnika (ikaryny) przy pomocy HPLC Agilent Technologies Infinity 1290 detektorem UV-VIS model 2489 (Rys. 14) i kolumny C18 (5 μ m, 250 mm \times 4,6 mm i.d., YMC Co. Ltd, Kyoto, Japan). Parametry procesu były takie same, jak przedstawione w punkcie 4.5.3. niniejszej pracy.

Rys. 14. Aparat HPLC firmy Agilent Technologies Infinity 1290 [zdjęcie własne]



4.6.2. Optymalizacja otrzymywania formulacji emulsyjnej i podniesienie skali jej wytwarzania do laboratoryjnej i półtechnicznej

W tabeli 13 przedstawiono skład formulacji emulsyjnej po optymalizacji procesu.

Tab. 13. Skład formulacji emulsyjnej po optymalizacji

Formulacja emulsja 1				
Faza	Kolejność składnika	Nazwa handlowa	Składnik INCI	Funkcja
A	A1	Epimedium Extract (GPD)-RSPO	Water Propanediol <i>Epimedium Koreanum</i> Extract	Składnik aktywny
	A2	Glucosamine Sulfate	Glucosamine Sulfate	Składnik aktywny
	A3	Wormwood Extract	Glycerin Water Butylene Glycol <i>Artemisia Absinthium</i> Extract	Składnik aktywny
	A4	Methyl Sulfonyl Methane	Dimethyl Sulfone	Składnik aktywny
	A5	Arnica Extract	Water Glycerin <i>Arnica Montana</i> Flower Extract Potassium Sorbate Sodium Benzoate	Składnik aktywny
	A6	Propylene Glycol	Propylene Glycol	Promotor przenikania
	A7	Keltrol® Cg-T	Xanthan Gum	Modyfikator reologii
B	B1	Cetyl Alcohol	Cetyl Alcohol	Emulgator
	B2	Genemuls Gs Se	Glycetyl Stearate	Emulgator
	B3	Cetareth 25	Cetareth 25	Emulgator
	B4	Rafined Grapeseed Oil	<i>Vitis Vinifera</i> Seed Oil	Składnik bazowy
	B5	Lipex Sheasoft	Butyrospermum Parkii Butter	Składnik bazowy
C	C1	Menthol	Menthol	Promotor przenikania, składnik aktywny
	C2	Camphor	Camphor	Promotor przenikania, składnik aktywny

	C2	Peg-40 Hydrogentated Castor Oil	Peg-40 Hydrogentated Castor Oil	Składnik powierzchniowo czynny
	C3	Rosemary Essential Oil	<i>Rosmarinus Officinalis</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	C4	Eucalyptus Essential Oil	<i>Eucalyptus Globulus</i> Leaf Oil	Składnik aktywny
	C5	Clove Essential Oil	<i>Eugenia Caryophyllus</i> Bud Oil	Składnik aktywny
	C6	Cetpro Vbe	Vanillyl Butyl Ether	Składnik aktywny
K	K1	Sharomix 721	Dehydroacetic Acid Benzyl Alcohol	Konserwant

4.6.2.1. Skala laboratoryjna

W pierwszym etapie prac opracowano technologię wytwarzania emulsji dla wielkości wsadu 500 g, z zachowaniem założonych parametrów naddatku procesowego w zakresie 2 % wag. - 5 % wag. oraz wydajności procesu na poziomie > 95 % wag. Podczas opracowywania technologii uwzględniono także zachowanie wszystkich etapów i temperatury procesu 20 °C - 65 °C, tak jak w przypadku pierwotnych formułacji opracowanych dla wielkości 100 g wsadu. Do wytworzenia masy produktu wykorzystano: mieszadło mechaniczne zmiennie-obrotowe IKA RW 20 digital, mieszadło śmigłowe (6 - łopatkowe), homogenizator IKA ULTRA TURRAX T25, wagę KERN PLJ 3500-2NM, płytę grzejącą SwitchOn CO-A0201 oraz termometr laboratoryjny testo 945. Przebieg procesu w skali laboratoryjnej obejmował:

- Proces – faza A

Zmieszano wszystkie naważone składniki: A1, A2, A3, A4, A5, A6 i mieszano przy 250 rpm do całkowitego ujednorodnienia składników z jednoczesnym ogrzewaniem do temperatury 50 °C – 55 °C. Następnie dodano naważoną ilość składnika A7 (guma ksantanowa) i kontynuowano mieszanie przy 250 rpm do całkowitego zdyspergowania składnika A7.

- Proces – faza B

Na płycie grzejącej, w zlewce stopiono składniki B1, B2, B3, B5 kontrolując temperaturę masy, aby nie przekroczyła 65 °C i dodano składniki B4.

- Proces – faza A + B

Do fazy A dodano fazę B i mieszano przy 350 rpm przez 60 s, a następnie masę homogenizowano przy obrotach 10 000 rpm przez 350 s. Następnie masę mieszano z nastawionym chłodzeniem masy do 30 °C.

- Proces – faza C
Odważono wszystkie składniki fazy C i mieszano je razem przy 350 rpm, aż do całkowitego rozpuszczenia kryształów mentolu.
- Proces – faza C + AB
Do wychłodzonej fazy AB dodano fazę C i mieszano przy 350 rpm do uzyskania jednorodnej emulsji.
- Konserwacja układu
Do połączonych faz AB dodano składnik K (konserwant) i kontynuowano mieszanie przy 350 rpm do całkowitego ujednorodnienia emulsji.

4.6.2.2. Skala półtechniczna

W drugim etapie opracowania technologii wytwarzania emulsji dla wielkości wsadu 50 000 g - 150 000 g, zachowano założone parametry naddatku procesowego w zakresie 3,5 % wag. - 5,0 % wag. oraz wydajności procesu na poziomie > 96 % wag. Utrzymano także dwufazowość procesu i temperaturę etapów w zakresie 20 °C – 65 °C, tak jak w przypadku pierwotnych formułacji opracowanych dla wielkości 100 g i 500 g wsadu. Do wytworzenia masy produktu wykorzystano: mieszalnik o pojemności 50 L - 150 L wyposażony w mieszadło kotwicowe, ramowe z łamaczami fal i zgarniacze teflonowe (poziome, pionowe), homogenizator typu rotor-stator IKA T50, młyn laboratoryjny IKA (model: M20) oraz wagę OHAUS I-D33xW60C1R6, drugi mieszalnik dwu płaszczyznowy o pojemności 50-150 L indu Kubasik.

Przebieg procesu w skali półtechnicznej obejmował:

- Proces – faza A
Do wody (A1) dodano naważone składniki: A1, A2, A3, A4, A5, A6 i mieszano przy 35 rpm do całkowitego ujednorodnienia składników przez 2 minuty przy ciągłym grzaniu masy do temperatury 50 °C – 55 °C. Następnie dodano naważoną ilość składnika A7 (gumę ksantanową) i kontynuowano mieszanie przy 35 rpm do całkowitego zdyspergowania składnika A7 przez 7 minut.
- Proces – faza B
W topielniku rozpuszczono składniki B3, B4, B5, B6 przez ogrzewanie do temperatury 55 °C - 60 °C, po czym dodano składniki B1, B2.
- Proces – faza A + B
Do fazy A dodano fazę B i mieszano przy 20 rpm - 50 rpm przez 120 s, a następnie homogenizowano masę przy 1000 rpm - 3000 rpm (optymalizacja parametrów homogenizacji względem wielkość cząstek fazy rozproszonej). Następnie masę mieszano przy 20 rpm – 50 rpm i ciągłym chłodzeniu do 30 °C.

- Proces – faza C
Składnik C1 (mentol) uprzednio zmielono. Odważono wszystkie składniki fazy C, które mieszano przy 30 rpm do całkowitego rozpuszczenia kryształów (czas mieszania 2 minuty).
- Proces – faza C + AB
Do wychłodzonej fazy AB dodano fazę C i kontynuowano mieszanie przy 20 rpm – 50 rpm do uzyskania jednorodnej emulsji (optymalizacja parametrów mieszania).
- Konserwacja układu
Do połączonych faz AB dodano składnik K (konserwant) i kontynuowano mieszanie przy 30 rpm, aż do całkowitego ujednorodnienia emulsji (czas mieszania 2 minuty).

4.6.2.3. Optymalizacja procesu mieszania i homogenizacji

a) Prędkość i czas procesu mieszania oraz homogenizacji

Optymalizacja procesu wytwarzania emulsji w skali półtechnicznej obejmowała analizę pięciu prędkości i różnego czasu procesu homogenizacji oraz mieszania zgodnie z parametrami przedstawionymi w tabelach 14 i 15. Odnotowano średnicę cząstek fazy rozproszonej oraz wszelkie uwagi, na podstawie których, podjęto decyzję o wyborze optymalnych parametrów procesowych.

Tab. 14. Parametry optymalizacji procesu homogenizacji

Prędkość homogenizacji [rpm]	Czas trwania procesu [min]
1000	1
	3
	5
1500	1
	3
	5
2000	1
	3
	5
2500	1
	3
	5
3000	1
	3
	5

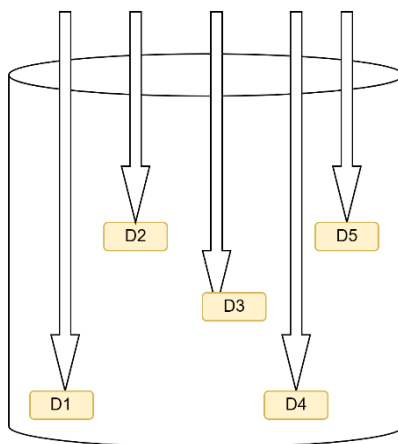
Tab. 15. Parametry optymalizacji procesu mieszania

Prędkość mieszania [rpm]	Czas trwania procesu [min]
ETAP 1	
20	3
	4
	6
30	3
	4
	6
40	3
	4
	6
50	3
	4
	6

b) Jednorodność otrzymanej mieszaniny

Podobnie, jak w przypadku formulacji żelowej, w procesie docelowym jako parametr jednorodności mieszaniny zbadano zawartość składnika A1 (ikaryny) w otrzymanej mieszaninie. Pobór prób przeprowadzono zgodnie z poniższym schematem (Rys. 15.)

Rys. 15. Schemat poboru prób dla formulacji emulsyjnych



D1, D2, D3, D4 i D5 to punkty poboru masy do badania, z których oznaczono zawartość wybranego składnika (ikaryny) przy pomocy HPLC-UV zgodnie z punktem 4.5.3.

4.7. Testy czystości mikrobiologicznej

4.7.1. Oznaczenie bakterii *Staphylococcus aureus*

Materiały: płytki Petriego o średnicy 90 mm, szkło laboratoryjne: szklane kolby płaskodenne o pojemności 50 ml, szklane kulki o średnicy w zakresie 3 mm – 4 mm, roztwór fizjologiczny z tryptonem (trypton 1,0 g, NaCl 8,5 g, woda 1000 ml, pH $7,0 \pm 0,2$ w $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), pożywka neutralizująca Eugon LT 100, agar tryptonowo-sojowy (TSA), agar z mannitolem i chlorkiem sodu (MSA, podłoże Chapmana), zestaw do barwienia Grama, test koagulazowy, test katalazowy, szczep testowy referencyjny *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

a) Oznaczenie bakterii *Staphylococcus aureus*

Przygotowano zawiesinę początkową próbki badanej, odważono 1 g badanego produktu i rozpuszczono w 9 ml pożywki neutralizującej. Zawiesinę dokładnie wymieszano i inkubowano w $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 48 h. Następnie wymieszano zawiesinę początkową i wykonano posiew namnożonej próbki, gdzie na płytkę Petriego z selektywną pożywką MSA naniesiono za pomocą ezy, inkubowaną zawiesinę w celu uzyskania pojedynczych kolonii. Płytkę inkubowano w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 48 h. Przeprowadzono identyfikację charakterystycznych kolonii dla bakterii *S. aureus* – kolonie żółte z żółtą strefą wokół kolonii. W przypadku stwierdzenia wzrostu charakterystycznych kolonii przeprowadzono identyfikację w kierunku *S. aureus*, gdzie przeprowadzono barwienie: metodą Grama – *S. aureus* jest Gram - dodatnim ziarniakiem, test katalazowy – *S. aureus* jest katalazo-dodatnią bakterią, test koagulazowy – *S. aureus* jest koagulazo-dodatnią bakterią.

b) Rejestracja wyników

Jeśli identyfikacja kolonii potwierdza obecność *S. aureus*, wynik należy przedstawić w formie: „obecne w 1 g”. Jeśli nie uzyskano charakterystycznego wzrostu dla *S. aureus* lub identyfikacja kolonii nie potwierdza obecności *S. aureus*, wynik należy przedstawić w formie: „nieobecne w 1 g”.

c) Wykazanie neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanego produktu

Należy wykazać, że mikroorganizmy występujące w zakażonej próbce będą zdolne do wzrostu w warunkach badania. W tym celu wyhodowano *S. aureus* na podłożu TSA (inkubacja w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 18 h - 24 h). Przygotowano zawiesinę bakterii *S. aureus* w rozcieńczalniku o gęstości około $1 \cdot 10^8$ jtk/ml. Wykonano rozcieńczenia w celu uzyskania zawiesiny o gęstości komórek w zakresie 100 jtk/ml – 500 jtk/ml. Posiano 1 ml zawiesiny na podłoże TSA w celu potwierdzenia ilości komórek, płytkę inkubowano w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 24 h. Następnie przygotowano dwie zawiesiny

początkowe próbki badanej – 1 g badanego produktu w 9 ml pożywki neutralizującej, całość dokładnie wymieszano. Dodano 0,1 ml zawiesiny o gęstości komórek w zakresie 100 jtk/ml – 500 jtk/ml do jednej z zawiesin badanej próbki i wymieszano (zawiesina testowa), druga to zawiesina kontrolna. Obie zawiesiny badanej próbki (testową i kontrolną) inkubowano w temperaturze $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ przez 24 h, po czym przeprowadzono oznaczenie obecności bakterii *S. aureus* w obu zawiesinach według powyżej opisanej procedury (rozdział 4.7.1.a: oznaczenie bakterii *Staphylococcus aureus*).

d) Ocena Neutralizacji

W celu wykazania neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanego produktu i poprawności metody oznaczenia *Staphylococcus aureus* muszą być spełnione następujące warunki:

- zawiesina *S. aureus* użyta do zaszczepienia powinna charakteryzować się gęstością od 100 jtk/ml do 500 jtk/ml,
- oznaczono bakterie *S. aureus* w zawiesinie testowej i nie oznaczono ich w zawiesinie kontrolnej lub oznaczono bakterie *S. aureus* w zawiesinie kontrolnej (zakażona próbka) i oznaczono bakterie *S. aureus* w zawiesinie testowej,
- Jeśli nie oznaczono bakterii *S. aureus* w zawiesinie testowej, świadczy to o niepowodzeniu neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanej próbki. Konieczne jest zmodyfikowanie warunków badania poprzez zmianę składu pożywki neutralizującej lub zwiększenie jej ilości w celu umożliwienia wzrostu bakterii *S. aureus*.

4.7.2. Oznaczenie bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

Materiały: płytki Petriego o średnicy 90 mm, szkło laboratoryjne: szklane kolby płaskodenne o pojemności 50 ml, szklane kulki o średnicy w zakresie 3 mm – 4 mm, roztwór fizjologiczny z tryptonem (trypton 1,0 g, NaCl 8,5 g, woda 1000 ml, pH $7,0 \pm 0,2$ w 25 °C), pożywka neutralizująca Eugon LT 100, agar tryptonowo-sojowy (TSA), agar z cetrymidem (CET), agar *Pseudomonas P* (PAP), test oksydazowy, zestaw do barwienia Grama, lampa UV (254 nm), szczep testowy *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

a) Oznaczenie bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

Przygotowano zawiesinę początkową próbki badanej, odważono 1 g badanego produktu, który następnie rozpuszczono w 9 ml pożywki neutralizującej, a następnie inkubowano w temperaturze $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ przez co najmniej 24 h. Zawiesinę początkową wymieszano i wykonano posiew. Na szklaną płytkę Petriego z selektywną pożywką agarową z cetrymidem (CET) nałożono, za pomocą ezy, namnożoną próbkę zawiesiny w celu uzyskania pojedynczych kolonii i inkubowano w temperaturze $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ przez 24 h.

Przeprowadzono identyfikację charakterystycznych kolonii dla bakterii *P. aeruginosa* – płaskie, przejrzyste, obecność żółtozielonego pigmentu w podłożu, fluorescencja w świetle UV.

W przypadku stwierdzenia wzrostu charakterystycznych kolonii przeprowadzono identyfikację w kierunku *P. aeruginosa* poprzez barwienie metodą Grama – *P. aeruginosa* jest Gram-ujemną pałeczką, test oksydazowy - *P. aeruginosa* jest oksydazo-dodatnią bakterią. Przesiano charakterystyczne kolonie z podłoża agarowego z cetrymidem (CET) na podłoże selektywne *Pseudomonas* P (PAP) i inkubowano płytkę w temperaturze $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$. Sprawdzono wzrost po 24 h, 48 h i 72 h i zidentyfikowano charakterystyczne kolonie dla bakterii *P. aeruginosa* – kolonie otoczone zieloną do niebieskiej strefą dyfundującej do podłoża piocyjaniny lub otoczone czerwoną do brązowej strefą dyfundującej do podłoża piorubiny.

b) Rejestracja wyniku

Jeśli identyfikacja kolonii potwierdza obecność *P. aeruginosa*, wynik przedstawiono w formie: „obecne w 1 g”. Jeśli nie uzyskano charakterystycznego wzrostu dla *P. aeruginosa* lub identyfikacja kolonii nie potwierdza obecności *P. aeruginosa*, wynik przedstawiono w formie: „nieobecne w 1 g”.

c) Wykazanie neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanego produktu

Wyhodowano *P. aeruginosa* na podłożu TSA poprzez inkubację w temperaturze $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ przez 18 h. Przygotowano zawiesinę bakterii *P. aeruginosa* w rozcieńczalniku o gęstości około $1 \cdot 10^8$ jtk/ml. Wykonano seryjne rozcieńczenia w celu uzyskania zawiesiny o gęstości komórek w zakresie 100 jtk/ml – 500 jtk/ml. Wysiano 1 ml zawiesiny na podłoże TSA w celu potwierdzenia ilości komórek, płytkę inkubowano w temperaturze $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ przez 24 h. Przygotowano dwie zawiesiny początkowe próbki badanej – 1 g badanego produktu w 9 ml pożywki neutralizującej i dokładnie wymieszano. Dodano 0,1 ml zawiesiny o gęstości komórek w zakresie 100 jtk/ml – 500 jtk/ml do jednej z zawiesin badanej próbki i wymieszano (zawiesina testowa), druga to zawiesina kontrolna. Obie zawiesiny badanej próbki (testową i kontrolną) inkubowano w temperaturze $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ przez 20 h, po czym przeprowadzono oznaczenie obecności bakterii *P. aeruginosa* w obu zawiesinach według wyżej opisanej procedury (rozdział 4.7.2.a) oznaczanie bakterii *Pseudomonas aeruginosa*.

d) Ocena neutralizacji

W celu wykazania neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanego produktu i poprawności metody oznaczenia muszą być spełnione następujące warunki:

- zawiesina *P. aeruginosa* użyta do zaszczepienia powinna charakteryzować się gęstością od 100 jtk/ml do 500 jtk/ml,

- oznaczono bakterie *P. aeruginosa* w zawiesinie testowej i nie zidentyfikowano bakterii *P. aeruginosa* w zawiesinie kontrolnej lub oznaczono bakterie *P. aeruginosa* w zawiesinie kontrolnej (zakażona próbka) i zidentyfikowano bakterie *P. aeruginosa* w zawiesinie testowej,
- Jeśli nie oznaczono bakterii *P. aeruginosa* w zawiesinie testowej, świadczy to o niepowodzeniu neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanej próbki. Konieczne jest zmodyfikowanie warunków badania poprzez zmianę składu pożywki neutralizującej lub zwiększenie jej ilości w celu umożliwienia wzrostu bakterii *P. aeruginosa*.

4.7.3. Oznaczenie bakterii *Escherichia coli*

Materiały: płytki Petriego o średnicy 90 mm, szkło laboratoryjne: szklane kolby płaskodenne o pojemności 50 ml, szklane kulki o średnicy w zakresie 3 mm – 4 mm, roztwór fizjologiczny z tryptonem (trypton 1,0 g, NaCl 8,5 g, woda 1000 ml, pH $7,0 \pm 0,2$ w 25 °C), pożywka neutralizująca Eugon LT 100, agar tryptonowo-sojowy (TSA), agar MacConkey (MAC), agar z eozyną i błękitem metylenowym (EMB), zestaw do barwienia Grama, szczep testowy referencyjny *Escherichia coli* ATCC 8739.

a) Oznaczenie bakterii *Escherichia coli*

Przygotowano zawiesinę początkową próbki badanej, w tym celu odważono 1 g badanego produktu, który rozpuszczono w 9 ml pożywki neutralizującej, a następnie inkubowano zawiesinę w temperaturze $32,5 \text{ °C} \pm 2,5 \text{ °C}$ przez 40 h. Wymieszano zawiesinę początkową i wykonano posiew namnożonej próbki, poprzez nałożenie zawiesiny, przy pomocy ezy, na płytkę Petriego z selektywną pożywką MacConkey (MAC) w celu uzyskania pojedynczych kolonii i inkubowano płytkę w temperaturze $32,5 \text{ °C} \pm 2,5 \text{ °C}$ 48 h. Następnie przeprowadzono identyfikację charakterystycznych kolonii dla bakterii *E. coli* – różowoczerwone, mogą być otoczone strefą wytrąconej żółci. W przypadku stwierdzenia wzrostu charakterystycznych kolonii przeprowadzono identyfikację w kierunku *E. coli* poprzez barwienie Grama – *E. coli* jest Gram-ujemną pałeczką. Następnie przesiano charakterystyczne kolonie z pożywki MacConkey (MAC) na agar z eozyną i błękitem metylenowym (EMB) i inkubowano płytkę w temperaturze $32,5 \text{ °C} \pm 2,5 \text{ °C}$ przez 48 h, po czym zidentyfikowano charakterystyczne kolonie dla bakterii *E. coli* – zielone, metaliczne w świetle odbitym i ciemnofioletowe w świetle przepuszczonym.

b) Rejestracja wyniku

Jeśli identyfikacja kolonii potwierdziła obecność *E. coli*, wynik przedstawiono w formie: „obecne w 1 g”. Jeśli nie uzyskano charakterystycznego wzrostu dla *E. coli* lub identyfikacja kolonii nie potwierdza obecności *E. coli*, wynik przedstawiono w formie: „nieobecne w 1 g”.

c) Wykazanie neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanego produktu

Konieczne było wykazanie, że mikroorganizmy występujące w zakażonej próbce będą zdolne do wzrostu w warunkach badania. W tym celu wyhodowano *E. coli* na podłożu TSA poprzez inkubację w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 24 h. Przygotowano zawiesinę bakterii *E. coli* w rozcieńczalniku o gęstości około $1 \cdot 10^8$ jtk/ml, a następnie wykonano seryjne rozcieńczenia w celu uzyskania zawiesiny o gęstości komórek w zakresie 100 jtk/ml – 500 jtk/ml. 1 ml zawiesiny wysiano na tryptonowo sojowy agar (TSA) i w celu potwierdzenia ilości komórek, płytkę inkubowano w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 24 h. Następnie przygotowano dwie zawiesiny początkowe próbki badanej – 1 g badanego produktu w 9 ml pożywki neutralizującej i dokładnie wymieszano. Dodano 0,1 ml zawiesiny o gęstości komórek w zakresie 100 jtk/ml – 500 jtk/ml do jednej z zawiesin badanej próbki i wymieszano (zawiesina testowa), a druga to zawiesina kontrolna. Próbki obu zawiesin inkubowano (testową i kontrolną) w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 24 h. Przeprowadzono oznaczenie obecności bakterii *E. coli* w obu zawiesinach według wyżej opisaney procedury (rozdział 4.7.3.a) oznaczanie bakterii *Escherichia coli*.

d) Ocena neutralizacji

W celu wykazania neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanego produktu i poprawności metody oznaczenia muszą być spełnione następujące warunki:

- zawiesina *E. coli* użyta do zaszczepienia powinna charakteryzować się gęstością od 100 jtk/ml – 500 jtk/ml,
- oznaczono bakterie *E. coli* w zawieszynie testowej i nie zidentyfikowano bakterii *E. coli* w zawieszynie kontrolnej lub oznaczono bakterie *E. coli* w zawieszynie kontrolnej (zakażona próbka) i zidentyfikowano bakterie *E. coli* w zawieszynie testowej,
- Jeśli nie oznaczono bakterii *E. coli* w zawieszynie testowej, świadczy to o niepowodzeniu neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanej próbki. Konieczne jest zmodyfikowanie warunków badania poprzez zmianę składu pożywki neutralizującej lub zwiększenie jej ilości w celu umożliwienia wzrostu bakterii *E. coli*.

4.7.4. Oznaczenie grzybów *Candida albicans*

Materiały: płytki Petriego o średnicy 90 mm, szkło laboratoryjne: szklane kolby płaskodenne o pojemności 50 ml, szklane kulki o średnicy w zakresie 3 mm – 4 mm, roztwór fizjologiczny z tryptonem (trypton 1,0 g, NaCl 8,5 g, woda 1000 ml, pH $7,0 \pm 0,2$ w $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), pożywka neutralizująca Eugon LT 100, agar tryptonowo-sojowy (TSA), agar Sabouraud z dekstrozą (SDA), agar Sabouraud z dekstrozą i chloramfenikolem (SDCA), agar kukurydziany z 1 % Tween 80 (CMA), zestaw do barwienia Grama, surowica cielęca lub końska, szczep testowy *Candida albicans* ATCC 10231.

a) Oznaczenie grzybów *Candida albicans*

Metoda obejmuje oznaczenie w badanej próbce namnożonych w nieselektywnej pożywce grzybów *Candida albicans* poprzez izolację na pożywce selektywnej. Zbadano co najmniej 1 g produktu. W badaniu wykorzystywano jedynie jałowe lub aseptyczne materiały i pracowano w warunkach aseptycznych. Przygotowano zawiesinę początkową próbki badanej, poprzez odważenie 1 g badanego produktu w 9 ml pożywki neutralizującej, którą następnie inkubowano w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 48 h. Wymieszano zawiesinę początkową i wykonano posiew namnożonej próbki poprzez naniesienie jej eżą na płytkę Petriego, zawierającą selektywną pożywkę agar Sabouraud z dekstrozą i chloramfenikolem (SDCA). Płytkę inkubowano w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 48 h. Następnie przeprowadzono identyfikację charakterystycznych kolonii dla grzybów *C. albicans* – białe do beżowych, kremowe, wypukłe. W przypadku stwierdzenia wzrostu charakterystycznych kolonii przeprowadzono identyfikację w kierunku *Candida albicans*. W tym celu przeprowadzono barwienie Grama – *C. albicans* barwi się na fioletowo, komórki są jajowate, również wydłużone, czasami widać pączkujące komórki oraz przeprowadzono test filamentacji próbówkowej. W teście filamentacji próbówkowej do próbki dodano od 0,5 ml do 1 ml surowicy cielęcej lub końskiej oraz dodano kolonię badanego szczepu i inkubowano w cieplarni w temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 3 h, po czym wykonano preparat do obejrzenia pod mikroskopem. Kiełkujące formy z charakterystycznymi wypustkami nitkowatymi świadczą o obecności *C. albicans*.

Jeśli nie oznaczono kiełkujących form w teście filamentacji próbówkowej wykonano drugi test. W tym celu przesiano charakterystyczną kolonię z podłoża agar Sabouraud z dekstrozą i chloramfenikolem (SDCA) na agar kukurydziany z 1 % Tween 80 wykonując na środku płytki kreskę, następnie przykryto ją sterylnym szkiełkiem nakrywkowym i inkubowano w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 3 doby. Po inkubacji obserwowano pod mikroskopem (powiększenie 100x) w celu znalezienia dużych, wysoce załamujących światło, grubościennych chlamydospor występujące na końcach lub odgałęzieniach strzępek.

b) Rejestracja wyniku

Jeśli identyfikacja kolonii potwierdza obecność *C. albicans*, to wynik przedstawiono w formie: „obecne w 1 g”. Jeśli nie uzyskano charakterystycznego wzrostu dla *C. albicans* lub identyfikacja kolonii nie potwierdza obecności *C. albicans*, to wynik przedstawiono w formie: „nieobecne w 1 g”.

c) Wykazanie neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanego produktu

Konieczne jest wykazanie, że mikroorganizmy występujące w zakażonej próbce będą zdolne do wzrostu w warunkach badania. W tym celu wyhodowano *Candida albicans* na podłożu agar Sabouraud z dekstrozą (SDA), poprzez inkubację w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C}$

$\pm 2,5$ °C przez 24 h. Następnie przygotowano zawiesinę komórek *C. albicans* o gęstości około $1 \cdot 10^8$ jtk/ml i wykonano seryjne rozcieńczenia w celu uzyskania zawiesiny o gęstości komórek w zakresie 100 jtk/ml – 500 jtk/ml. W kolejnym kroku wysiano 1 ml zawiesiny na płytkę Petriego z podłożem agar Sabouraud z dekstrozą (SDA) i inkubowano w temperaturze $32,5$ °C $\pm 2,5$ °C przez 24 h w celu potwierdzenia ilości komórek. Przygotowano dwie zawiesiny początkowe próbki badanej – gdzie po 1 g badanego produktu rozpuszczono w 9 ml pożywki neutralizującej i dokładnie wymieszano. Następnie dodano 0,1 ml zawiesiny o gęstości komórek w zakresie 100 jtk/ml – 500 jtk/ml do jednej z zawiesin badanej próbki i wymieszano (zawiesina testowa), natomiast druga to zawiesina kontrolna. Tak przygotowane próbki obu zawiesin (testową i kontrolną) inkubowano w temperaturze $32,5$ °C $\pm 2,5$ °C przez 24 h. Następnie przeprowadzono oznaczenie obecności grzybów *C. albicans* w obu zawiesinach według powyżej opisaney procedury (rozdział 4.7.4.a) oznaczenie grzybów *Candida albicans*.

d) Ocena neutralizacji

W celu wykazania neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanego produktu i poprawności metody oznaczenia muszą być spełnione następujące warunki:

- zawiesina *C. albicans* użyta do zaszczepienia powinna posiadać gęstość 100 jtk/ml – 500 jtk/ml,
- oznaczono grzyby *C. albicans* w zawiesinie testowej i nie zidentyfikowano grzybów *C. albicans* w zawiesinie kontrolnej lub zidentyfikowano grzyby *C. albicans* w zawiesinie kontrolnej (zakażona próbka) i oznaczono grzyby *C. albicans* w zawiesinie testowej,
- Jeśli nie zidentyfikowano grzybów *C. albicans* w zawiesinie testowej, świadczy to o niepowodzeniu neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanej próbki. Konieczne jest zmodyfikowanie warunków badania poprzez zmianę składu pożywki neutralizującej lub zwiększenie jej ilości w celu umożliwienia wzrostu grzybów *C. albicans*.

4.7.5. Ogólna liczba drożdży i pleśni

Materiały: płytki Petriego o średnicy 90 mm, szkło laboratoryjne: szklane kolby płaskodenne o pojemności 50 ml, szklane kulki o średnicy w zakresie 3 mm – 4 mm, roztwór fizjologiczny z tryptonem (trypton 1,0 g, NaCl 8,5 g, woda 1000 ml, pH $7,0 \pm 0,2$ w 25 °C), pożywka neutralizująca Eugon LT 100, agar tryptonowo-sojowy (TSA), agar Sabouraud z dodatkiem chloramfenikolu – grzyby drożdżopodobne, agar ziemniaczany z dodatkiem chloramfenikolu – grzyby pleśniowe, szczep testowy *Candida albicans* ATCC 10231.

a) Oznaczenie ogólnej liczby drożdży i pleśni

Metoda polega na zliczaniu kolonii grzybów pleśniowych i drożdżopodobnych na selektywnym podłożu agarowym po inkubacji w warunkach tlenowych. W badaniu

wykorzystywano jedynie jałowe lub aseptyczne materiały i pracowano w warunkach aseptycznych. W pierwszym etapie przygotowano zawiesinę próbki badanej. W tym celu odważono 1 g badanego produktu i wymieszano z 9 ml pożywki neutralizującej. Przygotowano rozcieńczenie 1:10, a następnie wykonano posiew wgłębny poprzez zalanie 1 ml zawiesiny próbki, płynną pożywką agar tryptonowo-sojowy (TSA) o temp. 45 °C – 48 °C w dwóch powtórzeniach. Płytki inkubowano w pozycji odwróconej w temperaturze 22,5 °C ± 2,5 °C przez 6 dni. Po inkubacji kolonie na płytkach natychmiastowo zliczono. Jeśli nie było to możliwe, przechowywano płytki dodatkowo przez 24 h w temperaturze 5 °C ± 3 °C.

b) Obliczenia i przedstawianie wyniku

Dla dokładności obliczeń uwzględniono płytki zawierające od 15 do 150 kolonii. Wykonano obliczenia liczby drożdży i pleśni, N, w 1 g próbki, za pomocą odpowiedniego wzoru (Równanie 8).

Równanie 8. Równanie i jego rozwinięcie opisujące liczbę drożdży i pleśni w 1 g próbki

$$N = \frac{m}{V \cdot d}$$

$$N = \frac{x_c}{V \cdot d}$$

$$x_c = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2)}$$

gdzie:

m – średnia arytmetyczna liczby kolonii z dwóch płytek Petriego,

c – liczba kolonii z jednej płytki Petriego,

x_c – średnia ważona liczby kolonii otrzymanej w dwóch kolejnych rozcieńczeniach,

V – objętość rozcieńczenia posianego na płytkę w ml,

d – współczynnik rozcieńczenia (0,1 dla 1:10, 0,01 dla 1:100, itd.),

Σc – suma kolonii dla dwóch rozcieńczeń,

n_1 – ilość płytek dla pierwszego rozcieńczenia,

n_2 – ilość płytek dla drugiego rozcieńczenia.

c) Wykazanie neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanego produktu

Dla prawidłowości badania konieczne było wykazanie, że mikroorganizmy występujące w zakażonej próbce będą zdolne do wzrostu w warunkach badania. W tym celu przygotowano szczep testowy *Candida albicans* ATCC 10231 na podłożu agar Sabouraud z dodatkiem chloramfenikolu. Przygotowano zawiesinę szczepu testowego w rozcieńczalniku o gęstości około $1 \cdot 10^6$ jtk/ml. Po czym wykonano seryjne rozcieńczenia dla szczepu testowego w celu uzyskania zawiesin o gęstości komórek w zakresie 1000 jtk/ml

– 3000 jtk/ml. Następnie wysiano 0,1 ml pożądanego rozcieńczenia zawiesiny na podłoże agar Sabouraud z dodatkiem chloramfenikolu w dwóch powtórzeniach i inkubowano płytki w temperaturze $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 3 - 5 dni w celu potwierdzenia ilości komórek. Przygotowano równolegle dwie zawiesiny początkowe próbki badanej, gdzie odważono po 1 g badanego produktu i wymieszano go z 9 ml pożywki namnażającej oraz dokładnie wymieszano. Do zawiesiny początkowej badanej próbki dodano 1 ml zawiesiny o gęstości komórek w zakresie 1000 jtk/ml – 3000 jtk/ml i wymieszano (zawiesina testowa). Dodatkowo, przygotowano zawiesinę kontrolną do której odmierzone po 9 ml pożywki namnażającej, 1 ml rozcieńczalnika oraz 1 ml zawiesiny komórek. Wykonano posiew wgłębnny poprzez odmierzenie 1 ml otrzymanych zawiesin (testowe i kontrolne) na podłoże Sabouraud i inkubowano płytki w temperaturze $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 3 - 5 dni. Po tym czasie zliczono kolonie na płytkach.

d) Ocena neutralizacji

Liczba kolonii na płytce próbki badanej musi stanowić przynajmniej 50 % liczby kolonii na płytce kontrolnej. Spełnienie tego warunku świadczy o zatwierdzeniu metody do badania danego wyrobu – użyta pożywka neutralizująca jest odpowiednia. W przypadku niepowodzenia, należy zmienić warunki badania: zastosować inny bulion, zwiększyć ilość pożywki przy zachowaniu ilości próbki lub ich kombinację.

4.7.6. Ogólna liczba mezofilnych mikroorganizmów tlenowych

Metoda polega na zliczaniu kolonii drobnoustrojów na nieselektywnym podłożu agarowym po inkubacji tlenowej. W badaniu używano jedynie jałowych lub aseptycznych materiałów i pracowano w warunkach aseptycznych.

Materiały: płytki Petriego o średnicy 90 mm, szkło laboratoryjne: szklane kolby płaskodenne o pojemności 50 ml, szklane kulki o średnicy w zakresie 3 mm – 4 mm, roztwór fizjologiczny z tryptonem (trypton 1,0 g, NaCl 8,5 g, woda 1000 ml, pH $7,0 \pm 0,2$ w $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), pożywka neutralizująca Eugon LT 100, agar tryptonowo-sojowy (TSA), szczep testowy *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 lub szczep testowy *Escherichia coli* ATCC 8739 – jako przedstawiciel bakterii Gram-ujemnych, szczep testowy *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 jako przedstawiciel bakterii Gram-dodatnich.

a) Oznaczanie liczby mezofilnych mikroorganizmów tlenowych

Przygotowano zawiesinę próbki badanej - 1 g badanego produktu zhomogenizowano w 9 ml pożywki neutralizującej. Przygotowano rozcieńczenie 1:10 i wykonano posiew wgłębnny poprzez zalanie 1 ml zawiesiny próbki płynną pożywką agar tryptonowo-sojowy (TSA) ($45\text{ }^{\circ}\text{C} - 48\text{ }^{\circ}\text{C}$) w dwóch powtórzeniach. Płytki inkubowano w pozycji odwróconej w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 72 h. Wykorzystano warunki umożliwiające oznaczenie zarówno bakterii, jak i grzybów. Po inkubacji natychmiast zliczono kolonie na płytkach.

b) Obliczenia i przedstawianie wyniku

Dla dokładności obliczeń uwzględniono płytki zawierające od 30 do 300 kolonii. Wykonano obliczenia liczby mezofilnych mikroorganizmów tlenowych, N, w 1 g próbki (wykonano zgodnie z punktem 4.7.5. podpunktem b).

c) Wykazanie neutralizacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanego produktu

Dla prawidłowości badania konieczne było wykazanie, że mikroorganizmy występujące w zakażonej próbce będą zdolne do wzrostu w warunkach badania. W tym celu przygotowano szczepy testowe (*Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus*) na podłożu agar tryptonowo-sojowy (TSA), które inkubowano w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 24 h. Przygotowano zawiesiny szczepów testowych w rozcieńczalniku o gęstości około $1 \cdot 10^8$ jtk/ml, a następnie wykonano seryjne rozcieńczenia dla obu szczepów testowych w celu uzyskania zawiesin o gęstości komórek w zakresie 1000 jtk/ml – 3000 jtk/ml. Wysiano 0,1 ml pożądanego rozcieńczenia zawiesiny na podłoże agar tryptonowo-sojowy (TSA) w dwóch powtórzeniach w celu potwierdzenia ilości komórek, po czym płytki inkubowano w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 24 h. W kolejnym etapie przygotowano równolegle dwie zawiesiny początkowe próbki badanej – 1 g badanego produktu w 9 ml pożywki namnażającej i dokładnie wymieszano. Do zawiesiny początkowej badanej próbki dodano 1 ml zawiesiny o gęstości komórek w zakresie 1000 jtk/ml – 3000 jtk/ml i wymieszano (zawiesina testowa). Etap ten wykonano osobno dla obu szczepów. Przygotowano dwie zawiesiny kontrolne – 9 ml pożywki namnażającej, 1 ml rozcieńczalnika oraz 1 ml zawiesiny komórek. Etap wykonano dla dwóch szczepów osobno, a następnie wykonano posiew wgłębny 1 ml otrzymanych czterech zawiesin (testowe i kontrolne) na podłożu agar tryptonowo-sojowy (TSA) i inkubowano płytki w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 24 h - 72 h. Zliczono kolonie na płytkach.

d) Ocena Neutralizacji

Liczba kolonii na płycie próbki badanej musi stanowić przynajmniej 50 % liczby kolonii na płycie kontrolnej (warunek musi być spełniony równocześnie dla dwóch szczepów). Spełnienie tego warunku świadczy o zatwierdzeniu metody do badania danego wyrobu – użyta pożywka neutralizująca jest odpowiednia. W przypadku niepowodzenia, należy zmienić warunki badania: zastosować inny bulion, zwiększyć ilość bulionu przy zachowaniu ilości próbki lub ich kombinację.

4.8. Testy konserwacji (Challenge tests)

Ocenę zakonserwowania produktu przeprowadzono w laboratorium zewnętrznym na podstawie normy PN-EN ISO 11930:2019 Kosmetyki - Mikrobiologia - Ocena skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej produktu kosmetycznego [380]. Szczepy bakteryjne wyhodowano na podłożu TSA (ang. Tryptic Soy Agar) (w temperaturze $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$

przez 24 h – 48 h) oraz grzyby poddane hodowli na podłożu SDA (ang. Sabouraud Dextrose Agar dla *C. albicans*) i PDA (ang. Potato Dextrose Agar dla *A. brasiliensis*), gdzie czas hodowli wynosił 7 - 11 dni w temp. $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Każdy ze szczepów był testowany osobno i wprowadzany do kosmetyku po wcześniejszym ustaleniu ich gęstości optycznej w zakresie 1×10^7 - 1×10^8 cfu/ml dla bakterii i 1×10^6 - 1×10^7 cfu/ml dla grzybów, uzyskanych poprzez wykonanie szeregu rozcieńczeń dziesięciokrotnych tej zawiesiny i ich posiewie na podłożach TSA, SDA i PDA. W następnym etapie odważono 20 g analizowanego produktu do sterylnego opakowania w pięciu powtórzeniach (jedno powtórzenie dla każdego ze szczepów). Do każdego powtórzenia dodano 0,2 ml odpowiedniej zawiesiny bakterii lub grzybów, dokładnie wymieszano i inkubowano przez 28 dni w $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, w ciągu których próbki poddano ocenie mikrobiologicznej po 7, 14 i 28 dniach od momentu rozpoczęcia badania. Badanie mikrobiologiczne obejmowało pobranie 1 g wtórnie zakażonego produktu, do którego dodano 9 ml przygotowanego neutralizatora (Eugon LT 100), znoszącego działanie konserwantu zawartego w produkcie kosmetycznym, umożliwiając swobodne namnażanie drobnoustrojów, które przeżyły obecność konserwantu. Tak przygotowaną próbkę inkubowano przez 30 minut \pm 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym wykonano posiewy mikrobiologiczne i określono poprzez zliczenie liczbę powstałych kolonii. Jako próbę kontrolną, w celu sprawdzenia braku toksyczności neutralizatora wobec badanego szczepu, wykorzystano próbkę zawierającą 9 ml neutralizatora oraz 1 g zawiesiny badanego szczepu zamiast zaszczipionego wtórnie produktu. Określenie liczby drobnoustrojów w dniu rozpoczęcia badania oraz po 7, 14 i 28 dniach umożliwiło sprawdzenie czy mikroorganizmy są zdolne do przeżycia i obliczono skuteczność układu konserwującego poprzez obliczenie ich redukcji wg. wzorów logarytmicznych, które pozwalają zakwalifikować produkt do odpowiedniej kategorii (wg. kryterium A lub B), które według normy PN-EN ISO 11930:2019 dzielą produkty na te, których ryzyko mikrobiologiczne jest uważane za akceptowalne (kryterium A), oraz te, których ocena ryzyka mikrobiologicznego powinna wskazywać na dodatkowe czynniki ochronne (kryterium B), takie jak opakowanie z pompką lub typu airless.

4.9. Testy stabilności i kompatybilności

Metoda opisuje wewnętrzną procedurę Laboratorium INVANTO Sp. z o.o. o numerze MB/COS/01/01 dotyczącą postępowania podczas badania stabilności i kompatybilności z opakowaniem produktów kosmetycznych. Badania stabilności miały na celu ocenę zdolności produktu do utrzymania pożądanych właściwości fizykochemicznych, mikrobiologicznych, sensorycznych i funkcjonalności podczas przechowywania i stosowania przez konsumenta w odpowiednich warunkach przedstawionych w tabeli 16.

Tab. 16. Warunki badań stabilnościowych

Warunki badania	
Czas	Badania przyspieszone obejmują przechowywanie produktów przez 12 tygodni i 7 - dniowy cykl pomiarowy (± 1 dzień)
Temperatura	Próby przechowywano w temperaturze pokojowej, w 0 °C oraz 40 °C (± 3 °C)
Wilgotność	Niekontrolowana
Zakres badań	Zakres badań ustalono na podstawie specyfikacji: <ul style="list-style-type: none"> • ocena sensoryczna masy produktu i opakowania, • zmiany masy, • aktywność wody (dla maści), • pH (dla emulsji i żelu), • gęstość (dla wszystkich formułacji), • lepkość (dla wszystkich formułacji), • stabilność emulsji (test wirówkowy) (dla emulsji), • typ emulsji (dla emulsji)
Wymagana ilość prób	Dla badania przyspieszonego niezbędne jest 26 próbek po minimum 100 g
Oznakowanie próbek	<ul style="list-style-type: none"> • numer badania stabilności (HB/rok/kolejny numer), • nazwa produktu, • warunki przechowywania i punkt czasowy, • osoba odpowiedzialna
Ilość punktów czasowych	9 punktów czasowych (D0, D7, D14, D21, D28, D42, D56, D70, D84)

Przed rozpoczęciem badania próbki oznakowano według wytycznych. Wszystkie próby zważono w oryginalnych opakowaniach wraz z etykietą i wykonano wybrane badania początkowe dla próby zerowej (D0) zgodnie z zakresem badań przedstawionym w tabeli 17.

Tab. 17. Zakres badań i metodyki wykorzystane do badań stabilności

Zakres badań	Numer metody wewnętrznej laboratorium INVANTO
Ocena sensoryczna masy produktu i opakowania	MB/COS/09/01
Zmiany masy	MB/COS/12/01
Aktywność wody (dla maści)	MB/COS/03/01
pH (dla emulsji i żelu)	MB/COS/04/01
Gęstość (dla wszystkich formułacji)	MB/COS/02/01
Lepkość (dla wszystkich formułacji)	MB/COS/05/01
Stabilność emulsji (test wirówkowy) (dla emulsji)	MB/COS/07/01
Typ emulsji (dla emulsji)	MB/COS/16/01

Pozostałe próby umieszczono w komorach stabilności (Rys. 16) według wyznaczonego programu badań stabilności (Załącznik 2). Zgodnie z harmonogramem badań, próby wyjmowano z komór w wyznaczonych punktach czasowych. W przypadku

wyjęcia preparatów z warunków przechowywania, przed rozpoczęciem analizy odczekano do czasu osiągnięcia przez próby temperatury pokojowej.

Wykonano kolejno badania:

- test zmiany masy,
- ocenę sensoryczną masy i opakowania (analogicznie, jak dla próby początkowej),
- oznaczenia wyznaczonych parametrów fizykochemicznych (analogicznie, jak dla próby początkowej).

Wyniki badań opracowano w postaci tabel i wykresów.

Rys. 16. Komora stabilności Binder KBF [zdjęcie własne]



4.10. Badanie dermatologiczne (potencjał drażniący)

4.10.1. Dobór ochotników do badań

Badanie dermatologiczne zostało wykonane na 25 osobowej grupie ochotników, którzy wyrazili dobrowolną zgodę na udział w badaniu, zgodnie z Deklaracją Helsińską z późniejszymi uzupełnieniami, przepisami UE, Rzeczypospolitej Polskiej i wytycznymi Cosmetics Europe. Przed rozpoczęciem badań został przeprowadzony wywiad dermatologiczny (wiek ochotników, typ skóry wg skali Fitzpatricka, alergie). Badanie wykonano na zdrowej skórze, bez podrażnień i zmian chorobowych. Ochotnicy zapoznali się z celem badania, jego przebiegiem oraz możliwymi działaniami niepożądanymi. Użytkownicy zostali zobowiązani do zgłaszania się do lekarza dermatologa w przypadku wystąpienia jakichkolwiek zmian świadczących o podrażnieniu skóry.

Kryteria włączenia do badania

- wiek powyżej 18 roku życia,
- osoby zdrowe, kobiety lub mężczyźni.

Kryteria niewłączenia do badania:

- kobiety w ciąży lub karmiące,
- wykazana alergia lub wrażliwość na którykolwiek składnik produktu

kosmetycznego, osoby w trakcie miejscowego lub układowego leczenia środkami przeciwzapalnymi, lekami antyhistaminowymi, immunosupresyjnymi, glikokortykosteroidami czy retinoidami.

4.10.2. Test płatkowy

Badanie dermatologiczne będące testem płatkowym przebiegało pod kontrolą lekarza specjalisty (dermatologa), zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1223/2009 [130] dotyczącym produktów kosmetycznych (Dz. Urz. UE L 342 z 22.12.2009), Cosmetic Europe – The Personal Care Association Guidelines Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility 1997 oraz Cosmetic Europe – The Personal Care Association Guidelines Product Test Guidelines for the Evaluation of The Efficacy of Cosmetic Products 2008.

Próby płatkowe polegające na jednorazowej aplikacji badanego produktu (o potwierdzonej czystości mikrobiologicznej) z okluzją zakładano na wewnętrznej powierzchni przedramienia według przyjętego schematu: badanym produktem kosmetycznym smarowano skórę o powierzchni 0,8 cm x 0,8 cm, miejsce to pokrywano komorą Finna (pasek 10-komorowy plastra) (Rys. 17).

Rys. 17. Komora Finna przed i po przyklejeniu na skórę [zdjęcia własne]









Jeśli pacjent miał tłustą skórę przed nałożeniem plastrów delikatnie przetarto ją alkoholem. Po naklejeniu plastrów na plecy pacjenta dociskano plaster przez około 5 sekund. Ucisk i ciepło powodowały lepsze przyklejenia się plastra. Granice plastra oznaczono markerem do skóry. Produkt kosmetyczny nakładano w stężeniu handlowym. Osoby biorące udział w badaniu dermatologicznym zobowiązały się do unikania zmoczenia miejsca aplikacji, ekspozycji na promieniowanie słoneczne oraz wysiłku, które mogłyby zaburzyć odczyt. Po 24 godzinach od aplikacji opatrunek zdjęto i dokonano oceny wyniku próby. Ponownej kontroli dokonywano po 48 i 72 godzinach od rozpoczęcia badania. Ocenę odczynów dokonywano według pięciopunktowej skali w badaniach dermatologicznych. Ochotnicy pozostawali w stałym kontakcie z dermatologiem.

4.10.3. Średni wskaźnik podrażnienia

Średni wskaźnik podrażnienia obliczony został na podstawie sumy klasyfikacji punktowej dla rumienia oraz obrzęku/nacieku (Równanie 9) według skali podanej w tabeli 18.

Tab. 18. Klasyfikacja punktowa podrażnienia

Nazwa odczynu	Klasyfikacja	Opis reakcji skórnej	Przykład
Odczyn ujemny	0	Brak widocznej reakcji skórnej	
Odczyn wątpliwy	1	Palpacyjnie niewyczuwalna plama rumieniowa	
Odczyn słaby	2	Palpacyjnie wyczuwalne ognisko rumieniowe, wskazujące na mierny obrzęk lub nacieki, może występować z grudkami lub bez, brak pęcherzyków	
Odczyn silny	3	Nasilony obrzęk, liczne grudki i nacieki, obecność pęcherzyków	
Odczyn skrajnie nasilony	4	Zlewanie się pęcherzyków w większe pęcherze rzekome lub obecność nadżerek powstających w wyniku ich pęknięcia	
Odczyn podrażnieniowy	5	Obecność „efektu mydlanego” – maceracji naskórka, obecność krost, strupków oraz tendencji do wygasania od momentu zdjęcia plastrów	

Równanie 9. Równanie opisujące wskaźnik podrażnienia produktu

$$\text{wskaźnik podrażnienia dla badanego produktu} = \frac{\text{suma klasyfikacji punktowej}}{\text{(ilość ochotników)}}$$

Na podstawie wskaźnika podrażnienia, produkt został sklasyfikowany zgodnie ze skalą przedstawioną w tabeli 19.

Tab. 19. Klasyfikacja wyrobu pod względem potencjału drażniącego

Średni wskaźnik podrażnienia (x_{sr})	Klasyfikacja wyrobu
$x_{\text{sr}} < 0,5$	Niedrażniący
$0,5 < x_{\text{sr}} < 2,0$	Lekko drażniący
$2,0 < x_{\text{sr}} < 5,0$	Umiarkowanie drażniący
$5,0 < x_{\text{sr}}$	Silnie drażniący

4.11. Badanie aplikacyjne ankietowe

4.11.1. Zakres badań

Zakres badań aplikacyjnych jest zgodny z:

- Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1223/2009 z dn. 30 listopada 2009 r. dotyczącym produktów kosmetycznych [130]
- Cosmetics Europe - The Personal Care Association „Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products 2008” [381],
- WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (wyd. 1964 - 2013) [382],
- Ustawa z dn. 4 października 2018r. o Produktach Kosmetycznych, Dz.U. 2018 poz. 2227 [383],
- Procedurą badawczą obowiązującą w laboratorium zewnętrznym, które prowadziło badania.

4.11.2. Dobór ochotników

Ochotnicy biorący udział w badaniach zostali wytypowani w oparciu o:

- aktualnie obowiązujące polskie i europejskie przepisy prawne,
- wytyczne Cosmetics Europe- The Personal Care Association,
- deklarację Helsińską (1964-2013),
- procedurę badawczą obowiązującą w laboratorium zewnętrznym.

Wszyscy wytypowani do badań ochotnicy spełniali wymagania dotyczące włączenia do badań oraz podpisali zgodę na dobrowolne uczestniczenie w badaniu, a także zostali poinformowani o celu badania, sposobie jego prowadzenia oraz o możliwych działaniach niepożądanych. Ochotnicy podczas całego badania byli pod stałą opieką lekarza dermatologa.

4.11.3. Metodyka badań aplikacyjnych

Badanie wykonano zgodnie z wewnętrzną procedurą badawczą pod nadzorem lekarza specjalisty (dermatolog i chirurg ortopeda). Badanie prowadzono w warunkach domowych. Zakwalifikowani do badań ochotnicy otrzymali do testowania badany produkt oraz przygotowaną ankietę. Ochotnicy zostali poinformowani o warunkach prowadzenia badania, o obszarze oraz częstotliwości stosowania produktu. Czas trwania badania wynosił 12 tygodni. Zastosowanie obejmowało trzykrotną aplikację produktu w ciągu dnia na skórę okolic stawów kolanowych, łokciowych lub barkowych. Preparat po nałożeniu na dłonie wmasowano kolistymi ruchami aż do całkowitego wchłonięcia.

4.11.4. Badanie aplikacyjne żelu chłodzącego (kontuzje stawowe)

- Grupa badawcza: 20 ochotników, którzy zadeklarowali przebytą kontuzję,
- Płeć: kobiety, mężczyźni,
- Wiek: 43 – 79 lat
- Typ skóry: normalna (40 %), wrażliwa (60 %)
- Problemy skórne: 40 % ochotników zgłosiło problemy skórne opisane przez lekarza nadzorującego jako suchość skóry, podrażnienia.

Oceniane parametry i pytania ankietowe przedstawiono w tabeli 20.

Tab. 20 Oceniane parametry i pytania ankietowe opracowane dla formułacji żelu chłodzącego

Właściwość	Skala
Barwa	Bardzo nieprzyjemna
	Nieprzyjemna
	Neutralna
	Przyjemna
	Bardzo przyjemna
Zapach	Bardzo nieprzyjemny
	Nieprzyjemny
	Neutralny
	Przyjemny
	Bardzo przyjemny
Intensywność zapachu	Za mało intensywny
	Odpowiedni
	Intensywny
	Bardzo intensywny
Aplikacja	Bardzo zła
	Zła
	Średnia
	Dobra
	Bardzo dobra

METODYKA PRACY

Wydajność	Bardzo słaba
	Słaba
	Średnia
	Dobra
	Bardzo dobra
Rozprowadzanie	Bardzo złe
	Złe
	Średnie
	Dobre
	Bardzo dobre
Uczucie ulgi	Bardzo słabe
	Słabe
	Średnie
	Dobre
	Bardzo dobre
Poprawa komfortu	Bardzo słaba
	Słaba
	Średnia
	Dobra
	Bardzo dobra
Posiada właściwości chłodzące	Bardzo słabe
	Słabe
	Średnie
	Dobre
	Bardzo dobre
Niweluje napięcie mięśniowe	Bardzo słabo
	Słabo
	Średnio
	Dobrze
	Bardzo dobrze
Działa wspomagająco przy dyskomforcie spowodowanym stłuczeniami, siniakami, urazami, których konsekwencją jest opuchlizna	Bardzo słabo
	Słabo
	Średnio
	Dobrze
	Bardzo dobrze
Daje wrażenie ogólnego odprężenia	Bardzo słabo
	Słabo
	Średnio
	Dobrze
	Bardzo dobrze

4.11.5. Badanie aplikacyjne emulsji rozgrzewającej (zwyrodnienia)

- Grupa badawcza: 20 ochotników, którzy zadeklarowali chorobę zwyrodnieniową stawów, będący pod opieką lekarską,
- Płeć: kobiety, mężczyźni,
- Wiek: 65 – 81 lat
- Typ skóry: normalna (10 %), wrażliwa (90 %),
- Problemy skórne: 90 % ochotników zgłosiło problemy skórne opisane przez lekarza nadzorującego jako suchość skóry, podrażnienia.

Oceniane parametry i pytania ankietowe przedstawiono w tabeli 21.

Tab. 21. Oceniane parametry i pytania ankietowe opracowane dla rozgrzewającej formułacji emulsyjnej

Właściwość	Skala
Barwa	Bardzo nieprzyjemna
	Nieprzyjemna
	Neutralna
	Przyjemna
	Bardzo przyjemna
Zapach	Bardzo nieprzyjemny
	Nieprzyjemny
	Neutralny
	Przyjemny
	Bardzo przyjemny
Intensywność zapachu	Za mało intensywny
	Odpowiedni
	Intensywny
	Bardzo intensywny
Aplikacja	Bardzo zła
	Zła
	Średnia
	Dobra
	Bardzo dobra
Wydajność	Bardzo słaba
	Słaba
	Średnia
	Dobra
	Bardzo dobra
Rozprowadzanie	Bardzo złe
	Złe
	Średnie
	Dobre
	Bardzo dobre

METODYKA PRACY

Uczucie ulgi	Bardzo słabe
	Słabe
	Średnie
	Dobre
	Bardzo dobre
Poprawa komfortu	Bardzo zła
	Zła
	Średnia
	Dobra
	Bardzo dobra
Posiada właściwości rozgrzewające	Bardzo słabe
	Słabe
	Średnie
	Dobre
	Bardzo dobre
Niweluje napięcie mięśniowe	Bardzo słabo
	Słabo
	Średnio
	Dobrze
	Bardzo dobrze
Działa wspomagające w dyskomforcie związanym z obecnością choroby zwyrodnieniowej stawów, w tym zaburzeń pracy mięśni i stawów	Bardzo słabo
	Słabo
	Średnio
	Dobrze
	Bardzo dobrze
Daje wrażenie ogólnego odprężenia	Bardzo słabo
	Słabo
	Średnio
	Dobrze
	Bardzo dobrze

4.12. Ocena bezpieczeństwa z analizą toksykologiczną

Ocenę bezpieczeństwa składu produktu kosmetycznego wykonano zgodnie z obowiązującymi normami prawnymi, Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczących produktów kosmetycznych, Decyzji Wykonawczej Komisji z dnia 25 listopada 2013 r. w sprawie wytycznych dotyczących załącznika I do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady nr 1223/2009 oraz w oparciu o dokument „The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation”, a także dostępną literaturę dotyczącą bezpieczeństwa stosowania produktów kosmetycznych i użytych surowców. Raport oceny bezpieczeństwa opracowano według poniższego schematu (Tab. 22.), na którym przedstawiono szczegółowo strukturę raportu oraz jego poszczególne elementy.

Tab. 22. Schemat raportu bezpieczeństwa

Element raportu	Zakres informacji
Skład jakościowy i ilościowy produktu	Obejmuje podanie szczegółowego, zarówno jakościowego, jak i ilościowego składu produktu kosmetycznego wraz z identyfikacją chemiczną substancji (Nazwa INCI, CAS, EINECS/ELINCS) oraz ich zamierzone funkcje; dla kompozycji zapachowych i aromatycznych nazwa i numer kompozycji oraz dane dostawcy
Właściwości fizykochemiczne	Właściwości fizyczne i chemiczne w postaci specyfikacji produktowej
Ocena mikrobiologiczna	Specyfikacje czystości mikrobiologicznej, zarówno gotowego produktu, jak i poszczególnych surowców oraz wyniki testu konserwacji
Stabilność i kompatybilność produktu z opakowaniem	Wyniki badań stabilności produktu w dających się przewidzieć warunkach przechowywania
Ogólne informacje i właściwości surowców oraz opakowań	Czystość surowców i mieszanin, informacje o zanieczyszczeniach i ilościach śladowych substancji niedozwolonych oraz alergeny wraz z dowodami, że ich uniknięcie nie jest możliwe ze względów technicznych, istotne właściwości materiału opakowania czystość, stabilność i obecność zanieczyszczeń
Narażenie na działanie produktu kosmetycznego i substancji w nim zawartych	Normalnie dające się przewidzieć stosowanie produktu, uzasadnione ostrzeżeniami i wyjaśnieniami umieszczonymi na etykiecie produktu. Dane dotyczące narażenia na działanie produktu uwzględniające wnioski z normalnego i dającego się przewidzieć stosowania ze szczególnym uwzględnieniem: <ul style="list-style-type: none"> • miejsca zastosowania, • powierzchni aplikacji, • ilości zastosowanego produktu, • czasu trwania i częstotliwości stosowania, • normalnych i dających się przewidzieć dróg narażenia, • populacji docelowej lub narażonej, • danych dotyczących narażenia na działanie poszczególnych substancji dla odpowiednich toksykologicznych punktów końcowych z podaniem marginesu bezpieczeństwa
Profil toksykologiczny	Obejmuje opisanie profilu toksykologicznego substancji znajdujących się w produkcie kosmetycznym ze zwróceniem uwagi na ocenę toksyczności lokalnej (działania drażniącego na skórę i oczy) działanie

Część A raportu

METODYKA PRACY

Część A raportu		uczulające na skórę oraz fototoksyczność w przypadku produktów z filtrami UV Wszystkie istotne toksykologicznie drogi wchłaniania, działanie ogólnoustrojowe na podstawie poziomu bez obserwowalnego działania (NOAEL) obliczenie marginesów bezpieczeństwa Informacje o nanomateriałach i substancjach sklasyfikowanych jako CMR
	Działania niepożądane i ciężkie działania niepożądane	Wszystkie dostępne dane na temat działania niepożądanego i ciężkiego niepożądanego kosmetycznego wyniku działania produktu
	Informacje o produkcji kosmetycznym	Inne istotne informacje, w tym badania z udziałem ochotników lub oceny ryzyka przeprowadzone w pokrewnych dziedzinach
Część B raportu	Wniosek z oceny	Oświadczenie o bezpieczeństwie produktu kosmetycznego
	Ostrzeżenia i instrukcje stosowania umieszczone na etykiecie	Oświadczenie o konieczności umieszczenia na etykiecie produktu określonych ostrzeżeń i instrukcji stosowania
	Rozumowanie	Wyjaśnienie toku rozumowania, którego wynikiem jest wniosek z oceny oraz oświadczenia o ostrzeżeniach i instrukcjach
	Kwalifikacje eksperta i zatwierdzenie	Dane safety assessora, dowody posiadania właściwych kwalifikacji wraz z datą i podpisem

W ocenie bezpieczeństwa istotna jest również analiza zanieczyszczeń substancjami niedozwolonymi, które mogą występować pod postacią zanieczyszczeń w surowcach wykorzystywanych do produkcji, a także mogą być nieświadomie wprowadzone do masy kosmetycznej w trakcie procesu produkcyjnego, jak również mogą powstawać w skutek potencjalnych przemian i interakcji chemicznych między składnikami czy też migracji substancji z materiału opakowaniowego do produktu podczas przechowywania. Obecność śladowych ilości w produktach gotowych oceniono na podstawie specyfikacji i danych technicznych lub aktualnej wiedzy na temat wytwarzania surowca (pochodzenia substancji, procesu produkcji, metody syntezy, procesu ekstrakcji, wykorzystanych rozpuszczalników). Oceny bezpieczeństwa obecności śladowych ilości niedozwolonych związków, mogących wpływać na bezpieczeństwo produktu, a dla których jednocześnie nie ma określonych stężeń granicznych, dokonała osoba przeprowadzająca ocenę bezpieczeństwa stosowania gotowego produktu – safety assessor. Uzasadniono obecność śladowych ilości z wykorzystaniem dostępnych źródeł oraz wydano opinię dotyczącą dopuszczalności tych ilości z punktu widzenia toksykologicznego i ogólnego bezpieczeństwa.

Do oznaczania narażenia wykorzystano dane:

- rodzaj produktu,
- miejsce zastosowania,
- ilość w jednorazowym stosowaniu w przypadku normalnego i dającego się

przewidzieć stosowania,

- czas trwania i częstotliwości stosowania,
- normalne dające się przewidzieć drogi narażenia oraz w niektórych przypadkach drugorzędowe drogi narażenia,
- docelowa grupa stosowania.

Następnie obliczono narażenie na działanie poszczególnych substancji, co jest niezbędne do dokonania oceny potencjalnego zagrożenia ze strony poszczególnych składników formulacji. W tym celu obliczono lub odczytano:

- a) SED (Systemic Exposure Dose) – dawkę narażenia systemicznego [mg/kg masy ciała/dzień], oznaczającą dawkę, na którą konsument jest narażony podczas stosowania produktu kosmetycznego. Jeśli było to możliwe, wartość ta została odczytana z danych literaturowych lub obliczona wg równania 10, jeśli dostępne są dane dotyczące absorpcji dermalnej podane w procentach:

Równanie 10. Równanie opisujące dawkę narażenia systemicznego (SED) analizowanego składnika mieszaniny na podstawie danych absorpcji dermalnej [%]

$$SED = A \cdot \left(\frac{C}{100 \%}\right) \cdot \left(\frac{DA_p}{100 \%}\right)$$

gdzie:

SED - dawka narażenia systemicznego [mg/kg masy ciała/dzień],

A - Dawka dzienna analizowanego składnika [mg/kg masy ciała/dzień],

C - Ilość (stężenie procentowe) analizowanego składnika w gotowym produkcie [%],

DA_p - absorpcja dermalna analizowanego składnika [%].

W przypadku, kiedy absorpcja dermalna podana jest w $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ to wartość SED wyznaczona została na podstawie równania 11.

Równanie 11. Równanie opisujące dawkę narażenia systemicznego (SED) na podstawie danych absorpcji dermalnej [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$]

$$SED = \frac{DA_a \cdot 10^{-3} \text{mg} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot SSA \cdot F}{60 \text{ kg}}$$

gdzie:

DA_a - absorpcja dermalna [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$],

SSA - powierzchnia skóry ekspozycja na zastosowaną ilość produktu [cm^2],

F - częstotliwość stosowania gotowego produktu [1 dzień = 1] ($F \geq 1$),

60 kg - typowa masa ciała człowieka.

- b) NOAEL (No-observed adverse effect level) – najwyższe stężenie nie działające szkodliwie [mg/kg masy ciała/dzień] odczytano z danych literaturowych dostępnych w bazach:

- CIR (Cosmetic Ingredient Review),
- ECHA (European Chemicals Agency),
- RTECS (The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances database),
- SCCS (The Scientific Committee on Consumer Safety),
- PubChem (National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information),
- DART (Developmental and Reproductive Toxicology Database).

W przypadku dostępności różnych danych do dalszej analizy wykorzystano najniższą wartość.

c) MoS (Margin of Safety) – margines bezpieczeństwa

Marginesy bezpieczeństwa dla poszczególnych substancji obliczono zgodnie z równaniem 12.

Równanie 12. Równanie opisujące margines bezpieczeństwa stosowania produktu kosmetycznego (MoS)

$$MoS = \frac{NOAEL}{SED}$$

Za bezpieczne, zgodnie z obowiązującymi regulacjami, uznano substancje o marginesie bezpieczeństwa powyżej 100.

Następnie opracowano profil toksykologiczny każdego ze składników, w którym opisano dostępne zagrożenia toksykologiczne wynikające z toksyczności lokalnej (działanie drażniące na skórę, oczy, działanie uczulające na skórę oraz fototoksyczność w przypadku pochłaniania promieniowania UV). Ponadto, jeśli dostępne były dane, wskazano właściwości składników (wielkość cząstek, zanieczyszczenia, interakcje) mogące mieć potencjalny wpływ na toksyczność.

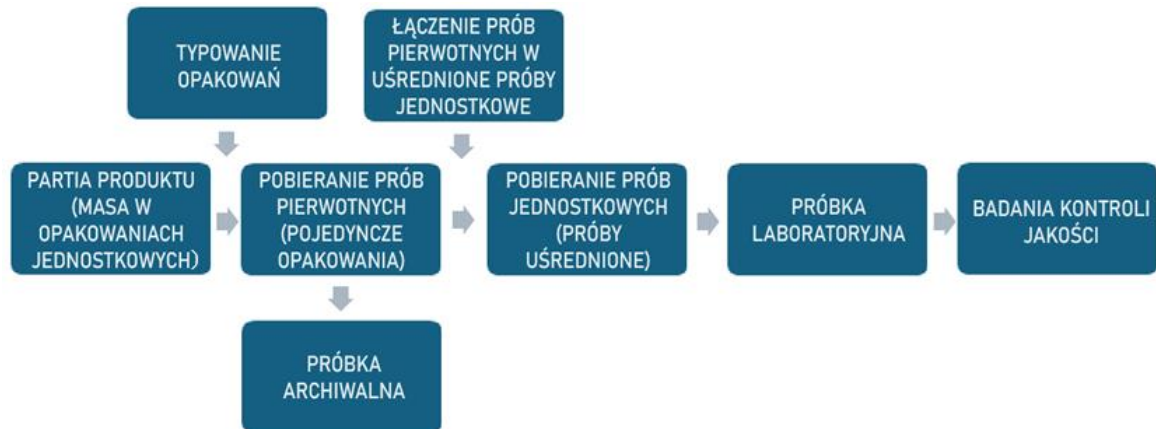
4.13. Kontrola jakości

Kontrola jakości prowadzona jest dla każdej wyprodukowanej partii produktu i jest podstawą do zwolnienia towaru z magazynu na podstawie wydanego certyfikatu kontroli jakości.

4.13.1. Pobieranie prób

Próbki pobierane były do badań kontroli jakości zgodnie ze schematem przedstawionym na Rys. 18 przez wykwalifikowanego pracownika z zachowaniem należytych zasad ostrożności przepisów BHP oraz zgodnie z wytycznymi zawartymi w normie PN-EN ISO 22716. Pobierana ilość próbek do badań kontroli jakości, zależy od ilości produktów wchodzących w skład partii.

Rys. 18. Schemat postępowania podczas poboru prób do kontroli jakości



4.13.2. Próbki archiwalne

W celu umożliwienia wykonania ponownych kontroli, próbki archiwalne każdej z partii przechowuje się przez cały okres przydatności + 1 miesiąc. Próbki archiwalne przechowywane są w wyznaczonym miejscu i określonych warunkach (temperatura pokojowa) w bezpośrednich opakowaniach i w ilości umożliwiającej wykonanie badań z zakresu kontroli jakości.

4.13.3. Zakres badań kontroli jakości

Każda wyprodukowana partia produkcyjna podlegała kontroli jakości, podczas której weryfikowano zgodność parametrów zawartych w opracowanej specyfikacji z wynikami badań przeprowadzonymi dla wyprodukowanej masy (czystość mikrobiologiczna oraz parametry fizykochemiczne zawarte w specyfikacji produktu).

5. Wyniki badań i dyskusja

5.1. Analiza rynku oraz analiza literaturowa i wytypowanie surowców o pożądanym właściwościach łagodzących i regeneracyjnych

Wybór surowców aktywnych dla danego produktu kosmetycznego jest kluczową kwestią, która ma ogromny wpływ na działanie gotowego produktu. Wybrane składniki nie powinny działać względem siebie antagonistycznie oraz warto jest zwrócić uwagę na to, aby poszczególne składniki nie reagowały ze sobą. Z uwagi na szeroki wachlarz dostępnych składników, poszukiwane były surowce o jak najszerszym zakresie działania lub o największej mocy względem łagodzenia objawów towarzyszących zwyrodnieniom stawów. W tabeli 23-25 przedstawiono aktywność różnych ekstraktów roślinnych dotychczas wykorzystywanych w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów i chorób pokrewnych. Na wstępnym etapie projektowania produktu kosmetycznego konieczne jest zapewnienie właściwego środowiska do działania substancji aktywnych, więc ich dobór i ich konkretnych stężeń równocześnie determinuje wybór konkretnej formy aplikacyjnej oraz dodatek substancji pomocniczych, selektywnie dobranych stabilizatorów, rozpuszczalników czy promotorów przenikania, aby zapewnić synergizm działania substancji i pożądane działanie kosmetyku. Rynek kosmetyczny w krajach Unii Europejskiej regulowany jest rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych z dnia 30 listopada 2009 r.. Powyższy dokument w 5 załącznikach precyzyjnie określa całe spektrum substancji, które nie są dopuszczone do stosowania w kosmetykach, jak również jasno wskazuje wszystkie substancje, których stosowanie jest dozwolone jedynie w ściśle określonych zakresach oraz prezentuje listę barwników, konserwantów oraz substancji promieniochronnych dozwolonych do użytku w produktach kosmetycznych. Dlatego wybór poszczególnych składników wchodzących w skład gotowego wyrobu kosmetycznego wymaga znajomości przepisów i regulacji prawnych oraz ciągłego monitorowania ich zmian.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Tab. 23. Zestawienie ekstraktów roślinnych wykorzystywanych w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów

Nazwa rośliny (Nazwa INCI)	Aktywność inhibicyjna wobec:				Układ dopelniacza*	Dodatkowe informacje
	COX-2	5-LOX	NF-kB	TNF		
<i>Arnika góraska (Arnica montana)</i>	x	x	x	x		W badaniach <i>in vitro</i> wyniki dla (50 g wyciągu alkoholowego/100 g produktu) były porównywalne do żelu z 5 % zawartością ibuprofenu [384]
<i>Czarci pazur (Harpagophytum prokumbens)</i>	x	x	x	x		W badaniach <i>in vivo</i> uzyskano zbliżone wyniki co popularne NSAIDs [385]
<i>Imbir lekarski (Zingiber officinale)</i>	x	x	x	x		Właściwości przeciwbólowe i przeciwzapalne, bez poważnych efektów ubocznych [386]
<i>Opornik latkowaty (Pueraria montana)</i>	x	x	x	x		Inhibuje tworzenie czynników prozapalnych, zwiększa syntezę kolagenu typu II [387]
<i>Ostryż długi (Curcuma longa)</i>	x	x	x	x		Redukuje procesy zapalne i stres oksydacyjny [388]
<i>Żywokost lekarski (Symphytum officinale)</i>	x	x	x	x		Surowiec kontrowersyjny pod kątem toksykologicznym. Wycofany z dystrybucji w niektórych krajach [399]
<i>Bylica piolun (Artemisia absinthium)</i>	x	x	x	x		Przy dozowaniu 4 % w badaniach <i>in vitro</i> uzyskano wyniki działania przeciwbólowego porównywalne do morfiny [390]
<i>Wiązówka błotna (Filipendula ulmaria)</i>	x			x	x	Działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne [391]
<i>Kadziłowiec indyjski (Boswellia serrata)</i>	x	x	x	x		Działanie przeciwbólowe, bez zmian w obrazie radiologicznym [392], [393]
<i>Wierzba biała (Salix alba)</i>	x	x	x	x		Działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne [394]
<i>Jeżówka purpurowa (Echinacea Purpurea)</i>	x	x	x	x		Łagodzi objawy OA [395]
<i>Koci pazur (Uncaria tomentosa)</i>	x	x	x	x		Wykazuje właściwości przeciwzapalne [396]
<i>Oczar wirginijski (Hamamelis virginiana)</i>		x				Działanie antagonistyczne w stosunku do kapsaicyny i innych substancji rozszerzających naczynia krwionośne, działa zwężająco na naczynia krwionośne, niewskazane jednoczesne stosowanie z substancjami rozgrzewającymi [397]
<i>Kolcorośl lekarska (Smilax officinalis)</i>			x	x		Wykazuje właściwości przeciwzapalne [398]
<i>Pokrzywa zwyczajna (Urtica dioica)</i>	x	x	x	x		Wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwobrzękowe [399]
<i>Kozieradka pospolita (Trigonella Foenum-Graecum)</i>	x	x	x	x		Wykazuje działanie przeciwzapalne [400]
<i>Epimedium wielkokwiatowe (Epimedium grandiflorum)</i>				x		Potencjalny promotor chondrogenyzy, pomotor odbudowy tkanek chrzęstnych i kostnych [401]

* System wrodzonego mechanizmu obrony immunologicznej organizmu, zbudowany z grupy białek aktywowanych kaskadowo, między innymi w celu inicjacji stanu zapalnego w organizmie gospodarza oraz lizy komórek patogenów [636]

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Tab. 24. Zestawienie olejków eterycznych i ich działania w odniesieniu do choroby zwyrodnieniowej stawów

Nazwa (Nazwa INCI)	Główne substancje (INCI)	Działanie											
		Przeciwbólowe, nerwobóle, bóle mięśni, stawów i ścięgien	Przeciwzapalne	Przeciwskurczowe	Znoszące napięcie mięśniowe	Przeciwreumatyczne	Obkurczające naczynia krwionośne	Poprawiające krażenie	Znoszące obrzęki	Efekt chłodzący	Efekt rozgrzewający	Znoszące sztywność	Wspomagające natlenienie i odżywienie tkanek
Olejek majerankowy (<i>Origanum Marjorana leaf oil</i>)	terpinen-4-ol (38,40 %), hydrat cis-sabinenu (15,00 %), p-cymen (7,0 %) i γ -terpinen (6,9 %) [402]	x		x	x							x	
Olejek rozmarynowy (<i>Rosmarinus officinalis oil</i>)	1,8-cineol (38,50 %), kamfora (17,10 %), α -pinen (12,30 %), limonen (6,23 %), kamfen (6,00 %) i linalol (5,70 %) [403]	x	x		x	x		x				x	
Olejek goździkowy (<i>Eugenia caryophyllus oil</i>)	eugenol (69,44 %), octan eugenolu (10,79 %), tyranton (7,78 %) i kariofilen (6,80 %) [404]	x	x						x			x	
Olejek anyżowy (<i>Illicium verum fruit oil</i>)	trans-anetol (89,5 %), 2-(1-cyklopentenylo)-furan (0,90 %) i cis-anetol (0,70 %) [405]	x	x		x	x						x	
Olejek eukaliptusowy (<i>Eucalyptus globulus oil</i>)	1,8-cyneol (63,10 %), p-cymen (7,70 %), α -pinen (7,30 %) i d-limonen (6,90 %) [406]	x	x	x	x		x			x			
Olejek miętowy (<i>Mentha piperita oil</i>)	mentol (45,34 %), menton (16,04 %), mentofuran (8,91 %) i cis-karen (8,70 %) [407]	x			x		x			x			
Olejek cynamonowy (<i>Cinnamomum zeylanicum bark oil</i>)	aldehyd cynamonowy (71,50 %), linalol (7,00 %), β -kariofilen (6,40 %), eukaliptol (5,40 %) i eugenol (4,60 %) [408]	x	x						x		x	x	x
Olejek jałowcowy (<i>Juniperus communis fruit oil</i>)	α -pinen (51,40 %), mircen (8,30 %), sabinen (5,80 %), limonen (5,10 %) i β -pinen (5,00 %) [409]	x	x			x		x	x			x	x
Olej z czarnuszki (<i>Nigella sativa seed oil</i>)	trans-anetol (38,30 %), p-cymen (14,80 %), limonen (4,30 %) i karwon (4,00 %) [410]	x	x			x			x			x	
Olej z pistacji (<i>Pistacia vera nut oil</i>)	α -pinen (75,60 %), β -pinen (9,50 %), trans-werbenol (3,00 %), kamfen (1,40 %), trans-pinokarweol (około 1,20 %) i limonen (1,00 %) [411]	x	x										

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Tab. 25. Zestawienie pozostałych syntetycznych oraz naturalnych składników kosmetycznych, które potencjalnie wykazują działanie łagodzące względem ChZS

Nazwa	Efekt	Działanie	Uwagi
Mentol	Efekt chłodzący i przeciwbólowy	Selektywny aktywator przejściowego potencjału receptora melastatyny-8 i związek wazoaktywny. Miejscowe działanie chłodzące i stymulacja nocycceptorów w kierunku znieczulenia, lokalnie może także aktywować ośrodkowe szlaki łagodzenia bólu [412]	Inhibicja VBE
Salicylan metylu		Łagodzenie bólu mięśniowo-szkieletowego, podrażnienie zakończeń nerwów czuciowych blokuje receptory bólowe [413]	
Eter butylowy kwasu waniliowego	Efekt rozgrzewający, stymuluje cyrkulację krwi i czasowo łagodzi ból	Selektywny agonista receptora waniloidowego TPRV1, powodujący rozszerzenie naczyń (rumień) i podrażnienie [414], [415]	W kombinacji z substancjami chłodzącymi VBE nasila działanie chłodzące
Kapsaicyna			
Kamfora		Antagonista receptorów waniloidowych TRPV1 i TRPV3 [416]	
Metylosulfonylometan (MSM)		Działanie przeciwzapalne; inhibitor aktywności transkrypcyjnej NF-κB, zmniejszając ekspresję cyklooksygenazy-2 (COX-2) [417]	
Chondroityna	Właściwości regeneracyjne, wspomagające odbudowę tkanki chrzęstnej	Zwiększa syntezę składników macierzy chrząstki, takich jak kwas hialuronowy i proteoglikany oraz zmniejsza degradację składników macierzy chrząstki, w szczególności kolagenu II, glikozaminoglikanów (GAG) i proteoglikanów (PG) oraz zmniejsza apoptozę chondrocytów [418]	
Glukozamina		Podstawowy składnik chrząstki i mazi stawowej, wpływa na proces anaboliczny metabolizmu chrząstki [419]	
Resveratrol	Działanie przeciwzapalne	Redukcja stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego oraz supresja IL-1b [420]	
Kannabinoidy	Działanie przeciwbólowe	Działanie przeciwbólowe kannabinoidów obejmuje hamowanie uwalniania neuroprzekaźników i neuropeptydów z presynaptycznych zakończeń nerwowych, hamując szlaki bólowe i redukując stany zapalne nerwów [421]	

Poszukiwane były substancje, które potencjalnie mogą działać synergicznie i wzajemnie uzupełniać swoje działanie. Wszelkie uszkodzenia w stawach mogą powstawać w sposób naturalny, w skutek zużycia powierzchni stawowych przez ich nadmierną eksploatację, kiedy tkanka nie jest zdolna do regeneracji na takim samym poziomie, na jakim zachodzą procesy degradacyjne lub w skutek urazów mechanicznych, czyli wszelkich kontuzji. Oba przypadki wymagają regeneracji tkanek i charakteryzują się podobnymi objawami, z których najbardziej uciążliwe są: ból, sztywność i opuchlizna, natomiast ich mechanizmy mogą się różnić, dlatego wymagają innego podejścia. Z tego powodu, do dalszych badań wybrane zostały dwie substancje aktywne: ekstrakt z *Epimedium Koreanum*, który potencjalnie może być promotorem chondrogenyzy, czyli jego zadaniem jest aktywowanie procesów naprawczych oraz siarczan glukozyminy, który z kolei stanowi podstawowy składnik budulcowy tkanki chrzęstnej. Dodatkowo, aby w jak najwyższym stopniu produkty łagodziły wszystkie dolegliwości, które mogą towarzyszyć uszkodzeniom tkanki chrzęstnej czy stawów wybrany został wspomagająco ekstrakt z arniki, który wielokrotnie wykazywał doskonałe właściwości znoszące wszelkie opuchlizny i obrzęki oraz piołun, charakteryzujący się w badaniach literaturowych najsilniejszymi właściwościami łagodzącymi ból [390], [422]. Połączenie różnych grup substancji daje produktowi szansę działania w bardzo szerokim zakresie z uwagi na różne mechanizmy działania składników. Z tego względu do formulacji w kalkulowano również dodatek MSM, które jest doskonałym źródłem łatwo przyswajalnej organicznej siarki, niezbędnej do produkcji podstawowego aminokwasu - metioniny, a tym samym przyczynia się do zapoczątkowania procesu odbudowy uszkodzonych tkanek. Olejki eteryczne cechują się bardzo szerokim zakresem działania z uwagi na bardzo bogate składy, zwykle od kilku do nawet kilkudziesięciu poszczególnych składników, dlatego ich działanie może doskonale wzmacniać działanie produktu. Należy jednak pamiętać o tym, że tak wieloskładnikowe mieszaniny mogą łatwo ze sobą reagować, i należy dobrze prześledzić ich składy by uniknąć niepożądanych reakcji czy niestabilności produktu. Wstępnie wytypowano kombinację trzech olejków eterycznych: rozmarynowego, eukaliptusowego oraz goździkowego, które wspomagane będą substancjami o działaniu termicznym: chłodzącym (mentol) lub rozgrzewającym (kamfora, VBE) w zależności od formulacji i przeznaczenia (uszkodzenia pokontuzyjne lub zwyrodnieniowe, które wymagają różnego podejścia pod kątem efektu termicznego). Dostępnych jest wiele surowców roślinnych o bardzo ciekawych mechanizmach działania, natomiast często ich stosowanie związane jest z wieloma ograniczeniami bądź stanowią surowce kontrowersyjne, których stosowanie jest ograniczone lub w niektórych państwach nawet zabronione z uwagi na potencjalne możliwe działanie kancerogenne lub toksyczne, co może znacząco przyczynić się do niepowodzenia produktu, niemożliwości jego wprowadzenia na dany rynek lub niskiej sprzedaży, pomimo wysokiej jakości i skuteczności produktu.

5.2. Analiza zawartości ikaryny w ekstrakcie z *Epimedium Koreanum* z zastosowaniem HPLC-MS

Oznaczenie zawartości ikaryny w ekstrakcie z ziela *Epimedium Koreanum* było konieczne do ustalenia stężenia ikaryny w ostatecznym składzie produktu, tak by w gotowym wyrobie możliwe było wykonanie oznaczeń analitycznych. Czulość urządzeń pozwala na wykonanie oznaczeń jedynie w zakresie granicy wykrywalności danego aparatu, dlatego przy zawartości poniżej granicy wykrywalności, wykonanie analizy byłoby niemożliwe. Przewidywana zawartość ikaryny w ekstrakcie była bardzo niska (według specyfikacji surowca, producent zapewnia $5\% \pm 0,5\%$ ekstraktu z *Epimedium Koreanum* w surowcu). Do analizy ilościowej ikaryny w surowcu wybrano metodę HPLC-MS z uwagi na wysoką specyficzność metody. Wynik analizy na poziomie 176 ng/ml pozwolił ustalić skład ilościowy produktu tak, aby zawartość substancji aktywnej mieściła się w granicach wykrywalności, jakie jest w stanie zmierzyć stosowane urządzenie. W pierwszej kolejności wyznaczona została krzywa kalibracyjna ikaryny, ustalona poprzez oznaczenie 5 różnych stężeń roztworów referencyjnych (roztwory przygotowane z zastosowaniem wzorca ikaryny) w trzech powtórzeniach (Tab. 26), na podstawie czego możliwe było oznaczenie zawartości ikaryny w badanej próbce.

Tab. 26. Zestawienie nastrzyków substancji aktywnej (ikaryny) oraz ekstraktu z *Epimedium Koreanum* i ich wyników z zastosowaniem analizy HPLC-MS

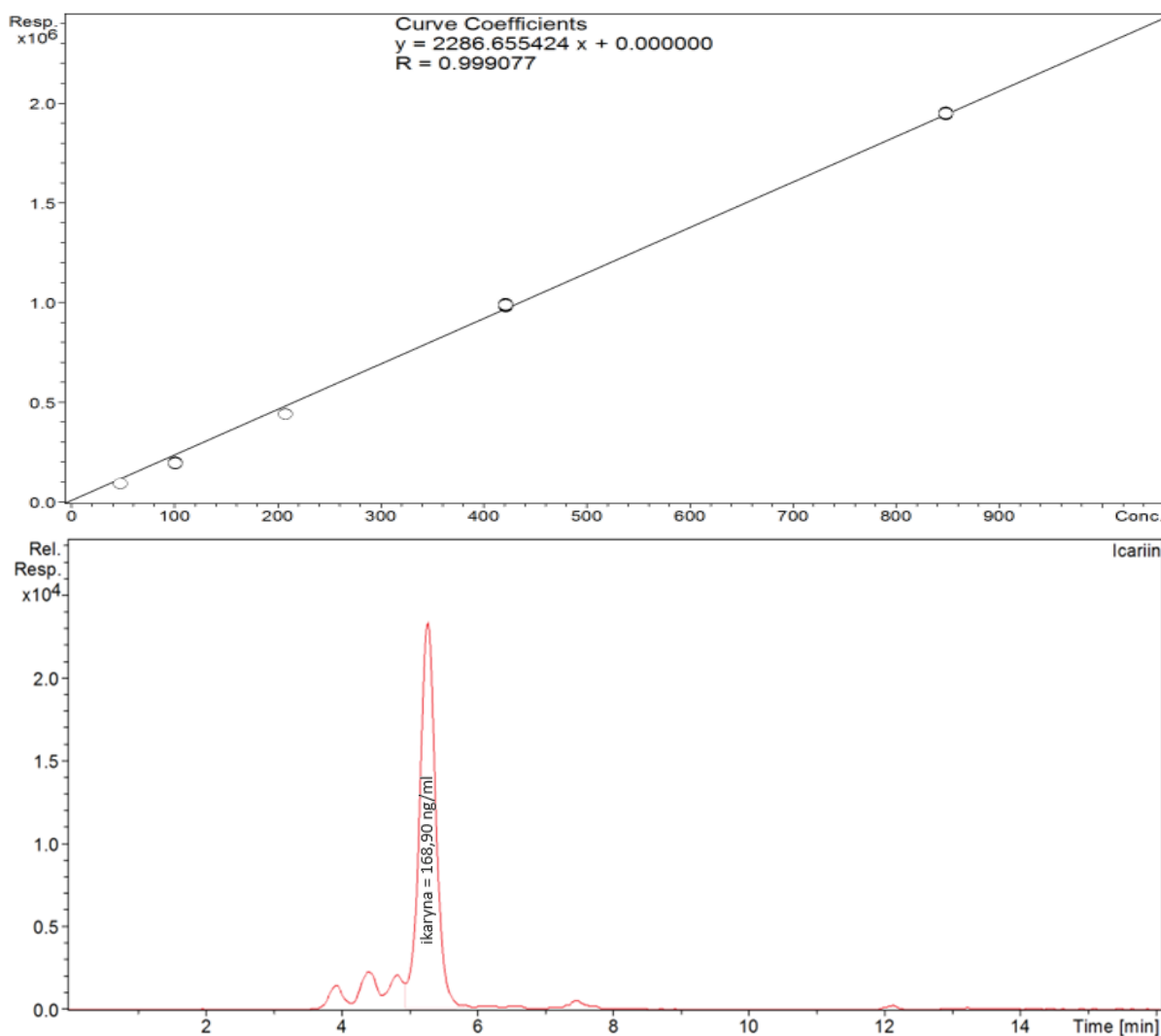
Lp.	Nazwa próbki	Teoretyczne stężenie [ng/ml]	Powierzchnia piku	Obliczone stężenie [ng/ml]	SD
1	Metanol	0,000000	0,000000	-	-
2	Woda	0,000000	0,000000	-	-
3	C1	53,000000	98233,773438	42,959587	
4	C1	53,000000	98448,437500	43,053464	0,127876
5	C1	53,000000	98812,218750	43,212553	
6	C2	106,000000	206322,296875	90,228853	
7	C2	106,000000	198680,234375	86,886827	2,265740
8	C2	106,000000	196441,031250	85,907579	
9	C3	212,000000	445687,343750	194,907960	
10	C3	212,000000	447367,687500	195,642808	0,755343
11	C3	212,000000	443913,687500	194,132305	
12	C4	424,000000	997472,375000	436,214554	
13	C4	424,000000	992462,625000	434,023690	4,081717
14	C4	424,000000	979394,500000	428,308738	
15	C5	848,000000	1938209,500000	847,617651	3,210869

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

16	C5	848,000000	1945110,250000	850,635487	
17	C5	848,000000	1952885,125000	854,035595	
18	Ekstrakt z <i>Epimedium</i> <i>Koreanum</i>	0,000000	381935,906250	167,028185	
19	Ekstrakt z <i>Epimedium</i> <i>Koreanum</i>	0,000000	386218,687500	168,901131	1,660418
20	Ekstrakt z <i>Epimedium</i> <i>Koreanum</i>	0,000000	389507,812500	170,339531	

Współczynnik regresji dla krzywej kalibracyjnej wyniósł 0,999, co wskazuje na dobrą liniowość krzywej kalibracyjnej (Rys. 19).

Rys. 19. Krzywa kalibracyjna ikaryny i przykładowy chromatogram analizy HPLC-MS



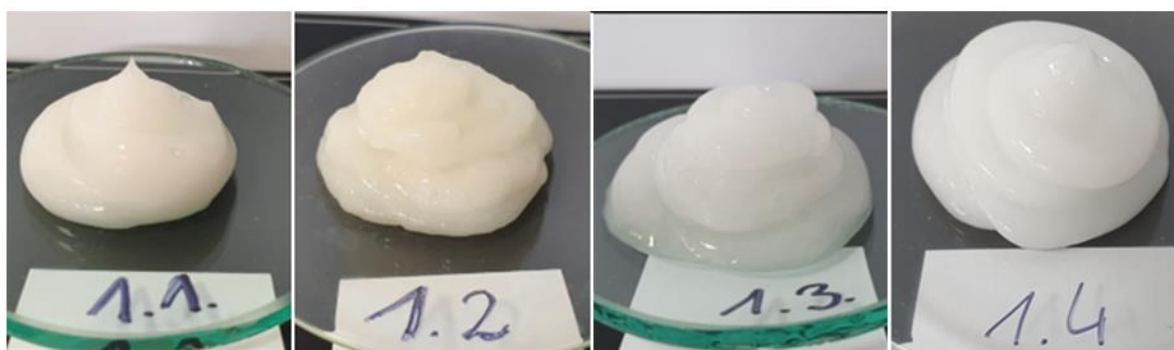
Analiza HPLC-MS potwierdziła obecność ikaryny w badanej próbce i wykazała średnio $168,76 \text{ ng} \pm 1,660418 \text{ ng}$ ikaryny na 1 ml ekstraktu *Epimedium Koreanum* (Tab. 26), co przy standardowym stosowaniu składnika aktywnego na poziomie od 1 % wag. do 5 % wag. byłoby poniżej granicy wykrywalności substancji aktywnej przy ocenie spektrofotometrycznej. W związku z tym, zawartość ekstraktu w końcowym produkcie powinna wynosić minimum 50 % wag., jednak z uwagi na osiągnięcie silnego efektu działania produktu, zawartość ekstraktu podniesiono do 70 % wag.. Dzięki temu możliwe było spektrofotometryczne oznaczenie uwalniania ikaryny z masy produktu. Dodatkowo, zawartość substancji aktywnej w końcowym produkcie jest zadowalająca dla producenta.

5.3. Preparatyka założonych formulacji

Wybór nośnika substancji aktywnych odgrywa niezwykle istotną rolę dla zdolności permeacyjnych składników formulacji oraz zachowania ich aktywności przez cały okres przechowywania i stosowania produktu. Dodatkowo wpływa na odbiór sensoryczny i właściwości reologiczne produktu oraz decyduje o jego aplikacji, przez co często jednocześnie ogranicza wybór opakowań. Dlatego dobrze zaprojektowane produkty cechują się wysoką skutecznością i stabilnością wraz z jednoczesnym komfortem użytkowania. Przygotowane zostały 3 prototypy formulacji: emulsja, maść oraz żel. Pierwotna, założona formulacja żelowa oparta na carbomerze jako zagęstniku niestety okazała się być niestabilna i nawet przy wysokiej zawartości zagęstnika (od 1 % wag. do 3 % wag.) nie tworzyła układu żelowego, z uwagi na zachwianie układu elektrolitycznego spowodowanego wysokim stężeniem siarczanu glukozaminy (do 10 % wag.). Carbomer, czyli kwas poliakrylowy to wielocząsteczkowy polimer silnie wiążący wodę. Jest bardzo bezpieczną substancją, popularnie stosowaną w kosmetykach oraz lekach, z uwagi na niski potencjał podrażnienia i uczulenia skóry nawet przy 100 % wag. czystego składnika, jak również niską fototoksyczność i alergenicność kontaktową. Zwykle wymaga stosowania na poziomie od 0,15 % wag. do 0,5 % wag., dlatego jest też niezwykle wydajnym surowcem i korzystnym pod kątem ekonomicznym dla kalkulacji finansowej formulacji [423]. Efekt żelowania carbomeru obejmuje jego dyspersję i hydratację, a następnie, pod wpływem neutralizacji masy, przez dodanie substancji chemicznych, które zwiększają pH, takie jak trietanolaminę (TEA) czy wodorotlenek sodu dochodzi do wytworzenia sieci żelu poprzez solwatację, tworzenie soli i odpychanie elektrostatyczne pomiędzy grupami anionowymi [424]. Polimery, takie jak carbomer potrzebują do zagęszczenia układu, zmiany (wzrostu) wartości pH, która w przypadku polimerów responsywnych na pH, prowadzi do deprotonowania ugrupowań łańcucha polimeru i jego wyprostowania dzięki czemu układ może stworzyć sieć [425]. W tym przypadku zbyt duża ilość elektrolitów w mieszaniu może zaburzyć proces zagęszczania, dlatego istotny jest także dobór odpowiedniego stężenia zagęstnika. W niniejszej pracy wyższe stężenia carbomeru (5 % wag.) pomimo zdolności żelowania nawet przy wysokich stężeniach siarczanu glukozaminy, nie mogły być użyte w formulacji, gdyż znacząco zaburzałyby założony kosztorys formulacji, dlatego konieczne było poszukiwanie innego zagęstnika. W następstwie, z uwagi na dużą dostępność surowca, przetestowano poliakrylan sodu (sól sodowa kwasu poliakrylowego, nazwa handlowa cosmedia SP), który jest samoemulgującym anionowym polielektrolitem [426], zdolnym do

wiązania znacznych ilości wody, nawet do kilkuset razy więcej niż wynosi jego masa [427], [428]. Tworzenie żelu, w tym przypadku, możliwe jest dzięki obecności w składzie polimeru grup hydrofilowych, takich jak: grupy karboksylowe pochodzące z kwasu akrylowego, co pozwala na efektywne tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy zagęstnikiem a cząsteczkami wody, w rezultacie tworząc sieć wiązań wodorowych, która ogranicza ruchomość cząsteczek wody w matrycy polimerowej. Poliakrylan sodowy, podobnie jak carbomer, jest składnikiem bezpiecznym i niedrażniącym dla skóry, jednak z uwagi na zbliżoną budowę chemiczną również wymagał zastosowania wysokiego stężenia (4 % wag.) do otrzymania stabilnego żelu, co ostatecznie byłoby nieopłacalne podczas produkcji. W związku z powyższym przetestowany został całkowicie inny, pod kątem budowy, składnik o nazwie handlowej Natrosol 250HHR, którym jest hydroksyetyloceluloza (HEC). Ta pochodna celulozy jest niejonowym polimerem pochodzenia naturalnego, o wysokiej tolerancji pH (4 - 10) oraz odporności na obecność wysokich zawartości soli, środków powierzchniowo czynnych oraz etanolu, co pozwoliło na otrzymanie jednorodnego, stabilnego żelu przy stosunkowo niskim dozowaniu (1,8 % wag.) w odniesieniu do poprzednich zagęstników (Rys. 20). W związku z powyższym do dalszych badań wyselekcjonowana została formuła oparta na HEC.

Rys. 20. Zestawienie formuły żelowych przy wykorzystaniu: [1.1.] carbomeru (5 % wag.), [1.2.] poliakrylanu sodu (4 % wag.), [1.3.] hydroksyetylocelulozy (1 % wag.) oraz [1.4.] hydroksyetylocelulozy (2 % wag.) [zdjęcia własne]

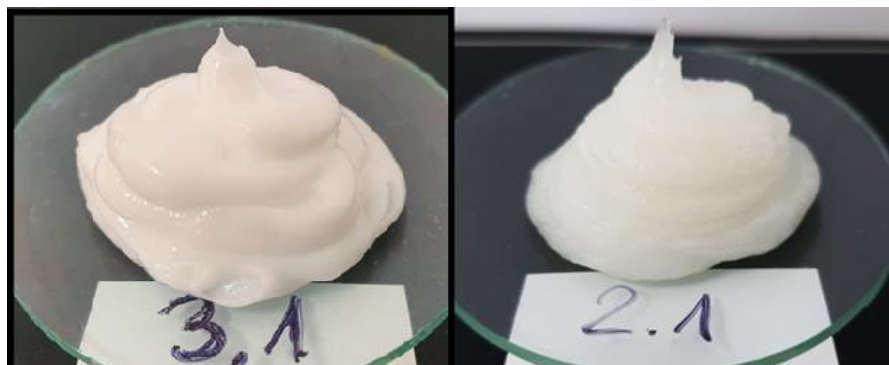


Do otrzymania emulsji typu O/W (Rys. 21) wykorzystano kombinację emulgatorów: samoemulgującego stearynianu glicerolu (INCI: Glyceryl Sterate, SE) oraz mieszaniny alkoholi cetylowego i stearylowego oksyetylenowanych 25 molami tlenu etylenu (INCI: Cetareth-25) i alkoholu cetylowego (INCI: Cetyl Alcohol) jako koemulgatora. Dodatkowo, do stabilizacji emulsji wykorzystano gumę ksantanową. Wybór surowców konsystencjotwórczych i modyfikatorów reologii podyktowany był dostępnością surowców w aktualnych zasobach producenta, tak by minimalizować koszty wytworzenia nowych formuły. Z uwagi na hydrofobowy charakter maści, w jej przypadku, możliwe było wprowadzenie maksymalnie 20 % wag. ekstraktu z *Epimedium Koreanum* przy niezmiętej ilości pozostałych składników aktywnych. Pomimo niższej zawartości głównego składnika aktywnego, formuła została opracowana w celu sprawdzenia potencjału różnych typów formuły dla zdolności permeacyjnych wybranych składników

aktywnych. W związku z założeniem opracowania dwóch wersji produktów (o różnych odczuciach termicznych) wszystkie trzy formułacje przygotowano w dwóch wariantach:

- chłodzącą z dodatkiem mentolu,
- rozgrzewającą z dodatkiem kamfory i VBE.

Rys. 21. Zdjęcie przygotowanych formułacji: [3.1.] emulsja, [2.1.] maść [zdjęcia własne]



5.4. Opracowanie specyfikacji fizykochemicznych opracowywanych produktów

5.4.1. Pomiar pH

Wartość pH produktu jest zależna od pH wszystkich poszczególnych składników w masie kosmetycznej oraz reakcji fizykochemicznych, jakie mogą pomiędzy nimi zachodzić. pH kosmetyków jest parametrem, który świadczy o bezpieczeństwie ich stosowania, i powinno być jak najbardziej zbliżone do pH ludzkiej skóry, które w fizjologicznych warunkach mieści się między 4,5 a 5,9. Lekko kwaśny odczyn produktów kosmetycznych nie narusza naturalnej warstwy ochronnej skóry i zasiedlających jej mikroorganizmów, umożliwia procesy regeneracyjne, a w przypadku bardziej alkalicznych kosmetyków dużo częściej dochodzi do zaburzenia naturalnej bariery ochronnej, częstego przesuszenia skóry w skutek usunięcia składników natłuszczających płaszcza hydrolipidowego oraz zaburzenia mikroflory, przez co skóra jest bardziej narażona na wszelkie uszkodzenia czy zakażenia. Zmiany pH mogą wskazywać na niestabilność masy lub zachodzące procesy destabilizacji emulsji czy też dezaktywacji składników aktywnych, dlatego pH jest często monitorowane podczas badań stabilności, wskazując na zachodzący proces destabilizacji, jeszcze zanim pojawią się pierwsze zmiany wizualne czy sensoryczne. W tabeli 27 przedstawiono wartości parametrów pH dla obu aktywnych substancji, czystej bazy kosmetycznej bez substancji aktywnych oraz gotowego produktu.

Tab. 27. Wyniki oznaczenia pH

Surowiec	Wartość pH	Tolerancja
10 % roztwór siarczanu glukozy	5,66	5,00 - 7,00
Ekstrakt z <i>Epimedium Koreanum</i>	5,47	4,00 – 7,00
Baza żel chłodzący	5,19	
Baza żel rozgrzewający	5,24	
Formulacja żel chłodzący	5,12	
Formulacja żel rozgrzewający	5,15	
Baza emulsja chłodząca	6,02	4,50 - 6,50
Baza emulsja rozgrzewająca	5,93	
Formulacja emulsja chłodząca	5,81	
Formulacja emulsja rozgrzewająca	5,88	

Wyniki wskazują, że dodatek składnika aktywnego nie wpływał znacząco na wartość pH gotowego produktu. Wartości pH każdej z opracowanych formuł mieszczą się w założonym kryterium akceptacji dla produktów stosowanych na skórę (4,50 - 6,50), w związku z tym otrzymane formułki mogą być potencjalnie wykorzystywane do aplikacji naskórnej.

5.4.2. Oznaczenie gęstości i lepkości dynamicznej otrzymanych formułki

Zarówno gęstość, jak i lepkość są parametrami o kluczowym znaczeniu dla właściwości sensorycznych i aplikacyjnych produktu. Gęstość jest istotna z punktu widzenia oceny objętości podczas doboru pojemności opakowań czy aparatury podczas projektowania procesu technologicznego. Lepkość, z kolei, zapewnia dobre rozprowadzanie produktu i jego smarowalność, a także warunkuje szybkość uwalniania substancji aktywnych, które przy niewłaściwym doborze bazy kosmetycznej mogą zostać uwięzione w masie produktu, przez co ich biodostępność będzie znikoma. Z drugiej jednak strony duża lepkość produktu często odbierana jest przez konsumentów jako zapewnienie wysokiej koncentracji składników aktywnych, a tym samym skuteczności ich działania i wysokiej jakości produktu [429]. Lepkość jest także brana pod uwagę przy doborze opakowań, tak by ułatwić aplikację lub uczynić ją bardziej atrakcyjną i bezpieczniejszą dla konsumenta. Zupełnie inne wartości lepkości są pożądane dla produktów w słoiczkach, tubkach, butelkach z pompką czy opakowaniach typu airless. Lepkość jest również istotna przy projektowaniu procesu technologicznego, aby dobrać parametry mieszania i homogenizacji w sposób zapobiegający nadmiernemu zapowietrzeniu masy czy destabilizacji układu. Oba parametry są zależne głównie od składników bazowych formułki i mogą być modyfikowane poprzez drobne zmiany w ilości poszczególnych komponentów konsystencjotwórczych lub dodatek modyfikatorów reologii. Obecnie na rynku dostępna jest cała gama surowców pochodzenia naturalnego (gumy pochodzenia naturalnego, celuloza i jej pochodne, skrobia), jak i syntetycznych (polimery, emulgatory), które umożliwiają uzyskanie pożądanej konsystencji produktu, dlatego już na początkowym etapie projektowania formułki ważne

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

jest uwzględnienie wszystkich istotnych aspektów i pożądaných wartości parametrów fizykochemicznych. Dobór składników formułacji kosmetycznej zwykle jest uzależniony od ich ceny, dostępności, pochodzenia, łatwości ich przetwarzania oraz kompatybilności z pozostałymi składnikami receptury, szczególnie substancjami aktywnymi dla których niezbędne jest zapewnienie właściwego środowiska do działania [430]. W formułacji żelowej głównym składnikiem wpływającym na lepkość jest HEC, w przypadku emulsji jest to kombinacja emulgatorów (stearynianu glicerolu, alkoholu cetylowego oraz mieszaniny alkoholi cetylowego i stearylowego oksyetylenowanych 25 molami tlenu etylenu, stabilizowanych gumą ksantanową, tworzącą roztwory określane jako pseudoplastyczne [431], scharakteryzowane jako odporne na szeroki zakres pH, temperatur czy sił ścinających oraz promieniowania UV, dodatkowo podbijając lepkość i wpływając na przyjemniejszą aplikację produktu [432]. Guma ksantanowa jest dobrym stabilizatorem emulsji, pozwala na otrzymanie stabilnych formułacji emulsyjnych, które są odporne na zewnętrzne czynniki, w tym nawet skrajne temperatury od -5 °C do 45 °C [433], dodatkowo jest tania, ma dużą dostępność, jest łatwa do wprowadzenia do formułacji oraz poprawia wrażenie sensoryczne formułacji dlatego jest chętnie wykorzystywana przez producentów. W przypadku maści, lepkość jest ściśle zależna od zawartości wazeliny, dlatego w opracowanej formułacji wykorzystano najmniejszą możliwą ilość wazeliny jaka była niezbędna do wytworzenia stabilnej maści, aby uzyskać najniższą możliwą lepkość i tym samym poprawić parametry sensoryczne aplikacji. Dostępne badania również wskazują wyższe uwalnianie substancji aktywnych z formułacji o najniższych lepkościach, a wraz ze wzrostem lepkości maleje szybkość uwalniania składników aktywnych [434]. W tabeli 28 przedstawiono wartości lepkości i gęstości wszystkich otrzymanych formułacji.

Tab. 28. Wartości lepkości oraz gęstości otrzymanych formułacji kosmetycznych

Formułacja	Gęstość [g/cm ³]	Tolerancja	Lepkość [mPa*s]	Tolerancja
Baza żel	0,9901		38 759	
Formułacja żel rozgrzewający	0,9898	0,95 - 1,10	38 417	25 000 – 40 000
Formułacja żel chłodzący	0,9909		29 589	
Baza emulsja	0,7824		48 041	
Formułacja emulsja rozgrzewająca	0,7795	0,75 - 0,85	48 533	35 000 – 50 000
Formułacja emulsja chłodząca	0,8041		39 867	
Baza maść	0,8259		29 981	
Formułacja maść rozgrzewająca	0,8146	0,78 - 0,85	30 067	18 000 – 35 000
Formułacja maść chłodząca	0,8046		21 867	

Pomimo podjętych działań obejmujących obniżenie lepkości, w przypadku maści nie udało się uzyskać zadowalającego efektu. Maść w odczuciu sensorycznym nadal była zbyt tłusta i pozostawiała lepki film. Pozostałe formułacje, zarówno emulsyjne, jak i żelowe uzyskały bardzo korzystne parametry lepkości i gęstości wytworzonej masy, mieszczące się w kryterium akceptacji producenta.

5.4.3. Ocena sensoryczna badanych formułacji

Ocena sensoryczna produktu często stanowi drugi, zaraz za efektywnością, parametr decydujący o ostatecznej ocenie produktu. Subiektywne odczucia sensoryczne mogą zniechęcić konsumenta do dalszego stosowania, dlatego ważne jest, aby zapewnić najbardziej pożądane przez konsumentów cechy formułacji, takie jak: ładny zapach, zachęcający kolor czy łatwa i przyjemna aplikacja. W tabeli 29 przedstawiono zestawienie ocen uzyskanych formułacji, gdzie zarówno emulsje oraz żele spełniały wszystkie założone parametry, natomiast w przypadku maści, formułacja okazała się być zbyt tłusta, i problematyczna w aplikacji, natomiast w przypadku wysokiej skuteczności byłby to mniej istotny czynnik decydujący o wprowadzeniu na rynek.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

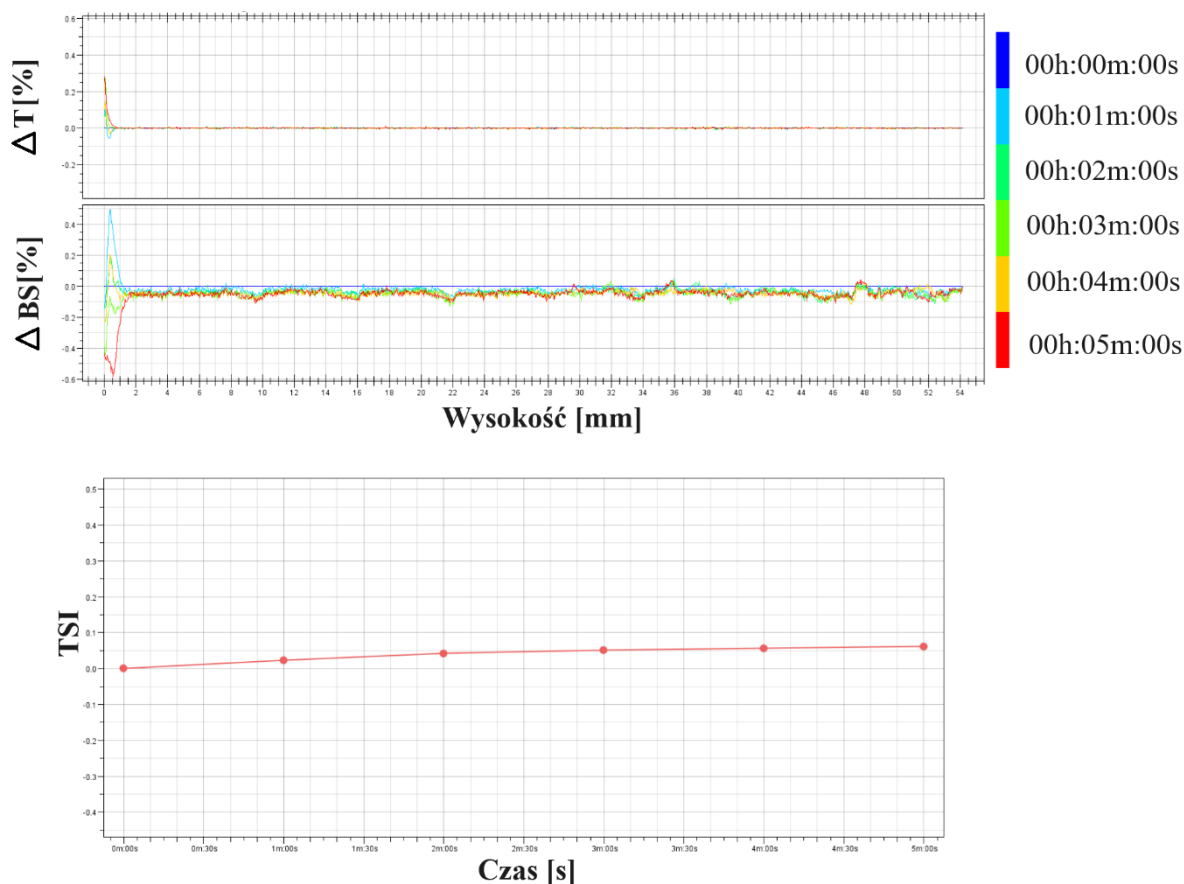
Tab. 29. Zestawienie parametrów sensorycznych dla każdej z opracowanych formułacji kosmetycznych

Formulacja	Kolor	Zapach	Wygląd masy produktu	Rozprowadzanie	Tłustość
Emulsja O/W chłodząca	Kremowy, jednorodny w całej objętości	Mentolowy Ocena wg skali interwałowej: 4 - przyjemny	Konsystencja kremowa, wizualnie homogenna w całej objętości bez widocznych zanieczyszczeń, grudek czy rozwarstwień, wg oceny interwałowej 4 - lekka	Wg oceny interwałowej: 4 - produkt łatwo rozprowadza się na skórze	Wg oceny interwałowej: 4 - produkt szybko się wchłania, pozostawia delikatny film
Emulsja O/W rozgrzewająca	Kremowy, jednorodny w całej objętości	Cynamonowo - ziołowy, Ocena wg skali interwałowej: 4 - przyjemny	Konsystencja kremowa, wizualnie homogenna w całej objętości bez widocznych zanieczyszczeń, grudek czy rozwarstwień, wg oceny interwałowej 4 - lekka	Wg oceny interwałowej: 4 - produkt łatwo rozprowadza się na skórze	Wg oceny interwałowej: 4 - produkt szybko się wchłania, pozostawia delikatny film
Żel chłodzący	Kremowy, jednorodny w całej objętości	Mentolowy, Ocena wg skali interwałowej: 4 - przyjemny	Konsystencja lekkiego żelu, wizualnie homogenna w całej objętości bez widocznych zanieczyszczeń, grudek czy rozwarstwień, wg oceny interwałowej 5 - bardzo lekka	Wg oceny interwałowej: 5 - produkt bardzo łatwo rozprowadza się na skórze	Wg oceny interwałowej: 4 - produkt bardzo szybko się wchłania, pozostawia delikatny film
Żel rozgrzewający	Kremowy, jednorodny w całej objętości	Cynamonowo - ziołowy, Ocena wg skali interwałowej: 4 - przyjemny	Konsystencja lekkiego żelu wizualnie homogenna w całej objętości bez widocznych zanieczyszczeń, grudek czy rozwarstwień, wg oceny interwałowej 5 - bardzo lekka	Wg oceny interwałowej: 5 - produkt bardzo łatwo rozprowadza się na skórze	Wg oceny interwałowej: 4 - produkt bardzo szybko się wchłania, pozostawia delikatny film
Maść chłodząca	Żółtawy jednorodny w całej objętości	Mentolowy, Ocena wg skali interwałowej: 4 - przyjemny	Masa produktu o konsystencji maściowej, wizualnie homogenna w całej objętości bez widocznych zanieczyszczeń, grudek czy rozwarstwień, wg oceny interwałowej 2 - ciężka	Wg oceny interwałowej: 2 - produkt trudno rozprowadza się na skórze	Wg oceny interwałowej: 1 - produkt bardzo tłusty, pozostawia tłustą warstwę
Maść rozgrzewająca	Żółtawy, jednorodny w całej objętości	Cynamonowo - ziołowy, Ocena wg skali interwałowej: 4 - przyjemny	Masa produktu o konsystencji maściowej, wizualnie homogenna w całej objętości bez widocznych zanieczyszczeń, grudek czy rozwarstwień, wg oceny interwałowej 2 - ciężka	Wg oceny interwałowej: 2 - produkt trudno rozprowadza się na skórze	Wg oceny interwałowej: 1 - produkt bardzo tłusty, pozostawia tłustą warstwę

5.4.4. Określenie stabilności emulsji

Emulsje są najbardziej niejednorodnymi układami dyspersyjnymi składającymi się z dwóch niemieszających się faz ustabilizowanych emulgatorami lub innymi związkami powierzchniowo czynnymi, które pozwalają na połączenie obu faz przez długi czas. Pod kątem termodynamicznym wysokie napięcie międzyfazowe na granicy faz prowokuje układ do jego obniżenia a tym samym rozdziału faz [435]. Stabilność emulsji określa długość czasu w jakim emulsja pozostaje w formie niezmienionej bez widocznych rozwarstwień faz. Do oceny stabilności wykorzystano: (i) testy wirówkowe opierające się na wpływie siły odśrodkowej na rozdział faz, (ii) metodę wielokrotnego rozpraszania światła oraz (iii) ocenę mikroskopową emulsji, które należą do grupy podstawowych metod oceny stabilności emulsji [436]. Przeprowadzone analizy nie wykazały niestabilności żadnej z otrzymanych emulsji, potwierdzając tym samym stabilność obu (zarówno chłodzącej, jak i rozgrzewającej). Ocenę stabilności metodą wirówkową przeprowadzono 7 dni po przygotowaniu formulacji, co potwierdziło odporność masy kosmetycznej na siły ścinające, przy prędkością 3500 rpm przez 15 minut. Analizę rozkładu transmisji światła w funkcji czasu i położenia wzdłuż całej próbki prowadzono przez miesiąc dokonując pomiaru aparatem Turbiscan w każdym tygodniu sezonowania. Turbiscan pozwala na określenie wartości indeksu stabilności TSI badanej substancji w zakresie 0 - 100, przy czym wzrost tej wartości świadczy o słabej stabilności analizowanej próbki i zachodzeniu zmian w układzie dyspersyjnym [437]. Porównanie wyników z każdego pomiaru nie wykazało znaczących różnic a tym samym zmniejszenia stabilności układów. Widoczny nieznaczny wzrost wskaźnika TSI (Rys. 22) mieści się w kryterium akceptacji dla stabilnych mas kosmetycznych, potwierdzając dobre ustabilizowanie układu. Analogiczne wyniki, jak te przedstawione na rysunku 22, uzyskano dla żelu chłodzącego, w związku z tym wykresu tego nie powielano.

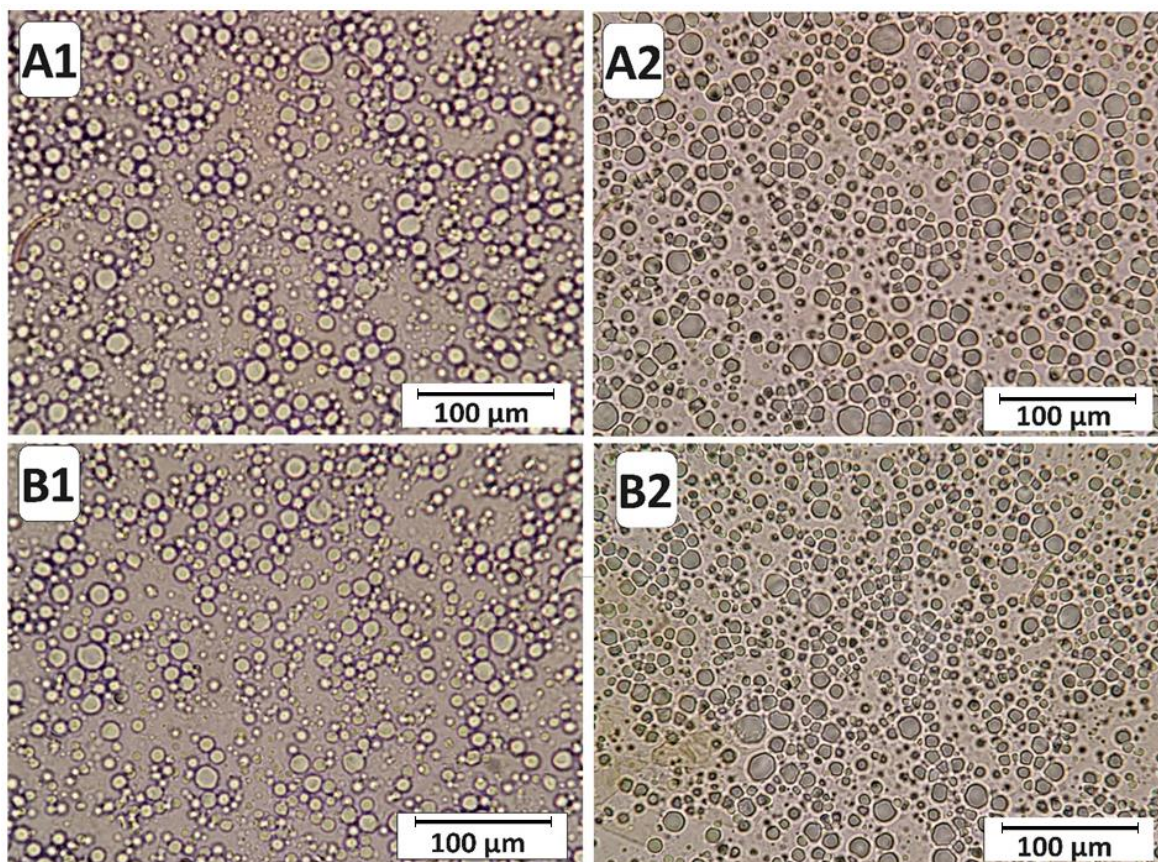
Rys. 22. Profil przedstawiający dane transmisji i rozpraszania wstecznego przez badaną emulsję rozgrzewającą oraz kinetykę procesu destabilizacji emulsji



5.4.5. Ocena mikroskopowa emulsji

Ocena mikroskopowa emulsji (chłodzącej i rozgrzewającej) wykazała dobrą dyspersję cząstek, brak widocznej flokulacji, co wskazuje na dobrą stabilność otrzymanych preparatów. W obu emulsjach udało się uzyskać bardzo zbliżone rozmiary cząstek fazy zdyspergowanej, co świadczy o powtarzalności procesu technologicznego i właściwym doborze parametrów mieszania i homogenizacji (zarówno czasu, jak i liczby obrotów), choć w przypadku emulsji rozgrzewającej otrzymano nieznacznie większe rozdrobnienie fazy tłuszczowej. Zabarwienie preparatu pozwoliło również na ocenę typu emulsji (Rys. 23) poprzez widoczne wybarwienie oranżem metylowym fazy zewnętrznej (dyspergującej), wskazując na fazę wodną jako dyspergującą w obu próbkach. W przypadku zabarwienia fazy zdyspergowanej czerwiecią Kongo, rozpuszczalną w tłuszczach, potwierdzono typ obu emulsji jako O/W.

Rys. 23. Obraz mikroskopowy emulsji zabarwionej barwnikami pozwalającymi na rozróżnienie faz: A1 - emulsja chłodząca zabarwiona oranżem metylowym, A2 - emulsja chłodząca zabarwiona czerwienią Kongo, B1 - Emulsja rozgrzewająca zabarwiona oranżem metylowym, B2 - emulsja rozgrzewająca zabarwiona czerwienią Kongo



Na podstawie powyższych obrazów mikroskopowych stwierdzono również, że obie otrzymane emulsje miały charakter makroemulsji, z uwagi na rozmiar ich cząstek, który nie przekraczał 100 µm [438].

5.4.6. Oznaczenie aktywności wody w maści

W przypadku produktów bezwodnych lub produktów o dużej zawartości fazy tłuszczowej niemożliwe jest oznaczenie pH, dlatego jako parametr kontrolny wykorzystywany jest pomiar aktywności wody, która może być podstawą do klasyfikacji formułacji jako produktu niskiego ryzyka mikrobiologicznego oraz może być także doskonałym wskaźnikiem zmian starzeniowych formułacji i jej destabilizacji w czasie. Monitorowanie tego parametru w trakcie przechowywania produktu, pozwala, podobnie jak pH, zauważyć wczesne oznaki rozdziału faz. Aktywność wody z uwagi na to, że jest wartością określającą ilość niezwiązanej wody dostępnej dla mikroorganizmów, pozwala ocenić szanse na mikrobiologiczne zakażenie produktu, gdyż woda jest niezbędnym czynnikiem rozwoju mikroorganizmów. Bakterie zwykle wymagają do namnażania podłoża powyżej 90 % RH, drożdże powyżej 70 % RH i pleśnie powyżej 60 % RH, dlatego wszystkie produkty o aktywności wody poniżej tych wartości są klasyfikowane jako bezpieczne

mikrobiologicznie [439]. Oba wyniki pomiaru aktywności wody mieściły się poniżej założonego poziomu < 60 % RH i wynosiły odpowiednio: dla maści chłodzącej 39,45 % RH oraz dla maści rozgrzewającej 41,20 % RH.

5.5. Badanie przenikania przeznaskórkowego *in vitro* opracowanych formułacji w wybranych formach aplikacyjnych

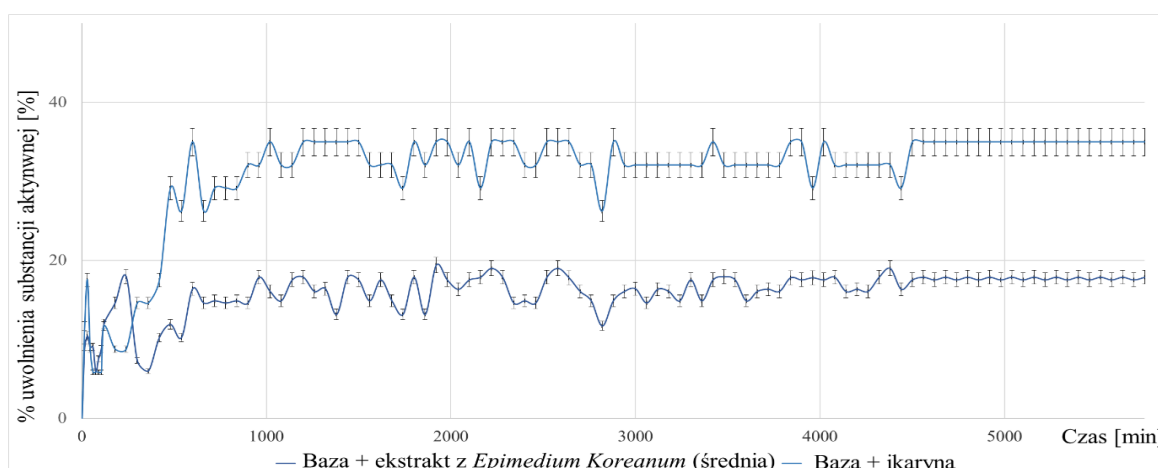
5.5.1. Określenie stopnia uwalniania ikaryny z zastosowaniem aparatu łopatkowego

Dostępne źródła literaturowe prezentują niewiele danych na temat efektywności przenikania ikaryny przez skórę. Jin i wsp. [440] wskazują na niską biodostępność ikaryny po podaniu doustnym, na poziomie 12 % oraz jej słabą absorpcję przez tkanki, które spowodowane są jej niską rozpuszczalnością w wodzie i zdolnością przenikania przez błony, skutkujące powolną szybkością rozpuszczania w płynach biologicznych. Jednocześnie wskazuje to na ograniczone możliwości zastosowań klinicznych. Bazując na tych danych oraz fizykochemicznych właściwościach ikaryny, w tym jej stosunkowo dużej masie cząsteczkowej wynoszącej 676,7 g/mol, niskiej rozpuszczalności w wodzie i słabej przenikalności przez błony, przewidywano, że wyniki aplikacji przekórnej również dadzą niskie wyniki biodostępności, dlatego już na początkowym etapie przygotowywania formułacji uwzględniono w niej środki zwiększające wchłanianie tzw. promotory przenikania. W wyjściowej formułacji, zawierającej ekstrakt z ziela *Epimedium Koreanum*, uzyskano procent uwalniania ikaryny na poziomie 15 % - 19 %. Dodatkowo w przygotowanej formułacji, zawierającej taką samą ilość czystej ikaryny, jaka znajdowała się w formułacji zawierającej ekstrakt z ziela uzyskano procent uwalniania ikaryny na poziomie 29 % - 35 % (Rys. 24). Zastosowanie żelowego nośnika (hydroksyetyloceluloza) umożliwiło na wprowadzenie do formułacji 70 % wag. wodnego ekstraktu z ziela *Epimedium Koreanum* przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej stabilności produktu, co wskazało na potencjał aplikacyjny miejscowego podania produktu na skórę. Badania uwalniania *in vitro* ikaryny z formułacji żelowej sugerują, że większą efektywność uwalniania substancji aktywnej można uzyskać po zastosowaniu czystej ikaryny niż tej pochodzącej z ekstraktu z ziela *Epimedium Koreanum*, co może wskazywać na konkurencyjne działanie innych substancji pochodzących z ekstraktu. Ekstrakty roślinne są mieszaninami wielu, często nawet setek różnych substancji, gdzie w ekstrakcie z *Epimedium Koreanum* zidentyfikowano ponad 260 związków chemicznych, niektórych pod względem struktury, bardzo podobnych do ikaryny, takie jak: epimedyny czy ikaryzydy, które konkurując ze sobą mogą utrudniać i zmniejszać uwalnianie pożądanego związku [441]. Pomimo niższej biodostępności formułacji zawierającej wspomniany ekstrakt, wyniki uwalniania substancji aktywnej (ikaryny) były wyższe niż przy podaniu doustnym (rezultaty otrzymane przez Jin i wsp.). Znacznie wyższe wyniki uwalniania ikaryny uzyskali Xu i wsp. [442], którzy wykazali, że nawet 70 % uwolnionego związku z formułacji zawierającej czystą substancję można było uzyskać poprzez odpowiednią modyfikację nośnika i wybór odpowiednich promotorów przenikania dla czystej substancji, wykazującej słabą

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

rozpuszczalność zarówno w wodzie, jak i w roztworach lipidów. Wyżej wymieniona grupa badawcza otrzymała nanożel, metodą odwróconej mikroemulsji, co dało bardzo obiecujący wynik w procesie uwalniania danej substancji aktywnej. Z uwagi na obecne restrykcje związane ze stosowaniem nanocząstek oraz „upakowanie” w jednej formulacji kilku składników aktywnych o różnym charakterze, powyższa propozycja nośnika wiązałaby się z utrudnionym procesem wdrożeniowym i możliwym uzyskaniem niezadowalających wyników przenikania pozostałych składników formulacji. W trakcie badań prowadzonych w ramach przekładnej pracy doktorskiej istotne było otrzymanie uniwersalnego nośnika, który będzie odpowiedni dla wszystkich substancji aktywnych, biorąc pod uwagę ich odmienny charakter i akceptowalny profil uwalniania. Przeprowadzona analiza uwalniania substancji aktywnej i wstępne badania nad produktami dały bardzo obiecujący obraz wspomaganego leczenia choroby zwyrodnieniowej stawów, jednakże zdolność penetracji skóry, zastosowanie i zwiększenie biodostępności, szczególnie w przypadku ikaryny, wymagają kontynuacji badań w celu zintensyfikowania terapeutycznego efektu ikaryny.

Rys. 24. Profil uwalniania *in vitro* ikaryny z masy kosmetycznej żelu chłodzącego



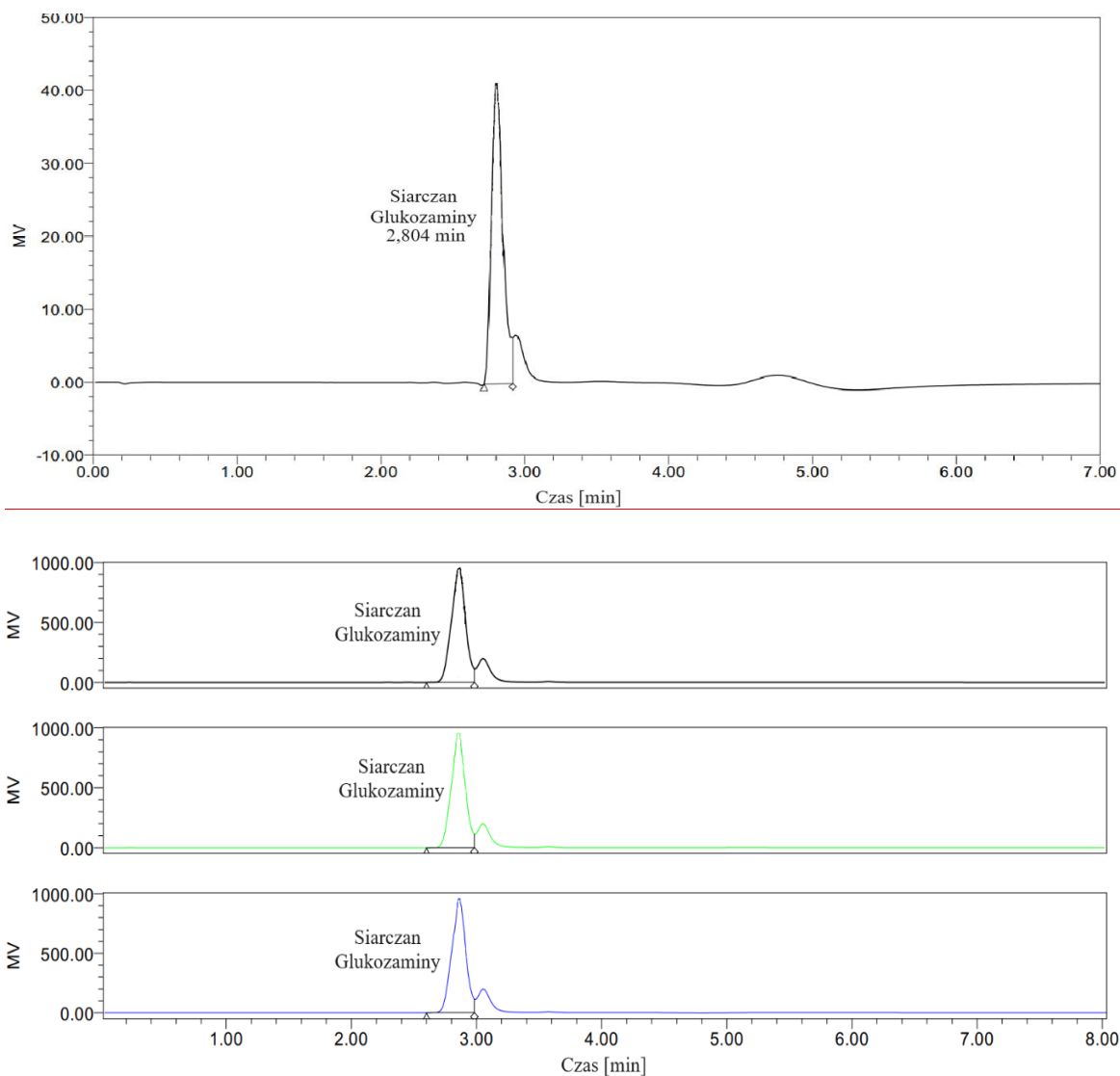
5.5.2. Przenikanie *in vitro* siarczanu glukozaminy w komorze Franz'a

W przeciwieństwie do ikaryny, siarczan glukozaminy jest substancją znacznie lepiej opisaną w literaturze naukowej oraz dostępnych jest więcej danych i badań na jej temat, co umożliwiło bardziej precyzyjny dobór warunków analizy przenikania. Dzięki hydrofilowemu charakterowi, siarczan glukozaminy cechuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, umożliwiającą jego łatwe wprowadzenie do podłoża o wysokiej zawartości fazy wodnej. Pozwoliło to zachować jego stabilność w wybranych nośnikach oraz uzyskać satysfakcjonujące wyniki zakumulowanej ilości dla wszystkich analizowanych formulacji. W pierwszej części badania porównano wpływ nośnika na przenikanie siarczanu glukozaminy oraz wpływ ilości siarczanu glukozaminy na profil uwalniania. Przedstawiono średnie wyniki przenikania *in vitro* siarczanu glukozaminy z wykorzystaniem komory Franz'a a następnie oznaczenia stężeń przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem współczynnika załamania światła (RID, RI) (Rys. 25). Z uwagi na fakt, iż siarczan glukozaminy nie posiada grup chromoforowych

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

umożliwiających oznaczenie przy pomocy standardowego detektora UV, konieczna byłaby derywatywacja związku, dlatego dla uproszczenia całej procedury wykorzystano detektor refraktometryczny, pozwalający na oznaczenie zawartości siarczanu glukozaminy w masie produktu na zasadzie różnic współczynnika załamania światła.

Rys. 25. Przykładowy chromatogram analizy z zastosowaniem HPLC-RID określający odpowiednio od góry zawartość wzorca (siarczanu glukozaminy) 0,4 mg/ml oraz siarczanu glukozaminy w masie produktu żelu chłodzącego odpowiednio 85,64 mg/ml, 85,37 mg/ml i 85,79 mg/ml



Najlepsze wyniki przenikania *in vitro* siarczanu glukozaminy otrzymano z wykorzystaniem stężenia 10 % wag. siarczanu glukozaminy (Tab. 30), które pokazały, że wyższe stężenie siarczanu glukozaminy pozwoliło otrzymać większe wartości zakumulowanej ilości tego składnika w przypadku formułacji zawierających dużą zawartość fazy wodnej (zarówno emulsji, jak i żelu). W przypadku maści, najwyższe wyniki przenikania uzyskano z formułacji zawierającej 5 % wag. siarczanu glukozaminy, a podwyższenie jej stężenia spowodowało nieznaczny spadek zakumulowanej ilości substancji aktywnej. Hydrofilowy charakter siarczanu glukozaminy i połączenie go z silnie

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

lipofilowym nośnikiem, obniżył wyniki przenikania, co wskazuje, że charakter nośnika i jego kompatybilność z substancją aktywną odgrywa kluczową rolę dla zdolności przenikania składników formułacji przez membrany.

Tab. 30. Wyniki badania przenikania *in vitro* siarczanu glukozaminy w komorze Franz'a

Średnia ilość zakumulowanej substancji aktywnej dla formułacji chłodzących zawierających 2 g siarczanu glukozaminy/100 g produktu						
Czas [h]	emulsja		żel		maść	
	[μg/cm ²]	[%]	[μg/cm ²]	[%]	[μg/cm ²]	[%]
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	45,00	2,25	132,00	6,60	0,00	0,00
2	104,00	5,20	152,50	7,63	12,00	0,60
3	236,00	11,80	213,50	10,68	64,50	3,23
4	335,00	16,75	229,00	11,45	84,00	4,20
5	355,00	17,75	294,50	14,73	107,50	5,38

Średnia ilość zakumulowanej substancji aktywnej dla formułacji chłodzących zawierających 5 g siarczanu glukozaminy/100 g produktu						
Czas [h]	emulsja		żel		maść	
	[μg/cm ²]	[%]	[μg/cm ²]	[%]	[μg/cm ²]	[%]
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	156,40	3,10	326,10	6,50	25,70	0,50
2	385,20	7,70	472,10	9,40	39,00	0,80
3	535,60	10,70	575,20	11,50	208,40	4,20
4	1046,40	20,90	810,70	16,20	270,90	5,40
5	1260,90	25,20	989,70	19,80	345,20	6,90

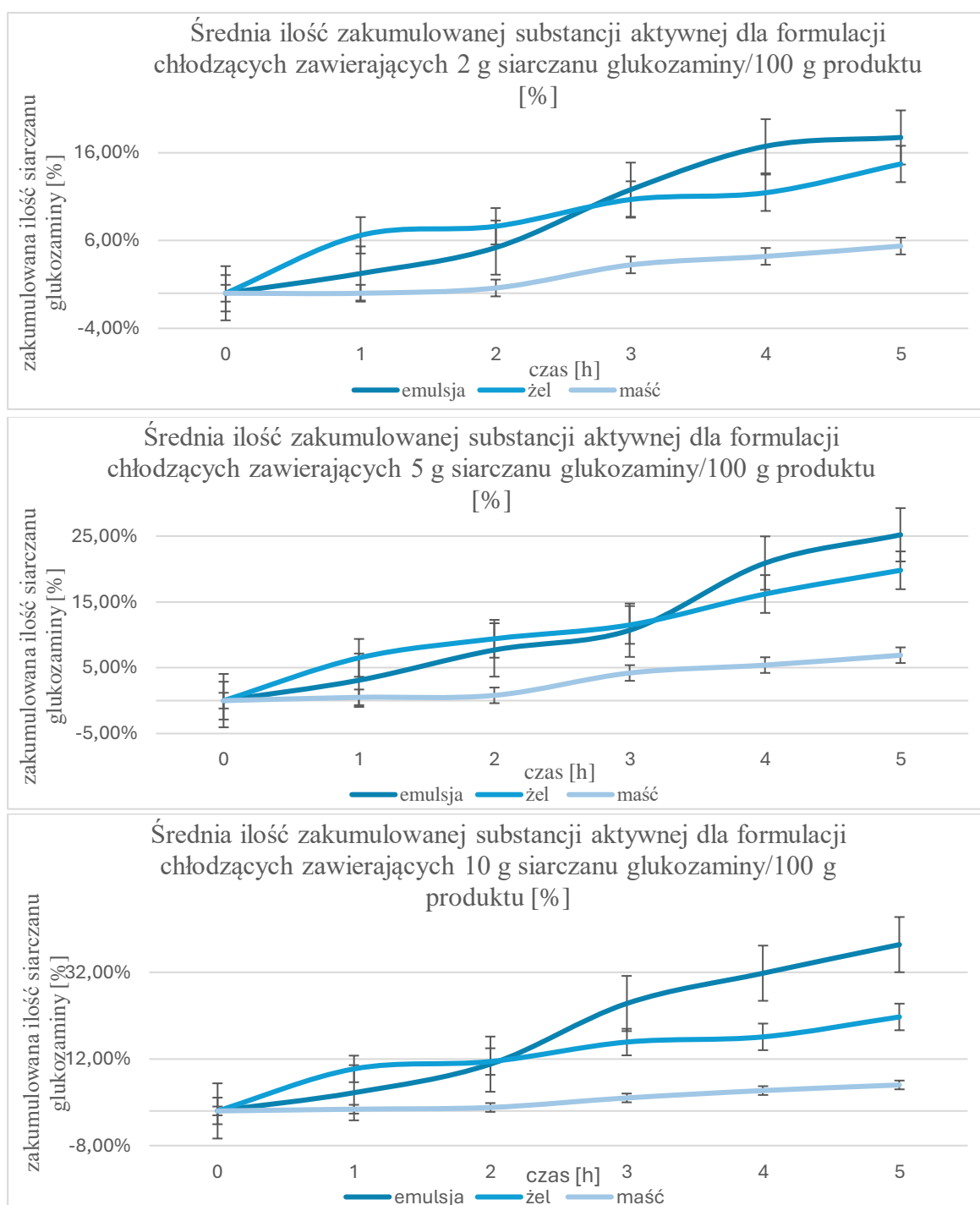
Średnia ilość zakumulowanej substancji dla formułacji chłodzących zawierających 10 g siarczanu glukozaminy/100 g produktu						
Czas [h]	emulsja		żel		maść	
	[μg/cm ²]	[%]	[μg/cm ²]	[%]	[μg/cm ²]	[%]
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	422,20	4,20	974,30	9,70	42,40	0,40
2	1083,10	10,80	1137,30	11,40	82,70	0,80
3	2479,50	24,80	1589,00	15,90	299,90	3,00
4	3179,20	31,80	1713,90	17,10	468,80	4,70
5	3838,10	38,40	2173,10	21,70	603,10	6,00

Badania przenikania formułacji zawierających wyższe stężenia siarczanu glukozaminy niż 10 % wag. nie były możliwe z uwagi na niestabilność formułacji. Zakumulowana ilość siarczanu glukozaminy podczas badania przenikania *in vitro* w komorze Franz'a po 5 godzinach wykazała średnio 38,4 % siarczanu glukozaminy dla kremu, 21,7 % dla żelu oraz 6,0 % dla maści. Dla wszystkich trzech stężeń siarczanu

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

glukozaminy (2 % wag, 5 % wag. i 10 % wag. siarczanu glukozaminy) uzyskano zbliżone profile uwalniania (Rys. 26). Początkowo siarczan glukozaminy uwalniał się z preparatu żelowego znacznie szybciej niż z emulsji, dając w krótszym czasie wyższe ilości składnika aktywnego. We wszystkich stężeniach (2 % wag, 5 % wag. i 10 % wag. siarczanu glukozaminy) między 2 i 3 godziną badania przenikania *in vitro* w komorze Franz'a szybkość przenikania siarczanu glukozaminy z formułacji emulsyjnej wzrosła z stosunku do formułacji w żelu dając ostatecznie nieco wyższe wyniki.

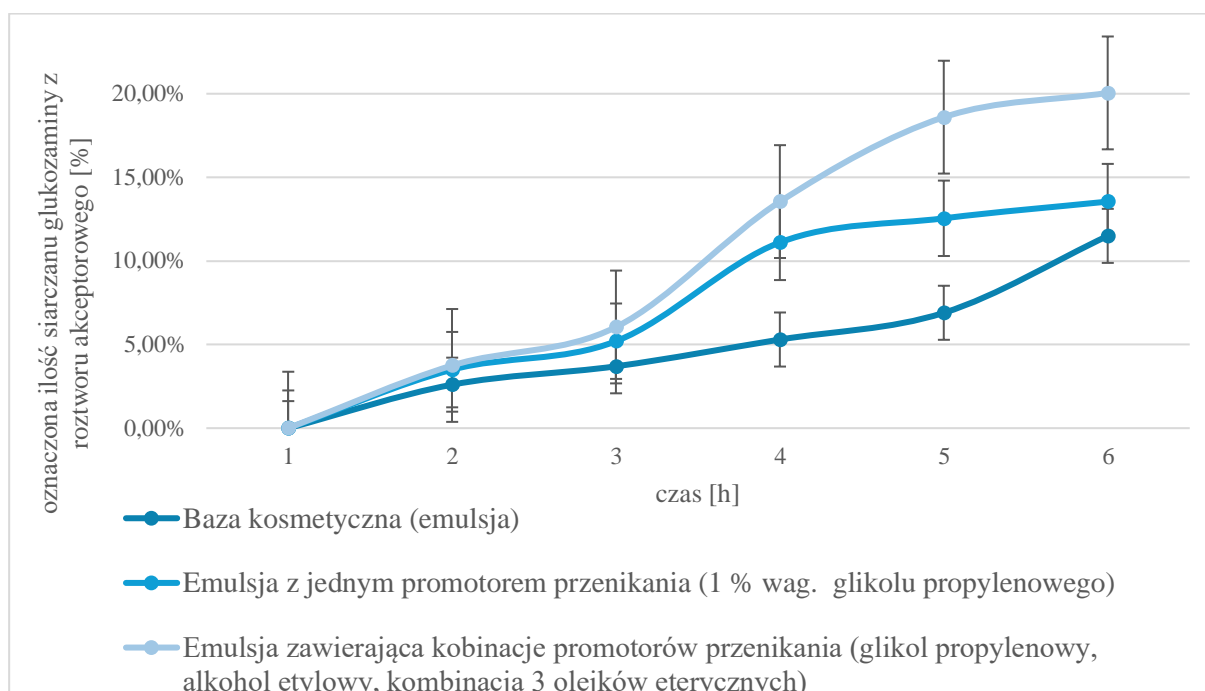
Rys. 26. Profile uwalniania siarczanu glukozaminy dla formułacji zawierających od 2,5 % wag. do 10 % wag. składnika aktywnego



WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Podobnie, jak w przypadku maści, wartości otrzymane dla żelu i emulsji mogą się wiązać z różnicami, jakie wynikają z właściwości baz wykorzystanych do otrzymania ostatecznego produktu. Emulsje, z uwagi na fakt obecności zarówno fazy tłuszczowej, jak i wodnej mają większe powinowactwo do skóry, niż preparaty składające się wyłącznie z fazy wodnej usieciowanej środkiem żelującym. Szybsze uwalnianie siarczanu glukozaminy z formułacji w formie żelu na początku badania mogło być związane z tym, że substancja czynna nie musiała rozdzielać się pomiędzy obie fazy i mogła natychmiast dyfundować przez membranę. Wyższe wartości przenikania siarczanu glukozaminy z formułacji kremu możliwe były ze względu na kombinację fazy olejowej i wodnej, które w połączeniu wykazują większe powinowactwo do skóry człowieka, niż czysta faza wodna żelu. Dzięki temu emulsje wykazują większą kompatybilność z lipofilowym charakterem skóry, co ostatecznie w niniejszym badaniu przełożyło się na uzyskanie korzystniejszego profilu przenikania substancji aktywnej dla produktów, dla których ma znaczenie ostateczne uzyskanie stężenie. W tym przypadku, pomimo wolniejszego uwalniania siarczanu glukozaminy na początku badania, ostatecznie uzyskano nieco wyższe stężenie końcowe. Bardziej progresywny profil uwalniania skutkuje dłuższym czasem działania wyższych stężeń składnika aktywnego, natomiast w przypadku produktów, dla których liczy się szybkość działania zdecydowanie korzystniejszy będzie wybór formułacji żelowej. Kombinacja promotorów przenikania o różnych mechanizmach działania, takich jak: glikol propylenowy, alkohol etylowy, kamfora, mentol i olejki eteryczne wykorzystane w opracowywanych produktach pozwoliła uzyskać stosunkowo wysokie wyniki przenikania glukozaminy w postaci siarczanu, które w najwyższym punkcie wynosiły średnio 38,4 %. Z uwagi na celowe wykorzystanie kombinacji promotorów, sprawdzono słuszność ich wykorzystania, a tym samym zbadano wpływ obecności popularnych promotorów przenikania na zdolność permeacyjną substancji. Równolegle przeprowadzono badania przenikania dla formułacji niezawierającej żadnego promotora przenikania (baza zawierająca dwa składniki aktywne, ikarynę i siarczan glukozaminy), oraz dla formułacji zawierającej dodatkowo 1 % wag. glikolu propylenowego, które porównano z wynikiem uzyskanym uprzednio dla formułacji zawierającej całą kombinację promotorów przenikania. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 27, który ewidentnie wskazuje na wyższość wykorzystania grupy promotorów. Zastosowanie jednego promotora przenikania wpłynęło na znaczącą poprawę zdolności permeacyjnych, natomiast formułacja składająca się wyłącznie z bazy kosmetycznej i składników aktywnych charakteryzowała się najniższą zdolnością przenikania przez membranę imitującą skórę.

Rys. 27. Wpływ promotorów przenikania na zdolność permeacyjną siarczanu glukozaminy na podstawie badań uwalniania *in vitro* z emulsji zawierającej 10 % wag. siarczanu glukozaminy



Obecnie dostępna jest cała gama rozmaitych membran imitujących skórę. Jednak do badań przenikania, FDA, sugeruje stosowanie membran polimerowych, takich jak: polisulfonowe, polietylosulfonowe, celulozowe i polidimetylosiloksanowe i ich pochodnych, które najlepiej odwzorowują właściwości oraz charakter skóry człowieka [443]. Wyżej wymienione membrany polimerowe są zazwyczaj obojętne, zarówno wobec skóry, jak i składników produktów kosmetycznych, nie utrudniają przenikania substancji aktywnych i zapewniają dobrą przepuszczalność [444]. Selekcja membrany imitującej skórę, do badań przenikania, jest istotnym czynnikiem warunkującym efektywność przenikania, pod względem kompatybilności nośnika z zastosowaną membraną. W celu przeprowadzenia badań przenikania *in vitro* ramach niniejszej pracy wybrano membrany syntetyczne, z uwagi na względy etyczne i ich dużą dostępność oraz stosunkowo niski koszt zakupu i utrzymania. Uzyskane wyniki badań dla żelu i kremu potwierdzają korzystny wpływ hydrofilowych membran, takich jak: membrany polisulfonowe czy celulozowe na wyniki przenikania. Obserwacje te potwierdzają, że rodzaj i właściwości membrany wpływają na szybkość uwalniania i ogólną akumulację miejscowych postaci dawkowania dając wyższe parametry przenikania niż w przypadku stosowania hydrofilowych membran w połączeniu z hydrofobowymi nośnikami, co wskazuje na istotność selekcji membran pod kątem ich powinowactwa do nośnika. W przypadku maści, zastosowanie błony lipofilowej, kompatybilnej z nośnikiem, prawdopodobnie umożliwiłoby uzyskanie dużo lepszych rezultatów, co potwierdzają także badania Lee i wsp [445], gdzie wskazano, że substancje lipofilowe wymagają specjalnego podejścia podczas badań przenikania. Niezależnie od ilości zalet jakimi cechują się membrany polimerowe, celulozowe czy polisulfonowe, wskazujących na łatwość ich pozyskiwania, przechowywania, użytkowania

i modyfikowania pod kątem rozmiaru czy składu, nie dają one pełnego obrazu interakcji zachodzących między produktem i ludzką skórą, z uwagi na ich jednorodny charakter i brak złożoności budowy jaka występuje w skórze [446]. Brak odzwierciedlenia oddziaływań pomiędzy elementami naskórka związany jest z niejednorodną strukturą skóry i rozbudowanym metabolizmem komórkowym, które są bardzo trudne do odtworzenia podczas projektowania i wytwarzania syntetycznych membran. Prawdłowo wykonany test *in vitro* uwalniania substancji aktywnych z nośnika może dostarczyć cennych informacji dotyczących potencjału substancji do przezskórnego przenikania i stanowić przesiewową metodę selekcji nośnika. Wykorzystanie błon syntetycznych, zamiast ludzkiej lub zwierzęcej skóry, pokazuje jedynie uwalnianie w czasie rzeczywistym, a nie realne przenikanie substancji czynnej, więc tego typu analizy nie zapewniają korelacji między wynikami badań *in vitro*, a realnym przenikaniem przezskórnym u ludzi. Inny aspekt opracowywania formułacji, który może mieć wpływ na wyniki przenikania stanowi sam proces produkcji masy kosmetycznej i jej przetwarzanie. Rodzaj i parametry procesu wytwarzania, takie jak: wysoka temperatura czy ciśnienie mogą mieć wpływ na stabilność składników aktywnych prowadząc do ich rozpadu. W takim przypadku skład preparatu i dobranie do niego właściwych parametrów procesu mają kluczowe znaczenie dla uzyskania efektywnego produktu. Formuła żelu do usieciowania zagęstnika wymagała dostarczenia ciepła i podgrzania masy do 55 °C co mogło wpłynąć na stabilność składników aktywnych, z kolei emulsja potrzebowała podwyższenia temperatury do 65 °C, do stopienia stałej części fazy olejowej, co zwiększało ryzyko rozkładu substancji aktywnych. Badanie oznaczenia zawartości składników aktywnych po procesie wytwarzania produktów nie wykazało zmiany zawartości siarczanu glukozaminy w stosunku do wartości początkowej, co świadczy o stabilności komponentów formułacji podczas procesu wytwarzania w podwyższonej temperaturze, potwierdzając, że w powyższych przypadkach oba procesy produkcyjne (zarówno dla emulsji, jak i żelu, nie miały wpływu na ostateczne stężenie składnika aktywnego w produkcie). Wolniejsze uwalnianie siarczanu glukozaminy w odniesieniu do formułacji w żelu można tłumaczyć obecnością środków powierzchniowo czynnych zmniejszających napięcie powierzchniowe między cząsteczkami emulsji oraz poprawiających zwilżanie powierzchni membrany, zwiększając tym samym powierzchnię kontaktu produktu z membraną, skutkując bardziej równomiernym i kontrolowanym uwalnianiem [447]. Oczywiście jest, że skóra pełni funkcję barierową, chroniąc przed wnikaniem wielu związków chemicznych. Selektywność skóry względem substancji chemicznych uwarunkowana jest przede wszystkim dużą różnorodnością gatunkową oraz hydrofobowym charakterem warstwy lipidowej, dlatego w celu uzyskania lepszych efektów działania wykorzystuje się promotory przenikania i inne czynniki zwiększające przezskórne przenikanie składników formułacji. Wykorzystana w tym badaniu kombinacja promotorów przenikania, które tymczasowo zmniejszają barierowość skóry poprzez chwilową destabilizację struktury dwuwarstwy lipidowej, pozwoliła na otrzymanie zadowalających wyników uwalniania substancji do płynu akceptorowego po drugiej stronie membrany. Istnieje wiele doskonałych promotorów przenikania takich jak np. dimetylosulfotlenek (DMSO), który jest jednym z najbardziej efektywnych związków zwiększających przenikanie przezskórne różnych leków, ale niestety w zastosowaniu kosmetycznym jest

zabroniony, dlatego w docelowych formulacjach wykorzystano jedynie substancje dopuszczone do stosowania w kosmetykach. Terpeny, na przykład mentol czy kamfora oraz terpenowe składniki olejków eterycznych, mogą zwiększać rozpuszczalność innych związków poprzez obniżanie temperatury topnienia składników w powstałej mieszaninie eutektycznej. Terpeny mogą także obniżać właściwości barierowe dwuwarstwy lipidowej naskórka, co również może mieć wpływ na wartości otrzymanych wyników. Wprowadzenie do formulacji alkoholu etylowego miało na celu zwiększenie możliwości przenikania substancji hydrofilowych. Alkohol etylowy w produktach kosmetycznych pełni funkcję czynnika wzmacniającego przenikanie poprzez wyplukiwanie składników lipidowych z warstwy rogowej naskórka oraz działa także jako nośnik dla innych substancji np. związków terpenowych, zwiększając ich przenikanie i poprawiając rozpuszczalność w tym szczególnie korzystnie wpływając na rozpuszczalność ikaryny [448], [449]. W wielu badaniach wykazano wpływ etanolu na zwiększenie przenikania związków hydrofilowych, który wiąże się z jednoczesnym zmniejszeniem permeacji związków lipofilowych [450], [451], jednak w przeciwieństwie do siarczanu glukozaminy, ikaryna jest bardzo specyficzną substancją wykazującą słabą rozpuszczalność, zarówno w wodzie, jak i w tłuszczach. Uwzględnienie dwóch głównych substancji aktywnych o różnych charakterach: hydrofilowego - siarczanu glukozaminy i hydrofobowej - ikaryny wymagało doboru promotorów przenikania, które pomogą wzmocnić przenikanie obu substancji bez negatywnego działania względem pozostałych składników aktywnych.

5.5.3. Przenikanie *in vitro* ikaryny w komorze Franz'a

W tabeli 31 przedstawiono średnie wyniki przenikania *in vitro* ikaryny z wykorzystaniem komory Franz'a a następnie oznaczenia stężeń przy pomocy HPLC-UV.

Tab. 31. Wyniki przenikania *in vitro* ikaryny z wykorzystaniem komory Franz'a

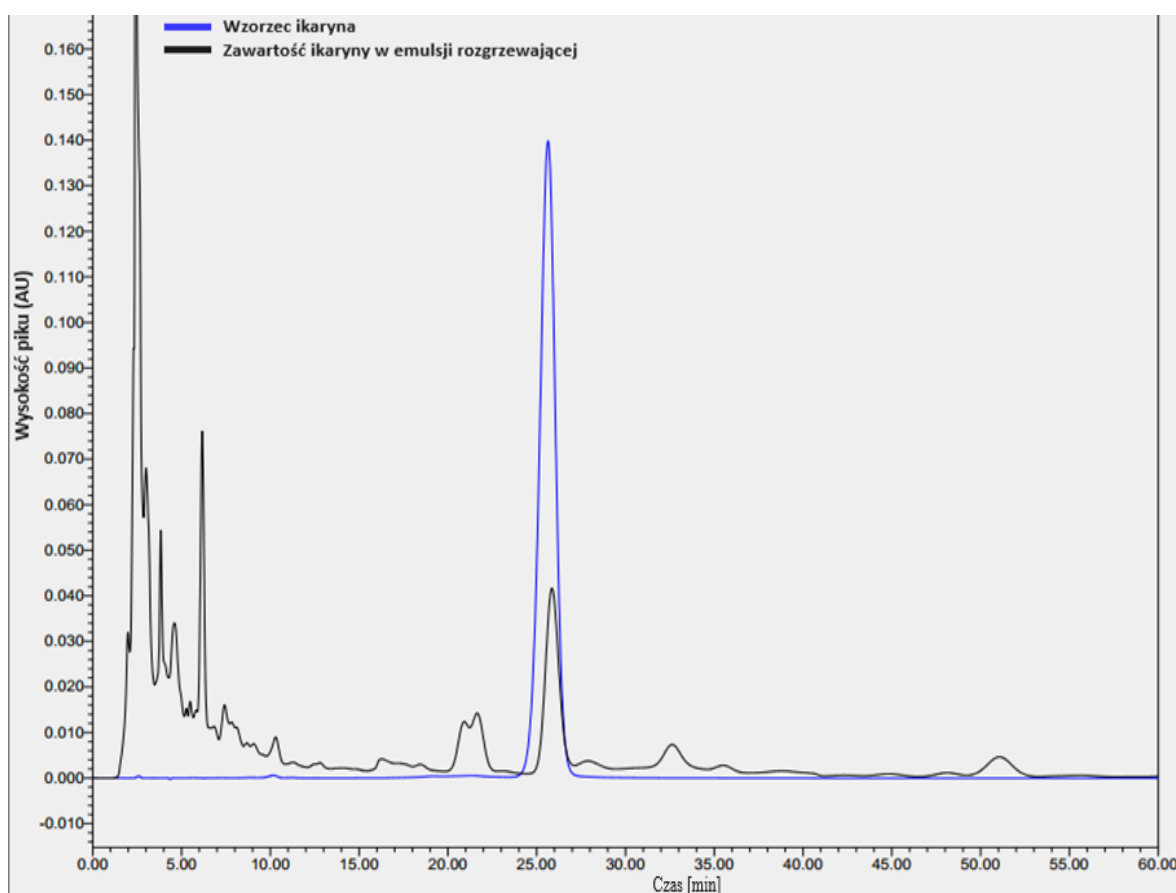
Czas [h]	EMULSJA		ŻEL		MAŚĆ	
	Średnia [ng/cm ²]	Średnia [%]	Średnia [ng/cm ²]	Średnia [%]	Średnia [ng/cm ²]	Średnia [%]
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	10,07	8,52	10,56	8,93	5,82	4,92
2	12,08	10,22	14,01	11,85	7,98	6,75
3	14,22	12,03	20,55	17,38	9,01	7,62
4	26,34	22,28	24,96	21,11	12,17	10,29
5	30,56	25,85	28,89	24,44	16,24	13,74

W oparciu o oznaczenie stężeń roztworów wzorca wyznaczono czas retencji ikaryny i krzywą kalibracyjną. Wysoki współczynnik korelacji R^2 (0,9998) potwierdza dobre dopasowanie krzywej wzorcowej do danych doświadczalnych, potwierdzający uzyskanie krzywej kalibracyjnej charakteryzującej się dobrą liniowością, co przy uzyskanej wartości RSD 0,1 % świadczy o wysokiej powtarzalności metody. Sprawdzone także, czy w formulacji nie występują inne związki o takim samym czasie retencji jak ikaryna, poprzez przeprowadzenie analizy dla formulacji, w której ekstrakt z *Epimedium Koreanum* został

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

zastąpiony wodą demineralizowaną. Wynik tej analizy potwierdził brak występowania w formulacji innych związków o zbliżonym czasie retencji. Na rysunku nr 28 przedstawiono porównanie chromatogramu wzorca z chromatogramem badanej próbki. Pokrywanie się czasów retencji wzorca i składnika znajdując się w badanej próbce wskazuje zgodność substancji, jak również stabilność ikaryny podczas procesu produkcji i jej przechowywania, potwierdzając brak wpływu temperatury procesu emulgowania (65 °C) na stabilność ikaryny. Ekstrakt z *Epimedium Koreanum* jest wieloskładnikową mieszaniną zawierającą oprócz ikaryny inne związki o zbliżonej budowie np. ikaryzydy czy epimedyny, które z uwagi na swoją podobną budowę mogą wykazywać zbliżone czasy retencji, na co może wskazywać obecność innych pików na chromatogramie w okolicy czasu retencji ikaryny.

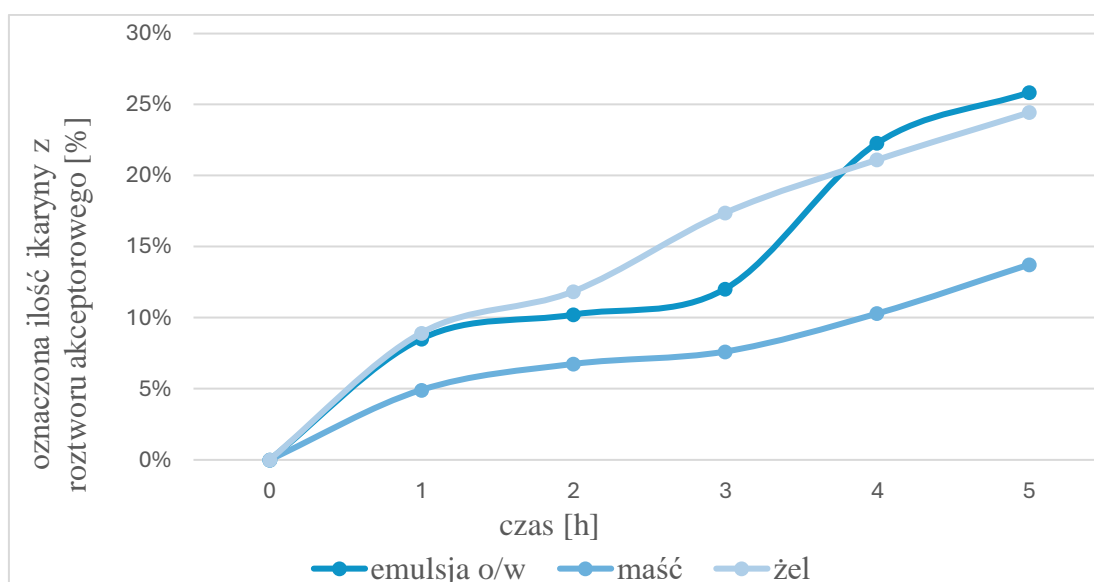
Rys. 28. Porównanie chromatogramu wzorca z chromatogramem badanej próbki



Uzyskane wyniki, o wartościach powyżej założonej wartości 20 % przenikania ikaryny, wskazują, że zarówno nośnik żelowy, jak i emulsyjny dają zadowalające wyniki przenikania *in vitro* przez membranę imitującą ludzką skórę. Formułacja w postaci maści, uzyskała najniższe wartości przenikania ikaryny przez membrany imitujące skórę, podobnie jak w przypadku badania przenikania siarczanu glukozaminy, co może wskazywać na znaczenie aspektów fizykochemicznych maści, które utrudniają przenikanie składników formulacji. W tym przypadku charakter substancji aktywnych miał raczej drugorzędowe znaczenie, bowiem oba składniki, pomimo, że znacząco różniły się od siebie hydrofilowością, dały zbliżone parametry przenikania w nośniku maściowym. Może to

wskazywać, że kluczową rolę dla zdolności permeacyjnych składników formułacji może odgrywać silnie lipofilowy charakter samego nośnika potwierdzający brak kompatybilności maści z obiema substancjami, a tym samym wpływając na utrudnione przenikanie i uwalnianie substancji aktywnych z podłoża. Słabsze uwalnianie ikaryny z maści może być związane z brakiem powinowactwa maści do substancji aktywnych, z uwagi na jej silnie hydrofobowy charakter, przez co nośnik może blokować składniki aktywne w swojej masie, nie dopuszczając do ich uwolnienia z produktu [452]. Otrzymane wyniki spowodowały wykluczenie formułacji w postaci maści z dalszych badań. Na rysunku nr 29 przedstawiono wykres zależności przenikania każdej z formułacji w czasie. Średni wynik przenikania ikaryny w ostatnim punkcie pomiarowym wynosił dla żelu 25,85 %, z maksymalną uzyskaną wartością 26,82 %, natomiast dla emulsji odpowiednio 24,44 %, z maksymalną wartością 24,75 %.

Rys. 29. Profil przenikania *in vitro* ikaryny przez membranę imitującą skórę w komorze Franz'a



Powyższe wyniki badania przenikania *in vitro* przez membrany imitujące skórę potwierdziły potencjał obu substancji w przenikaniu przez skórę, naśladując zastosowanie miejscowe, szczególnie w aplikacji poprzez nośnik w postaci żelu i maści. Co ciekawe, uzyskane wyniki dwóch niezależnych badań dla obu substancji, wykazały zbliżone profile uwalniania substancji aktywnych do medium akceptorowego, sugerując że odmienna rozpuszczalność obu związków chemicznych, nie miała w tym przypadku istotnego wpływu na zdolność substancji do przenikania. W obu badaniach przenikania, zarówno ikaryny, jak i siarczanu glukozaminy wykorzystano dokładnie takie same nośniki (maść, żel i emulsję) oraz takie same promotory przenikania (glikol propylenowy, alkohol etylowy, kombinacja 3 olejków eterycznych), co może wskazywać na istotność właściwości nośnika i składu formułacji bazowej, ze szczególnym uwzględnieniem czynników ułatwiających przenikanie, na uwalnianie substancji z nośnika i ich przenikanie przez membrany imitujące skórę. W przypadku obu substancji (zarówno ikaryny, jak i siarczanu glukozaminy), dla formułacji w postaci żelu uzyskiwano, w początkowym etapie, szybsze uwalnianie obu

składników aktywnych (ikaryna, siarczan glukozaminy) w stosunku do formulacji w postaci emulsji. Tendencja ta uległa odwróceniu dla ikaryny po ok. 3,5 h oraz dla siarczanu glukozaminy pomiędzy 2 a 3 godziną badania, w zależności od stężenia składnika aktywnego (2 % wag. – 10 % wag). Ostateczna, końcowa zawartość zakumulowanego składnika aktywnego w badaniach przenikania była zbliżona dla obu nośników, więc profil uwalniania każdej z wyżej wymienionych substancji stanowił podstawę do wyboru nośnika dla opracowywanych produktów. Założeniem pracy było opracowanie produktów kosmetycznych wspomagających proces leczenia, zarówno choroby zwyrodnieniowej, jak i kontuzji stawowych, jednakże z uwagi na odmienne podejście w regeneracji każdego z nich, wymagane jest stworzenie produktów o odmiennych właściwościach termicznych. Pomocne w tym przypadku mogą być również profile uwalniania składników aktywnych z powyższych formulacji. Kontuzje stawowe są związane z nagle wywołanymi stanami zapalnymi w obrębie tkanek stawów i kości, dlatego w tym przypadku ważniejsza jest szybkość działania niż minimalna różnica w ostatecznej zawartości zakumulowanej substancji aktywnej. Dodatkowo, w przypadku kontuzji zalecana jest terapia zimnem, dlatego faworyzowane są składniki o działaniu chłodzącym, które jednocześnie są antagonistami receptorów bólowych blokując przesyłanie sygnałów o bólu [453]. W związku z powyższym dla produktu przeznaczonego do pielęgnacji skóry po urazach i kontuzjach wybrana została formulacja w formie żelu, dająca znacznie wyższe wyniki uwalniania substancji aktywnej w pierwszych 2 godzinach badania. Choroba zwyrodnieniowa stawów wymaga odmiennego podejścia z uwagi na fakt, że jest to choroba chroniczna i progresywna. W przypadku produktu przeznaczonego do pielęgnacji skóry w obrębie stawów objętych chorobą zwyrodnieniową, korzystniejsze wydaje się być zastosowanie wolniejszego początkowego uwalniania substancji aktywnej, jednak ostatecznie dającego najwyższe stężenia dostarczanych składników aktywnych. Dodatkowo wskazuje się na efekty terapeutyczne terapii ciepłem, które ma działanie pobudzające mikrokążenie i aktywujące procesy naprawcze, a dodatkowo jest najchętniej wybieraną formą termoterapii wśród osób cierpiących na zwyrodnienia [454]. W związku z powyższym dla produktu dedykowanego dla osób zmagających się z OA zaproponowano formulację w formie emulsji z dodatkowym efektem rozgrzewającym.

5.6. Optymalizacja procesu otrzymywania formulacji i podniesienie skali jej wytwarzania w skali półtechnicznej

Wybór formy aplikacyjnej pozwolił na dopracowanie końcowych formulacji obu produktów i rozpoczęcie badań wdrożeniowych. W pierwszej kolejności konieczne było podniesienie skali wytwarzania, zarówno masy żelu, jak i emulsji oraz optymalizacja całych procesów wytwarzania, aby zapewnić niezmiennosc pożądanych parametrów względem formulacji wyjściowych oraz brak wpływu procesu na stabilność gotowego wyrobu i poszczególnych składników aktywnych. Pierwotne formulacje opracowane były w ilości 100 g, natomiast podniesienie skali wytwarzania formulacji odbywało się stopniowo od skali laboratoryjnej (500 g) do skali półtechnicznej 50 000 g - 150 000 g, aby uniknąć dużej straty masy surowców w razie niepowodzenia. Optymalizacja procesu otrzymywania produktów,

poprzez poznanie wpływu parametrów procesu na właściwości otrzymanej masy kosmetycznej procesu, pomaga osiągnąć powtarzalność wytwarzania, która jest kluczowa podczas przemysłowych aplikacji na rynku kosmetycznym czy farmaceutycznym. Brak lub niewłaściwa optymalizacja może przyczynić się do wzrostu kosztów produkcji [455]. Wpływ zmiennych (prędkości i czasu mieszania/homogenizacji, temperatury procesu) zależy od stosowanych składników, typu procesu oraz wykorzystywanej aparatury, jednakże właściwe ich dopasowanie pozwala sterować wielkością kropeł fazy wewnętrznej czy innymi właściwościami reologicznymi otrzymywanych układów [456]. Optymalizacja procesu wytwarzania formułacji kosmetycznych gwarantuje także skuteczność produktu poprzez zapewnienie stabilności, zarówno masy kosmetyku, jak i poszczególnych składników aktywnych, a także poprzez osiągnięcie jednorodności i takich samych parametrów fizykochemicznych masy w całej jej objętości. Optymalizacja może dotyczyć każdego etapu procesu produkcyjnego, przy czym najczęściej wybiera się te, które w największym stopniu mogą wpływać na właściwości masy produktu i ostateczny efekt wytwarzania, czyli zaczynając od samego doboru składników formułacji przez mieszanie, homogenizację, podgrzewanie, mielenie czy nalewanie. Dobór parametrów optymalizacji zależy od możliwości technologicznych zakładu produkcyjnego oraz aparatury produkcyjnej jaką on dysponuje i obejmuje sprawdzenie różnych wariantów w celu wyboru najkorzystniejszego pod kątem ekonomicznym i jakościowym. Dodatek energii do układu pozwala wytworzyć większą powierzchnię na granicy faz, dlatego wszelkie urządzenia zdolne do szybkiego przekazywania dużej ilości energii są wykorzystywane do tworzenia emulsji o konkretnych wielkościach kropeł fazy wewnętrznej [457]. Odtwarzanie formułacji na różnych sprzętach z wykorzystaniem innej aparatury produkcyjnej, nawet przy zachowaniu tego samego składu formułacji i parametrów procesowych nie daje gwarancji uzyskania masy spełniającej kryterium akceptacji i może się znacząco różnić od prototypu. Wskazuje się nawet, że zmiana choćby typu mieszadła lub jego geometrii ma znaczący wpływ na średnicę kropeł i właściwości lepko-sprężyste układu [458]. Dostępne badania wskazują także na istotność szybkości mieszania, gdzie zwiększenie prędkości obrotowej mieszadła obniża średnią wielkość kropli fazy wewnętrznej [457]. Dodatkowo podczas produkcji wyrobów, dla których lepkość jest kluczowym parametrem sensorycznym lub jej konkretne wartości warunkują proces rozlewania, podczas optymalizacji warto zwrócić uwagę, czy występuje zależność pomiędzy lepkością, a szybkością ścinania i czy mamy do czynienia z układami zagęszczanymi lub rozrzedzanymi ścinaniem. Kolejnym parametrem o dużym znaczeniu podczas optymalizacji jest czas trwania danego etapu, którego wydłużenie do pewnego momentu wpływa na zwiększenie stabilności emulsji, jednak po jego przekroczeniu, nie dochodzi już do żadnych zmian w średnicy i rozkładzie kropeł [459].

Dla każdej formułacji przeprowadzono następującą optymalizację: dla żelu – obu etapów procesu mieszania (Tab. 32), a dla emulsji - procesu homogenizacji (Tab. 33). W pierwszym przypadku optymalizacja obejmowała sprawdzenie i porównanie wpływu parametrów mieszania, ilości obrotów na minutę oraz czasu mieszania na rozprowadzenia składnika żelującego. W drugim etapie porównano te same parametry, jednakże w odniesieniu do rozkładu składników aktywnych. Celem optymalizacji procesu było zapewnienie w całej objętości produktu jednorodności i jak najmniejszego zapowietrzenia

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

masy kosmetycznej, bez widocznych konglomeratów składnika żelującego, dlatego porównano wpływ czasu trwania etapu mieszania i prędkości obrotowej.

Tab. 32. Analiza procesu mieszania prędkości obrotowej mieszadła i zapowietrzenia

ETAP 1			
Prędkość mieszania [rpm]	Czas trwania procesu [min]	Uwagi	
20	3	Widoczne duże konglomeraty zagęstnika, brak zapowietrzenia masy	
	6	Widoczne duże konglomeraty zagęstnika, brak zapowietrzenia masy	
	9	Widoczne drobne konglomeraty zagęstnika, brak zapowietrzenia masy	
35	3	Widoczne konglomeraty zagęstnika, brak zapowietrzenia masy	
	6	Widoczne konglomeraty zagęstnika, brak zapowietrzenia masy	
	9	Widoczne drobne pojedyncze konglomeraty zagęstnika, brak zapowietrzenia masy	
50	3	Widoczne drobne konglomeraty zagęstnika, brak zapowietrzenia masy	
	6	Jednorodny transparentny żel, brak zapowietrzenia	
	9	Jednorodny transparentny żel, delikatne zapowietrzenie masy	
63	3	Widoczne drobne konglomeraty zagęstnika, lekko zapowietrzona masa produktu	
	6	Jednorodny żel zagęstnika, widocznie zapowietrzona masa produktu	
	9	Jednorodny żel, znaczne zapowietrzenie masy	
ETAP 2			
Prędkość mieszania [rpm]	Czas trwania etapu procesu [min]	Uwagi	RSD % zawartości siarczanu glukozaminy [%]
20	4	Brak zapowietrzenia	0,543781
	8	Brak zapowietrzenia	0,217762
	12	Brak zapowietrzenia	0,074031
35	4	Brak zapowietrzenia	0,263153
	8	Brak zapowietrzenia	0,099922
	12	Brak zapowietrzenia	0,061938
50	4	Brak zapowietrzenia	0,053254
	8	Brak znaczącego zapowietrzenia, widoczne pojedyncze bąble powietrza	0,003456
	12	Widoczne delikatne zapowietrzenie masy	0,003621
63	4	Pojedyncze bąble powietrza	0,027309
	8	Widoczne znaczne zapowietrzenie masy	0,001655
	12	Widoczne znaczne zapowietrzenie masy	0,002977

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Proces wprowadzania zagęstnika był nieskuteczny w przypadku wszystkich czasów dla prędkości obrotowych 20 rpm i 30 rpm. W każdym przypadku uzyskano nierozpuszczone skupiska składnika żelującego. Dla prędkości 50 rpm, przy czasie mieszania 6 minut, udało się uzyskać pożądany efekt równomiernego rozprowadzenia zagęstnika bez nadmiernego zapowietrzenia masy. Duże zapowietrzenie masy, z doświadczenia zakładu produkcyjnego, w którym prowadzone są badania, może zaburzać proces rozlewania masy do opakowań docelowych, poprzez zmianę lepkości i gęstości masy, co może skutkować napełnianiem innej pojemności niż była zadana, lub przepełnieniem butelek, w których dana objętość nie może się zmieścić. Jeśli niemożliwe jest uniknięcie zapowietrzenia masy podczas produkcji, konieczne jest wcześniejsze sezonowanie masy w celu jej odpowietrzenia. Dłuższy czas i wyższe prędkości mieszania pomimo dobrego rozprowadzenia zagęstnika znacząco nasilały zapowietrzenie masy i zwiększały niepotrzebne zużycie energii. W drugim etapie procesu sprawdzono zapowietrzenie i rozkład składnika aktywnego w całej objętości wytwarzanej masy. Siarczan glukozaminy jest związkiem nieposiadającym ugrupowania chromoforowe, nie jest zdolny do absorbowania promieniowania w zakresie UV-VIS, dlatego oznaczenie HPLC z detektorem UV nie byłoby możliwe, bez uprzedniej derywatywacji związku. Dla uproszczenia procedury oznaczania wykorzystano HPLC z detektorem refraktometrycznym (RID, ang. Refractive Index Detector), oznaczającym współczynnik załamania światła dla mieszanin jednorodnych, pozwalającym na ocenę stężenia siarczanu glukozaminy w odniesieniu do współczynnika załamania światła roztworów wzorcowych.

Brak zapowietrzenia uzyskano z wykorzystaniem prędkości mieszania 20 rpm i 30 rpm, natomiast w obu przypadkach, przy wszystkich czasach mieszania, wyniki pomiaru zawartości siarczanu glukozaminy zbyt znacząco się od siebie różniły (zbyt wysokie RSD % zawartości siarczanu glukozaminy), co świadczyło o nierównomiernym rozkładzie siarczanu glukozaminy w całej objętości produkowanej masy. Najkorzystniejszą kombinację parametrów zawartości i mieszania uzyskano przy mieszaniu 50 rpm przez 8 minut dających równomierne rozmieszczenie siarczanu glukozaminy przy minimalnym zapowietrzeniu masy.

W przypadku emulsji przeprowadzono jedynie optymalizację procesu homogenizacji. Homogenizacja masy była umiejscowiona w czasie po dodaniu wszystkich składników aktywnych, więc w przypadku otrzymania równomiernego rozkładu ich zawartości w masie, dalsze mieszanie nie powodowało już dalszych zmian. W przypadku emulsji jako parametr optymalizacyjny, przyjęto średnicę kropeł fazy rozproszonej emulsji oraz zawartość siarczanu glukozaminy. Pożądane było uzyskanie emulsji o jak najbardziej jednolitej średnicy wszystkich kropeł o wartościach poniżej 10 μm . Zmniejszenie średnicy kropeł fazy wewnętrznej powodowane jest działaniem sił ścinających wywołanych działaniem homogenizatora. Homogenizatory są urządzeniami o dużej mocy, wykorzystującymi technologię rotor-stator, w której duża prędkość obrotowa rotora wymusza silne zasysanie cieczy przez otwory w głowicy homogenizatora, gdzie cząsteczki masy ulegają silnemu mieszanemu i rozdrobnieniu. Wyniki badań przedstawione w tabeli 33 wskazują, że proces homogenizacji przy prędkości 3000 rpm zapewnił wystarczające mieszanie składników aktywnych, a proces mieszania służył jedynie wprowadzeniu do masy konserwantów, dlatego nie była wymagana jego optymalizacja.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Tab. 33. Wyniki optymalizacji procesu homogenizacji emulsji rozgrzewającej

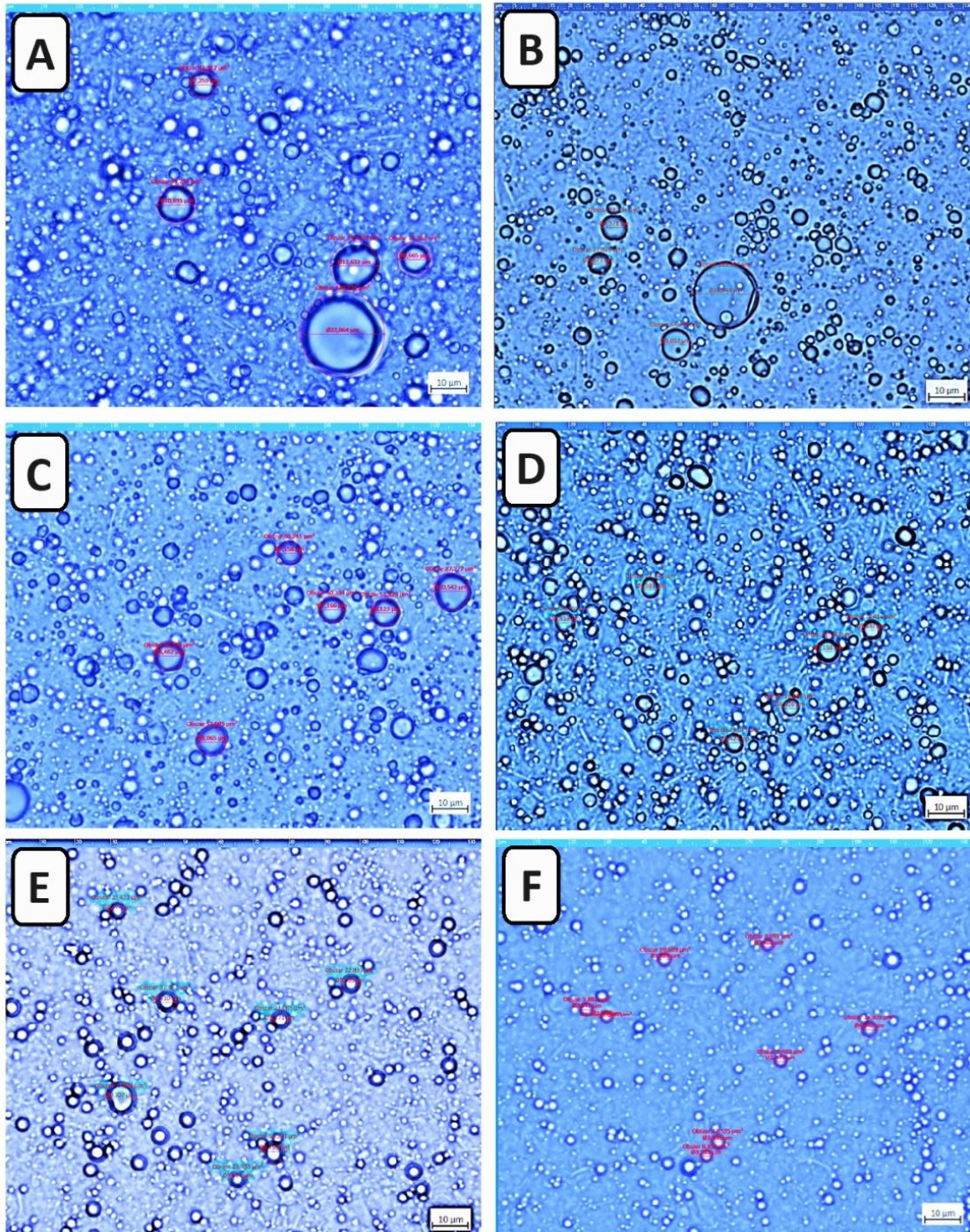
Prędkość homogenizacji [rpm]	Czas trwania procesu [min]	Wielkość cząstek [μm]	Uwagi	RSD % zawartości siarczanu glukozaminy [%]
1000	1	<23,864	Duża różnica wielkości kropeł, widoczne konglomeraty	0,457323
	3	<19,115	Duża różnica wielkości kropeł	0,263768
	5	<15,647	Duża różnica wielkości kropeł	0,135682
1500	1	<18,949	Duża różnica wielkości kropeł, widoczne konglomeraty	0,369970
	3	<15,439	Duża różnica wielkości kropeł, widoczne konglomeraty	0,223920
	5	<13,004	Duża różnica wielkości kropeł, widoczne konglomeraty	0,068064
2000	1	15,219	Duża różnica wielkości kropeł, widoczne konglomeraty	0,108387
	3	<10,542	Duża różnica wielkości kropeł, widoczne konglomeraty	0,074259
	5	<9,891	Nieznaczące różnice wielkości kropeł, widoczne pojedyncze konglomeraty	0,065140
2500	1	<14,176	Duża różnica wielkości kropeł	0,072939
	3	<7,158	Nieznaczące różnice wielkości kropeł, widoczne pojedyncze konglomeraty	0,002079
	5	-	Emulsja wizualnie niestabilna, rozdzielanie faz	0,002073
3000	1	<9,707	Nieznaczące różnice wielkości kropeł, brak istotnych konglomeratów	0,036306
	3	<4,640	Zbliżona wielkość wszystkich cząstek, jednorodna masa pod kątem wielkości, krople nie tworzą istotnych konglomeratów	0,000953
	5	-	Emulsja wizualnie niestabilna, rozdzielanie faz	0,001635

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Warto też zwrócić uwagę, że przy wysokich prędkościach, od 2500 rpm, długotrwała homogenizacja prowadziła do destabilizacji układu i rozdziału faz emulsji. Z kolei zbyt krótka homogenizacja nie pozwalała na uzyskanie jednorodności średnicy kropeł fazy wewnętrznej, a duże różnice w ich średnicach mogą prowokować tworzenie większych konglomeratów i ich koalescencję, prowadząc do destabilizacji całego układu. W tym przypadku poszukiwane były parametry homogenizacji pozwalające na otrzymanie stabilnej emulsji o jak najmniejszej średnicy cząstek przy jednocześnie równomiernym rozkładzie badanego składnika aktywnego, co pozwoliło na wybranie prędkości homogenizacji wynoszącej 300 rpm i czasu jej trwania 3 minuty. Na rysunku 30 przedstawiono wybrane zdjęcia obrazu mikroskopowego emulsji uzyskanych z wykorzystaniem różnych parametrów technologicznych procesu homogenizacji, przedstawiające wpływ czasu i prędkości homogenizacji na rozmiar kropeł. Wybrane parametry homogenizacji poprzez stopniowe zmniejszanie średnicy cząstek pozwoliły uzyskać średnicę kropeł poniżej 5 μm , zachowując stabilność masy i brak skupisk poszczególnych kropeł dając ich równomierne rozmieszczenie. Wyniki badań wskazują, że zarówno wzrost prędkości homogenizacji, jak i jej czasu wpływają na zmniejszenie średnicy cząstek emulsji, do momentu, po którym zostaje zachwiana stabilność układu.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Rys. 30. Wpływ parametrów homogenizacji na wielkość i rozkład kropeł fazy wewnętrznej emulsji: A - 1 min/1000 rpm; średnica największej kropli 23,864 μm , B - 1 min/1500 rpm; średnica największej kropli 18,949 μm , C - 3 min/2000 rpm; średnica największej kropli 10,542 μm , D - 3 min/2500 rpm; średnica największej kropli 7,158 μm , E - 1 min/3000 rpm; średnica największej kropli 9,707 μm , F - 3 min/3000 rpm; średnica największej kropli 4,640 μm



5.7. Zaprojektowanie pakietu badań wdrożeniowych dla opracowanych produktów kosmetycznych

Przed wdrożeniem produktów kosmetycznych na rynek konieczna jest ocena bezpieczeństwa ich stosowania, w związku z czym produkty poddawane są szeregowi testów i badań oceniających potencjalne zagrożenia, które mogłyby wpłynąć na zdrowie konsumentów. Szybki rozwój rynku kosmetycznego w ostatnich latach przyczynił się do opracowania regulacji prawnych dotyczących wdrażania nowych kosmetyków na rynek, ich kwalifikacji oraz bezpieczeństwa. Obecny stan wiedzy, nowoczesne badania i postęp w dziedzinie chemii kosmetycznej i farmaceutycznej pozwalają na ciągłe wprowadzanie zmian w obowiązujących dokumentach i ich aktualizowanie zgodnie z aktualnym stanem wiedzy z zakresu bezpieczeństwa składników i zakresu ich stosowania, dlatego niezwykle ważne jest ciągłe śledzenie postępów prac nad nowymi zmianami. Pozwala to uniknąć wprowadzenia produktu na rynek, który w niedługim czasie będzie musiał być zmieniony lub wycofany, jednocześnie chroniąc producenta przed stratą czasu i pieniędzy przeznaczonych na badania. Obecnie obowiązującym dokumentem jest Rozporządzenie 1223/2009 Parlamentu Europejskiego i Rady Europy z dnia 30 listopada 2009 r., obligujące producentów do przeprowadzenia badań mikrobiologicznych (w tym czystości mikrobiologicznej i zakonserwowania produktu), badań stabilności, badań dermatologicznych, badań aplikacyjnych potwierdzających wszystkie deklaracje marketingowe oraz opracowania raportu bezpieczeństwa wraz z analizą toksykologiczną. Wszystkie badania i analizy zostały przeprowadzone, zarówno dla żelu chłodzącego, jak i emulsji rozgrzewającej. Pozytywne wyniki każdego z badań nie gwarantują jednak całkowitego bezpieczeństwa produktu i mimo uzyskania możliwości wprowadzenia produktu na rynek nie można wykluczyć wystąpienia działań niepożądanych i skutków ubocznych stosowania kosmetyku, takich jak: podrażnienie, zaczerwienienie czy reakcje alergiczne, które są specyficzne dla każdej osoby i dotyczą ok. 10 % populacji [460]. Projektując pakiet badań wdrożeniowych konieczne jest wzięcie pod uwagę docelowej grupy odbiorców i kryteriów akceptacji jakie ją obowiązują, oraz rozważenie wszystkich niebezpieczeństw jakie może nieść ze sobą stosowanie na skórę. Kombinacja składników danego produktu oraz jego przeznaczenie warunkują dobór grupy ochotników do badań wdrożeniowych pod kątem ich specyficznych cech osobniczych oraz dobór parametrów badań pozwalających na uzyskanie rzetelnych wyników.

5.7.1. Badania mikrobiologiczne

Badania mikrobiologiczne są jednym z podstawowych narzędzi oceny bezpieczeństwa produktu, gdyż obecność nadmiernej ilości mikroorganizmów w kosmetykach może powodować ich psucie, destabilizację układu, dezaktywację składników aktywnych produktu, zmianę zapachu, koloru, wyglądu czy konsystencji [461]. Dodatkowo, obecność chorobotwórczych bakterii, drożdży czy pleśni i ich metabolitów stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Pomimo znacznego rozwoju branży kosmetycznej i produkcyjnej wciąż zdarzają się przypadki skażenia produktów, najczęściej

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

mikroorganizmami: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, a także należącymi do gatunku *Enterococcus Spp.*, *Enterobacter Spp.*, *Serratia Spp.*, *Klebsiella Spp.* i wielu innych [462]. Do skażenia mikrobiologicznego produktu może dochodzić już na etapie produkcji i są to skażenia pierwotne oraz w czasie użytkowania produktu, określane jako skażenia wtórne. Aby zapobiegać skażeniom pierwotnym wszyscy producenci są zobligowani do przestrzegania wymagań sanitarnych i higienicznych, które wraz z pozostałymi parametrami kontroli jakości, tworzą zespół zasad określonych jako Dobra Praktyka Produkcyjna (ang. Good Manufacturing Practice – GMP) [130]. GMP narzuca ciągle monitorowanie i dokumentowanie czystości mikrobiologicznej surowców wyjściowych, wody produkcyjnej, półproduktów i gotowego wyrobu a także środowiska produkcyjnego, w tym czystości powietrza, urządzeń, opakowań oraz personelu. Wdrożenie restrykcyjnych procedur i prowadzenia dokumentacji dotyczącej higieny pracy, mycia, dezynfekcji i kontroli jakości zapewnia zachowanie powtarzalności oraz jednorodności produktów poprzez kontrolę całego procesu produkcji włączając nadzór nad łańcuchem dostaw i późniejsze magazynowanie produktu, począwszy od zamówienia surowców, przez wytwarzanie, pakowanie, znakowanie, etykietowanie i magazynowanie gotowego produktu. W przeciwieństwie do zanieczyszczeń pierwotnych, których można uniknąć przestrzegając GMP, grupa zanieczyszczeń wtórnych dotyczy skażenia produktu już w trakcie jego użytkowania, najczęściej przez konsumenta, lub środowisko w jakim produkt jest przechowywany, dlatego producent nie jest w stanie przewidzieć na co narażony może być produkt. W celu ochrony kosmetyków przed zakażeniami wtórnymi, producenci stosują środki konserwujące, których zadaniem jest neutralizowanie wszelkich zanieczyszczeń mikroorganizmami i redukować ich wzrost w przypadku skażenia produktu. Dla ochrony konsumentów monitorowana jest, zarówno czystość mikrobiologiczna produktów, jak i zdolność układu konserwującego do ochrony produktu przed zanieczyszczeniami wtórnymi.

Tab. 34. Wyniki badania czystości mikrobiologicznej

Badanie	Metoda	Kryterium*	Wynik emulsja rozgrzewająca	Wynik żel chłodzący
Liczba mezofilnych mikroorganizmów tlenowych (bakterie i grzyby)	PN-EN ISO 21149:2017-07	$\leq 1 \times 10^3$ jtk/g	<10 jtk/g	<10 jtk/g
Liczba pleśni i drożdży	PN-EN ISO 16212:2017-08	$\leq 1 \times 10^3$ jtk/g	<10 jtk/g	<10 jtk/g
Obecność <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PN-EN 22717:2016-01	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g
Obecność <i>Staphylococcus aureus</i>	PN-EN ISO 22718:2016-01	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g
Obecność <i>Escherichia coli</i>	PN-EN ISO 21150:2016-01	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g
Obecność <i>Candida albicans</i>	PN-EN ISO 18416:2016-01	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g

*Kryterium zależne od przeznaczenia produktu kosmetycznego, wynika z PN-EN 17516:2014-11

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Wynik czystości mikrobiologicznej dla obu badanych produktów (emulsji rozgrzewającej i żelu chłodzącego), przedstawiony w tabeli 34, nie wykazał odchylenia od dopuszczalnej liczby mezofilnych mikroorganizmów tlenowych, drożdży czy pleśni, jak również nie zaobserwowano obecności żadnego z testowanych szczepów patogennych, co ewidentnie wskazuje na czystość użytych surowców, prawidłowość procesu produkcyjnego oraz zachowywania wszystkich procedur sanitarnych w zakładzie produkcyjnym.

W kwestii zapobiegania zakażeniom wtórnym przeprowadzono test zdolności użytego układu konserwującego do hamowania rozwoju mikroorganizmów celowo wprowadzonych do produktu w ściśle określonej ilości, podczas którego monitorowano stopień redukcji szczepów *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, będących przedstawicielami najczęściej rozwijających się mikroorganizmów w kosmetykach. W obu formułacjach wykorzystano układ konserwujący składający się z kwasu dehydrooctowego (DHA) i alkoholu benzyłowego z uwagi na ich niską toksyczność oraz fakt dopuszczenia do użytku w kosmetykach certyfikowanych przez ECOCERT i COSMOS. Powyższa mieszanina składników konserwujących zapewnia doskonale działanie w szerokim zakresie pH od 2 do 7, cechuje się dobrą dostępnością i niskim dozowaniem (zalecone dozowanie 0,6 % wag. - 1,1 % wag.) jest przystępny cenowo, bezpieczny w przypadku produktów niespłukiwalnych oraz łatwy do wprowadzenia do formułacji, dodatkowo w przypadku obu formułacji nie wpłynął znacząco na pH, lepkość czy stabilność produktów. Jego skuteczność przedstawiono w tabeli 35.

Tab. 35. Wyniki testu konserwacji emulsji rozgrzewającej i żelu chłodzącego

Żel								
T7			T14			T28		
R7	Kryterium	Wynik	R14	Kryterium	Wynik	R28	Kryterium	Wynik
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027								
4,12	≥3	zgodny	4,12	≥3 oraz NI	zgodny	4,12	≥3 oraz NI	zgodny
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538								
4,14	≥3	zgodny	4,14	≥3 oraz NI	zgodny	4,14	≥3 oraz NI	zgodny
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739								
4,12	≥3	zgodny	4,12	≥3 oraz NI	zgodny	4,12	≥3 oraz NI	zgodny
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231								
3,03	≥1	zgodny	3,03	≥1 oraz NI	zgodny	3,03	≥1 oraz NI	zgodny
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404								
-	-	-	3,00	≥0	zgodny	3,00	≥1	zgodny

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Emulsja								
T7			T14			T28		
R7	Kryterium	Wynik	R14	Kryterium	Wynik	R28	Kryterium	Wynik
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027								
4,11	≥3	zgodny	4,11	≥3 oraz NI	zgodny	4,11	≥3 oraz NI	zgodny
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538								
4,10	≥3	zgodny	4,10	≥3 oraz NI	zgodny	4,10	≥3 oraz NI	zgodny
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739								
4,10	≥3	zgodny	4,10	≥3 oraz NI	zgodny	4,10	≥3 oraz NI	zgodny
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231								
3,05	≥1	zgodny	3,05	≥1 oraz NI	zgodny	3,05	≥1 oraz NI	zgodny
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404								
-	-	-	3,03	≥0	zgodny	3,03	≥1	zgodny
MIANO KOŃCOWE W PRÓBCE EMULSJA ROZGRZEWAJĄCA:				1,0·10 ⁵ - 1,0·10 ⁶ jtk/g dla bakterii				
				1,0·10 ⁴ - 1,0·10 ⁵ jtk/g dla <i>C. albicans</i> i <i>A. brasiliensis</i>				
MIANO KOŃCOWE W PRÓBCE ŻEL CHŁODZĄCY:				1,0·10 ⁵ - 1,0·10 ⁶ jtk/g dla bakterii				
				1,0·10 ⁴ - 1,0·10 ⁵ jtk/g dla <i>C. albicans</i> i <i>A. brasiliensis</i>				

NI – brak wzrostu mikroorganizmów w porównaniu z próbką T7,
T7, T14, T28 – czas odpowiednio 7, 14, 28 dni,
R7, R14, R28 – log redukcji po czasie odpowiednio 7, 14 i 28 dni.

Wyniki badania próbek obu formułacji potwierdzają skuteczne zabezpieczenie obu produktów przed rozwojem wtórnych zakażeń i spełnienie wymagań normy PN-EN ISO 11930:2019 bez dodatkowego uzasadnienia, klasyfikując produkt jako kategoria A, niewymagająca dodatkowego uzasadnienia czy zastosowania środków ostrożności.

5.7.2. Testy stabilności i kompatybilności

Badania stabilności i kompatybilności kosmetyku z opakowaniem, podczas których monitorowane są wybrane parametry fizykochemiczne i sensoryczne, pozwalają wykryć różnego rodzaju wady czy niestabilność na początkowym etapie opracowania formułacji nowego produktu. Wczesne rozpoznanie niepożądanych właściwości badanego preparatu pomaga zapobiec nietrafionym wdrożeniom i zredukować koszty, stratę czasu oraz ryzyko niepowodzenia. Dla każdej formułacji konieczne było opracowanie metody badania stabilności i doboru warunków przechowywania i specyficznych parametrów fizykochemicznych dla danego typu formułacji oraz ustalenie zakresu dopuszczalnych zmian, jakie mogą zostać zaakceptowane i nie stanowią zagrożenia dla zachowania

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

oryginalnych wartości gotowego wyrobu. W celu sprawdzenia stabilności oraz kompatybilności produktów z opakowaniem przeprowadzono badania stabilności, podczas których produkty przechowywane były przez 84 dni w kontrolowanych warunkach temperatury:

- temperatury pokojowej (warunki referencyjne),
- 5 °C (warunki skrajne),
- 40 °C (warunki przyspieszonego starzenia),

podczas których monitorowano parametry sensoryczne i fizykochemiczne tj. pH, gęstość, lepkość, stabilność wirówkową oraz zmiany masy. W żadnym z punktów czasowych, w testowanych warunkach, nie stwierdzono znaczących odchyłeń od kryterium akceptacji zawartych w specyfikacjach produktów (żel chłodzący i emulsja rozgrzewająca). Wyniki dla analizowanych parametrów przedstawiono w tabelach 36 - 38.

Tab. 36. Ocena parametrów fizykochemicznych żelu chłodzącego

Punkt czasowy	Warunki	Żel chłodzący			Stabilność wirówkowa
		pH	Gęstość [g/cm ³]	Lepkość [mPa*s]	
D0	tp	5,12	0,9907	28 000	Stabilny
D7	5 °C ± 2 °C	5,15	0,9913	27 800	Stabilny
D7	40 °C ± 2 °C	5,06	0,9909	28 400	Stabilny
D7	tp	5,11	0,9911	28 000	Stabilny
D14	5 °C ± 2 °C	5,14	0,9907	27 800	Stabilny
D14	40 °C ± 2 °C	5,09	0,9910	28 600	Stabilny
D14	tp	5,11	0,9912	28 200	Stabilny
D21	5 °C ± 2 °C	5,13	0,9906	28 000	Stabilny
D21	40 °C ± 2 °C	5,14	0,9910	28 200	Stabilny
D21	tp	5,09	0,9908	27 800	Stabilny
D28	5 °C ± 2 °C	5,14	0,9913	28 200	Stabilny
D28	40 °C ± 2 °C	5,13	0,9912	28 200	Stabilny
D28	tp	5,07	0,9908	28 000	Stabilny
D56	5 °C ± 2 °C	5,11	0,9911	28 000	Stabilny
D56	40 °C ± 2 °C	5,14	0,9909	27 600	Stabilny
D56	tp	5,09	0,9912	28 200	Stabilny
D84	5 °C ± 2 °C	5,10	0,9913	28 200	Stabilny
D84	40 °C ± 2 °C	5,07	0,9908	27 800	Stabilny
D84	tp	5,12	0,9911	28 000	Stabilny

tp - temperatura pokojowa

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Tab. 37. Ocena parametrów fizykochemicznych emulsji rozgrzewającej

Punkt czasowy	Warunki	Emulsja rozgrzewająca			
		pH	Gęstość [g/cm ³]	Lepkość [mPa*s]	Stabilność wirówkowa
D0	tp	5,88	0,8140	48 000	Stabilny
D7	5 °C ± 2 °C	5,90	0,8143	48 200	Stabilny
D7	40 °C ± 2 °C	5,87	0,8139	48 000	Stabilny
D7	tp	5,87	0,8140	48 000	Stabilny
D14	5 °C ± 2 °C	5,88	0,8142	48 200	Stabilny
D14	40 °C ± 2 °C	5,91	0,8138	47 600	Stabilny
D14	tp	5,87	0,8141	47 800	Stabilny
D21	5 °C ± 2 °C	5,90	0,8145	48 400	Stabilny
D21	40 °C ± 2 °C	5,88	0,8137	48 000	Stabilny
D21	tp	5,88	0,8140	48 200	Stabilny
D28	5 °C ± 2 °C	5,79	0,8143	48 000	Stabilny
D28	40 °C ± 2 °C	5,91	0,8137	47 600	Stabilny
D28	tp	5,88	0,8143	48 400	Stabilny
D56	5 °C ± 2 °C	5,76	0,8137	48 200	Stabilny
D56	40 °C ± 2 °C	7,89	0,8135	47 800	Stabilny
D56	tp	5,89	0,8146	47 800	Stabilny
D84	5 °C ± 2 °C	5,80	0,8144	48 600	Stabilny
D84	40 °C ± 2 °C	5,91	0,8137	48 200	Stabilny
D84	tp	5,89	0,8143	47 800	Stabilny

tp - temperatura pokojowa

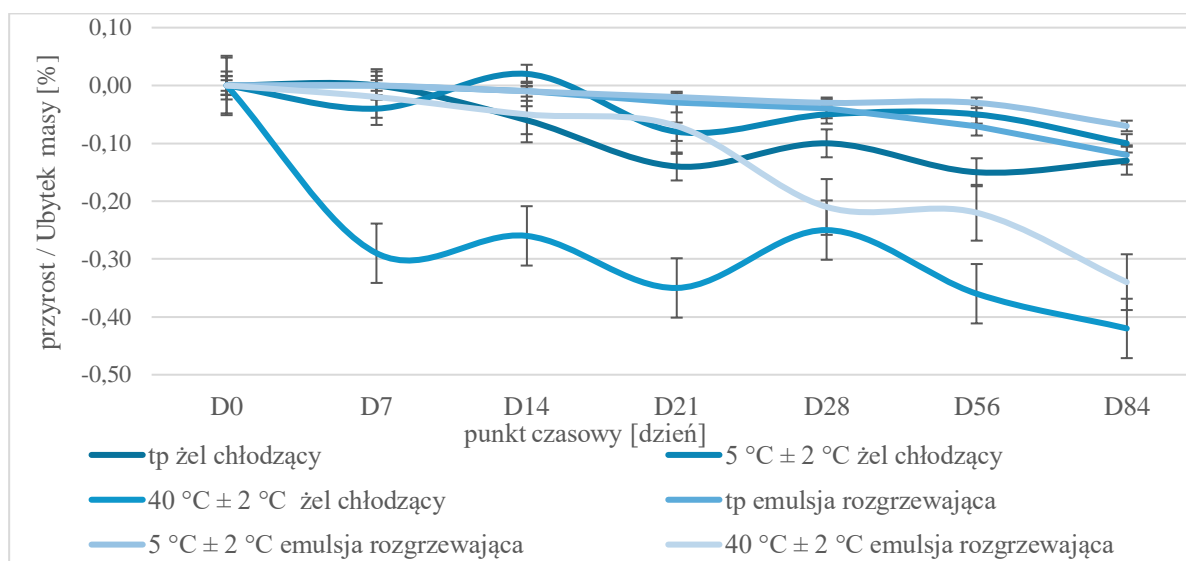
Tab. 38. Ocena ubytku masy w trakcie sezonowania badanych produktów

Produkt	Warunki sezonowania	Punkt czasowy						
		D0	D7	D14	D21	D28	D56	D84
		[%]						
Żel chłodzący (kontuzje stawowe)	tp		0,00	-0,06	-0,14	-0,10	-0,15	-0,13
	5 °C ± 2 °C	0,00	-0,04	0,02	-0,08	-0,05	-0,05	-0,10
	40 °C ± 2 °C		-0,29	-0,26	-0,35	-0,25	-0,36	-0,42
Emulsja rozgrzewająca (zwyrodnienia)	tp		0,00	-0,01	-0,03	-0,04	-0,07	-0,12
	5 °C ± 2 °C	0,00	0,00	-0,01	-0,02	-0,03	-0,03	-0,07
	40 °C ± 2 °C		-0,02	-0,05	-0,07	-0,21	-0,22	-0,34

tp - temperatura pokojowa

Zmiany masy produktu w czasie jego sezonowania w różnych warunkach temperaturowych, pozwalają ocenić kompatybilność z masą kosmetyczną pod kątem szczelności i ochrony produktu przed działaniem czynników atmosferycznych, takich jak wilgotność powietrza. Wysokie temperatury przechowywania czy magazynowania produktu przy nieuszczelnym opakowaniu lub przy opakowaniu niedopasowanym do właściwości masy mogą powodować ubytek wody i lotnych składników w skutek ich odparowywania z masy. Wysoka wilgotność powietrza, z kolei, może przyczynić się do chłonięcia wody przez substancje higroskopijne, a tym samym do puchnięcia masy produktu powodując zwiększenie jego masy/objętości, a nawet rozsadzenie opakowanie. Zgodnie z prawem Arrheniusa podwyższenie temperatury zwiększa szybkość zachodzenia reakcji, co w przypadku badań przyspieszonych, gdzie stosuje się podwyższoną temperaturę nawet do 40 °C, może świadczyć o zachodzeniu niepożądanych reakcji, jak również o rozwoju mikroorganizmów, które w wyższych temperaturach mogą się sprawnie namnażać i produkować własne metabolity np. w skutek fermentacji masy produktu, zwiększając tym samym masę gotowego wyrobu. Ubytek masy zwykle jest bardziej bezpieczny niż przyrost i najgorszym przypadkiem może być utrata aktywnych składników wraz z odparowaną masą, co nie wpływa na bezpieczeństwo stosowania produktu. Przyrost masy może być powodowany, jak wyżej wspomniano, poprzez pochłanianie wilgoci z powietrza zapewniając lepsze warunki do rozwoju mikroorganizmów, jak również może świadczyć o obecności metabolitów powstających podczas ich namnażania, może być także powodem reagowania ze sobą komponentów formułacji. Wszystkie powyższe możliwości obniżają bezpieczeństwo stosowania produktu. Nieznaczne zmiany masy są naturalnym etapem starzenia produktu i przyjmuje się, że zmiany masy do 5 % wag. masy początkowej są akceptowalne dla produktów kosmetycznych, co jest regulowane przez ustawę o towarach paczkowanych. Na rysunku 31 zobrazowano wpływ czasu i temperatury na masę obu badanych produktów.

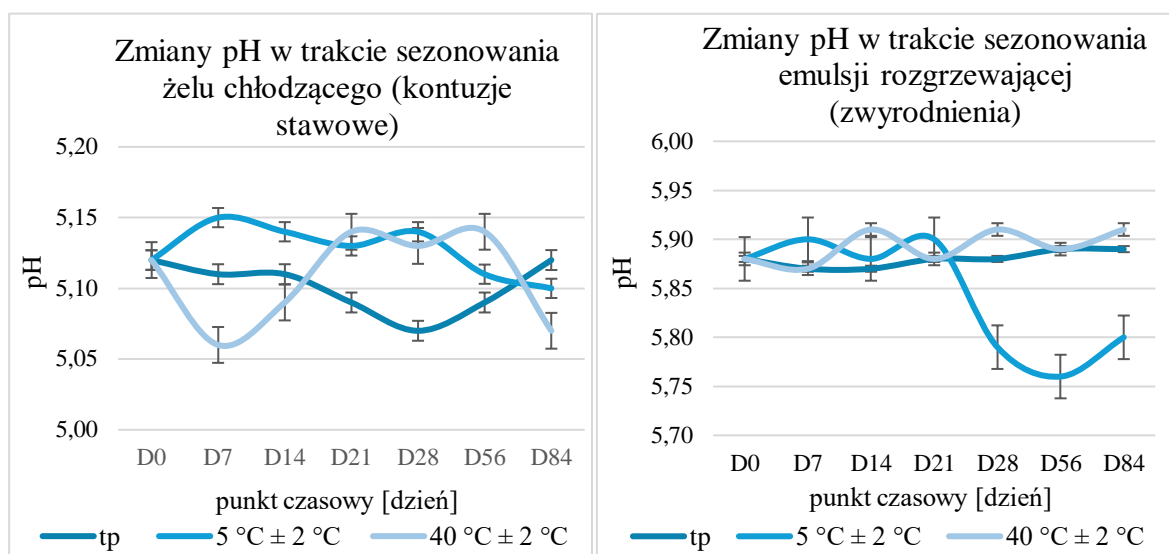
Rys. 31. Zmiana masy w czasie sezonowania obu produktów emulsji rozgrzewającej i żelu chłodzącego



WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Wyniki wskazują, że największy ubytek masy produktów nastąpił w podwyższonej temperaturze, zarówno w przypadku emulsji, jak i żelu. Najmniejszy ubytek w obu produktach zaobserwowano w najniższej temperaturze ich przechowywania (-5°C), co wskazuje na wpływ temperatury na zmiany masy produktu, wskazując na to, że im wyższa jest temperatura przechowywania tym większych zmian można się spodziewać. Kolejnym, kluczowym parametrem monitorowanym podczas analizy stabilności produktów w czasie jest pH. pH zależne jest od wszystkich składników mieszaniny, a więc jego zmiany świadczą o zmianie składu poszczególnych składników lub ich proporcji. pH odgrywa kluczową rolę dla produktu, bowiem determinuje charakter masy zapewniając odpowiednie warunki dla działania konserwantów, składników aktywnych a także zapewniających bezpieczeństwo dla skóry. Dobrze dobrane pH produktu nie zmienia właściwości ochronnych warstwy rogowej skóry, gdzie kwasowe pH skóry pełni funkcję regulującą prawidłowe utrzymanie homeostazy dwuwarstwy lipidowej naskórka oraz zapewnia przepuszczalność dla składników aktywnych [463]. Prawidłowe funkcjonowanie naskórka związane jest między innymi z pH - zależnymi procesami mającymi miejsce w warstwie rogowej, takimi jak pH - zależna aktywność enzymów β -glukocerebrozydazy i kwaśnej sfingomielinazy, które katalizują procesy tworzenia ceramidów, stanowiących ok. 50 % składników lipidowych naskórka [463], [464], czy proteolityczną degradację korneodesmosomów, regulującą proces złuszczenia naskórka [465]. Inny aspekt ochronny pH skóry obejmuje utrzymanie naturalnej mikroflory skóry, której destabilizacja daje możliwość rozwoju drobnoustrojów chorobotwórczych. Drobnoustroje komensalne skóry mają istotny wpływ na właściwości układu immunologicznego człowieka. Poprzez wytwarzanie sygnałów zwiększają ekspresję peptydów antydrobnoustrojowych, bakteriocyn czy cytokin, przyczyniając się do utrzymania bariery naskórkowej [466]. Alkaliczny odczyn kosmetyku, szczególnie przy długotrwałym stosowaniu, może wywierać niekorzystny wpływ na warstwę rogową naskórka, zaburzać barierę hydrolipidową, z kolei zbyt niskie pH produktu może powodować podrażnienia i stany zapalne skóry [467]. Do zmian pH może dochodzić wieloma różnymi szlakami, w tym np. poprzez produkcję kwasu mlekowego w czasie, w skutek fermentacji prowadzonej przez bakterie kwasu mlekowego, czy też przez powstawanie amoniaku, będące efektem rozkładu protein przez laseczki beztlenowe z rodzaju *Pseudomonas*, jednak we wszystkich przypadkach zmiany pH wychodzące poza kryterium akceptacji stanowią niebezpieczeństwo dla konsumentów [331]. Pomiar pH dokonane po sezonowaniu obu produktów w określonych warunkach, przedstawione w postaci rysunku 32, nie wskazały na znaczące odchylenia od wartości początkowej i mieściły się w założonym kryterium akceptacji.

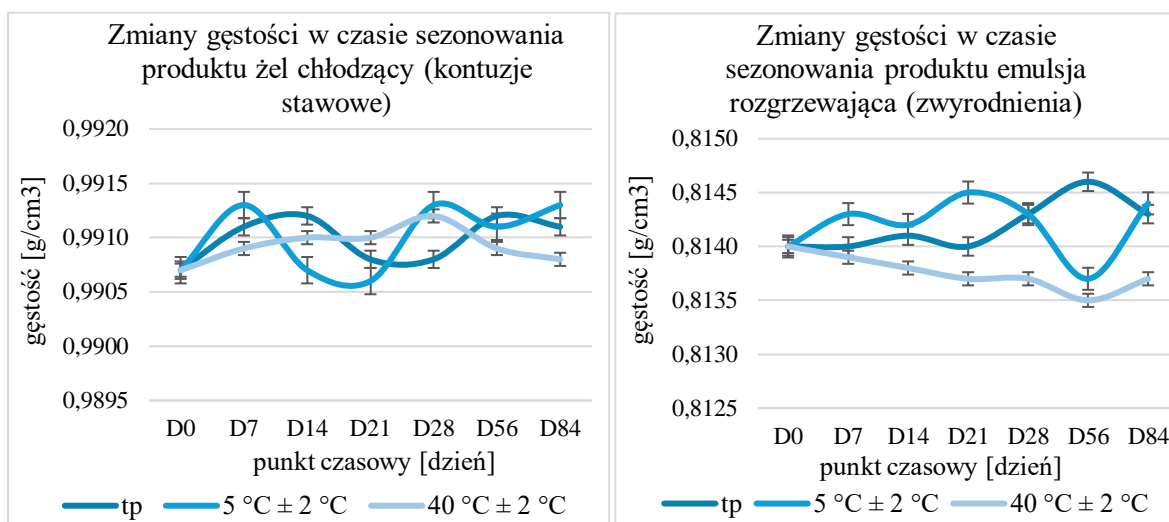
Rys. 32. Zmiany wartości pH w czasie sezonowania badanych produktów



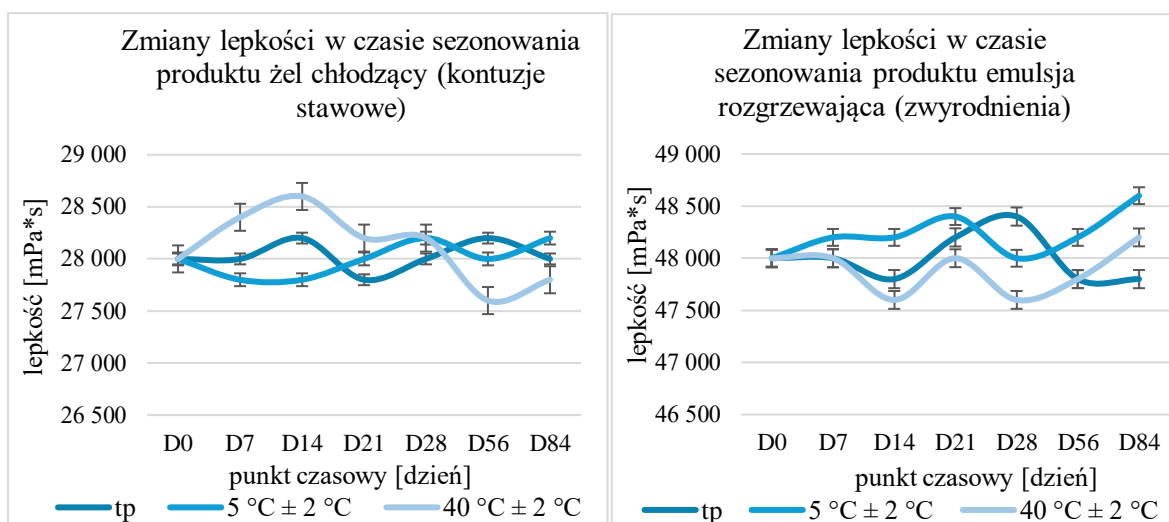
Podobnie, jak w przypadku pH, zmiany lepkości i gęstości wykraczające poza kryterium akceptacji produktu kosmetycznego świadczą o jego niestabilności. W przypadku emulsji naukowcy wskazują, że spadek lepkości w czasie zwykle jest związany z nasilaniem zjawiska koalescencji, dlatego zalecana jest ocena wielkości kropli, która rzetelnie pozwala ocenić wpływ czasu na procesy starzeniowe emulsji [468]. Grupa badawcza de Castro i wsp. [469] zauważyła, że szybki spadek lepkości produktów emulsyjnych skorelowany jest z występowaniem flokulacji, a szybki jej wzrost wskazuje na delikatną koalescencję, przy czym odnotowano zwiększenie nasilenia procesów destabilizacyjnych wraz upływem czasu przechowywania. Powyższa grupa, pomimo drobnych zmian w lepkości, na przestrzeni 6 miesięcy, nie wykazała destabilizacji układu emulsyjnego. Lepkość układu zależy w dużej mierze od właściwości reologicznych wykorzystanych składników, a jej modyfikacje można łatwo uzyskiwać poprzez dodatek modyfikatorów reologii czy składników konsystencjotwórczych. Zmiany lepkości mają istotny wpływ na stabilność produktu. Dostępne badania potwierdzają, że wzrost lepkości fazy zewnętrznej w przypadku emulsji O/W, np. poprzez dodatek sieciujących polimerów, powoduje zmniejszenie ruchliwości kropli oleju, zapobiegając ich zlewaniu, a tym samym pozwala na uzyskanie bardziej stabilnych emulsji [469]. W badanych próbkach zaobserwowano nieznaczne wahania lepkości produktu zależne od temperatury przechowywania, wyznaczając tendencję spadkową w przypadku obu produktów przechowywanych w temp. 40 °C oraz delikatny wzrost lepkości badanych produktów po sezonowaniu w 5 °C (rys. 33). Produkty przechowywane w temperaturze pokojowej nie wykazały znaczących zmian lepkości. Natomiast ocena mikroskopowa nie wykazałaby zaobserwowane zmiany lepkości miały wpływ na wielkość kropli emulsji. Wartości gęstości we wszystkich warunkach sezonowania, w obu badanych produktach, były bardzo stabilne i nie wykazywały istotnych odchyżeń (rys. 34) pozostając blisko wartości początkowych i mieszczą się w kryterium akceptacji.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Rys. 33. Zmiany gęstości w czasie sezonowania produktów



Rys. 34. Zmiany lepkości w czasie sezonowania produktów



Dodatkowo nie zaobserwowano żadnych zmian sensorycznych produktów, wszystkie parametry (zapach, kolor, wygląd, konsystencja) pozostały stabilne bez odchyżeń możliwych do zaobserwowania przy pomocy ludzkich zmysłów. Stabilność wirówkowa została potwierdzona w każdym punkcie czasowym, zarówno dla emulsji, jak i żelu. Porównanie wszystkich próbek poddanych sezonowaniu z próbkami kontrolnymi nie wskazuje na zachodzenie interakcji pomiędzy masą produktu a opakowaniem ani pomiędzy surowcami, dlatego na podstawie uzyskanych wyników stwierdza się stabilność analizowanych produktów oraz jego kompatybilność z testowanym opakowaniem. Wykonane badania stabilności i kompatybilności potwierdzają, że produkt w całym terminie przydatności będzie stabilny i bezpieczny, a opakowanie będzie spełniało zakładane funkcje i nie zajdzie między nim a masą produktu żadna niepożądana interakcja.

5.7.3. Badanie dermatologiczne (potencjał drażniący)

Dostępna literatura naukowa wskazuje, że częstość występowania alergii i podrażnień w kontakcie ze związkami chemicznymi, będącymi składnikami kosmetyków, rośnie z każdym rokiem [470]. Z uwagi na znaczną dywersyfikację populacji konsumentów i ich swoiste cechy osobnicze, każdy organizm może zareagować w inny sposób, jednak wskazuje się, że możliwość wystąpienia alergii kontaktowej i podrażnień dotyczy aż 10 % społeczeństwa [460], które klasyfikowane są jako działanie niepożądane użytkownika produktu kosmetycznego. Możliwość wystąpienia działań niepożądanych stanowi poważne ryzyko bezpieczeństwa stosowania produktu kosmetycznego, dlatego panel badań dermatologicznych jest nieodłącznym elementem oceny bezpieczeństwa produktu z punktu widzenia analizy potencjału drażniącego produktu, pozwalającym na realną ocenę ryzyka jakie niesie za sobą użytkowanie kosmetyku, a tym samym daje konsumentom rzetelną informację na podstawie, której mogą podjąć świadomą decyzję podczas zakupu produktu. Aby badania dermatologiczne dawały realne odwzorowanie możliwości działań niepożądanych konieczne jest dostosowanie doboru ochotników, ich ilości i cech osobniczych (takich jak np. posiadanie skóry wrażliwej), dobranych tak, by jak najlepiej odzwierciedlić cechy grupy docelowej konsumentów, dla której dedykowany jest produkt. Ilość ochotników powinna być na tyle duża, aby była możliwość uwzględnienia wyżej wymienionych 10 % osób, u których może wystąpić podrażnienie czy alergia kontaktowa po zastosowaniu kosmetyku, jednak im większa grupa badana tym większe prawdopodobieństwo wychwycenia ciężkich działań niepożądanych i tym większe jest bezpieczeństwo stosowania wdrożonego produktu. Dobór ochotników powinien również uwzględniać docelową grupę potencjalnych konsumentów, względem deklaracji np. produkty dla cery wrażliwej, hipoalergiczne czy produkty dla dzieci poniżej 3-go roku życia, muszą być przebadane na ochotnikach ze skórą wrażliwą. Deklaracje potwierdzające korzystne właściwości produktu względem skóry suchej, tłustej, trądzikowej, mieszanej, itd. również powinny być potwierdzane na ochotnikach wykazujących właśnie te cechy. W dzisiejszych czasach produkty kosmetyczne są zazwyczaj wieloskładnikowymi mieszaninami, w których ciężko jest oznaczyć, który ze składników jest czynnikiem alergogennym [471]. Na liście najczęstszych czynników alergicznych znajdują się szczególnie środki konserwujące oraz kompozycje zapachowe, jednak zagrożenie mogą stanowić także ekstrakty roślinne, które podobnie jak kompozycje zapachowe cechują się zwykle bardzo bogatym składem, które często nie są nawet do końca poznane i mogą się różnić w zależności od miejsca występowania rośliny czy pory zbioru surowca. Dodatkowy problem w identyfikacji czynnika alergennego mogą stanowić alergie krzyżowe, które mogą być inicjowane poprzez pewne kombinacje składników w produkcie, jak również pomiędzy produktami o różnych funkcjach, ale używanych po sobie. Opracowane, w trakcie realizacji niniejszej pracy, formułacje zawierają zarówno kombinację konserwantów, jak i olejki eteryczne będące składnikami kompozycji zapachowych, jak również znaczącą ilość ekstraktów roślinnych, dlatego badania dermatologiczne stanowiły kluczowy etap oceny bezpieczeństwa stosowania i ryzyka wystąpienia działań niepożądanych [472]. Działania niepożądane według obowiązującego rozporządzenia o kosmetykach określane są jako jakikolwiek niekorzystny wpływ na ludzkie zdrowie, powstały w skutek prawidłowego

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

stosowania produktu, przy czym do najczęstszych zaliczane są: silny świąd, zaczerwienienie, wysypka, zmiany obrzękowo-wysiękowe, trądzik kosmetyczny, pokrzywka, reakcje fotouczulające, czy zmiany barwnikowe skóry [471]. Badanie dermatologiczne w obu przypadkach przeprowadzono na mieszanej grupie osób o skórze wrażliwej składającej się z zarówno mężczyzn, jak i kobiet w wieku 19 - 65 w przypadku żelu chłodzącego oraz 21 - 65 w przypadku emulsji rozgrzewającej (Tab. 39).

Tab. 39. Wyniki badania dermatologicznego

Numer ochotnika	Żel chłodzący (kontuzje stawowe)				Emulsja rozgrzewająca (zwyrodnienia)			
	Płeć K – kobieta M- mężczyzna	Wiek	Odczyt badania po 48 [h]		Płeć K – kobieta M- mężczyzna	Wiek	Odczyt badania po 48 [h]	
			Rumień	Obrzęk			Rumień	Obrzęk
001	K	19	0	0	K	21	0	0
002	K	22	0	0	M	43	0	0
003	K	42	0	0	K	23	0	0
004	K	44	0	0	K	51	0	0
005	K	31	0	0	M	44	0	0
006	K	50	0	0	K	47	0	0
007	K	54	0	0	K	39	0	0
008	M	23	0	0	K	28	0	0
009	K	59	0	0	M	23	0	0
010	K	19	0	0	M	36	0	0
011	M	48	0	0	K	39	0	0
012	K	28	0	0	K	41	0	0
013	K	21	0	0	K	37	0	0
014	K	65	0	0	M	60	0	0
015	K	29	0	0	K	65	0	0
016	M	60	0	0	K	61	0	0
017	K	28	0	0	K	43	0	0
018	K	32	0	0	K	25	0	0
019	M	47	0	0	M	28	0	0
020	M	30	0	0	M	51	0	0

U żadnego z ochotników nie wystąpiła reakcja alergiczna, nie odnotowano rumienia ani obrzęku po kontakcie z kosmetykiem, co pomimo bogatego składu wskazuje na bezpieczeństwo stosowania produktu. Analizowana grupa ochotników pomimo dużego ich zróżnicowania nie wykazała ani jednego niepożądanego efektu stosowania produktu. Obliczony wskaźnik podrażnienia dla badanego produktu wynosił 0, klasyfikując wyrób jako niedrażniący. Na podstawie przeprowadzonych badań dermatologicznych na ochotnikach ze skórą wrażliwą, u których nie stwierdzono występowania alergii na którykolwiek ze składników obu z badanych produktów, potwierdzono, że badane produkty (żel chłodzący (kontuzje stawowe) oraz emulsja rozgrzewająca (zwyrodnienia) są dobrze tolerowane przez skórę i nie wykazują właściwości drażniących ani uczulających, dlatego

mogą zostać sklasyfikowane jako niedrażniące. Mimo uzyskania takich wyników nie można całkowicie wykluczyć możliwości wystąpienia działań niepożądanych, dlatego w przypadku każdego produktu kosmetycznego konieczne jest opracowanie postępowania w momencie zgłoszenia działania niepożądanego, gdzie osoba odpowiedzialna musi obligatoryjnie dokonać natychmiastowego zgłoszenia właściwemu organowi oraz konieczne jest przedstawione podjętych działań naprawczych.

5.7.4. Badanie aplikacyjne - ankietowe zrealizowane w laboratorium zewnętrznym

Wraz z wejściem w życie w Unii Europejskiej zakazu testowania produktów kosmetycznych na zwierzętach, zaczęto poszukiwać alternatywy zarówno dla badań oceny potencjału drażniącego, jak i badań potwierdzających właściwości produktów. Obecne badania użytkowe, inaczej aplikacyjne, opierają się o świadome podjęcie ryzyka grupy ochotników, którzy wyrażają chęć testowania wdrażanych produktów w celu ich oceny. Zadaniem badań aplikacyjnych jest potwierdzenie lub wykluczenie deklarowanych przez producenta właściwości produktu. Badanie odbywa się pod kontrolą lekarza dermatologa i w niektórych przypadkach innego specjalisty np. ginekologa, okulisty czy ortopedy, przy czym samo stosowanie przez określony czas, odbywa się w warunkach domowych, zgodnie z zaleconym przez producenta sposobem użytkowania, a następnie ocenie produktu poprzez wypełnienie ankiety czy kwestionariusza, na podstawie, których w ostatecznym etapie wyciągane są wnioski i łączna opinia o produkcie. Podobnie, jak w przypadku badań dermatologicznych, za reprezentatywną grupę ochotników uznaje się grupę minimum 10 osób, jednak szerszy panel ochotników pozwala na uzyskanie bardziej obiektywnej opinii i dokładniejszych wyników [473]. W celu określenia potencjału wdrożeniowego dla obu badanych produktów opracowano ankietowe badania aplikacyjne. Badanie zostało przeprowadzone przez laboratorium zewnętrzne, które zebrało grupę 20 ochotników deklarujących problemy zwyrodnieniowe (grupa ochotników badania aplikacyjnego emulsji rozgrzewającej) oraz drugą grupę, 20 ochotników, deklarujących przebytą w niedawnym czasie kontuzję (grupa ochotników badania aplikacyjnego żelu chłodzącego). Oba produkty, zgodnie z deklaracją producenta przeznaczone są do poprawy komfortu, działania kojącego w przypadku odczuwania dolegliwości związanych z chorobą zwyrodnieniową stawów czy kontuzji. Produkty polecane są także wspomagająco przy bólach mięśni, stawów oraz w pielęgnacji skóry w miejscach stłuczeń i zasinień. Działanie wyżej wymienionych kosmetyków opiera się na miejscowym przynoszeniu ulgi poprzez działanie chłodzące lub rozgrzewające, znoszące odczucie bólu, sztywności, a także poprzez wmasowanie produktów pobudzenie krążenia, lepsze odżywienie tkanek, przez co wywierają wpływ także na szybszą regenerację, zniesienie obrzęków i sztywności. Ich działanie nie wykracza poza działanie produktu kosmetycznego, dlatego podczas prowadzenia badań kierowano się wytycznymi i rozporządzeniami obejmującymi tę właśnie grupę produktów. Zarówno żel, jak i emulsja były aplikowane dwa razy dziennie przez okres 12 tygodni. Po tym czasie, ochotnicy biorący udział w badaniu, opisali i ocenili swoje subiektywne odczucia wobec używanego produktu.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Łącznie 40 ochotników należących do obu grup badań ankietowych zadeklarowali zmaganie z chorobą zwyrodnieniową stawów lub przejście w niedawnym czasie kontuzji. W pierwszej kolejności ochotnicy obu paneli określili stan wyjściowy skóry oraz dolegliwości jakie im towarzyszą, gdzie jako najbardziej uciążliwe przy kontuzjach stawowych wskazana została bolesność oraz ogólny dyskomfort podczas poruszania się, dalej opuchliznę i zaczerwienienie skóry (Tab. 40), natomiast w przypadku choroby zwyrodnieniowej bolesność, sztywność i ograniczenie ruchomości, a następnie obrzęk i trzeszczenie przedstawione w tabeli 41.

Tab. 40. Ocena stanu wyjściowego ochotników badania aplikacyjnego żelu chłodzącego

Ogólna ocena kondycji skóry ochotników [%]				
Bardzo słaba	Słaba	Zadowalająca	Dobra	Bardzo dobra
0	85	5	10	0

Ogólna ocena kondycji skóry ochotników

■ BARDZO SŁABA	■ SŁABA	■ ZADOWALAJĄCA
■ DOBRA	■ BARDZO DOBRA	

Dolegliwości towarzyszące zgłoszone przez ochotników [%]			
Bolesność	Opuchlizna	Zaczerwienienie	Dyskomfort podczas poruszania
90	60	45	85

Dolegliwości jakie zgłosili ochotnicy

Dyskomfort podczas poruszania	85%
Zaczerwienienie	45%
Opuchlizna	60%
Bolesność	90%

Liczba osób [%]

Tab. 41. Ocena stanu skóry ochotników w miejscu aplikacji oraz dolegliwości towarzyszących, podczas badania aplikacyjnego emulsji rozgrzewającej

Ogólna ocena kondycji skóry [%]				
Bardzo słaba	Słaba	Zadowalająca	Dobra	Bardzo dobra
0	85	5	10	0

Dolegliwości towarzyszące zgłoszone przez ochotników [%]				
Bolesność	Sztywność	Obrzęk	Ograniczona ruchomość	Trzeszczenie
100	95	30	90	10

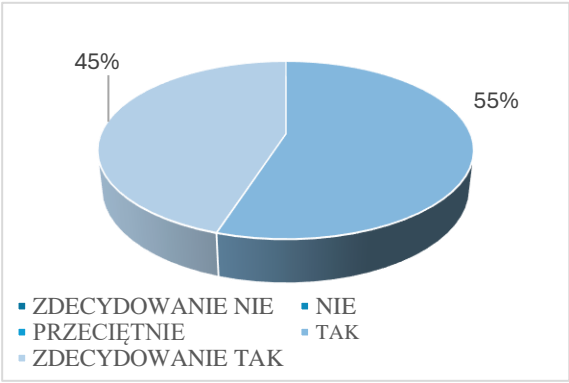
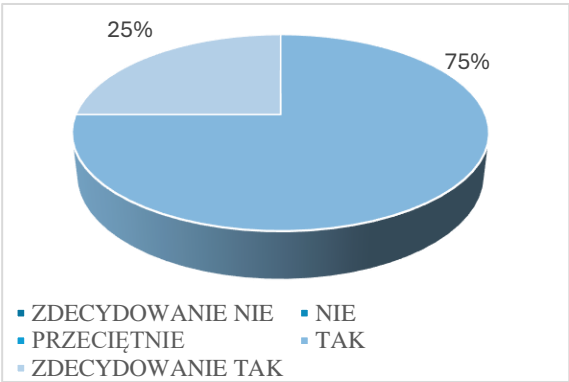
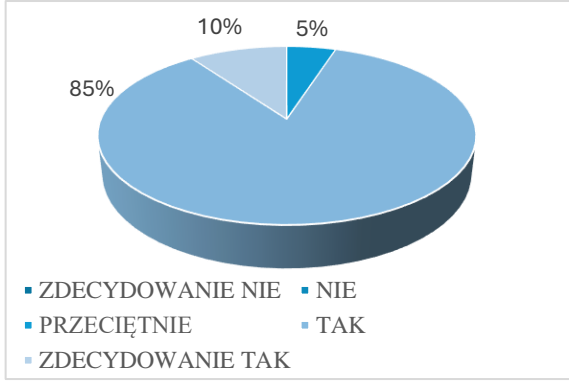
Następnie ochotnicy ocenili właściwości sensoryczne produktów, takie jak: kolor, zapach, łatwość aplikacji, wydajność, łatwość rozprowadzania na skórze oraz właściwości produktu, które producent chciałby zadeklarować na opakowaniu: uczucie ulgi po zastosowaniu, poprawa komfortu podczas poruszania się, odprężenie w miejscu aplikacji, redukcja napięcia mięśni. Dodatkowo dla żelu chłodzącego: uczucie chłodzenia i poprawa komfortu przy opuchliznach, natomiast dla emulsji rozgrzewającej: działanie rozgrzewające i łagodzące objawy choroby zwyrodnieniowej. Uzyskane wyniki oceny sensorycznej i deklaracji marketingowych żelu chłodzącego przedstawiono w tabelach 42 - 44.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

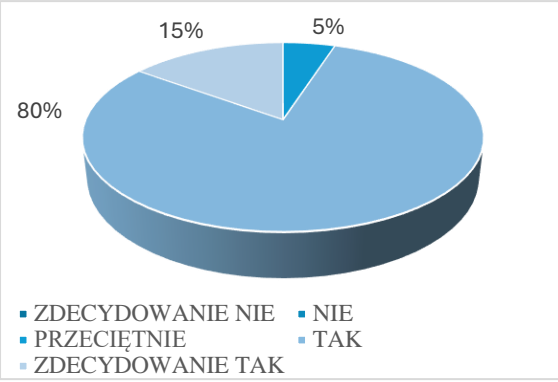
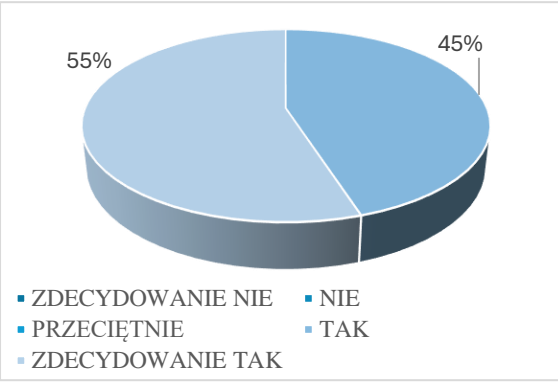
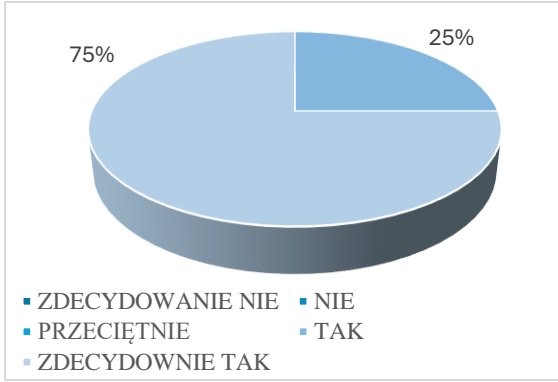
Tab. 42. Ocena ogólnych parametrów sensorycznych obu opracowanych formułacji

Parametr	Ocena	Wyniki dla żelu chłodzącego [%]	Wyniki dla emulsji rozgrzewającej [%]
Barwa	Bardzo nieprzyjemna	0	0
	Nieprzyjemna	0	0
	Neutralna	25	40
	Przyjemna	75	60
	Bardzo przyjemna	0	0
Zapach	Bardzo nieprzyjemny	0	0
	Nieprzyjemny	0	0
	Neutralny	0	0
	Przyjemny	100	100
	Bardzo przyjemny	0	0
Intensywność zapachu	Za mało intensywny	0	0
	Odpowiedni	10	10
	Neutralny	90	90
	Zbyt intensywny	0	0
Aplikacja	Bardzo zła	0	0
	Zła	0	0
	Średnia	5	5
	Dobra	55	85
	Bardzo dobra	40	15
Wydajność	Bardzo mała	0	0
	Mała	0	0
	Średnia	5	10
	Duża	55	35
	Bardzo duża	40	55
Rozprowadzenie	Bardzo złe	0	0
	Złe	0	0
	Średnie	0	0
	Dobre	60	35
	Bardzo dobre	40	65

Tab. 43. Ocena deklaracji producenta produktu żel chłodzący

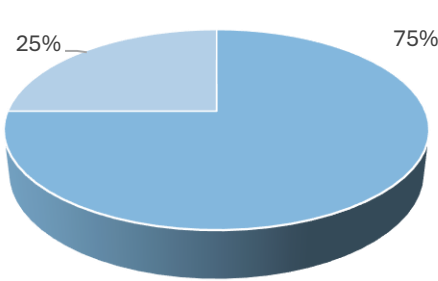
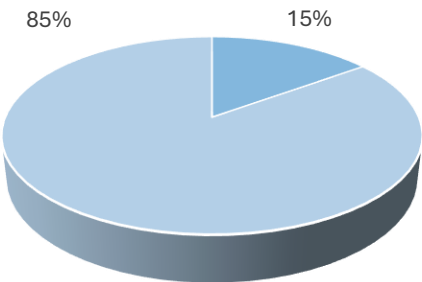
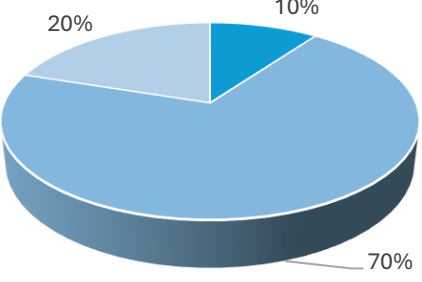
Pytanie ankietowe / wykres	Zdecydowanie nie	Nie	Przeciętnie	Tak	Zdecydowanie tak
<p>Czy produkt daje uczucie ulgi?</p>  <p> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ TAK ■ ZDECYDOWANIE TAK </p>	0 %	0 %	0 %	55 %	45 %
<p>Czy po zastosowaniu produktu poprawia się komfort przy poruszaniu?</p>  <p> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ TAK ■ ZDECYDOWANIE TAK </p>	0 %	0 %	0 %	75 %	25 %
<p>Czy produkt daje uczucie chłodzenia?</p>  <p> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ TAK ■ ZDECYDOWANIE TAK </p>	0 %	0 %	5 %	85 %	10 %

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

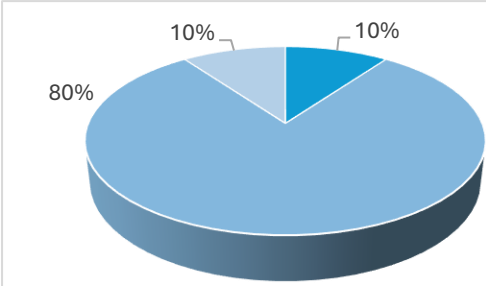
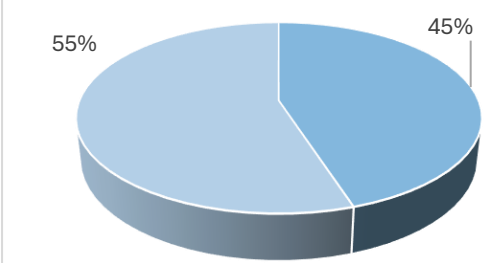
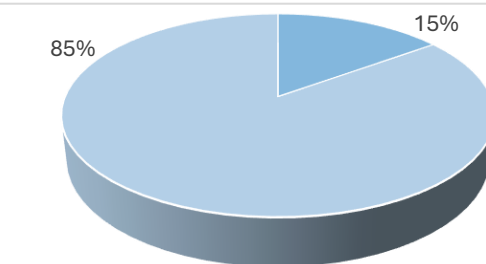
<p>Czy produkt niweluje napięcie mięśniowe?</p>  <p>80% 15% 5%</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ ZDECYDOWANIE TAK ■ NIE ■ TAK 	0 %	0 %	5 %	80 %	15 %
<p>Czy produkt działa wspomagająco przy dyskomforcie spowodowanym stłuczeniami, siniakami, urazami, których konsekwencją jest opuchlizna?</p>  <p>55% 45%</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ ZDECYDOWANIE TAK ■ NIE ■ TAK 	0 %	0 %	0 %	45 %	55 %
<p>Czy produkt daje wrażenie ogólnego odprężenia w miejscu stosowania?</p>  <p>75% 25%</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ ZDECYDOWANIE TAK ■ NIE ■ TAK 	0 %	0 %	0 %	25 %	75 %

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Tab. 44. Ocena deklaracji producenta produktu emulsja rozgrzewająca

<p>Czy produkt daje uczucie ulgi?</p>  <p>25% 75%</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ ZDECYDOWANIE TAK ■ NIE ■ TAK 	Zdecydowanie nie	Nie	Przeciętnie	Tak	Zdecydowanie tak
	0 %	0 %	0 %	75 %	25 %
<p>Czy po zastosowaniu produktu poprawia się komfort przy poruszaniu?</p>  <p>85% 15%</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ ZDECYDOWANIE TAK ■ NIE ■ TAK 	Zdecydowanie nie	Nie	Przeciętnie	Tak	Zdecydowanie tak
	0 %	0 %	0 %	15 %	85 %
<p>Czy produkt daje uczucie rozgrzewania?</p>  <p>20% 10% 70%</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ ZDECYDOWANIE TAK ■ NIE ■ TAK 	Zdecydowanie nie	Nie	Przeciętnie	Tak	Zdecydowanie tak
	0 %	0 %	10 %	70 %	20 %

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

<p>Czy produkt niweluje napięcie mięśniowe?</p>  <p> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ TAK ■ ZDECYDOWANIE TAK </p>	Zdecydowanie nie	Nie	Przeciętnie	Tak	Zdecydowanie tak
	0 %	0 %	10 %	80 %	10 %
<p>Czy produkt działa wspomagająco w dyskomforcie wynikającym z obecności choroby zwyrodnieniowej, w tym zaburzeń pracy mięśni i stawów?</p>  <p> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ TAK ■ ZDECYDOWANIE TAK </p>	Zdecydowanie nie	Nie	Przeciętnie	Tak	Zdecydowanie tak
	0 %	0 %	0 %	45 %	55 %
<p>Czy produkt daje wrażenie ogólnego odprężenia?</p>  <p> ■ ZDECYDOWANIE NIE ■ NIE ■ PRZECIĘTNIE ■ TAK ■ ZDECYDOWANIE TAK </p>	0 %	0 %	0 %	15 %	85 %

Ochotnicy bardzo wysoko ocenili właściwości sensoryczne obu produktów, nie wskazali na żadne zastrzeżenia dotyczące koloru, zapachu czy aplikacji produktu. Dodatkowo podczas badania zostały potwierdzone wszystkie założone deklaracje, sugerując wysoki potencjał wdrożeniowy produktu. Co istotne, żaden z ochotników nie zaobserwował

wystąpienia efektów ubocznych stosowania, które mogłyby świadczyć o alergennym działaniu produktu, dając dodatkowe odniesienie dla bezpieczeństwa stosowania kosmetyku. 12 - tygodniowe badanie polegające na zewnętrznej aplikacji produktu, mające na celu poprawę komfortu potwierdziło działanie produktów w całym zakresie, co pozwala na zredukowanie dolegliwości towarzyszących osobom po przebytych kontuzjach, czy z chorobą zwyrodnieniową.

5.7.5. Ocena bezpieczeństwa z analizą toksykologiczną

Zapewnienie bezpieczeństwa produktów kosmetycznych stanowi najwyższy priorytet producentów wyrobów kosmetycznych i pielęgnacyjnych, świadczący o wysokiej jakości produktów. Przeprowadzenie oceny bezpieczeństwa i analizy toksykologicznej, zarówno składników, jak i całej mieszaniny jest obligatoryjne dla każdej osoby odpowiedzialnej za wdrożenie produktu na rynek i jest regulowane rozporządzeniem o kosmetykach 1223/2009. Przy przygotowaniu raportu bezpieczeństwa uwzględniane jest przeznaczenie produktu kosmetycznego oraz przewidywane narażenie ogólnoustrojowe na poszczególne składniki w gotowym produkcie, jak również opracowanie oceny oparte na dowodach pochodzących z przeglądu danych ze wszystkich istniejących źródeł. Pod uwagę musi być brana także możliwość późniejszej aktualizacji danych raportu bezpieczeństwa, z uwzględnieniem dodatkowych istotnych informacji uzyskanych po wprowadzeniu produktu do obrotu. Ocena bezpieczeństwa kosmetyku bazuje na analizie poszczególnych składników, biorąc pod uwagę ich budowę chemiczną, narażenie oraz profil toksykologiczny. Z racji tego, ocenę bezpieczeństwa mogą przeprowadzać jedynie wykwalifikowane w tym zakresie osoby tzw. safety assessorzy zaznajomieni z aktualnie obowiązującymi przepisami prawnymi i wymogami oceny ryzyka narażenia na chemiczne substancje. Wszystkie dopuszczone składniki do zastosowania w kosmetykach nie wykazują właściwości toksycznych, jednakże zagrożenie mogą stanowić ich zanieczyszczenia, ich rodzaj np. metale ciężkie i skumulowane ilości zanieczyszczeń pochodzących z wielu surowców wykorzystanych w recepturze, a także powstające w skutek wewnętrznych reakcji pomiędzy składnikami receptury. Przykładem niepożądanego reakcji może być wydzielanie amoniaku, powstającego podczas reakcji hydrolizy mocznika pod wpływem kwasów, czy nitrozowanie amin pod wpływem prekursorów nitrozowania popularnie występujących w kosmetykach, takich jak: dietanoloamina (DEA), trójetanoloamina (TEA) czy kapsaicyna. Dodatkowo, konieczne jest też określenie warunków użytkowania czy wszelkich ostrzeżeń dla analizowanych produktów w celu wykluczenia działań niepożądanych związanych z nieprawidłowym użytkowaniem, bowiem wiele z obserwowanych działań niepożądanych związanych jest z niewłaściwym stosowaniem kosmetyków, gdzie np. peelingi chemiczne stóp w przypadku nałożenia w okolicy paznokci pomalowanych lakierem hybrydowym mogą powodować rozpuszczanie płytki paznokcia i urazy macierzy. Wszelkie błędy w analizie toksykologicznej składników produktu mogą prowadzić do uszczerbku na zdrowiu konsumentów, dlatego tak ważne jest przeprowadzenie rzetelnej analizy toksykologicznej.

5.7.5.1. Narażenie na działanie produktu kosmetycznego

Podczas oceny bezpieczeństwa w pierwszej kolejności konieczne było określenie czasu i stopnia kontaktu masy kosmetyku z ciałem człowieka. Podstawowe wartości umożliwiające wyznaczenie narażenia konsumentów stosujących produkt na działanie produktu kosmetycznego obejmują ustalenie drogi ekspozycji, częstość używania produktu, powierzchnię oraz czas kontaktu z produktem. Określenie dróg narażenia obejmuje realne wskazanie możliwości ekspozycji na działanie produktu, co zwykle związane jest z jego funkcją lub aplikacją. Produkty w aerozolach i mgiełkach aplikowanych poprzez ich rozpylanie są wdychane przez konsumentów, narażając drogi oddechowe na ekspozycję na składniki kosmetyku, produkty do higieny jamy ustnej są wchłaniane przez błony śluzowe i mogą zostać połknięte, natomiast kosmetyki do pielęgnacji skóry wokół oczu mogą narażać wzrok. Wskazanie wszystkich, realnie możliwych dróg narażenia, pozwala ukierunkować analizę pod kątem zagrożeń, jakie może stanowić badany produkt. W tym punkcie wskazuje się grupę docelową, bowiem produkty dla dzieci i dorosłych mają inne kryteria akceptacji. Określa się także przeznaczenie, przewidywane dzienne zużycie oraz miejsce i czas kontaktu produktu ze skórą, który dla produktów splotkiwalnych wynosi < 1 minuty natomiast dla produktów niesplotkiwalnych określany jest > 1 minuty. W tabeli 45 przedstawiono podstawowe dane wykorzystane do obliczeń.

Tab. 45. Ocena narażenia na działanie produktu kosmetycznego

Przeznaczenie	Pielęgnacja skóry całego ciała
Populacja docelowa	Osoby dorosłe, dzieci powyżej 3 roku życia
Ilość dziennych aplikacji	2,28/dzień
Przewidywane dzienne zużycie [g produktu/dzień]	7,82
Całkowite dzienne zużycie [mg/kg masy ciała/dzień]*	123,20
Miejsce kontaktu z ciałem człowieka	Skóra całego ciała
Powierzchnia kontaktu SSA [cm²]	15670
Rodzaj produktu	Niesplotkiwany
Współczynnik retencji F_{retencji}	1,00
Poziom narażenia skóry E_{dermalna} [mg/cm²]	0,499
Dzienna ekspozycja na produkt A=E_{produkt} [mg/kg masy ciała/dzień]	123,20
Zamierzona droga narażenia	Powierzchnia skóry – przy zastosowaniu zgodnie z przeznaczeniem
Wtórna droga narażenia	Oczy – niezamierzone podrażnienie Pokarmowa – niezamierzone spożycie

*przy założeniu masy ciała przeciętnego człowieka 60 kg

Jak wcześniej wspomniano, ocena bezpieczeństwa obejmuje analizę parametrów: NOAEL, SED i MoS. NOAEL oznaczający poziom bez obserwowanego działania

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

szkodliwego, czyli najwyższe stężenie, przy którym nie wykazano szkodliwego efektu stosowania substancji, najczęściej wyznaczany jest w badaniach na zwierzętach, a jego wartości do obliczeń przyjmuje się obecnie na podstawie danych pochodzących z baz chemicznych lub literatury naukowej. W przypadku znalezienia kilku różnych wartości NOAEL dla danej substancji do obliczeń wybierana jest wartość stanowiąca największe zagrożenie, w tym przypadku najniższa wartość NOAEL, przy jakiej zaobserwowano jakikolwiek szkodliwy efekt. W przypadku braku danych dla parametru NOAEL brane są pod uwagę wartości NOEL (ang. No Observable Effect Level, najwyższa dawka leku, która nie ma zauważalnego działania) lub LOAEL (ang. Lowest Observable Adverse Effects Level, najniższa dawka, w przypadku której obserwuje się działania niepożądane). Wartość SED (ang. Systemic Exposure Dose), czyli dawkę substancji, na którą są narażeni konsumenci systematycznie korzystający z produktu (zawierającego daną substancję) została wyliczona na podstawie powyższych danych, a następnie w oparciu o wartości NOAEL i SED obliczono margines bezpieczeństwa stosowania danej substancji (MoS ang. the Margin of Safety). W tabeli 46 przedstawiono wyniki obliczeń wszystkich parametrów dla każdej z substancji emulsji rozgrzewającej z osobna.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Tab. 46. Dane toksykologiczne emulsji rozgrzewającej

Nazwa wg INCI	SED [mg/kg masy ciała/dzień]	NOAEL [mg/kg masy ciała/dzień]	POD	MoS	C [%]	C max [%]	NOAEL dane źródłowe
Aqua	21,870	-	-	-	35,503	-	Woda służy jako rozpuszczalnik. W przypadku stosowania miejscowego jego toksyczność nie ma znaczenia z toksykologicznego punktu widzenia. Jakość wody określają wytyczne WHO dotyczące jakości wody pitnej.
Propanediol	4,553	1000	1000	220	30,800	-	[475]
Glucosamine sulfate	2,464	430	430	175	10,000	-	[476]
<i>Epimedium Koreanum</i> extract	2,372	1000	1000	422	3,850	-	[477]
Ceteareth - 25	1,848	500	500	271	3,000	-	[478]
Glycetyl stearate	1,848	1000	1000	541	3,000	-	[479]
<i>Vitis vinifera</i> seed oil	1,602	1000	1000	624	2,600	-	[480]
Cetyl alcohol	1,540	750	750	487	2,500	-	[481]
Peg-40 hydrogenated castor oil	0,924	1000	1000	1082	1,500	-	[482]
Butyrospermum parkii butter	0,616	5200	5200	8442	1,000	-	[483]
Dimethyl sulfone	0,616	1500	1500	2435	1,000	-	[484]
Menthol	0,616	200	200	325	1,000	-	[485]
Propylene glycol	0,616	1700	1700	2760	1,000	-	[486]
Glycerin	0,554	8000	8000	14430	0,900	-	[487]
Benzyl alcohol	0,548	286	286	522	0,890	1,00	[488]
<i>Rosmarinus officinalis</i> leaf oil	0,308	300	300	974	0,500	-	[489]
<i>Eucalyptus globulus</i> leaf oil	0,123	300	300	2435	0,200	-	[490]
<i>Eugenia caryophyllus</i> bud oil	0,123	600	600	4870	0,200	-	[491]
Eugenol	0,108	600	600	5531	0,176	-	[492]
Xanthan gum	0,062	100	100	1623	0,100	-	[493]
Dehydroacetic acid	0,055	100	33	595	0,090	0,60 (kwas)	[494]
Limonene	0,052	825	196	3738	0,085	-	[495]
<i>Artemisia absinthium</i> extract	0,049	1270	1270	25771	0,080	-	[496]
<i>Arnica montana</i> flower extract	0,009	-	-	-	0,015	-	[497]
Linalool	0,002	498	498	211081	0,004	-	[498]
Sodium benzoate	0,002	500	500	216450	0,004	2,50 (kwas)	[499]
Potassium sorbate	0,002	1000	1000	541126	0,003	0,60 (kwas)	[500]

Margines bezpieczeństwa składników kosmetycznych wskazuje ilościowo ryzyko stosowania i pozwala na zaklasyfikowanie do substancji bezpiecznych lub tych obarczonych ryzykiem stosowania w konkretnym produkcie. Aby uznać substancję za bezpieczną do stosowania jej margines bezpieczeństwa powinien przekraczać wartość 100 jak wskazuje SCCP [501]. Wszystkie składniki, dla których wyliczono margines bezpieczeństwa spełniają powyższą zależność, dlatego mogą zostać uznane jako bezpieczne. W przypadku ekstraktu z arniki górskiej, dla której nie jest dostępna wartość NOAEL, bezpieczeństwo zostało oszacowane na podstawie danych i raportów dostępnych w bazie Cosmetic Ingredients Review (CIR). Powyższe obliczenia wskazują jedynie bezpieczeństwo odrębnych składników, natomiast w celu oceny produktu konieczna jest dalsza analiza uwzględniająca produkt jako mieszaninę wielu składników, które potencjalnie mogą ze sobą reagować.

5.7.5.2. Profil toksykologiczny substancji

Dla każdego składnika wchodzącego w skład formułacji odrębnie opracowano profil toksykologiczny, w którym opisano działanie drażniące, uczulające, genotoksyczność, kancerogenność, fototoksyczność, toksyczność rozrodczą i rozwojową, które podsumowano w ocenie bezpieczeństwa każdego ze składników. W tabeli 48 przedstawiono ocenę toksykologiczną składników wchodzących w skład emulsji rozgrzewającej. Ocena bezpieczeństwa surowców pochodzenia botanicznego, takich jak ekstrakty czy olejki eteryczne jest znacznie trudniejsza w porównaniu do pojedynczych składników, gdyż stanowią one mieszaniny często nawet setek komponentów, pośród których poszczególne składniki mogą stanowić zagrożenie poprzez genotoksyczne czy kancerogenne właściwości. Analityczna identyfikacja i charakterystyka całkowitych składów konkretnych ekstraktów jest bardzo trudna a czasem nawet niemożliwa, dlatego przyjmuje się, że do oceny bezpieczeństwa wymagana jest ocena minimum 50 % wag. składników, co jest regulowane rozporządzeniem (WE) nr 627/2006 [501]. W przypadku, kiedy brakuje danych toksykologicznych dla analizowanej substancji, ocenę toksykologiczną przeprowadza się na podstawie danych dostępnych dla substancji pochodnych ocenianej substancji, dlatego w raporcie pojawiają się zarówno składniki wykorzystane w recepturach jak ich pochodne. Dane toksykologiczne dla drugiego produktu (żelu chłodzącego) przedstawiono w załączniku 3. Wykaz testów analizowanych podczas oceny toksykologicznej otrzymanych produktów przedstawiono w tabeli 47.

Tab. 47. Wykaz testów analizowanych podczas oceny toksykologicznej

Numer testu/skrót	Nazwa testu	Objaśnienie
OECD 401	Acute Oral Toxicity	Test ostrej toksyczności doustnej
OECD 402	Acute Dermal Toxicity	Test ostrej toksyczności dermalnej
OECD 403	Acute Inhalation Toxicity	Test ostrej toksyczności inhalacyjnej
OECD 404	Acute Dermal Irritation/Corrosion	Test ostrego podrażnienia dermalnego

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

OECD 405	Acute Eye Irritation/Corrosion	Test ostrego podrażnienia oczu
OECD 406	Skin Sensitisation	Test działania uczulającego
OECD 408	Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents	90-dniowa toksyczność dawki powtarzanej u gryzoni
OECD 411	Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study	Subchroniczna toksyczność skórna: badanie 90-dniowe
OECD 412	Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study	Podostra toksyczność inhalacyjna: badanie 28-dniowe
OECD 413	Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study	Subchroniczna toksyczność inhalacyjna: badanie 90-dniowe
OECD 414	Prenatal Development Toxicity Study	Badanie toksyczności rozwojowej w okresie prenatalnym
OECD 416	Two-Generation Reproduction Toxicity	Badanie toksyczności reprodukcyjnej dwóch pokoleń
OECD 422	Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test	Połączone badanie toksyczności dawki powtarzanej z badaniem przesiewowym toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej
OECD 429	Skin Sensitisation	Test działania uczulającego
OECD 432	<i>In Vitro</i> 3T3 NRU Phototoxicity Test	Test wychwytu neutralnej czerwieni
OECD 439	<i>In Vitro</i> Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method	Metoda badania izolowanego oka kurczaka do identyfikacji i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz ii) substancji chemicznych niewymagających klasyfikacji ze względu na działanie drażniące na oczy lub poważne uszkodzenie oczu
OECD 442C	In Chemico Skin Sensitisation	Test reaktywności badanej substancji chemicznej z cysteiną lub lizyną po 24 godzinach inkubacji
OECD 451	Carcinogenicity Studies	Badania rakotwórczości
OECD 471	Bacterial Reverse Mutation Test	Test odwrotnej mutacji bakteryjnej
OECD 473	<i>In Vitro</i> Mammalian Chromosomal Aberration Test	Test aberracji chromosomowej ussaków <i>in vitro</i>

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

OECD 474	Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test	Test mikrojądrowy erytrocytówssaków
OECD 475	Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test	Test aberracji chromosomowych komórek szpiku kostnego
OECD 476	<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes	Test mutacji genów komórek ssaków <i>in vitro</i>
OECD 492	Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage	Metoda badania zrekonstruowanego ludzkiego nabłonka rogówkowego (RhCE) do identyfikacji substancji chemicznych niewymagających klasyfikacji i oznakowania pod kątem podrażnienia lub poważnego uszkodzenia oczu
DPRA	Direct Peptide Reactivity Assay	Bezpośredni test reaktywności peptydów
Ames	-	Test służący do wykrywania siły mutagenu
HRIPT	Human repeat insult patch test	Test skórny na ludziach
Draize	-	Badanie toksyczności ostrej opracowane przez Johna H. Draize'a i Jacoba M. Spinesa
-	Magnusson and Kligman Maximisation Assay	Test maksymalizacji, pozwalający ocenić potencjał uczulenia skóry
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship	Ilościowa zależność pomiędzy strukturą a aktywnością
LLNA	Local lymph node assay	Badanie lokalnych węzłów chłonnych

Tab. 48. Ocena toksykologiczna składników wchodzących w skład emulsji rozgrzewającej

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	PROPANEDIOL (PROPANODIOL)
Absorbacja skórna	0,12 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego) [474]
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 oralnie, badania na szczurach = 14,9 ml/kg masy ciała (OECD 401)
Inhalacyjna	Inhalacyjne średnie stężenie śmiertelne, badania na szczurach > 5,0 mg/dm ³ (OECD 403)

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Dermalna	LD50 dermalnie, królik > 4200 mg/kg masy ciała (OECD 402)
Działania drażniące	
Na skórę	Lekko drażniący w badaniach na królikach (OECD 404) [501]
Na oczy	Nie drażni oczu (badania na królikach, OECD 405) [502]
Działanie uczulające	
Na skórę	W badaniach na świnkach morskich nie zaobserwowano działania uczulającego propanodiolu [502]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Toksyczność dawki powtarzalnej (28 dni) inhalacyjna: NOAEL inhalacyjny, szczur = 1 800 mg/m ³ powietrza (OECD 412) Toksyczność subchroniczna (90 dni) doustna: NOAEL oralny, szczur, 90 dni = 1000 mg/kg masy ciała/dzień (OECD 408) [502]
Genotoksyczność	Mutagenność/genotoksyczność <i>in vitro</i>: Niegenotoksyczny w teście aberracji chromosomowych komórek ssaków <i>in vitro</i> (OECD 473) przy użyciu fibroblastów płuc chomika chińskiego [502] Mutagenność/genotoksyczność <i>in vivo</i>: Niegenotoksyczny w teście mikrojądrowym na myszach <i>in vivo</i> [502]
Kancerogenność	Propanodiol nie jest uważany za związek rakotwórczy [502]
Fototoksyczność	Fototoksyczność/działanie fotodrażniące i fotouczulające: Dane przekrojowe z 1,5-pentanodiolu: Substancja w stężeniu 5 % wag. nie była fototoksyczna i nie uwrażliwiała na światło w 24 - godzinnym teście okluzyjnym wykonanym po ekspozycji skóry na światło UVA i UVB w badaniach na ludziach [503]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Działanie szkodliwe na płodność i reprodukcję: Dane przekrojowe z 1,3-butanodiolu: Badania na szczurach (OECD 416) nie wykazały niekorzystnego wpływu na parametry reprodukcyjne i laktacyjne [523] Toksyczność rozwojowa: 1,3-propanodiol nie wykazywał właściwości teratogennych w badaniach na szczurach (OECD 414). NOAEL dla toksyczności matczynej i płodowej, szczur = 1000 mg/kg masy ciała/dzień [502]
Badania z udziałem ludzi	Propanodiol nie jest uważany za związek rakotwórczy [502]
Ocena bezpieczeństwa	Propanodiol, jest związkiem organicznym, najprostszym przedstawicielem grupy propano-1,3-diole, składającym się z propanu, w którym jeden wodór z każdej grupy metylowej jest podstawiony grupą hydroksylową. Propanodiol może być otrzymywany przez fermentację z glukozy pochodzącej z kukurydzy za pomocą biokatalizatora, można go również znaleźć w niektórych roślinach. Substancja ta jest stosowana w syntezie niektórych polimerów jako rozpuszczalnik i środek zapobiegający zamarzaniu. Co więcej, propanodiol jest szeroko stosowany w roli rozpuszczalnika i modyfikatora

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	reologii w produktach do higieny osobistej, takich jak: kosmetyki dla dzieci, perfumy, spray'e do włosów, dezodoranty, szampony, mydła, płyny, pasty do zębów itp. Panel ekspertów CIR stwierdził, że propanodiol jest bezpieczną substancją w obecnych praktykach jej stosowania i używanych stężeń w kosmetykach. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa MoS > 100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [503]
--	--

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	GLUCOSAMINE SULFATE (SIARCZAN GLUKOZAMINY)
Absorbcja skórna	0,10 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 8000 mg/kg masy ciała (szczur, glukozamina)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	N/D
Działania drażniące	
Na skórę	N-Acetyloglukozamina nie działa drażniąco na skórę (OECD 439) [504]
Na oczy	Przeprowadzono test konwersji bromku 3-[4,5,-dimetylotiazol-2-ilo]-2,5-difenyloctetrazoliowego (MTT) w celu określenia potencjalnego podrażnienia oczu serum do twarzy zawierającego 2 % wag. N - acetyloglukozaminy. Stratyfikowane ludzkie keratynocyty ekspozowano na czysty artykuł testowy przez 8, 16, 20 i 24 godziny. Nie odnotowano działania drażniącego [504]
Działanie uczulające	
Na skórę	N-Acetyloglukozamina nie działa uczulająco na skórę (DPRA; OECD 442C) [504]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Norweski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności obliczył wartości marginesu bezpieczeństwa (MoS) dla stosowania 10 % wag. siarczanu glukozaminy w balsamie do ciała (35,0), kremie do nóg (99,0) i kremie do twarzy (178,0) oraz na podstawie całkowitego narażenia na kosmetyki. Wartości te obliczono przy założeniu 100 % wchłaniania przez skórę, wartości NOAEL wynoszącej 430 mg/kg masy ciała/dzień (otrzymanej z testu toksyczności po wielokrotnej dawce doustnej przeprowadzonego na psach z biodostępnością wynoszącą 20 % wag.) oraz obliczonego względnego dziennego narażenia, na odpowiednio: 123 mg/kg masy ciała/dzień, 20 mg/kg masy ciała/dzień, 43 mg/kg masy ciała/dzień, 50 mg/kg masy ciała/dzień i 24 mg/kg masy ciała/dzień, 13 mg/kg masy ciała/dzień dla balsamu do ciała,

WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

	<p>kremu do nóg i kremu do twarzy. Zgodnie z tą oceną maksymalne poziomy stosowania wyniosły odpowiednio 18 % wag., 10 % wag. i 3,5 % wag. w balsamie do twarzy, nóg i ciała</p>
Genotoksyczność	<p>Potencjalną genotoksyczność chlorowodoru glukozaminy pochodzącej z <i>Aspergillus niger</i> oceniano w teście Ames (test służący do wykrywania siły mutagenu). Szczepy testowe (<i>S. typhimurium</i> oraz <i>E. coli</i>) poddano ekspozycji na chlorowodorek glukozaminy w stężeniach 100 µg/płytkę, 333 µg/płytkę, 1000 µg/płytkę, 3300 µg/płytkę i 5000 µg/płytkę, z aktywacją metaboliczną lub bez niej. Substancję testową uznano za niemutageną.</p> <p>Test mikrojądrowy <i>in vivo</i> przeprowadzono zgodnie z OECD 474. Nie stwierdzono statystycznie istotnego wzrostu liczby polichromatycznych erytrocytów mikrojądrowych ani zmniejszenia stosunku polichromatycznych do normochromatycznych erytrocytów na żadnym poziomie dawki. Substancję badaną uznano za nietoksyczną dla szpiku kostnego [504]</p>
Kancerogenność	<p>Potencjał rakotwórczy N - Acetyloglukozaminy oceniano na szczurach. Zwierzętom podawano w diecie N - Acetyloglukozaminę na poziomie 0 % wag., 2,5 % wag. lub 5 % wag. przez 104 tygodnie. Substancję testową uznano za nierakotwórczą [504]</p>
Fototoksyczność	<p>Brak danych toksykologicznych, jednak biorąc pod uwagę budowę chemiczną siarczanu glukozaminy (brak grup chromoforowych) nie przewiduje się działania fototoksycznego</p>
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	<p>Oceniono wpływ suplementacji glukozaminą w wodzie pitnej przed kryciem na jednorodność ściółki szczurów Sprague-Dawley, receptywność macicy i poziom hormonów matczynych. Po 2 tygodniach podawania szczury kojarzono. Oceniono jajniki, macice, miejsca implantacji, masę urodzeniową potomstwa, wydajność łożyska matki i osocze matek. Zmienność masy urodzeniowej w obrębie miotu w grupie leczonej glukozaminą wyniosła 5,55 % wag., co stanowi znacznie mniejszą zmienność niż w grupie kontrolnej (8,17 %). Nie obserwowano działania toksycznego zarówno na płody jak i matki [504]</p>
Badania z udziałem ludzi	<p>W przeglądzie literatury dotyczącej badań z udziałem ludzi (między innymi testy HRIPT) nie odnotowano działania drażniącego, uczulającego dla badanych substancji (N - acetyloglukozamina, glukozamina, chlorowodorek glukozaminy) [504]</p>
Ocena bezpieczeństwa	<p>Siarczan glukozaminy to substancja kondycjonująca, zmiękcza i wygładza włosy nadając im naturalny blask. Działa antystatycznie, przez co niweluje efekt elektryzowania się</p>

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	<p>włosów i ułatwia ich rozczesywanie. Siarczan glukozaminy stymuluje również syntezę kwasu hialuronowego, dlatego poprawia nawilżenie skóry, zwiększa jędrność, elastyczność oraz przyspiesza regenerację. Działa przeciwzapalnie i antyoksydacyjnie, chroniąc przed szkodliwym wpływem wolnych rodników na skórę. Panel CIR ocenił glukozaminę i jej pochodne jako substancje bezpieczne do stosowania w kosmetykach.</p> <p>W ocenianym produkcie siarczan glukozaminy jest składnikiem bezpiecznym [504]</p>
--	--

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	<i>EPIMEDIUM KOREANUM</i> EXTRACT (EKSTRAKT Z <i>EPIMEDIUM KOREANUM</i>)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	TD _{LO} 52,5 mg/kg masy ciała (szczur, ikaryna)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	N/D
Działania drażniące	
Na skórę	Ikaryna nie powoduje podrażnienia skóry [505]
Na oczy	Brak danych literaturowych
Działanie uczulające	
Na skórę	Brak danych literaturowych
Toksyczność dawki powtarzalnej	<p>W badaniu tym badano toksyczność podprzewlekłą wodnego ekstraktu <i>Epimedium Koreanum</i> u szczurów przy codziennym podawaniu dożołądkowym w dawce 7 g/kg masy ciała, 5 g/kg masy ciała, 15 g/kg masy ciała lub 30 g/kg masy ciała przez 13 tygodni. Dziewięć składników ekstraktu wodnego zidentyfikowano metodą ultrasprawniej chromatografii cieczowej (UPLC). Nie określono poziomu, przy którym nie zaobserwowano działań niepożądanych, ale u szczurów leczonych przez 13 tygodni wynosił on poniżej 7,5 g/kg masy ciała. U samic szczurów <i>Epimedium Koreanum</i> może uszkadzać wątrobę i trzustkę oraz zaburzać biosyntezę fenyloalaniny, tyrozyny, tryptofanu, waliny, leucyny i izoleucyny oraz metabolizm fenyloalaniny. U samców szczurów, ekstrakt może uszkodzić wątrobę i nadnercza oraz zaburzyć biosyntezę waliny, leucyny i izoleucyny oraz metabolizm pirogronianu [506]</p>
Genotoksyczność	Test odwrotnej mutacji bakteryjnej nie wykazał mutagennego działania <i>Epimedium Koreanum</i> . Ponadto ekstrakt z <i>Epimedium Koreanum</i> nie wykazał żadnego działania klastogenego w testach <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> [507]
Kancerogenność	Brak danych literaturowych
Fototoksyczność	Brak danych literaturowych

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Brak danych literaturowych
Badania z udziałem ludzi	Brak danych literaturowych
Ocena bezpieczeństwa	<p>W tradycyjnych zastosowaniach <i>Epimedium Koreanum</i> jest często stosowane w leczeniu różnych chorób, takich jak: zaburzenia erekcji, bezpłodność, reumatoidalne zapalenie stawów, osteoporoza, astma, zespół niedoboru Yang nerek itp. Do chwili obecnej odkryto ponad 379 związków z różnych części <i>Epimedium Koreanum</i>, w tym flawonoidy, lignany, kwasy organiczne, terpenoidy, węglowodory, pochodne dihydrofenantrenu, alkaloidy i inne. Badania wykazały, że związki i ekstrakty roślinne z <i>Epimedium Koreanum</i> mają szeroki zakres działania farmakologicznego na układ rozrodczy, sercowo-naczyniowy i nerwowy, a także mają właściwości przeciwoosteoporotyczne, przeciwnowotworowe, przeciwutleniające, przeciwzapalne, immunomodulujące, hepatoprotekcyjne i przeciwwirusowe. Poza tym ekstrakty roślinne z <i>Epimedium Koreanum</i> wykazują potencjalną hepatotoksyczność.</p> <p>W ocenianym produkcie jest to składnik bezpieczny, a wyliczony MoS spełnia kryteria akceptacji</p>

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	CETEARETH-25 (MIESZANINA ALKOHOLI CETYLOWEGO I STEARYLOWEGO OKSYETYLENOWANYCH 25 MOLAMI TLENKU ETYLENU)
Absorbacja skórna	0,50 % wag. (zastosowanie promotorów przeniesienia przeznaskórkowego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 10 000 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	LC50 > 1 600 mg/m ³ powietrza (szczur)
Dermalna	LD50 > 2 000 mg/kg masy ciała (szczur)
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę królika [508]
Na oczy	Nie działa drażniąco na oczy królika [509]
Działanie uczulające	
Na skórę	Nie działa uczulająco na skórę świnki morskiej [510]
Toksyczność dawki powtarzalnej	<p>Nie zaobserwowano żadnego wpływu na ogólny stan zdrowia i zachowanie narażonych szczurów. Stwierdzono znaczący wpływ na masę ciała, spożycie pokarmu, masę narządów, chemię kliniczną i hematologię u jednej płci lub obu płci po zastosowaniu dawek dziennych wynoszących 150 mg/kg masy ciała/dzień i 500 mg/kg masy ciała/dzień.</p> <p>Ze względu na fakt, że przy żadnym poziomie dawki nie zidentyfikowano ogólnych lub histopatologicznych zmian związanych ze związkiem, zgłoszone zmiany uważa się za niewielkie</p>

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	i niemające znaczenia toksykologicznego. Dlatego też NOAEL dla toksyczności ogólnoustrojowej ustalono na ponad 500 mg/kg masy ciała/dzień [511]
Genotoksyczność	Badana substancja nie indukowała aberracji chromosomowych w komórkach jajnika chomika chińskiego w obecności lub przy braku aktywacji metabolicznej [512]
Kancerogenność	Brak danych literaturowych, jednak biorąc pod uwagę dane z badania alkoholu stearylowego nie przewiduje się działania kancerogennego [513]
Fototoksyczność	Brak danych literaturowych
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	W przypadku alkoholi C16-18 (parzystych), etoksyloowanych, < 2,5 (nr CAS 68439-49-6, nr WE 939-518-5) przyjmuje się następujące wartości: Doustnie (szczur, OECD 414): NOAEL (toksyczność rozwojowa) = 1000 mg/kg masy ciała/dzień Doustnie (szczur, OECD 414): NOAEL (teratogenność) = 1000 mg/kg masy ciała/dzień [514]
Badania z udziałem ludzi	W przeglądzie danych dotyczących badań z udziałem ludzi narażonych na działanie alkoholu cetylowego i/lub stearylowego nie odnotowano działania drażniącego i uczulającego [513]
Ocena bezpieczeństwa	Cetearth-25 jest bezpiecznie stosowany jako składnik kosmetyczny. Bezpieczeństwo Cetearth-25 zostało ocenione przez ekspertów CIR. Substancja wykazuje właściwości powierzchniowo czynne, dlatego może być stosowana w kosmetykach jako środek emulgujący, oczyszczający i solubilizujący. Eksperti CIR uznali, że Cetearth - 25 jest bezpieczny w produktach kosmetycznych. W ocenianym produkcie jest to składnik bezpieczny

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	GLYCERYL STEARATE (STEARYNIAN GLICEROLU)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (zastosowanie promotorów przeniesienia przeznaskórkowego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	LC50 > 1,97 µl/cm ³ powietrza (szczur)
Dermalna	LD50 > 2000 mg/kg masy ciała (szczur)
Działania drażniące	
Na skórę	Niedrażniący (królik, OECD 404) [515]
Na oczy	Nie działa drażniąco na oczy (królik, OECD 405) [515]
Działanie uczulające	
Na skórę	Badania na świnkach morskich nie wykazały działania uczulającego (OECD 406)) [515]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Toksyczność subchroniczna doustna: NOAEL oralny, szczur, 90 dni = 5725 mg/kg masy ciała/dzień (OECD 408) [515]
Genotoksyczność	Mutagenność/genotoksyczność <i>in vitro</i>:

WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

	<p>Dane przekrojowe z glicerolu: Nie działa mutagennie w badaniu mutacji w komórkach jajnika chomika chińskiego (OECD 476)</p> <p>Mutagenność/genotoksyczność <i>in vivo</i>:</p> <p>Dane przekrojowe dla glicerydów C16-18 i C18 kwasów tłuszczowych: brak wskazań na genotoksyczność w teście mikrojądrowym erytrocytów u ssaków (myszy) (OECD 474) [515]</p>
Kancerogenność	Stearynian glicerolu nie powodował inicjacji ani promocji guza w badaniach na myszach [516]
Fototoksyczność	Produkty zawierające 2 % wag. stearynianu glicerolu nie były fototoksyczne ani fotoalergiczne podczas testów płatkowych na ochotnikach [516]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	<p>Działanie szkodliwe na płodność i reprodukcję:</p> <p>NOAEL dla toksyczności rodzicielskiej, szczur = 1000 mg/kg masy ciała/dzień (OECD 422). W badaniu tym nie zaobserwowano toksycznego wpływu na wskaźnik i czas trwania ciąży, przebieg porodu, opiekę matek nad potomstwem i wczesny rozwój młodych [517]</p> <p>Toksyczność rozwojowa:</p> <p>Dane przekrojowe dla glicerydów, substancja badana nie miała wpływu na wewnątrzmaciczny rozwój szczurów [517]</p>
Badania z udziałem ludzi	<p>W testach klinicznych stearynianu glicerolu w ilości 5 % wag. nie podrażniał skóry.</p> <p>Zarówno stearynian glicerolu, jak i samoemulgujący stearynian glicerolu nie były drażniące i nie wywoływały uczuleń w teście płatkowym pojedynczym i powtarzanym.</p> <p>Ponadto stwierdzono, że składniki te nie wywoływały niepożądanych reakcji wśród pracowników produkcyjnych [516]</p>
Ocena bezpieczeństwa	<p>Stearynian glicerolu, jest estrem kwasu stearynowego i gliceryny. Substancja ta posiada szerokie zastosowanie w kosmetykach jako emulgator typu W/O, emolient tłusty i regulator konsystencji. Tworzy na powierzchni skóry warstwę okluzyjną, która zapobiega nadmiernemu odparowywaniu wody, przez co kondycjonuje, czyli zmiękcza i wygładza skórę oraz włosy. Ponadto stearynian glicerolu jest szeroko stosowany w żywności jako środek aromatyzujący i konsystencjotwórczy, a także w bazach farmaceutycznych. Panel ekspertów CIR stwierdził, że stearynian glicerolu jest bezpieczny w obecnych praktykach stosowania i używanych stężeniach w kosmetykach. Stearynian glicerolu uzyskał status regulacyjny składnika GRAS jako pośredni i bezpośredni dodatek do żywności. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [518]</p>
Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	VITIS VINIFERA SEED OIL (OLEJ Z PESTEK WINOGRON)

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (zastosowanie promotorów przeniesienia przelnaskórkowego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 >16500 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 > 2000 mg/kg masy ciała (szczur)
Działania drażniące	
Na skórę	Umiarkowanie drażniący na skórę (królik) Użyty w stężeniu 0,15 % wag. w balsamie po goleniu nie powoduje działania drażniącego [519]
Na oczy	Produkt zawierający 0,15 % wag. ekstraktu z nasion winogron został sklasyfikowany jako lekko drażniący oczy podczas testów <i>in vitro</i> [519]
Działanie uczulające	
Na skórę	Nie działa uczulająco na skórę człowieka [519]
Toksyczność dawki powtarzalnej	W 90-dniowych badaniach dietetycznych z powtarzanymi dawkami na szczurach, (ekstrakt z pestek winogron i ekstrakt ze skórki winogron) NOAEL wynosił około 2150 mg/kg masy ciała/dzień i 1780 mg/kg masy ciała/dzień odpowiednio u samców i samic szczurów. Nie zaobserwowano żadnych efektów toksycznych [519]
Genotoksyczność	W badaniach <i>in vitro</i> odnotowano mieszane wyniki genotoksyczności składników otrzymanywanych z winogron, ale <i>in vivo</i> uzyskano głównie wyniki negatywne [519]
Kancerogenność	Nie działa rakotwórczo. Ekstrakty z winogron działają hamująco na rozwój niektórych nowotworów [520]
Fototoksyczność	Ekstrakt z liści winogron, który jest stosowany w perfumach w ilości do 3 % wag., jest składnikiem silnie zabarwionym, a panel dermatologów CIR omówił możliwość, że ekstrakt z liści może być fotoaktywny. Dermatolodzy z panelu zauważyli, że u pracowników winnic nie zgłoszono problemów związanych z fototoksycznością, a panel oparł się na tym doświadczeniu klinicznym, aby złagodzić obawy dotyczące możliwych efektów fototoksycznych ekstraktu z liści winogrona [521].
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	W badaniu przeprowadzonym na grupie szczurów obu płci zaobserwowano zmiany wagi (spadek) narządów wewnętrznych. Nie zanotowano bezpośredniego wpływu na płodność badanych grup zwierząt [519]
Badania z udziałem ludzi	W badaniu z udziałem 32 mężczyzn balsam po goleniu zawierający 0,15 % wag. ekstraktu z pestek winogron nie powodował reakcji uczuleniowej i nie był drażniący dla skóry. W badaniu HRIPT zawartość 6 % wag. ekstraktu z nasion winogron w produkcie gotowym, 97 ochotników, brak działania drażniącego i uczulającego [519]
Ocena bezpieczeństwa	Olej z pestek winogron jest bezpieczny do stosowania w produktach kosmetycznych. Cosmetic Ingredient Review: CIR w raporcie z 2017 r. uznali olej z pestek winogron za bezpieczny składnik produktów kosmetycznych [519]

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	CETYL ALCOHOL (ALKOHOL CETYLOWY)
Absorbcja skórna	0,50 % wag. (zastosowanie promotorów przeniesienia przeznaskórkowego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 2000 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	LC50 > 1,5 mg/cm ³ powietrza (szczur)
Dermalna	LD50 > 8000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Alkohole C16-18 są klasyfikowane jako niedrażniące po 24-godzinnej półokluzyjnej ekspozycji na skórę królika (test OECD 404 oraz test Draize'a)[522]
Na oczy	Nie wykazano działania drażniącego na oczy w badaniach na królikach (OECD 405, test Draize'a) [480]
Działanie uczulające	
Na skórę	Brak działania uczulającego w badaniu na świnkach morskich (test Magnussona i Kligmana, OECD 406)
Toksyczność dawki powtarzalnej	Toksyczność subchroniczna (90 dni) doustna/dermalna/inhalacyjna: NOAEL oralny, szczur, 90 dni = 750 mg/kg masy ciała/dzień. NOAEL dermalny, szczur, 90 dni, dla efektów systemicznych = 1000 mg/kg masy ciała/dzień.; LOAEL dermalny, szczur, 90 dni, dla efektów lokalnych = 100 mg/kg masy ciała/dzień. (OECD 411). Badania przekrojowe dla 2-etyloheksanolu: NOAEL inhalacyjny, szczur, 90 dni= 638.4 mg/m ³ (OECD 413) [480]
Genotoksyczność	Mutagenność/genotoksyczność <i>in vitro</i>: Niemutagenny w teście Ames (OECD 471) z użyciem szczepu <i>Salmonella typhimurium</i> Mutagenność/genotoksyczność <i>in vivo</i>: Niemutagenny w teście mikrojądrowym na erytrocytach ssaków (myszy) - Test mikrojądrowy erytrocytów ssaków (OECD 474) [480]
Kancerogenność	Alkohole C16-18 zostały określone jako niekancerogenne w badaniach rakotwórczości na szczurach (OECD 451) [522]
Fototoksyczność	Badano potencjał fotouczulający pomadki zawierającej 4 % wag. alkoholu cetylowego w badaniach na ochotnikach. Nie zaobserwowano reakcji fotoalergiczych u żadnego z 52 ochotników. W badaniach nad produktem do pielęgnacji skóry zawierającym 1 % wag. alkoholu cetylowego udowodniono, że preparat ten nie wykazywał potencjału fotouczulającego u 407 badanych ochotników [523]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Działanie szkodliwe na płodność i reprodukcję: W badaniach toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej (OECD 422) na szczurach, nie wykazano działania reprotoksycznego alkoholu cetylowego. NOAEL dla efektów reprodukcyjnych i rozwojowych, szczur > 2000 mg/kg masy ciała/dzień [480] Toksyczność rozwojowa:

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	<p>Badania przekrojowe dla 1-oktadekanolu: w badaniach na szczurach wykazano brak działania toksycznego u matek, brak embriotoksyczności i działania teratogenne. NOAEL dla toksyczności matczynej i działania toksycznego na płód wynosił 2000 mg/kg masy ciała/dzień (OECD 422) [522]</p>
Badania z udziałem ludzi	<p>Alkohole C16-17 zastosowane w ilości 0,5 % wag. nie wykazywały potencjału uczulającego w powtarzonym teście płatkowym u 100 ochotników.</p> <p>W badaniach klinicznych produktu kosmetycznego zawierającego 8,4 % wag. alkoholu cetylowego nie odnotowano działania drażniącego ani alergizującego [523]</p>
Ocena bezpieczeństwa	<p>Alkohol cetylowy jest organicznym związkiem chemicznym z grupy alkoholi. Na skalę przemysłową najczęściej jest otrzymywany z olejów roślinnych, takich jak: olej palmowy i olej kokosowy. Posiada bardzo długą historię stosowania w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Jest niejonową substancją powierzchniowo czynną, tłustym emolientem, tworzy na powierzchni skóry warstwę okluzyjną, która zapobiega nadmiernemu odparowywaniu wody, ponadto kondycjonuje, czyli zmiękcza i wygładza skórę i włosy. Alkohol cetylowy pełni również funkcję emulgatora typu W/O oraz modyfikatora reologii. Panel ekspertów CIR stwierdził, że alkohol cetylowy jest bezpieczną substancją w obecnych praktykach jej stosowania i używanych stężeń w kosmetykach. Substancja została uwzględniona przez FDA jako pośredni dodatek do żywności. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym.</p>
Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	PEG-40 HYDROGENATED CASTOR OIL (UWODORNIONY OLEJ RYCYNOWY PEG-40)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 2000 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	N/D
Działania drażniące	
Na skórę	<p>Substancję badano w modelu ludzkiej skóry EpiDerm™ przy użyciu podwójnych tkanek przez 3 i 60 minut. Względna średnia żywotność tkanek traktowanych badaną substancją wynosiła 98,0 % dla 3 - minutowej ekspozycji i 101,5 % dla 60-minutowej ekspozycji. Można zatem stwierdzić, że substancja nie działa żrąco na skórę [524]</p>

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Na oczy	Potencjał działania drażniącego na oczy oceniano za pomocą testu modelowego ludzkiej rogówki. Substancja nie okazała się reduktorem MTT i wykluczono zakłócenia barwy [525]
Działanie uczulające	
Na skórę	Substancję uważa się za nie działającą uczulająco na skórę. Potwierdzają to badania QSAR [526]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Doustne podanie substancji było dobrze tolerowane przez dorosłe zwierzęta (szczur). W kontekście tego badania nie wykazano żadnych dowodów na to, że substancja zaburza funkcjonowanie układu hormonalnego. Uznano, że poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) dla toksyczności ogólnoustrojowej wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień [527]
Genotoksyczność	W teście Amesa substancję badano na szczepach <i>Salmonella typhimurium</i> i <i>E. coli</i> w obecności i przy braku aktywacji metabolicznej. Nie odnotowano wzrostu częstości mutacji u żadnego z testowanych szczepów, zarówno w obecności, jak i przy braku aktywacji metabolicznej. W warunkach tego badania substancję uważa się za niemutageną [528]
Kancerogenność	Brak danych literaturowych
Fototoksyczność	Nie działa fototoksycznie na skórę [529]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) w przypadku toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień, biorąc pod uwagę brak wpływu na cykl rujowy, okres przed stosunkiem, wydajność krycia, płodność i długość ciąży lub u potomstwa na podstawie wielkości miotu, stosunku płci, objawów klinicznych, odległości odbytowo-płciowej lub makroskopii [530]
Badania z udziałem ludzi	W testach klinicznych na ludziach, olej rycynowy, nie wykazuje znaczącego działania drażniącego na skórę, uczulającego ani fotouczulającego, ale był łagodnym środkiem drażniącym oczy [529]
Ocena bezpieczeństwa	Uwodorniony olej rycynowy PEG-40 jest bardzo bezpiecznym surowcem stosowanym w kosmetykach bez określonych ograniczeń. Cosmetic Ingredient Review: zgodnie z opinią panelu CIR uwodorniony olej rycynowy PEG-40 może być bezpiecznie stosowany w kosmetykach. Nie stwierdzono podrażnień skóry ani oczu w wyniku narażenia na działanie oleju rycynowego PEG i uwodornionych składników oleju rycynowego PEG

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	BUTYROSPERMUM PARKII BUTTER (MASŁO SHEA)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 oralnie, szczur > 74 g/kg masy ciała (<i>in vivo</i> test ostrej toksyczności)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 dermalnie, świnka morska > 3000 mg/kg masy ciała
Działania drażniące	
Na skórę	W badaniu podrażnienia skóry z zastosowaniem okluzyjnych testów płatkowych masło shea wytworzyło bardzo niewielki rumień (z obrzękiem lub bez) u 2/3 królików narażonych na badany materiał przez 4 godziny. Substancja nie powodowała pierwotnego podrażnienia skóry podczas badania w stężeniu do 2 % wag.. W badaniu <i>in vitro</i> z użyciem modelu EpiSkin™, 24,1 % wag. masło shea testowane w wosku do ust nie wywoływało podrażnień [531], [532]
Na oczy	Nierozcieńczone masło shea uznano za niedrażniące oczy podczas badania na królikach [531]
Działanie uczulające	
Na skórę	Masło shea nie było uczulające w badaniu maksymalizacji świnki morskiej Materiał zawierający masło shea, testowany w postaci nierozcieńczonej, dał odpowiedź negatywną w badaniu. Bezpośredni test reaktywności peptydów (DPRA), co wskazuje na brak potencjału uczulającego [531], [532]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Toksyczność subchroniczna (90 dni) doustna: Dane przekrojowe dla oleju triglicerydowego bogatego w oleiny: NOAEL oralny, szczur, 90 dni = 5200 mg/kg masy ciała/dzień (OECD 408) [533] Toksyczność chroniczna (> 12 miesięcy): Dane przekrojowe z kwasu oleinowego: w badaniach na myszach karmionych olejem kukurydzianym (10 % wag.) i kwasem oleinowym (0,15 % wag.) przez 24 miesiące zanotowano wzrost zawartości lipidów w wątrobie i przysadce mózgowej. Napodstawie zawartości lipidów ustalono wartość NOAEL na 225 mg/kg masy ciała/dzień [534]
Genotoksyczność	Mutagenność/genotoksyczność <i>in vitro</i>: Dane przekrojowe dla oleju triglicerydowego bogatego w oleiny: niemutagenny w badaniu na szczepach <i>S. typhimurium</i> oraz <i>E. coli</i> (OECD 471) Materiał zawierający masło shea nie był mutagenny w teście Ames [533] Mutagenność/genotoksyczność <i>in vivo</i>: Dane przekrojowe dla oleju triglicerydowego bogatego w oleiny: nie zaobserwowano potencjału klastogenicznego dla badanej substancji w teście aberracji chromosomowych komórek szpiku kostnego myszy (OECD 475) [533]

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Kancerogenność	Dane przekrojowe dla oleiny z masła shea: substancja nie wykazywała potencjału rakotwórczego w badaniach na szczurach w stężeniu 15 % wag. w diecie (7,5 g/kg masy ciała/dzień) [535]
Fototoksyczność	Masło shea nie wykazywało właściwości fototoksycznych u świnek morskich, w stężeniu 10 % wag. i 20 % wag. w acetonie. Materiał zawierający masło shea uznano za niefototoksyczny w teście OECD 432, przy badaniu w ilości 0,005 – 1 mg/mL [531], [532]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Działanie szkodliwe na płodność i reprodukcję: Dane przekrojowe dla oleiny z masła shea i uwodornionych olein z masła shea: zbadano potencjał toksycznego wpływu na reprodukcję w badaniach żywieniowych na szczurach. Nie zaobserwowano niekorzystnego wpływu na reprodukcję po ekspozycji na oleinę z masła shea i uwodornioną oleinę z masła shea u szczurów w stężeniach większych niż 15 % wag. (7,5 g/kg masy ciała/dzień) [536]
Badania z udziałem ludzi	W badaniach na ochotnikach nie zaobserwowano działania drażniącego masła shea podczas badań użytkowych błyszczczyku do ust i olejków do masażu ciała/ dłoni, w stężeniach do 45 % wag. W wielokrotnie powtarzalnych testach płatkowych na ludziach z użyciem produktów zawierających masło shea nie zaobserwowano objawów uczulenia. Masło shea badano w stężeniach do 60 % wag. [532]
Ocena bezpieczeństwa	Masło shea, jest to tłuszcz uzyskany z owoców drzewa masłosza Parka. Ten składnik jest bogatym źródłem kwasów tłuszczowych (głównie kwasu oleinowego, stearynowego, palmitynowego), niezmydlającej frakcji lipidów, tokoferoli, a także związków fenolowych. Ze względu na dobre właściwości zmiękczone, nawilżające, przeciwzapalne i przeciwutleniające masło shea od dawna jest szeroko wykorzystywane w kosmetykach. Jest również stosowane w żywności i suplementach diety. Panel ekspertów CIR stwierdził, że masło shea jest bezpieczną substancją w obecnych praktykach stosowania i w używanych stężeniach w kosmetykach, gdy są sformułowane jako nieuczulające. Masło shea znajduje się na liście GRAS (zatwierdzone przez FDA) jako bezpośredni dodatek do żywności. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [532]

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	DIMETHYL SULFONE (DIMETYLOSULFOTLENEK)
Absorbacja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 2000 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	LC50 > 600 mg/cm ³ powietrza (szczur)

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Dermalna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Potencjał podrażnienia skóry badanego artykułu określono zgodnie z wytycznymi OECD 439 stosowanymi w tym badaniu. Ustalono, że średni % żywotności tkanki w porównaniu z kontrolą ujemną (n = 3) badanej substancji chemicznej wynosi 94,4 %. W związku z tym uznano, że badana substancja chemiczna nie działa drażniąco na ludzką skórę [537]
Na oczy	Potencjał podrażnienia oczu przez badaną substancję chemiczną określono zgodnie z wytycznymi badawczymi OECD 492 stosowanymi w tym badaniu. Ustalono, że średni % żywotności tkanek badanej substancji chemicznej wynosi 86,3 %. W związku z tym badanej substancji chemicznej nie uznano za substancję drażniącą oczu [538]
Działanie uczulające	
Na skórę	Potencjał uczulający na skórę badaną substancją chemiczną oceniano za pomocą testu lokalnych węzłów chłonnych u myszy (LLNA). Badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi OECD 429. Na podstawie badania uznano, że substancja nie działa uczulająco [539]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Doustne podawanie 1500 mg/kg masy ciała/dzień (1,5 g/kg masy ciała/dzień) substancji testowej przez 90 dni nie spowodowało żadnych działań niepożądanych ani śmiertelności. Nie miało to wpływu na masę ciała ani szacunkowe spożycie pokarmu. Nie zaobserwowano żadnych zmian hematologicznych ani klinicznych zmian chemicznych. Histologia nerek leczonych zwierząt była prawidłowa. Zatem poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) substancji testowej w tym 90-dniowym badaniu z użyciem zgłębnika, określono na 1500 mg/kg masy ciała/dzień [540]
Genotoksyczność	W teście odwrotnej mutacji bakteryjnej z użyciem szczepów <i>S. typhimurium</i> , badana substancja nie indukowała żadnego znaczącego wzrostu rewertantów histydynozależnych. W związku z tym stwierdza się, że substancja badana nie jest genotoksyczna. W teście aberracji chromosomowej <i>in vitro</i> z użyciem komórek płuc chomika chińskiego nie zaobserwowano żadnych skutków aberracji. Dlatego też substancję testową uważa się za niemutageną w komórkach płuc chomika chińskiego [541]
Kancerogenność	Brak danych literaturowych
Fototoksyczność	Brak danych literaturowych
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	W oparciu o dane dostępne z danego badania, uznano, że NOAEL dla materiału testowego wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień w przypadku toksyczności reprodukcyjnej, gdy samcom i samicom szczurów podawano doustnie materiał testowy. Zatem porównanie tej wartości z kryteriami materiału testowego zgodnie z przepisami CLP prawdopodobnie nie spowoduje jego sklasyfikowania jako substancji działającej szkodliwie na rozrodczość.

WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

	Na podstawie badania dostępnego dla badanej substancji chemicznej dokonano przeglądu w celu określenia toksyczności rozwojowej, uznano, że NOAEL dla badanej substancji chemicznej wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień w przypadku szczurów, którym podawano badaną substancję chemiczną doustnie. Zatem porównanie tej wartości z kryteriami określonymi w rozporządzeniu CLP prawdopodobnie nie spowoduje sklasyfikowania jej jako substancji działającej toksycznie na rozrodczość i rozwój [542]
Badania z udziałem ludzi	Brak danych dotyczących badań z udziałem ludzi
Ocena bezpieczeństwa	Metylosulfonylometan jest to związek organicznej siarki. Wykazuje działania antyoksydacyjne oraz ułatwia przenikanie substancji odżywczych. W ocenianym produkcie jest to składnik bezpieczny, a obliczony MoS spełnia kryteria akceptacji

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	MENTHOL (MENTOL)
Absorbcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD100 > 1500 mg/kg masy ciała (kot)
Inhalacyjna	LC50 > 5289 mg/m ³ (szczur)
Dermalna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Działa nieznacznie drażniąco na skórę królika [543]
Na oczy	Działa drażniąco na oczy królika [544]
Działanie uczulające	
Na skórę	Nie działa uczulająco na skórę świnki morskiej [545]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Badanie wykonano na grupie 80 szczurów, którym przez 5 tygodni aplikowano zadaną dawkę substancji. NOEL wyznaczono na poziomie 200 mg/kg masy ciała/dzień [546]
Genotoksyczność	Nie działa genotoksycznie w teście aberracji chromosomowej zarówno z aktywacją metaboliczną, jak i bez niej [547]
Kancerogenność	Nie działa kancerogenicznie [548]
Fototoksyczność	Brak danych literaturowych
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Badania histopatologiczne narządów rozrodczych myszy nie wykazały zmian w badaniach toksyczności po podaniu wielokrotnym z zastosowaniem D/L-mentolu, a także w badaniach rakotwórczych u pacjentów z D/L mentolem. W związku z tym nie ma dowodów na to, że D/L-mentol mógłby wpływać negatywnie na reprodukcję. Dawkę NOAEL w badaniu 104-tygodniowym wyznaczono na 667 mg/kg masy ciała/dzień [549]
Badania z udziałem ludzi	Nadwrażliwość alergiczną badano w grupie 228 wybranych pacjentów dermatologicznych za pomocą testów płatkowych z 1 % wag. mentolem w wazelinie; częstość występowania wyraźnego uczulenia: 1,3 % pacjentów.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Ocena bezpieczeństwa	Mentol jest bezpiecznym składnikiem do stosowania w produktach kosmetycznych. Cosmetic Ingredient Review: wskazuje, że istnieją doniesienia o działaniu podrażniającym mentolu, ale nie wykazano tego w testach płatkowych. CIR w 2018 r. dokonał przeglądu dostępnej literatury naukowej dotyczącej olejku z mięty pieprzowej, którego głównym składnikiem jest mentol i uznał go za bezpieczny do stosowania w kosmetykach [550], [551]
Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	PROPYLENE GLYCOL (GLIKOL PROPYLENOWY)
Absorbcja skórna	0,50 % wag. (promotor przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 = 22000 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	LC50 > 317042 mg/m ³ (szczur)
Dermalna	LD50 > 2000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę królika (OECD 404) [552]
Na oczy	Powoduje delikatne podrażnienie oczu królika (OECD 404) [552]
Działanie uczulające	
Na skórę	Może powodować podrażnienie skóry u niektórych osób, prawdopodobnie z powodu odwodnienia, jednak nie jest uważany za składnik uczulający [553]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Toksyczność chroniczna (> 12 miesięcy): NOAEL doustnie, wyznaczony w badaniu na szczurach = 1700 mg/kg masy ciała/dzień (w badaniu chronicznej toksyczności doustnej i 2 - letnich badaniach rakotwórczości) [552]
Genotoksyczność	Glikol propylenowy nie wykazał aktywności mutagennej w teście powrotnych mutacji bakteryjnych z użyciem szczepów <i>Salmonella typhimurium</i> . Glikol propylenowy nie powodował wykrywalnych aberracji chromosomowych w szpiku kostnym szczura po podaniu doustnym w dawkach do 5000 mg/kg masy ciała [552]
Kancerogenność	W badaniach długoterminowych (2 lata) na szczurach nie stwierdzono działań niepożądanych ani zmian histopatologicznych, w tym zmian nowotworowych, po zastosowaniu najwyższej badanej dawki glikolu propylenowego [552]
Fototoksyczność	Glikol propylenowy nie powodował efektu fotouczulającego w teście Photopatch na 30 ochotnikach płci męskiej i 52 ochotniczkach płci żeńskiej [554]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Badania na szczurach - dwupokoleniowa toksyczność reprodukcyjna: NOAEL dla toksyczności płodności, pokolenie F1 = 10100 mg/kg masy ciała/dzień Nie zaobserwowano wpływu na płodność F1 przy najwyższej dawce Badania na szczurach - dwupokoleniowa toksyczność reprodukcyjna: NOAEL dla toksyczności rozwojowej, pokolenie F2 = 10100 mg/kg masy ciała/dzień. Nie zaobserwowano wpływu na wielkość miotu, płęć i masę urodzeniową w pokoleniu F2 przy

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	najwyższej dawce. Badania na myszach (OECD 414): NOAEL u matki = 520 mg/kg masy ciała/dzień [552]
Badania z udziałem ludzi	<p>W 24-godzinnym badaniu na 33 ochotnikach przy użyciu testów płatkowych w warunkach półokluzyjnych glikol propylenowy wykazał łagodne podrażnienie.</p> <p>Wykazano, że substancja ta wzmacnia działanie drażniące izopropanolu i kwasu benzoowego (badania na ludziach, test nieokluzyjny).</p> <p>Doniesiono o kilku studiach przypadków zapalenia skóry i atopowego zapalenia skóry związanych ze stosowaniem glikolu propylenowego [552], [554]</p>
Ocena bezpieczeństwa	<p>Glikol propylenowy to alkohol alifatyczny szeroko stosowany w kosmetyce jako składnik kondycjonujący, modyfikator reologii, rozpuszczalnik ekstraktów oraz substancje aktywne. Ponadto substancja ta jest wykorzystywana w żywności, farmacji, a także jako czynnik bakteriostatyczny i fungistatyczny.</p> <p>Panel Ekspertów CIR (Cosmetic Ingredient Review) stwierdził, że glikol propylenowy jest bezpieczny w obecnych praktykach stosowania i koncentracji w kosmetykach w preparatach niedrażniących.</p> <p>Substancja ta znajduje się na liście GRAS (Generally Recognized As Safe by FDA - Food and Drug Administration) jako bezpośredni dodatek do żywności.</p> <p>Obliczony margines bezpieczeństwa dla składnika ma akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100. Ten składnik jest oceniany jako bezpieczny do stosowania w produkcie kosmetycznym [554]</p>

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	GLYCERIN (GLICERYNA)
Absorbcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 oralnie, szczur = 2530 - 58400 mg/kg masy ciała (OECD 401) LD50 oralnie, człowiek = 1428 mg/kg masy ciała
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 dermalnie, szczur > 21900 mg/kg masy ciała (OECD 402) LD50 dermalnie, królik > 18700 mg/kg masy ciała
Działania drażniące	
Na skórę	<p>Nie działa drażniąco na skórę u królików w stężeniach do 100 % wag. (test Draize - OECD 404)</p> <p>Łagodnie drażniąca skórę w stężeniu 100 % wag. u świnek morskich Gliceryna (50 % wag. roztwór wodny) nie drażniła osób z zapaleniem skóry (badanie na ludziach) [555]</p>
Na oczy	<p>Nie działa drażniąco na oczy królików w stężeniach do 100 % wag. (test Draize i OECD 405)</p> <p>Niedrażniąca przy podawaniu do oczu ludzi [555]</p>

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Działanie uczulające	
Na skórę	Nieuczulająca w badaniach na świnkach morskich Nieuczulająca dla człowieka (zmodyfikowany test Draize'a – human patch test) [555]
Toksyczność dawki powtarzalnej	NOAEL oralny, szczur, badania 44-dniowe = 115 - 2300 mg/kg masy ciała/dzień NOAEL oralny, człowiek 50-dniowe \geq 2,2 g/kg masy ciała/dzień [555]
Genotoksyczność	Niegenotoksyczna (kilka testów Ames'a ze szczepami <i>Salmonella typhimurium</i>). Niegenotoksyczna (OECD 474) [555]
Kancerogenność	Substancja nie jest rakotwórcza (gliceryna podawana w paszy szczurów przez 2 lata nie zwiększała częstości występowania guzów) [555]
Fototoksyczność	Nie znaleziono danych w dostępnej literaturze. Ze względu na swoją budowę chemiczną (brak grup chromoforowych) nie przewiduje się, aby gliceryna absorbowała promieniowanie UV-VIS, a tym samym działała fototoksycznie/fotouczulająco
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Działanie szkodliwe na płodność i reprodukcję: Nie wykazano. W dwupokoleniowym badaniu toksyczności reprodukcyjnej u szczurów nie zaobserwowano niekorzystnego wpływu na wydajność reprodukcyjną, wzrost i płodność (dla dawki gliceryny ~ 2000 mg/ kg masy ciała/dzień) [555] Toksyczność rozwojowa: Nie zaobserwowano toksyczności dla matki ani działania teratogennego u szczurów, myszy i królików (NOAEL dla toksyczności matczynej i teratogennej: u szczurów = 1310 mg/ kg masy ciała/dzień, u myszy = 1280 mg/ kg masy ciała/dzień, u królików = 1180 mg/ kg masy ciała/dzień) [555]
Badania z udziałem ludzi	Nie stwierdzono działania uczulającego mieszaniny gliceryna/woda w testach płatkowych przeprowadzanych na pracownikach z narażeniem zawodowym na glicerynę. Zastosowanie 100% wag. gliceryny na powierzchni oka ludzkiego spowodowało rozległe zmiany w wyglądzie śródbłonna, ale większość tych zmian zniknęła w ciągu 90 minut po zakończeniu ekspozycji. Środek nawilżający zawierający 65,9 % wag. gliceryny nie był uczulający dla ludzi [555], [556]
Ocena bezpieczeństwa	Gliceryna, jest od dawna szeroko wykorzystywana w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Substancja ta jest zatwierdzona do stosowania w lekach dostępnych bez recepty, takich jak środki ochrony skóry (do 45 % wag.) i produkty do pielęgnacji jamy ustnej. Wolna gliceryna występuje naturalnie w ludzkim osoczu. Panel ekspertów CIR (Cosmetic Ingredient Review) stwierdził, że gliceryna jest bezpieczna do stosowania w produktach kosmetycznych przy stężeniach do 78,5 % wag. w produktach niezmywalnych, 68,6 % wag. w produktach spłukiwanych i 47 % wag. w produktach rozcieńczonych do kąpieli. Gliceryna została wymieniona przez FDA (Food and Drug Administration) na liście

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	GRAS (substancja powszechnie uznana za bezpieczną przez FDA) jako wielofunkcyjna substancja spożywcza oraz z przeznaczeniem do pakowania żywności. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [555]
--	---

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	BENZYL ALCOHOL (ALKOHOL BENZYLOWY)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 1620 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	LC50 3297 mg/m ³ powietrza (szczur)
Dermalna	LD50 < 5000 mg/kg masy ciała (świnka morska)
Działania drażniące	
Na skórę	Wykazuje nieznaczne działanie drażniące na skórę (królik) [557]
Na oczy	Działa drażniąco na oczy królika [557]
Działanie uczulające	
Na skórę	Działa uczulająco na skórę [558]
Toksyczność dawki powtarzalnej	W badaniu równoważnym OECD 451 prowadzonym na grupie szczurów nie zaobserwowano żadnego wpływu na zwiększenie masy ciała i nie zaobserwowano żadnych klinicznych objawów związanych z zespołem w trakcie badania. NOEL ustalono na 400 mg / kg masy ciała
Genotoksyczność	Alkohol benzylowy nie był mutagenny, gdy badano protokół preinkubacji w obecności lub nieobecności egzogennej aktywacji metabolicznej szczepów <i>Salmonella typhimurium</i> [559] Alkohol benzylowy nie powodował zwiększonej liczby mikrojąderek w polichromatycznych erytrocytach szpiku kostnego myszy [560]
Kancerogenność	W badaniach podobnych do OECD 451 samce i samice szczurów otrzymywały codziennie 0 mg/kg masy ciała/dzień, 200 mg/kg masy ciała/dzień i 400 mg/kg masy ciała/dzień alkoholu benzylowego, a samce i samice myszy otrzymywały codziennie 0 mg/kg masy ciała/dzień, 100 mg/kg masy ciała/dzień i 200 mg/kg masy ciała/dzień alkoholu benzylowego przez 104 tygodnie. W warunkach tych badań nie było dowodów na działanie rakotwórcze [561]
Fototoksyczność	Alkohol benzylowy (w stężeniu 4 mol/L - 10 mol/L) indukował umiarkowaną hemolizę (~ 6 %) tylko w obecności UVA, co klasyfikowało go jako słabo fototoksyczny związek [562]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Nie wpływa toksycznie na rozrodczość Nie powoduje zmian płodu. NOAEL 510 mg/kg masy ciała/dzień
Badania z udziałem ludzi	W dostępnej literaturze istnieje tylko kilka opisów przypadków wywołanych zawodowo alergicznych reakcji kontaktowych na alkohol benzylowy. Testy naskórne z alkoholem benzylowym

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	w dużych zbiorowościach wykazują raczej rzadko pozytywne reakcje [563]
Ocena bezpieczeństwa	<p>Alkohol benzylowy jest bezpieczny do stosowania w produktach kosmetycznych. Rozporządzenie 1223/2009: Składnik znajduje się w wykazie substancji, które mogą być zawarte w produktach kosmetycznych z zastrzeżeniem określonych ograniczeń (załącznik III do Rozporządzenia Parlamentu i Rady (WE) nr 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych). W przypadku, gdy alkohol benzylowy jest stosowany jako składnik kompozycji zapachowych, czyli przeznaczony do celów innych niż zahamowanie rozwoju drobnoustrojów w produkcie, cel musi wynikać z prezentacji produktu. Obecność substancji musi być uwzględniona w wykazie składników (INCI), gdy jej stężenie przekracza: — 0,001 % wag. w produkcie niespłukiwanym — 0,01 % wag. w produkcie spłukiwanym. Składnik ten znajduje się również w wykazie substancji konserwujących dozwolonych w produktach kosmetycznych (załącznik V do Rozporządzenia Parlamentu i Rady (WE) nr 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych). Maksymalne stężenie w preparacie gotowym do użycia 1 % wag.</p> <p>Bezpieczeństwo czystej substancji</p> <p>Według zharmonizowanej klasyfikacji i oznakowania zatwierdzonej przez Unię Europejską, substancja ta jest szkodliwa w przypadku połknięcia i jest szkodliwa w przypadku wdychania. Należy pamiętać, że substancja zastosowana w produktach kosmetycznych w warunkach określonych przepisami nie powoduje takiego efektu. Klasyfikacja CLP odnosi się wyłącznie do substancji w czystej postaci. Alkohol benzylowy w produktach kosmetycznych stosowany jest w bardzo niskim stężeniu, do 1 % wag. i nie wywołuje takich efektów jak czysta substancja.</p> <p>Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [563], [564]</p>

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	ROSMARINUS OFFICINALIS LEAF OIL (OLEJEK ROZMARYNOWY)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 5 ml/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 > 10 ml/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Działa drażniąco na skórę [565]
Na oczy	Brak klasyfikacji na podstawie dostępnych badań
Działanie uczulające	

WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

Na skórę	Działa uczulająco na skórę [566]
Toksyczność dawki powtarzalnej	W warunkach testowych poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) dla toksyczności ogólnoustrojowej, został uznany za 300 mg/kg masy ciała/dzień i 1000 mg/kg masy ciała/dzień odpowiednio u samic i samców szczurów [567]
Genotoksyczność	W warunkach testowych olejek rozmarynowy nie jest uważany za mutagenny w szczepach <i>S. typhimurium</i> oraz <i>E. coli</i> z aktywacją metaboliczną i bez niej [568]
Kancerogenność	Nie podejrzewa się działania kancerogennego [569]
Fototoksyczność	Brak danych toksykologicznych
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	W warunkach badania poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) dla szkodliwego działania na rozrodczość wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień, ponieważ nie zaobserwowano szkodliwego wpływu na reprodukcję [570]. W warunkach testowych poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL), uznano za 300 mg/kg masy ciała/dzień dla toksyczności rozwojowej, jednak wpływ na masę ciała potomstwa nie był selektywny i zaobserwowano go przy dawkach wywołujących toksyczność matczyną i dlatego substancja nie została uznana za selektywną toksyczną substancję rozwojową [571]
Badania z udziałem ludzi	Olejek rozmarynowy wykazał dodatnią reakcję (odczyn obrzękowy/pęcherzykowy) w dniu 4. Stwierdzono, że zawierał terpineol (> 1 % wag.) oraz α -pinen, linalol i kariofilen (> 10 % wag.) [572]
Ocena bezpieczeństwa	Olejek z liści rozmarynu może być bezpiecznie stosowany w produktach kosmetycznych. Wybierając składniki botaniczne do przygotowania produktów kosmetycznych, formulatorzy polegają na obszernej historii ich przygotowania i stosowania. Takie materiały były używane przez długi czas i na podstawie tego doświadczenia została zdobyta rozległa wiedza na temat ich bezpieczeństwa. W sytuacji nowo zidentyfikowanych składników botanicznych w przemyśle kosmetycznym, przed wprowadzeniem do ogólnego handlu prowadzone są odpowiednie badania bezpieczeństwa oczu i skóry. Istnieje wiele różnych odniesień, które opisują stosowanie i bezpieczeństwo preparatów botanicznych. Cosmetic Ingredients Review: Bezpieczeństwo olejku z liści rozmarynu zostało ocenione przez ekspertów CIR. Składnik nie powoduje podrażnień skóry oraz nie jest toksyczny
Ocena toksykologiczna	
Nazwa inci	EUCALYPTUS GLOBULUS LEAF OIL (OLEJEK Z EUKALIPTUSA)
Absorbacja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 = 1560 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (królik)
Działanie drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę myszy (eukaliptol) [573]
Na oczy	Nie działa drażniąco na oczy królika (ekstrakt) [574]
Działanie uczulające	
Na skórę	W teście maksymalizacji z udziałem ludzi (25 ochotników) nie powodował reakcji uczuleniowej [573]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) w odniesieniu do toksyczności ogólnoustrojowej (u samic), toksyczności ogólnoustrojowej (samce), toksyczności rozwojowej i reprodukcyjnej uznano za odpowiednio 300 mg/kg masy ciała/dzień, 1000 mg/kg masy ciała/dzień, 300 mg/kg masy ciała/dzień i 1000 mg/kg masy ciała/dzień (szczur) [575]
Genotoksyczność	W warunkach testowych olejek eukaliptusowy nie jest uważany za mutageny dla szczepów <i>S. typhimurium</i> i <i>E. coli</i> [576]
Kancerogenność	Na podstawie dostępnych badań nie jest klasyfikowany jako kancerogeny [573]
Fototoksyczność	Na podstawie dostępnych badań nie jest spodziewane działanie fotodrażniące i fotouczulające [573]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) w odniesieniu do toksyczności ogólnoustrojowej (u samic), toksyczności ogólnoustrojowej (samce), toksyczności rozwojowej i reprodukcyjnej uznano za odpowiednio 300 mg/kg masy ciała/dzień, 1000 mg/kg masy ciała/dzień, 300 mg/kg masy ciała/dzień i 1000 mg/kg masy ciała/dzień (szczur) [575]
Badania z udziałem ludzi	W badaniu działania uczulającego na skórę dwóm pacjentkom (50 i 51 - letnie zawodowe aromaterapeutki z podejrzeniem alergicznego kontaktowego zapalenia skóry) nałożono plastry okluzyjne zawierające olejek eukaliptusowy rozcieńczony wazeliną białą przez 48 godzin. Reakcje obserwowano po 30 minutach i po usunięciu plastrów w dniu 4. Olejek eukaliptusowy wykazał pozytywną reakcję (wyczuwalny rumień) u jednej kobiety w 4. dniu. Stwierdzono, że składa się on wyłącznie z eukaliptolu wraz z α - i β -pinenem [577]
Ocena bezpieczeństwa	Składnik aktywny, działa antyseptycznie i odświeżająco. Olejek stosowany jest przede wszystkim w pastach do zębów. Działa także przeciwbakteryjnie, dlatego stosowany jest również w preparatach do cery tłustej i trądzikowej. Ponadto wykazuje działanie przeciwzapalne. Olejek eukaliptusowy jest bezpiecznym składnikiem produktów kosmetycznych. Brak klasyfikacji jako substancja powodująca alergię skórne, ale istnieją doniesienia naukowe, że substancja generuje znaczącą liczbę przypadków uczuleń. Panel CIR uznał, że olejek z liści <i>Eucalyptus globulus</i> może zwiększać przenikanie innych składników przez skórę (np.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	chlorheksydyny). Panel przestrzegł, że należy zachować ostrożność przy formułowaniu produktów kosmetycznych, które mogą zawierać ten składnik w połączeniu z dowolnymi składnikami, których bezpieczeństwo wskazano na podstawie braku danych dotyczących wchłaniania przez skórę lub gdy wchłanianie przez skórę budziło wątpliwości [573]
--	---

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	EUGENIA CARYOPHYLLUS FLOWER OIL² I EUGENOL (OLEJEK GOŹDZIKOWY I EUGENOL)
Absorbacja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 1500 < 3000 mg/kg masy ciała (mysz)
Inhalacyjna	LC50 > 5 mg/L (szczur)
Dermalna	N/D
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa uczulająco na skórę królika [578]
Na oczy	Działa drażniąco na oczy królika [579]
Działanie uczulające	
Na skórę	Działa uczulająco na skórę myszy [580]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Przy braku śmiertelności, dużych zmian patologicznych i histopatologicznych u obu płci, NOAEL u szczurów określono na podstawie niewielkiego spadku masy ciała i niewielkich zmian masy ciała przy 6000 ppm i 12500 ppm (co odpowiada 600 lub 1250 mg eugenolu/kg masy ciała/dzień) odpowiednio u samców i samic. Końcowy NOAEL określono na poziomie 600 mg/kg masy ciała/dzień u samców i na lub powyżej 1250 mg/kg masy ciała/dzień u samic [581]
Genotoksyczność	Potencjał mutageny eugenolu oceniano w bakteryjnym teście odwrótnej mutacji. Eugenol (60 µg/płytkę, 120 µg/płytkę, 300 µg/płytkę i 600 µg/płytkę) nie indukował znaczącego wzrostu liczby rewertantów, ani w przypadku szczepów testowych <i>Salmonella</i> , ani w przypadku <i>E. coli</i> Potencjał genotoksyczny eugenolu oceniano w teście mikrojądrowym szpiku kostnego u szczurów. Eugenol podawano drogą doustną (zglębniakiem) w dawkach 335 mg/kg masy ciała, 670 mg/kg masy ciała lub 1340 mg/kg masy ciała w dawkach podzielonych na 30 i 6 godzin przed pobraniem szpiku kostnego. Eugenol był ujemny w tym teście mikrojądrowym [582]
Kancerogenność	Na podstawie danych dowody wskazują, że eugenol nie jest czynnikiem rakotwórczym u gryzoni. Wniosek ten jest zgodny z wnioskiem z niedawnego przeglądu toksykologii eugenolu przeprowadzonego przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa

² Na podstawie głównego składnika Eugenol CAS: 97-53-0

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	<p>Żywności, który stwierdził, że eugenol jest pozbawiony działania rakotwórczego [583]</p>
Fototoksyczność	<p>W oparciu o widma absorpcji UV/VIS i istniejące dane, nie oczekuje się, że eugenol będzie budzić obawy związane z fototoksycznością lub fotoalergiczną [584]</p>
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	<p>Przekrojowy materiał dla izoeugenolu (nr CAS 97-54-1; zob. sekcja V) wskazuje badania toksyczności rozwojowej przez sondę, przeprowadzone na szczurach, w których ustalono, że NOAEL dla toksyczności rozwojowej wynosi 500 mg/kg masy ciała/dzień, na podstawie wewnątrzmacicznego opóźnienia wzrostu i opóźnionego kostnienia szkieletu.</p> <p>Dla izoeugenolu (nr CAS 97-54-1) prowadzone były także wielopokoleniowe, ciągłe badanie hodowlane prowadzone na szczurach, które określiły NOAEL dla szkodliwego działania na rozrodczość na poziomie 230 mg/kg masy ciała/dzień [584]</p>
Badania z udziałem ludzi	<p>Istnieje stosunkowo niewiele badań na ludziach dotyczących farmakokinetyki i działania eugenolu. Badania na zwierzętach sugerują, że po wdychaniu dymu z papierosów goździkowych niewielkie ilości eugenolu mogą być wchłaniane z płuc. Również niektóre badania <i>in vitro</i> wykazały, że eugenol ulega biotransformacji w hepatocytach. Badanie zdrowych ochotników płci męskiej i żeńskiej wykazało, że eugenol był szybko wchłaniany i metabolizowany po podaniu doustnym. Został prawie całkowicie wydalony z moczem w ciągu 24 godzin, a mocz zawierał koniugaty eugenolu. Wyniki wykazały, że tylko mniej niż 1 % wag. podanej dawki było wydalane w postaci niezmetabolizowanej z moczem. Analiza moczu wykazała również, że ponad 90 % wag. produktów przemiany materii to koniugaty fenolowe, a 50 % wag. sprzężonych metabolitów to eugenol-glukuronid i eugenol-siarczan. Inne obserwowane szlaki metaboliczne to szlak epoksydowo-diolowy, synteza tiofenolu i podstawionego kwasu propionowego, utlenianie allilowe i migracja wiązania podwójnego [585]</p>
Ocena bezpieczeństwa	<p>Eugenol jest lotnym fenolowym składnikiem olejku goździkowego otrzymywanego z <i>Eugenia caryophyllata</i>. Jest funkcjonalnym składnikiem wielu produktów, które w ograniczonych stężeniach znalazły zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i kosmetycznym. Jego pochodne znalazły zastosowanie w medycynie jako miejscowy środek antyseptyczny i znieczulający. Szeroki zakres działania eugenolu obejmuje działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwutleniające. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków zatwierdziła stosowanie olejku goździkowego jako substancji aromatyzującej w przemyśle spożywczym, jako substancji zapachowej w przemyśle kosmetycznym oraz w stomatologii jako naturalnego środka przeciwbólowego i antyseptycznego. Eugenol znajduje się na liście substancji, które mogą być zawarte w produktach kosmetycznych wyłącznie z zastrzeżeniem</p>

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	określonych ograniczeń [130]. W ocenianym produkcie został zastosowany zgodnie z dopuszczalnym limitem
Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	XANTHAN GUM
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 oralnie, szczur > 5 g/kg masy ciała (OECD 401) LD50 oralnie, szczur > 20 g/kg masy ciała (OECD 401)
Inhalacyjna	LD50 inhalacyjnie, królik > 21 mg/dm ³ (<i>In vivo</i> test ostrej toksyczności inhalacyjnej)
Dermalna	N/D
Działania drażniące	
Na skórę	Guma ksantanowa do stężenia 1 % wag. nie była drażniąca dla skóry w kilku badaniach przeprowadzonych na królikach. W innym eksperymencie na królikach guma ksantanowa w stężeniu 5 % wag. powodowała miejscowe podrażnienie skóry [586], [587]
Na oczy	1 % wag. gumy ksantanowej nie działała drażniąco na oczy królików [588]
Działanie uczulające	
Na skórę	Brak działania uczulającego w teście na świnkach morskich [589]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Toksyczność subchroniczna (90 dni) doustna: Dane przekrojowe z beta-glukanu: NOAEL oralny, szczur, 90 dni = 100 mg/kg masy ciała/dzień (OECD 408) [590] Toksyczność chroniczna (> 12 miesięcy): Nie zaobserwowano istotnych różnic w tempie wzrostu, przeżywalności, hematologii i masie narządów w 2-letnim badaniu na szczurach [591]
Genotoksyczność	Mutagenność/genotoksyczność <i>in vitro</i>: Guma ksantanowa badana na szczepach <i>Bacillus subtilis</i> nie wykazywała aktywności uszkadzającej DNA. Dane przekrojowe dla gumy Gellan: niemutageny w teście Ames (OECD 471) ze szczepami <i>S. typhimurium</i> [592], [593] Mutagenność/genotoksyczność <i>in vivo</i>: Dane przekrojowe dla gumy Gellan: negatywny wynik testu mikrojądrowego na erytrocytach myszy (OECD 474) [594]
Kancerogenność	Substancja nie wykazała działania rakotwórczego w badaniach na szczurach, którym podawano gumę ksantanową w dawkach 0 mg/kg masy ciała/dzień, 250 mg/kg masy ciała/dzień, 500 mg/kg masy ciała/dzień i 1000 mg/kg masy ciała/dzień przez 104 tygodnie [591]
Fototoksyczność	Dane przekrojowe dla karboksymetylobetaglukanu sodu: brak potencjału fotoalergicznego, w teście płatkowym, przeprowadzonym na ochotnikach [586]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Przeprowadzono badanie toksyczności reprodukcyjnej w trzech pokoleniach szczurów, gdzie zwierzęta karmiono gumą ksantanową

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	w ilości 0 g/kg masy ciała/dzień; 0,25 g/kg masy ciała/dzień i 0,5 g/kg masy ciała/dzień. Nie odnotowano znaczących różnic w parametrach rozwojowych między miotami testowymi i kontrolnymi, nie zaobserwowano też wad rozwojowych u potomstwa [591]
Badania z udziałem ludzi	Spożywanie gumy ksantanowej nie miało istotnego, negatywnego wpływu na parametry hematologiczne lub wyniki analizy moczu w badaniach na 5 osobnikach płci męskiej, którzy spożywali 150 mg/kg masy ciała/dzień gumy ksantanowej przez okres 23 dni. Zbadano związek pomiędzy długotrwałym narażeniem zawodowym na pył gumy ksantanowej i niekorzystnymi objawami na grupie osób pracujących przy procesie fermentacji wytwarzania gumy ksantanowej. Największa ekspozycja dotyczyła pracowników narażonych na mielenie, mieszanie i pakowanie produktu. W żadnej z grup ekspozycji nie zaobserwowano znaczących ostrych lub przewlekłych efektów w czynności płuc [595], [596]
Ocena bezpieczeństwa	Guma ksantanowa to guma polisacharydowa otrzymywana z bakterii <i>Xanthomonas campestris</i> w procesie fermentacji glukozy lub syropu kukurydzianego. Jest stosowana w prawie wszystkich kategoriach produktów kosmetycznych jako stabilizator emulsji, substancja filmotwórcza, środek wiążący, regulator lepkości i środek kondycjonujący skórę. Substancja jest również od wielu lat szeroko wykorzystywana w preparatach spożywczych i farmaceutycznych. Panel ekspertów CIR stwierdził, że guma ksantanowa jest bezpieczną substancją w obecnych praktykach jej stosowania i używanych stężeń w kosmetykach Według EFSA (Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności; European Food Safety Authority). Stosowanie gumy ksantanowej w żywności nie budzi obaw związanych z bezpieczeństwem. Guma ksantanowa jest dopuszczona przez FDA jako bezpośredni i pośredni dodatek do żywności zgodnie z określonymi warunkami dotyczącymi jej czystości. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [587], [597]

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	DEHYDROACETIC ACID
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 1480 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 > 3000 < 5000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Niedrażniący (królik, OECD 404) [598]

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Na oczy	Kwas dehydrooctowy nie powodował działania żrącego ani drażniącego na oczy w badaniach <i>in vitro</i> (OECD 438) [598]
Działanie uczulające	
Na skórę	Kwas dehydrooctowy nie działał uczulająco na skórę (OECD 429) [599]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Ogólny stan i masa ciała przy 0, 10, 30, 100 mg/kg masy ciała/dzień były niezmienione. Ponadto nie odnotowano działań niepożądanych dla mocznika we krwi ani po badaniu histopatologicznym wybranych tkanek (płuca, serca, wątroby, nerek, śledziony, nadnerczy, trzustki, jąder i żołądka). Przy stracie 300 mg/kg masy ciała/dzień wystąpiły dwa zgony (7 i 11 dni). Pozostałe zwierzęta przy 300 mg/kg masy ciała/dzień zabito po 11 dniach (7 dawek). Zwierzęta te straciły od 20 do 30 % wag. masy ciała, były chude i zaniedbane. Badanie każdego z tych zwierząt ujawniło wyraźne wycieńczenie i skurcz żołądka z zabarwioną krwią treścią, przekrwienie błony śluzowej i kilka obszarów krwotocznych. Oceniono, że NOAEL wynosi 100 mg/kg masy ciała/dzień [600]
Genotoksyczność	Niegenotoksyczny w teście Ames z użyciem szczepów <i>S. typhimurium</i> . Niegenotoksyczny w teście mikrojądrowym u myszy [600]
Fototoksyczność	Dane przekrojowe dla dehydrooctanu sodu: substancja nie była fotouczulająca w powtarzanym teście płatkowym u ludzi przy ekspozycji na promieniowanie UV [601]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	W badaniach na szczurach zaobserwowano toksyczny wpływ na matkę jako zmniejszenie spożycia pokarmu i obniżenie masy ciała. NOAEL dla toksyczności matczynej, szczur = 50 mg/kg masy ciała/dzień. W prenatalnym badaniu toksyczności rozwojowej na myszach zaobserwowano pewne skutki dla płodu, tj. wzrost śmiertelności płodu i masy ciała przy dawce kwasu dehydrooctowego 200 mg/kg masy ciała/dzień [602]
Badania z udziałem ludzi	Dehydrooctan sodu i kwas dehydrooctowy zostały przetestowane pod kątem podrażnień i uczuleń na losowo wybranym panelu 100 mężczyzn i 100 kobiet. Nie zaobserwowano żadnych reakcji u żadnego z 200 panelistów po pierwszym lub drugim zastosowaniu [603]
Ocena bezpieczeństwa	Kwas dehydrooctowy jest bezpieczny do stosowania w kosmetykach jako substancja konserwująca. Kwas dehydrooctowy wymieniony jest w załączniku V rozporządzenia 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych. (substancje konserwujące, dozwolone w produktach kosmetycznych) rozporządzenia 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych. Jest dopuszczony do stosowania w maksymalnym stężeniu 0,6 % wag. wyrażonym jako kwas i jest zabroniony produktach aerozolowych (sprayach). CIR w 1985 r. w swoim raporcie uznał kwas dehydrooctowy za bezpieczny składnik kosmetyczny. Oceniał, że jest skutecznym środkiem konserwującym w niskich stężeniach w optymalnym

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	<p>zakresie pH od 2 do 4. CIR w 2006 r. przeanalizował nowe dostępne dane o kwasie dehydrooctowym i potwierdził pierwotny wniosek</p> <p>Bezpieczeństwo czystej substancji</p> <p>Według zharmonizowanej klasyfikacji i oznakowania zatwierdzonej przez Unię Europejską, substancja ta jest szkodliwa w przypadku połknięcia (zaklasyfikowana jako substancja stwarzająca zagrożenie H302). Substancja zastosowana w produktach kosmetycznych w odpowiednich warunkach nie powoduje takiego efektu. Klasyfikacja CLP odnosi się wyłącznie do substancji w czystej postaci.</p> <p>Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa - MoS>100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [603], [604]</p>
--	---

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	LIMONENE (LIMONEN)
Absorbacja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 5300 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	n/d
Dermalna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę królika (OECD 404) [605]
Na oczy	Nie działa drażniąco na oczy (królik) (OECD 405) [605]
Działanie uczulające	
Na skórę	W warunkach testowych, d-limonen jest klasyfikowany jako "R43 Może powodować uczulenie w kontakcie ze skórą", zgodnie z kryteriami określonymi w załączniku VI do dyrektywy 67/548/EWG i "kategorii 1" zgodnie z rozporządzeniem CLP (WE) nr ° C (1272-2008). Test <i>in vivo</i> na myszach [606]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Uznano, że NOAEL dla samców i samic szczurów wynosi odpowiednio 825 mg/kg masy ciała/dzień i 1650 mg/kg mc/dzień. Uznano, że LOAEL dla samców i samic szczurów wynosi odpowiednio 1650 mg/kg masy ciała/dzień i 3300 mg/kg masy ciała/dzień, na podstawie zmniejszonego przyrostu masy ciała [607]
Genotoksyczność	Zgodnie z przeprowadzonymi badaniami <i>in vitro</i> d-limonen nie jest uważany za genotoksyczny w komórkach chomika chińskiego zgodnie z kryteriami określonymi w załączniku VI do dyrektywy 67/548 / EWG i rozporządzenia CLP (WE) nr (1272-2008) [608]
Kancerogenność	D-limonen był badany w badaniach rakotwórczości na szczurach i myszach (2-letnie badanie zgłębnikiem). U samców szczurów obserwowano zwiększoną częstość występowania przerostu komórek kanalików nerkowych, gruczolaków i gruczolakoraków nerek. Nie zgłoszono zwiększonej częstości występowania nowotworów u samic szczurów i myszy. Udowodniono, że

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	mechanizm nefrokarcynogenności jest specyficzny dla samców szczurów i nie ma znaczenia dla ludzi [609]
Fototoksyczność	Olejek ze słodkiej pomarańczy nie działa fototoksycznie [610]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	<p>Uznano, że NOAEL wynosi 500 mg/kg masy ciała/dzień. Uznano, że LOAEL wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień zarówno dla samic, jak i samców myszy, na podstawie obserwacji objawów klinicznych u obu płci i zmniejszonej masy ciała u samców. Nie zaobserwowano wpływu na narządy rozrodcze ani na poziomie makroskopowym, ani mikroskopowym, dlatego nie przewiduje się wpływu na zdolność rozrodczą.</p> <p>D-limonen nie wykazywał działania teratogennego u płodów królików i uznano, że NOAEL dla toksyczności dla płodu przekracza 1000 mg/kg masy ciała/dzień. Za NOAEL dla toksyczności matczynej uznano 250 mg/kg masy ciała/dzień na podstawie zmniejszonego przyrostu masy ciała [611]</p>
Badania z udziałem ludzi	NOEL (najwyższe badane stężenie bez uczulenia u ludzi), oparte na ludzkim teście płatkowym z powtarzającym się narażeniem, wyniosło 10000 µg/cm ² . Ta wartość jest bardzo zbliżona do średnich ważonych wartości LLNA z pięciu badań LLNA (= 10075 µg/cm ²) [612]
Ocena bezpieczeństwa	<p>Limonen jest bezpieczny do stosowania w produktach kosmetycznych. Rozporządzenie 1223/2009 dotyczące produktów kosmetycznych: Limonen znajduje się na liście substancji, które mogą być zawarte w produktach kosmetycznych wyłącznie z zastrzeżeniem określonych ograniczeń (zał. III Rozporządzenia 1223, pozycja 88, 167, 168). Jeżeli d-Limonen znajduje się w danym produkcie kosmetycznym to obecność substancji musi być uwzględniona w wykazie składników umieszczonym na etykiecie produktu, gdy jej stężenie przekracza: 0,001 % wag. w produkcie niespłukiwanym – 0,01 % wag. w produkcie spłukiwanym</p> <p>Opinia SCCNFP (Scientific Committee for Cosmetic Products and Non-food Products intended for Consumers): SCCNFP w 1999 r. uznało produkty utleniania d-limonenu za silne alergeny. Częstość alergii kontaktowej na utleniony limonen wynosi 1 – 2 % wag.. SCCNFP w 2001 r. umieścił limonen na liście substancji perfumeryjnych, które nie mogą wchodzić w skład produktów kosmetycznych z wyjątkiem określonych ograniczeń i warunków. Limonen i produkty naturalne zawierające jego znaczne ilości powinny być stosowane tylko wtedy, gdy poziom nadtlenu jest utrzymywany na najniższym praktycznym poziomie, na przykład poprzez dodanie przeciwutleniaczy w trakcie produkcji. Takie produkty powinny mieć liczbę nadtlenu mniejszą niż 20 milimoli nadtlenu na litr (wytyczne IFRA). Opinia SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety): SCCS w 2011 r. uznał Limonen za substancję o potencjale uczulającym. SCCS sugeruje, że obecność utlenionej frakcji (zawartość nadtlenu) nie powinna być wyższa niż 0,001 % wag.</p>

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	(10 ppm) dla substancji lub 0,01 % wag. (100 ppm) dla końcowego produktu kosmetycznego [610], [613]
Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	ARTEMISIA ABSINTHIUM EXTRACT (EKSTRAKT Z PIOŁUNU)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	Nie działa toksycznie, po podaniu doustnym (mysz)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	N/D
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę (szczur) [614]
Na oczy	Brak danych literaturowych
Działanie uczulające	
Na skórę	Nie działa uczulająco na skórę (szczur) [614]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Przeprowadzono 13 - tygodniowe badanie toksyczności ekstraktu z piołunu po podaniu wielokrotnym u szczurów Wistar Hannover (GALAS) obu płci. Szczury podzielono na 4 grupy składające się z 10 samców i 10 samic każda i podano im wodę zawierającą 0 % wag., 0,125 % wag., 0,5 % wag. lub 2 % wag. ekstraktu z piołunu. Wszystkie szczury przeżyły do końca badania. W masach ciała, badaniach hematologicznych i biochemicznych surowicy, masie narządów i badaniach histopatologicznych nie zaobserwowano żadnych zmian wskazujących na oczywiste toksyczności, które można przypisać leczeniu ekstraktem z piołunu. Na podstawie wyników niniejszego badania oszacowano, że NOAEL (poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków) ekstraktu z piołunu szczurów Wistar Hannover wynosi 2 % wag. (co odpowiada 1,27 g/kg masy ciała/dzień u samców i 2,06 g/kg masy ciała/dzień u samic lub więcej) [615]
Genotoksyczność	<i>Artemisia absinthium L.</i> to tradycyjna roślina lecznicza należąca do rodziny astrowatych i powszechnie znana jako piołun. Piołun jest tradycyjnie stosowany jako środek przeciwbaczy, antyseptyczny, przeciwskurczowy oraz na czerwonkę prątkową, nowotwory i choroby neurodegeneracyjne. Celem badania było zbadanie genotoksycznego działania ekstraktu z liści piołunu na komórki szpiku kostnego myszy. Po wstrzyknięciu myszom ekstraktu o różnych stężeniach, w różnych odstępach czasu, określono aberracje chromosomowe (CA) i indeks mitotyczny (MI) komórek szpiku kostnego. Uzyskane wyniki wykazały, że ekstrakt nasilał, ale nie znacząco, powstawanie aberracji chromosomowych na komórkach szpiku kostnego myszy, w sposób zależny od dawki i czasu. Wyniki indeksu mitotycznego (MI) wykazały znaczny spadek podziału komórek i prawie wszystkie stężenia powodowały niski MI w porównaniu z kontrolą. Wyniki wykazały, że wysokie

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	<p>dawki <i>Artemisia absinthium L.</i> o długim czasie działania powodowały tygodniowy efekt aberracji chromosomowych. Wyniki niniejszego badania udokumentowały, że <i>Artemisia absinthium L.</i> może przyczyniać się do szerokich właściwości terapeutycznych deklarowanych przez medycynę ludową, a jej niskie dawki stanowią bezpieczeństwo [616]</p>
<p>Kancerogenność</p>	<p>Według raportu CIR z dwuletnich badań podawania przez sondę szczurów (poziomy dawek 12,5 mg/kg masy ciała, 25 mg/kg masy ciała i 50 mg/kg masy ciała) i myszy (poziomy dawek 3 mg/kg masy ciała, 6 mg/kg masy ciała, 12 mg/kg masy ciała, 25 mg/kg masy ciała) stwierdzono pewne dowody rakotwórczego działania α, β-tujonu u samców szczurów F344/N na podstawie zwiększonej częstości występowania nowotworów gruczołu napletkowego przy dawce 25 mg/kg (wszystkie szczury przy dawce 50 mg/kg zmarły przed zakończeniem badania); zwiększona częstość występowania łagodnego guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy mogła być związana z podawaniem α, β-tujonu samcom szczurów, którym podawano dawkę 12,5 mg/kg masy ciała lub 25 mg/kg masy ciała. Nie było dowodów na działanie rakotwórcze α, β-tujonu u samic szczurów, którym podawano dawki 12,5 mg/kg masy ciała lub 25 mg/kg masy ciała. Nie było dowodów na działanie rakotwórcze α, β-tujonu u samców i samic myszy, którym podawano dawki 3 mg/kg masy ciała, 6 mg/kg masy ciała lub 12 mg/kg masy ciała. W tym samym dwuletnim badaniu podawanie α, β-tujonu spowodowało zwiększoną częstość występowania napadów drgawkowych u szczurów i myszy w sposób zależny od dawki oraz zwiększoną częstość występowania zmian nienowotworowych w mózgu i śledzionie samców i samic. Szczury: nerki samców szczurów i przysadka mózgowa samic szczurów zwykle przy dwóch najwyższych poziomach dawek (25 mg/kg masy ciała i 50 mg/kg masy ciała) [617]</p>
<p>Fototoksyczność</p>	<p>Brak danych literaturowych</p>
<p>Toksyczność rozrodcza i rozwojowa</p>	<p>Badania wpływu na płodność przeprowadzono na szczurach albinosach rasy Wistar o potwierdzonej płodności. Działanie przeciwplodnościowe etanolowego suchego ekstraktu (50 % wag. EtOH) z liści piołunu oceniano pod względem działania przeciwoowulacyjnego, przeciwiimplantacyjnego lub poronnego w porównaniu z kontrolami, którym podano nośnik. Po 10-dniowym leczeniu samic szczurów nie zaobserwowano żadnego wpływu na owulację i fazy cyklu rujowego. Ciężarne samice szczurów leczono suchym ekstraktem od 1 do 7 dnia ciąży. W dniu 10 rejestrowano liczbę miejsc implantacji u każdego zwierzęcia. Tylko 2 z 6 szczurów zaszły w ciążę, a liczba urodzonych młodych na szczura była zmniejszona w porównaniu z kontrolą. Ponadto ciężarnym samicom szczurów podawano suchy ekstrakt od 11 do 13 dnia ciąży. Wszystkie zwierzęta badano pod kątem krwawienia z pochwy w dniach od 12 do 16 i w dniu 20; zabijano je i rejestrowano liczbę płodów żywych</p>

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	i martwych. Piołun (200 mg/kg masy ciała) znacząco zmniejszał miejsca implantacji (2 z 6 szczurów zaszło w ciążę), a liczba urodzonych młodych na szczura uległa zmniejszeniu w porównaniu z grupą kontrolną [617]. Brak dostępnych danych z badań dotyczących reprodukcji i rozwoju wodnych preparatów piołunu
Badania z udziałem ludzi	Brak danych literaturowych
Ocena bezpieczeństwa	Piołun w medycynie tradycyjnej znany jako <i>A. absinthium</i> ma różne właściwości lecznicze, takie jak działanie przeciwcukrzycowe, przeciwnadciśnieniowe, przeciwbólowe, przeciwgorączkowe, przeciwskurczowe, przeciwzapalne i poprawiające pamięć, a także właściwości gojące rany i chroniące skórę W ocenianym produkcie jest to składnik bezpieczny, a wyliczony MoS spełnia kryteria akceptacji

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	ARNICA MONTANA FLOWER EXTRACT (EKSTRAKT Z KWIATÓW ARNIKI GÓRSKIEJ)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę królika [422]
Na oczy	Brak danych literaturowych
Działanie uczulające	
Na skórę	Nie działa uczulająco na skórę świnki morskiej [422]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Brak danych literaturowych.
Genotoksyczność	Potencjał mutageny ekstraktu z arniki oznaczono w teście Ames przy użyciu szczepów <i>Salmonella typhimurium</i> . Oceniano roztwory etanolowe z aktywacją metaboliczną i bez niej. Ekstrakt z arniki powodował dwu- do czterokrotny wzrost liczby rewertantów w porównaniu do kontroli z <i>S. typhimurium</i> z aktywacją metaboliczną i bez niej oraz z <i>S. typhimurium</i> z aktywacją metaboliczną; nie zaobserwowano wzrostu w przypadku bez aktywacji metabolicznej. Naukowcy ustalili, że działanie mutagenne można przypisać flawonolom obecnym w arnicy [422]
Kancerogenność	Brak danych literaturowych
Fototoksyczność	Nie działa fototoksycznie na skórę myszy [422]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Brak danych literaturowych
Badania z udziałem ludzi	Potencjał drażniący kremu do twarzy zawierającego 1 % wag. mieszaniny ekstraktu z arniki Montana i oleju z nasion słonecznika określono w teście okluzyjnym z pojedynczym narażeniem na

WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

	15 osobach. Nie obserwowano działania drażniącego i uczulającego [422]
Ocena bezpieczeństwa	<p>Właściwości farmakologiczne kwiatów arniki są wynikiem działania głównie laktonów seskwiterpenowych i flawonoidów. Mechanizm działania przeciwzapalnego arniki (badania <i>in vitro</i>) polega na hamowaniu uwalniania czynników prozapalnych: NF-κB, NF-AT i produktów przemian metabolicznych kwasu arachidonowego. Surowiec ten stosowany jest tylko zewnętrznie w tępych urazach (stłuczenia, skręcenia, siniaki), a także w bólach mięśniowych i reumatycznych. Silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, dorównujące aktywności antybiotyków, uzasadniają stosowanie kwiatów arniki w dermatozach. Głównymi związkami odpowiedzialnymi za właściwości terapeutyczne surowca są laktony seskwiterpenowe z grupy pseudogwajanolidów, głównie helenalina i octan 11α,13-dwuhydrohelenaliny, a także flawonoidy – głównie 3β-glukuronidy: kwercetyny, kemferolu i izoramnetyny. Ponadto kwiaty arniki górskiej zawierają triterpeny (arnidiol, faradiol), kwasy fenolowe (kwas kawowy i jego estry), kumaryny, olejek eteryczny, karotenoidy, irydoidy oraz alkaloidy pirolizydynowe (tussilagina i izotussilagina), niewykazujące działania hepatotoksycznego. W ocenianym produkcie jest to składnik bezpieczny</p>

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	LINALOOL (LINALOL)
Absorbcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 2790 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	LC50 > 20 mg (mysz)
Dermalna	LD50 5610 mg/kg masy ciała (królik)
Działanie drażniące	
Na skórę	Działa drażniąco na skórę królika w teście OECD 404 [618]
Na oczy	Działa drażniąco na oczy królika (OECD 405) [619]
Działanie uczulające	
Na skórę	Działa uczulająco na skórę w teście OECD 429 [620]
Toksyczność dawki powtarzalnej	W warunkach badania i na podstawie ocenionych toksykologicznych punktów końcowych ustalono, że poziom bez obserwowanych działań niepożądanych (NOAEL) dla podawania badanego elementu w diecie wynosił 497,9 mg/kg masy ciała/dzień i 532,1 mg/kg masy ciała/dzień dla samców i samic szczurów Sprague-Dawley, odpowiednio, w oparciu o skorygowane poziomy spożycia w matrycy żywieniowej najwyższej badanej dawki [621]
Genotoksyczność	<p>Linalol nie wykazywał działania mutagennego z aktywacją metaboliczną ani bez aktywacji metabolicznej w teście postępującej mutacji chłoniaka myszy w warunkach badania (OECD 476)</p> <p>Linalol nie wykazuje działania mutagennego w teście mikrojądrowym w warunkach doświadczalnych (OECD 474) [622]</p>

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Kancerogenność	Wyniki wskazują, że linalol nie wydłużył znacząco latencji guza ani nie zmniejszył całkowitej liczby obserwowanych guzów w porównaniu z kontrolami. W warunkach tego badania stwierdzono, że 20-tygodniowa ekspozycja na linalol w diecie nie hamowała karcynogenezy sutka, a także nie zwiększała częstości występowania nowotworów [623]
Fototoksyczność	Nie działa fototoksycznie i fotouczulająco [623]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	W badaniu toksyczności rozrodczej NOAEL dla samic i potomstwa ustalono na 200 mg/kg masy ciała/dzień, dla samców NOAEL ustalono na 750 mg/kg masy ciała/dzień W warunkach tego badania, poziom bez obserwowanych działań niepożądanych (NOAEL) dla toksyczności matczynej linalolu ustalono na 500 mg/kg masy ciała/dzień ze względu na wpływ na przyrost masy ciała i spożycie paszy (odwracalne po okresie leczenia). Dla toksyczności rozwojowej ustalono NOAEL 1000 mg/kg masy ciała/dzień [624]
Badania z udziałem ludzi	Test HRIPT wykazał, że linalol wywołuje jedynie słaby, minimalny rumień u 1 na 117 i 119 osób ocenianych w drugim i trzecim odczycie po prowokacji [625]
Ocena bezpieczeństwa	Linalol jest bezpieczny do stosowania w produktach kosmetycznych. Rozporządzenie 1223/2009 dotyczące produktów kosmetycznych: linalol znajduje się na liście substancji, które mogą być zawarte w produktach kosmetycznych wyłącznie z zastrzeżeniem określonych ograniczeń. Jeżeli linalol znajduje się w danym produkcie kosmetycznym to obecność substancji musi być uwzględniona w wykazie składników umieszczonym na etykiecie produktu, gdy jej stężenie przekracza: 0,001 % wag. w produkcie niespłukiwanym – 0,01 % wag. w produkcie spłukiwanym Opinia SCCNFP (Scientific Committee for Cosmetic Products and Non-food Products intended for Consumers): SCCNFP w 1999 r. uznało linalol za substancję o potencjale alergizującym. Opinia SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety): SCCS w 2011 r. uznał linalol za substancję o potencjale uczulającym. SCCS sugeruje, że obecność utlenionej frakcji (zawartość nadtlenków) nie powinna być wyższa niż 0,001 % wag. (10 ppm) dla substancji lub 0,01 % wag. (100 ppm) dla końcowego produktu kosmetycznego. Bezpieczeństwo czystej substancji: Brak dodatkowej klasyfikacji jako substancja niebezpieczna zgodnie z przepisami chemicznymi
Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	SODIUM BENZOATE (BENZOESAN SODU)
Absorbacja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	Dane przekrojowe z kwasu benzooesowego: LD50 oralnie, szczur = 3140 mg/kg masy ciała (<i>In vivo</i> test ostrej toksyczności doustnej)

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Inhalacyjna	Dane przekrojowe z kwasu benzoesowego: LC50 inhalacyjnie, szczur > 0,026 mg/dm ³ /godzinę (<i>In vivo</i> test ostrej toksyczności inhalacyjnej)
Dermalna	Dane przekrojowe z kwasu benzoesowego: LD50 dermalnie, królik > 5000 mg/kg masy ciała (<i>In vivo</i> test ostrej toksyczności dermalnej)
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę w badaniach na królikach (OECD 404, Draize test) [626]
Na oczy	Benzoosan sodu był lekko drażniący dla oczu w teście Draize'a na królikach (OECD 405) [626]
Działanie uczulające	
Na skórę	Dane przekrojowe z benzoesanu benzylu: przeprowadzono kilka testów maksymalizacji świnki morskiej dla tego związku. W rezultacie benzoosan benzylu okazał się być substancją nieuczulającą lub umiarkowanie uczulającą skórę [627]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Toksyczność dawki powtarzalnej (30 dni) doustna: Poziomy dawek od 16 do 1090 mg benzoesanu sodu/kg masy ciała podawano szczurom przez 30 dni. Nie zaobserwowano działań niepożądanych zależnych od dawki [628] Toksyczność chroniczna (> 12 MIESIĘCY): NOAEL oralny, szczur, 18 do 24 miesięcy = 1000 mg/kg masy ciała/dzień [626]
Genotoksyczność	Na podstawie wyników testu mutacji powrotnych (OECD 471) u bakterii <i>S. typhimurium</i> i <i>E. coli</i> stwierdzono, że substancja nie jest mutagenna [626] Brak potencjału genotoksycznego w teście aberracji chromosomowych komórek szpiku kostnego u szczurów (test OECD 475) [626]
Kancerogenność	Benzoosan sodu nie wykazywał działania rakotwórczego w badaniach przewlekłych na szczurach i myszach w dawkach 1000 mg/kg masy ciała/dzień i wyższych. Zwierzęta utrzymywano na diecie zawierającej 2 % wag. lub 1 % wag. badanej substancji przez 18 do 24 miesięcy. Dlatego uzyskana wartość NOAEL wynosiła > 1000 mg/kg masy ciała/dzień [626]
Fototoksyczność	Dane przekrojowe z alkoholu benzylowego i benzoesanu benzylu: w celu oceny fototoksyczności zastosowano test fotohemolizy <i>in vitro</i> w zawiesinie ludzkich erytrocytów. W rezultacie stwierdzono, że alkohol benzylowy jest słabo fototoksycznym związkiem, podczas gdy benzoosan benzylu nie był fototoksyczny w obecności światła UVA lub UVB. Fototoksyczność benzoesanu benzylu oceniano <i>in vivo</i> . W badaniach na myszach zaobserwowano nieznacznie pozytywną reakcję po 4-godzinnej ekspozycji na promieniowanie po podaniu badanej substancji. W innym eksperymencie na świnkach morskich nie zaobserwowano działania fotodrażniającego dla żadnego z testowanych stężeń benzoesanu benzylu (10 % wag., 30 % wag. i 50 % wag.) [628], [629]

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	<p>Wykazano działanie fotogenotoksyczne kwasu benzooesowego (0,5 % wag.) i benzoesanu sodu (0,5 % wag.) w badaniach <i>in vitro</i> przy użyciu zawiesin komórek <i>E. coli</i> [630]</p>
<p>Toksyczność rozrodcza i rozwojowa</p>	<p>Dane przekrojowe z kwasu benzooesowego: przeprowadzono czteropokoleniowe badania na szczurach. Nie stwierdzono niekorzystnych skutków ubocznych dla wzrostu, spożycia pokarmu, przeżywalności, prokreacji, karmienia potomstwa i masy narządów w grupie dawek 1 %. NOAEL = 500 mg/kg masy ciała/dzień [627]</p> <p>W badaniach na szczurach (OECD 414) nie stwierdzono wyraźnie dostrzegalnego wpływu benzoesanu sodu na poród i przeżycie matki lub płodu. NOAEL teratogeny dla tego badania wynosił ≥ 175 mg/kg masy ciała/dzień [626]</p>
<p>Badania z udziałem ludzi</p>	<p>Dostępne są dane dotyczące testów płatkowych przeprowadzonych na ludziach w celu zbadania działania uczulającego benzoesanu sodu. W jednym z testów przeprowadzonym wśród 2045 pacjentów zaobserwowano 5 pozytywnych wyników dla badanej substancji. W innym badaniu odnotowano nieimmunologiczną pokrzywkę kontaktową. Ogólnie benzoesan sodu wykazywał bardzo niską częstość występowania uczulenia skóry u ludzi. Według raportu wstępnej oceny OECD dotyczącego benzoesanów, kwasu benzooesowego i alkoholu benzylowego substancje te lekko podrażniają skórę. Z drugiej strony przyjęto, że narażenie zawodowe na alkohol benzylowy, kwas benzooesowy lub benzoesan sodu nie powodowało alergii przez dziesięciolecia [627], [629]</p>
<p>Ocena bezpieczeństwa</p>	<p>Benzoesan sodu, jest to sól sodowa kwasu benzooesowego, wytwarzana przez neutralizację kwasu benzooesowego za pomocą wodorowęglanu sodu, węglanu sodu lub wodorotlenku sodu. Substancja ta jest od wielu lat szeroko stosowana jako środek konserwujący w produktach do higieny osobistej, żywności i lekach. Na podstawie danych dostarczonych w opinii Komitetu Naukowego ds. Produktów Kosmetycznych i Produktów Nieżywnościowych Przeznaczonych dla Konsumentów, nr: SCCNFP/0532/01 oraz Komitetu Naukowego ds. Produktów Konsumenckich, nr: SCCP/0891/05, Komitet SCCP wydał opinię, że benzoesan sodu jest bezpieczny do stosowania w celach konserwujących i innych w produktach kosmetycznych spłukiwanych w maksymalnym stężeniu 2,5 % wag., w produktach do pielęgnacji jamy ustnej do 1,7 % wag. oraz w produktach niespłukiwanych do 0,5 % wag.. Panel ekspertów CIR stwierdził, że benzoesan sodu jest bezpieczną substancją w obecnych praktykach jej stosowania i używanych stężeń w kosmetykach. Benzoesan sodu został uznany przez FDA za substancję GRAS. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [627], [631]</p>

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Ocena toksykologiczna	
NAZWA INCI	POTASSIUM SORBATE (SORBINIAN POTASU)
Absorbcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 4200 - 6170 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	Dane przekrojowe z kwasu sorbowego: Nie zaobserwowano śmiertelności po 7 dniach badania ostrej toksyczności inhalacyjnej <i>in vivo</i> na królikach
Dermalna	LD50 > 2000 mg/kg masy ciała (szczur)
Działania drażniące	
Na skórę	Sorbinian potasu nie działał drażniąco na skórę w badaniach na królikach [632]
Na oczy	W badaniach <i>in vivo</i> na królikach stwierdzono, że sorbinian potasu działa drażniąco na oczy [632]
Działanie uczulające	
Na skórę	Sorbinian potasu nie wykazywał działania uczulającego na skórę w zmodyfikowanym teście maksymalizacji świnki morskiej [634]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Toksyczność subchroniczna (90 dni) doustna: NOAEL oralny, szczur, 90 dni = 6800 mg/kg masy ciała/dzień NOAEL oralny, pies, 90 dni = 1000 mg/kg masy ciała/dzień Toksyczność chroniczna (> 12 miesięcy): NOAEL oralny, szczur, 24 miesiące = 750 mg/kg masy ciała/dzień NOAEL oralny, mysz, 18 miesięcy = 1400 mg/kg masy ciała/dzień [633]
Genotoksyczność	Mutagenność/genotoksyczność <i>in vitro</i>: Sorbinian potasu nie wykazywał działania mutagennego w teście mutacji powrotnych przy użyciu szczepów <i>S. typhimurium</i> [632] Mutagenność/genotoksyczność <i>in vivo</i>: Niegenotoksyczny w teście na komórkach wątroby szczurów przy użyciu metody elucji alkalicznej [634]
Kancerogenność	Nie jest rakotwórczy. Sorbinian potasu w stężeniu 0,1 % wag. i 0,3 % wag. podawany szczurom w wodzie pitnej przez okres do 100 tygodni nie wywoływał powstawania nowotworów [632]
Fototoksyczność	Nie znaleziono danych w dostępnej literaturze
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Działanie szkodliwe na płodność i reprodukcję: Dane przekrojowe z kwasu sorbowego (OECD 416): NOAEL dla toksyczności rozwojowej, szczur = 300 mg/kg masy ciała/dzień, NOAEL dla toksyczności rodzicielskiej, szczur = 1000 mg/kg masy ciała/dzień [634] Toksyczność rozwojowa: Dane z badań prenatalnych toksyczności rozwojowej sorbinianu potasu: NO(A)EL dla toksyczności matczynej, szczur = 340 mg/kg masy ciała/dzień,

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

	NO(A)EL embriotoksyczny, teratogeny, szczur = 340 mg/kg masy ciała/dzień [632]
Badania z udziałem ludzi	Produkt nawilżający zawierający 0,15 % wag. sorbinianu potasu oceniano pod kątem działania uczulającego i podrażniającego na skórze u ochotników, stosując test płatkowy typu RIPT (Repeat Insult Patch Test). Wyniki pokazały, że produkt nie działał drażniaco nie powodował też alergicznego kontaktowego uczulenia skóry. W innym badaniu RIPT zbadano peeling do twarzy z 0,1 % wag. sorbinianu potasu z udziałem 53 pacjentów. W fazie indukcji zaobserwowano siedem minimalnych reakcji rumieniowych. Preparat był bardzo łagodnym skumulowanym środkiem drażniącym, ale nie był pierwotnym środkiem drażniącym i nie powodował uczulenia [635]
Ocena bezpieczeństwa	Sorbinian potasu, Potassium Sorbate jest solą potasową kwasu sorbowego. Substancja ta posiada długą historię stosowania jako środek konserwujący w kosmetykach, preparatach farmaceutycznych, lekach i żywności. Panel ekspertów CIR stwierdził, że sorbinian potasu jest bezpieczną substancją w obecnych praktykach jej stosowania i używanych stężeń w kosmetykach. Substancja jest wymieniona na liście GRAS przez FDA jako środek konserwujący żywność, jeżeli jest stosowany zgodnie z dobrą praktyką wytwarzania. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa - MoS>100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [634], [635]

Stwierdza się, że oceniany produkt, o zadeklarowanym przez producenta składzie, może zostać oceniony jako bezpieczny dla zdrowia ludzkiego, gdy jest użytkowany w normalnych i dających się racjonalnie przewidzieć warunkach stosowania zgodnie z wymaganiami Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczącego produktów kosmetycznych (Dz. U. L 342 z 22.12.2009), którego przepisy w pełni obowiązują od dnia 11 lipca 2013 r. (w szczególności Rozdział III, Artykuł 3 i 10). Surowce zastosowane w ocenianym produkcie są powszechnie stosowane w przemyśle kosmetycznym w Europie i na świecie. Wszystkie składniki są użyte zgodnie z przeznaczeniem i we właściwych ilościach. Produkt jest bezpieczny zgodnie z aktualnym stanem wiedzy. Niniejszej oceny dokonano w oparciu o obowiązujące prawo, uwzględniając międzynarodowe zalecenia władz i stowarzyszeń oraz własne doświadczenie zawodowe, biorąc pod uwagę zgodność użytych surowców, ich profil toksykologiczny, budowę chemiczną, właściwości fizykochemiczne, badania gotowego produktu kosmetycznego oraz rozważając poziom ekspozycji.

5.7.5.3. Ocena bezpieczeństwa substancji lub mieszanin

Surowce użyte w niniejszym produkcie są dobrze znanymi składnikami o długiej historii bezpiecznego stosowania. Ogólnie rzecz biorąc, związki zawarte w ocenianym produkcie mają niską częstość występowania działań niepożądanych. Wszystkie surowce użyte w formule zostały zastosowane zgodnie z ich przeznaczeniem, w dozwolonej ilości i nie stanowią zagrożenia dla zdrowia ludzkiego.

Produkt kosmetyczny nie zawiera substancji wymienionych na liście substancji zabronionych w załączniku II Rozporządzenia (WE) nr 1223/2009.

Wszystkie wykorzystane surowce zostały ocenione jako bezpieczne składniki niniejszego produktu. Bezpieczeństwo produktu kosmetycznego opiera się na bezpieczeństwie jego składników. Biorąc pod uwagę profile toksykologiczne stosowanych składników, stwierdza się, że nie ma prawdopodobnych zagrożeń odnośnie do bezpieczeństwa wynikających z normalnych i dających się racjonalnie przewidzieć warunków stosowania tego produktu. Nie przewiduje się interakcji między substancjami zawartymi w produkcie w odniesieniu do aktualnych danych literaturowych i wyników testu stabilności.

W obliczeniach uwzględniono dane ilościowe przy zastosowaniu produktu przez osoby dorosłe i dzieci powyżej 3 roku życia, ponieważ wartość Marginesu Bezpieczeństwa (MoS), która musi zgodnie z założeniem wynosić > 100 , uwzględnia również różnice wewnątrzgatunkowe. Dla składników, dla których wyznaczono wartość NOAEL, dokonano obliczeń marginesu bezpieczeństwa. Dla surowców, dla których obliczenie marginesu bezpieczeństwa jest niemożliwe, do potwierdzenia ich bezpieczeństwa wykorzystano dostępne dane literaturowe pochodzące z następujących baz: CIR (Cosmetic Ingredient Review), ECHA (European Chemicals Agency), RTECS (The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances database), SCCS (The Scientific Committee on Consumer Safety), PubChem (National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information), DART (Developmental and Reproductive Toxicology Database).

5.7.5.4. Ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego

Biorąc pod uwagę niezwykle bogate składy produktów kosmetycznych w dzisiejszych czasach, trzeba je rozpatrywać całościowo jako wieloskładnikowe mieszaniny składników, które potencjalnie mogą ze sobą reagować, wykazywać działanie synergistyczne pod kątem drażniącym, uczulającym, kancerogennym itd.. Ocena gotowego wyrobu stanowi sumę ryzyka i możliwości wystąpienia działań niepożądanych, aby rzetelnie przedstawić realne zagrożenie związane ze stosowaniem produktu. W tabeli 49 przedstawiono wnioski dotyczące analizy bezpieczeństwa dla produktu emulsja rozgrzewająca.

Tab. 49. Ocena bezpieczeństwa gotowego wyrobu pod nazwą emulsja rozgrzewająca

Długotrwałe narażenie	Nie przewiduje się, aby produkt końcowy miał długotrwałe skutki dla zdrowia
Narządy docelowe	Nie są spodziewane niekorzystne skutki zdrowotne w narządach docelowych na skutek stosowania gotowego produktu
Działanie rakotwórcze	Nie przewiduje się, aby produkt końcowy miał działanie rakotwórcze (w oparciu o właściwości poszczególnych składników)
Kontakt ze skórą/ toksyczność dla skóry	Dostępne dane wskazują, że niniejszy produkt kosmetyczny nie powinien stwarzać zagrożenia podczas normalnego użytkowania
Działanie fototoksyczne i fotoalergizujące	Nie przewiduje się działania fototoksycznego produktu
Uszkodzenie narządów wewnętrznych po kontakcie ze skórą	Mało prawdopodobne, biorąc pod uwagę kinetykę przenikania poszczególnych substancji, jak i mieszaniny
Kontakt z oczami / toksyczność dla oczu	Jeśli produkt dostanie się do oka może to wywołać efekt podrażnienia, dlatego należy podczas stosowania unikać kontaktu z oczami i omijać ich okolice
Połknięcie/ toksyczność doustna	Produkt stosowany zgodnie z przeznaczeniem nie powinien powodować podrażnienia przewodu pokarmowego. W razie przypadkowego połknięcia produkt może spowodować przemijające łagodne podrażnienie - dyskomfort w przewodzie pokarmowym
Wdychanie/ toksyczność inhalacyjna	Forma i skład produktu wskazują, że jest mało prawdopodobne, aby inhalacja stanowiła drogę narażenia
Stabilność produktu kosmetycznego	Wykonane badania stabilności i kompatybilności potwierdzają, że produkt w całym terminie przydatności będzie stabilny i bezpieczny, a opakowanie będzie spełniało zakładane funkcje i nie zajdzie między nim a masą produktu żadna niepożądana interakcja
Bezpieczeństwo mikrobiologiczne produktu kosmetycznego	Badanie mikrobiologiczne oraz test stabilności mikrobiologicznej (test konserwacji) wskazują na trwałość i czystość mikrobiologiczną ocenianego produktu oraz na skuteczność zastosowanego układu konserwującego
Właściwości drażniące i alergizujące produktu kosmetycznego	Przeprowadzone badania dermatologiczne na skórze normalnej – potwierdziły brak właściwości drażniących i alergizujących kosmetyku

Produkt został oceniany jako bezpieczny produkt kosmetyczny w normalnych i dających się racjonalnie przewidzieć warunkach stosowania. Jednakże w indywidualnych przypadkach może wystąpić nadwrażliwość na niektóre składniki. Wówczas takie osoby powinny zaprzestać stosowania produktu. W oparciu o powyższą analizę opracowane zostały ostrzeżenia, instrukcja stosowania, uwagi, oznakowanie oraz skład INCI przedstawione w tabeli 50. Na podstawie których możliwe było opracowanie etykiety i wyglądu produktów przedstawionych na rysunku 35.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Tab. 50. Dane do umieszczenia na etykiecie

Instrukcja stosowania	Niewielką ilość żelu zaaplikuj na oczyszczoną wcześniej skórę, rozsmaruj równomiernie do całkowitego wchłonięcia
Ostrzeżenia	Unikać kontaktu z oczami
Alergeny	Produkt zawiera następujące alergeny pochodzące z użytych surowców w ilości powyżej 10ppm: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Eucalyptus Globulus Leaf Oil ▪ Eugenia Caryophyllus Bud Oil ▪ Eugenol ▪ Limonene ▪ Linalool
Dodatkowe informacje	Brak
Uwagi	Dalsze ostrzeżenia i instrukcje dotyczące stosowania nie są konieczne, ponieważ oznakowanie i ogólny opis produktu są wystarczające, aby określić jego zastosowanie. Prezentacja produktu spełnia wymagania i zgodność Dyrektywy 87/357/EEC
Oznakowanie	Producent zgodnie z obowiązującymi przepisami jest zobowiązany do umieszczenia na opakowaniu następujących informacji: <ul style="list-style-type: none"> • nazwy produktu, • nr partii oraz daty minimalnej trwałości, • adres osoby odpowiedzialnej i/lub adres producenta, jeżeli osoba odpowiedzialna nie jest producentem, • nominalną zawartość produktu, • wykaz składników, • funkcję kosmetyku zgodną z przeznaczeniem i udokumentowaną w przypadku deklaracji zamierzonego działania zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (UE) nr 655/2013 z dnia 10 lipca 2013 r. <p>Są to informacje zgodne z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 art. 19</p>
Skład inci deklarowany na opakowaniu	Aqua, Propanediol, Glucosamine Sulfate, Epimedium Koreanum Extract, Cetearth 25, Glycetyl Stearate, Vitis Vinifera Seed Oil, Cetyl Alcohol, PEG-40 Hydrogentated Castor Oil, Butyrospermum Parkii Butter, Dimethyl Sulfone, Menthol, Propylene Glycol, Glycerin, Benzyl Alcohol, Rosmarinus Officinalis Leaf Oil, Eucalyptus Globulus Leaf Oil, Eugenia Caryophyllus Bud Oil, Eugenol, Xanthan Gum, Dehydroacetic Acid, Limonene, Artemisia Absinthium Extract, Arnica Montana Flower Extract, Linalool, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate
Projekt oznakowania	Nie oceniano oznakowania produktu
Uwagi	Brak

Rys. 35. Wzór etykiet

EN

- this product gives a feeling of relief
- improves comfort during movement
- gives a cooling feeling
- eliminates muscle tension
- it supports discomfort resulting from degenerative disease, including muscle and joint dysfunction
- gives an impression of general relaxation

PL

- produkt daje uczucie ulgi
- poprawia komfort przy poruszaniu się
- daje uczucie chłodzenia
- niweluje napięcie mięśniowe
- działa wspomagająco przy dyskomforcie spowodowanym stłuczeniami, siniakami, urazami, których konsekwencją jest opuchlizna
- daje wrażenie ogólnego odprężenia



JOINT REGENERATION,
ANALGESIC,
STIFFNESS RELIEF



10% GLUCOSAMINE SULFATE
70% EPIMEDIUM EXTRACT
ROSEMARY, EUCALYPTUS & CLOVE ESSENTIAL OILS

SKŁAD INCI: AQUA, PROPANEDIOL, GLUCOSAMINE SULFATE, EPIMEDIUM KOREANUM EXTRACT, HYDROXYETHYLCELLULOSE, PEG-40 HYDROGENATED CASTOR OIL, DIMETHYL SULFONE, MENTHOL, PROPYLENE GLYCOL, GLYCERIN, BENZYL ALCOHOL, ROSMARINUS OFFICINALIS LEAF OIL, EUCALYPTUS GLOBULUS LEAF OIL, EUGENIA CARYOPHYLLUS BUD OIL, EUGENOL, DEHYDROACETIC ACID, LIMONENE, ARTEMISIA ABSINTHIUM EXTRACT, ARNICA MONTANA FLOWER EXTRACT, LINALOOL, SODIUM BENZOATE, POTASSIUM SORBATE.

Precautions: Avoid contact with eyes and mucous membranes. For external use only. Do not apply on irritated skin. Store at room temperature.

Directions: Apply the appropriate amount of the product to the skin. Massage gently until absorbed. You can wrap it. If necessary, it can be used several times a day. Regular use increases the effect.

Uwagi: Unikaj kontaktu z oczami i błonami śluzowymi. Wyłącznie do użytku zewnętrznego. Nie stosować na podrażnioną skórę. Przechowywać w temperaturze pokojowej.

Zastosowanie: Nanieść odpowiednią ilość preparatu na skórę. Masować delikatnie aż do wchłonięcia. Można zawijać. W miarę potrzeb można stosować kilka razy dziennie. Regularne stosowanie zwiększa efekt działania.



5 903802 187168

Nr partii / Najlepiej użyć przed końcem - na opakowaniu
Invanto Sp. z o.o.
 ul. Hodowlana 5, 61-680 Poznań
500 ml

EN

- this product gives a feeling of relief
- improves comfort during movement
- gives a warming feeling
- eliminates muscle tension
- it helps with discomfort caused by bruises and injuries resulting in swelling
- gives an impression of general relaxation

PL

- produkt daje uczucie ulgi
- poprawia komfort przy poruszaniu się
- daje uczucie rozgrzewania
- niweluje napięcie mięśniowe
- działa wspomagająco w dyskomforcie wynikającym z obecności choroby zwyrodnieniowej, w tym zaburzeń pracy mięśni i stawów
- daje wrażenie ogólnego odprężenia



JOINT REGENERATION,
ANALGESIC,
STIFFNESS RELIEF



10% GLUCOSAMINE SULFATE
70% EPIMEDIUM EXTRACT
ROSEMARY, EUCALYPTUS & CLOVE ESSENTIAL OILS

SKŁAD INCI: AQUA, PROPANEDIOL, GLUCOSAMINE SULFATE, EPIMEDIUM KOREANUM EXTRACT, CETEARETH 25, GLYCERYL STEARATE, VITIS VINIFERA SEED OIL, CETYL ALCOHOL, PEG-40 HYDROGENATED CASTOR OIL, BUTYROSPERMUM PARKI BUTTER, DIMETHYL SULFONE, MENTHOL, PROPYLENE GLYCOL, GLYCERIN, BENZYL ALCOHOL, ROSMARINUS OFFICINALIS LEAF OIL, EUCALYPTUS GLOBULUS LEAF OIL, EUGENIA CARYOPHYLLUS BUD OIL, EUGENOL, XANTHAN GUM, DEHYDROACETIC ACID, LIMONENE, ARTEMISIA ABSINTHIUM EXTRACT, ARNICA MONTANA FLOWER EXTRACT, LINALOOL, SODIUM BENZOATE, POTASSIUM SORBATE.

Precautions: Avoid contact with eyes and mucous membranes. For external use only. Do not apply on irritated skin. Store at room temperature.

Directions: Apply the appropriate amount of the product to the skin. Massage gently until absorbed. You can wrap it. If necessary, it can be used several times a day. Regular use increases the effect.

Uwagi: Unikaj kontaktu z oczami i błonami śluzowymi. Wyłącznie do użytku zewnętrznego. Nie stosować na podrażnioną skórę. Przechowywać w temperaturze pokojowej.

Zastosowanie: Nanieść odpowiednią ilość preparatu na skórę. Masować delikatnie aż do wchłonięcia. Można zawijać. W miarę potrzeb można stosować kilka razy dziennie. Regularne stosowanie zwiększa efekt działania.



5 903802 187168

Nr partii / Najlepiej użyć przed końcem - na opakowaniu
Invanto Sp. z o.o.
 ul. Hodowlana 5, 61-680 Poznań
500 ml

Rys. 36. Wizualizacja gotowych produktów



6. WNIOSKI

W trakcie realizacji niniejszej pracy, z powodzeniem opracowano formułacje dwóch produktów dermokosmetycznych, tj. emulsji chłodzącej oraz rozgrzewającej, do stosowania miejscowego. Podczas prowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

- **Dobór składników aktywnych:**

- Analiza rynkowa wykazała, że dostępna jest cała gama surowców (zarówno syntetycznych, jak i pochodzenia naturalnego), dla których wskazuje się na działanie terapeutyczne względem urazów i choroby zwyrodnieniowej stawów. Mnogość surowców pozwala tworzyć niezliczone kombinacje formułacji. Wybór składników aktywnych ograniczony jest często ich właściwościami, możliwościami technologicznymi oraz ich dostępnością. Wybór stężenia ekstraktu z *Epimedium Koreanum* w ostatecznej formułacji możliwy był dopiero po oznaczeniu zawartości ikaryny w/w ekstrakcie. Analiza HPLC-MS potwierdziła obecność ikaryny w badanej próbce i wskazała zawartość średnio 168,76 ng ikaryny w 1 ml ekstraktu z *Epimedium Koreanum*.

- **Opracowanie formułacji**

- W efekcie prowadzonych badań opracowano 3 formy aplikacyjne (emulsja, żel oraz maść). Zarówno Carbomer (polimer kwasu akrylowego), jak i Cosmedia SP (poliakrylan sodu) w przypadku wysokiej zawartości elektrolitów w formułacji są niestabilne i nie tworzą układu żelującego przy standardowym dozowaniu (do 2 % wag.). Do wytworzenia stabilnego żelu oba powyższe składniki wymagają wysokich stężeń. Hydrosyetyloceluloza okazała się być stabilnym zagęstnikiem pomimo zachwianej równowagi elektrolitycznej.
- Układ emulgatorów: stearynian glicerolu (INCI: Glyceryl Sterate, SE) oraz mieszaniny alkoholi cetylowego i stearylowego oksyetylenowanych 25 molami tlenu etylenu (INCI: Cetareth-25) oraz alkoholu cetylowego (INCI: Cetyl Alcohol) pozwolił na otrzymanie stabilnej emulsji zawierającej wysokie stężenie elektrolitu.
- Z uwagi na hydrofobowy charakter maści, cechuje się ona ograniczeniami wobec wprowadzania składników hydrofilowych, przez co możliwe było wprowadzenie maksymalnie 20 % wag. ekstraktu z *Epimedium Koreanum* przy niezmięnionej ilości pozostałych składników aktywnych.
- Nie udało się uzyskać stabilnych formułacji zawierających powyżej 10 % wag. siarczanu glukozaminy.

- **Analiza fizykochemiczna**

- Wyniki badań wykazały, że dodatek dwóch głównych składników aktywnych (ikaryny i siarczanu glukozaminy) nie wpływał znacząco na wartość pH gotowego produktu. Wartości pH opracowanych formułacji mieściły się w założonym kryterium akceptacji dla produktów stosowanych na skórę (4,50 - 6,50), w związku z tym otrzymane formułacje mogą być potencjalnie wykorzystywane do aplikacji naskórnej.
- Formułacje emulsji i żelu charakteryzowały się kremową, jednorodną, w całej objętości konsystencją, przy czym żel dawał najłżejsze odczucie sensoryczne.

WNIOSKI

Wytworzona maść miała żółtawy odcień i cechowała się najmniej przyjemną aplikacją z uwagi na jej tłustość.

- Stabilność emulsji została potwierdzona przy pomocy urządzenia Turbiscan Lab expert, dając nieznaczny wzrost wskaźnika TSI mieszczący się w kryterium akceptacji dla stabilnych mas kosmetycznych.
- Ocena mikroskopowa emulsji wykazała dobrą dyspersję cząstek, brak widocznej flokulacji, co wskazuje tym samym na dobrą stabilność otrzymanych preparatów. W obu emulsjach (chłodząca i rozgrzewająca) uzyskano zbliżone rozmiary cząstek fazy zdyspergowanej, wskazując na powtarzalność procesu technologicznego i właściwy dobór parametrów mieszania i homogenizacji (zarówno czasu, jak i liczby obrotów).
- Niska aktywność wody dla maści (dla maści chłodzącej 39,45 % RH oraz dla maści rozgrzewającej 41,20 % RH) pozwoliła zakwalifikować je jako produkty niskiego ryzyka mikrobiologicznego.
- **Badania uwalniania i przenikania *in vitro***
 - Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że wybór nośnika substancji aktywnych odgrywa istotną rolę dla zdolności permeacyjnych.
 - Podczas oznaczenia procentu substancji aktywnej z formułacji żelowej uzyskano uwalnianie ikaryny na poziomie 15 % - 19 %. Dodatkowo w przygotowanej formułacji, zawierającej taką samą ilość czystej ikaryny, jaka znajdowała się w formułacji zawierającej ekstrakt z ziela uzyskano procent uwalniania ikaryny na poziomie 29 % - 35 % wskazując, że w przypadku wykorzystania ekstraktu uwalnianie ikaryny jest zmniejszone.
 - Zastosowanie 10 % wag. siarczanu glukozaminy pozwoliło uzyskać najlepsze wyniki przenikania *in vitro*, zarówno w przypadku żelu, jak i emulsji.
 - W przypadku maści, podwyższenie stężenia siarczanu glukozaminy do 10 % wag. spowodowało nieznaczny spadek zakumulowanej ilości substancji aktywnej w stosunku do formułacji zawierającej 5 % wag. siarczanu glukozaminy, wskazując, że hydrofobowość nośnika może ograniczać przenikanie składnika hydrofilowego.
 - Kompatybilność nośnika z substancją aktywną odgrywa kluczową rolę dla zdolności przenikania składników formułacji przez membrany imitujące skórę.
 - Najwyższy procent uwalniania siarczanu glukozaminy (pierwsze 2 – 3 h analizy) zaobserwowano w przypadku zastosowania formułacji żelowej.
 - Równomierne i najwyższe całkowite uwalnianie siarczanu glukozaminy uzyskano z formułacji emulsyjnej.
 - Najniższe ilości uwalnianej substancji aktywnej – siarczanu glukozaminy uzyskano z maści. Stąd też, nośnik ten, został wykluczony z dalszych badań.
 - Zarówno nośnik w postaci żelu, jak i emulsji pozwoliły uzyskać przenikanie ikaryny powyżej założonego poziomu 20 %.
 - Obecność promotorów przenikania w formułacji pozwala uzyskać lepsze właściwości permeacyjne składników zawartych w formułacji. Wykorzystanie kombinacji promotorów przenikania dało wyższe wyniki w stosunku do użycia pojedynczego promotora przenikania.

- **Opracowanie technologii wytwarzania i optymalizacja procesów produkcji**
 - Zarówno proces mieszania, jak i homogenizacji masy kosmetycznej ma istotny wpływ na ostateczne właściwości fizykochemiczne i stabilność wytworzonej masy.
 - Przy podnoszeniu skali produkcji, niskie prędkości obrotowe mieszadła i zbyt krótki czas mieszania nie pozwalały na uzyskanie homogennej masy, natomiast zbyt wysokie obroty lub zbyt długi czas mieszania prowadziły do zapowietrzenia masy i późniejszych trudności podczas rozlewania masy do opakowań.
 - Zbyt długa homogenizacja przy wysokich obrotach prowadziła do destabilizacji układu faz emulsji.
 - Czas i prędkość obrotowa homogenizacji miały kluczowe znaczenie dla jednorodności rozmiaru kropeł fazy zdyspergowanej, pozwalając na uzyskanie optymalnego efektu (jednorodna średnica kropeł w całej objętości masy poniżej 5 µm) przy 3000 rpm przez 3 minuty.
- **Badania wdrożeniowe:**
 - Przeprowadzone badania mikrobiologiczne obu produktów (żel chłodzący i emulsja rozgrzewająca) nie wykazały odchyień od dopuszczalnej liczby mezofilnych mikroorganizmów tlenowych, drożdży czy pleśni, jak również nie zaobserwowano obecności żadnego z testowanych szczepów patogennych, pozwoliły dzięki czemu zakwalifikowano produkty do dalszych badań wdrożeniowych.
 - Zmiany parametrów fizykochemicznych formułacji świadczą o niestabilności formułacji i mogą się nasilać przy przechowywaniu w skrajnych warunkach ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Analiza parametrów kontrolnych takich jak pH, gęstość, lepkość czy ocena sensoryczna pozwoliły na potwierdzenie stabilności produktów w całym okresie sezonowania.
 - Podczas badania dermatologicznego na grupie ochotników (u żadnego z ochotników) nie wystąpiła reakcja alergiczna, nie odnotowano rumienia, obrzęku po kontakcie z kosmetykiem ani niepożądanego efektu stosowania produktu co wskazuje na bezpieczeństwo stosowania produktu. Obliczony wskaźnik podrażnienia dla badanego produktu wynosił 0, pozwolił na klasyfikację produktu jako wyrób niedrażniący. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że oba badane produkty (żel chłodzący (kontuzje stawowe) oraz emulsja rozgrzewająca (zwyrodnienia)) są dobrze tolerowane przez skórę i nie wykazują właściwości drażniących ani uczulających, dlatego mogą zostać sklasyfikowane jako niedrażniące.
 - Podczas badania aplikacyjnego ochotnicy bardzo wysoko ocenili właściwości sensoryczne obu produktów, nie wskazali na żadne zastrzeżenia dotyczące koloru, zapachu czy aplikacji produktu. Dodatkowo w 12-tygodniowych badaniach zostały potwierdzone wszystkie założone deklaracje, a tym samym efektywność produktów w całym zakresie sugerując wysoki potencjał wdrożeniowy produktu.
 - Podczas analizy toksykologicznej produkt został oceniany jako bezpieczny produkt kosmetyczny w normalnych i dających się racjonalnie przewidzieć warunkach stosowania. Wszystkie surowce użyte w formule zostały zastosowane zgodnie z ich

WNIOSKI

przeznaczeniem, w dozwolonej ilości i nie stanowią zagrożenia dla zdrowia ludzkiego.

7. PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ

PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ

W niniejszej pracy potwierdzono potencjał wzdrożeniowy obu substancji aktywnych (ikaryny i siarczanu glukozaminy) dla miejscowej aplikacji produktu kosmetycznego. W dodatkowym pozakosmetycznym badaniu aplikacyjnym, poza badaniami w ramach doktoratu, określono na podstawie ankiety WOMAC przydatność produktów jako wspomagających leczenie zwyrodnień. Przeprowadzono wstępne badania wpływu produktu na poprawę ruchomości stawów u ochotników ze zdiagnozowaną chorobą zwyrodnieniową stawów. Ochotnicy wypełnili ankietę WOMAC przed rozpoczęciem badań, po 6 tygodniach i po zakończeniu badania (po 12 tygodniach) oraz oceniono, na podstawie zdjęć RTG, zwężenie szpary stawowej, przed rozpoczęciem badania i po jego zakończeniu. W ankiecie ochotnicy oceniali następujące aktywności:

- dolegliwości bólowe występujące podczas chodzenia, wchodzenia po schodach, leżenia w nocy w łóżku, odpoczynku (siedzenia lub leżenia), obciążenia kończyny dolnej,
- sztywność po okresie bezruchu oraz sztywność w ciągu dnia,
- aktywność fizyczna podczas schodzenia po schodach, wchodzenia po schodach, wstawania z pozycji siedzącej, stania, schylania się do podłogi, spaceru po płaskiej powierzchni, wsiadania/wysiadania do/z samochodu, pójścia po zakupy, zakładania skarpetek, leżenia w łóżku, zdejmowania skarpetek, podnoszenia się z łóżka, wchodzenia lub wychodzenie z wanny/spod prysznica, siedzenia, wstawania/siadania z/na toalety/ę, ciężkich prac domowych, lekkich prac domowych.

Na podstawie określenia zmian w natężeniu dolegliwości bólowych, sztywności i trudności podczas aktywności fizycznych zaobserwowano poprawę o średnio 11,33 % (dla emulsji rozgrzewającej) i 17,67 % (dla żelu chłodzącego) oraz wykazano zwiększenie szpary międzystawowej średnio o 0,52 % dla żelu i 0,30 % dla emulsji po 12 tygodniach stosowania produktu, co wskazuje na znaczący potencjał produktów podczas terapii zwyrodnień. Uzyskane wyniki w pracy doktorskiej ułatwiły producentowi proces wdrożeniowy oraz doprowadziły do stworzenia unikalnych produktów dermokosmetycznych, mogących stanowić innowacyjne podejście wspierające pielęgnację skóry w miejscach chorobowo zmienionych oraz samą terapię dysfunkcji i chorób stawów. Powyższe wyniki przeprowadzonych dotychczas analiz dały bardzo obiecujący obraz poprawy samopoczucia i ulgi podczas użytkowania produktów dedykowanych jako terapia pomocnicza w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów, jednak w celu zwiększenia jego efektu terapeutycznego i potwierdzenia rzeczywistego przenikania przez skórę *in vivo*, mogą wymagać dalszych badań, dlatego dalsze badania mające na celu potwierdzenie właściwości produktu są kontynuowane. Całość przeprowadzonych badań w przyszłości może być pierwszym krokiem do rozpoczęcia badań klinicznych nad terapeutycznym, miejscowym działaniem ikaryny i kombinacji ikaryna/siarczan glukozaminy względem choroby zwyrodnieniowej stawów.

8. OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

Konferencje międzynarodowe

1. Katarzyna Pikosz, Paweł Musiał, Marek Przybylski, Paulina Szczyglewska, Agnieszka Feliczak-Guzik "The effect of the physicochemical properties of terpenes-rich essential oils in promoting transepidermal permeation", 6th Polish-Kazakh Meeting: relationship between chemistry and biology, Poznań, Poland On-line session 23.11.2020 r.
2. Katarzyna Pikosz, Paulina Szczyglewska, Izabela Nowak, Agnieszka Feliczak-Guzik, Invanto Sp. z o.o / Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Protective and therapeutic potential of gingerols Poznań, Poland, On-line session 6.07.2021 r.
3. Katarzyna Pikosz, Izabela Nowak, Agnieszka Feliczak-Guzik, Invanto Sp. z o.o / Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, " Potential of icariin - glucosamine combination in the treatment of osteoarthritis by topical application" 8th Polish-Kazakh Meeting: relationship between chemistry and biology, Poznań, Poland, On-line session 7.07.2022 r.
4. Katarzyna Pikosz, Izabela Nowak, Agnieszka Feliczak-Guzik, Invanto Sp. z o.o / Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, "Topical use of Epimedium extract and its potential effect for cartilage tissues", " 9th Polish-Kazakh Meeting: relationship between chemistry and biology, Poznań, Poland, On-line session 27.06.2023 r.
5. Katarzyna Pikosz, Agnieszka Feliczak-Guzik, Invanto Sp. z o.o / Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, "The Selection of transdermal delivery system that enhances skin permeation and the release of active substances", " 10th Polish-Kazakh Meeting: relationship between chemistry and biology, Poznań, Poland, On-line session 26.06.2024 r.

Konferencje krajowe

1. Katarzyna Pikosz, Izabela Nowak, Agnieszka Feliczak-Guzik, Invanto Sp. z o.o / Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, "Benefits of use medicinal plants extracts in patients with osteoarthritis", COMPASS: The future to interdisciplinary science, Poznań, Poland, 22-24.09.2021 r.
2. Katarzyna Pikosz, Izabela Nowak, Agnieszka Feliczak-Guzik, "Potencjał ikaryny w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów", Konferencja - Naturalne surowce lecznicze I kosmetyczne, 15-16.11.2022 r.
3. Katarzyna Pikosz, Agnieszka Feliczak-Guzik, Izabela Nowak, Dobra praktyka procesu produkcyjnego w świetle zrównoważonego rozwoju, "Ogólnopolska Konferencja Naukowa. Zrównoważony rozwój w obszarze kosmetyków i detergentów" 12.04.2024 r.

Publikacje w czasopisach naukowych

1. Katarzyna Pikosz, Izabela Nowak and Agnieszka Feliczak-Guzik, Potential of Icariin–Glucosamine Combination in the Treatment of Osteoarthritis by Topical

Application: Development of Topical Formulation and *In Vitro* Permeation Study, *Cosmetics* 2023, 10, 36.

Publikacje w czasopismach branżowych

1. Katarzyna Pikosz, „Wykorzystanie olejków eterycznych jako promotorów przeniesienia w formułacjach kosmetycznych”, *Świat Przemysłu Kosmetycznego*, 2021,1, 40-43.
2. Katarzyna Pikosz, Marta Murat, "Składniki kondycjonujące produktów do pielęgnacji włosów ", *Farmakom*, 1/2022, 58-61.
3. Katarzyna Pikosz, Marta Murat, " Technologia produktów kosmetycznych służących ochronie przeciwslonecznej ", *Farmakom*, 2/2022, 72-75.
4. Katarzyna Pikosz, Marta Murat, „Aktualne strategie w projektowaniu składników kosmetyków”, *Chemia i Biznes*, 3/2022, 36-39.
5. Katarzyna Pikosz, Marta Murat, „Recepturowanie kosmetyków” *Chemia i Biznes*, 3/2022, 142-144.
6. Katarzyna Pikosz, Marta Murat, " Perspektywy rozwoju produktów do demakijażu", *Farmakom*, 3/2022, 78-81.
7. Katarzyna Pikosz, Marta Murat, Kosmetyki ujędrniające, wyszczuplające i antycellulitowe, *Świat Przemysłu Kosmetycznego* 4/2022, 76-78.
8. Katarzyna Pikosz, Marta Murat, Produkty do pielęgnacji włosów, czyli jak stworzyć ciekawą formułację, *CHEMIA I BIZNES*. 4/2022, 46-49.
9. Marta Murat, Katarzyna Pikosz, Jagoda Karaś, Pielęgnacja dłoni i stóp, *Świat Przemysłu Kosmetycznego* 1/2023, 38-40.
10. Marta Murat, Katarzyna Pikosz, Najpopularniejsze substancje aktywne wykorzystywane w serum do twarzy, *Świat Przemysłu Kosmetycznego* 2/2023, 68-70.
11. Jagoda Karaś, Marta Murat, Katarzyna Pikosz, Pielęgnacja skóry głowy, *Chemia i biznes* 1/2024, 22-24
12. Jagoda Karaś, Marta Murat, Katarzyna Pikosz, Rozwój sektora bezwodnych kosmetyków, *Chemia i biznes* 2/2024, 154-156.
13. Katarzyna Pikosz, Marta Murat, Jagoda Karaś, Depilacja ciała, metody mniej i bardziej znane. *Chemia i biznes* 3/2023, 200-202.
14. Jagoda Karaś, Katarzyna Pikosz, Marta Murat, Pielęgnacja twarzy z niedoskonałościami, *Chemia i biznes* 4/2023, 170-172.

Szkolenia

1. „Doskonalenie kompetencji kierownika laboratorium- od przyjęcia pracownika do budowania kompetentnego zespołu laboratoryjnego”, CE2 Centrum Edukacji M.Dziewa, E.Tarnas-Szwed Sp. j., 19-20.03.2024 r.
2. „Ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego dla początkujących”, THETA Consulting Sp. z o.o., Łódź, 15.03.2024 r.

9. ZAŁĄCZNIKI

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1.	Ankieta badania sensorycznego
Załącznik 2.	Harmonogram badań stabilności
Załącznik 3.	Ocena bezpieczeństwa produktu żel chłodzący

Załącznik. 1.

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl	
--	--

Ankieta

Badanie sensoryczne

Imię i Nazwisko:.....

Data, miejsce:.....

PESEL:.....

Numer ocenianej próbki:

Oceniane parametry:

Parametr	Ocena*	Uwagi
1. Kolor		
2. Zapach		
3. Konsystencja		
4. Jednorodność		
5. Rozprowadzanie		
6. Tłustość		

*Ocenniono zgodnie z kryterium oceny przedstawionym na stronie 2

.....

Data, podpis

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SR Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



Kryteria oceny produktu:

Parametr	Ocena	Skala
Kolor	Ocena wzrokowa	Opisowa
Zapach	Opisowa ocena z wykorzystaniem węchu	Opisowa + interwałowa 1 - zapach bardzo nieprzyjemny, 2 - nieprzyjemny, 3 - średnio przyjemny, 4 - przyjemny, 5 - bardzo przyjemny
Konsystencja	Oceniono opisowo i interwałowo na podstawie wykorzystania wzroku oraz zmysłów czucia powierzchniowego i głębokiego	Opisowa + interwałowa 1 - bardzo ciężka, 2 - ciężka, 3 - średnia 4 - lekka 5 - bardzo lekka
Jednorodność	Oceniono opisowo z wykorzystaniem wzroku oraz zmysłu czucia powierzchniowego	Opisowo oceniono obecność zapowietrzenia, grudek, zanieczyszczeń, rozwarstwień fazowych
Rozprowadzanie	Oceniono z wykorzystaniem czucia powierzchniowego, ocena interwałowa	Ocena interwałowa 1 - bardzo trudne, 2 - trudne, 3 - średnio trudne, 4 - łatwe, 5 - bardzo łatwe
Thustość	Ocena interwałowa wzrokowa oraz z wykorzystaniem czucia powierzchniowego	Ocena interwałowa 1 - bardzo tłusta/bardzo ciężko się wchłania 2 - tłusta/ciężko się wchłania 3 - średnio tłusta/średnio się wchłania 4 - lekko tłusta/dobrze się wchłania 5 - brak filmu/bardzo dobrze się wchłania

Oświadczam, że zapoznałem/am się z kryteriami oceny sensorycznej produktu

.....
Data, podpis

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 2.

HB/2024/55

Harmonogram badań stabilności i kompatybilności masy z opakowaniem

Nazwa preparatu, moc, seria, opakowanie, numer odniesienia (lub inne charakterystyczne oznaczenie):

PRODUKT:

SERIA:

OPAKOWANIA:



Liczba próbek	13				
Czas →					
Warunki sezonowania ↓	D0 INITIAL	D14	D28	D56	D84
40 / NK	/	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0
TP / NK	1 opakowanie <u>1. Ocena produktu:</u> - sensoryczna (wygląd, barwa, zapach, konsystencja); - masa. -aktywność wody - pH -gęstość -lepkość <u>2. Ocena opakowania:</u> - wygląd, deformacje, pęknięcie, szczelność, odklejanie się etykiet, schodzenie nadruku, itp. - zapach: zmiana zapachu; - barwa: zmiana zabarwienia.	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0
5 / NK	/	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0	1 opakowanie Zakres oceny jak w D0



Opis metody badań (zgodnie z MB/COS/01/01):

Initial:

Całkowita liczba próbek w poszczególnych warunkach:

Całkowita liczba próbek w poszczególnych warunkach:

Całkowita liczba próbek w poszczególnych warunkach:

TP/NK – 5

40/NK – 4

5/NK – 4

Data rozpoczęcia badań:

Data przeglądu:

Osoba odpowiedzialna:

Podpis i data:

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 3.


INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl					
OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO					
Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
NAZWA PRODUKTU (WG DEKLARACJI PRODUCENTA)		ŻEL CHŁODZĄCY (KONTUZJE)			
CHARAKTERYSTYKA ZASTOSOWANIA (FUNKCJA)		Pielęgnacja skóry całego ciała.			
OSOBA ODPOWIEDZIALNA		INVANTO SP. Z O.O.			

Osoba zlecająca wykonanie poniższego raportu odpowiada za informacje dotyczące składu ilościowego i jakościowego produktu z uwzględnieniem nazw handlowych surowców oraz ich dostawców.

Poniższą ocenę bezpieczeństwa składu produktu kosmetycznego wykonano zgodnie z obowiązującymi normami prawnymi, ROZPORZĄDZENIEM PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY (WE) NR 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczących produktów kosmetycznych, DECYZJI WYKONAWCZEJ KOMISJI z dnia 25 listopada 2013r. w sprawie wytycznych dotyczących załącznika I do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady nr 1223/2009 oraz w oparciu o THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 12th revision, a także dostępną literaturę dotyczącą bezpieczeństwa stosowania produktów kosmetycznych i użytych surowców.



str. 1

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl			
OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO			
Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01
		Data sporządzenia	24.06.2024

CZEŚĆ A
INFORMACJE NA TEMAT BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

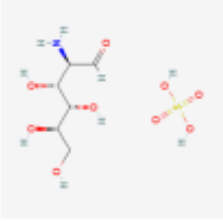
1. Ilościowy i jakościowy skład produktu kosmetycznego – oceny dokonano w oparciu o najwyższe deklarowane przez producenta stężenia składników.

INCI	ILOŚĆ	NAZWA CHEMICZNA	Oxidane, Dihydrogen oxide	CHARAKTERYSTYKA
Aqua	46,085%	NAZWA CHEMICZNA	Oxidane, Dihydrogen oxide	WZÓR SUMARYCZNY H ₂ O
		NR CAS	7732-18-5	MASA CZĄSTECZKOWA 18,02 g/mol
		NR EINECS/ELINCS	231-791-2	WZÓR STRUKTURALNY
		FUNKCJA	Rozpuszczalnik	
Propanediol	30,800%	NAZWA CHEMICZNA	propane-1,3-diol	WZÓR SUMARYCZNY C ₃ H ₈ O ₂
		NR CAS	504-63-2 / 26264-14-2	MASA CZĄSTECZKOWA 76,09 g/mol
		NR EINECS/ELINCS	207-997-3	WZÓR STRUKTURALNY
		FUNKCJA	Rozpuszczalnik	

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

str. 2

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl			
OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO			
Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01
		Data sporządzenia	24.06.2024

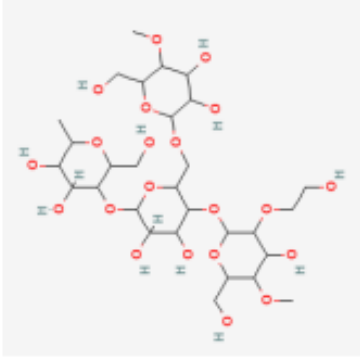
INCI		ILOŚĆ	CHARAKTERYSTYKA	
Glucosamine Sulfate	NAZWA CHEMICZNA	(2R,3R,4S,5R)-2-amino-3,4,5,6-tetrahydroxyhexanal; sulfuric acid	WZÓR SUMARYCZNY C6H15NO8S	
	NR CAS	29031-19-4	MASA CZĄSTECzkOWA 277.25 g/mol	
	NR EINECS/ELINCS	249-379-6	WZÓR STRUKTURALNY	
			Kondycjonująca	
Epimedium Koreanum Extract	NAZWA CHEMICZNA	N/D	Epimedium Koreanum Extract to wydziąg z całej rośliny Epimedium koreanum, Berberidaceae. W tradycyjnych zastosowaniach E. koreanum jest często stosowana w leczeniu różnych chorób, takich jak zaburzenia erekcji, bezpłodność, reumatoidalne zapalenie stawów, osteoporoza, astma, zespół niedoboru nerek- yang itp. Do chwili obecnej odkryto ponad 379 związków z różnych części organizmu E. koreanum, w tym flawonoidy, lignany, kwasy organiczne, terpenoidy, węglowodory, pochodne dihydrofenantrenu, alkaloidy i inne. Badania wykazały, że związki i surowe ekstrakty mają szeroki zakres działania farmakologicznego na układ rozrodczy, sercowo-naczyniowy i nerwowy, a także mają właściwości przeciwoleporotyczne, przeciwnowotworowe, przeciwlutleniające, przeciwzapalne, immunomodulujące, hepatoprotekcyjne i przeciwwirusowe.	
	NR CAS	N/D		
	NR EINECS/ELINCS	N/D		
	FUNKCJA	Antybakteryjna, pobudzająca		

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w całości bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAN www.invanto.pl	
--	---

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

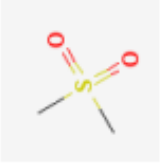
Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

INCI	ILOŚĆ	CHARAKTERYSTYKA
Hydroxyethylcellulose	1,800%	NAZWA CHEMICZNA 5-[6-[[3,4-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-5-methoxyoxan-2-yl]oxyethyl]-3,4-dihydroxy-5-[4-hydroxy-3-(2-hydroxyethoxy)-6-(hydroxymethyl)-5-methoxyoxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)-2-methylxane-3,4-diol
		NR CAS 9004-62-0
		NR EINECS/ELINCS 618-387-5
		FUNKCJA Konsystencjotwórcza
		WZOR SUMARYCZNY C29H52O21
		MASA CZĄSTECZKOWA 736,7 g/mol
		WZÓR STRUKTURALNY 

<p>INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl</p>	
--	---

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

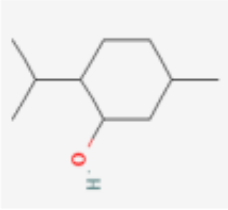
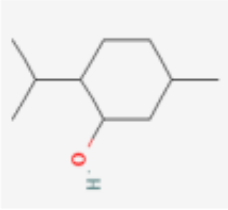
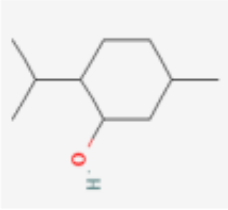
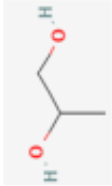
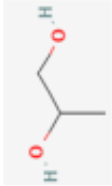
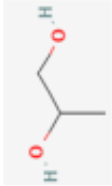
INCI	ILOŚĆ	NAZWA CHEMICZNA	CHARAKTERYSTYKA	
PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	1,500%	NAZWA CHEMICZNA	Uwodorniony olej rycynowy PEG-40 jest pochodną glikolu polietylenowego uwodornionego oleju rycynowego zawierającą średnio 40 moli tlenu etylenu. Uwodorniony olej rycynowy PEG-40 jest mieszaniną produktów eteryfikacji i esteryfikacji glicerydów i kwasów tłuszczowych uwodornionego oleju rycynowego z uwodornionym olejem rycynowym, z 40 równoważnikami tlenu etylenu.	
		NR CAS		Castor oil, hydrogenated, ethoxylated
		NR EINECS/ELINCS		61788-85-0
		FUNKCJA		500-147-5 Solubilizator
Dimethyl Sulfone	1,00%	NAZWA CHEMICZNA	WZÓR SUMARYCZNY C ₂ H ₆ O ₂ S	
		NR CAS	methylsulfonimethane	
		NR EINECS/ELINCS	67-71-0	
		FUNKCJA	200-665-9 Promotor przenikania, kondycjonująca	
			<p>WZÓR STRUKTURALNY</p> 	

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

INCI	ILOŚĆ	CHARAKTERYSTYKA																
Menthol	1,000%	<table border="1"> <tr> <td>NAZWA CHEMICZNA</td> <td>5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexan-1-ol</td> <td>WZÓR SUMARYCZNY</td> <td>C₁₀H₂₀O</td> </tr> <tr> <td>NR CAS</td> <td>1490-04-6 / 2216-51-5 / 89-78-1 / 15356-70-4</td> <td>MASA CZĄSTECZKOWA</td> <td>156.26 g/mol</td> </tr> <tr> <td>NR EINECS/ELINCS</td> <td>216-074-4 / 218-690-9 / 201-939-0 / 239-388-3</td> <td>WZÓR STRUKTURALNY</td> <td></td> </tr> <tr> <td>FUNKCJA</td> <td>Odświeżająca</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	NAZWA CHEMICZNA	5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexan-1-ol	WZÓR SUMARYCZNY	C ₁₀ H ₂₀ O	NR CAS	1490-04-6 / 2216-51-5 / 89-78-1 / 15356-70-4	MASA CZĄSTECZKOWA	156.26 g/mol	NR EINECS/ELINCS	216-074-4 / 218-690-9 / 201-939-0 / 239-388-3	WZÓR STRUKTURALNY		FUNKCJA	Odświeżająca		
		NAZWA CHEMICZNA	5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexan-1-ol	WZÓR SUMARYCZNY	C ₁₀ H ₂₀ O													
		NR CAS	1490-04-6 / 2216-51-5 / 89-78-1 / 15356-70-4	MASA CZĄSTECZKOWA	156.26 g/mol													
		NR EINECS/ELINCS	216-074-4 / 218-690-9 / 201-939-0 / 239-388-3	WZÓR STRUKTURALNY														
FUNKCJA	Odświeżająca																	
Propylene Glycol	1,000%	<table border="1"> <tr> <td>NAZWA CHEMICZNA</td> <td>propane-1,2-diol</td> <td>WZÓR SUMARYCZNY</td> <td>C₃H₈O₂</td> </tr> <tr> <td>NR CAS</td> <td>57-55-6</td> <td>MASA CZĄSTECZKOWA</td> <td>76.09 g/mol</td> </tr> <tr> <td>NR EINECS/ELINCS</td> <td>200-338-0</td> <td>WZÓR STRUKTURALNY</td> <td></td> </tr> <tr> <td>FUNKCJA</td> <td>Humektant, rozpuszczalnik</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	NAZWA CHEMICZNA	propane-1,2-diol	WZÓR SUMARYCZNY	C ₃ H ₈ O ₂	NR CAS	57-55-6	MASA CZĄSTECZKOWA	76.09 g/mol	NR EINECS/ELINCS	200-338-0	WZÓR STRUKTURALNY		FUNKCJA	Humektant, rozpuszczalnik		
		NAZWA CHEMICZNA	propane-1,2-diol	WZÓR SUMARYCZNY	C ₃ H ₈ O ₂													
		NR CAS	57-55-6	MASA CZĄSTECZKOWA	76.09 g/mol													
		NR EINECS/ELINCS	200-338-0	WZÓR STRUKTURALNY														
FUNKCJA	Humektant, rozpuszczalnik																	


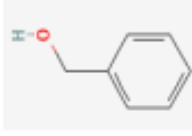
Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

str. 6

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl	
--	---

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

INCI	ILOŚĆ	CHARAKTERYSTYKA			
		NAZWA CHEMICZNA	propane-1,2,3-triol	WZÓR SUMARYCZNY	
Glycerin	0,900%	NR CAS	56-81-5	MASA CZĄSTECZKOWA	
		NR EINECS/ELINCS	200-289-5	WZÓR STRUKTURALNY	
		FUNKCJA	Rozpuszczalnik, humektant		
		WZÓR SUMARYCZNY			
Benzyl Alcohol	0,890%	NAZWA CHEMICZNA	phenylmethanol	WZÓR SUMARYCZNY	
		NR CAS	100-51-6	MASA CZĄSTECZKOWA	
		NR EINECS/ELINCS	202-859-9	WZÓR STRUKTURALNY	
		FUNKCJA	Konserwant		
Rosmarinus Officinalis Leaf Oil	0,500%	NAZWA CHEMICZNA	N/D		
		NR CAS	84604-14-8 / 8000-25-7		
		NR EINECS/ELINCS	283-291-9		
		FUNKCJA	Kondycjonująca		

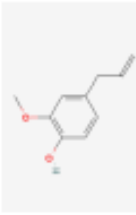
Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp. z o.o.

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

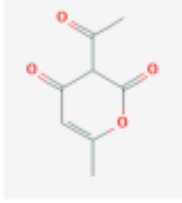
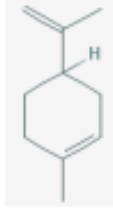
Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

INCI	ILOŚĆ	CHARAKTERYSTYKA	
Eucalyptus globulus leaf oil	0,200%	NAZWA CHEMICZNA	N/D
		NR CAS	8000-48-4 / 84625-32-1
		NR EINECS/ELINCS	- / 283-406-2
		FUNKCJA	Kondycjonująca, odświeżająca
Eugenia Caryophyllus Bud Oil	0,200%	NAZWA CHEMICZNA	N/D
		NR CAS	84961-50-2
		NR EINECS/ELINCS	284-638-7
		FUNKCJA	Odświeżająca
Eugenol	0,176%	NAZWA CHEMICZNA	2-methoxy-4-prop-2-enylphenol
		NR CAS	97-53-0
		NR EINECS/ELINCS	202-589-1
		FUNKCJA	Tonizująca, zapachowa
		<p>WZÓR SUMARYCZNY C10H12O2</p> <p>MASA CZĄSTECZKOWA 164.20 [g/mol]</p> <p>WZÓR STRUKTURALNY</p> 	

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl	
--	---

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

INCI	ILOŚĆ	NAZWA CHEMICZNA	CHARAKTERYSTYKA		
Dehydroacetic Acid	0,090%	NAZWA CHEMICZNA	WZÓR SUMARYCZNY C ₈ H ₈ O ₄		
		NR CAS	MASA CZĄSTECZKOWA 168,15 [g/mol]		
		NR EINECS/ ELINCS	WZÓR STRUKTURALNY 		
Limonene	0,085%	FUNKCJA	Konservant		
		NAZWA CHEMICZNA	WZÓR SUMARYCZNY C ₁₀ H ₁₆		
		NR CAS	MASA CZĄSTECZKOWA 136,26 [g/mol]		
		NR EINECS/ ELINCS	WZÓR STRUKTURALNY 		
Artemisia Absinthium Extract i	0,090%	FUNKCJA	Deodoryzująca, zapachowa		
		NAZWA CHEMICZNA	Ekstrakt Artemisia Absinthium jest wyciągiem z całego ziela piołunika, Artemisia absinthium L., Compositae		
		NR CAS	N/D		
		NR EINECS/ ELINCS	84929-19-1 284-503-2		
FUNKCJA	Kondycjonująca				


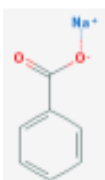
Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

INCI	ILOŚĆ	CHARAKTERYSTYKA	
Arnica Montana Flower Extract	0,015%	NAZWA CHEMICZNA	N/D
		NR CAS	68990-11-4
		NR EINECS/ELINCS	273-579-2
		FUNKCJA	Kondycjonująca
Linalool	0,004%	NAZWA CHEMICZNA	3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol
		NR CAS	78-70-6
		NR EINECS/ELINCS	201-134-4
		FUNKCJA	Maskująca
Sodium Benzoate	0,004%	NAZWA CHEMICZNA	sodium;benzoate
		NR CAS	532-32-1
		NR EINECS/ELINCS	208-534-8
		FUNKCJA	Konserwant
		CHARAKTERYSTYKA Ekstrakt z kwiatów Arnica Montana to wyciąg z suszonych główek kwiatowych arniki, Arnica montana L., Asteraceae	
		WZÓR SUMARYCZNY C10H18O MASA CZĄSTECZKOWA 154,25 [g/mol] WZÓR STRUKTURALNY 	
		WZÓR SUMARYCZNY C7H5O2Na MASA CZĄSTECZKOWA 144,105 g/mol WZÓR STRUKTURALNY 	

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w całości bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.


INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl	
--	---

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

INCI		ILOŚĆ	CHARAKTERYSTYKA	
Potassium Sorbate	NAZWA CHEMICZNA		potassium;(2E,4E)-hexa-2,4-dienoate	WZÓR SUMARYCZNY C ₈ H ₇ KO ₂
	NR CAS		24634-61-5 / 590-00-1	MASA CZĄSTECzkOWA 150.22 g/mol
	NR EINECS/ ELINCS	0,003%	246-376-1 / -	WZÓR STRUKTURALNY
	FUNKCJA		Konserwant	



INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl			
OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO			
Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01
		Data sporządzenia	24.06.2024

Właściwości fizyczne/chemiczne oraz stabilność produktu kosmetycznego
 1.1. Właściwości fizyko-chemiczne surowców

L.p.	Nazwa handlowa	Zawartość w produkcie gotowym	Skład surowca		Zanieczyszczenia	Właściwości fizyko-chemiczne
1.	WODA	10,30%	AQUA		100,00%	Water serves as a solvent. In the field of topical application its toxicity is irrelevant from the toxicological point of view. The quality of water is determined by the WHO Guidelines for Drinking-water Quality.
2.	EPIEDIUM EXTRACT(GPD)-RSPO	70,00%	AQUA		50,50%	Postać: ciecz Barwa: żółta do brązowej Gęstość: 0,98 – 1,04 g/ml pH 4,00 – 7,00 Rozpuszczalność w wodzie: rozpuszczalny
			PROPANEDIOL EPIEDIUM KOREANUM EXTRACT		44,00% 5,50%	Metale ciężkie < 10ppm Arsen: > 2ppm
3.	SIARCZAN GLUKOZAMINY	10,00%	GLUCOSAMINE SULFATE		100,00%	Postać: ciało stałe Barwa: biała do kremowej Zapach: bez wyraźnego zapachu Rozpuszczalność w wodzie: 55 mg/ml
			GLYCERIN AQUA		60,00% 23,25%	
4.	WORMWOOD EXTRACT	1,00%	ARTEMISIA-ABSINTHIUM EXTRACT		8,00%	Postać: ciecz Barwa: żółta do brązowej Gęstość: 0,98 – 1,04 g/ml pH 4,00 – 7,00 Rozpuszczalność w wodzie: rozpuszczalny
			SODIUM BENZOATE POTASSIUM SORBATE		0,30% 0,15%	Metale ciężkie < 10ppm
5.	METHYL SULFONYL METHANE (MSM)	1,00%	DIMETHYL SULFONE		100,00%	Postać: ciało stałe Barwa: biała do kremowej Zapach: bez wyraźnego zapachu Gęstość: 1,16 g/cm ³ Refractive index: 1,4228 Rozpuszczalność w wodzie: 150 g/L (20 °C)
L.p.	Nazwa handlowa	Zawartość w	Skład surowca		Zanieczyszczenia	Właściwości fizyko-chemiczne

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w całości bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl	
--	---

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	produkcje gotowym				
6. ARNICA EXTRACT	AQUA	36,55%	Metale ciężkie < 10ppm		Postać: ciecz Barwa: żółta do brązowej Gęstość: 0,98 – 1,04 g/ml pH 4,00 – 7,00 Rozpuszczalność w wodzie: rozpuszczalny
	GLYCERIN	60,00%			
	ARNICA MONTANA FLOWER EXTRACT	3,00%			
	POTASSIUM SORBATE	0,30%			
	SODIUM BENZOATE	0,15%			
7. GLIKOL PROPYLENOWY	PROPYLENE GLYCOL	100,00%	Zelazo, mg/kg max 0,3 Arsen, mg/kg max 2 Ołów, mg/kg max 1 Kadm, mg/kg max 0,5 Rtęć, mg/kg max 0,1		Wygląd: bezbarwna ciecz Zapach: prawie bezwonne Gęstość względna: 1,03 w 20 °C pH: 6,5 – 7,5 Rozpuszczalność: w wodzie, etanolu i acetonie: całkowita; w eterze: 12 g/100 ml Lepkość: lepkość dynamiczna 0,0434 Pa·s w 25 °C Współczynnik podziału n-o oktanol/woda: Log Pow = -1,07 (dane testowe)
8. NATROSOL™ 250 HHR	HYDROXYETHYLCELLULOSE	100,00%			Wygląd : granulki; proszek; ciało stałe Barwa : białawy Zapach : bez zapachu Próg zapachu : brak dostępnych danych pH : 6,0 - 8,5; 2 %; (jako wodny roztwór) Gęstość : 1,38 g·cm ³ Rozpuszczalność w wodzie : rozpuszczalny, Ograniczona przez lepkość
9. MENTHOL	MENTHOL	100,00%			Postać: ciało stałe Barwa: bezbarwny kryształ Zapach: miętowy Rozpuszczalność w wodzie: brak Rozpuszczalność w etanolu: całkowita

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp. z o.o.

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

L.p.	Nazwa handlowa	Zawartość w produkcie gotowym	Skład surowca	Zanieczyszczenia	Właściwości fizyko-chemiczne
10.	PEG 40 HCO	1,50%	PEG-40 HYDROGAENATED CASTOR OIL	1,4-dioksan < 10ppm	Postać: gęsta, lepka ciecz Barwa: bezbarwna do białej Zapach: charakterystyczny Rozpuszczalność w wodzie: rozpuszczalny pH : 6,0 - 7,5 Gęstość : 1,03 g/cm ³ @ 60°C
11.	ROSEMARY ESSENTIAL OIL	0,50%	Eukaliptol Borani-2-on Dipenten Borneol beta-Pinen alfa-Pinen alfa-Terpinen Kamfen alfa-Terpineol p-Menta-1,4-dien Terpinolen Octan terpinolu beta-Karidifen p-Cymen 3-Karen Linalol Felandren Sabinen Myrcen Octan geranylu	25-50% 10-20% 10-20% 5-10% 5-10% 2,5-5% 1-2,5% 1-2,5% 1-2,5% 1-2,5% 1-2,5% 1-2,5% 1-2,5% 1-2,5% 1-2,5% 0,1-1% 0,25-1% 0,1-1% 0,25-1% 0,1-1%	Stan skupienia: Płynny Kolor: Jasnożółty Zapach: Charakterystyczny Gęstość w 20 °C: 0,91 g/cm ³ Rozpuszczalność w wodzie: Nie lub mało mieszalny współczynnik załamania światła /20oC/ : 1,459 do 1,479

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

L.p.	Nazwa handlowa	Zawartość w produkcie gotowym	Skład surowca	Zanieczyszczenia	Właściwości fizyko-chemiczne																																	
12.	EUCALYPTUS ESSENTIAL OIL	0,20%	<table border="1"> <tr><td>Cynedl</td><td>50-100%</td></tr> <tr><td>Pin-2(3)-en</td><td>10-20%</td></tr> <tr><td>P-menta-1,4(8)-dien</td><td>10-20%</td></tr> <tr><td>l-limonene</td><td>5-10%</td></tr> <tr><td>P-ment-1-en-8-ol</td><td>5-10%</td></tr> <tr><td>7-metylo-3-metylenokta-1,6-dien</td><td>5-10%</td></tr> <tr><td>P-menta-1,4 (8) -dien</td><td>1-5%</td></tr> <tr><td>p-cymen</td><td>1-5%</td></tr> <tr><td>Linalol</td><td>1-5%</td></tr> <tr><td>Pin-2(10)-en</td><td>1-5%</td></tr> <tr><td>Bornan-2-on</td><td>0,1-1%</td></tr> <tr><td>Eugenol</td><td>70-90%</td></tr> <tr><td>Kanofilen</td><td>10-20%</td></tr> <tr><td>Octan 4-allylo-2-metoksyfenylu</td><td>1-10%</td></tr> <tr><td>Dehydroacetic Acid</td><td>9,00%</td></tr> <tr><td>Benzyl Alcohol</td><td>89,00%</td></tr> <tr><td>Aqua</td><td>2,00%</td></tr> </table>	Cynedl	50-100%	Pin-2(3)-en	10-20%	P-menta-1,4(8)-dien	10-20%	l-limonene	5-10%	P-ment-1-en-8-ol	5-10%	7-metylo-3-metylenokta-1,6-dien	5-10%	P-menta-1,4 (8) -dien	1-5%	p-cymen	1-5%	Linalol	1-5%	Pin-2(10)-en	1-5%	Bornan-2-on	0,1-1%	Eugenol	70-90%	Kanofilen	10-20%	Octan 4-allylo-2-metoksyfenylu	1-10%	Dehydroacetic Acid	9,00%	Benzyl Alcohol	89,00%	Aqua	2,00%	<p>Stan skupienia 20 °C: Ciecz</p> <p>Wygląd: Ciecz</p> <p>Kolor: Charakterystyczny</p> <p>Zapach: Charakterystyczny</p> <p>Gęstość względna 20 °C: 0,89 - 0,95</p> <p>Stopień rozpuszczalności: nierozpuszczalny w wodzie, rozp. w etanolu (70%) 1:5</p> <p>Współczynnik załamania: 1,450 – 1,470</p>
Cynedl	50-100%																																					
Pin-2(3)-en	10-20%																																					
P-menta-1,4(8)-dien	10-20%																																					
l-limonene	5-10%																																					
P-ment-1-en-8-ol	5-10%																																					
7-metylo-3-metylenokta-1,6-dien	5-10%																																					
P-menta-1,4 (8) -dien	1-5%																																					
p-cymen	1-5%																																					
Linalol	1-5%																																					
Pin-2(10)-en	1-5%																																					
Bornan-2-on	0,1-1%																																					
Eugenol	70-90%																																					
Kanofilen	10-20%																																					
Octan 4-allylo-2-metoksyfenylu	1-10%																																					
Dehydroacetic Acid	9,00%																																					
Benzyl Alcohol	89,00%																																					
Aqua	2,00%																																					
13.	CLOVE ESSENTIAL OIL	0,20%	<table border="1"> <tr><td>Eugenol</td><td>70-90%</td></tr> <tr><td>Kanofilen</td><td>10-20%</td></tr> <tr><td>Octan 4-allylo-2-metoksyfenylu</td><td>1-10%</td></tr> <tr><td>Dehydroacetic Acid</td><td>9,00%</td></tr> <tr><td>Benzyl Alcohol</td><td>89,00%</td></tr> <tr><td>Aqua</td><td>2,00%</td></tr> </table>	Eugenol	70-90%	Kanofilen	10-20%	Octan 4-allylo-2-metoksyfenylu	1-10%	Dehydroacetic Acid	9,00%	Benzyl Alcohol	89,00%	Aqua	2,00%	<p>Postać: ciecz</p> <p>Kolor: Żółto-brązowy, charakterystyczny</p> <p>Zapach: Charakterystyczny</p> <p>Gęstość 20 °C: 1,030 – 1,063</p> <p>Lepkość kinematyczna 40 °C: <20,5 mm²/s</p>																						
Eugenol	70-90%																																					
Kanofilen	10-20%																																					
Octan 4-allylo-2-metoksyfenylu	1-10%																																					
Dehydroacetic Acid	9,00%																																					
Benzyl Alcohol	89,00%																																					
Aqua	2,00%																																					
14.	SHAROMIX 721	1,00%	<table border="1"> <tr><td>Dehydroacetic Acid</td><td>9,00%</td></tr> <tr><td>Benzyl Alcohol</td><td>89,00%</td></tr> <tr><td>Aqua</td><td>2,00%</td></tr> </table>	Dehydroacetic Acid	9,00%	Benzyl Alcohol	89,00%	Aqua	2,00%	<p>Wygląd: Płyn bezbarwny do żółtego</p> <p>Zapach: łagodny</p> <p>Gęstość (20°C) 1,069</p> <p>Rozpuszczalność: Dobrze rozpuszczalny w polarnych rozpuszczalnikach organicznych.</p> <p>Rozpuszczalny w wodzie w małych ilościach.</p>																												
Dehydroacetic Acid	9,00%																																					
Benzyl Alcohol	89,00%																																					
Aqua	2,00%																																					

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp. z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

2. Właściwości fizyko-chemiczne produktu gotowego

Lp.	Własności wyrobu gotowego	Wymagania specyfikacji
1	Wygląd	Jednorodny żel
2	Zapach	Charakterystyczny
3	Barwa	Biała
4	pH	4,50 – 5,50
5	Gęstość [g/ml]	0,950 – 1,050

str. 16

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl	
--	---

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

3. Stabilność produktu i kompatybilność z opakowaniem.

	CZAS TRWANIA [DNI]	WARUNKI	BADANE PARAMETRY	WYNIK
TEST STABILNOŚCI	84	tp	Ocena sensoryczna, pH, stabilność wirówkowa	Produkt jest stabilny. Nie zaobserwowano znaczących zmian we właściwościach fizykochemicznych produktu.
	84	5°C	Ocena sensoryczna, pH, stabilność wirówkowa	
	84	40°C	Ocena sensoryczna, pH, stabilność wirówkowa	
TEST KOMPATYBILNOŚCI	84	tp	Ocena sensoryczna opakowania, test ubytku masy	Produkt jest kompatybilny z opakowaniem. Skład produktu i opakowania nie wykazują wzajemnego oddziaływania.
	84	5°C	Ocena sensoryczna opakowania, test ubytku masy	
	84	40°C	Ocena sensoryczna opakowania, test ubytku masy	
OKREŚLONY TERMIN TRWAŁOŚCI	24 miesiące			
PAO (TERMIN TRWAŁOŚCI PO OTWARCIU)	N/D			
NUMER RAPORTU	RSK1-23-04-18-1 z dnia 13.06.2023			

str. 17

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

4. Ocena mikrobiologiczna.

4.1. Czystość mikrobiologiczna surowców

Wymagania dotyczące czystości mikrobiologicznej zastosowanych surowców są zawarte w dostarczonych przez producenta specyfikacjach dostarczonych surowców. Wymagania dotyczące czystości mikrobiologicznej zależą od rodzaju surowca i jego podatności na zakażenia mikrobiologiczne. Wszystkie surowce spełniają wymagania mikrobiologiczne zgodnie z normą ISO 17516: 2014-11.

4.2. Czystość mikrobiologiczna wyrobu gotowego.

Oceniany produkt zaliczany jest do grupy produktów, które charakteryzują się wysoką podatnością na zakażenia mikrobiologiczne, zostały wykonane wdrożeniowe badania mikrobiologiczne w oparciu o normy PN-EN ISO 17516:2014 Kosmetyki - Mikrobiologia - Limity Mikrobiologiczne.

RODZAJ MIKROORGANIZMU	PRZEWIDYWANY WYNIK DLA PRODUKTÓW KATEGORII I*	PRZEWIDYWANY WYNIK DLA PRODUKTÓW KATEGORII II**
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych (bakterie, drożdże i pleśnie)	≤ 100 jtk/g lub ml	≤ 1000 jtk/g lub ml
<i>Escherichia coli</i>	Nieobecne w 1 g lub 1 ml	Nieobecne w 1 g lub 1 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nieobecne w 1 g lub 1 ml	Nieobecne w 1 g lub 1 ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nieobecne w 1 g lub 1 ml	Nieobecne w 1 g lub 1 ml
<i>Candida albicans</i>	Nieobecne w 1 g lub 1 ml	Nieobecne w 1 g lub 1 ml

Protokół RM1-23-04-18-1 z dnia 21.04.2023

4.3. Skuteczność ochrony przeciwdrobnoustrojowej

Test konserwacji produktu kosmetycznego został przeprowadzony z użyciem metody PN-EN ISO 11930:2019. Wynik potwierdza skuteczność użytego układu konserwującego.

Kryterium A

Raport: RK1-23-04-18-1 z dnia 30.05.2023

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

5. Zanieczyszczenia, ilości śladowe, informacje o materiale, z którego wykonano opakowanie.

5.1. Zanieczyszczenia i ilości śladowe.

L.p.	Nazwa handlowa	Zanieczyszczenia
1.	EPIMEDIUM EXTRACT(GPD)-RSPO	Metale ciężkie < 10ppm Arsen: > 2ppm
2.	WORMWOOD EXTRACT	Metale ciężkie < 10ppm
3.	ARNICA EXTRACT	Metale ciężkie < 10ppm
4.	GLIKOL PROPYLENOWY	Żelazo, mg/kg max 0,3 Arsen, mg/kg max 2 Ołów, mg/kg max 1 Kadm, mg/kg max 0,5 Rtęć, mg/kg max 0,1
5.	PEG 40 HCO	1,4-dioksan < 10ppm
6.	SHAROMIX 721	µg/g Co < 0,5 ppm µg/g Cr < 0,5 ppm µg/g Ni < 0,5 ppm µg/g As < 0,5 ppm

str. 19

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

5.2. Informacje o materiale, z którego wykonano opakowanie.

RODZAJ OPAKOWANIA	Butelka z nakrętką typu flip-top
MATERIAŁ OPAKOWANIA	Butelka: PE; nakrętka PP
POJEMNOŚĆ OPAKOWANIA	500ml
UWAGI	n/d
OŚWIADCZENIA	Zgodnie z dokumentacją dostarczoną przez producenta, dotyczącą materiału, z którego wykonano opakowanie nie są spodziewane zanieczyszczenia (producent opakowania deklaruje brak przenikania substancji używanych podczas procesu produkcyjnego zgodnie z Rozporządzeniem (WE) NR 10/2011 z dnia 14 stycznia 2011 r. w sprawie materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych przeznaczonych do kontaktu z żywnością Aneks 1) lub niestabilność mogące wpływać na bezpieczeństwo produktu gotowego. Skład produktu oraz opakowania nie wskazuje na możliwość interakcji masy z opakowaniem.

str. 20

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

6. Normalne i dające się racjonalnie przewidzieć stosowanie produktu kosmetycznego

NORMALNE I DAJĄCE SIĘ RACJONALNIE PRZEWIDZIEĆ STOSOWANIE	Produkt kosmetyczny – produkt do pielęgnacji skóry całego ciała
OPIS STOSOWANIA PRODUKTU NA ETYKIECIE	Niewielką ilość żelu zaaplikuj na oczyszczoną wcześniej skórę, rozsmaruj równomiernie do całkowitego wchłonięcia.
OSTRZEŻENIA NA ETYKIECIE	Unikać kontaktu z oczami.

7. Narażenie na działanie produktu kosmetycznego

Przeznaczenie	Pielęgnacja skóry całego ciała
Populacja docelowa	Osoby dorosłe, dzieci powyżej 3 roku życia
Ilość dziennych aplikacji	2,28 / dzień
Przewidywane dzienne zużycie q_x [g/dzień]	7,82
Całkowite dzienne zużycie $q_x \cdot bw$ [mg/kg masy ciała/dzień]*	123,20
Miejsce kontaktu z ciałem człowieka	Skóra całego ciała
Powierzchnia kontaktu SSA	15670
Rodzaj produktu	Niesplukiwany
Współczynnik retencji $F_{retencji}$	1,00
Poziom narażenia skóry $E_{dermalny}$ [mg/cm²]	0,499
Dzienna ekspozycja na produkt $A=E_{produkt}$ [mg/kg masy ciała/dzień]	123,20
Zamierzona droga narażenia	Powierzchnia skóry – przy zastosowaniu zgodnie z przeznaczeniem
Wtórna droga narażenia	Oczy – niezamierzone podrażnienie Pokarmowa – niezamierzone spożycie

*przy założeniu masy ciała przeciętnego człowieka 60kg

Ocena ekspozycji została przeprowadzona na podstawie SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation (12th revision) z wykorzystaniem następujących skrótów i równań:

str. 21

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

SSA	Skin Surface Area; powierzchnia skóry [cm ²]
f	Frequency of application; częstotliwość aplikacji [day ⁻¹]
q _x	Estimated Daily Amount Applied; przewidywane dzienne zużycie [g/day]
q _{x bw}	Relative Daily Amount Applied; całkowite dzienne zużycie [mg/kg bw/day]
bw	Human body weight; waga ciała człowieka (wartość domyślna: 60 kg) [kg bw]
F _{ret}	Retention Factor; faktor retencji
E _{product}	Calculated Daily Exposure; dzienne narażenie [g/day]
A - E _{product bw}	Calculated Relative Daily Exposure; dzienna ekspozycja na produkt [mg/kg bw/day]
E _{dermat}	Dermal Exposure; poziom narażenia skóry [mg/cm ²]
E _{dermat Fret}	Dermal Exposure including Retention Factor; poziom narażenia skóry z uwzględnieniem faktu retencji [mg/cm ²]
SED	Systemic Exposure Dose; dawka dziennego narażenia systemicznego [mg/ kg bw/day]
DA _s	Dermal Absorption as amount per surface; absorpcja dermalna wyrażona jako stosunek ilości substancji do powierzchni [µg/ cm ²]
DA _p	Dermal Absorption as a percentage; absorpcja dermalna wyrażona w procentach [%]
C	Concentration of the substance; stężenie substancji [%]
MoS	Margin of Safety; margines bezpieczeństwa
POD _{sys}	Point of Departure for the Systemic Exposure; punkt wyjścia dla ekspozycji systemowej [mg/kg bw/day]
BMD	Benchmark Dose; dawka wyznaczająca [mg/kg bw/day]
NOAEL	No Observable Adverse Effect Level; najwyższa dawka lub stężenie substancji, dla którego nie obserwuje się działania niepożądanego [mg/kg bw/day]
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level; najniższa dawka substancji wywołująca działanie niepożądane [mg/kg bw/day]
MoE	Margin of Exposure; margines ekspozycji
DI	Daily Intake of food product; dzienna dawka produktu spożywczego [mg/kg bw/day]

$$q_{x bw} = \frac{q_x [mg]}{bw}$$

$$E_{product} = q_x \times F_{ret}$$

$$A = E_{product bw} = q_{x bw} \times F_{ret}$$

$$E_{dermat} = \frac{q_x [mg]}{SSA}$$

$$E_{dermat Fret} = E_{dermat} \times F_{ret}$$

$$SED = \frac{DA_s \times 10^{-3} \times SSA \times f}{bw}$$

$$SED = E_{product bw} \times \frac{C}{100} \times \frac{DA_p}{100}$$

$$MoS = \frac{POD_{sys}}{SED}$$

$$POD_{sys} = BMD, NOAEL \text{ or } LOAEL$$

$$MoE = \frac{DI}{SED}$$

$$DI = \frac{m \text{ of food consumed daily [mg]}}{bw}$$

str. 22

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAN www.invanto.pl	
--	---

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

8. Narażenie na działanie substancji

Nazwa wg INCI	SED mg/kg bw/day	NOAEL mg/kg bw/day	POD	MoS	C [%]	C max [%]	NOAEL REFERENCE
AQUA	28,389	*	*	*	46,085%	*	Water serves as a solvent. In the field of topical application its toxicity is irrelevant from the toxicological point of view. The quality of water is determined by the WHO Guidelines for Drinking-water Quality.
PROPANEDIOL	4,553	1000	1000	220	30,800%	*	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/2099
GLUCOSAMINE SULFATE	2,464	430	430	175	10,000%	*	https://www.cir-safety.org/sites/default/files/Glucosamine_1.pdf
EPIMEDIUM KOREANUM EXTRACT	2,372	1000	1000	422	3,850%	*	https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/001480545.2022.2050749
HYDROXYETHYLCELLULOSE	1,109	4500	4500	4058	1,800%	*	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/efsa.2018.5047
PEG-40 HYDROGENATED CASTOR OIL	0,924	1000	1000	1082	1,500%	*	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/2632007/6/2
DIMETHYL SULFONE	0,616	1500	1500	2435	1,000%	*	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/1759007/6/2
MENTHOL	0,616	200	200	325	1,000%	*	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/1375877/2/2
PROPYLENE GLYCOL	0,616	1700	1700	2760	1,000%	*	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/1600117/6/2
GLYCERIN	0,554	8000	8000	14430	0,900%	*	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/144817/6/2
BENZYL ALCOHOL	0,548	286	286	522	0,890%	1,00%	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14748/7/6/2
ROSMARINUS OFFICINALIS LEAF OIL	0,308	300	300	974	0,500%	*	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/54797/6/2
EUCALYPTUS GLOBULUS LEAF OIL	0,123	300	300	2435	0,200%	*	https://www.cir-safety.org/sites/default/files/eucalyptus_1.pdf
EUGENIA CARYOPHYLLUS BUD OIL	0,123	600	600	4870	0,200%	*	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13694
EUGENOL	0,108	600	600	5531	0,176%	*	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13694/7/6/2
DEHYDROACETIC ACID	0,055	100	33	595	0,090%	0,60% (kwas)	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/21299/7/6/2
LIMONENE	0,052	825	196	3738	0,085%	*	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15258/7/6/2
ARTEMISIA ABSINTHIUM EXTRACT	0,049	1270	1270	2571	0,080%	*	https://www.istage.jst.go.jp/article/ist/28/5/28_5_471/pdf
ARNICA MONTANA FLOWER EXTRACT	0,009	*	*	*	0,015%	*	https://cir-reports.cir-safety.org/view-attachment/?id=75e3329-d9e74-ec11-8943-0022482106a6
LINALOOL	0,002	498	498	211081	0,004%	*	https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14501/7/6/2
SODIUM BENZOATE	0,002	500	500	216450	0,004%	2,5% (kwas)	SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS SCCP OPINION ON Benzoic Acid and Sodium Benzoate Adopted by the SCCP during the 4th plenary of 21 June 2005
POTASSIUM SORBATE	0,002	1000	1000	541126	0,003%	0,60% (kwas)	https://dissemination.ec.europa.eu/floccides/ActiveSubstances/1350-08/1350-08_Assessment_Report.pdf

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

9. Profil toksykologiczny substancji.

Ocena Toksykologiczna	
Nazwa INCI	PROPANEDIOL (PROPANODIOL)
Absorbpcja skórna	0,12 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego) [475]
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 oralnie, badania na szczurach = 14,9 ml/kg masy ciała (OECD 401)
Inhalacyjna	Inhalacyjne średnie stężenie śmiertelne, badania na szczurach > 5,0 mg/dm ³ (OECD 403)
Dermalna	LD50 dermalnie, królik > 4200 mg/kg masy ciała (OECD 402)
Działania drażniące	
Na skórę	Lekko drażniący w badaniach na królikach (OECD 404) [502]
Na oczy	Nie drażni oczu (badania na królikach, OECD 405) [503]
Działanie uczulające	
Na skórę	W badaniach na świnkach morskich nie zaobserwowano działania uczulającego propanodiolu [503]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Toksyczność dawki powtarzalnej (28 dni) inhalacyjna: NOAEL inhalacyjny, szczur = 1 800 mg/m ³ powietrza (OECD 412) Toksyczność subchroniczna (90 dni) doustna: NOAEL oralny, szczur, 90 dni = 1000 mg/kg masy ciała/dzień (OECD 408) [503]
Genotoksyczność	Mutagenność/genotoksyczność <i>in vitro</i>: Niegenotoksyczny w teście aberracji chromosomowych komórek ssaków <i>in vitro</i> (OECD 473) przy użyciu fibroblastów płuc chomika chińskiego [503] Mutagenność/genotoksyczność <i>in vivo</i>: Niegenotoksyczny w teście mikrojądrowym na myszach <i>in vivo</i> [503]
Kancerogenność	Propanodiol nie jest uważany za związek rakotwórczy [503]
Fototoksyczność	Fototoksyczność/działanie fotodrażniące i fotouczulające: Dane przekrojowe z 1,5-pentanodiolu: Substancja w stężeniu 5 % wag. nie była fototoksyczna i nie uwrażliwiała na światło w 24 - godzinny teście okluzyjnym wykonanym po ekspozycji skóry na światło UVA i UVB w badaniach na ludziach [504]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Działanie szkodliwe na płodność i reprodukcję:

str. 24

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	<p>Dane przekrojowe z 1,3-butanodiolu: Badania na szczurach (OECD 416) nie wykazały niekorzystnego wpływu na parametry reprodukcyjne i laktacyjne [503]</p> <p>Toksyczność rozwojowa: 1,3-propanodiol nie wykazywał właściwości teratogennych w badaniach na szczurach (OECD 414). NOAEL dla toksyczności matczynej i płodowej, szczur = 1000 mg/kg masy ciała/dzień [503]</p>
Badania z udziałem ludzi	Propanodiol nie jest uważany za związek rakotwórczy [503]
Ocena bezpieczeństwa	<p>Propanodiol, jest związkiem organicznym, najprostszym przedstawicielem grupy propano-1,3-diolei, składającym się z propanu, w którym jeden wodór z każdej grupy metylowej jest podstawiony grupą hydroksylową. Propanodiol może być otrzymywany przez fermentację z glukozy pochodzącej z kukurydzy za pomocą biokatalizatora, można go również znaleźć w niektórych roślinach. Substancja ta jest stosowana w syntezie niektórych polimerów jako rozpuszczalnik i środek zapobiegający zamarzaniu. Co więcej, propanodiol jest szeroko stosowany w roli rozpuszczalnika i modyfikatora reologii w produktach do higieny osobistej, takich jak: kosmetyki dla dzieci, perfumy, spray'e do włosów, dezodoranty, szampony, mydła, płyny, pasty do zębów itp. Panel ekspertów CIR stwierdził, że propanodiol jest bezpieczną substancją w obecnych praktykach jej stosowania i używanych stężeń w kosmetykach. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa MoS > 100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [504]</p>
Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	GLUCOSAMINE SULFATE (SIARCZAN GLUKOZAMINY)
Absorbcja skórna	0,10 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 8000 mg/kg masy ciała (szczur, glukozamina)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	N/D
Działania drażniące	
Na skórę	N-Acetyloglukozamina nie działa drażniąco na skórę (OECD 439) [505]
Na oczy	Przeprowadzono test konwersji bromku 3-[4,5,-dimetylotiazol-2-ilo]-2,5-difenylotetrazoliowego (MTT) w celu określenia potencjalnego

str. 25

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	<p>podrażnienia oczu serum do twarzy zawierającego 2 % wag. N - acetyloglukozaminy. Stratyfikowane ludzkie keratynocyty ekspozowano na czysty artykuł testowy przez 8, 16, 20 i 24 godziny. Nie odnotowano działania drażniącego [505]</p>
	Działanie uczulające
Na skórę	N-Acetyloglukozamina nie działa uczulająco na skórę (DPRA; OECD 442C) [505].
Toksyczność dawki powtarzalnej	Norweski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności obliczył wartości marginesu bezpieczeństwa (MoS) dla stosowania 10 % wag. siarczanu glukozaminy w balsamie do ciała (35,0), kremie do nóg (99,0) i kremie do twarzy (178,0) oraz na podstawie całkowitego narażenia na kosmetyki. Wartości te obliczono przy założeniu 100 % wchłaniania przez skórę, wartości NOAEL wynoszącej 430 mg/kg masy ciała/dzień (otrzymanej z testu toksyczności po wielokrotnej dawce doustnej przeprowadzonego na psach z biodostępnością wynoszącą 20 % wag.) oraz obliczonego względnego dziennego narażenia, na odpowiednio: 123 mg/kg masy ciała/dzień, 20 mg/kg masy ciała/dzień, 43 mg/kg masy ciała/dzień, 50 mg/kg masy ciała/dzień i 24 mg/kg masy ciała/dzień, 13 mg/kg masy ciała/dzień dla balsamu do ciała, kremu do nóg i kremu do twarzy. Zgodnie z tą oceną maksymalne poziomy stosowania wyniosły odpowiednio 18 % wag., 10 % wag. i 3,5 % wag. w balsamie do twarzy, nóg i ciała
Genotoksyczność	Potencjalną genotoksyczność chlorowodoru glukozaminy pochodzącej z <i>Aspergillus niger</i> oceniano w teście Ames (test służący do wykrywania siły mutagenu). Szczepy testowe (<i>S. typhimurium</i> oraz <i>E. coli</i>) poddano ekspozycji na chlorowodorek glukozaminy w stężeniach 100 µg/płytkę, 333 µg/płytkę, 1000 µg/płytkę, 3300 µg/płytkę i 5000 µg/płytkę, z aktywacją metaboliczną lub bez niej. Substancję testową uznano za niemutageną. Test mikrojądrowy <i>in vivo</i> przeprowadzono zgodnie z OECD 474. Nie stwierdzono statystycznie istotnego wzrostu liczby polichromatycznych erytrocytów mikrojądrowych ani zmniejszenia stosunku polichromatycznych do normochromatycznych erytrocytów na żadnym poziomie dawki. Substancję badaną uznano za nietoksyczną dla szpiku kostnego [505]
Kancerogenność	Potencjał rakotwórczy N - Acetyloglukozaminy oceniano na szczurach. Zwierzętom podawano w diecie N - Acetyloglukozaminę na poziomie 0

str. 26

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	% wag., 2,5 % wag. lub 5 % wag. przez 104 tygodnie. Substancję testową uznano za nierakotwórczą [505]
Fototoksyczność	Brak danych toksykologicznych, jednak biorąc pod uwagę budowę chemiczną siarczanu glukozaminy (brak grup chromoforowych) nie przewiduje się działania fototoksycznego
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Oceniono wpływ suplementacji glukozaminą w wodzie pitnej przed kryciem na jednorodność ściółki szczurów Sprague-Dawley, receptywność macicy i poziom hormonów matczynych. Po 2 tygodniach podawania szczury kojarzono. Oceniono jajniki, macice, miejsca implantacji, masę urodzeniową potomstwa, wydajność łożyska matki i osocze matek. Zmienność masy urodzeniowej w obrębie miotu w grupie leczonej glukozaminą wyniosła 5,55 % wag., co stanowi znacznie mniejszą zmienność niż w grupie kontrolnej (8,17 %). Nie obserwowano działania toksycznego zarówno na płody jak i matki [505]
Badania z udziałem ludzi	W przeglądzie literatury dotyczącej badań z udziałem ludzi (między innymi testy HRIPT) nie odnotowano działania drażniącego, uczulającego dla badanych substancji (N - acetyloglukozamina, glukozamina, chlorowodorek glukozaminy) [505]
Ocena bezpieczeństwa	Siarczan glukozaminy to substancja kondycjonująca, zmiękcza i wygładza włosy nadając im naturalny blask. Działa antystatycznie, przez co niweluje efekt elektryzowania się włosów i ułatwia ich rozczesywanie. Siarczan glukozaminy stymuluje również syntezę kwasu hialuronowego, dlatego poprawia nawilżenie skóry, zwiększa jędrność, elastyczność oraz przyspiesza regenerację. Działa przeciwzapalnie i antyoksydacyjnie, chroniąc przed szkodliwym wpływem wolnych rodników na skórę. Panel CIR ocenił glukozaminę i jej pochodne jako substancje bezpieczne do stosowania w kosmetykach. W ocenianym produkcie siarczan glukozaminy jest składnikiem bezpiecznym [505]

Ocena Toksykologiczna	
Nazwa INCI	EPIMEDIUM KOREANUM EXTRACT (EKSTRAKT Z EPIMEDIUM KOREANUM)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	TD ₀ 52,5 mg/kg masy ciała (szczur, ikaryna)

str. 27

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Inhalacyjna	N/D
Dermalna	N/D
Działania drażniące	
Na skórę	Ikaryna nie powoduje podrażnienia skóry [506]
Na oczy	Brak danych literaturowych
Działanie uczulające	
Na skórę	Brak danych literaturowych
Toksyczność dawki powtarzalnej	W badaniu tym badano toksyczność podprzewleklą wodnego ekstraktu <i>Epimedium Koreanum</i> u szczurów przy codziennym podawaniu dożołądkowym w dawce 7 g/kg masy ciała, 5 g/kg masy ciała, 15 g/kg masy ciała lub 30 g/kg masy ciała przez 13 tygodni. Dziewięć składników ekstraktu wodnego zidentyfikowano metodą ultrasprawną chromatografii cieczowej (UPLC). Nie określono poziomu, przy którym nie zaobserwowano działań niepożądanych, ale u szczurów leczonych przez 13 tygodni wynosił on poniżej 7,5 g/kg masy ciała. U samic szczurów <i>Epimedium Koreanum</i> może uszkadzać wątrobę i trzustkę oraz zaburzać biosyntezę fenyloalaniny, tyrozyny, tryptofanu, waliny, leucyny i izoleucyny oraz metabolizm fenyloalaniny. U samców szczurów, ekstrakt może uszkodzić wątrobę i nadnercza oraz zaburzyć biosyntezę waliny, leucyny i izoleucyny oraz metabolizm pirogronianu [507]
Genotoksyczność	Test odwrotnej mutacji bakteryjnej nie wykazał mutagennego działania <i>Epimedium Koreanum</i> . Ponadto ekstrakt z <i>Epimedium Koreanum</i> nie wykazał żadnego działania klastogenego w testach <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> [508]
Kancerogenność	Brak danych literaturowych
Fototoksyczność	Brak danych literaturowych
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Brak danych literaturowych
Badania z udziałem ludzi	Brak danych literaturowych
Ocena bezpieczeństwa	W tradycyjnych zastosowaniach <i>Epimedium Koreanum</i> jest często stosowane w leczeniu różnych chorób, takich jak: zaburzenia erekcji, bezpłodność, reumatoidalne zapalenie stawów, osteoporoza, astma, zespół niedoboru Yang nerek itp. Do chwili obecnej odkryto ponad 379 związków z różnych części <i>Epimedium Koreanum</i> , w tym flawonoidy, lignany, kwasy organiczne, terpenoidy, węglowodory, pochodne dihydrofenantrenu, alkaloidy i inne. Badania wykazały, że związki i ekstrakty roślinne z <i>Epimedium Koreanum</i> mają szeroki zakres działania farmakologicznego na układ rozrodczy, sercowo-naczyniowy i nerwowy, a także mają właściwości przeciwosteoporotyczne, przeciwnowotworowe,

str. 28

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl	
--	---

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	przeciwutleniające, przeciwzapalne, immunomodulujące, hepatoprotekcyjne i przeciwwirusowe. Poza tym ekstrakty roślinne z <i>Epimedium Koreanum</i> wykazują potencjalną hepatotoksyczność. W ocenianym produkcie jest to składnik bezpieczny, a wyliczony MoS spełnia kryteria akceptacji
OCENA TOKSYKOLOGICZNA	
NAZWA INCI	HYDROXYETHYLCELLULOSE (HYDROKSYETYLOCELULOZA)
ABSORBCJA SKÓRNA	0,50 % (zastosowanie promotorów przeniesienia przeznaskórkowego)
TOKSYCZNOŚĆ OSTRA	
DOUSTNA	LD50 > 5000 mg/kg [szczur, brak efektu toksycznego]
INHALACYJNA	N/D
DERMALNA	N/D
DZIAŁANIA DRAŻNIĄCE	
NA SKÓRĘ	Nie działa drażniąco na skórę królika.
NA OCZY	Roztwór wodny może powodować delikatne podrażnienie oka królika.
DZIAŁANIE UCZULAJĄCE	
NA SKÓRĘ	Nie działa uczulająco na skórę świnki morskiej.
TOKSYCZNOŚĆ DAWKI POWTARZALNEJ	W przypadku metylocelulozy (E 461) poziom dawki wynosił 3% u szczurów (co odpowiada 2700 mg/kg mc na dzień) i został wybrany jako NOAEL na podstawie spadku masy ciała i narządów wykazanego u samców szczurów, którym podawano najwyższy dodatek poziom (10%, co odpowiada 9000 mg/kg mc na dzień i dzień).
GENOTOKSYCZNOŚĆ	Struktura chemiczna niezmodyfikowanej i zmodyfikowanej celulozy nie wskazuje na genotoksyczność i że w kilku badaniach genotoksyczności in vitro i in vivo nie stwierdzono żadnych oznak genotoksyczności żadnej z tych substancji. W odniesieniu do modyfikowanych celuloz, metyloceluloza była ujemna w teście rewersji mutacji bakteryjnych, w teście aberracji chromosomowych in vitro w komórkach ssaków oraz w testach z udziałem gospodarza na drożdżach i bakteriach.
KANCEROGENNOŚĆ	Nie wykazuje działania rakotwórczego.
FOTOTOKSYCZNOŚĆ	Badanie przeprowadzono na Hydroxyethylceluloze (HEC). Nie wykazano działania fototoksycznego na skórze królika.
TOKSYCZNOŚĆ ROZRODCZA I ROZWOJOWA	Jedyne istotne badanie toksyczności rozwojowej z użyciem hydroksypropylocelulozy (E 463) (rozpuszczonej w 1% roztworze gumy arabskiej) przeprowadzono na ciężarnych szczurach narażonych przez zglębnik od 7 do 17 dnia ciąży do testu 0,200, 1000 lub 5000 mg/kg mc. Nie stwierdzono działań niepożądanych związanych z HPC u matek ani u badanych płodów.

str. 29

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

BADANIA Z UDZIAŁEM LUDZI	W badaniach przekrojowych działania drażniącego na skórę ochotników, zauważono niewiele reakcji drażniących; niektóre ze względu na efekt suszenia produktu; brak oznak uczulenia.
OCENA BEZPIECZEŃSTWA	Na podstawie dostępnych danych badań na zwierzętach i danych klinicznych panel ekspertów CIR uznał modyfikowaną celulozę za bezpieczny składniki kosmetyczny.

Ocena Toksykologiczna	
Nazwa INCI	PEG-40 HYDROGENATED CASTOR OIL (UWODORNIONY OLEJ RYCYNOWY PEG-40)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyčność ostra	
Doustna	LD50 > 2000 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	N/D
Działania drażniące	
Na skórę	Substancję badano w modelu ludzkiej skóry EpiDerm™ przy użyciu podwójnych tkanek przez 3 i 60 minut. Względna średnia żywotność tkanek traktowanych badaną substancją wynosiła 98,0 % dla 3-minutowej ekspozycji i 101,5 % dla 60-minutowej ekspozycji. Można zatem stwierdzić, że substancja nie działa żrąco na skórę [525]
Na oczy	Potencjał działania drażniącego na oczy oceniano za pomocą testu modelowego ludzkiej rogówki. Substancja nie okazała się reduktorem MTT i wykluczono zakłócenia barwy [526]
Działanie uczulające	
Na skórę	Substancję uważa się za nie działającą uczulająco na skórę. Potwierdzają to badania QSAR [527]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Doustne podanie substancji było dobrze tolerowane przez dorosłe zwierzęta (szczur). W kontekście tego badania nie wykazano żadnych dowodów na to, że substancja zaburza funkcjonowanie układu hormonalnego. Uznano, że poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) dla toksyczności ogólnoustrojowej wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień [528]
Genotoksyczność	W teście Ames substancję badano na szczepach <i>Salmonella typhimurium</i> i <i>E. coli</i> w obecności i przy braku aktywacji metabolicznej. Nie odnotowano wzrostu częstości mutacji u żadnego z testowanych

str. 30

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	szczepów, zarówno w obecności, jak i przy braku aktywacji metabolicznej. W warunkach tego badania substancję uważa się za niemutageną [529]
Kancerogenność	Brak danych literaturowych
Fototoksyczność	Nie działa fototoksycznie na skórę [530]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) w przypadku toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej, wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień, biorąc pod uwagę brak wpływu na cykl ruijowy, okres przed stosunkiem, wydajność krycia, płodność i długość ciąży lub u potomstwa na podstawie wielkości miotu, stosunku płci, objawów klinicznych, odległości odbytowo-płciowej lub makroskopii [531]
Badania z udziałem ludzi	W testach klinicznych na ludziach, olej rycynowy, nie wykazuje znaczącego działania drażniącego na skórę, uczulającego ani fotouczulającego, ale był łagodnym środkiem drażniącym oczy [530]
Ocena bezpieczeństwa	Uwodorniony olej rycynowy PEG-40 jest bardzo bezpiecznym surowcem stosowanym w kosmetykach bez określonych ograniczeń. Cosmetic Ingredient Review: zgodnie z opinią panelu CIR uwodorniony olej rycynowy PEG-40 może być bezpiecznie stosowany w kosmetykach. Nie stwierdzono podrażnień skóry ani oczu w wyniku narażenia na działanie oleju rycynowego PEG i uwodornionych składników oleju rycynowego PEG
Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	DIMETHYL SULFONE (DIMETYLOSULFOTLENEK)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 2000 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	LC50 > 600 mg/cm ³ powietrza (szczur)
Dermalna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Potencjał podrażnienia skóry badanego artykułu określono zgodnie z wytycznymi OECD 439 stosowanymi w tym badaniu. Ustalono, że średni % żywotności tkanki w porównaniu z kontrolą ujemną (n = 3) badanej substancji chemicznej wynosi 94,4 %. W związku z tym uznano, że badana substancja chemiczna nie działa drażniąco na ludzką skórę [538]

str. 31

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl	
--	--

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
----------------------	----------------	---------------	----	--------------------------	------------

Na oczy	Potencjał podrażnienia oczu przez badaną substancję chemiczną określono zgodnie z wytycznymi badawczymi OECD 492 stosowanymi w tym badaniu. Ustalono, że średni % żywotności tkanek badanej substancji chemicznej wynosi 86,3 %. W związku z tym badanej substancji chemicznej nie uznano za substancję drażniącą oczu [539]
Działanie uczulające	
Na skórę	Potencjał uczulający na skórę badaną substancją chemiczną oceniano za pomocą testu lokalnych węzłów chłonnych u myszy (LLNA). Badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi OECD 429. Na podstawie badania uznano, że substancja nie działa uczulająco [540]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Doustne podawanie 1500 mg/kg masy ciała/dzień (1,5 g/kg masy ciała/dzień) substancji testowej przez 90 dni nie spowodowało żadnych działań niepożądanych ani śmiertelności. Nie miało to wpływu na masę ciała ani szacunkowe spożycie pokarmu. Nie zaobserwowano żadnych zmian hematologicznych ani klinicznych zmian chemicznych. Histologia nerek leczonych zwierząt była prawidłowa. Zatem poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) substancji testowej w tym 90-dniowym badaniu z użyciem zglębniaka, określono na 1500 mg/kg masy ciała/dzień [541]
Genotoksyczność	W teście odwrotnej mutacji bakteryjnej z użyciem szczepów <i>S. typhimurium</i> , badana substancja nie indukowała żadnego znaczącego wzrostu rewertantów histydynozależnych. W związku z tym stwierdza się, że substancja badana nie jest genotoksyczna. W teście aberracji chromosomowej <i>in vitro</i> z użyciem komórek płuc chomika chińskiego nie zaobserwowano żadnych skutków aberracji. Dlatego też substancję testową uważa się za niemutagenną w komórkach płuc chomika chińskiego [542]
Kancerogenność	Brak danych literaturowych
Fototoksyczność	Brak danych literaturowych
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	W oparciu o dane dostępne z danego badania, uznano, że NOAEL dla materiału testowego wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień w przypadku toksyczności reprodukcyjnej, gdy samcom i samicom szczurów podawano doustnie materiał testowy. Zatem porównanie tej wartości z kryteriami materiału testowego zgodnie z przepisami CLP prawdopodobnie nie spowoduje jego sklasyfikowania jako substancji działającej szkodliwie na rozrodczość.

str. 32

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	Na podstawie badania dostępnego dla badanej substancji chemicznej dokonano przeglądu w celu określenia toksyczności rozwojowej, uznano, że NOAEL dla badanej substancji chemicznej wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień w przypadku szczurów, którym podawano badaną substancję chemiczną doustnie. Zatem porównanie tej wartości z kryteriami określonymi w rozporządzeniu CLP prawdopodobnie nie spowoduje sklasyfikowania jej jako substancji działającej toksycznie na rozrodczość i rozwój [543]
Badania z udziałem ludzi	Brak danych dotyczących badań z udziałem ludzi
Ocena bezpieczeństwa	Metylosulfonilometan jest to związek organicznej siarki. Wykazuje działania antyoksydacyjne oraz ułatwia przenikanie substancji odżywczych. W ocenianym produkcie jest to składnik bezpieczny, a obliczony MoS spełnia kryteria akceptacji

Ocena Toksykologiczna	
Nazwa INCI	MENTHOL (MENTOL)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD100 > 1500 mg/kg masy ciała (kot)
Inhalacyjna	LC50 > 5289 mg/m ³ (szczur)
Dermalna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Działa nieznacznie drażniąco na skórę królika [544]
Na oczy	Działa drażniąco na oczy królika [545]
Działanie uczulające	
Na skórę	Nie działa uczulająco na skórę świnki morskiej [546]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Badanie wykonano na grupie 80 szczurów, którym przez 5 tygodni aplikowano zadaną dawkę substancji. NOEL wyznaczono na poziomie 200 mg/kg masy ciała/dzień [547]
Genotoksyczność	Nie działa genotoksycznie w teście aberracji chromosomowej zarówno z aktywacją metaboliczną, jak i bez niej [548]
Kancerogenność	Nie działa kancerogennie [549]
Fototoksyczność	Brak danych literaturowych
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Badania histopatologiczne narządów rozrodczych myszy nie wykazały zmian w badaniach toksyczności po podaniu wielokrotnym z zastosowaniem D/L-mentolu, a także w badaniach rakotwórczych u pacjentów z D/L

str. 33

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	mentolem. W związku z tym nie ma dowodów na to, że D/L-mentol mógłby wpływać negatywnie na reprodukcję. Dawkę NOAEL w badaniu 104-tygodniowym wyznaczono na 667 mg/kg masy ciała/dzień [550]
Badania z udziałem ludzi	Nadwrażliwość alergiczną badano w grupie 228 wybranych pacjentów dermatologicznych za pomocą testów platkowych z 1 % wag. mentolem w wazelinie; częstość występowania wyraźnego uczulenia: 1,3 % pacjentów.
Ocena bezpieczeństwa	Mentol jest bezpiecznym składnikiem do stosowania w produktach kosmetycznych. Cosmetic Ingredient Review: wskazuje, że istnieją doniesienia o działaniu podrażniającym mentolu, ale nie wykazano tego w testach platkowych. CIR w 2018 r. dokonał przeglądu dostępnej literatury naukowej dotyczącej olejku z mięty pieprzowej, którego głównym składnikiem jest mentol i uznał go za bezpieczny do stosowania w kosmetykach [551], [552]
Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	PROPYLENE GLYCOL (GLIKOL PROPYLENOWY)
Absorbacja skórna	0,50 % wag. (promotor przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 = 22000 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	LC50 > > 317042 mg/m ³ (szczur)
Dermalna	LD50 > 2000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę królika (OECD 404) [553]
Na oczy	Powoduje delikatne podrażnienie oczu królika (OECD 404) [553]
Działanie uczulające	
Na skórę	Może powodować podrażnienie skóry u niektórych osób, prawdopodobnie z powodu odwodnienia, jednak nie jest uważany za składnik uczulający [554]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Toksyczność chroniczna (> 12 miesięcy): NOAEL doustnie, wyznaczony w badaniu na szczurach = 1700 mg/kg masy ciała/dzień (w badaniu chronicznej toksyczności doustnej i 2 - letnich badaniach rakotwórczości) [553]
Genotoksyczność	Glikol propylenowy nie wykazał aktywności mutagennej w teście powrotnych mutacji bakteryjnych z użyciem szczepów <i>Salmonella typhimurium</i> . Glikol propylenowy nie powodował wykrywalnych aberracji chromosomowych w szpiku kostnym szczura po podaniu doustnym w dawkach do 5000 mg/kg masy ciała [553]

str. 34

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Kancerogenność	W badaniach długoterminowych (2 lata) na szczurach nie stwierdzono działań niepożądanych ani zmian histopatologicznych, w tym zmian nowotworowych, po zastosowaniu najwyższej badanej dawki glikolu propylenowego [553]
Fototoksyczność	Glikol propylenowy nie powodował efektu fotouczulającego w teście Photopatch na 30 ochotnikach płci męskiej i 52 ochotniczkach płci żeńskiej [555]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Badania na szczurach - dwupokoleniowa toksyczność reprodukcyjna: NOAEL dla toksyczności płodności, pokolenie F1 = 10100 mg/kg masy ciała/dzień Nie zaobserwowano wpływu na płodność F1 przy najwyższej dawce Badania na szczurach - dwupokoleniowa toksyczność reprodukcyjna: NOAEL dla toksyczności rozwojowej, pokolenie F2 = 10100 mg/kg masy ciała/dzień. Nie zaobserwowano wpływu na wielkość miotu, płęć i masę urodzeniową w pokoleniu F2 przy najwyższej dawce. Badania na myszach (OECD 414): NOAEL u matki = 520 mg/kg masy ciała/dzień [553]
Badania z udziałem ludzi	W 24-godzinnym badaniu na 33 ochotnikach przy użyciu testów płatkowych w warunkach półokluzyjnych glikol propylenowy wykazał łagodne podrażnienie. Wykazano, że substancja ta wzmacnia działanie drażniące izopropanolu i kwasu benzoesowego (badania na ludziach, test nieokluzyjny). Doniesiono o kilku studiach przypadków zapalenia skóry i atopowego zapalenia skóry związanych ze stosowaniem glikolu propylenowego [553], [555]
Ocena bezpieczeństwa	Glikol propylenowy to alkohol alifatyczny szeroko stosowany w kosmetyce jako składnik kondycjonujący, modyfikator reologii, rozpuszczalnik ekstraktów oraz substancje aktywne. Ponadto substancja ta jest wykorzystywana w żywności, farmacji, a także jako czynnik bakteriostatyczny i fungistatyczny. Panel Ekspertów CIR (Cosmetic Ingredient Review) stwierdził, że glikol propylenowy jest bezpieczny w obecnych praktykach stosowania i koncentracji w kosmetykach w preparatach niedrażniących. Substancja ta znajduje się na liście GRAS (Generally Recognized As Safe by FDA - Food and Drug Administration) jako bezpośredni dodatek do żywności.

str. 35

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	Obliczony margines bezpieczeństwa dla składnika ma akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100. Ten składnik jest oceniany jako bezpieczny do stosowania w produkcie kosmetycznym [555]
--	--

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	GLYCERIN (GLICERYNA)
Absorbcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 oralnie, szczur = 2530 - 58400 mg/kg masy ciała (OECD 401) LD50 oralnie, człowiek = 1428 mg/kg masy ciała
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 dermalnie, szczur > 21900 mg/kg masy ciała (OECD 402) LD50 dermalnie, królik > 18700 mg/kg masy ciała
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę u królików w stężeniach do 100 % wag. (test Draize - OECD 404) Łagodnie drażniąca skórę w stężeniu 100 % wag. u świnek morskich Gliceryna (50 % wag. roztwór wodny) nie drażniła osób z zapaleniem skóry (badanie na ludziach) [556]
Na oczy	Nie działa drażniąco na oczy królików w stężeniach do 100 % wag. (test Draize i OECD 405) Niedrażniąca przy podawaniu do oczu ludzi [556]
Działanie uczulające	
Na skórę	Nieuczulająca w badaniach na świnkach morskich Nieuczulająca dla człowieka (zmodyfikowany test Draize'a – human patch test) [556]
Toksyczność dawki powtarzalnej	NOAEL oralny, szczur, badania 44-dniowe = 115 - 2300 mg/kg masy ciała/dzień NOAEL oralny, człowiek 50-dniowe ≥ 2,2 g/kg masy ciała/dzień [556]
Genotoksyczność	Niegenotoksyczna (kilka testów Amesa ze szczepami <i>Salmonella typhimurium</i>). Niegenotoksyczna (OECD 474) [556]
Kancerogenność	Substancja nie jest rakotwórcza (gliceryna podawana w paszy szczurów przez 2 lata nie zwiększała częstości występowania guzów) [556]
Fototoksyczność	Nie znaleziono danych w dostępnej literaturze. Ze względu na swoją budowę chemiczną (brak grup chromoforowych) nie przewiduje się,

str. 36

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	aby gliceryna absorbowała promieniowanie UV-VIS, a tym samym działała fototoksycznie/fotouczulająco
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	<p>Działanie szkodliwe na płodność i reprodukcję: Nie wykazano. W dwupokoleniowym badaniu toksyczności reprodukcyjnej u szczurów nie zaobserwowano niekorzystnego wpływu na wydajność reprodukcyjną, wzrost i płodność (dla dawki gliceryny ~ 2000 mg/ kg masy ciała/dzień) [556]</p> <p>Toksyczność rozwojowa: Nie zaobserwowano toksyczności dla matki ani działania teratogennego u szczurów, myszy i królików (NOAEL dla toksyczności matczynej i teratogennej: u szczurów = 1310 mg/ kg masy ciała/dzień, u myszy = 1280 mg/ kg masy ciała/dzień, u królików = 1180 mg/ kg masy ciała/dzień) [556]</p>
Badania z udziałem ludzi	<p>Nie stwierdzono działania uczulającego mieszaniny gliceryna/woda w testach płatkowych przeprowadzanych na pracownikach z narażeniem zawodowym na glicerynę. Zastosowanie 100% wag. gliceryny na powierzchni oka ludzkiego spowodowało rozległe zmiany w wyglądzie śródbrzonka, ale większość tych zmian zniknęła w ciągu 90 minut po zakończeniu ekspozycji. Środek nawilżający zawierający 65,9 % wag. gliceryny nie był uczulający dla ludzi [556], [557]</p>
Ocena bezpieczeństwa	<p>Gliceryna, jest od dawna szeroko wykorzystywana w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Substancja ta jest zatwierdzona do stosowania w lekach dostępnych bez recepty, takich jak środki ochrony skóry (do 45 % wag.) i produkty do pielęgnacji jamy ustnej. Wolna gliceryna występuje naturalnie w ludzkim osoczu. Panel ekspertów CIR (Cosmetic Ingredient Review) stwierdził, że gliceryna jest bezpieczna do stosowania w produktach kosmetycznych przy stężeniach do 78,5 % wag. w produktach niezmywalnych, 68,6 % wag. w produktach splukiwanych i 47 % wag. w produktach rozcieńczonych do kąpieli. Gliceryna została wymieniona przez FDA (Food and Drug Administration) na liście GRAS (substancja powszechnie uznana za bezpieczną przez FDA) jako wielofunkcyjna substancja spożywcza oraz z przeznaczeniem do pakowania żywności. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [556]</p>

str. 37

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	BENZYL ALCOHOL (ALKOHOL BENZYLOWY)
Absorbcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 1620 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	LC50 3297 mg/m ³ powietrza (szczur)
Dermalna	LD50 < 5000 mg/kg masy ciała (świnka morska)
Działania drażniące	
Na skórę	Wykazuje nieznaczne działanie drażniące na skórę (królik) [558]
Na oczy	Działa drażniąco na oczy królika [558]
Działanie uczulające	
Na skórę	Działa uczulająco na skórę [559]
Toksyczność dawki powtarzalnej	W badaniu równoważnym OECD 451 prowadzonym na grupie szczurów nie zaobserwowano żadnego wpływu na zwiększenie masy ciała i nie zaobserwowano żadnych klinicznych objawów związanych z zespołem w trakcie badania. NOEL ustalono na 400 mg / kg masy ciała
Genotoksyczność	Alkohol benzylowy nie był mutageny, gdy badano protokół preinkubacji w obecności lub nieobecności egzogennej aktywacji metabolicznej szczepów <i>Salmonella typhimurium</i> [560] Alkohol benzylowy nie powodował zwiększonej liczby mikrojąder w polichromatycznych erytrocytach szpiku kostnego myszy [561]
Kancerogenność	W badaniach podobnych do OECD 451 samce i samice szczurów otrzymywały codziennie 0 mg/kg masy ciała/dzień, 200 mg/kg masy ciała/dzień i 400 mg/kg masy ciała/dzień alkoholu benzylowego, a samce i samice myszy otrzymywały codziennie 0 mg/kg masy ciała/dzień, 100 mg/kg masy ciała/dzień i 200 mg/kg masy ciała/dzień alkoholu benzylowego przez 104 tygodnie. W warunkach tych badań nie było dowodów na działanie rakotwórcze [562]
Fototoksyczność	Alkohol benzylowy (w stężeniu 4 mol/L - 10 mol/L) indukował umiarkowaną hemolizę (~ 6 %) tylko w obecności UVA, co klasyfikowało go jako słabo fototoksyczny związek [563]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Nie wpływa toksycznie na rozrodczość Nie powoduje zmian płodu. NOAEL 510 mg/kg masy ciała/dzień
Badania z udziałem ludzi	W dostępnej literaturze istnieje tylko kilka opisów przypadków wywołanych zawodowo alergicznych reakcji kontaktowych na alkohol

str. 38

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	benzylowy. Testy naskórne z alkoholem benzylowym w dużych zbiorowościach wykazują raczej rzadko pozytywne reakcje [564]
Ocena bezpieczeństwa	<p>Alkohol benzylowy jest bezpieczny do stosowania w produktach kosmetycznych. Rozporządzenie 1223/2009: Składnik znajduje się w wykazie substancji, które mogą być zawarte w produktach kosmetycznych z zastrzeżeniem określonych ograniczeń (załącznik III do Rozporządzenia Parlamentu i Rady (WE) nr 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych). W przypadku, gdy alkohol benzylowy jest stosowany jako składnik kompozycji zapachowych, czyli przeznaczony do celów innych niż zahamowanie rozwoju drobnoustrojów w produkcie, cel musi wynikać z prezentacji produktu. Obecność substancji musi być uwzględniona w wykazie składników (INCI), gdy jej stężenie przekracza: — 0,001 % wag. w produkcie niespłukiwanym — 0,01 % wag. w produkcie spłukiwanym. Składnik ten znajduje się również w wykazie substancji konserwujących dozwolonych w produktach kosmetycznych (załącznik V do Rozporządzenia Parlamentu i Rady (WE) nr 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych). Maksymalne stężenie w preparacie gotowym do użycia 1 % wag.</p> <p>Bezpieczeństwo czystej substancji</p> <p>Według zharmonizowanej klasyfikacji i oznakowania zatwierdzonej przez Unię Europejską, substancja ta jest szkodliwa w przypadku połknięcia i jest szkodliwa w przypadku wdychania. Należy pamiętać, że substancja zastosowana w produktach kosmetycznych w warunkach określonych przepisami nie powoduje takiego efektu. Klasyfikacja CLP odnosi się wyłącznie do substancji w czystej postaci. Alkohol benzylowy w produktach kosmetycznych stosowany jest w bardzo niskim stężeniu, do 1 % wag. i nie wywołuje takich efektów jak czysta substancja.</p> <p>Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100.</p> <p>Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [564], [565]</p>

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	ROSMARINUS OFFICINALIS LEAF OIL (OLEJEK ROZMARYNOWY)
Absorbacja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)

Toksyčność ostra	
------------------	--

str. 39

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Doustna	LD50 > 5 ml/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 > 10 ml/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Działa drażniąco na skórę [566]
Na oczy	Brak klasyfikacji na podstawie dostępnych badań
Działanie uczulające	
Na skórę	Działa uczulająco na skórę [567]
Toksyczność dawki powtarzalnej	W warunkach testowych poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) dla toksyczności ogólnoustrojowej, został uznany za 300 mg/kg masy ciała/dzień i 1000 mg/kg masy ciała/dzień odpowiednio u samic i samców szczurów [568]
Genotoksyczność	W warunkach testowych olejek rozmarynowy nie jest uważany za mutageny w szczepach <i>S. typhimurium</i> oraz <i>E. coli</i> z aktywacją metaboliczną i bez niej [569]
Kancerogenność	Nie podejrzewa się działania kancerogennego [570]
Fototoksyczność	Brak danych toksykologicznych
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	W warunkach badania poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) dla szkodliwego działania na rozrodczość wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień, ponieważ nie zaobserwowano szkodliwego wpływu na reprodukcję [571].
	W warunkach testowych poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL), uznano za 300 mg/kg masy ciała/dzień dla toksyczności rozwojowej, jednak wpływ na masę ciała potomstwa nie był selektywny i zaobserwowano go przy dawkach wywołujących toksyczność matczyną i dlatego substancja nie została uznana za selektywną toksyczną substancję rozwojową [572]
Badania z udziałem ludzi	Olejek rozmarynowy wykazał dodatnią reakcję (odczyn obrzękowy/pęcherzykowy) w dniu 4. Stwierdzono, że zawierał terpineol (> 1 % wag.) oraz α -pinen, linalol i kariofilen (> 10 % wag.) [573]
Ocena bezpieczeństwa	Olejek z liści rozmarynu może być bezpiecznie stosowany w produktach kosmetycznych. Wybierając składniki botaniczne do przygotowania produktów kosmetycznych, formulatorzy polegają na obszernej historii ich przygotowania i stosowania. Takie materiały były używane przez długi czas i na podstawie tego doświadczenia została zdobyta rozległa wiedza na temat ich bezpieczeństwa. W sytuacji

str. 40

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

nowo zidentyfikowanych składników botanicznych w przemyśle kosmetycznym, przed wprowadzeniem do ogólnego handlu prowadzone są odpowiednie badania bezpieczeństwa oczu i skóry. Istnieje wiele różnych odniesień, które opisują stosowanie i bezpieczeństwo preparatów botanicznych. Cosmetic Ingredients Review: Bezpieczeństwo olejku z liści rozmarynu zostało ocenione przez ekspertów CIR. Składnik nie powoduje podrażnień skóry oraz nie jest toksyczny

Ocena Toksykologiczna	
Nazwa incii	EUCALYPTUS GLOBULUS LEAF OIL (OLEJEK Z EUKALIPTUSA)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyčność ostra	
Doustna	LD50 = 1560 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (królik)
Działanie drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę myszy (eukaliptol) [574]
Na oczy	Nie działa drażniąco na oczy królika (ekstrakt) [575]
Działanie uczulające	
Na skórę	W teście maksymalizacji z udziałem ludzi (25 ochotników) nie powodował reakcji uczuleniowej [574]
Toksyčność dawki powtarzalnej	Poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) w odniesieniu do toksyczności ogólnoustrojowej (u samic), toksyczności ogólnoustrojowej (samce), toksyczności rozwojowej i reprodukcyjnej uznano za odpowiednio 300 mg/kg masy ciała/dzień, 1000 mg/kg masy ciała/dzień, 300 mg/kg masy ciała/dzień i 1000 mg/kg masy ciała/dzień (szczur) [576]
Genotoksyčność	W warunkach testowych olejek eukaliptusowy nie jest uważany za mutagenny dla szczepów <i>S. typhimurium</i> i <i>E. coli</i> [577]
Kancerogenność	Na podstawie dostępnych badań nie jest klasyfikowany jako kancerogeny [574]
Fototoksyčność	Na podstawie dostępnych badań nie jest spodziewane działanie fotodrażniące i fotouczulające [574]

str. 41

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków (NOAEL) w odniesieniu do toksyczności ogólnoustrojowej (u samic), toksyczności ogólnoustrojowej (samce), toksyczności rozwojowej i reprodukcyjnej uznano za odpowiednio 300 mg/kg masy ciała/dzień, 1000 mg/kg masy ciała/dzień, 300 mg/kg masy ciała/dzień i 1000 mg/kg masy ciała/dzień (szczur) [576]
Badania z udziałem ludzi	W badaniu działania uczulającego na skórę dwóm pacjentkom (50 i 51 - letnie zawodowe aromaterapeutki z podejrzeniem alergicznego kontaktowego zapalenia skóry) nałożono plastry okluzyjne zawierające olejek eukaliptusowy rozcieńczony wazeliną białą przez 48 godzin. Reakcje obserwowano po 30 minutach i po usunięciu plastrów w dniu 4. Olejek eukaliptusowy wykazał pozytywną reakcję (wyczuwalny rumień) u jednej kobiety w 4. dniu. Stwierdzono, że składa się on wyłącznie z eukaliptolu wraz z α - i β -pinenem [578]
Ocena bezpieczeństwa	Składnik aktywny, działa antyseptycznie i odświeżająco. Olejek stosowany jest przede wszystkim w pastach do zębów. Działa także przeciwbakteryjnie, dlatego stosowany jest również w preparatach do cery tłustej i trądzikowej. Ponadto wykazuje działanie przeciwzapalne. Olejek eukaliptusowy jest bezpiecznym składnikiem produktów kosmetycznych. Brak klasyfikacji jako substancja powodująca alergie skórne, ale istnieją doniesienia naukowe, że substancja generuje znaczącą liczbę przypadków uczuleń. Panel CIR uznał, że olejek z liści <i>Eucalyptus Globulus</i> może zwiększać przenikanie innych składników przez skórę (np. chlorheksydyny). Panel przestrzegł, że należy zachować ostrożność przy formułowaniu produktów kosmetycznych, które mogą zawierać ten składnik w połączeniu z dowolnymi składnikami, których bezpieczeństwo wskazano na podstawie braku danych dotyczących wchłaniania przez skórę lub gdy wchłanianie przez skórę budziło wątpliwości [574]

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	EUGENIA CARYOPHYLLUS FLOWER OIL ¹ I EUGENOL (OLEJEK GOŹDZIKOWY I EUGENOL)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 1500 < 3000 mg/kg masy ciała (mysz)

¹ Na podstawie głównego składnika Eugenol CAS: 97-53-0

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Inhalacyjna	LC50 > 5 mg/L (szczur)
Dermalna	N/D
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa uczulająco na skórę królika [579]
Na oczy	Działa drażniąco na oczy królika [580]
Działanie uczulające	
Na skórę	Działa uczulająco na skórę myszy [581]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Przy braku śmiertelności, dużych zmian patologicznych i histopatologicznych u obu płci, NOAEL u szczurów określono na podstawie niewielkiego spadku masy ciała i niewielkich zmian masy ciała przy 6000 ppm i 12500 ppm (co odpowiada 600 lub 1250 mg eugenolu/kg masy ciała/dzień) odpowiednio u samców i samic. Końcowy NOAEL określono na poziomie 600 mg/kg masy ciała/dzień u samców i na lub powyżej 1250 mg/kg masy ciała/dzień u samic [582]
Genotoksyczność	Potencjał mutageny eugenolu oceniano w bakteryjnym teście odwrotnej mutacji. Eugenol (60 µg/płytkę, 120 µg/płytkę, 300 µg/płytkę i 600 µg/płytkę) nie indukował znaczącego wzrostu liczby rewertantów, ani w przypadku szczepów testowych <i>Salmonella</i> , ani w przypadku <i>E. coli</i> Potencjał genotoksyczny eugenolu oceniano w teście mikrojądrowym szpiku kostnego u szczurów. Eugenol podawano drogą doustną (zglębniakiem) w dawkach 335 mg/kg masy ciała, 670 mg/kg masy ciała lub 1340 mg/kg masy ciała w dawkach podzielonych na 30 i 6 godzin przed pobraniem szpiku kostnego. Eugenol był ujemny w tym teście mikrojądrowym [583]
Kancerogenność	Na podstawie danych dowody wskazują, że eugenol nie jest czynnikiem rakotwórczym u gryzoni. Wniosek ten jest zgodny z wnioskiem z niedawnego przeglądu toksykologii eugenolu przeprowadzonego przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności, który stwierdził, że eugenol jest pozbawiony działania rakotwórczego [584]
Fototoksyczność	W oparciu o widma absorpcji UV/VIS i istniejące dane, nie oczekuje się, że eugenol będzie budzić obawy związane z fototoksycznością lub fotoalergiczną [585]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Przekrojowy materiał dla izoeugenolu (nr CAS 97-54-1; zob. sekcja V) wskazuje badania toksyczności rozwojowej przez sondę, przeprowadzone na szczurach, w których ustalono, że NOAEL dla toksyczności rozwojowej wynosi 500 mg/kg masy ciała/dzień, na

str. 43

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	<p>podstawie wewnątrzmacicznego opóźnienia wzrostu i opóźnionego kostnienia szkieletu.</p> <p>Dla izoeugenolu (nr CAS 97-54-1) prowadzone były także wielopokoleniowe, ciągłe badanie hodowlane prowadzone na szczurach, które określiły NOAEL dla szkodliwego działania na rozrodczość na poziomie 230 mg/kg masy ciała/dzień [585]</p>
Badania z udziałem ludzi	<p>Istnieje stosunkowo niewiele badań na ludziach dotyczących farmakokinetyki i działania eugenolu. Badania na zwierzętach sugerują, że po wdychaniu dymu z papierosów goździkowych niewielkie ilości eugenolu mogą być wchłaniane z płuc. Również niektóre badania <i>in vitro</i> wykazały, że eugenol ulega biotransformacji w hepatocytach. Badanie zdrowych ochotników płci męskiej i żeńskiej wykazało, że eugenol był szybko wchłaniany i metabolizowany po podaniu doustnym. Został prawie całkowicie wydany z moczem w ciągu 24 godzin, a mocz zawierał koniugaty eugenolu. Wyniki wykazały, że tylko mniej niż 1 % wag. podanej dawki było wydane w postaci niezmetabolizowanej z moczem. Analiza moczu wykazała również, że ponad 90 % wag. produktów przemiany materii to koniugaty fenolowe, a 50 % wag. sprzężonych metabolitów to eugenol-glukuronid i eugenol-siarczan. Inne obserwowane szlaki metaboliczne to szlak epoksydowo-diolowy, synteza tiofenolu i podstawionego kwasu propionowego, utlenianie allilowe i migracja wiązania podwójnego [586]</p>
Ocena bezpieczeństwa	<p>Eugenol jest lotnym fenolowym składnikiem olejku goździkowego otrzymywanego z <i>Eugenia caryophyllata</i>. Jest funkcjonalnym składnikiem wielu produktów, które w ograniczonych stężeniach znalazły zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i kosmetycznym. Jego pochodne znalazły zastosowanie w medycynie jako miejscowy środek antyseptyczny i znieczulający. Szeroki zakres działania eugenolu obejmuje działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwutleniające. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków zatwierdziła stosowanie olejku goździkowego jako substancji aromatyzującej w przemyśle spożywczym, jako substancji zapachowej w przemyśle kosmetycznym oraz w stomatologii jako naturalnego środka przeciwbólowego i antyseptycznego. Eugenol znajduje się na liście substancji, które mogą być zawarte w produktach kosmetycznych wyłącznie z</p>

str. 44

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

zastrzeżeniem określonych ograniczeń [130]. W ocenianym produkcie został zastosowany zgodnie z dopuszczalnym limitem

Ocena Toksykologiczna	
Nazwa INCI	DEHYDROACETIC ACID
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyčność ostra	
Doustna	LD50 > 1480 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 > 3000 < 5000mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Niedrażniący (królik, OECD 404) [599]
Na oczy	Kwas dehydrooctowy nie powodował działania żrącego ani drażniącego na oczy w badaniach <i>in vitro</i> (OECD 438) [599]
Działanie uczulające	
Na skórę	Kwas dehydrooctowy nie działał uczulająco na skórę (OECD 429) [600]
Toksyčność dawki powtarzalnej	Ogólny stan i masa ciała przy 0, 10, 30, 100 mg/kg masy ciała/dzień były niezmienione. Ponadto nie odnotowano działań niepożądanych dla mocznika we krwi ani po badaniu histopatologicznym wybranych tkanek (płuca, serca, wątroby, nerek, śledziony, nadnerczy, trzustki, jąder i żołądka). Przy stracie 300 mg/kg masy ciała/dzień wystąpiły dwa zgony (7 i 11 dni). Pozostałe zwierzęta przy 300 mg/kg masy ciała/dzień zabito po 11 dniach (7 dawek). Zwierzęta te straciły od 20 do 30 % wag. masy ciała, były chude i zaniedbane. Badanie każdego z tych zwierząt ujawniło wyraźne wycieńczenie i skurcz żołądka z zabarwioną krwią treścią, przekrwienie błony śluzowej i kilka obszarów krwotocznych. Oceniono, że NOAEL wynosi 100 mg/kg masy ciała/dzień [601]
Genotoksyczność	Niegenotoksyczny w teście Ames z użyciem szczepów <i>S. typhimurium</i> . Niegenotoksyczny w teście mikrojądrowym u myszy [601]
Fototoksyczność	Dane przekrojowe dla dehydrooctanu sodu: substancja nie była fotouczulająca w powtarzanym teście płatkowym u ludzi przy ekspozycji na promieniowanie UV [602]

str. 45

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	<p>W badaniach na szczurach zaobserwowano toksyczny wpływ na matkę jako zmniejszenie spożycia pokarmu i obniżenie masy ciała. NOAEL dla toksyczności matczynej, szczur = 50 mg/kg masy ciała/dzień.</p> <p>W prenatalnym badaniu toksyczności rozwojowej na myszach zaobserwowano pewne skutki dla płodu, tj. wzrost śmiertelności płodu i masy ciała przy dawce kwasu dehydrooctowego 200 mg/kg masy ciała/dzień [603]</p>
Badania z udziałem ludzi	<p>Dehydrooctan sodu i kwas dehydrooctowy zostały przetestowane pod kątem podrażnień i uczuleń na losowo wybranym panelu 100 mężczyzn i 100 kobiet. Nie zaobserwowano żadnych reakcji u żadnego z 200 panelistów po pierwszym lub drugim zastosowaniu [604]</p>
Ocena bezpieczeństwa	<p>Kwas dehydrooctowy jest bezpieczny do stosowania w kosmetykach jako substancja konserwująca. Kwas dehydrooctowy wymieniony jest w załączniku V rozporządzenia 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych. (substancje konserwujące, dozwolone w produktach kosmetycznych) rozporządzenia 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych. Jest dopuszczony do stosowania w maksymalnym stężeniu 0,6 % wag. wyrażonym jako kwas i jest zabroniony produktach aerozolowych (sprayach). CIR w 1985 r. w swoim raporcie uznał kwas dehydrooctowy za bezpieczny składnik kosmetyczny. Oceniał, że jest skutecznym środkiem konserwującym w niskich stężeniach w optymalnym zakresie pH od 2 do 4. CIR w 2006 r. przeanalizował nowe dostępne dane o kwasie dehydrooctowym i potwierdził pierwotny wniosek</p> <p>Bezpieczeństwo czystej substancji</p> <p>Według zharmonizowanej klasyfikacji i oznakowania zatwierdzonej przez Unię Europejską, substancja ta jest szkodliwa w przypadku połknięcia (zaklasyfikowana jako substancja stwarzająca zagrożenie H302). Substancja zastosowana w produktach kosmetycznych w odpowiednich warunkach nie powoduje takiego efektu. Klasyfikacja CLP odnosi się wyłącznie do substancji w czystej postaci.</p> <p>Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa - MoS>100.</p> <p>Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [604], [605]</p>

Ocena toksykologiczna

Nazwa INCI	LIMONENE (LIMONEN)
-------------------	---------------------------

str. 46

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 5300 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	n/d
Dermalna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę królika (OECD 404) [606]
Na oczy	Nie działa drażniąco na oczy (królik) (OECD 405) [606]
Działanie uczulające	
Na skórę	W warunkach testowych, d-limonen jest klasyfikowany jako "R43 Może powodować uczulenie w kontakcie ze skórą", zgodnie z kryteriami określonymi w załączniku VI do dyrektywy 67/548/EWG i "kategorii 1" zgodnie z rozporządzeniem CLP (WE) nr * C (1272-2008). Test <i>in vivo</i> na myszach [607]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Uznano, że NOAEL dla samców i samic szczurów wynosi odpowiednio 825 mg/kg masy ciała/dzień i 1650 mg/kg mc/dzień. Uznano, że LOAEL dla samców i samic szczurów wynosi odpowiednio 1650 mg/kg masy ciała/dzień i 3300 mg/kg masy ciała/dzień, na podstawie zmniejszonego przyrostu masy ciała [608]
Genotoksyczność	Zgodnie z przeprowadzonymi badaniami <i>in vitro</i> d-limonen nie jest uważany za genotoksyczny w komórkach chomika chińskiego zgodnie z kryteriami określonymi w załączniku VI do dyrektywy 67/548 / EWG i rozporządzenia CLP (WE) nr (1272-2008)[609]
Kancerogenność	D-limonen był badany w badaniach rakotwórczości na szczurach i myszach (2-letnie badanie zgłębnikiem). U samców szczurów obserwowano zwiększoną częstość występowania przerostu komórek kanalików nerkowych, gruczolaków i gruczolakoraków nerek. Nie zgłoszono zwiększonej częstości występowania nowotworów u samic szczurów i myszy. Udowodniono, że mechanizm nefrokarcynogenności jest specyficzny dla samców szczurów i nie ma znaczenia dla ludzi [610]
Fototoksyczność	Olejek ze słodkiej pomarańczy nie działa fototoksycznie [611]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Uznano, że NOAEL wynosi 500 mg/kg masy ciała/dzień. Uznano, że LOAEL wynosi 1000 mg/kg masy ciała/dzień zarówno dla samic, jak i samców myszy, na podstawie obserwacji objawów klinicznych u obu płci i zmniejszonej masy ciała u samców. Nie zaobserwowano wpływu na narządy rozrodcze ani na poziomie makroskopowym, ani

str. 47

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	<p>mikroskopowym, dlatego nie przewiduje się wpływu na zdolność rozrodczą.</p> <p>D-limonen nie wykazywał działania teratogennego u płodów królików i uznano, że NOAEL dla toksyczności dla płodu przekracza 1000 mg/kg masy ciała/dzień. Za NOAEL dla toksyczności matczynej uznano 250 mg/kg masy ciała/dzień na podstawie zmniejszonego przyrostu masy ciała [612]</p>
Badania z udziałem ludzi	<p>NOEL (najwyższe badane stężenie bez uczulenia u ludzi), oparte na ludzkim teście płatkowym z powtarzającym się narażeniem, wyniosło 10000 µg/cm². Ta wartość jest bardzo zbliżona do średnich ważonych wartości LLNA z pięciu badań LLNA (= 10075 µg/cm²) [613]</p>
Ocena bezpieczeństwa	<p>Limonen jest bezpieczny do stosowania w produktach kosmetycznych. Rozporządzenie 1223/2009 dotyczące produktów kosmetycznych: Limonen znajduje się na liście substancji, które mogą być zawarte w produktach kosmetycznych wyłącznie z zastrzeżeniem określonych ograniczeń (zał. III, pozycja 88, 167, 168). Jeżeli d-Limonen znajduje się w danym produkcie kosmetycznym to obecność substancji musi być uwzględniona w wykazie składników umieszczonym na etykiecie produktu, gdy jej stężenie przekracza: 0,001 % wag. w produkcie niespłukiwanym – 0,01 % wag. w produkcie spłukiwanym</p> <p>Opinia SCCNFP (Scientific Committee for Cosmetic Products and Non-food Products intended for Consumers): SCCNFP w 1999 r. uznało produkty utleniania d-limonenu za silne alergenny. Częstość alergii kontaktowej na utleniony limonen wynosi 1 – 2 % wag.. SCCNFP w 2001 r. umieścił limonen na liście substancji perfumeryjnych, które nie mogą wchodzić w skład produktów kosmetycznych z wyjątkiem określonych ograniczeń i warunków. Limonen i produkty naturalne zawierające jego znaczne ilości powinny być stosowane tylko wtedy, gdy poziom nadtlenu jest utrzymywany na najniższym praktycznym poziomie, na przykład poprzez dodanie przeciwutleniaczy w trakcie produkcji. Takie produkty powinny mieć liczbę nadtlenu mniejszą niż 20 milimoli nadtlenu na litr (wytyczne IFRA). Opinia SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety): SCCS w 2011 r. uznał Limonen za substancję o potencjale uczulającym. SCCS sugeruje, że obecność utlenionej frakcji (zawartość nadtlenu) nie powinna być wyższa niż 0,001 % wag. (10 ppm) dla substancji lub 0,01 % wag. (100 ppm) dla końcowego produktu kosmetycznego [611], [614]</p>

str. 48

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	ARTEMISIA ABSINTHIUM EXTRACT (EKSTRAKT Z PIOŁUNU)
Absorbcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyeczność ostra	
Doustna	Nie działa toksycznie, po podaniu doustnym (mysz)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	N/D
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę (szczur) [615]
Na oczy	Brak danych literaturowych
Działanie uczulające	
Na skórę	Nie działa uczulająco na skórę (szczur) [615]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Przeprowadzono 13 - tygodniowe badanie toksyczności ekstraktu z piołunu po podaniu wielokrotnym u szczurów Wistar Hannover (GALAS) obu płci. Szczury podzielono na 4 grupy składające się z 10 samców i 10 samic każda i podano im wodę zawierającą 0 % wag., 0,125 % wag., 0,5 % wag. lub 2 % wag. ekstraktu z piołunu. Wszystkie szczury przeżyły do końca badania. W masach ciała, badaniach hematologicznych i biochemicznych surowicy, masie narządów i badaniach histopatologicznych nie zaobserwowano żadnych zmian wskazujących na oczywiste toksyczności, które można przypisać leczeniu ekstraktem z piołunu. Na podstawie wyników niniejszego badania oszacowano, że NOAEL (poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków) ekstraktu z piołunu szczurów Wistar Hannover wynosi 2 % wag. (co odpowiada 1,27 g/kg masy ciała/dzień u samców i 2,06 g/kg masy ciała/dzień u samic lub więcej) [616]
Genotoksyczność	<i>Artemisia absinthium</i> L. to tradycyjna roślina lecznicza należąca do rodziny astrowatych i powszechnie znana jako piołun. Piołun jest tradycyjnie stosowany jako środek przeciworobaczy, antyseptyczny, przeciwskurczowy oraz na czerwonkę prątkową, nowotwory i choroby neurodegeneracyjne. Celem badania było zbadanie genotoksycznego działania ekstraktu z liści piołunu na komórki szpiku kostnego myszy. Po wstrzyknięciu myszom ekstraktu o różnych stężeniach, w różnych odstępach czasu, określono aberracje chromosomowe (CA) i indeks mitotyczny (MI) komórek szpiku kostnego. Uzyskane wyniki wykazały, że ekstrakt nasilał, ale nie znacząco, powstawanie aberracji chromosomowych na komórkach szpiku kostnego myszy,

str. 49

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	<p>w sposób zależny od dawki i czasu. Wyniki indeksu mitotycznego (MI) wykazały znaczny spadek podziału komórek i prawie wszystkie stężenia powodowały niski MI w porównaniu z kontrolą. Wyniki wykazały, że wysokie dawki <i>Artemisia absinthium</i> L. o długim czasie działania powodowały tygodniowy efekt aberracji chromosomowych. Wyniki niniejszego badania udokumentowały, że <i>Artemisia absinthium</i> L. może przyczynić się do szerokich właściwości terapeutycznych deklarowanych przez medycynę ludową, a jej niskie dawki stanowią bezpieczeństwo [617]</p>
Kancerogenność	<p>Według raportu CIR z dwuletnich badań podawania przez sondę szczurów (poziomy dawek 12,5 mg/kg masy ciała, 25 mg/kg masy ciała i 50 mg/kg masy ciała) i myszy (poziomy dawek 3 mg/kg masy ciała, 6 mg/kg masy ciała, 12 mg/kg masy ciała, 25 mg/kg masy ciała) stwierdzono pewne dowody rakotwórczego działania α, β-tujonu u samców szczurów F344/N na podstawie zwiększonej częstości występowania nowotworów gruczołu napletkowego przy dawce 25 mg/kg (wszystkie szczury przy dawce 50 mg/kg zmarły przed zakończeniem badania); zwiększona częstość występowania łagodnego guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy mogła być związana z podawaniem α, β-tujonu samcom szczurów, którym podawano dawkę 12,5 mg/kg masy ciała lub 25 mg/kg masy ciała. Nie było dowodów na działanie rakotwórcze α, β-tujonu u samic szczurów, którym podawano dawki 12,5 mg/kg masy ciała lub 25 mg/kg masy ciała. Nie było dowodów na działanie rakotwórcze α, β-tujonu u samców i samic myszy, którym podawano dawki 3 mg/kg masy ciała, 6 mg/kg masy ciała lub 12 mg/kg masy ciała. W tym samym dwuletnim badaniu podawanie α, β-tujonu spowodowało zwiększoną częstość występowania napadów drgawkowych u szczurów i myszy w sposób zależny od dawki oraz zwiększoną częstość występowania zmian nienowotworowych w mózgu i śledzionie samców i samic. Szczury: nerki samców szczurów i przysadka mózgowa samic szczurów zwykle przy dwóch najwyższych poziomach dawek (25 mg/kg masy ciała i 50 mg/kg masy ciała) [618]</p>
Fototoksyczność	Brak danych literaturowych
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	<p>Badania wpływu na płodność przeprowadzono na szczurach albinosach rasy Wistar o potwierdzonej płodności. Działanie przeciwpłodnościowe etanolowego suchego ekstraktu (50 % wag. EtOH) z liści piołunu oceniano pod względem działania przeciwowulacyjnego,</p>

str. 50

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	<p>przeciwiimplantacyjnego lub poronnego w porównaniu z kontrolami, którym podano nośnik. Po 10-dniowym leczeniu samic szczurów nie zaobserwowano żadnego wpływu na owulację i fazy cyklu rujowego. Ciężarne samice szczurów leczono suchym ekstraktem od 1 do 7 dnia ciąży. W dniu 10 rejestrowano liczbę miejsc implantacji u każdego zwierzęcia. Tylko 2 z 6 szczurów zaszły w ciążę, a liczba urodzonych młodych na szczura była zmniejszona w porównaniu z kontrolą. Ponadto ciężarnym samicom szczurów podawano suchy ekstrakt od 11 do 13 dnia ciąży. Wszystkie zwierzęta badano pod kątem krwawienia z pochwy w dniach od 12 do 16 i w dniu 20; zabijano je i rejestrowano liczbę płodów żywych i martwych. Piolun (200 mg/kg masy ciała) znacząco zmniejszał miejsca implantacji (2 z 6 szczurów zaszło w ciążę), a liczba urodzonych młodych na szczura uległa zmniejszeniu w porównaniu z grupą kontrolną [618]. Brak dostępnych danych z badań dotyczących reprodukcji i rozwoju wodnych preparatów piolunu</p>
Badania z udziałem ludzi	Brak danych literaturowych
Ocena bezpieczeństwa	<p>Piolun w medycynie tradycyjnej znany jako <i>A. absinthium</i> ma różne właściwości lecznicze, takie jak działanie przeciwcukrzycowe, przeciwnadciśnieniowe, przeciwbólowe, przeciwgorączkowe, przeciwskurczowe, przeciwzapalne i poprawiające pamięć, a także właściwości gojące rany i chroniące skórę</p> <p>W ocenianym produkcie jest to składnik bezpieczny, a wyliczony MoS spełnia kryteria akceptacji</p>

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	ARNICA MONTANA FLOWER EXTRACT (EKSTRAKT Z KWIATÓW ARNIKI GÓRSKIEJ)
Absorbpcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	N/D
Dermalna	LD50 > 5000 mg/kg masy ciała (królik)
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę królika [423]
Na oczy	Brak danych literaturowych
Działanie uczulające	
Na skórę	Nie działa uczulająco na skórę świnki morskiej [423]

str. 51

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Toksyczność dawki powtarzalnej	Brak danych literaturowych.
Genotoksyczność	Potencjał mutagenny ekstraktu z arniki oznaczono w teście Ames przy użyciu szczepów <i>Salmonella typhimurium</i> . Oceniano roztwory etanolowe z aktywacją metaboliczną i bez niej. Ekstrakt z arniki powodował dwu- do czterokrotny wzrost liczby rewertantów w porównaniu do kontroli z <i>S. typhimurium</i> z aktywacją metaboliczną i bez niej oraz z <i>S. typhimurium</i> z aktywacją metaboliczną; nie zaobserwowano wzrostu w przypadku bez aktywacji metabolicznej. Naukowcy ustalili, że działanie mutagenne można przypisać flawonolom obecnym w arnicy [423]
Kancerogenność	Brak danych literaturowych
Fototoksyczność	Nie działa fototoksycznie na skórę myszy [423]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Brak danych literaturowych
Badania z udziałem ludzi	Potencjał drażniący kremu do twarzy zawierającego 1 % wag. mieszaniny ekstraktu z arniki Montana i oleju z nasion słonecznika określono w teście okluzyjnym z pojedynczym narażeniem na 15 osobach. Nie obserwowano działania drażniącego i uczulającego [423]
Ocena bezpieczeństwa	Właściwości farmakologiczne kwiatów arniki są wynikiem działania głównie laktonów seskwiterpenowych i flawonoidów. Mechanizm działania przeciwzapalnego arniki (badania <i>in vitro</i>) polega na hamowaniu uwalniania czynników prozapalnych: NF-κB, NF-AT i produktów przemian metabolicznych kwasu arachidonowego. Surowiec ten stosowany jest tylko zewnętrznie w tępych urazach (stłuczenia, skręcenia, siniaki), a także w bólach mięśniowych i reumatycznych. Silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, dorównujące aktywności antybiotyków, uzasadniają stosowanie kwiatów arniki w dermatozach. Głównymi związkami odpowiedzialnymi za właściwości terapeutyczne surowca są laktony seskwiterpenowe z grupy pseudogwajanolidów, głównie helenalina i octan 11α,13-dwuhydrohelenaliny, a także flawonoidy – głównie 3β-glukuronidy: kwercetyny, kemferolu i izoramnetyny. Ponadto kwiaty arniki górskiej zawierają triterpeny (arnidiol, faradiol), kwasy fenolowe (kwas kawowy i jego estry), kumaryny, olejek eteryczny, karotenoidy, irydoidy oraz alkaloidy pirolizydynowe (tussilagina i izotussilagina), niewykazujące działania hepatotoksycznego. W ocenianym produkcie jest to składnik bezpieczny

str. 52

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	LINALOOL (LINALOL)
Absorbacja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	LD50 2790 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	LC50 > 20 mg (mysz)
Dermalna	LD50 5610 mg/kg masy ciała (królik)
Działanie drażniące	
Na skórę	Działa drażniąco na skórę królika w teście OECD 404 [619]
Na oczy	Działa drażniąco na oczy królika (OECD 405) [620]
Działanie uczulające	
Na skórę	Działa uczulająco na skórę w teście OECD 429 [621]
Toksyczność dawki powtarzalnej	W warunkach badania i na podstawie ocenionych toksykologicznych punktów końcowych ustalono, że poziom bez obserwowanych działań niepożądanych (NOAEL) dla podawania badanego elementu w diecie wynosił 497,9 mg/kg masy ciała/dzień i 532,1 mg/kg masy ciała/dzień dla samców i samic szczurów Sprague-Dawley, odpowiednio, w oparciu o skorygowane poziomy spożycia w matrycy żywieniowej najwyższej badanej dawki [622]
Genotoksyczność	Linalol nie wykazywał działania mutagennego z aktywacją metaboliczną ani bez aktywacji metabolicznej w teście postępującej mutacji chłoniaka myszy w warunkach badania (OECD 476) Linalol nie wykazuje działania mutagennego w teście mikrojądrowym w warunkach doświadczalnych (OECD 474) [623]
Kancerogenność	Wyniki wskazują, że linalol nie wydłużył znacząco latencji guza ani nie zmniejszył całkowitej liczby obserwowanych guzów w porównaniu z kontrolami. W warunkach tego badania stwierdzono, że 20-tygodniowa ekspozycja na linalol w diecie nie hamowała karcynogenezy sutka, a także nie zwiększała częstości występowania nowotworów [624]
Fototoksyczność	Nie działa fototoksycznie i fotouczulająco [624]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	W badaniu toksyczności rozrodczej NOAEL dla samic i potomstwa ustalono na 200 mg/kg masy ciała/dzień, dla samców NOAEL ustalono na 750 mg/kg masy ciała/dzień W warunkach tego badania, poziom bez obserwowanych działań niepożądanych (NOAEL) dla toksyczności matczynej linalolu ustalono na 500 mg/kg masy ciała/dzień ze względu na wpływ na przyrost masy ciała

str. 53

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	i spożycie paszy (odwracalne po okresie leczenia). Dla toksyczności rozwojowej ustalono NOAEL 1000 mg/kg masy ciała/dzień [625]
Badania z udziałem ludzi	Test HRIPT wykazał, że linalol wywołuje jedynie słaby, minimalny rumień u 1 na 117 i 119 osób ocenianych w drugim i trzecim odczycie po prowokacji [626]
Ocena bezpieczeństwa	Linalol jest bezpieczny do stosowania w produktach kosmetycznych. Rozporządzenie 1223/2009 dotyczące produktów kosmetycznych: linalol znajduje się na liście substancji, które mogą być zawarte w produktach kosmetycznych wyłącznie z zastrzeżeniem określonych ograniczeń. Jeżeli linalol znajduje się w danym produkcie kosmetycznym to obecność substancji musi być uwzględniona w wykazie składników umieszczonym na etykiecie produktu, gdy jej stężenie przekracza: 0,001 % wag. w produkcie niespłukiwanym – 0,01 % wag. w produkcie spłukiwanym Opinia SCCNFP (Scientific Committee for Cosmetic Products and Non-food Products intended for Consumers): SCCNFP w 1999 r. uznało linalol za substancję o potencjale alergizującym. Opinia SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety): SCCS w 2011 r. uznał linalol za substancję o potencjale uczulającym. SCCS sugeruje, że obecność utlenionej frakcji (zawartość nadtlenków) nie powinna być wyższa niż 0,001 % wag. (10 ppm) dla substancji lub 0,01 % wag. (100 ppm) dla końcowego produktu kosmetycznego. Bezpieczeństwo czystej substancji: Brak dodatkowej klasyfikacji jako substancja niebezpieczna zgodnie z przepisami chemicznymi

Ocena toksykologiczna	
Nazwa INCI	SODIUM BENZOATE (BENZOESAN SODU)
Absorbcja skórna	0,50 %wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyczność ostra	
Doustna	Dane przekrojowe z kwasu benzoesowego: LD50 oralnie, szczur = 3140 mg/kg masy ciała (<i>In vivo</i> test ostrej toksyczności doustnej)
Inhalacyjna	Dane przekrojowe z kwasu benzoesowego: LC50 inhalacyjnie, szczur > 0,026 mg/dm ³ /godzinę (<i>In vivo</i> test ostrej toksyczności inhalacyjnej)
Dermalna	Dane przekrojowe z kwasu benzoesowego: LD50 dermalnie, królik > 5000 mg/kg masy ciała (<i>In vivo</i> test ostrej toksyczności dermalnej)
Działania drażniące	
Na skórę	Nie działa drażniąco na skórę w badaniach na królikach (OECD 404, Draize test) [627]

str. 54

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Na oczy	Benzoesan sodu był lekko drażniący dla oczu w teście Draize'a na królikach (OECD 405) [627]
Działanie uczulające	
Na skórę	Dane przekrojowe z benzoesanu benzylu: przeprowadzono kilka testów maksymalizacji świnki morskiej dla tego związku. W rezultacie benzoesan benzylu okazał się być substancją nieuczulającą lub umiarkowanie uczulającą skórę [628]
Toksyczność dawki powtarzalnej	<p>Toksyczność dawki powtarzalnej (30 dni) doustna: Poziomy dawk od 16 do 1090 mg benzoesanu sodu/kg masy ciała podawano szczurom przez 30 dni. Nie zaobserwowano działań niepożądanych zależnych od dawki [628]</p> <p>Toksyczność chroniczna (> 12 MIESIĘCY): NOAEL oralny, szczur, 18 do 24 miesięcy = 1000 mg/kg masy ciała/dzień [627]</p>
Genotoksyczność	<p>Na podstawie wyników testu mutacji powrotnych (OECD 471) u bakterii <i>S. typhimurium</i> i <i>E. coli</i> stwierdzono, że substancja nie jest mutagenna [627]</p> <p>Brak potencjału genotoksycznego w teście aberracji chromosomowych komórek szpiku kostnego u szczurów (test OECD 475) [627]</p>
Kancerogenność	Benzoesan sodu nie wykazywał działania rakotwórczego w badaniach przewlekłych na szczurach i myszach w dawkach 1000 mg/kg masy ciała/dzień i wyższych. Zwierzęta utrzymywano na diecie zawierającej 2 % wag. lub 1 % wag. badanej substancji przez 18 do 24 miesięcy. Dlatego uzyskana wartość NOAEL wynosiła > 1000 mg/kg masy ciała/dzień [627]
Fototoksyczność	Dane przekrojowe z alkoholu benzylowego i benzoesanu benzylu: w celu oceny fototoksyczności zastosowano test fotohemolizy <i>in vitro</i> w zawiesinie ludzkich erytrocytów. W rezultacie stwierdzono, że alkohol benzylowy jest słabo fototoksycznym związkiem, podczas gdy benzoesan benzylu nie był fototoksyczny w obecności światła UVA lub UVB. Fototoksyczność benzoesanu benzylu oceniano <i>in vivo</i> . W badaniach na myszach zaobserwowano nieznacznie pozytywną reakcję po 4-godzinnej ekspozycji na promieniowanie po podaniu badanej substancji. W innym eksperymencie na świnkach morskich nie zaobserwowano działania fotodrażniającego dla żadnego z testowanych stężeń benzoesanu benzylu (10 % wag., 30 % wag. i 50 % wag.) [629], [630]

str. 55

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	Wykazano działanie fotogenotoksyczne kwasu benzooesowego (0,5 % wag.) i benzooesanu sodu (0,5 % wag.) w badaniach <i>in vitro</i> przy użyciu zawiesin komórek <i>E. coli</i> [631]
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	Dane przekrojowe z kwasu benzooesowego: przeprowadzono czteropokoleniowe badania na szczurach. Nie stwierdzono niekorzystnych skutków ubocznych dla wzrostu, spożycia pokarmu, przeżywalności, prokreacji, karmienia potomstwa i masy narządów w grupie dawek 1 %. NOAEL = 500 mg/kg masy ciała/dzień [628] W badaniach na szczurach (OECD 414) nie stwierdzono wyraźnie dostrzegalnego wpływu benzooesanu sodu na poród i przeżycie matki lub płodu. NOAEL teratogeny dla tego badania wynosił ≥ 175 mg/kg masy ciała/dzień [627]
Badania z udziałem ludzi	Dostępne są dane dotyczące testów płatkowych przeprowadzonych na ludziach w celu zbadania działania uczulającego benzooesanu sodu. W jednym z testów przeprowadzonym wśród 2045 pacjentów zaobserwowano 5 pozytywnych wyników dla badanej substancji. W innym badaniu odnotowano nieimmunologiczną pokrzywkę kontaktową. Ogólnie benzooesan sodu wykazywał bardzo niską częstość występowania uczulenia skóry u ludzi. Według raportu wstępnej oceny OECD dotyczącego benzooesanów, kwasu benzooesowego i alkoholu benzylowego substancje te lekko podrażniają skórę. Z drugiej strony przyjęto, że narażenie zawodowe na alkohol benzylowy, kwas benzooesowy lub benzooesan sodu nie powodowało alergii przez dziesięciolecia [628], [630]
Ocena bezpieczeństwa	Benzooesan sodu, jest to sól sodowa kwasu benzooesowego, wytwarzana przez neutralizację kwasu benzooesowego za pomocą wodorowęglanu sodu, węglanu sodu lub wodorotlenku sodu. Substancja ta jest od wielu lat szeroko stosowana jako środek konserwujący w produktach do higieny osobistej, żywności i lekach. Na podstawie danych dostarczonych w opinii Komitetu Naukowego ds. Produktów Kosmetycznych i Produktów Nieżywnościowych Przeznaczonych dla Konsumentów, nr: SCCNFP/0532/01 oraz Komitetu Naukowego ds. Produktów Konsumenckich, nr: SCCP/0891/05, Komitet SCCP wydał opinię, że benzooesan sodu jest bezpieczny do stosowania w celach konserwujących i innych w produktach kosmetycznych splukiwanych w maksymalnym stężeniu 2,5 % wag., w produktach do pielęgnacji jamy ustnej do 1,7 % wag. oraz w produktach niesplukiwanych do 0,5 % wag.. Panel ekspertów CIR stwierdził, że benzooesan sodu jest bezpieczną substancją w obecnych praktykach jej stosowania i używanych stężeń w kosmetykach. Benzooesan

str. 56

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

	sodu został uznany przez FDA za substancję GRAS. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa – MoS > 100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [628], [632]
--	--

Ocena toksykologiczna	
NAZWA INCI	POTASSIUM SORBATE (SORBINIAN POTASU)
Absorbcja skórna	0,50 % wag. (obecność w recepturze promotorów przenikania przezskórnego)
Toksyčność ostra	
Doustna	LD50 4200 - 6170 mg/kg masy ciała (szczur)
Inhalacyjna	Dane przekrojowe z kwasu sorbowego: Nie zaobserwowano śmiertelności po 7 dniach badania ostrej toksyczności inhalacyjnej <i>in vivo</i> na królikach
Dermalna	LD50 > 2000 mg/kg masy ciała (szczur)
Działania drażniące	
Na skórę	Sorbinian potasu nie działał drażniąco na skórę w badaniach na królikach [633]
Na oczy	W badaniach <i>in vivo</i> na królikach stwierdzono, że sorbinian potasu działa drażniąco na oczy [633]
Działanie uczulające	
Na skórę	Sorbinian potasu nie wykazywał działania uczulającego na skórę w zmodyfikowanym teście maksymalizacji świnki morskiej [634]
Toksyczność dawki powtarzalnej	Toksyczność subchroniczna (90 dni) doustna: NOAEL oralny, szczur, 90 dni = 6800 mg/kg masy ciała/dzień NOAEL oralny, pies, 90 dni = 1000 mg/kg masy ciała/dzień Toksyczność chroniczna (> 12 miesięcy): NOAEL oralny, szczur, 24 miesiące = 750 mg/kg masy ciała/dzień NOAEL oralny, mysz, 18 miesięcy = 1400 mg/kg masy ciała/dzień [634]
Genotoksyczność	Mutagenność/genotoksyczność <i>in vitro</i>: Sorbinian potasu nie wykazywał działania mutagennego w teście mutacji powrotnych przy użyciu szczepów <i>S. typhimurium</i> [633] Mutagenność/genotoksyczność <i>in vivo</i>: Niegenotoksyczny w teście na komórkach wątroby szczurów przy użyciu metody elucji alkalicznej [635]

str. 57

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

Kancerogenność	Nie jest rakotwórczy. Sorbinian potasu w stężeniu 0,1 % wag. i 0,3 % wag. podawany szczurom w wodzie pitnej przez okres do 100 tygodni nie wywoływał powstawania nowotworów [633]
Fototoksyczność	Nie znaleziono danych w dostępnej literaturze
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa	<p>Działanie szkodliwe na płodność i reprodukcję: Dane przekrojowe z kwasu sorbowego (OECD 416): NOAEL dla toksyczności rozwojowej, szczur = 300 mg/kg masy ciała/dzień, NOAEL dla toksyczności rodzielskiej, szczur = 1000 mg/kg masy ciała/dzień [635]</p> <p>Toksyczność rozwojowa: Dane z badań prenatalnych toksyczności rozwojowej sorbinianu potasu: NO(A)EL dla toksyczności matczynej, szczur = 340 mg/kg masy ciała/dzień, NO(A)EL embriotoksyczny, teratogeny, szczur = 340 mg/kg masy ciała/dzień [633]</p>
Badania z udziałem ludzi	Produkt nawilżający zawierający 0,15 % wag. sorbinianu potasu oceniano pod kątem działania uczulającego i podrażniającego na skórze u ochotników, stosując test platkowy typu RIPT (Repeat Insult Patch Test). Wyniki pokazały, że produkt nie działał drażniaco nie powodował też alergicznego kontaktowego uczulenia skóry. W innym badaniu RIPT zbadano peeling do twarzy z 0,1 % wag. sorbinianu potasu z udziałem 53 pacjentów. W fazie indukcji zaobserwowano siedem minimalnych reakcji rumieniowych. Preparat był bardzo łagodnym skumulowanym środkiem drażniącym, ale nie był pierwotnym środkiem drażniącym i nie powodował uczulenia [636]
Ocena bezpieczeństwa	Sorbinian potasu, Potassium Sorbate jest solą potasową kwasu sorbowego. Substancja ta posiada długą historię stosowania jako środek konserwujący w kosmetykach, preparatach farmaceutycznych, lekach i żywności. Panel ekspertów CIR stwierdził, że sorbinian potasu jest bezpieczną substancją w obecnych praktykach jej stosowania i używanych stężeń w kosmetykach. Substancja jest wymieniona na liście GRAS przez FDA jako środek konserwujący żywność, jeżeli jest stosowany zgodnie z dobrą praktyką wytwarzania. Obliczony margines bezpieczeństwa dla substancji posiada akceptowalny poziom współczynnika bezpieczeństwa - MoS>100. Składnik ten został oceniony jako bezpieczny do stosowania w danym produkcie kosmetycznym [635], [636]

str. 58

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

10. Działanie niepożądane i ciężkie działanie niepożądane.

Rozporządzenie (WE) nr 1223/2009 dotyczące produktów kosmetycznych stanowi podstawę dla jednolitego podejścia do zarządzania działaniami niepożądanymi i ciężkimi działaniami niepożądanymi przypisywanymi stosowaniu kosmetyków. W rozporządzeniu przewiduje się bezzwłoczne zgłaszanie ciężkich działań niepożądanych właściwym organom państwa członkowskiego, w którym wystąpiło dane działanie, oraz zgłaszanie wszelkich środków naprawczych podjętych przez osobę odpowiedzialną lub dystrybutora. Dane dotyczące ciężkich działań niepożądanych zostają włączone do raportu bezpieczeństwa produktu kosmetycznego i muszą być podane do wiadomości publicznej.

11. Informacje o produkcji kosmetycznym.

BADANIE DERMATOLOGICZNE	Ocena produktu pod względem właściwości drażniących oraz uczulających. Badanie formułacji pierwotnej wykonano zgodnie z procedurą badawczą na grupie 25 probantów ze skórą normalną (kobiet i mężczyzn w wieku od 18 do 61 lat). U żadnej z 25 osób, poddanych badaniom dermatologicznym, nie stwierdzono dodatnich odczynów ani reakcji podrażnieniowej. Raport nr RD1-23-04-18-1 z dnia 26.06.2023
BADANIE APLIKACYJNE	Ocenę działania produktu kosmetycznego wykonano zgodnie z procedurą badawczą na grupie 20 probantów ze skórą normalną (kobiet i mężczyzn w wieku od 18 do 61 lat). Oceniany produkt potwierdził w opisanym badaniu swoje działanie: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Zwiększenie nawilżenia skóry (100%) ▪ Odżywienie skóry (100%) ▪ Poprawa elastyczności skóry (95%) ▪ Poprawa jędrności skóry (95%) ▪ Łagodzenie (100%) Raport nr RA1-23-04-18-1 z dnia 19.09.2023
BADANIA NA ZWIERZĘTACH	Producent oświadcza, że nie wykonuje testów na zwierzętach. Od marca 2009 r. wszystkie badania in vivo dotyczące toksyczności składników testowanych na potrzeby kosmetyków zostały zakazane w UE. W marcu 2013 roku został wprowadzony zakaz wprowadzania do obrotu produktów zawierających składniki testowane i badane in vivo na zwierzętach do celów kosmetycznych w UE.
NANOMATERIAŁY	W składzie kosmetyku nie znajdują się surowce sklasyfikowane jako nanomateriały zgodnie z definicją zamieszczoną w Rozdziale I Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady WE 1223/2009.
SUBSTANCJE SKLASYFIKOWANE JAKO CMR	Produkt nie zawiera substancji sklasyfikowanych jako CMR w rozumieniu części 3 załącznika VI Rozporządzenia WE nr 1272/2008, które są zakazane do stosowania w produktach kosmetycznych.
SUBSTANCJE ZNAJDUJĄCE SIĘ W WYKAZIE ZAŁĄCZNIKA NR II ROZPORZĄDZENIA 1223/2009	W składzie kosmetyku nie znajdują się surowce zakazane do stosowania w produktach kosmetycznych, które znajdują się w wykazie surowców zawartym w załączniku II Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady WE 1223/2009.

str. 59

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

WYTWARZANIE

Producent deklaruje, że oceniany produkt kosmetyczny wytwarzany jest zgodnie z normą ISO 22716 i posiada lub nadzoruje system GMP związany z wytwarzaniem produktów kosmetycznych.

CZĘŚĆ B

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

1. Wniosek z oceny.

Stwierdza się, że oceniany produkt, o zadeklarowanym przez producenta składzie, może zostać oceniony jako bezpieczny dla zdrowia ludzkiego, gdy jest użytkowany w normalnych i dających się racjonalnie przewidzieć warunkach stosowania zgodnie z wymaganiami Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczącego produktów kosmetycznych (Dz. U. L 342 z 22.12.2009), którego przepisy w pełni obowiązują od dnia 11 lipca 2013 r. (w szczególności Rozdział III, Artykuł 3 i 10).

Surowce zastosowane w ocenianym produkcie są powszechnie stosowane w przemyśle kosmetycznym w Europie i na świecie.

Wszystkie składniki są użyte zgodnie z przeznaczeniem i we właściwych ilościach.

Produkt jest bezpieczny zgodnie z aktualnym stanem wiedzy.

Niniejszej oceny dokonano w oparciu o obowiązujące prawo, uwzględniając międzynarodowe zalecenia władz i stowarzyszeń oraz własne doświadczenie zawodowe, biorąc pod uwagę zgodność użytych surowców, ich profil toksykologiczny, budowę chemiczną, właściwości fizykochemiczne, badania gotowego produktu kosmetycznego oraz rozważając poziom ekspozycji.

str. 60

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O. UL. HODOWLANA 5 61-680 POZNAŃ www.invanto.pl	
--	---

OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

2. Ostrzeżenia i instrukcje stosowania umieszczone na etykiecie.

INSTRUKCJA STOSOWANIA	Niewielką ilość żelu zaaplikuj na oczyszczoną wcześniej skórę, rozsmaruj równomiernie do całkowitego wchłonięcia.
OSTRZEŻENIA	Unikać kontaktu z oczami.
ALERGENY	Produkt zawiera następujące alergeny pochodzące z użytych surowców w ilości powyżej 10ppm: <ul style="list-style-type: none"> ▪ EUCALYPTUS GLOBULUS LEAF OIL ▪ EUGENIA CARYOPHYLLUS BUD OIL ▪ EUGENOL ▪ LIMONENE ▪ LINALOOL
DODATKOWE INFORMACJE	Brak.
UWAGI	Dalsze ostrzeżenia i instrukcje dotyczące stosowania nie są konieczne, ponieważ oznakowanie i ogólny opis produktu są wystarczające, aby określić jego zastosowanie. Prezentacja produktu spełnia wymagania i zgodność Dyrektywy 87/357/EEC.
OZNAKOWANIE	Producent zgodnie z obowiązującymi przepisami jest zobowiązany do umieszczenia na opakowaniu następujących informacji: <ul style="list-style-type: none"> • nazwę produktu, • nr partii oraz datę minimalnej trwałości. • <u>adres osoby odpowiedzialnej i/lub adres producenta, jeżeli osoba odpowiedzialna nie jest producentem</u> • <u>nominalną zawartość produktu,</u> • <u>wykaz składników</u> • <u>funkcję kosmetyku zgodną z przeznaczeniem i udokumentowaną w przypadku deklaracji zamierzonego działania zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (UE) nr 655/2013 z dnia 10 lipca 2013. Są to informacje zgodne z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 art. 19 (1).</u>
SKŁAD INCI DEKLAROWANY NA OPAKOWANIU	AQUA, PROPANEDIOL, GLUCOSAMINE SULFATE, EPIMEDIUM KOREANUM EXTRACT, HYDROXYETHYLCELLULOSE, PEG-40 HYDROGENATED CASTOR OIL, DIMETHYL SULFONE, MENTHOL, PROPYLENE GLYCOL, GLYCERIN, BENZYL ALCOHOL, ROSMARINUS OFFICINALIS LEAF OIL, EUCALYPTUS GLOBULUS LEAF OIL, EUGENIA CARYOPHYLLUS BUD OIL, EUGENOL, DEHYDROACETIC ACID, LIMONENE, ARTEMISIA ABSINTHIUM EXTRACT, ARNICA MONTANA FLOWER EXTRACT, LINALOOL, SODIUM BENZOATE, POTASSIUM SORBATE
PROJEKT OZNAKOWANIA	Nie oceniano oznakowania produktu.
UWAGI	Brak

str. 61

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

3. Rozumowanie.

3.1. Ocena bezpieczeństwa substancji lub mieszanin.

Surowce użyte w niniejszym produkcie są dobrze znanymi składnikami o długiej historii bezpiecznego stosowania. Ogólnie rzecz biorąc, związki zawarte w ocenianym produkcie mają niską częstość występowania działań niepożądanych. Wszystkie surowce użyte w formule zostały zastosowane zgodnie z ich przeznaczeniem, w dozwolonej ilości i nie stanowią zagrożenia dla zdrowia ludzkiego.

Produkt kosmetyczny nie zawiera substancji wymienionych na liście substancji zabronionych (Załącznik II) do Rozporządzenia (WE) nr 1223/2009.

Wszystkie wykorzystane surowce zostały ocenione jako bezpieczne składniki niniejszego produktu. Bezpieczeństwo produktu kosmetycznego opiera się na bezpieczeństwie jego składników. Biorąc pod uwagę profile toksykologiczne stosowanych składników, stwierdza się, że nie ma prawdopodobnych zagrożeń odnośnie do bezpieczeństwa wynikających z normalnych i dających się racjonalnie przewidzieć warunków stosowania tego produktu. Nie przewiduje się interakcji między substancjami zawartymi w produkcie w odniesieniu do aktualnych danych literaturowych i wyników testu stabilności.

W obliczeniach uwzględniono dane ilościowe przy zastosowaniu produktu przez osoby dorosłe i dzieci powyżej 3 roku życia, ponieważ wartość Marginesu Bezpieczeństwa (MoS), która musi zgodnie z założeniem wynosić > 100, uwzględnia również różnice wewnątrzgatunkowe. Dla składników, dla których wyznaczono wartość NOAEL dokonano obliczeń marginesu bezpieczeństwa. Dla surowców, dla których obliczenie marginesu bezpieczeństwa jest niemożliwe, do potwierdzenia ich bezpieczeństwa wykorzystano dostępne dane literaturowe pochodzące z następujących baz: CIR (Cosmetic Ingredient Review), ECHA (European Chemicals Agency), RTECS (The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances database), SCCS (The Scientific Committee on Consumer Safety), PubChem (National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information), DART (Developmental and Reproductive Toxicology Database).

str. 62

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

ZAŁĄCZNIKI

INVANTO SP. Z O.O.
UL. HODOWLANA 5
61-680 POZNAŃ
www.invanto.pl



OCENA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO

Numer raportu	RZ1-23-04-18-1	Wersja	01	Data sporządzenia	24.06.2024
---------------	----------------	--------	----	-------------------	------------

3.2. Ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego

DŁUGOTRWALE NARAŻENIE	Nie przewiduje się, aby produkt końcowy miał długotrwałe skutki dla zdrowia.
NARZĄDY DOCELOWE	Nie są spodziewane niekorzystne skutki zdrowotne w narządach docelowych na skutek stosowania gotowego produktu.
DZIAŁANIE RAKOTWÓRCZE	Nie przewiduje się, aby produkt końcowy miał działanie rakotwórcze (w oparciu o właściwości poszczególnych składników).
KONTAKT ZE SKÓRĄ/ TOKSYCZNOŚĆ DLA SKÓRY	Dostępne dane wskazują, że niniejszy produkt kosmetyczny nie powinien stwarzać zagrożenia podczas normalnego użytkowania.
DZIAŁANIE FOTOTOKSYCZNE I FOTOALERGIZUJĄCE	Nie przewiduje się działania fototoksycznego produktu.
USZKODZENIE NARZĄDÓW WEWNĘTRZNYCH PO KONTAKCIE ZE SKÓRĄ	Mało prawdopodobne, biorąc pod uwagę kinetykę przenikania poszczególnych substancji jak i mieszaniny.
KONTAKT Z OCZAMI / TOKSYCZNOŚĆ DLA OCZU	Jeśli produkt dostanie się do oka może to wywołać efekt podrażnienia, dlatego należy podczas stosowania unikać kontaktu z oczami i omijać ich okolice.
PÓLKNIECIE/ TOKSYCZNOŚĆ DOUSTNA	Produkt stosowany zgodnie z przeznaczeniem nie powinien powodować podrażnienia przewodu pokarmowego. W razie przypadkowego połknięcia produkt może spowodować przemijające łagodne podrażnienie - dyskomfort w przewodzie pokarmowym.
WDYCHANIE/ TOKSYCZNOŚĆ INHALACYJNA:	Forma i skład produktu wskazują, że jest mało prawdopodobne, aby inhalacja stanowiła drogę narażenia.
STABILNOŚĆ PRODUKTU KOSMETYCZNEGO	Wykonane badania stabilności i kompatybilności potwierdzają, że produkt w całym terminie przydatności będzie stabilny i bezpieczny, a opakowanie będzie spełniało zakładane funkcje i nie zajdzie między nim a masą produktu żadna niepożądana interakcja.
BEZPIECZEŃSTWO MIKROBIOLOGICZNE PRODUKTU KOSMETYCZNEGO	Badanie mikrobiologiczne oraz test stabilności mikrobiologicznej (test konserwacji) wskazują na trwałość i czystość mikrobiologiczną ocenianego produktu oraz na skuteczność zastosowanego układu konserwującego.
WŁAŚCIWOŚCI DRAŻNIĄCE I ALERGIZUJĄCE PRODUKTU KOSMETYCZNEGO	Przeprowadzone badania dermatologiczne na skórze normalnej – potwierdziły brak właściwości drażniących i alergizujących kosmetyku.

Oceniany produkt jest bezpiecznym produktem kosmetycznym w normalnych i dających się racjonalnie przewidzieć warunkach stosowania. Jednakże w indywidualnych przypadkach może wystąpić nadwrażliwość na niektóre składniki. Wówczas takie osoby powinny zaprzestać stosowania produktu.

str. 63

Wynik badania dotyczy wyłącznie badanych próbek. Odpowiedzialność Laboratorium jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w sprawozdaniu. Niniejsze sprawozdanie nie może być powielane w części bez pisemnej zgody Invanto Sp z o.o.

10. STRESZCZENIA PRACY

Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zapadalności na chorobę zwyrodnieniową stawów (ChZS), która diagnozowana jest nie tylko wśród starszej części społeczeństwa, ale także u młodszego pokolenia (szczególnie sportowców), co prowadzi do wykluczenia ich z rywalizacji. Do tej pory nie opracowano efektywnego leczenia choroby zwyrodnieniowej stawów, dlatego stosowane mogą być jedynie terapie spowalniające postęp choroby lub chroniące przed pogłębianiem się obecnych uszkodzeń. Zwykle, terapie zachowawcze opierają się na terapii przeciwbólowej oraz jak najdłuższym utrzymaniu ruchomości i działaniu kojącym w obrębie stawu. Dlatego nieustannie poszukiwane są alternatywne formy przynoszenia ulgi osobom zmagającym się z ChZS.

Niniejsza rozprawa doktorska miała na celu opracowanie produktów dermokosmetycznych na bazie wyselekcjonowanych ekstraktów roślinnych, olejków eterycznych i substancji o wysokim potencjale łagodzącym i regeneracyjnym względem urazów i chorób zwyrodnieniowych stawów, oraz przeprowadzenie wszystkich niezbędnych badań umożliwiających wdrożenie produktów na rynek. Przedstawiona dysertacja zawiera część literaturową, metodyczną oraz wyniki przeprowadzonych badań i ich dyskusję.

W części literaturowej przybliżono budowę stawów, ze wskazaniem na problemy związane z chorobą zwyrodnieniową stawów. Opisano problematykę tej choroby, włącznie z przedstawieniem etiopatogenezy, obrazu klinicznego, danych epidemiologicznych oraz obecnie dostępnych metod leczenia. W tym rozdziale wskazano substancje o wysokim potencjale regeneracyjnym względem ChZS ich mechanizm działania oraz możliwe skutki uboczne ich stosowania (ze szczególnym rozwinięciem charakterystyki siarczanu glukozaminy i ikaryny pochodzącej z ekstraktu z *Epimedium Koreanum*). Przedstawiona została także budowa skóry pod kątem możliwości zastosowania środków z aplikacją miejscową naskórną oraz możliwości transportu przez naskórkowego składników aktywnych. W dalszej części pracy przybliżono możliwe metody badania *in vitro* i *in vivo* przenikania substancji, problematykę tworzenia nowych formułacji oraz przeanalizowano aspekty prawne dotyczące wdrażania nowych produktów i bezpieczeństwa ich stosowania. Ponadto, w rozdziale tym opisane zostały także wszystkie niezbędne do wdrożenia badania wraz z ich znaczeniem dla bezpieczeństwa stosowania produktu kosmetycznego.

W części metodycznej przedstawiono metodykę ilościowego oznaczenia substancji aktywnej – ikaryny, w ekstrakcie z *Epimedium Koreanum*, potrzebnej do ustalenia ostatecznych składów opracowywanych produktów. Dołączono spis wszystkich surowców wykorzystanych do tworzenia nowych formułacji oraz opisano technologię wytwarzania formułacji, zarówno w skali mikro trzech form aplikacyjnych (maść, żel, emulsja), jak i podniesienie skali ich wytwarzania do skali półtechnicznej. Następnie, przedstawiono wykorzystane metody oznaczeń parametrów fizykochemicznych wykorzystanych do opracowania specyfikacji wyrobów kosmetycznych, włączając metodykę pomiaru pH, gęstości, lepkości, oceny sensorycznej, stabilności wirówkowej, stabilności metodą wielokrotnego rozpraszania światła, analizy mikroskopowej oraz pomiaru aktywności wody. Dla przeprowadzonych badań uwalniania w aparacie łopatkowym i badań przenikania przez membrany imitujące skórę *in vitro* w komorze Franz'a opisano warunki prowadzonych

analiz. W tym rozdziale przedstawiono także metodykę badań wdrożeniowych. Szczegółowo opisano procedury przeprowadzonych badań czystości mikrobiologicznej i testu zakonserwowania masy kosmetycznej, badań stabilnościowych, dermatologicznych i aplikacyjnych oraz przedstawiono postępowanie podczas oceny toksykologicznej. Określono kluczowe parametry toksykologiczne ze wskazaniem ich źródła lub metody ich obliczeń.

W sekcji wyników przedstawiono analizę dostępnych surowców, mających zastosowanie we wspomaganiu leczenia choroby zwyrodnieniowej stawów, na podstawie której jako główne składniki wytypowano: siarczan glukozaminy jako składnik endogennej łańcuchów polisacharydowych macierzy chrząstki i glukozaminoglikanów mazi stawowej oraz ikarynę pochodzącą z ekstraktu z *Epimedium Koreanum* o potencjalnie wysokiej zdolności do aktywacji chondrogenyzy i regeneracji macierzy międzykomórkowej przez chondrocyty. Następnie zdefiniowano problemy napotkane podczas przygotowywania formułacji i możliwe ich przyczyny oraz scharakteryzowano otrzymane formułacje pod kątem fizykochemicznych właściwości na podstawie których opracowano specyfikacje produktowe, niezbędne do kontroli jakości wytwarzania. W tym rozdziale przedstawiono także wyniki uwalniania i przenikania *in vitro* przez membrany imitujące skórę, podczas których zastosowanie, zarówno nośnika w postaci żelu, jak i emulsji, umożliwiło uzyskanie przenikania ikaryny powyżej założonego poziomu 20 %. Podczas badań uwalniania substancji aktywnych z maści, z uwagi na najniższe wartości procentu uwalniania, nośnik ten został wykluczony z dalszych badań. W następnym etapie przedstawiono wyniki procesu optymalizacji wytwarzania masy kosmetycznej w skali półtechnicznej, wskazując wpływ parametrów procesu mieszania i homogenizacji (czasu i liczby obrotów na minutę) masy kosmetycznej na ostateczne właściwości fizykochemiczne i stabilność wytworzonej masy. W tej sekcji przedstawiono także wyniki przeprowadzonych badań wdrożeniowych wybranych formułacji. Wykazano czystość mikrobiologiczną na podstawie oznaczeń ogólnej liczby mezofilnych mikroorganizmów tlenowych, drożdży i pleśni oraz szczepów patogennych *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*, które nie wykazały odchylenia od dopuszczalnej liczby mikroorganizmów, jak również nie zaobserwowano obecności żadnego z testowanych szczepów patogennych. Wyniki badania układu konserwującego dla analizowanych produktów kosmetycznych, potwierdziły jego skuteczność przeciwko sztucznie wprowadzonym mikroorganizmom. Efekty badania i obliczenia potencjału drażniącego, wskazują, że oba produkty (żel chłodzący (kontuzje stawowe) oraz emulsja rozgrzewająca (zwyrodnienia)) są dobrze tolerowane przez skórę i nie wykazują właściwości drażniących ani uczulających, dlatego mogą zostać sklasyfikowane jako niedrażniące. W dalszej części tego rozdziału przedstawiono wyniki badania aplikacyjnego ankietowego, ukazującego skuteczność produktów i ogólne wrażenie potencjalnych konsumentów. Scharakteryzowano panel ochotników biorących udział w badaniu oraz opracowano analizę statystyczną uzyskanych w ankietach odpowiedzi, gdzie odnotowano wysokie oceny właściwości sensoryczne obu produktów i brak zastrzeżeń dotyczących koloru, zapachu czy aplikacji produktu. W 12-tygodniowych badaniach aplikacyjnych potwierdzono wszystkie założone przez producenta deklaracje, a tym samym efektywność produktów w całym zakresie, sugerując tym samym wysoki potencjał wdrożeniowy produktu. W ostatnim podrozdziale tej sekcji bardzo

STRESZCZENIE

szczegółowo zaprezentowano analizę toksykologiczną każdego ze składników formułacji emulsji rozgrzewającej w formie analizy literaturowych danych toksykologicznych na podstawie dostępnych badań *in vitro* i *in vivo*. Następnie przeanalizowano wszystkie składniki jako całość w odniesieniu do możliwego ryzyka podczas stosowania produktu. Produkt został oceniany jako bezpieczny produkt kosmetyczny w normalnych i dających się racjonalnie przewidzieć warunkach stosowania. W oparciu o powyższą analizę opracowano także ostrzeżenia, instrukcję stosowania, uwagi, oznakowanie oraz skład INCI, które obligatoryjnie powinny znaleźć się na etykiecie produktu.

Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim

In recent years an increase in the incidence of osteoarthritis (OA) has been observed, which has been diagnosed not only in the elderly, but also in the younger generation, especially in athletes, which usually means the end of their career. As yet, no effective treatment for osteoarthritis has been developed, so only therapies that slow down the progression of the disease or protect against the deepening of existing damage can be applied. Typically, conservative therapies are based on analgesic therapy and aim at maintaining mobility and soothing effects in the joints as long as possible. Therefore, the search for alternative forms of bringing relief to people struggling with OA is continued.

The studies presented in this doctoral dissertation were aimed at development of dermocosmetic products based on selected plant extracts, essential oils and substances with high soothing and regenerative potential for injuries or degenerative joint diseases, and to conduct all necessary research to enable the products introduction on the market. The presented dissertation contains a presentation of the topic based on literature along with a methodological part as well as the results of the conducted research and their discussion.

The introductory part presents the structure of joints with an indication of problems related to osteoarthritis. The problems of this disease are described, including presentation of etiopathogenesis, clinical picture, epidemiological data and currently available treatment methods. This chapter indicates substances with high regenerative potential for OA, their mechanism of action and possible side effects of their use (with particular explication of the characteristics of glucosamine sulfate and icariin derived from the *Epimedium Koreanum* extract). The structure of the skin is also presented focusing on the possibility of using agents with local epidermal application and the possibility of transepidermal transport of active ingredients. The next chapter of the dissertation presents the possible *in vitro* and *in vivo* methods of testing the skin permeation of substances, the problems of designing new formulations, and analysis of the legal aspects regarding the implementation of new products in terms of the safety of their use. Moreover, this chapter also describes all the tests required for the implementation procedure emphasizing the importance for the safe use of the cosmetic products.

The methodological part presents the methodology for quantitative determination of the active substance - icariin, in the *Epimedium Koreanum* extract, needed to determine the final compositions of the developed products. A list of all raw materials used in the new formulations is attached, and the technology for producing the formulations is described on the micro scale for three application forms (ointment, gel, emulsion), as well as for increasing the scale of gel and emulsion production from the micro to semi-technical scale. Then, the methods applied to determine the physicochemical parameters used to develop specifications for cosmetic products are presented, including those for measuring pH, density, viscosity, sensory evaluation, centrifuge stability, stability by multiple light scattering, microscopic analysis and water activity measurement. The conditions of the release tests carried out in the paddle apparatus and the *in vitro* permeation tests through the skin-imitating membranes in the Franz chamber are described. This chapter also presents the implementation tests methodologies. The procedures for microbiological purity tests and the cosmetic mass preservation test, stability, dermatological and application tests are described

in detail along with the procedure of toxicological assessment. Key toxicological parameters have been determined indicating the sources or calculation methods.

The results section presents an analysis of available raw materials used to support the treatment of osteoarthritis, based on which the main ingredients of the proposed formulation were selected: glucosamine sulfate as an endogenous component of the polysaccharide chains of the cartilage matrix and glucosaminoglycans of synovial fluid, along with icariin derived from the extract of *Epimedium Koreanum* with a potentially high ability to activate chondrogenesis and regeneration of the intercellular matrix by chondrocytes. Then, the problems encountered during the preparation of the proposed formulations are described and their possible causes are identified. The new formulations have been characterized in terms of physicochemical properties, on whose basis product specifications necessary for production quality control have been developed. The same chapter also presents the results characterizing the release and *in vitro* permeation through the skin-imitating membranes. The use of both carriers in the form of a gel or emulsion has made it possible to achieve the penetration of icariin above the assumed level of 20%. On the basis of the release tests of active substances from the ointment, due to the lowest release percentage values, this carrier has been excluded from further tests. The next section presents the results of the process of optimizing the production of cosmetic mass on a semi-technical scale, indicating the influence of the mixing and homogenization process parameters (time and number of revolutions per minute) on the final physicochemical properties or stability of the produced mass. This section also presents the results of implementation tests of selected formulations. Microbiological purity has been checked on the basis of determination of the total number of mesophilic aerobic microorganisms, yeasts and molds, as well as pathogenic strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, showing no deviations from the permissible number of microorganisms, and no presence of any of the tested pathogenic strains. The findings of the cosmetic products' preservation system examination confirmed its effectiveness against the multiplication of artificially introduced microorganisms. Results of the examination and calculation of the irritation potential, indicate that both products (cooling gel (joint injuries) and warming emulsion (joint degeneration)) are well tolerated by the skin and do not show irritating or sensitizing properties, therefore the products can be classified as non-irritating. The final part of this chapter presents the results of an application survey, assessment of the effectiveness of the products and the overall impression of potential consumers. The panel of volunteers participating in the study is characterized and a statistical analysis of the responses obtained in the surveys has been performed giving high ratings of the sensory properties of both products with no objections regarding their color, smell or application. The 12-week application tests confirmed all the declarations promised by the manufacturer, and thus the effectiveness of the products in the entire range, hence suggesting their high implementation potential. The last subsection of this chapter presents in great detail the toxicological study of each of the components of the warming emulsion formulation, in the form of a literature research on toxicological data based on available *in vitro* and *in vivo* tests. Then, all ingredients have been analyzed as a mixture in terms of the possible risks when applied. The product has been assessed as a safe cosmetic one under normal and reasonably foreseeable conditions of use. Based on the above analysis, the information mandatory on the product

STRESZCZENIE

label has been prepared, including the warnings, instructions for use, notes, labeling and INCI composition.

11. WYKAZ RYSUNKÓW I TABEL

WYKAZ RYSUNKÓW, TABEL I RÓWNAŃ

Wykaz rysunków

Numer rysunku	Tytuł
1	Schemat budowy stawu człowieka [opracowanie własne]
2	Wzór strukturalny glukozaminy [opracowanie własne ChemSketch]
3	Wzór strukturalny chondroityny [opracowanie własne chemsketch]
4	Wzór strukturalny ikaryny [opracowanie własne chemsketch]
5	Schemat budowy skóry
6	Aparat do pomiaru pH Fisher Scientific Accumet AE150 [zdjęcie własne]
7	Piknometr metalowy z przykrywką P-1 POL-ZAF S.C. [zdjęcie własne]
8	Wirówka Sartorius Centrisart D - 16C [zdjęcie własne]
9	Mikroskop optyczny Carl Zeiss Suzhou Co., Ltd. Axiolab 5 [zdjęcie własne]
10	Sonda do pomiaru aktywności wody Rotronic HC2-AW-USB [zdjęcie własne]
11	Aparat do HPLC Waters Alliance 2695 z detektorem RID model 2489 [zdjęcie własne]
12	Mieszalnik P&M Promixer [zdjęcie własne]
13	Schemat poboru prób dla formułacji żelowych
14	Aparat do HPLC firmy Agilent Technologies Infinity 1290 [zdjęcie własne]
15	Schemat poboru prób dla formułacji emulsyjnych
16	Komora stabilności Binder KBF [zdjęcia własne]
17	Komora Finna przed i po przyklejeniu na skórę
18	Schemat postępowania podczas poboru prób do kontroli jakości
19	Krzywa kalibracyjna ikaryny i przykładowy chromatogram analizy HPLC-MS
20	Zestawienie formułacji żelowych przy wykorzystaniu [1.1.] carbomeru (5 % wag.), [1.2.] poliakrylanu sodu (4 % wag.), [1.3.] hydroksyetulocelulozy (1 % wag.) oraz [1.4.] hydroksyetulocelulozy (2 % wag.) [zdjęcia własne]
21	Zdjęcie przygotowanych formułacji 3.1. emulsja, 2.1. maść [zdjęcia własne]
22	Profil przedstawiający dane transmisji i rozpraszania wstecznego przez badaną emulsję oraz kinetykę procesu destabilizacji emulsji
23	Obraz mikroskopowy emulsji zabarwionej barwnikami pozwalającymi na rozróżnienie faz: A1 - emulsja chłodząca zabarwiona oranżem metylowym, A2 - emulsja chłodząca zabarwiona czerwienią Kongo, B1 - Emulsja rozgrzewająca zabarwiona oranżem metylowym, B2 - emulsja rozgrzewająca zabarwiona czerwienią Kongo
24	Profil uwalniania <i>in vitro</i> ikaryny z masy kosmetycznej
25	Przykładowy chromatogram analizy HPLC-RID określający odpowiednio od góry zawartość wzorca 0,4 mg/ml oraz siarczanu glukozaminy w masie produktu żelu chłodzącego odpowiednio 85,64 mg/ml, 85,37 mg/ml, i 85,79 mg/ml
26	Profile uwalniania siarczanu glukozaminy dla formułacji zawierających od 2,5 % wag. do 10 % wag. składnika
27	Wpływ promotorów przenikania na zdolność permeacyjną siarczanu glukozaminy na podstawie badań uwalniania <i>in vitro</i> z emulsji zawierającej 10 % wag. siarczanu glukozaminy
28	Porównanie chromatogramu wzorca z chromatogramem badanej próby
29	Profil przenikania <i>in vitro</i> ikaryny przez membranę imitującą skórę w komorze Franz'a
30	Wpływ parametrów homogenizacji na wielkość i rozkład kropel fazy wewnętrznej emulsji: A - 1 min/1000 rpm średnica największej kropli 23,864 µm, B - 1 min/1500 rpm średnica największej kropli 18,949 µm, C - 3 min/2000 rpm średnica największej

WYKAZ RYSUNKÓW, TABEL I RÓWNAŃ

	kropli 10,542 μm , D - 3 min/2500 rpm średnica największej kropli 7,158 μm , E - 1 min/3000 rpm średnica największej kropli 9,707 μm , F - 3 min/3000 rpm średnica największej kropli 4,640 μm
31	Zmiana masy w czasie sezonowania obu produktu
32	Zmiany wartości pH w czasie sezonowania badanych produktów
33	Zmiany gęstości w czasie sezonowania produktów
34	Zmiany lepkości w czasie sezonowania produktów
35	Wzór etykiet
36	Wizualizacja gotowych produktów

Wykaz tabel

Numer tabeli	Tytuł
1	Właściwości wybranych substancji, wykazujących zdolności do wiązania z termoreceptorami
2	Gradientowa elucja fazy ruchomej do oznaczania ikaryny w ekstrakcie z <i>Epimedium Koreanum</i> metodą HPLC-MS
3	Wstępny skład formułacji emulsyjnej 1
4	Wstępny skład formułacji żelowej nr 1
5	Wstępny skład formułacji żelowej nr 2
6	Wstępny skład formułacji żelowej nr 3
7	Wstępny skład formułacji w postaci maści
8	Cechy sensoryczne i metody ich badania wykorzystane w ocenie organoleptycznej
9	Gradientowa elucja do oznaczenia siarczanu glukozaminy podczas badania uwalniania <i>in vitro</i>
10	Warunki analizy HPLC oznaczenia ikaryny z płynu akceptorowego pobranego po badaniu przenikania.
11	Skład wybranej formułacji żelowej po optymalizacji
12	Parametry optymalizacji procesu mieszania
13	Skład formułacji emulsyjnej po optymalizacji
14	Parametry optymalizacji procesu homogenizacji
15	Parametry optymalizacji procesu mieszania
16	Warunki badań stabilnościowych
17	Zakres badań i metodyki wykorzystane do badań stabilności
18	Klasyfikacja punktowa podrażnienia
19	Klasyfikacja wyrobu pod względem potencjału drażniącego
20	Pytania ankietowe opracowane dla formułacji żelu chłodzącego
21	Pytania ankietowe opracowane dla rozgrzewającej formułacji emulsyjnej
22	Schemat raportu bezpieczeństwa
23	Zestawienie ekstraktów roślinnych wykorzystywanych w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów
24	Zestawienie olejków eterycznych i ich działania w odniesieniu do choroby zwyrodnieniowej stawów
25	Zestawienie pozostałych syntetycznych oraz naturalnych składników kosmetycznych, które potencjalnie wykazują działanie łagodzące względem ChZS

WYKAZ RYSUNKÓW, TABEL I RÓWNAŃ

26	Zestawienie nastrzyków i ich wyników w analizie LC-MS
27	Wyniki oznaczenia pH
28	Wartości lepkości oraz gęstości otrzymanych formułacji kosmetycznych
29	Zestawienie parametrów sensorycznych dla każdej z opracowanych formułacji kosmetycznych
30	Wyniki badania przenikania <i>in vitro</i> siarczanu glukozaminy w komorze Franza
31	Wyniki przenikania <i>in vitro</i> ikaryny z wykorzystaniem komory Franz'a
32	Analiza procesu mieszania prędkości obrotowej mieszadła i zapowietrzenia
33	Wyniki optymalizacji procesu homogenizacji emulsji rozgrzewającej
34	Wyniki badania czystości mikrobiologicznej
35	Wyniki testu konserwacji emulsji rozgrzewającej i żelu
36	Ocena parametrów fizykochemicznych żelu chłodzącego
37	Ocena parametrów fizykochemicznych emulsji rozgrzewającej
38	Ocena ubytku masy w trakcie sezonowania badanych produktów
39	Wyniki badania dermatologicznego
40	Ocena stanu wyjściowego ochotników badania aplikacyjnego żelu chłodzącego
41	Ocena stanu skóry ochotników w miejscu aplikacji oraz dolegliwości towarzyszących, podczas badania aplikacyjnego emulsji rozgrzewającej
42	Ocena ogólnych parametrów sensorycznych obu opracowanych formułacji
43	Ocena deklaracji producenta produktu żel chłodzący
44	Ocena deklaracji producenta produktu emulsja rozgrzewająca
45	Ocena narażenia na działanie produktu kosmetycznego
46	Dane toksykologiczne emulsji rozgrzewającej
47	Wykaz testów analizowanych podczas oceny toksykologicznej
48	Ocena toksykologiczna składników wchodzących w skład emulsji rozgrzewającej.
49	Ocena bezpieczeństwa gotowego wyrobu pod nazwą emulsja rozgrzewająca
50	Dane do umieszczenia na etykiecie

Wykaz równań

Numer równania	Tytuł
Równanie 1.	Równanie opisujące lepkość dynamiczną
Równanie 2.	Równanie opisujące lepkość kinematyczną
Równanie 3.	Równanie opisujące gęstość substancji
Równanie 4.	Równanie opisujące gęstość z uwzględnieniem ciśnienia atmosferycznego i gęstości powietrza
Równanie 5.	Równanie opisujące aktywność wody
Równanie 6.	Równanie opisujące prawo Lamberta Beera
Równanie 7.	Równanie opisujące stabilność emulsji
Równanie 8.	Równanie i jego rozwinięcie opisujące liczbę drożdży i pleśni w 1g próbki
Równanie 9.	Równanie opisujące wskaźnik podrażnienia produktu
Równanie 10.	Równanie opisujące dawkę narażenia systemicznego (SED) na podstawie danych absorpcji dermalnej [%]
Równanie 11.	Równanie opisujące dawkę narażenia systemicznego (SED) na podstawie danych absorpcji dermalnej [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$]

WYKAZ RYSUNKÓW, TABEL I RÓWNAŃ

Równanie 12.	Równanie opisujące margines bezpieczeństwa stosowania produktu kosmetycznego (MoS)
---------------------	--

12. SPIS LITERATURY

Literatura

- [1] P. Kościelna, A. M. Pogorzała, “Badanie funkcjonalne stawu biodrowego w przypadku zmian zwyrodnieniowych”, *Innowacyjność i Tradycja w Fizjoterapii. Wyższa Szkoła Edukacji i Terapii w Poznaniu*, p. 51–70, 2017.
- [2] E. Sajewicz, "Wprowadzenie do biotribologii", Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej, 2011.
- [3] J. R. Ralphs, M. Benjamin, “The joint capsule: structure, composition, ageing and disease”, *Journal of Anatomy*, vol. 184, p. 503, 1994.
- [4] E. B. de Sousa, P. L. Casado, V. M. Neto, M. E. L. Duarte, D. P. Aguiar, “Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives”, *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 5, p. 1–6, 2014.
- [5] A. Bochenek, M. Reicher, “Anatomia człowieka, tom I”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2008.
- [6] B. Ciszek, “Morfologia i funkcja chrząstki stawowej”, *Acta Clinica*, vol. 1, p. 10–14, 2001.
- [7] Y. Li, Z. Yuan, H. Yang, H. Zhong, W. Peng, R. Xie, “Recent advances in understanding the role of cartilage lubrication in osteoarthritis”, *Molecules*, vol. 26, p. 6122, 2021.
- [8] G. A. Ateshian, V. C. Mow, R. Huiskes, “Friction, lubrication, and wear of articular cartilage and diarthrodial joints”, *Basic orthopaedic biomechanics and mechano-biology*, vol. 3, p. 447–494, 2005.
- [9] A. J. Sophia Fox, A. Bedi, S. A. Rodeo, “The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function”, *Sports Health*, vol. 1, p. 461–468, 2009.
- [10] A. J. Freemont, J. Hoyland, “Lineage plasticity and cell biology of fibrocartilage and hyaline cartilage: its significance in cartilage repair and replacement”, *European Journal of Radiology*, vol. 57, p. 32–36, 2006.
- [11] L. Eichelberger, “Hyaline cartilage; the histochemical characterization of the extracellular and the intracellular compartments”, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 17, p. 77–91, 1960.
- [12] J. M. Clark, “The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage”, *Journal of Anatomy*, vol. 171, p. 117, 1990.
- [13] R. D. Bloebaum, A. S. Wilson, W. N. Martin, “A review of the collagen orientation in the articular cartilage”, *Cartilage*, vol. 13, p. 367-374, 2021.
- [14] A. A. Cederlund, R. M. Aspden, “Walking on water: revisiting the role of water in articular cartilage biomechanics in relation to tissue engineering and regenerative medicine”, *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 19, p. 20220364, 2022.
- [15] F. Shapiro, “Chapter 2 - Imaging Approaches for Epiphyseal Assessment”, *Pediatric Orthopedic Deformities Academic Press*, p. 129–150, 2001.
- [16] M. S. Şenol, H. Özer, “Architecture of cartilage tissue and its adaptation to pathological conditions,” in *Comparative Kinesiology of the Human Body*, Elsevier, p. 91–100, 2020.
- [17] S. R. Brannan, D. A. Jerrard, “Synovial fluid analysis”, *Journal of Emergency Medicine*, vol. 30, p. 331–339, 2006.

- [18] D. A. Swann, E. L. Radin, M. Nazimiec, P. A. Weisser, N. Curran, G. Lewinnek, "Role of hyaluronic acid in joint lubrication", *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 33, p. 318, 1974.
- [19] E. L. Radin, D. A. Swann, P. A. Weisser, "Separation of a hyaluronate-free lubricating fraction from synovial fluid", *Nature*, vol. 228, p. 377–378, 1970.
- [20] D. A. Swann, E. L. Radin, "The molecular basis of articular lubrication: I. Purification and properties of a lubricating fraction from bovine synovial fluid", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 247, p. 8069–8073, 1972.
- [21] H. Higaki, T. Murakami, Y. Nakanishi, H. Miura, T. Mawatari, Y. Iwamoto, "The lubricating ability of biomembrane models with dipalmitoyl phosphatidylcholine and γ -globulin", *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineer Part H*, vol. 212, p. 337–346, 1998.
- [22] C. J. Bell, E. Ingham, J. Fisher, "Influence of hyaluronic acid on the time-dependent friction response of articular cartilage under different conditions", *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineer Part H*, vol. 220, p. 23–31, 2006.
- [23] A. V. Sarma, G. L. Powell, M. LaBerge, "Phospholipid composition of articular cartilage boundary lubricant", *Journal of orthopaedic research*, vol. 19, p. 671–676, 2001.
- [24] K. Mabuchi, T. Obara, K. Ikegami, T. Yamaguchi, T. Kanayama, "Molecular weight independence of the effect of additive hyaluronic acid on the lubricating characteristics in synovial joints with experimental deterioration", *Clinical biomechanics*, vol. 14, p. 352–356, 1999.
- [25] M. Chojnacki, A. Kwapisz, M. Synder, J. Szemraj, "Osteoartroza: etiologia, czynniki ryzyka, mechanizmy molekularne", *Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, vol. 68, p. 640–652, 2014.
- [26] J. Ärnlöv, A. Larsson, "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013", *The Lancet*, vol. 386, p. 743–800, 2015.
- [27] T. Vos et al., "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015", *The Lancet*, vol. 388, p. 1545–1602, 2016.
- [28] T. J. Klein, S.C. Rizzi, J.C. Reichert, N. Georgi, J. Malda, W. Schuurman, R.W. Crawford, D.W. Huttmacher, "Strategies for zonal cartilage repair using hydrogels", *Macromolecular Bioscience*, vol. 9, p. 1049–1058, 2009.
- [29] J. A. Buckwalter, "Articular cartilage: injuries and potential for healing", *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, vol. 28, p. 192–202, 1998.
- [30] J. Galle, A. Bader, P. Hepp, W. Grill, B. Fuchs, J.A. Käs, A. Krinner, B. Marquass, K. Müller, J. Schiller, R.M. Schulz, M. von Buttlar, E. von der Burg, M. Zscharnack, M. Löffler, "Mesenchymal stem cells in cartilage repair: state of the art and methods to monitor cell growth, differentiation and cartilage regeneration," *Curr Med Chem*, vol. 17, p. 2274–2291, 2010.

- [31] M. Grunke, H. Schulze-Koops, "Successful treatment of inflammatory knee osteoarthritis with tumour necrosis factor blockade", *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 65, p. 555–556, 2006.
- [32] P. Deshpande, K. Patil, M. V Guledgud, R. S. D'souza, "Diagnostic imaging in TMJ osteoarthritis: a case report and overview", *International Journal of Dental Science and Research*, vol. 3, p. 56–59, 2015.
- [33] P. A. Klimiuk, A. Kuryliszyn-Moskal, "Choroba zwyrodnieniowa stawów", *Reumatologia*, vol. 2016, p. 111–113, 2016.
- [34] F. Oliviero, A. Scanu, P. Galozzi, R. Ramonda, "Synovial fluid analysis to identify osteoarthritis". *Journal of Visualized Experiments*, p. 64351, 2022.
- [35] Strona internetowa WHO, World Health Organization, "Health topics: risk factors", http://www.who.int/topics/%0Arisk_factors/en/. (dostęp online: 29.11.2023):
- [36] R. Hamood, M. Tirosh, N. Fallach, G. Chodick, E. Eisenberg, O. Lubovsky, "Prevalence and incidence of osteoarthritis: A population-based retrospective cohort study", *Journal of Clinical Medicine*, vol. 10, p. 4282, 2021.
- [37] A. Cui, H. Li, D. Wang, J. Zhong, Y. Chen, H. Lu, "Global, regional prevalence, incidence and risk factors of knee osteoarthritis in population-based studies", *E Clinical Medicine*, vol. 29, 2020.
- [38] M. Cross, E. Smith, D. Hoy, S. Nolte, I. Ackerman, M. Fransen, L. Bridgett, S. Williams, F. Guillemin, C.L. Hill, L.L. Laslett, G. Jones, F. Cicuttini, R. Osborne, T. Vos, R. Buchbinder, A. Woolf, L. March, "The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study", *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 73, p. 1323–1330, 2014.
- [39] S. A. Oliveria, D. T. Felson, J. I. Reed, P. A. Cirillo, A. M. Walker, "Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization", *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, vol. 38, p. 1134–1141, 1995.
- [40] Strona internetowa Głównego Urzędu Statystycznego, "Stan zdrowia ludności Polski w 2019 31.03.2021 r.", (dostęp online: 21.12. 2023).
- [41] S. Dahaghin, S. M. A. Bierma-Zeinstra, A. Z. Ginai, H. A. P. Pols, J. M. W. Hazes, B. W. Koes, "Prevalence and pattern of radiographic hand osteoarthritis and association with pain and disability (the Rotterdam study)", *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 64, p. 682–687, 2005.
- [42] V. L. Johnson, "The epidemiology of osteoarthritis", *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, vol. 28, p. 5–15, 2014.
- [43] K. D. Allen, Y. M. Golightly, "Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence", *Current Opinion in Rheumatology*, vol. 27, p. 276, 2015.
- [44] Y. Zhang, J. M. Jordan, "Epidemiology of osteoarthritis", *Clinics in Geriatric Medicine*, vol. 26, p. 355–369, 2010.
- [45] T. Neogi, Y. Zhang, "Epidemiology of osteoarthritis", *Rheumatic Disease Clinics*, vol. 39, p. 1–19, 2013.
- [46] S. C. Warner, A. M. Valdes, "Genetic association studies in osteoarthritis: is it fairytale?", *Current Opinion in Rheumatology*, vol. 29, p. 103–109, 2017.

- [47] E. R. Vina, C. K. Kwok, “Epidemiology of osteoarthritis: literature update”, *Current Opinion in Rheumatology*, vol. 30, p. 160, 2018.
- [48] J. Woron, “Pharmacological treatment of osteoarthritis—current recommendations”, *Lekarz POZ*, vol. 6, p. 33–36, 2020.
- [49] I. Ghlichloo, V. Gerriets, “Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)”, 2019.
- [50] L. A. Chahl, “Opioids-mechanisms of action”, *Australian Prescriber*, vol. 19, 1996.
- [51] E. G. Matzkin, E. J. Curry, Q. Kong, M. J. Rogers, M. Henry, E. L. Smith, “Efficacy and treatment response of intra-articular corticosteroid injections in patients with symptomatic knee osteoarthritis”, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, vol. 25, p. 703–714, 2017.
- [52] J. G. McGarry, Z. J. Daruwalla, “The efficacy, accuracy and complications of corticosteroid injections of the knee joint”, *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy*, vol. 19, p. 1649–1654, 2011.
- [53] A. Horecka, A. Hordyjewska, T. Blicharski, J. Kurzepa, “Osteoarthritis of the knee—Biochemical aspect of applied therapies: A review”, *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 22, p. 488, 2022.
- [54] M. Dougados, “Symptomatic slow-acting drugs for osteoarthritis: what are the facts?”, *Joint Bone Spine*, vol. 73, p. 606–609, 2006.
- [55] S.K. Cho, H. Kim, H.R. Park, W. Choi, S. Choi, S.Y. Jung, E.J. Jang, Y.K. Sung, “Nonsteroidal anti-inflammatory drugs-sparing effect of symptomatic slow-acting drugs for osteoarthritis in knee osteoarthritis patients”, *Journal of Rheumatic Diseases*, vol. 26, p. 179–185, 2019.
- [56] D. Hamerman, “The biology of osteoarthritis”, *New England Journal of Medicine*, vol. 320, p. 1322–1330, 1989.
- [57] H. Müller-Faßbender, G. L. Bach, W. Haase, L. C. Rovati, I. Setnikar, “Glucosamine sulfate compared to ibuprofen in osteoarthritis of the knee”, *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 2, p. 61–69, 1994.
- [58] K. Pavelká, J. Gatterová, M. Olejarová, S. Machacek, G. Giacobelli, L. C. Rovati, “Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study”, *Archives of Internal Medicine*, vol. 162, p. 2113–2123, 2002.
- [59] B. Avouac, “Slow Acting Drugs in osteoarthritis: a step towards disease modification”, *Revista Española de Reumatología*, vol. 20, p. 221–222, 1993.
- [60] H. Y. Bassleer, C. P. Franchimont, “In-vitro evaluation of drugs proposed as chondroprotective agents”, 1992.
- [61] I. Setnikar, R. Cereda, M. A. Pacini, L. Revel, “Antireactive properties of glucosamine sulfate”, *Arzneimittelforschung*, vol. 41, p. 157–161, 1991.
- [62] I. Setnikar, M. A. Pacini, L. Revel, “Antiarthritic effects of glucosamine sulfate studied in animal models”, *Arzneimittelforschung*, vol. 41, p. 542–545, 1991.
- [63] L. C. Rovati, I. Setnikar, A. Reichelt, W. Noack, “Glucosamine sulfate in gonarthrosis: efficacy in placebo controlled studies”, *Revista Española de Reumatología*, vol. 20, p. 72, 1993.
- [64] W. Noack, M. Fischer, K. K. Förster, L. C. Rovati, I. Setnikar, “Glucosamine sulfate in osteoarthritis of the knee”, *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 2, p. 51–59, 1994.

- [65] J. A. Silva, A. C. Apolinário, M. S. R. Souza, B. Damasceno, A. C. D. Medeiros, “Cutaneous Administration of Drugs: Challenges and Strategies for the Development of Trans-dermal Formulations”, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 31, p. 125–131, 2010.
- [66] S. Persiani, R. Rotini, G. Trisolino, L.C. Rovati, M. Locatelli, D. Paganini, D. Antonioli, A. Roda, “Synovial and plasma glucosamine concentrations in osteoarthritic patients following oral crystalline glucosamine sulphate at therapeutic dose”, *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 15, p. 764–772, 2007.
- [67] S. Persiani, E. Roda, L. C. Rovati, M. Locatelli, G. Giacobelli, A. Roda, “Glucosamine oral bioavailability and plasma pharmacokinetics after increasing doses of crystalline glucosamine sulfate in man”, *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 13, p. 1041–1049, 2005.
- [68] T. S. Barclay, C. Tsourounis, G. M. McCart, “Glucosamine”, *Annals of Pharmacotherapy*, vol. 32, p. 574–579, 1998.
- [69] I. Setnikar, L. C. Rovati, “Absorption, distribution, metabolism and excretion of glucosamine sulfate”, *Arzneimittelforschung*, vol. 51, p. 699–725, 2001.
- [70] C. W. Lee, Z. Li, K. Patel, J. O. Olobo, E. J. D. Lee, L. B. Goh, “The Transdermal Profiles of Mediflex™ Glucosamine Cream in Mouse and Man”, *National Congress of Indonesian Society of Rheumatology*, 2005.
- [71] M. Kong, K.B. Hashim, P. Lin, G. Coestesquis, A. Xu, F. Lebes, C.M. Ting, “Penetration of topical glucosamine sulfate into the synovial fluid of patients with knee osteoarthritis: a nonrandomized, open-label, single dose, bioavailability study”, *Journal of biosciences and medicines*, vol. 7, p. 76, 2019.
- [72] C. B. S. Leite, J. M. Coelho, L. A. Muehlmann, R. B. de Azevedo, M. H. Sousa, “Skin Delivery of Glucosamine and Chondroitin Sulphates—A Perspective on the Conservative Treatment for Osteoarthritis of the Knee”, *Journal of biosciences and medicines*, vol. 5, p. 11–20, 2017.
- [73] A. L. Almada, P. W. Harvey, K. J. Platt, “Effect of chronic oral glucosamine sulfate upon fasting insulin resistance index (FIRI) in nondiabetic individuals”, *Federation of American Societies for Experimental Biology*, p. 750–750, 2000.
- [74] A. J. Tannis, J. Barban, J. A. Conquer, “Effect of glucosamine supplementation on fasting and non-fasting plasma glucose and serum insulin concentrations in healthy individuals”, *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 12, p. 506–511, 2004.
- [75] D. L. Bissett, “Glucosamine: an ingredient with skin and other benefits”, *Journal of Cosmetic Dermatology*, vol. 5, p. 309–315, 2006.
- [76] N. Volpi, “Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 96, p. 3168–3180, 2007.
- [77] M. Bishnoi, A. Jain, P. Hurkat, S. K. Jain, “Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis,” *Glycoconjugate Journal*, vol. 33, p. 693–705, 2016.
- [78] J. Martel-Pelletier, A. Farran, E. Montell, J. Vergés, J.-P. Pelletier, “Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate”, *Molecules*, vol. 20, p. 4277–4289, 2015.

- [79] J.P. Bali, H. Cousse, E. Neuzil, "Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system," in *Seminars in arthritis and rheumatism*, Elsevier, 2001, pp. 58–68.
- [80] R. Y. Au, P. V Phan, A. Y. Au, C. G. Frondoza, "Effect of different chondroitin sulfate raw materials on pro-inflammatory gene expression in chondrocytes and monocytes", *Proceedings of the 6th Symposium of ICRSI*, 2006.
- [81] S. Y. Cho, J.S. Sim, C.S. Jeong, S.Y. Chang, D.W. Choi, T. Toida, Y.S. Kim, "Effects of low molecular weight chondroitin sulfate on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 27, p. 47–51, 2004.
- [82] F. Ronca, L. Palmieri, P. Panicucci, G. Ronca, "Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 6, p. 14–21, 1998.
- [83] J.Y. L. Reginster, "CONCEPT provides robust evidence that chondroitin sulfate is superior to placebo and similar to celecoxib in the symptomatic management of osteoarthritis", *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 77, p. 11–11, 2018.
- [84] J.P. Pelletier, J.P. Raynauld, A.D. Beaulieu, L. Bessette, F. Morin, A.J. de Brum-Fernandes, P. Delorme, M. Dorais, P. Paiement, F. Abram, J. Martel-Pelletier, "Chondroitin sulfate efficacy versus celecoxib on knee osteoarthritis structural changes using magnetic resonance imaging: a 2-year multicentre exploratory study", *Arthritis Research & Therapy*, vol. 18, p. 1–12, 2016.
- [85] O. F. Restaino, R. Finamore, A. Stellavato, P. Diana, E. Bedini, M. Trifuoggi, M. De Rosa, C. Schiraldi, "European chondroitin sulfate and glucosamine food supplements: a systematic quality and quantity assessment compared to pharmaceuticals", *Carbohydrate Polymers* vol. 222, p. 114984, 2019.
- [86] A. O. Adebawale, D. S. Cox, Z. Liang, N. D. Eddington, "Analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in marketed products and the Caco-2 permeability of chondroitin sulfate raw materials", *Journal of the American Nutraceutical Association*, vol. 3, p. 37–44, 2000.
- [87] L.K. Pei, B.L. Guo, "A review on research of raw material and cut crude drug of *Herba epimedii* in last ten years", *China journal of Chinese materia medica*, vol. 32, p. 466–471, 2007.
- [88] R. Liu, A. Li, A. Sun, J. Cui, L. Kong, "Preparative isolation and purification of three flavonoids from the Chinese medicinal plant *Epimedium koreanum* Nakai by high-speed counter-current chromatography", *Journal of Chromatography A*, vol. 1064, p. 53–57, 2005.
- [89] Y. Wang, Z. Guo, Y. Jin, X. Zhang, L. Wang, X. Xue, X. Liang, "Identification of prenyl flavonoid glycosides and phenolic acids in *Epimedium koreanum* Nakai by Q-TOF-MS combined with selective enrichment on 'click oligo (ethylene glycol)' column," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 51, p. 606–616, 2010.
- [90] S. C. W. Sze, Y. Tong, T. B. Ng, C. L. Y. Cheng, H. P. Cheung, "Herba *Epimedii*: anti-oxidative properties and its medical implications," *Molecules*, vol. 15, p. 7861–7870, 2010.
- [91] Z. Wang, Y. Lou, "Proliferation-stimulating effects of icaritin and desmethylcaritin in MCF-7 cells", *European Journal of Pharmacology*, vol. 504, p. 147–153, 2004.

- [92] X. Zhang, T. Liu, Y. Huang, D. Wismeijer, Y. Liu, “Icariin: does it have an osteoinductive potential for bone tissue engineering?”, *Phytotherapy Research*, vol. 28, p. 498–509, 2014.
- [93] Y. Pan, L. Kong, X. Xia, W. Zhang, Z. Xia, F. Jiang, “Antidepressant-like effect of icariin and its possible mechanism in mice”, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 82, p. 686–694, 2005.
- [94] Y.Q. Liu, X.F. Han, T. Liu, M.-C. Cheng, H.-B. Xiao, “A cell-based model of bone remodeling for identifying activity of icariin in the treatment of osteoporosis”, *Biotechnology Letters*, vol. 37, p. 219–226, 2015.
- [95] W. Jiang, K. Ding, R. Yue, M. Lei, “Therapeutic effects of icariin and icariside II on diabetes mellitus and its complications”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p. 1–26, 2022.
- [96] L. Zhang, X. Zhang, K.F. Li, D.X. Li, Y.M. Xiao, Y.J. Fan, X.D. Zhang, “Icariin promotes extracellular matrix synthesis and gene expression of chondrocytes in vitro”, *Phytotherapy Research*, vol. 26, p. 1385–1392, 2012.
- [97] Z. C. Wang, H. J. Sun, K. H. Li, C. Fu, M. Z. Liu, “Icariin promotes directed chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells but not hypertrophy in vitro”, *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 8, p. 1528–1534, 2014.
- [98] D. Li, T. Yuan, X. Zhang, Y. Xiao, R. Wang, Y. Fan, “Icariin: a potential promoting compound for cartilage tissue engineering”, *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 20, p. 1647–1656, 2012.
- [99] P. Sun, Y. Liu, X. Deng, C. Yu, N. Dai, X. Yuan, L. Chen, S. Yu, W. Si, X. Wang, D. Wu, S. Liu, H. Pang, “An inhibitor of cathepsin K, icariin suppresses cartilage and bone degradation in mice of collagen-induced arthritis”, *Phytomedicine*, vol. 20, p. 975–979, 2013.
- [100] Y.J. Liu, W. Feng, D.Y. He, Q.Q. Wang, “Effect of icariin on bone destruction and serum RANKL/OPG levels in type II collagen-induced arthritis rats”, *China journal of Chinese materia medica*, vol. 33, p. 1221–1225, 2013.
- [101] C. Chao Wei, Q. Dai Ping, F. Tian You, C. Yong Qiang, C. Tao, “Icariin prevents cartilage and bone degradation in experimental models of arthritis”, *Mediators of Inflammation*, vol. 2016, 2016.
- [102] L. Kong, J. Liu, J. Wang, Q. Luo, H. Zhang, B. Liu, F. Xu, Q. Pang, Y. Liu, J. Dong, “Icariin inhibits TNF- α /IFN- γ induced inflammatory response via inhibition of the substance P and p38-MAPK signaling pathway in human keratinocytes”, *International Immunopharmacology*, vol. 29, p. 401–407, 2015.
- [103] J. Zhao, S. Ohba, Y. Komiyama, M. Shinkai, U. Chung, T. Nagamune, “Icariin: a potential osteoinductive compound for bone tissue engineering”, *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, p. 233–243, 2010.
- [104] A.M. Malfait, R. J. Miller, “Emerging targets for the management of osteoarthritis pain,” *Current Osteoporosis Reports*, vol. 14, p. 260–268, 2016.
- [105] S. A. Armstrong, M. J. Herr, “Physiology, nociception”, *StatPearls*, 2019.
- [106] A. E. Dubin, A. Patapoutian, “Nociceptors: the sensors of the pain pathway”, *Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, p. 3760–3772, 2010.

- [107] M. Nazıroglu, “TRPV1 channel: a potential drug target for treating epilepsy”, *Current Neuropharmacology*, vol. 13, p. 239–247, 2015.
- [108] F. Yang, J. Zheng, “Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin”, *Protein Cell*, vol. 8, p. 169–177, 2017.
- [109] M. Del Fiacco, M. Quartu, M. Boi, M.P. Serra, T. Melis, R. Boccaletti, E. Shevel, C. Cianchetti, “TRPV1, CGRP and SP in scalp arteries of patients suffering from chronic migraine”, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 86, p. 393–397, 2015.
- [110] P. G. Hogan, H. Li, “Calcineurin”, *Current Biology*, vol. 15, p. R442–R443, 2005.
- [111] P. Siudem, K. Paradowska, “Budowa, funkcja oraz mechanizm działania receptora waniloidowego TRPV1”, *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, vol. 74, p. 481–488, 2020.
- [112] M. D. Jhaveri, S. J. R. Elmes, D. A. Kendall, V. Chapman, “Inhibition of peripheral vanilloid TRPV1 receptors reduces noxious heat-evoked responses of dorsal horn neurons in naïve, carrageenan-inflamed and neuropathic rats”, *European Journal of Neuroscience*, vol. 22, p. 361–370, 2005.
- [113] A. Szallasi, M. J. Gunthorpe, “Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms”, *Current Pharmaceutical Design*, vol. 14, p. 32–41, 2008.
- [114] M. Tominaga, M. J. Caterina, “Thermosensation and pain”, *Journal of Neurobiology*, vol. 61, p. 3–12, 2004.
- [115] I. Kojima, M. Nagasawa, “Trpv2”, *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*: vol. 1, p. 247–272, 2014.
- [116] M. M. Diver, J. V Lin King, D. Julius, Y. Cheng, “Sensory TRP channels in three dimensions”, *Annual Review of Biochemistry*, vol. 91, p. 629–649, 2022.
- [117] D. Souza Monteiro de Araujo, R. Nassini, P. Geppetti, F. De Logu, “TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain”, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 24, p. 997–1008, 2020.
- [118] R. J. Schepers, M. Ringkamp, “Thermoreceptors and thermosensitive afferents”, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 34, p. 177–184, 2010.
- [119] Z. Li, Y. Gan, T. Kang, Y. Zhao, T. Huang, Y. Chen, J. Liu, B. Ke “Camphor Attenuates Hyperalgesia in Neuropathic Pain Models in Mice”, *Journal of Pain Research*, vol.16, p. 785–795, 2023.
- [120] B. Liu, L. Fan, S. Balakrishna, A. Sui, J. B. Morris, S.E. Jordt, “TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain”, *Pain*, vol. 154, p. 2169–2177, 2013.
- [121] A. Binder, M. Stengel, O. Klebe, G. Wasner, R. Baron, “Topical high-concentration (40%) menthol—somatosensory profile of a human surrogate pain model,” *The Journal of Pain*, vol. 12, p. 764–773, 2011.
- [122] M. A. Cliff, B. G. Green, “Sensory irritation and coolness produced by menthol: evidence for selective desensitization of irritation”, *Physiology, behavior, and conservation*, vol. 56, p. 1021–1029, 1994.

- [123] O. M. E. Abdel-Salam, G. Mózsik, “Capsaicin, the vanilloid receptor TRPV1 agonist in neuroprotection: mechanisms involved and significance”, *Oxidative stress and neurotoxicity*, vol. 48, p. 3296–3315, 2023.
- [124] P. Anand, K. Bley, “Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch”, *British Journal of Anaesthesia*, vol. 107, p. 490–502, 2011.
- [125] Y. Oka, K. Takahashi, T. Ohta, “The effects of vanilloid analogues structurally related to capsaicin on the transient receptor potential vanilloid 1 channel”, *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 30, p. 101243, 2022.
- [126] S. S. Bharate, S. B. Bharate, “Modulation of thermoreceptor TRPM8 by cooling compounds”, *ACS Chemical Neuroscience Journal*, vol. 3, p. 248–267, 2012.
- [127] U. Jacobi, M. Kaiser, W. Sterry, J. Lademann, “Kinetics of blood flow after topical application of benzyl nicotinate on different anatomic sites”, *Archives of Dermatological Research*, vol. 298, p. 291–300, 2006,
- [128] M. Šentjerc, J. Kristl, Z. Abramović, “17 - Transport of Liposome-Entrapped Substances into Skin as Measured by Electron Paramagnetic Resonance Oximetry In Vivo”, *Liposomes, Part D*, vol. 387, p. 267–287, 2004.
- [129] C. Lee, C. Chen, “Role of proprioceptors in chronic musculoskeletal pain”, *Experimental Physiology*, vol. 109, p. 45-54, 2023.
- [130] Strona internetowa Paarlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej, “Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) NR 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych”, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF>, (dostęp online: 17.10.2023).
- [131] S. S. Ghori, M. I. Ahmed, M. Arifuddin, M. S. Khateeb, “Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of formulation containing camphor, menthol and thymol”, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 8, p. 271–274, 2016.
- [132] W. Markiewicz, “Hakorośl rozesłana i kadzidłowiec indyjski-mało znane rośliny występujące w preparatach weterynaryjnych”, *Życie Weterynaryjne*, vol. 96, 2021.
- [133] Z. Maksimović, S. Samardžić, “Chapter Herbal Medicinal Products in the Treatment of Osteoarthritis”, 2019.
- [134] Z. Maksimović, S. Samardžić, “Herbal medicinal products in the treatment of osteoarthritis”, *Biomarkers for Osteoarthritis Diseases*, p. 1–18, 2018.
- [135] M. Cameron, S. Chrubasik, C. M. Group, “Topical herbal therapies for treating osteoarthritis”, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2013, 1996.
- [136] G. K. Menon, A. M. Kligman, “Barrier functions of human skin: a holistic view”, *Skin Pharmacology and Physiology*, vol. 22, p. 178–189, 2009.
- [137] G. Honari, “Skin structure and function”, *Sensitive skin syndrome*, CRC Press, p. 16–22, 2017.
- [138] A. Baroni, E. Buommino, V. De Gregorio, E. Ruocco, V. Ruocco, R. Wolf, “Structure and function of the epidermis related to barrier properties”, *Clinics in Dermatology*, vol. 30, p. 257–262, 2012.
- [139] M. Sznitowska, “Polarna droga dyfuzji leku przez skórę-dowody na istnienie i próba charakterystyki”, *Akademia Medyczna*, 1996,.

- [140] A. Thibodeau, S. Amari, "Maintenance and Repair of the Hydrolipidic Film with Skin Molecular Mimetic Emollients and Surfactants", *Laporan Penelitian, Cosmetics Science Technology B&T Company, Italy*, vol. 5, 2009.
- [141] C. De Luca, G. Valacchi, "Surface lipids as multifunctional mediators of skin responses to environmental stimuli", *Mediators of Inflammation*, vol. 2010, 2010.
- [142] E. Haahti, E. C. Horning, "Isolation and characterization of saturated and unsaturated fatty acids and alcohols of human skin surface lipids", *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, vol. 15, p. 73–78, 1963.
- [143] E. H. Epstein Jr, N. H. Munderloh, "Human skin collagen. Presence of type I and type III at all levels of the dermis", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 253, p. 1336–1337, 1978.
- [144] E. Małek, "Charakterystyka budowy i funkcji skóry oraz włosów" Instytut Technologii Eksploatacji – Państwowy Instytut Badawczy, 2007.
- [145] V. Couturaud, "Biophysical characteristics of the skin in relation to race, sex, age, and site", *Handbook of Cosmetic Science and Technology*, p. 5–24, 2009.
- [146] H. Schaefer, W. Schalla, A. Zesch, G. Stüttgen, *Skin permeability*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [147] M. R. Prausnitz, R. Langer, "Transdermal drug delivery", *Nat Biotechnol*, vol. 26, p. 1261–1268, 2008.
- [148] N. G. G. Hua, L. Y. Ming, J. Obaje, "A transdermal glucosamine formulation improves osteoarthritic symptoms in an open clinical survey", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, p. 80, 2011.
- [149] T. Tanner, R. Marks, "Delivering drugs by the transdermal route: review and comment", *Skin Research and Technology*, vol. 14, p. 249–260, 2008.
- [150] M. Karolak, A. Tyburski, J. Krysiński, "Promotory wchłaniania–substancje wpływające na przenikanie leków przez skórę", *Farmacja Polska*, vol. 73, 2017.
- [151] W. Czerwonka, D. Puchalska, M. Lipińska, A. Habrat, "Mechanizmy i metody przenikania substancji czynnych przez barierę lipidową skóry", *Kosmetologia Estetyczna*, vol. 7, p. 667–671, 2018.
- [152] H. Trommer, R. H. H. Neubert, "Absorption Enhancers", *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology*, p. 1–17, 2013.
- [153] M. Pośniak, M. Galwas, "Ocena narażenia dermalnego", *Bezpieczeństwo Pracy: nauka i praktyka*, p. 14–17, 2007.
- [154] W. Czerwonka, D. Puchalska, M. Lipińska, A. Habrat, "Mechanizmy i metody przenikania substancji czynnych przez barierę lipidową skóry", *Kosmetologia Estetyczna*, vol. 7, p. 667–671, 2018.
- [155] H. A. E. Benson, "Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques," *Current Drug Delivery*, vol. 2, p. 23–33, 2005.
- [156] R. O. Potts, R. H. Guy, "Predicting skin permeability", *Pharmaceutical Research*, vol. 9, p. 663–669, 1992.
- [157] B. Godin E. Touitou, "Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 59, p. 1152–1161, 2007.

- [158] C. Alonso, V. Carrer, S. Espinosa, M. Zanuy, M. Córdoba, B. Vidal, M. Domínguez, N. Godessart, L. Coderch, M. Pont, “Prediction of the skin permeability of topical drugs using in silico and in vitro models,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 136, p. 104945, 2019.
- [159] G. Lian, L. Chen, L. Han, “An evaluation of mathematical models for predicting skin permeability,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, p. 584–598, 2008.
- [160] S. Grégoire, C. Ribaud, F. Benech, J. R. Meunier, A. Garrigues-Mazert, R. H. Guy, “Prediction of chemical absorption into and through the skin from cosmetic and dermatological formulations,” *British Journal of Dermatology*, vol. 160, p. 80–91, 2009.
- [161] H. Kouzuki, F. Yamashita, H. Itagaki, M. Hashida, “Prediction of human skin permeability of chemicals in various vehicles using artificial neural network,” 5th World Congress on Alternative and Animal Use in the Life Sciences, p. 276, 2005.
- [162] J. W. Wiechers, C. L. Kelly, T. G. Blease, J. C. Dederen, “Formulating for efficacy 1,” *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 26, p. 173–182, 2004.
- [163] J. E. Riviere, J. D. Brooks, “Predicting skin permeability from complex chemical mixtures,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 208, p. 99–110, 2005.
- [164] T. Kosicki, “Zakaz testowania produktów kosmetycznych na zwierzętach. Uwagi na tle rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z 30 listopada 2009 roku”, *Studia z Zakresu Nauk Prawnoustrojowych*. vol. 4, p. 67–75, 2014.
- [165] S.F. Ng, J. J. Rouse, F. D. Sanderson, V. Meidan, G. M. Eccleston, “Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies”, *AAPS PharmSciTech*, vol. 11, p. 1432–1441, 2010.
- [166] G. Singhvi, M. Singh, “In-vitro drug release characterization models”, *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, vol. 2, p. 77–84, 2011.
- [167] M. P. Paarakh, P. A. Jose, C. M. Setty, G. V Peterchristoper, “Release kinetics—concepts and applications,” *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, vol. 8, p. 12–20, 2018.
- [168] K. A. Walters, A. C. Watkinson, K. R. Brain, “In vitro skin permeation evaluation: the only realistic option”, *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 20, p. 307–316, 1998.
- [169] E. C. Jung, H. I. Maibach, “Animal models for percutaneous absorption”, *Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration*, p. 21–40, 2014.
- [170] M. Niczyporuk, “Rat skin as an experimental model in medicine,” *Progress in Health Sciences*, vol. 8, p. 223–228, 2018.
- [171] R. J. Seeley, O. A. MacDougald, “Mice as experimental models for human physiology: when several degrees in housing temperature matter”, *Nature Metabolism*, vol. 3, p. 443–445, 2021.
- [172] A. M. Barbero, H. F. Frasch, “Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review”, *Toxicology in vitro*, vol. 23, p. 1–13, 2009.

- [173] R. Neupane, S. H. S. Boddu, R. J. Jwala, "Alternatives to biological skin in permeation studies: current trends and possibilities", *Pharmaceutics* vol. 12, p. 152, 2020.
- [174] F. Netzlaff, C.M. Lehr, P. W. Wertz, U. F. Schaefer, "The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 60, p. 167–178, 2005.
- [175] K. Gojniczek, A. Garnarczyk, A. Pytel, "Hodowle komórek in vitro w kosmetologii", *Wiadomości Lekarskie*, p. 1–2, 2005.
- [176] C. Herkenne, A. Naik, Y. N. Kalia, J. Hadgraft, R. H. Guy, "Ibuprofen transport into and through skin from topical formulations: in vitro–in vivo comparison", *Journal of investigative dermatology*, vol. 127, p. 135–142, 2007.
- [177] A. D. Woolfson, D. F. McCafferty, K. E. McGowan, "Percutaneous penetration characteristics of amethocaine through porcine and human skin," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 78, p. 209–216, 1992.
- [178] T. G. OECD, "428: Skin absorption: in vitro Method," *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section, vol. 4, 2004.
- [179] J. Arct, A. Eysymont, "Metody oceny inter- i transepidermnej dostępności substancji czynnych"
- [180] M. Malinowska, E. Sikora, J. Ogonowski, "Transport przeznaskórkowy aktywnych składników kosmetycznych", *Wiadomości chemiczne*, vol. 67, p. 321–344, 2013.
- [181] G. L. Flynn, E. W. Smith, "Membrane diffusion I: Design and testing of a new multifeatured diffusion cell", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 60, p. 1713–1717, 1971.
- [182] R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, E. R. Congdon, "Methods for in vitro percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin", *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 62, p. 481–488, 1982.
- [183] R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, "Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 74, p. 64–67, 1985.
- [184] S. W. Collier, N. M. Sheikh, A. Sakr, J. L. Lichtin, R. F. Stewart, R. L. Bronaugh, "Maintenance of skin viability during in vitro percutaneous absorption/metabolism studies", *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 99, p. 522–533, 1989.
- [185] R. L. Bronaugh, "In vitro percutaneous absorption models," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 919, p. 188–191, 2000.
- [186] M. Wiater, D. Hoc, J. Paszkowska, G. Garbacz, "Hydrodynamika i naprężenia mechaniczne działające na postać leku w farmakopealnym i niekompendialnym badaniu uwalniania," *Farmacja Polska*, vol. 76, p. 210–221, 2020.
- [187] M. Piechota-Urbańska, "Zastosowanie ekstraktu z mącznicy lekarskiej w recepturze hydrożeli dermatologicznych wytworzonych na bazie carbopoli", *Polimery w medycynie*, vol. 40, p. 11-18, 2010.

- [188] M. Piechota-Urbańska, A. Berner-Strzelczyk, “Zastosowanie glikolowych wyciągów roślinnych w recepturze hydrożeli o działaniu wybielającym podawanych na skórę,” *Polymers in Medicine*, vol. 41, p. 17-25, 2011.
- [189] B. Sinkó, T.M. Garrigues, G.T. Balogh, Z.K. Nagy, O.Tsinman, A.Avdeef, K.Takács-Novák, “Skin–PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 45, p. 698–707, 2012.
- [190] B. D. Markovic, S. M. Vladimirov, O. A. Cudina, J. V Odovic, K. D. Karljikovic-Rajic, “A PAMPA assay as fast predictive model of passive human skin permeability of new synthesized corticosteroid C-21 esters”, *Molecules*, vol. 17, p. 480–491, 2012.
- [191] E. M. Renkin, “Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes,” *J Gen Physiol*, vol. 38, p. 225, 1954.
- [192] H. Durrheim, G. L. Flynn, W. I. Higuchi, C. R. Behl, “Permeation of hairless mouse skin I: Experimental methods and comparison with human epidermal permeation by alkanols”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 69, p. 781–786, 1980.
- [193] A. P. Funke, R. Schiller, H. W. Motzkus, C. Günther, R. H. Müller, R. Lipp, “Transdermal delivery of highly lipophilic drugs: in vitro fluxes of antiestrogens, permeation enhancers, and solvents from liquid formulations”, *Pharmaceutical Research*, vol. 19, p. 661–668, 2002.
- [194] J. D. Bos, M. M. H. M. Meinardi, “The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs”, *Experimental Dermatology: Viewpoint*, vol. 9, p. 165–169, 2000.
- [195] C. A. Phillips, B. B. Michniak, “Transdermal delivery of drugs with differing lipophilicities using azone analogs as dermal penetration enhancers”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 84, p. 1427–1433, 1995.
- [196] C. T. Jafvert, P. P. Kulkarni, “Buckminsterfullerene’s (C60) octanol– water partition coefficient (K_{ow}) and aqueous solubility,” *Environ Sci Technol*, vol. 42, p. 5945–5950, 2008.
- [197] K. Moser, K. Kriwet, A. Naik, Y. N. Kalia, R. H. Guy, “Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro”, *European journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 52, p. 103–112, 2001.
- [198] A. Jankowski, R. Dyja, B. Sarecka-Hujar, “Dermal and transdermal delivery of active substances from semisolid bases”, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 79, p. 488–500, 2017.
- [199] J. Ziegenmeyer, C. Fuehrer, “Microemulsions as a topical drug form”, *Acta pharmaceutica technologica*, vol. 26, p. 273–275, 1980.
- [200] H. Ishii, H. Todo, A. Terao, T. Hasegawa, M. Akimoto, K. Oshima, K. Sugibayashi, “Why does a hydrophilic drug permeate skin, although it is not soluble in white petrolatum?” *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 35, p. 1356–1363, 2009.
- [201] A. M. El Gendy, H. W. Jun, A. A. Kassem, “In vitro release studies of flurbiprofen from different topical formulations” *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 28, p. 823–831, 2002.

- [202] S. M. Maru, L. W. Gathu, A. W. Mathenge, A. O. Okaru, F. N. Kamau, H. K. Chepkwony, "In vitro drug release studies of metronidazole topical formulations through cellulose membrane", *East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 15, p. 57–62, 2012.
- [203] S. Janicki, A. Fiebig, M. Sznitowska, "Farmacja stosowana: podręcznik dla studentów farmacji", Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2006.
- [204] K. H. Bauer, K.H. Frömming, C. Führer, "Technologia postaci leku z elementami biofarmacji", *MedPharm Polska*, 2012.
- [205] A. Kováčik, M. Kopečná, K. Vávrová, "Permeation enhancers in transdermal drug delivery: Benefits and limitations", *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 17, p. 145–155, 2020.
- [206] M. E. Lane, "Skin penetration enhancers," *International Journal of, Pharmaceutics* vol. 447, p. 12–21, 2013.
- [207] K. Sugibayashi, S. Nakayama, T. Seki, K. Hosoya, Y. Morimoto, "Mechanism of skin penetration-enhancing effect by laurocapram", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 81, p. 58–64, 1992.
- [208] E. Limpongsa, N. Jaipakdee, T. Pongjanyakul, "Skin deposition and permeation of finasteride in vitro: effects of propylene glycol, ethanol and sodium lauryl sulfate," *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 20, p. 984–991, 2015.
- [209] S. Amin, K. Kohli, R. K. Khar, S. R. Mir, K. K. Pillai, "Mechanism of in vitro percutaneous absorption enhancement of carvedilol by penetration enhancers", *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 13, p. 533–539, 2008.
- [210] A. C. Allenby, J. Fletcher, C. Schock, T. F. S. Tees, "The effect of heat, pH and organic solvents on the electrical impedance and permeability of excised human skin", *British journal of dermatology*, vol. 81, p. 31–39, 1969.
- [211] K. Abrams, J.D. Harvell, D. Shriner, P. Wertz, H. Maibach, H.I. Maibach, S.J. Rehfeld, "Effect of Organic Solvents on In Vitro Human Skin Water Barrier Function", *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 101, p. 609–613, 1993.
- [212] M. Karolak, A. Tyburski, J. Krysiński, "Promotory wchłaniania–substancje wpływające na przenikanie leków przez skórę", *Farmacja Polska*, vol. 73, 2017.
- [213] H. L. Hood, M. E. K. Kraeling, M. G. Robl, R. L. Bronaugh, "The Effects of an Alpha Hydroxy Acid (Glycolic Acid) on Hairless Guinea Pig Skin Permeability", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 37, p. 1105–1111, 1999.
- [214] P.W. Hsieh, S. A. Al-Suwayeh, C.L. Fang, C.F. Lin, C.C. Chen, J.Y. Fang, "The co-drug of conjugated hydroquinone and azelaic acid to enhance topical skin targeting and decrease penetration through the skin", *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol. 81, p. 369–378, 2012.
- [215] P. Sebastiani, S. Nicoli, P. Santi, "Effect of lactic acid and iontophoresis on drug permeation across rabbit ear skin", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 292, p. 119–126, 2005.
- [216] I. Som, K. Bhatia, M. Yasir, "Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery," *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, vol. 4, p. 2–9, 2012.

- [217] U. Schmalfuss, R. Neubert, W. Wohlrab, "Modification of drug penetration into human skin using microemulsions", *Journal of controlled release*, vol. 46, p. 279–285, 1997.
- [218] P. Karande, S. Mitragotri, "Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals", *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, vol. 1788, p. 2362–2373, 2009.
- [219] M. H. Abraham, H. S. Chadha, R. C. Mitchell, "The factors that influence skin penetration of solutes", *Journal of pharmacy and pharmacology*, vol. 47, p. 8–16, 1995.
- [220] H. Marwah, T. Garg, A. K. Goyal, G. Rath, "Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery", *Drug Delivery*, vol. 23, p. 564–578, 2016.
- [221] F. F. Larese, F. D'Agostin, M. Crosera, G. Adami, N. Renzi, M. Bovenzi, G. Maina, "Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin", *Toxicology*, vol. 255, p. 33–37, 2009.
- [222] E. Estrada, E. Uriarte, Y. Gutierrez, H. Gonzalez, "Quantitative structure-toxicity relationships using TOPS-MODE. 3. Structural factors influencing the permeability of commercial solvents through living human skin", *SAR QSAR Environmental Research*, vol. 14, p. 145–163, 2003.
- [223] J. Ziegenmeyer, C. Fuehrer, "Microemulsions as a topical drug form", *Acta pharmaceutica technologica*, vol. 26, p. 273–275, 1980.
- [224] H. Ishii, H. Todo, A. Terao, T. Hasegawa, M. Akimoto, K. Oshima, K. Sugibayashi, "Why does a hydrophilic drug permeate skin, although it is not soluble in white petrolatum?", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 35, p. 1356–1363, 2009.
- [225] A. Olejnik, J. Goscińska, I. Nowak, "Active compounds release from semisolid dosage forms," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 101, p. 4032–4045, 2012.
- [226] C. M. Schoellhammer, D. Blankschtein, R. Langer, "Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects", *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 11, p. 393–407, 2014.
- [227] N. Golda, J. Koo, H. I. Maibach, "Effects and uses of occlusion on human skin: an overview", *Cutan Ocul Toxicol*, vol. 24, p. 91–104, 2005.
- [228] T. Wolski B. Kędzia, "Farmakoterapia skóry. Cz. 2. Przenikanie substancji przez skórę", *Postępy fitoterapii*, vol. 2, p. 154-158, 2019.
- [229] H. Kim, J.T. Kim, S. Barua, S.Y. Yoo, S.C. Hong, K.B. Lee, J. Lee, "Seeking better topical delivery technologies of moisturizing agents for enhanced skin moisturization", *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 15, p. 17–31, 2018.
- [230] K. Cal, J. Stefanowska, "Metody zwiększania przenikania substancji leczniczych przez skórę," *Farmacja Polska*, vol. 66, p. 514–520, 2010.
- [231] H. Zhai, H. I. Maibach, "Skin occlusion and irritant and allergic contact dermatitis: an overview", *Contact Dermatitis: Review Article*, vol. 44, p. 201–206, 2001.
- [232] T. Wolski, "Przenikanie substancji przez skórę", *Postępy fitoterapii*, vol. 2, p. 154-158, 2019.
- [233] K. Cal, "Across skin barrier; known methods, new performances", *Frontiers in Drug Design and Discovery*, vol. 4, p. 162–188, 2009.

- [234] R. Rao, S. Nanda, "Sonophoresis: recent advancements and future trends," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 61, p. 689–705, 2009.
- [235] A. Azagury, L. Khoury, G. Enden, J. Kost, "Ultrasound mediated transdermal drug delivery", *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 72, p. 127–143, 2014.
- [236] M. Kotulska, "Electro-nanopores in the lipid membrane and their application in medicine", *Polska Akademia Nauk. Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej*, 2007.
- [237] A. K. Nayak, M. S. Hasnain, T. M. Aminabhavi, V. P. Torchilin, "Nanovesicular systems in drug delivery", in *Systems of Nanovesicular Drug Delivery*", Elsevier, p. 1–15, 2022.
- [238] T. Rattanapak, K. Young, T. Rades, S. Hook, "Comparative study of liposomes, transfersomes, ethosomes and cubosomes for transcutaneous immunisation: characterisation and in vitro skin penetration," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 64, p. 1560–1569, 2012.
- [239] K. Morteza-Semnani, M.Saeedi, J. Akbari, M. Moazeni, A. Babaei, R. Negarandeh, M. Azizi, M. Eghbali, S. Mohammad H. Hashemi, "Preparation and In-Vitro Evaluation of Ketoconazole-Loaded Niosome (Ketosome) for Drug Delivery to Cutaneous Candidiasis", *Pharmaceutical Sciences*, vol. 29, p. 208–218, 2023.
- [240] S. N. Kale, S. L. Deore, "Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review", *Systematic Reviews in Pharmacy*, vol. 8, p. 39, 2017.
- [241] W. D. Bancroft, "The theory of emulsification, VI", *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 19, p. 275–309, 2002.
- [242] F. Adams, A.S. Kabalnov, D.N. Petsev, T. Obey, B. Vincent, *Modern aspects of emulsion science*. Royal Society of Chemistry, 2007.
- [243] W. C. Griffin, "Calculation of HLB values of non-ionic surfactants", *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, vol. 5, p. 249–256, 1954.
- [244] A. Gupta, H. B. Eral, T. A. Hatton, P. S. Doyle, "Nanoemulsions: formation, properties and applications", *Soft Matter*, vol. 12, p. 2826–2841, 2016.
- [245] J. Arct, K. Pytkowska, "Emulsje kosmetyczne", *Wiadomości Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego*, vol. 3, p. 12–16, 2000.
- [246] F. Ravera, K. Dziza, E. Santini, L. Cristofolini, L. Liggieri, "Emulsification and emulsion stability: The role of the interfacial properties", *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 288, p. 102344, 2021.
- [247] B. Neckebroek, A. Van Loey, M. Hendrickx, "Emulsifying and emulsion stabilizing potential of extracted pectin from different plant origin in relation to specific structural characteristics", *Food Research International*, vol. 141, p. 1-11, 2021.
- [248] M. Przybylski, "Stabilność kosmetyku", *Świat Przemysłu Kosmetycznego*, vol. 4, p. 34–37, 2019.
- [249] D. J. McClements, J. N. Coupland, "Theory of droplet size distribution measurements in emulsions using ultrasonic spectroscopy", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 117, p. 161–170, 1996.
- [250] E. Dłużewska, K. Leszczyński, "Wpływ ciśnienia homogenizacji na stabilność emulsji napojowych z dodatkiem skrobi modyfikowanej®," *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, vol. 15, p. 27–30, 2005.

- [251] A. Durand, R. W. Hosken, "Effects of homogenisation on the stability of a model soy food emulsion", *Chemeca Institution of Engineers*, p. 786–792, 1999.
- [252] G. Chen, D. Tao, "An experimental study of stability of oil–water emulsion," *Fuel processing technology*, vol. 86, p. 499–508, 2005.
- [253] K. Samsonowska, "Bezpieczeństwo opakowań z tworzyw sztucznych przeznaczonych na produkty kosmetyczne", *Opakowanie*, 2018.
- [254] L. Coltro, J. Borghetti, "Plastic packages for personal care products: evaluation of light barrier properties", *Polimeros*, vol. 17, p. 56–61, 2007.
- [255] J. Pluta, B. Karolewicz, "Hydrożele: właściwości i zastosowanie w technologii postaci leku. I. Charakterystyka hydrożeli", *Polymers in Medicine*, vol. 34, p. 1–31, 2004.
- [256] C. J. van Oss, "A review of "Intermolecular and Surface Forces", *Journal of dispersion science and technology*, vol. 13, p. 718–719, 1992.
- [257] K. Trickett, J. Eastoe, "Surfactant-based gels," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 144, p. 66–74, 2008.
- [258] D. Bhowmik, "Recent advances in novel topical drug delivery system", *The Pharma Innovation*, vol. 1, 2012.
- [259] S. W. Hoag, A. S. Hussain, "The impact of formulation on bioavailability: summary of workshop discussion", *The Journal of Nutrition*, vol. 131, p. 1389-1391, 2001.
- [260] E. Pesta-Dynda, A. Zielińska, J. Zagrodzka, A. Dworzyńska, "Półstałe formy leku: metody badania dostępności farmaceutycznej", *Przemysł Chemiczny*, vol. 91, p. 376–380, 2012.
- [261] A. Fiebig, J. St, M. Sznitowska, "Farmacja stosowana", PZWL, Warszawa, 2004.
- [262] D. Osborne, "Review of changes in topical drug product classification", *Pharmaceutical technology*, vol. 32, 2008.
- [263] T. W. Atkinson, M. J. Greenway, S. J. Holland, D. R. Merrifield, H. P. Scott, "The use of laser diffraction particle size analysis to predict the dispersibility of a medicament in a paraffin based ointment", *Particle Size Analysis*, The Royal Society of Chemistry, p. 143–152, 1992,.
- [264] I. N. Joanna Gościańska, Anna Ilejnok, "Analityka środków kosmetycznych", II. *Cursiva*, 2013.
- [265] U. Klaschka, "Dangerous cosmetics-criteria for classification, labelling and packaging (EC 1272/2008) applied to personal care products", *Environmental Sciences Europe*, vol. 24, p. 1–10, 2012.
- [266] A. D. Khan, M. N. Alam, "Cosmetics and their associated adverse effects: A review", *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*, p. 1–6, 2019.
- [267] A. J. Gilchrist, "Making Quality Cosmetics: Good Manufacturing Practice and ISO 22716: 2007", *Royal Society of Chemistry*, 2022.
- [268] Parlament Europejski i Rada Unii Europejskiej, "Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) NR 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych", <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF>, (dostęp online 27.04.2024):

- [269] Przewodnik po ocenie ryzyka mikrobiologicznego, „Cosmetics Microbiology Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products ISO 29621:2017”, 2017.
- [270] Norma ISO, Kosmetyki -- Mikrobiologia -- Limity mikrobiologiczne PN-EN ISO 17516:2014-11, 2017.
- [271] A. Varvaresou, S. Papageorgiou, E. Tsirivas, E. Protopapa, H. Kintziou, V. Kefala, C. Demetzos, “Self-preserving cosmetics”, *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 31, p. 163–175, 2009.
- [272] W. Siegert, “Microbiological quality management for the production of cosmetics and detergents,” *Journal-Seifen Ole Fette Wachse*, vol. 138, p. 30, 2012.
- [273] M. Russell, “Microbiological control of raw materials”, *Microbial Quality Assurance in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Toiletries*, p. 31–47, 2017.
- [274] M. G. de Freitas Araújo, T. M. Bauab, “Microbial quality of medicinal plant materials”, *Latest research into quality control*, p. 67–81, 2012.
- [275] K. Uzdrowska, M. Górską-Ponikowska, “Środki konserwujące w technologii kosmetyków”, *Kosmetologia estetyczna*, vol. 12, p. 45-50, 2023.
- [276] Norma ISO, „Kosmetyki -- Mikrobiologia -- Wykrywanie obecności *Pseudomonas aeruginosa* PN-EN ISO 22717:2016-01”, 2017.
- [277] Norma ISO, „Kosmetyki -- Mikrobiologia -- Wykrywanie obecności *Staphylococcus aureus* PN-EN ISO 22718:2016-01”, 2016.
- [278] Norma ISO, „Kosmetyki -- Mikrobiologia -- Wykrywanie obecności *Escherichia coli* PN-EN ISO 21150:2016-01”, 2016.
- [279] Norma ISO, „Kosmetyki -- Mikrobiologia -- Wykrywanie obecności *Candida albicans* PN-EN ISO 18416:2016-01”, 2016.
- [280] I. M. Michalek, S. M. John, F. L. Caetano dos Santos, “Microbiological contamination of cosmetic products—observations from Europe, 2005–2018”, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 33, p. 2151–2157, 2019.
- [281] S. E. Stewart, M. D. Parker, A. Amézquita, T. L. Pitt, “Microbiological risk assessment for personal care products”, *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 38, p. 634–645, 2016.
- [282] D. F. Spooner, “Hazards associated with the microbiological contamination of cosmetics, toiletries and non-sterile pharmaceuticals”, *Microbial Quality Assurance in Cosmetics, Toiletries and Non-Sterile Pharmaceuticals*, p. 9, 2017.
- [283] R. Baird, S. F. Bloomfield, *Microbial Quality Assurance in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Toiletries*, CRC Press, 1996.
- [284] A. C. De Groot, J. P. Nater, R. van der Lender, B. Rijcken, “Adverse effects of cosmetics and toiletries: a retrospective study in the general population”, *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 9, p. 255–259, 1987.
- [285] S. G. O. Johansson, “Zmodyfikowana terminologia alergologiczna: raport Komitetu ds. Nazewnictwa Światowej Organizacji Alergii 2003”, 2003.
- [286] O. Aerts, A. Goossens, “Contact allergy to preservatives,” *Contact Dermatitis*, p. 835–876, 2021.

- [287] D. A. Basketter, G. Briatico-Vangosa, W. Kaestner, C. Lally, W. J. Bontinck, "Nickel, cobalt and chromium in consumer products: a role in allergic contact dermatitis?", *Contact Dermatitis*, vol. 28, p. 15–25, 1993.
- [288] A. Nardelli, J. Drieghe, L. Claes, L. Boey, A. Goossens, "Fragrance allergens in 'specific' cosmetic products", *Contact Dermatitis*, vol. 64, p. 212–219, 2011.
- [289] P. Kumar, R. Paulose, "Patch testing in suspected allergic contact dermatitis to cosmetics", *Dermatology Research and Practice*, vol. 2014, 2014.
- [290] P. Romanowski, R. Schueller, "Stability testing of cosmetic products", *Handbook of cosmetic science and technology*, p. 785–796, 2001,.
- [291] L. Kirkbride, L. Humphries, P. Kozielska, H. Curtis, "Designing a Suitable Stability Protocol in the Face of a Changing Retail Landscape", *Cosmetics*, vol. 8, p. 1-8, 2021.
- [292] J. Szakiel, P. Turek, "Sensoryczna ocena jakości kosmetycznych produktów nawilżających przeznaczonych do pielęgnacji skóry rąk", *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie*, vol. 6 p. 239–252, 2018.
- [293] J. Płocica, B. Tal-Figiel, W. Figiel, "Badania reologiczne i sensoryczne stosowane do oceny preparatów kosmetycznych", *Świat Przemysłu Kosmetycznego*, vol. 17, p. 68–73, 2014.
- [294] K. Jacek, "Badanie i ocena preferencji dotyczących zapachu wybranych kosmetyków", *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie*, vol. 831, p. 17-29, 2010.
- [295] P. Romanowski, R. Schueller, "Stability testing of cosmetic products", *Handbook of cosmetic science and technology*, p. 785–796, 2001.
- [296] M.-H. Schmid-Wendtner, H. C. Korting, "The pH of the skin surface and its impact on the barrier function", *Skin Pharmacology and Physiology*, vol. 19, p. 296–302, 2006.
- [297] H. Lambers, S. Piessens, A. Bloem, H. Pronk, P. Finkel, "Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora", *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 28, p. 359–370, 2006.
- [298] D. Segger, U. Aßmus, M. Brock, J. Erasmy, P. Finkel, A. Fitzner, H. Heuss, U. Kortemeier, S. Munke, T. Rheinländer, H. Schmidt-Lewerkühne, W. Schneider, G. Weser, "Multicenter study on measurement of the natural pH of the skin surface", *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 30, p. 75, 2008.
- [299] M. Lukić, I. Pantelić, S. D. Savić, "Towards optimal pH of the skin and topical formulations: From the current state of the art to tailored products", *Cosmetics*, vol. 8, p. 69, 2021.
- [300] L. Baranda, R. González-Amaro, B. Torres-Alvarez, C. Alvarez, V. Ramírez, "Correlation between pH and irritant effect of cleansers marketed for dry skin", *International Journal of Dermatology*, vol. 41, p. 494–499, 2002.
- [301] Strona internetowa Mettler Toledo, "Essentials Guide Essential Knowledge of pH to Measure Correctly From the Start", <https://www.mt.com/us/en/home/library/guides/lab-analytical-instruments/pH-measurement-guide.html>, (dostęp online: 19.03.2024)

- [302] J. Blaak, C. Theiss, M. Schleißinger, I. Simon, N. Y. Schürer, P. Staib, "A commercially available skin care lotion with a pH of 4.5 and 10% urea improves skin surface pH, stratum corneum hydration and epidermal barrier function in subjects with dry skin and atopic diathesis," *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, vol. 10, p. 116–133, 2020.
- [303] R. L. Fogel'Son, E. R. Likhachev, "Temperature dependence of viscosity," *Technical Physics*, vol. 46, p. 1056–1059, 2001.
- [304] I. Nowak, J. Gościańska, A. Ilejnok, „Analityka środków kosmetycznych”, II. *Cursiva*, 2013.
- [305] J. Szakiel, "Modelowanie zachodzących w procesach starzenia zmian wybranych parametrów emulsji kosmetycznych," *Zeszyty Naukowe/Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie*, p. 69–78, 2010.
- [306] D. Benderly, "Viscosity Measurement for Topically Applied Formulations," *Handbook of Formulating Dermal Applications: A Definitive Practical Guide*, p. 349–368, 2016.
- [307] A. Śliwowska, "Badanie właściwości fizykochemicznych i aplikacyjnych formułacji kosmetycznych zawierających jasmonidy wraz z oceną kinetyki ich przenikania przez bariery imitujące skórę", 2017.
- [308] *Encyklopedia fizyki, praca zbiorowa*, PWN, vol.1 p. 696, 1973.
- [309] M. Wright, "Compressibility: solids, liquids, gases", *Journal of Computational Physics*, 2021.
- [310] J. R. McAllister, "Pressurized dispensers", *Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps.*, Springer Science Business Media, p. 377–392, 2000.
- [311] K. Jeżowiecka-Kabsch, H. Szewczyk, "Mechanika płynów". *Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej* Wrocław, 2001.
- [312] "Poradnik dotyczący organizacji systemu kontroli wewnętrznej ilości towaru paczkowanego", *Główny Urząd Miar*, 2020.
- [313] Hp. Cresswell, G. J. Hamilton, "Bulk density and pore space relations", *Soil physical measurement and interpretation for land evaluation*, p. 35–58, 2002.
- [314] M. Mathlouthi, "Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs", *Food Control*, vol. 12, p. 409–417, 2001.
- [315] H. Dao, P. Lakhani, A. Police, V. Kallakunta, Sankar S. Ajjarapu, K.W. Wu, P. Ponshe, M.A. Repka, S.N. Murthy, "Microbial stability of pharmaceutical and cosmetic products", *AAPS PharmSciTech*, vol. 19, p. 60–78, 2018.
- [316] H. Bojarowicz, P. Fronczak, J. Krysiński, "Czy kosmetyki mogą nie zawierać konserwantów", *Hygiea Public Health*, vol. 53, p. 124–131, 2018.
- [317] J. Jandzio, B. Domagalska, "Metody badania stabilności emulsji o/w", p. 25–54, 2013,.
- [318] S. Smaoui, H. Ben Hlima, R. Jarraya, N. G. Kamoun, R. Ellouze, M. Damak, "Cosmetic emulsion from virgin olive oil: Formulation and bio-physical evaluation", *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, p. 9664–9671, 2012.
- [319] C. Anchisi, A. M. Maccioni, C. Sinico, D. Valenti, "Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents", *Il Farmaco*, vol. 56, p. 427–431, 2001.

- [320] Y. M. Navarro-Pérez, E. Cedeño-Linares, O. Norman-Montenegro, V. Ruz-Sanjuan, Y. Mondeja-Rivera, A.M. Hernández-Monzón, M.M. González-Bedia, "Prediction of the physical stability and quality of O/W cosmetic emulsions using full factorial design", *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, vol. 9, p. 98–112, 2021.
- [321] J. Liu, X. Huang, L. Lu, M. Li, J. Xu, H. Deng, "Turbiscan Lab® Expert analysis of the biological demulsification of a water-in-oil emulsion by two biodemulsifiers", *Journal of Hazardous Materials*, vol. 190, p. 214–221, 2011.
- [322] C. Celia, E. Trapasso, D. Cosco, D. Paolino, M. Fresta, "Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 72, p. 155–160, 2009.
- [323] W. Kang, B. Xu, Y. Wang, Y. Li, X. Shan, F. An, J. Liu, "Stability mechanism of W/O crude oil emulsion stabilized by polymer and surfactant", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 384, p. 555–560, 2011.
- [324] L. Boliński, "Norma Branzowa BN--77/6140-01. Emulsje kosmetyczne. Metody badań Określenie typu emulsji w kremach metodą rozcieńczania", Wydawnictwa Normalizacyjne, Warszawa, 1977.
- [325] D. J. McClements, S. M. Jafari, "Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review", *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 251, p. 55–79, 2018.
- [326] K.-H. Lira, D. H. Smith, "Electrical conductivities of concentrated emulsions and their fit by conductivity models", *Journal of Dispersion Science Andtechnology*, vol. 11, p. 529–545, 1990.
- [327] S. Mroczkowski, "Oznaczanie stopnia dyspersji woda/olej i olej/woda", *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, vol. 53, 1965.
- [328] A. Metera, A. Markowska-Radomska, E. Dłuska, K. Kosicki, B. Tudek, T. Frączyk, "Emulsje podwójne i potrójne z modyfikowanymi powierzchniami kropeł jako nośniki substancji czynnych", *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 2017.
- [329] M. Mulczyk, "Wpływ narzędzi marketingowych na decyzję zakupowe kobiet odnośnie kosmetyków pielęgnacyjnych do twarzy", 2019.
- [330] J. Płocica, "Nowoczesne metody badań kosmetyków na przykładzie linii Skalpel".
- [331] I. Nowak, K. Latanowicz, A. Bętlewski, A. Feliczak-Guzik, A. Wawrzyńczak, "Produkt kosmetyczny od koncepcji w laboratorium do produkcji przemysłowej", *Wiadomości Chemiczne*, vol. 76, 2022.
- [332] M. Wójtowicz „Charakteryzacja stanu skóry ludzkiej za pomocą pomiarów impedancji i współczynnika TEWL”, *Praca Dyplomowa Magisterska*, 2015
- [333] A. Olejnik, J. Gornowicz-Porowska, J. Gościańska, "Metody analityczne badania preparatów kosmetycznych-wczoraj i dziś", *Wiadomości Chemiczne*, 2022.
- [334] B. G. Chiari, M. G. J. Almeida, M. A. Corrêa, V. L. B. Isaac, "Cosmetics' quality control", *Latest research into quality control*, p. 337–364, 2012.
- [335] P. Stepnowski, E. Synak, B. Szafranek, Z. Kaczyński, "Techniki separacyjne", *Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego*, Gdańsk, p. 206–221, 2010.

- [336] E. Sottofattori, M. Anzaldi, A. Balbi, G. Tonello, "Simultaneous HPLC determination of multiple components in a commercial cosmetic cream", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 18, p. 213–217, 1998.
- [337] Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, "Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych". Wydawnictwo Naukowe PWN, 2017.
- [338] R. L. Cunico, K. M. Gooding, T. Wehr, "Basic HPLC and CE of Biomolecules", in *Basic HPLC and CE of biomolecules*, p. 388, 1998.
- [339] K. Jagodzińska, A. Feliczak-Guzik, I. Nowak, "Metody analityczne do identyfikacji oraz oznaczania wybranych składników kosmetycznych", *Chemik*, vol. 65, p. 88–93, 2011.
- [340] P.W. Wu, C.C. Chang, S.S. Chou, "Determination of formaldehyde in cosmetics by HPLC method and acetylacetone method", *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 11, p. 5, 2003.
- [341] R. Lecce, L. Regazzoni, C. Mustazza, G. Incarnato, R. Porrà, A. Panusa, "Screening of preservatives by HPLC-PDA-ESI/MS: A focus on both allowed and recently forbidden compounds in the new EU cosmetics regulation", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 125, p. 260–269, 2016.
- [342] K.M. Han, Y.K. Kim, S. Seo, J.H. Kim, J.H. Lee, H.I. Kim, S. Cho, "Analysis of 13 Banned Colorants in Cosmetics via Liquid Chromatographic and Mass Spectrometric Techniques", *Applied Sciences*, vol. 13, p. 5967, 2023.
- [343] A. Van Asten, "The importance of GC and GC-MS in perfume analysis", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 21, p. 698–708, 2002.
- [344] C. Martínez, N. Ramírez, V. Gómez, E. Pocurull, F. Borrull, "Simultaneous determination of 76 micropollutants in water samples by headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry", *Talanta*, vol. 116, p. 937–945, 2013.
- [345] N. S. Tulve, P.A. Jones, M.G. Nishioka, R.C. Fortmann, C.W. Croghan, J.Y. Zhou, A. Fraser, C. Cavel, W. Friedman, "Pesticide measurements from the first national environmental health survey of child care centers using a multi-residue GC/MS analysis method", *Environmental Science & Technology*, vol. 40, p. 6269–6274, 2006.
- [346] S. S. Li, B. Yin, H. L. Zhai, S. H. Lu, J. Y. Mi, "An effective approach to the quantitative analysis of skin-whitening agents in cosmetics with different substrates based on conventional UV-Vis determination", *Analytical Methods*, vol. 11, p. 1500–1507, 2019.
- [347] I. Głaszczka K. Paradowska, "Ocena możliwości zastosowania magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) w jakościowej analizie wybranych konserwantów obecnych w kosmetykach", *Herbalism*, vol. 8, 2022.
- [348] L. Kilpatrick-Liverman, P. Kazmi, E. Wolff, T. G. Polefka, "The use of near-infrared spectroscopy in skin care applications", *Skin Research and Technology*, vol. 12, p. 162–169, 2006.
- [349] P. R. Griffiths, "Fourier transform infrared spectrometry", *Science*, vol. 222, p. 297–302, 1983.

- [350] T. Kossowski, "Wykorzystanie spektroskopii w bliskiej podczerwieni do ciągłej, nieinwazyjnej oceny stężenia substancji chemicznych w organizmie", 2017.
- [351] M. N. Dole, P. A. Patel, S. D. Sawant, P. S. Shedpure, "Advance applications of Fourier transform infrared spectroscopy", *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 7, p. 159–166, 2011.
- [352] A. Rohman, Y. B. Che Man, "Analysis of lard in cream cosmetics formulations using ft-ir spectroscopy and chemometrics", *Middle-East Journal of Scientific Research*, vol. 7, p. 726–732, 2011.
- [353] N. A. Puttnam, S. Lee, B. H. Baxter, "products, 1., Qualitative analysis", *J. Soc. Cosmetic Chemists*, vol. 16, pp. 607–615, 1965.
- [354] S. Pasiczna-Patkowska, T. Olejnik, "Analysis of cosmetic products using different IR spectroscopy techniques", *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska*, vol. 68, 2013.
- [355] M. C. Gamberini, C. Baraldi, F. Palazzoli, E. Ribechini, P. Baraldi, "MicroRaman and infrared spectroscopic characterization of ancient cosmetics", *Vibrational Spectroscopy*, vol. 47, p. 82–90, 2008.
- [356] M. Żylewski, "Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)", *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania*, vol. 23, 2018.
- [357] Y. B. Monakhova, T. Kuballa, G. Mildau, E. Kratz, A. Keck-Wilhelm, C. Tschiersch, D.W. Lachenmeier, "Formaldehyde in hair straightening products: rapid ¹H NMR determination and risk assessment", *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 35, p. 201–206, 2013.
- [358] M. Kireche, E. Gimenez-Arnau, J. Lepoittevin, "Preservatives in cosmetics: reactivity of allergenic formaldehyde-releasers towards amino acids through breakdown products other than formaldehyde", *Contact Dermatitis*, vol. 63, p. 192–202, 2010.
- [359] D. Emeis, W. Anker, K.-P. Wittern, "Quantitative ¹³C NMR spectroscopic studies on the equilibrium of formaldehyde with its releasing cosmetic preservatives", *Analytical Chemistry Journal*, vol. 79, p. 2096–2100, 2007.
- [360] Y. Lu, Y. He, X. Wang, H. Wang, Q. Qiu, B. Wu, X. Wu, "Screening, characterization, and determination of suspected additives bimatoprost and latanoprost in cosmetics using NMR and LC–MS methods", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, p. 1–10, 2023.
- [361] X. Wang, H. Wang, X. Wu, Y. Lu, "Characterization and determination of benvitimod, an unknown risk substance in cosmetics, using nuclear magnetic resonance spectroscopy and HPLC–MS/MS", *Journal of Separation Science*, vol. 45, p. 3652–3662, 2022.
- [362] M. O. Schmitz-Masse, M. Herpol-Borremans, F. Parmentier, "Esters of para-aminobenzoic acid in cosmetics. Identification and dosage within sun-creams", *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 1, p. 101–110, 1979.
- [363] T. Doi, K. Kajimura, S. Taguchi, "The different decomposition properties of diazolidinyl urea in cosmetics and patch test materials", *Contact Dermatitis*, vol. 65, p. 81–91, 2011.

- [364] D. De Medici, S. Pieretti, G. Salvatore, M. Nicoletti, P. Rasoanaivo, "Chemical analysis of essential oils of Malagasy medicinal plants by gas chromatography and NMR spectroscopy", *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 7, p. 275–281, 1992.
- [365] C. I. Cerceau, L. C. A. Barbosa, E. S. Alvarenga, C. R. A. Maltha, F. M. D. Ismail, "1H-NMR and GC for detection of adulteration in commercial essential oils of *Cymbopogon ssp*", *Phytochemical analysis*, vol. 31, p. 88–97, 2020.
- [366] M. Tarsa, E. Kępczyńska, "Metody spektroskopowe w analizie związków organicznych", 2019.
- [367] J. Szklarzewicz, A. Migdał-Mikuli, "Absorpcyjna spektroskopia elektronowa", 2005.
- [368] K. Dudek, "Badania spektrofotometryczne wybranych surowców kosmetycznych o aktywności promienochronnej", 2016.
- [369] J. Wiącek, "Metoda selektywnego wydzielenia wybranych składników z kosmetyków", Katedra Chemii Analitycznej, Praca dyplomowa magisterska, 2013.
- [370] J. H. Banoub, R. P. Newton, E. Esmans, D. F. Ewing, G. Mackenzie, "Recent developments in mass spectrometry for the characterization of nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, and nucleic acids", *Chemical Reviews Journal*, vol. 105, p. 1869–1916, 2005.
- [371] E. J. Finehout, K. H. Lee, "An introduction to mass spectrometry applications in biological research", *Biochemistry and molecular biology Education*, vol. 32, p. 93–100, 2004.
- [372] E. De Hoffmann, V. Stroobant, "Mass spectrometry: principles and applications", John Wiley & Sons, 2007.
- [373] D. N. Nguyen, G. W. Becker, R. M. Riggin, "Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology", *Journal of Chromatography A*, vol. 705, p. 21–45, 1995.
- [374] R. Harkewicz, E. A. Dennis, "Applications of mass spectrometry to lipids and membranes", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 80, p. 301–325, 2011.
- [375] A. Olejnik, J. Gornowicz-Porowska, J. Gościańska, "Metody analityczne badania preparatów kosmetycznych-wczoraj i dziś", *Wiadomości Chemiczne*, 2022.
- [376] K. Jurowski, W. Piekoszewski, "Toksykologia i ocena bezpieczeństwa kosmetyków", PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, 2019.
- [377] Farmakopea Europejska 10th ed., Council of Europe, "Potentiometric determination of pH", *European Pharmacopoeia*, Strasbourg, 2023.
- [378] Farmakopea Europejska 10th ed., Council of Europe, "Relative density," in *European Pharmacopoeia*, 10th ed., Strasbourg, 2023.
- [379] Farmakopea Europejska 10th ed., Council of Europe, "Water activity," in *European Pharmacopoeia*, 10th ed., Strasbourg, 2023.
- [380] Norma ISO, Kosmetyki -- Mikrobiologia -- Ocena skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej produktu kosmetycznego Norma PN-EN ISO 11930:2019, 2019.
- [381] Przewodnik po ocenie efektywności produktów kosmetycznych, *Cosmetics Europe – The Personal Care Association*, "Guidelines for the evaluation of the efficacy of cosmetic product", 2008.

- [382] W. M. Association, “World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects”, *Journal of the American Medical Association*, vol. 310, p. 2191–2194, 2013.
- [383] *Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej*, “Ustawa z dn. 4 października 2018r. o Produktach Kosmetycznych, Dz.U. 2018 poz. 2227”, Warszawa, 2018.
- [384] T. Iannitti, J. C. Esar Morales-Medina, P. Bellavite, V. Rottigni, B. Palmieri, “Effectiveness and Safety of *Arnica montana* in Post-Surgical Setting, Pain and Inflammation”, vol.1, p. 184-197, 2014.
- [385] P. Chantre, A. Cappelaere, D. Leblan, D. Guédon, J. Vandermander, B. Fournie, “Efficacy and Tolerance of *Harpagophytum Procumbens* versus Diacerhein in Treatment of Osteoarthritis”, *Phytomedicine*, vol. 7, p. 177–183, 2000,
- [386] G. Paramdeep, “Efficacy and tolerability of ginger (*Zingiber officinale*) in patients of osteoarthritis of knee,” *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 57, p. 177–183, 2013.
- [387] T. Ma, T. Bu, Y. Li, Y. He, F. Yang, L.Zou, “Puerarin inhibits the development of osteoarthritis through antiinflammatory and antimatrix-degrading pathways in osteoarthritis-induced rat model”, *Phytotherapy Research*, vol. 35, p. 2579–2593, 2021.
- [388] S. Srivastava, A. K. Saksena, S. Khattri, S. Kumar, R. S. Dagur, “*Curcuma longa* extract reduces inflammatory and oxidative stress biomarkers in osteoarthritis of knee: a four-month, double-blind, randomized, placebo-controlled trial”, *Inflammopharmacology*, vol. 24, p. 377–388, 2016.
- [389] Food and Drug Administration, “FDA/CFSAN – FDA Advises Dietary Supplement Manufacturers to Remove Comfrey Products From the Market”, 2001.
- [390] F. Zeraati, F. Esna-Ashari, M. Araghchian, A. H. Emam, M.V. Rad, S. Seif, K. Razaghi, “Evaluation of topical antinociceptive effect of *Artemisia absinthium* extract in mice and possible mechanisms”, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 8, p. 492–496, 2014.
- [391] G. Bruno, “COX-2”, 2009.
- [392] G. Yu, W. Xiang, T. Zhang, L. Zeng, K. Yang, J. Li, “Effectiveness of *Boswellia* and *Boswellia* extract for osteoarthritis patients: a systematic review and meta-analysis”, *BMC Complementary Medicine and Therapies*, vol. 20, p. 1–16, 2020.
- [393] N. Kimmatkar, V. Thawani, L. Hingorani, R. Khiyani, “Efficacy and tolerability of *Boswellia serrata* extract in treatment of osteoarthritis of knee—a randomized double blind placebo controlled trial”, *Phytomedicine*, vol. 10, p. 3–7, 2003.
- [394] M. Shara, S. J. Stohs, “Efficacy and safety of white willow bark (*Salix alba*) extracts”, *Phytotherapy Research*, vol. 29, p. 1112–1116, 2015.
- [395] A. Johnson, Y.C. Huang, C.F. Mao, C.K. Chen, S. Thomas, H.P. Kuo, S. Miao, Z.L. Kong, “Protective effect of ethanolic extract of *Echinacea purpurea* contained nanoparticles on meniscal/ligamentous injury induced osteoarthritis in obese male rats,” *Scientific Reports*, vol. 12, p. 5354, 2022.
- [396] S. R. Hardin, “Cat’s claw: an Amazonian vine decreases inflammation in osteoarthritis”, *Complementary Therapies in Clinical Practice*, vol. 13, p. 25–28, 2007.

- [397] A. Raposo, A. Saraiva, F. Ramos, C. Carrascosa, D. Raheem, R. Bárbara, H. Silva, “The role of food supplementation in microcirculation—A comprehensive review”, *Biology*, vol. 10, p. 616, 2021.
- [398] M. L. Cardeccia, L. H. Elam, K. A. Deabold, E. L. Miscioscia, J. L. Huntingford, “A pilot study examining a proprietary herbal blend for the treatment of canine osteoarthritis pain”, *The Canadian Veterinary Journal*, vol. 63, p. 55, 2022.
- [399] X. Zheng, “Anti-osteoarthritis activity of urtica extracts at different concentrations”, *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, vol. 21, p. 5741, 2017.
- [400] V. G. Gajera, A. Yadav, C. Shah, D. P. Shah, “Anti-arthritis effect of *Trigonella foenum graecum* l. leaves in acute and chronic models of arthritis in albino rats”, *Complexity International*, vol. 25, 2021.
- [401] L. Zhang, X. Zhang, K.F. Li, D.X. Li, Y.M. Xiao, Y.J. Fan, X.D. Zhang, “Icariin promotes extracellular matrix synthesis and gene expression of chondrocytes in vitro”, *Phytotherapy Research*, vol. 26, p. 1385–1392, 2012.
- [402] R. R. Vera, J. Chane-Ming, “Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island”, *Food Chemistry*, vol. 66, p. 143–145, 1999.
- [403] A. I. Hussain, F. Anwar, S. A. S. Chatha, A. Jabbar, S. Mahboob, P. S. Nigam, “*Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities”, *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 41, p. 1070–1078, 2010.
- [404] M. A. Uddin, M. Shahinuzzaman, M. S. Rana, Z. Yaakob, “Study of chemical composition and medicinal properties of volatile oil from clove buds (*Eugenia caryophyllus*)”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 8, p. 895, 2017.
- [405] Y. Huang, J. Zhao, L. Zhou, J. Wang, Y. Gong, X. Chen, Z. Guo, Q. Wang, W. Jiang, “Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole”, *Molecules*, vol. 15, p. 7558–7569, 2010.
- [406] N. Čmiková, N. Čmiková, L. Galovičová, M. Schwarzová, M.D. Vukic, N.L. Vukovic, P.Ł. Kowalczewski, L. Bakay, M.I. Kluz, C. Puchalski, M. Kačániová, “Chemical composition and biological activities of *Eucalyptus globulus* essential oil”, *Plants*, vol. 12, p. 1076, 2023.
- [407] A.A. Taherpour, S. Khaef, A. Yari, S. Nikeafshar, M. Fathi, S. Ghambari, “Chemical composition analysis of the essential oil of *Mentha piperita* L. from Kermanshah, Iran by hydrodistillation and HS/SPME methods”, *Journal of Analytical Science and Technology*, vol. 8, p. 1–6, 2017.
- [408] B. A. Behbahani, F. Falah, F. Lavi Arab, M. Vasiee, F. Tabatabaee Yazdi, “Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2020, p. 5190603, 2020.
- [409] M. Höferl, I. Stoilova, E. Schmidt, J. Wanner, L. Jirovetz, D. Trifonova, L. Krastev, A. Krastanov, “Chemical composition and antioxidant properties of Juniper berry (*Juniperus communis* L.) essential oil. Action of the essential oil on the antioxidant protection of *Saccharomyces cerevisiae* model organism”, *Antioxidants*, vol. 3, p. 81–98, 2014.

- [410] B. Nickavar, F. Mojab, K. Javidnia, M. A. R. Amoli, "Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran", *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 58, p. 629–631, 2003.
- [411] M. H. Alma, S. Nitz, H. Kollmannsberger, M. Digrak, F. T. Efe, N. Yilmaz, "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (*Pistacia vera* L.)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, p. 3911–3914, 2004.
- [412] D. H. Craighead, "Elucidation of novel therapeutic targets in the microvasculature of hypertensive humans", *Praca doktorska*, 2017.
- [413] R. L. Barkin, "The pharmacology of topical analgesics", *Postgraduate Medicine*, vol. 125, p. 7–18, 2013.
- [414] Y. Oka, K. Takahashi, T. Ohta, "The effects of vanilloid analogues structurally related to capsaicin on the transient receptor potential vanilloid 1 channel", *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 30, p. 101243, 2022.
- [415] L. G. B. Ferreira, J. V. Faria, J. P. S. Dos Santos, R. X. Faria, "Capsaicin: TRPV1-independent mechanisms and novel therapeutic possibilities", *European Journal of Pharmacology*, vol. 887, p. 173356, 2020.
- [416] H. Xu, N. T. Blair, D. E. Clapham, "Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism", *Journal of Neuroscience*, vol. 25, p. 8924–8937, 2005.
- [417] E. M. Debbi, G. Agar, G. Fichman, Y. B. Ziv, R. Kardosh, N. Halperin, A. Elbaz, Y. Beer, R. Debi, "Efficacy of methylsulfonylmethane supplementation on osteoarthritis of the knee: a randomized controlled study", *BBMC Complementary Medicine and Therapies*, vol. 11, p. 1–9, 2011.
- [418] J. Martel-Pelletier, A. Farran, E. Montell, J. Vergés, J.P. Pelletier, "Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate", *Molecules*, vol. 20, p. 4277–4289, 2015.
- [419] E. J. Uitterlinden, H. Jahr, J.L.M. Koevoet, Y.M. Jenniskens, S.M.A. Bierma-Zeinstra, J. DeGroot, J.A.N. Verhaar, H. Weinans, G.J.V.M. van Osch, "Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage explants", *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 14, p. 250–257, 2006.
- [420] M. Shakibaei, C. Csaki, S. Nebrich, A. Mobasheri, "Resveratrol suppresses interleukin-1 β -induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: Potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis", *Brazilian Journal of Poultry Science*, vol. 20, p. 747-752, 2018.
- [421] K. Starowicz, D. P. Finn, "Cannabinoids and pain: sites and mechanisms of action", *Advances in Pharmacology* vol. 80, p. 437–475, 2017.
- [422] T. Iannitti, J. C. Morales-Medina, P. Bellavite, V. Rottigni, B. Palmieri, "Effectiveness and safety of *Arnica montana* in post-surgical setting, pain and inflammation", *American Journal of Therapeutics*, vol. 23, p. 184–197, 2016.
- [423] K. Al-Malah, "Rheological properties of carbomer dispersions", *Annual Transactions-Nordic Rheology Society*, vol. 14, p. 123, 2006.

- [424] D. Q. M. Craig, S. Tamburic, G. Buckton, J. M. Newton, "An investigation into the structure and properties of Carbopol 934 gels using dielectric spectroscopy and oscillatory rheometry", *Journal of controlled release*, vol. 30, p. 213–223, 1994.
- [425] Z. Latif, K. Shahid, H. Anwer, R. Shahid, M. Ali, K.H. Lee, M. Alshareef, "Carbon quantum dots (CQDs) modified polymers: a mini review of non-optical applications", *Nanoscale*, vol. 5, p. 1-55, 2024.
- [426] Y. Ma, W. Wang, Y. Wang, Y. Guo, S. Duan, K. Zhao, S. Li, "Metal ions increase mechanical strength and barrier properties of collagen-sodium polyacrylate composite films", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 119, p. 15–22, 2018.
- [427] Strona internetowa Polymer technologies, M. Matushek, "History of super absorbent polymer chemistry", <https://m2polymer.com/2019/02/history-of-super-absorbent-polymer-chemistry>, (dostęp online: 27.11.2023)
- [428] M. Liu, T. Guo, "Preparation and swelling properties of crosslinked sodium polyacrylate", *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 82, p. 1515–1520, 2001.
- [429] J. Płocica, B. Tal-Figiel, W. Figiel, "Badania reologiczne i sensoryczne stosowane do oceny preparatów kosmetycznych", *Świat Przemysłu Kosmetycznego*, vol. 17, p. 68–73, 2014.
- [430] F. Calvo, J. M. Gómez, L. Ricardez-Sandoval, O. Alvarez, "Integrated design of emulsified cosmetic products: A review", *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 161, p. 279–303, 2020.
- [431] E. Klimaszewska, A. Małyśa, M. Zięba, T. Wasilewski, "Korelacje między zawartością regulatorów konsystencji a właściwościami fizykochemicznymi i użytkowymi maseczek pielęgnacyjnych zawierających ekstrakt z nasion jeżyny otrzymany w warunkach nadkrytycznego di tlenku węgla, Zastosowanie ekstraktów roślinnych pozyskiwanych w warunkach nadkrytycznego CO₂ w kosmetykach i produktach chemii gospodarczej", *Wydawnictwo Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny w Radomiu*, p. 85–101, 2016.
- [432] M. Zięba, E. Klimaszewska, M. Ogorzałek, "Application of plant-derived rheology modifiers in hair shampoos", *Towaroznawcze problemy jakości*, p. 150–157, 2018.
- [433] V. Zague, D. de Almeida Silva, A. Rolim Baby, T. Mary Kaneko, M. Valéria Robles Velasco, "Clay facial masks: Physicochemical stability at different storage temperatures", *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 29, p. 488–489, 2007.
- [434] A. M. El Gendy, H. W. Jun, A. A. Kassem, "In vitro release studies of flurbiprofen from different topical formulations", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 28, p. 823–831, 2002.
- [435] I. Szymańska, A. Żbikowska, K. Marciniak-Łukasiak, M. Kowalska, "Charakterystyka modelowych emulsji typu o/wz dodatkiem zagęszczonego wodnego ekstraktu z dzikiego dorsza", *Żywność: nauka-technologia-jakość*, p. 88–103, 2021.
- [436] D. J. McClements, "Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 47, p. 611–649, 2007.

- [437] O. Góral, A. Krztoń-Maziopa, A. Ł. Wąs, “Kontrola stabilności, testy starzeniowe i ich wpływ na właściwości fluidu kosmetycznego”.
- [438] A. Gupta, H. B. Eral, T. A. Hatton, P. S. Doyle, “Nanoemulsions: formation, properties and applications,” *Soft Matter*, vol. 12, p. 2826–2841, 2016.
- [439] K. Uzdrowska M. Górską-Ponikowską, “Środki konserwujące w technologii kosmetyków”, *Kosmetologia estetyczna*, vol.12, p. 45-50, 2023.
- [440] J. Jin, H. Wang, X. Hua, D. Chen, C. Huang, Z. Chen, “An outline for the pharmacological effect of icariin in the nervous system,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 842, p. 20–32, 2019.
- [441] H. Ma, X. He, Y. Yang, M. Li, D. Hao, Z. Jia, “The genus *Epimedium*: an ethnopharmacological and phytochemical review,” *Journal of Ethnopharmacology* vol. 134, p. 519–541, 2011.
- [442] D. Xu, Y.R. Lu, N. Kou, M.J. Hu, Q.S. Wang, Y.L. Cui, “Intranasal delivery of icariin via a nanogel-thermoresponsive hydrogel compound system to improve its antidepressant-like activity”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 586, p. 119550, 2020.
- [443] U. FDA, “Guidance for Industry. Nonsterile semisolid dosage forms, scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation”, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1997.
- [444] Strona internetowa, Wytyczne dotyczące jakości plastrów transdermalnych, “Guideline on quality of transdermal patches”, <https://www.tga.gov.au/resources/resource/international-scientific-guidelines/guideline-quality-transdermal-patches> , (dostęp online: 11.02.2024)
- [445] Y. Lee, S. Q. Choi, “Quantitative analysis for lipophilic drug transport through a model lipid membrane with membrane retention”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 134, p. 176–184, 2019.
- [446] M. Ameri, H. Lewis, P. Lehman, “Effect of skin model on in vitro performance of an adhesive dermally applied microarray coated with zolmitriptan”, *Bulletin of Faculty of Pharmacy Cairo University*, vol. 2018, p. 7459124, 2018.
- [447] L. A. M. Ferreira, M. Seiller, J. L. Grossiord, J. P. Marty, J. Wepierre, “Vehicle influence on in vitro release of metronidazole: role of w/o/w multiple emulsion”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 109, p. 251–259, 1994.
- [448] H. Lin, L. Lin, M. Sun, J. Liu, Q. Wu, “Topical delivery of four neuroprotective ingredients by ethosome-gel: synergistic combination for treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy”, *International Journal of Nanomedicine*, p. 3251–3266, 2020.
- [449] N. Wang, Q. Fu, Z. Xi, X. Che, N. Li, “Solubility of icariin in a binary solvent system of ethanol and water”, *Journal of Solution Chemistry* vol. 42, p. 1837–1843, 2013.
- [450] C. K. Lee, T. Uchida, A. Yagi, N.S. Kim, S. Goto, “Effect of hydrophilic and lipophilic vehicles on skin permeation of tegafur, alclofenac and ibuprofen with or without permeation enhancers”, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 16, p. 1264–1269, 1993.

- [451] D. Horita, H. Todo, K. Sugibayashi, "Effect of ethanol pretreatment on skin permeation of drugs", *Biol Pharm Bull*, vol. 35, p. 1343–1348, 2012.
- [452] A. Fini, V. Bergamante, G. C. Ceschel, C. Ronchi, C. A. F. De Moraes, "Control of transdermal permeation of hydrocortisone acetate from hydrophilic and lipophilic formulations", *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, p. 762–768, 2008.
- [453] S. Y. Kwiecien, M. P. McHugh, "The cold truth: the role of cryotherapy in the treatment of injury and recovery from exercise", *European Journal of Applied Physiology*, vol. 121, p. 2125–2142, 2021.
- [454] C. R. Denegar, D.R. Dougherty, J.E. Friedman, M.E. Schimizzi, J.E. Clark, B.A. Comstock, W.J. Kraemer, "Preferences for heat, cold, or contrast in patients with knee osteoarthritis affect treatment response", *Clinical Interventions in Aging*, p. 199–206, 2010.
- [455] M. Jaszczur, T. Bednarz, J. Szmyd, Z. Kolenda, "Analiza procesu mieszania płynów newtonowskich w mikserze statycznym", *Konferencja Teoria i Inżynieria Procesów Metalurgicznych*, Kraków, p. 147-158, 2003.
- [456] A. Sebai, A. Gadomska-Gajadur, P. Ruśkowski, "Optymalizacja procesu otrzymywania nanosfer proleku polilaktydu z chlorofenezyną", *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, vol. 5, 2016.
- [457] C. Gallegos, M. C. Sánchez, A. Guerrero, J. M. Franco, "Effect of process parameters on the rheological properties of o/w emulsions", in *ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition*, American Society of Mechanical Engineers, p. 177–183, 1996.
- [458] M. C. Sánchez, M. Berjano, A. Guerrero, E. Brito, C. Gallegos, "Evolution of the microstructure and rheology of o/w emulsions during the emulsification process", *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 76, p. 479–485, 1998.
- [459] M. Dziubiński, T. Kiljański, J. Sęk, "Podstawy Teoretyczne i Metody Pomiarowe Reologii", *Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej Poland*, p. 1–313, 2014.
- [460] M. J. Zirwas, "Contact dermatitis to cosmetics", *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, vol. 56, p. 119–128, 2019.
- [461] M. P. Russell, "Microbiological aspects of control in manufacturing", *Soap, Perfumery, and Cosmetics*, vol. 56, p. 234–236, 1983.
- [462] E. Neza M. Centini, "Microbiologically contaminated and over-preserved cosmetic products according Rapex 2008–2014", *Cosmetics*, vol. 3, p. 3, 2016.
- [463] M. Lukić, I. Pantelić, S. D. Savić, "Towards optimal ph of the skin and topical formulations: From the current state of the art to tailored products", *Cosmetics*, vol. 8, p. 69, 2021.
- [464] M. Danso, W. Boiten, V. van Drongelen, K. Gmelig Meijling, G. Gooris, A. El Ghalbzouri, S. Absalah, R. Vreeken, S. Kezic, J. van Smeden, S. Lavrijsen, J. Bouwstra, "Altered expression of epidermal lipid bio-synthesis enzymes in atopic dermatitis skin is accompanied by changes in stratum corneum lipid composition", *Journal of Dermatological Science*, vol. 88, p. 57–66, 2017.
- [465] M. Haftek, M. Simon, J. Kanitakis, S. Maréchal, A. Claudy, G. Serre, D. Schmitt, "Expression of corneodesmosin in the granular layer and stratum corneum of normal and diseased epidermis", *British Journal of Dermatology*, vol. 137, p. 864–873, 1997.

- [466] S. Naik, N. Bouladoux, C. Wilhelm, M.J. Molloy, R. Salcedo, W. Kastenmuller, C. Deming, M. Quinones, L. Koo, S. Conlan, S. Spencer, J.A. Hall, A. Dzutsev, H. Kong, D.J. Campbell, G. Trinchieri, J.A. Segre, Y. Belkaid, "Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals", *Science* (1979), vol. 337, p. 1115–1119, 2012.
- [467] A. Ainurofiq, A. Maharani, F. Fatonah, H. N. Halida, T. Nurrodotiningtyas, "Pre-formulation study on the preparation of skin cosmetics", *Science and Technology Indonesia*, vol. 6, p. 273–284, 2021.
- [468] R. Brummer, "Rheology essentials of cosmetic and food emulsions," Springer Berlin, 2006.
- [469] A. G. de Castro, "Reologia e suas aplicações industriais", 2001.
- [470] M. Kieć-Świerczyńska, B. Kręcisz, D. Świerczyńska-Machura, "Uczulenie na kosmetyki i środki zapachowe", *Medycyna Pracy*, vol. 55, no. 2, 2004.
- [471] H. Bojarowicz, P. Fronczak, J. Krysiński, "Czy kosmetyki mogą nie zawierać konserwantów," *Hygiea Public Health*, vol. 53, p. 124–131, 2018.
- [472] J. M. L. White, A. C. de Groot, I. R. White, "Cosmetics and skin care products," *Contact Dermatitis*, p. 591–605, 2011.
- [473] J. Płocica, "Nowoczesne metody badań kosmetyków na przykładzie linii Skalpel".
- [474] Strona internetowa ECHA, "propane-1,3-diol," <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/2099>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [475] Strona internetowa CIR, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, S. C. Tilton, P. D. P. Panel, "Safety Assessment of Glucosamine Ingredients as Used in Cosmetics", https://www.cir-safety.org/sites/default/files/Glucosamine_1.pdf, (dostęp online: 09.02.2024).
- [476] L. Song, L. Song, Y. Zhou, Y. Zhai, X. Huo, M. Chen, H. Shi, "Sub-chronic toxicity of an aqueous extract of *Epimedium sagittatum* (Sieb. Et Zucc.) Maxim. in rats," *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 46, p. 451–461, 2023.
- [477] Strona internetowa ECHA, "Alcohols, C16-18, ethoxylated," <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13418/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [478] Strona internetowa ECHA, "Stearic acid, monoester with glycerol," <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/2133>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [479] Strona internetowa ECHA, "Palmitic acid," <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15218/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [480] Strona internetowa ECHA, "Hexadecan-1-ol," <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15942>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [481] Strona internetowa ECHA, "Castor oil, hydrogenated, ethoxylated," <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/26320/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [482] N. J. Szabo, R.A. Matulka, P.A. Marone, M.R. Bauter, T. Chan, S. Franklin, J.R. Carney, S.L. McQuaid, W. Rakitsky, R. Green, P. Licari, "Safety evaluation of oleic-

- rich triglyceride oil produced by a heterotrophic microalgal fermentation process,” *Food and chemical toxicology*, vol. 65, p. 301–311, 2014.
- [483] Strona internetowa ECHA, “Dimethyl sulphone,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/17580/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [484] Strona internetowa ECHA, “Menthol,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13758/7/2/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [485] Strona internetowa ECHA, “Propane-1,2-diol,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/16001/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [486] Strona internetowa ECHA, “Glycerol,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14481/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [487] Strona internetowa ECHA, “Benzyl alcohol,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14748/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [488] Strona internetowa ECHA, “Rosemary, ext.,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/5479/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [489] L. C. Becker, A. Akinsulie, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, B. Heldreth, “Safety assessment of Eucalyptus globulus (Eucalyptus)-derived ingredients as used in cosmetics,” *International Journal of Toxicology*, vol. 42, p. 57S-92S, 2023.
- [490] Strona internetowa ECHA, “Eugenol,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13694>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [491] Strona internetowa ECHA, “Eugenol,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13694/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [492] M. M. Fiume, B. Heldreth, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, F.A. Andersen, L.J. Gill, “Safety assessment of microbial polysaccharide gums as used in cosmetics”, *International Journal of Toxicology*, vol. 35, p. 5S-49S, 2016.
- [493] Strona internetowa ECHA, “3-acetyl-6-methyl-2H-pyran-2,4(3H)-dione,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/21299/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [494] Strona internetowa ECHA, “(R)-p-mentha-1,8-diene,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15256/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [495] T. Muto, T. Watanabe, M. Okamura, M. Moto, Y. Kashida, K. Mitsumori, “Thirteen-week repeated dose toxicity study of wormwood (*Artemisia absinthium*) extract in rats”, *The Journal of Toxicological Sciences*, vol. 28, p. 471–478, 2003.
- [496] T. Iannitti, J. C. Morales-Medina, P. Bellavite, V. Rottigni, B. Palmieri, “Effectiveness and safety of *Arnica montana* in post-surgical setting, pain and inflammation”, *American Journal of Therapeutics*, vol. 23, p. e184–e197, 2016.
- [497] Strona internetowa ECHA, “Linalool,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14501/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [498] B. Acid, “Scientific committee on consumer products SCCP”

- [499] “Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Evaluation of active substances Assessment Report. Potassium sorbate”, 2015.
- [500] U. Bernauer, L. Bodin, Q. Chaudhry, P.J. Coenraads, M. Dusinska, J. Ezendam, E. Gaffet, C. L. Galli, E. Panteri, V. Rogiers, Ch. Rousselle, M. Stepnik, T. Vanhaecke, S. Wijnhoven, The SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation-12th Revision. 2023.
- [501] Strona internetowa ECHA, “ECHA/registration-dossier/2009,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/2099>, (dostęp online: 15.04.2024).
- [502] Strona internetowa ECHA, “ECHA/registration-dossier/registered-dossier/2099,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/2099>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [503] W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, “Safety Assessment of Alkane Diols as Used in Cosmetics”, Washington, 2018.
- [504] R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, S. C. Tilton, P. D. P. Panel, “Safety Assessment of Glucosamine Ingredients as Used in Cosmetics”.
- [505] L. Kong, X. Liang, A. Liu, X. Yang, Q. Luo, Y. Lv, J. Dong, “Icariin inhibits inflammation via immunomodulation of the cutaneous hypothalamus–pituitary–adrenal axis in vitro”, *Clinical and Experimental Dermatology*, vol. 44, p. 144–152, 2019.
- [506] L. Song, Y. Zhou, Y. Zhai, X. Huo, M. Chen, H. Shi, Y. Yu, Y. Zhang, K. Zhou, “Sub-chronic toxicity of an aqueous extract of *Epimedium sagittatum* (Sieb. Et Zucc.) Maxim. in rats,” *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 46, p. 451–461, 2023.
- [507] Y.-H. Hwang, H. J. Yang, N.-H. Yim, J. Y. Ma, “Genetic toxicity of *Epimedium koreanum* Nakai”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 198, p. 87–90, 2017.
- [508] Strona internetowa ECHA, “ECHA/registered-dossier/13418/7/4/2,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13418/7/4/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [509] Strona internetowa ECHA, “ECHA/registered-dossier/13418/7/4/3,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13418/7/4/3>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [510] Strona internetowa ECHA, “ECHA/registered-dossier/13418/7/5/2,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13418/7/5/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [511] Strona internetowa ECHA, “ECHA/registered-dossier/13418/7/6/2,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13418/7/6/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [512] Strona internetowa ECHA, “ECHA/registered-dossier/13418/7/7/2,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13418/7/7/2>, (dostęp online: 09.02.2024).
- [513] F. A. Andersen, “Final Report on the Safety Assessment of Cetearth-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9,-10,-11,-12,-13,-14,-15,-16,-17,-18,-20,-22,-23,-24,-25,-27,-28,-29,-30,-33,-

- 34,-40,-50,-55,-60,-80, and-100”, *International Journal of Toxicology*, vol. 18, p. 41–49, 1999.
- [514] Strona internetowa ECHA, “ECHA/registered-dossier/13418/7/9/1,” <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13418/7/9/1>, (dostęp online: 09.04.2024).
- [515] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/2133>,” (dostęp online: 09.04.2024).
- [516] R. L. Elder, “Final report on the safety assessment of glyceryl stearate and glyceryl stearate/SE”, *Journal of the American College of Toxicology*, vol. 1, p. 169–192, 1982.
- [517] “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/12535/7/6/2>,” (dostęp online: 09.04.2024).
- [518] M.M. Flume, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, L.J. Gill, B. Heldreth, “Safety Assessment of Monoglyceryl Monoesters as Used in Cosmetics”, *International Journal of Toxicology*, vol. 39, 2020.
- [519] M. M. Fiume, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, F.A. Andersen, “Safety assessment of *Vitis vinifera* (Grape)-derived ingredients as used in cosmetics”, *International Journal of Toxicology*, vol. 33, p. 48S-83S, 2014.
- [520] A. Mittal, C. A. Elmets, S. K. Katiyar, “Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation”, *Carcinogenesis*, vol. 24, p. 1379–1388, 2003.
- [521] “<https://online.personalcarecouncil.org/ctfa-static/online/lists/cir-pdfs/PRS618.pdf>,” <https://online.personalcarecouncil.org/ctfa-static/online/lists/cir-pdfs/PRS618.pdf>.
- [522] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/16007/7/6/2>,” (dostęp online: 09.04.2024).
- [523] R. L. Elder, “Final report on the safety assessment of ceteryl alcohol, cetyl alcohol, isostearyl alcohol, myristyl alcohol, and behenyl alcohol”, *Journal of the American College of Toxicology*, vol. 7, no. 3, pp. 359–413, 1988.
- [524] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/26320/7/4/2>,” (dostęp online: 09.04.2024).
- [525] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/26320/7/4/3>,” (dostęp online: 09.04.2024).
- [526] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/26320/7/5/1>,” (dostęp online: 09.04.2024).
- [527] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/26320/7/6/2>,” (dostęp online: 09.04.2024).
- [528] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/26320/7/7/2>,” (dostęp online: 09.04.2024).
- [529] M.M. Fiume, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, L.J. Gill, B. Heldreth, “Amended Safety Assessment of PEGylated Oils as Used in Cosmetics”.

- [530] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/26320/7/9/2>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [531] C. L. Burnett, M.M. Fiume, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, F.A. Andersen, "Final report on the safety assesement of plant-derived fatty acid oils as used in cosmetics," Available on the CIR website, 2011.
- [532] C. L. Burnett, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, M.M. Fiume, B. Hilderth, "Safety assessment of butyrospermum parkii (shea)-derived ingredients as used in cosmetics", *International Journal of Toxicology*, vol. 43, p. 82S-95S, 2024.
- [533] N. J. Szabo, R.A. Matulka, P.A. Marone, M.R. Bauter, T. Chan, S. Franklin, J.R. Carney, S.L. McQuaid, W. Rakitsky, R. Green, P. Licari, "Safety evaluation of oleic-rich triglyceride oil produced by a heterotrophic microalgal fermentation process", *Food and chemical toxicology*, vol. 65, p. 301–311, 2014.
- [534] A. Bassan, E. Fioravanzo, M. Pavan, A. Conto, "Reports on toxicokinetics, toxicity and allergenicity data on substances to be evaluated as acceptable previous cargoes for edible fats and oils (NP/EFSA/CONTAM/2011/01)–Batches n. 1, 2 and 3", *EFSA Supporting Publications*, vol. 9, p. 274E, 2012.
- [535] P. Carthew, P. Baldrick, P. A. Hepburn, "An assessment of the carcinogenic potential of shea oleine in the rat", *Food and chemical toxicology*, vol. 39, p. 807–815, 2001.
- [536] P. Baldrick, J. A. Robinson, P. A. Hepburn, "Reproduction studies in the rat with shea oleine and hardened shea oleine", *Food and chemical toxicology*, vol. 39,p. 923–930, 2001.
- [537] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/17580/7/4/2>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [538] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/17580/7/4/3>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [539] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/17580/7/5/2>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [540] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/17580/7/6/2>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [541] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/17580/7/7/1>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [542] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/17580/7/9/1>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [543] D. L. J. Opdyke, "Menthol racemic", *Food and Cosmetics Toxicology*, vol. 14, p. 473–474, 1976.
- [544] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13758/7/4/3>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [545] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13758/7/5/2>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [546] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13758/7/6/2>", (dostęp online: 09.04.2024).

- [547] R. W. Tennant, B.H. Margolin, M.D. Shelby, E. Zeiger, J.K. Haseman, J. Spalding, W. Caspary, M. Resnick, S. Stasiewicz, B. Anderson, "Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays", *Science*, vol. 236, p. 933–941, 1987.
- [548] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13758/7/8>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [549] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13758/7/9/2>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [550] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13758/7/11/5>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [551] B. Nair, "Final report on the safety assessment of *Mentha piperita* (Peppermint) oil, *Mentha piperita* (Peppermint) leaf extract, *Mentha piperita* (Peppermint) leaf, and *Mentha piperita* (Peppermint) leaf water", *International Journal of Toxicology*, vol. 20, p. 61–73, 2001.
- [552] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/16001/7/3/2>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [553] Strona internetowa PubChem, S. E. Cavender FL, "Glycols Toxicology", <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propylene-Glycol#section=Associated-Disorders-and-Diseases>, (dostęp online: 15.04.2024).
- [554] M. M. Fiume, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, , F.A. Andersen, "Safety assessment of propylene glycol, tripropylene glycol, and PPGs as used in cosmetics", *International Journal of Toxicology*, vol. 31, p. 245S-260S, 2012.
- [555] L. C. Becker, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, L.J. Gill, B. Heldreth, "Safety assessment of glycerin as used in cosmetics", *International Journal of Toxicology*, vol. 38, p. 6S-22S, 2019.
- [556] Strona internetowa PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glicerol> (dostęp online: 15.04.2024).
- [557] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14748/7/4/3>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [558] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14748/7/5/2>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [559] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14748/7/7/2>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [560] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14748/7/7/3>", (dostęp online: 09.04.2024).
- [561] Strona internetowa ECHA, <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14748/7/8>, (dostęp online: 09.04.2024).
- [562] W. Johnson, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, F.A. Andersen, "Safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid and its salts, and benzyl benzoate", *International Journal of Toxicology*, vol. 36, p. 5S-30S, 2017.

- [563] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14748/7/11/5>”, (dostęp online: 09.04.2024).
- [564] Strona Internetowa Kosmopedia, „<https://www.kosmopedia.org/encyklopedia/benzyl-alcohol/>”, (dostęp online: 15.04.2024).
- [565] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/5479/7/4/2>”, (dostęp online: 09.04.2024).
- [566] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/5479/7/5/2>”, (dostęp online: 09.04.2024).
- [567] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/5479/7/6/2>”, (dostęp online: 09.04.2024).
- [568] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/5479/7/7/2>”, (dostęp online: 09.04.2024).
- [569] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/5479/7/8>”, (dostęp online: 09.04.2024).
- [570] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/5479/7/9/2>”, (dostęp online: 09.04.2024).
- [571] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/5479/7/9/3>”, (dostęp online: 09.04.2024).
- [572] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/5479/7/11/5>”, (dostęp online: 09.04.2024).
- [573] L. C. Becker, A. Akinsulie, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, B. Heldreth, “Safety assessment of Eucalyptus globulus (Eucalyptus)-derived ingredients as used in cosmetics”, *International Journal of Toxicology*, vol. 42, p. 57S-92S, 2023.
- [574] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14864/7/4/3>”, (dostęp online: 15.04.2024).
- [575] Strona internetowa ECHA, <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14864/7/9/2>”, (dostęp online: 15.04.2024).
- [576] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14864/7/7/2>”, (dostęp online: 15.04.2024).
- [577] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14864/7/11/5>”, (dostęp online: 15.04.2024).
- [578] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13694/7/4/2>”, (dostęp online: 15.04.2024).
- [579] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13694/7/4/3>”, (dostęp online: 15.04.2024).
- [580] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13694/7/5/2>”, (dostęp online: 15.04.2024).
- [581] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13694/7/6/2>”, (dostęp online: 15.04.2024).
- [582] Strona internetowa ECHA, “<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13694/7/7/3>”, (dostęp online: 15.04.2024).

- [583] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/13694/7/8>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [584] A.M. Api, D. Belsito, S. Bhatia, M. Bruze, P. Calow, M.L. Dagli, W. Dekant, A.D. Fryer, L. Kromidas, S. La Cava, J.F. Lalko, A. Lapczynski, D.C. Liebler, Y. Miyachi, V.T. Politano, G. Ritacco, D. Salvito, T.W. Schultz, J. Shen, I.G. Sipes, B. Wall, D.K. Wilcox, "RIFM fragrance ingredient safety assessment, Eugenol, CAS Registry Number 97-53-0", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 97, p. S25–S37, 2016.
- [585] S. M. Nejad, H. Özgüneş, N. Başaran, "Pharmacological and toxicological properties of eugenol", *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 14, p. 201, 2017.
- [586] M. M. Fiume M.M. Fiume, B. Heldreth, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, A. Andersen, "Safety assessment of microbial polysaccharide gums as used in cosmetics," *International Journal of Toxicology*, vol. 35, p. 5S-49S, 2016.
- [587] W. H. McNeely, P. Kkovacs, "The physiological effects of alginates and xanthan gum", ACS Publications, 1975.
- [588] J. P. Guillot, J. Y. Giauffret, M. C. Martini, J. F. Gonnet, G. Soule, "Safety evaluation of gums and thickeners used in cosmetic formulations", *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 4, p. 53–66, 1982.
- [589] Strona internetowa InChem, "<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v21je13.htm>", (dostęp online: 16.04.2024).
- [590] K. Babíček, I. Čechová, R. R. Simon, M. Harwood, D. J. Cox, "Toxicological assessment of a particulate yeast (1, 3/1, 6)- β -D-glucan in rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, p. 1719–1730, 2007.
- [591] G. Woodard, M. W. Woodard, W. H. McNeely, P. Kovacs, M. T. I. Cronin, "Xanthan gum: safety evaluation by two-year feeding studies in rats and dogs and a three-generation reproduction study in rats," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 24, p. 30–36, 1973.
- [592] M. Ishizaki, S. Ueno, "The DNA-damaging activity of natural food additives (IV)", *Food Hygiene and Safety Science*, vol. 28, p. 498–501, 1987.
- [593] Strona internetowa InChem, "<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v28je17.htm>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [594] Strona internetowa InChem, "<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec04.htm>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [595] M. A. Eastwood, W. G. Brydon, D. M. W. Anderson, "The dietary effects of xanthan gum in man", *Food Additives & Contaminants*, vol. 4,p. 17–26, 1987.
- [596] E. V Sargent, J. Adolph, M. K. Clemmons, G. D. Kirk, B. M. Pena, M. J. Fedoruk, "Evaluation of flu-like symptoms in workers handling xanthan gum powder", *Journal of occupational medicine*, p. 625–630, 1990.
- [597] E. Mortensen, F. Aguilar, R. Crebelli, A. Di Domenico, M. Jose Frutos, P. Galtier, D. Gott, U. Gundert-Remy, C. Lambré, J.C. Leblanc, O. Lindtner, P. Moldeus, P. Mosesso, A. Oskarsson, D. Parent-Massin, I. Stankovic, I. Waalkens-Berendsen,

- R.A. Woutersen, M. Wright, M. Younes, L. Brimer, A. Christodoulidou, F. Lodi, P. Gelgelova, B. Dusemund, "Re-evaluation of xanthan gum (E 415) as a food additive", *EFSA Journal*, vol. 15, p. 4909, 2017.
- [598] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/21299/7/4/3>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [599] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/21299/7/5/2>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [600] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/21299/7/6/2>,"
- [601] P. Cherian, W.F. Bergfeld, Belsito D.V., Cohen D.E. , Klaassen C.D. , Rettie A. , Ross D. , Slaga T.J. , Snyder P.W. , Tilton S. , Fiume M. , Heldreth B., "Sodium Dehydroacetate and Dehydroacetic Acid," *International Journal of Toxicology*, p. 10-76, 2024.
- [602] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/21299/7/9/1>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [603] Strona internetowa Personal Care Council, <https://online.personalcarecouncil.org/ctfa-static/online/lists/cir-pdfs/pr197.pdf>, (dostęp online: 16.04.2024).
- [604] Strona internetowa Kosmopedia, <https://www.kosmopedia.org/encyklopedia/dehydroacetic-acid/>, (dostęp online: 16.04.2024).
- [605] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15256/7/4/2>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [606] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15256/7/5/2>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [607] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15256/7/6/2>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [608] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15256/7/7/3>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [609] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15256/7/8>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [610] R. Tisserand, R. Young, "Essential oil safety: a guide for health care professionals", Elsevier Health Sciences, 2013.
- [611] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15256/7/9/3>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [612] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/15256/7/11/5>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [613] Strona internetowa Kosmopedia, <https://www.kosmopedia.org/encyklopedia/limonene/> (dostęp online: 16.04.2024).
- [614] A. Boudjelal, A. Smeriglio, G. Ginestra, M. Denaro, D. Trombetta, "Phytochemical profile, safety assessment and wound healing activity of *Artemisia absinthium* L.", *Plants*, vol. 9, p. 1744, 2020.
- [615] N. M. Y. Alshibly, "Effect of *Artemisia absinthium* L. on genotoxicity on mice bone marrow cells", 2014.

- [616] T. Muto, T. Watanabe, M. Okamura, M. Moto, Y. Kashida, K. Mitsumori, "Thirteen-week repeated dose toxicity study of wormwood (*Artemisia absinthium*) extract in rats", *The Journal of Toxicological Sciences*, vol. 28, p. 471–478, 2003.
- [617] J. Koch, "Assessment Report on *Artemisia absinthium* L., herba", European Medicines Agency, p. 1–26, 2009.
- [618] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14501/7/4/2>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [619] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14501/7/4/3>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [620] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14501/7/5/2>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [621] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14501/7/6/2>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [622] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14501/7/7/3>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [623] A. M. Api, D. Belsito, D. Botelho, M. Bruze, G.A. Burton, J. Buschmann, M.A. Cancellieri, M.L. Dagli, M. Date, W. Dekant, C. Deodhar, A.D. Fryer, L. Jones, K. Joshi, M. Kumar, A. Lapczynski, M. Lavelle, I. Lee, D.C. Liebler, H. Moustakas, M. Na, T.M. Penning, G. Ritacco, J. Romine, N. Sadekar, T.W. Schultz, D. Selechnik, F. Siddiqi, I.G. Sipes, G. Sullivan, Y. Thakkar, Y. Tokura, "Update to RIFM fragrance ingredient safety assessment, linalool, CAS Registry number 78-70-6", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 159, p. 112687, 2022.
- [624] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14501/7/9/3>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [625] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14501/7/11/1>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [626] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14966/7/6/2>", (dostęp online: 15.04.2024).
- [627] C.M. Chambers, R. Dubakiene, R. Grimalt, B. Jazwiec-Kanyion, V. Kapoulas, C. Liden, J.P. Marty, S.C. Rastogi, J. Revuz, T. Sanner, I.R. White, "Scientific committee on consumer products SCCP opinion on Benzoic Acid and Sodium Benzoate", SCCP, p. 1-29, 2005.
- [628] M. Placzek, W. Frömel, B. Eberlein, K.P. Gilbertz, B. Przybilla, "Evaluation of phototoxic properties of fragrances.", *Acta Dermato-Venereologica*, vol. 87, 2007.
- [629] W. Johnson, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, F.A. Andersen, "Safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid and its salts, and benzyl benzoate," *International Journal of Toxicology*, vol. 36, p. 5S-30S, 2017.
- [630] F. M. Salih, "Risk assessment of combined photogenotoxic effects of sunlight and food additives", *Science of the total environment*, vol. 362, p. 68–73, 2006.
- [631] D. Phthalate, "Opinion of the scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers", 2004.
- [632] Strona internetowa ECHA, "<https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/11008/7/4/2>", (dostęp online: 15.04.2024).

- [633] Regulacje prawne, “Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, Assessment Report Potassium sorbate, Product-type 08 (wood preservative)”, Official Journal of the European Union <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:167:0001:0123:en:PDF>, (dostęp online: 15.04.2024).
- [634] European Commission, “Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives”, EFSA Journal, vol. 13, p. 4144, 2015.
- [635] M. A. Libert, “Final report on the safety assessment of sorbic acid and potassium sorbate”, Journal of the American College of Toxicology, vol. 7, p. 837–872, 1988.
- [636] I. Klaska, J. Nowak, “Rola układu dopełniacza w fi zjologii i patologii”, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, vol. 61, 2007.