



**Uniwersytet Kaliski im. Prezydenta Stanisława Wojciechowskiego**

**WYDZIAŁ MEDYCZNY I NAUK O ZDROWIU**

Dyscyplina naukowa: Nauki o zdrowiu

**Otrzymywanie i zastosowanie biofermentu *Yarrowia* sp. w produktach kosmetycznych do pielęgnacji twarzy podczas retinoidoterapii**

**mgr Ewa Kilian - Pięta**

**Rozprawa doktorska**

Promotor:  
dr hab. Joanna Matysiak, prof. UK  
Promotor pomocniczy:  
prof. dr hab. Daria Szymanowska

Kalisz 2025

*Składam serdeczne podziękowania moim promotorkom Pani dr hab. Joannie Matysiak, prof. UK i Pani prof. dr hab. Darii Szymanowskiej za poświęcony czas, cenne wskazówki oraz wsparcie podczas badań i sporządzania rozprawy doktorskiej.*

*Niniejszą pracę dedykuję mojemu synowi i mężowi.*

## Spis treści

Streszczenie .....	5
<b>I Przegląd literatury</b>	
1. Branża kosmetyczna w ujęciu ogólnym .....	6
2. Oczekiwania klientów branży kosmetycznej .....	9
3. Trądzik – patofizjologia i terapia .....	16
3.1 Etiologia powstawania trądziku .....	16
4.0 Retinoidoterapia .....	24
4.1 Retinoidy jako leki .....	24
4.2 Retinoidy w kosmetyce.....	29
5. Wykorzystanie biotechnologii do otrzymywania innowacyjnych surowców .....	33
kosmetycznych	
<b>II Cel pracy .....</b>	<b>41</b>
<b>III Schemat prac eksperymentalnych .....</b>	<b>42</b>
<b>IV Materiały i metody .....</b>	<b>43</b>
1. Materiały .....	43
1.1 Mikroorganizmy .....	43
1.2 Podłoża mikrobiologiczne .....	44
1.3 Podłoża produkcyjne .....	44
1.4 Surowce kosmetyczne .....	44
1.5 Sól fizjologiczna .....	45
1.6 Opakowania kosmetyczne .....	45
2. Metody .....	46
2.1 Synteza kwasu alfa-ketoglutazarowego przez drożdże <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	46
2.2 Przygotowanie formułacji kosmetycznych .....	47

2.3 Analiza fizykochemiczna .....	55
2.3.1 Odczyn pH .....	55
2.3.2 Lepkość .....	56
2.3.3 Gęstość .....	56
2.3.4 Stężenie metali ciężkich .....	56
2.3.5 Stabilność mechaniczna .....	56
2.3.6 Potencjał antyoksydacyjny .....	57
2.3.7 Analiza chromatograficzna .....	57
2.4 Metody mikrobiologiczne .....	57
2.4.1 Przygotowanie inokulum grzybów .....	57
2.4.2 Przygotowanie inokulum bakterii .....	58
2.4.3 Oznaczanie liczebności drobnoustrojów – metoda zalewowa Kocha .....	58
2.4.4 Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej i prebiotycznej metodą studzienkowo-dyfuzyjną .....	58
2.5 Metody badania formulacji kosmetycznych .....	58
2.5.1 Ocena stabilności produktów kosmetycznych .....	58
2.5.2 Ocena czystości mikrobiologicznej produktów kosmetycznych .....	59
2.5.3 Test kompatybilności masy kosmetycznej z opakowaniem .....	59
2.5.4 Ocena szczelności opakowania .....	59
2.5.5 Test konserwacji .....	59
2.5.6 Ocena organoleptyczna .....	60
2.5.7 Testy dermatologiczne .....	60
2.5.8 Testy aplikacyjno-użytkowe .....	61
2.5.9 Badania aparaturowe .....	63
2.5.10 Badanie stopnia nawilżenia skóry - TEWL .....	63

2.5.11 Badanie poziomu wilgotności skóry - Corneometr .....	64
2.5.12 Poziom elastyczności skóry .....	64
2.5.13 Odczyn pH skóry .....	64
2.6 Dokumentacja wdrożeniowa .....	65
<b>V Wyniki i dyskusja</b>	
1. Biosynteza kwasu alfa-ketoglutarynowego .....	66
2. Przygotowanie formułacji kosmetycznych .....	67
3. Charakterystyka fizyko-chemiczna formułacji kosmetycznych .....	79
4. Test konserwacji .....	82
5. Jakość mikrobiologiczna .....	84
6. Ocena stabilności produktów kosmetycznych .....	87
7. Ocena kompatybilności matrycy kosmetycznej z opakowaniem .....	92
8. Testy starzeniowe kompatybilności matrycy kosmetycznej z opakowaniem .....	94
9. Ocena funkcjonalności formułacji kosmetycznych .....	98
9.1 Potencjał antyoksydacyjny .....	98
9.2 Potencjał przeciwdrobnoustrojowy i prebiotyczny .....	99
10. Badania aparaturowe .....	102
10.1 Ocena miejscowej tolerancji skórnej produktów kosmetycznych: kremu i serum do twarzy .....	102
11. Badania aplikacyjno-użytkowe .....	106
12. Badanie parametrów biofizycznych .....	110
13. Opracowanie treści etykiet .....	121
14. Opracowanie raportu bezpieczeństwa .....	127
<b>VI Wnioski</b> .....	162
<b>VII Literatura</b> .....	162

## Streszczenie

Globalny popyt na produkty proponowane przez branżę kosmetyczną wydaje się być niczym nieograniczony. W ostatnich latach obserwuje się również wzajemne przenikanie się przemysłu kosmetycznego z branżą medyczną, zwłaszcza w dziedzinie dermatologii. Szczególną grupą sygnalizującą zapotrzebowanie na nowe produkty kosmetyczne są pacjenci leczeni retinoidami. Retinoidoterapia jest jedną z bardziej skutecznych metodą leczenia trądziku, łuszczycy oraz innych dermatologicznych schorzeń skóry, działając poprzez regulację odnowy komórkowej skóry. Jednakże stosowanie tej terapii w większości przypadków wiąże się z powstawaniem szeregu działań niepożądanych, takich jak: suchość skóry, podrażnienia, łuszczenie się skóry czy rumień. Zatem bardzo istotne w terapii retinoidami jest odpowiednia dbałość o nawilżenie skóry i regenerację płaszcza hydrolipidowego.

Celem pracy było opracowanie receptur, technologii produkcji i charakterystyka trzech formułacji kosmetycznych przeznaczonych dla osób będących w trakcie i po leczeniu retinoidami.

Hipoteza naukowa zakładała, że zastosowanie płynu pofermentacyjnego uzyskanego na drodze biotechnologicznej przez drożdże *Yarrowia lipolytica* zawierającego m.in. kwas alfa-ketoglutaryny jako biofunkcjonalnego składnika formułacji kosmetycznych, pozwoli na otrzymanie innowacyjnych produktów skutecznych we wspieraniu retinoidoterapii.

W efekcie przeprowadzonych prac opracowano trzy receptury formułacji kosmetycznych – krem do twarzy, serum do twarzy i żel do mycia twarzy. Każda z opracowanych formułacji zawierała funkcjonalny składnik pochodzenia biotechnologicznego. Produkty poddano szczegółowej charakterystyce fizyko-chemicznej, mikrobiologicznej i funkcjonalnej. Przygotowano również dokumentację warunkującą wdrożenie produktów do sprzedaży na polskim rynku.

Ostatecznym wynikiem pracy doktorskiej jest opracowanie trzech innowacyjnych formułacji kosmetycznych o udowodnionych właściwościach biofunkcjonalnych przeznaczonych dla osób stosujących leczenie retinoidami o potwierdzonej stabilności technologicznej i skuteczności działania na skórę.

**Słowa kluczowe:** retinoidoterapia, formułacja kosmetyczna, bioferment natywny, filtrat, kwas-alfaketoglutaryny

# I Przegląd literatury

## 1. Branża kosmetyczna w ujęciu ogólnym

Raporty ekonomiczne, statystyki wskazują, że rynek kosmetyczny od wielu lat, jako jeden z nielicznych nie zanotował regresji sprzedaży a nawet jest zauważalny trend wzrostu popytu i podaży w branży *beauty*. Owy trend był stabilny również podczas światowych kryzysów gospodarczych i politycznych. Wartość rynku kosmetyków wyceniono na 0,31 miliarda dolarów w 2023 r. Przewiduje się, że przemysł rynku kosmetyków wzrośnie z 0,32 miliarda dolarów w 2024 r. do 0,43 miliarda dolarów do 2032 r., wykazując roczną stopę wzrostu na poziomie 3,57% w okresie objętym prognozą (2024 - 2032) (Gupta, 2022). Analizy ekspertów Orbis Research zawarte w raporcie „Global Cosmetics Products Market-Analysis of Growth, Trends and Forecasts (2022-2025)” prognozują, że w latach 2024-2025 nastąpi kolejny wzrost o ponad 7%. Światowy rynek produktów kosmetycznych jest podzielony z uwagi na uwarunkowania geograficzne, status ekonomiczny klientów, ale przede wszystkim z uwagi na ich przeznaczenie. I tak największym zainteresowaniem cieszą się produkty do pielęgnacji skóry twarzy (40%), następnie kosmetyki do pielęgnacji włosów (21%), kosmetyki do makijażu (18%), perfumy i zapachy (11%) oraz przybory toaletowe i dezodoranty (10%) (Gupta, 2022).

Również w Polsce rynek kosmetyczny jest dynamicznie rozwijającym się sektorem gospodarki. Wartość polskiego sektora kosmetycznego, rozumianego jako produkcja powiększona o import oraz pomniejszona o eksport, w 2022 roku została oszacowana na 3,9 mld euro (+1% r/r). Zgodnie z raportem *Cosmetics Europe*, Polska jest szóstym co do wielkości sektorem kosmetycznym w Europie (za Niemcami, Francją, Włochami, Wielką Brytanią oraz Hiszpanią). Największy udział w rynku przypada na segment kosmetyków do pielęgnacji osobistej, którego wartość w 2022 roku wyniosła około 2 mld euro, odpowiadając za aż 51% całkowitej sprzedaży na tym rynku. Wśród nich najpopularniejsze były i nadal są kosmetyki do pielęgnacji twarzy, ciała i włosów. Drugim co do wielkości segmentem są kosmetyki kolorowe, które stanowią około 30% wartości rynku. Szacuje się, że w latach 2025-2026 stopa wzrostu rynku będzie na poziomie +5,5% średniorocznie ([www.chemiaibiznes.pl](http://www.chemiaibiznes.pl)).

W bazie REGON obecnie jest zarejestrowanych jest ponad 1300 podmiotów gospodarczych o wskazanej klasie PKD 20.42 (produkcja wyrobów kosmetycznych i toaletowych), co wskazuje na dużą konkurencyjność. Większość stanowią mikroprzedsiębiorstwa, a 86 firmy zatrudniają więcej niż 10 osób. W sektorze tym pracuje ponad 15 tysięcy osób. Ponad 71% przedsiębiorstw ma kapitał polski, jednak 24 podmioty to te z przeważającym kapitałem zagranicznym i to one odpowiadają za 58% przychodów całej

branży (www.wirtualnekosmetyki.pl). Polski rynek kosmetyczny stopniowo rośnie, a pomioty z polskim kapitałem zwiększają swój udział (przy jednoczesnym wzroście udziału eksportu w przychodach przedsiębiorstwa). W analizowanym okresie 2015-2020 polskie firmy kosmetyczne podwoiły swój udział na rodzimym rynku, osiągając 41% w roku 2020, podczas gdy zagraniczne podmioty w Polsce skurczyły się o około 5%. Pionierem jest niemiecka sieć drogerii Rossmann, której przypisuje się 25% sprzedaży kosmetyków w Polsce. Należy również wskazać, że drogerie są głównym kanałem dystrybucji kosmetyków na rynku detalicznym, co pokazuje Rys. 1 (Raport Banku Zachodniego WBK – „Branża kosmetyczna”, 2017).

**Rysunek 1. Struktura dystrybucji kosmetyków w Polsce z podziałem na płeć i kanał sprzedaży (Raport Banku Zachodniego WBK – „Branża kosmetyczna”, 2017)**



Analizując raport PMR pt. „Handel detaliczny artykułami kosmetycznymi w Polsce 2022, można znaleźć informacje na temat wzrastającej liczby klientów, którzy przy wyborze produktów kosmetycznych kierują się jakością, składem i skutecznością działania, chociaż cena też nie jest bez znaczenia.

Obecnie przemysł kosmetyczny jest jedną z najszybciej rozwijających się gałęzi polskiej gospodarki. Kosmetyki produkowane na naszym rynku trafiają do ponad 130 krajów. Na terenie Polski funkcjonuje około 800 podmiotów w tym firmy międzynarodowe, duże, średnie oraz małe polskie przedsiębiorstwa. Taka struktura zapewnia ogromną różnorodność w



branży i stanowi o jej silnych podstawach. Najwięcej firm należy do grupy małych i mikroprzedsiębiorstw. Pozostali gracze na rynku to duże międzynarodowe koncerny. Na polskim rynku możemy spotkać wielu globalnych producentów jak L'Oréal, Unilever Procter&Gamble, Avon Cosmetics, Beiersdorf (Nivea), Henkel, Colgate, Palmolive. Z kolei największymi dystrybutorami są L'Oréal oraz firma Coty. Warto również podkreślić fakt, że L'Oréal i Oriflame zlokalizowały w Polsce swoje największe zakłady produkcyjne, a Nivea największą, europejską fabrykę. Należy również wspomnieć, że polski rynek kosmetyków to też silne lokalne przedsiębiorstwa. Do największych rodzimych firm należą: Laboratorium Kosmetyczne Dr Irena Eris, Ziaja Ltd Zakład Produkcji Leków, Oceanic, Eveline Cosmetics, Inglot, Bielenda Kosmetyki Naturalne, Delia Cosmetics, Laboratorium Kosmetyczne Floslek Furmanek, Bell, Laboratorium Kosmetyczne Joanna, Fabryka Kosmetyków Pollena Ewa czy Miraculum. Analiza sektora kosmetycznego pokazuje, że rodzimi przedsiębiorcy stawiają na ciągły rozwój. Na naszym rynku ciągle pojawiają się nowe firmy kosmetyczne i marki. Częstym przypadkiem jest zjawisko przejść, które polega na sprzedawaniu dobrze prosperujących podmiotów większym graczom globalnym. Dobrym przykładem takich działań była sprzedaż marek Soraya i Dermika – obecnie w portfolio firmy Orkla Care. Na terenie Polski występują również laboratoria, firmy badawcze, chemiczne, biotechnologiczne oraz producenci opakowań, którzy wzajemnie ze sobą współpracują. Taka infrastruktura pozwala na wykonanie całego procesu produkcyjnego na terenie Polski (Deloitte, kosmetyczni.pl, 2022).

Na kierunku rozwoju światowego rynku kosmetycznego znaczącą wpłynęła pandemia COVID-19, która przyczyniła się do zwiększenia sprzedaży produktów typu żele antybakteryjne, płyny do dezynfekcji, czy produkty o właściwościach przeciwwirusowych. Istotnie obniżyła się produkcja kosmetyków do makijażu (praca w trybie online, ograniczone opuszczanie domu). Z drugiej zaś strony wzrosło zainteresowanie rytuałami pielęgnacyjnymi, które można przeprowadzić w domu. Kwarantanna przyczyniła się do wypracowania nowych rutyn pielęgnacyjnych. Marki produktów do pielęgnacji skóry wykorzystały to na swoją korzyść. Biorąc pod uwagę całą branżę kosmetyczną to w skali świata został zanotowany wzrost wartości przychodu z 483 miliardów dolarów w 2020 roku do 511 miliardów dolarów w 2021 roku. Oczekuje się, że roczne całkowite przychody przekroczą 716 miliardów dolarów do 2025 roku (www.trade.gov.pl).

Nie bez znaczenia dla rynku kosmetycznego ma konflikt zbrojny na Ukrainie. Zaobserwowano zmniejszoną sprzedaż produktów do Rosji, Ukrainy i Białorusi, a także trudności importu surowców z tych państw. Zarówno pandemia COVID-19 jak i wojna na

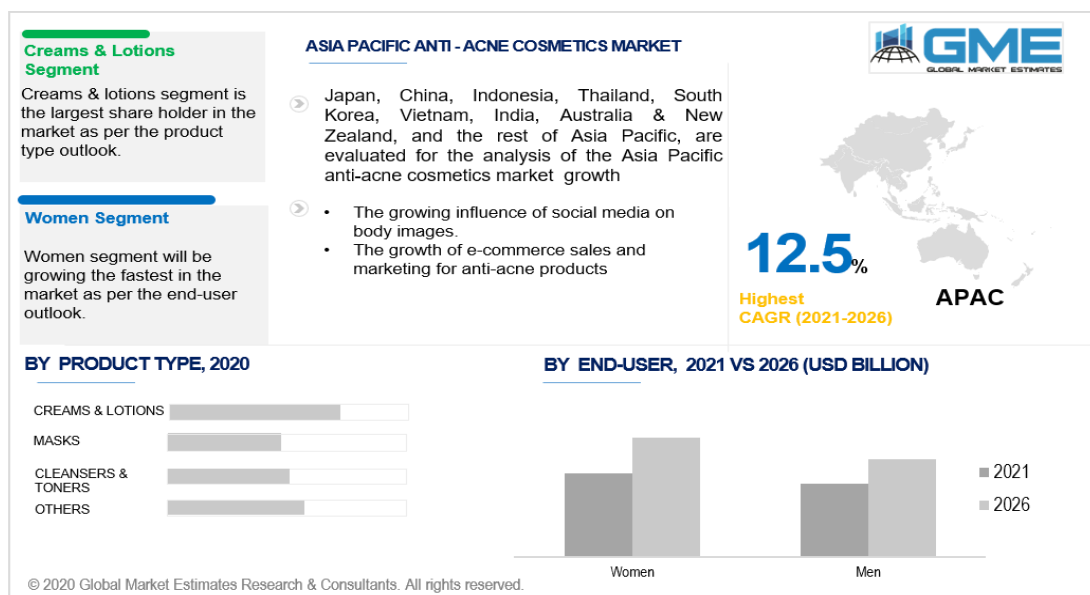
Ukrainie przyczyniły się do wzrostu cen energii, paliw i surowców, co przekłada się również na przemysł kosmetyczny w Polsce.

## **2. Oczekiwania klientów branży kosmetycznej**

Ostatnie lata zmieniły również oczekiwania klientów wobec rynku kosmetycznego. Znaczna ich część poszukuje produktów naturalnych, organicznych i przyjaznych środowisku. W ostatnim czasie rośnie również zainteresowanie kosmetykami wegańskimi i *cruelty-free*. Coraz większym zainteresowaniem cieszą się marki kliniczne i apteczne, w tym głównie kosmetyki o udowodnionych właściwościach przeciwstarzeniowych. I ten ostatni trend jest niezmienny od lat. Starzenie się społeczeństwa jest głównym czynnikiem mającym wpływ na rozwój branży kosmetycznej. Spadek współczynnika dzietności i śmiertelności w ciągu ostatnich lat wskazuje na widoczny trend starzenia się populacji na całym świecie. Silne pragnienie zachowania młodzieńczego wyglądu wśród mężczyzn i kobiet przyczynia się do obserwowanej tendencji wzrostowej sprzedaży na całym świecie. Największym zainteresowaniem cieszą się produkty przeciwmarszczkowe, zapobiegające plamom starczym i je rozjaśniające, produkty dla skóry suchej i podrażnionej oraz preparaty do włosów (zapobiegające wypadaniu, łamliwości itp.). Także statystyki demograficzne wskazują, że starzejącej się grupy klientów będzie przybywać. Oczekuje się, że do 2050 roku liczba ludności w wieku powyżej 60 lat wzrośnie do 2,1 miliarda a średnia długość życia kobiet wzrośnie z 82,8 lat w 2005 r. do 86,3 lat w 2050 r. Natomiast dla mężczyzn oczekiwane zwiększenie długości życia przewiduje się z 78,4 lat (rok 2005) do 83,6 lat ([www.trade.gov.pl](http://www.trade.gov.pl)). Jeszcze kilka lat temu komunikacja z klientem poprzez opis „*anti-aging*” nie cieszyła się aprobatą, co w sposób istotny zmieniło się w roku 2022, w którym to działania marketingowe zostały ukierunkowane na hasła związane z zatrzymaniem zegara biologicznego czy zapobieganiem jego tykania. Warto zwrócić uwagę, że po produkty przeciwstarzeniowe sięgają coraz młodsze osoby. Drugą, równie ważną grupą użytkowników mających wpływ na trendy sprzedażowe branży kosmetycznej są osoby z trądzikiem pospolitym. Schorzenie to dotyka 85% światowej populacji, głównie dzieci i dorosłych od 11 do 30 roku życia. Presja społeczna, obciążenie psychiczne chorych na trądzik i zwiększone użycie kosmetyków przez kobiety jak i mężczyzn będzie napędzać ten sektor kosmetyków przeciwtrądzikowych. Oczekuje się, że światowy rynek kosmetyków przeciwtrądzikowych wzrośnie o 9,8% w 2030 roku. Europejska Akademia Dermatologii i Wenerologii szacuje, że u 95% mężczyzn oraz u 85% kobiet zmiany trądzikowe pojawiły się w pewnym momencie życia. Z czego 40% osób z objawami trądziku cierpiało na postać o nasileniu umiarkowanym do ciężkiego, a ponad 50% miało problemy z trądzikiem w wieku dorosłym ([www.trade.gov.pl](http://www.trade.gov.pl)). Liczby te wskazują na duże zapotrzebowanie na produkty

związane z pielęgnacją skóry trądzikowej wśród nastolatków a także wśród osób dorosłych. Wykorzystanie mediów społecznościowych w zbieraniu danych dotyczących zdrowia i problemów z trądzikiem stało się powszechnym narzędziem badawczym w dermatologii, które może zapewnić wgląd w rzeczywiste potrzeby pacjentów dermatologicznych oraz wskazać potencjalnych klientów kosmetyków do pielęgnacji skóry trądzikowej (Concilla i in., 2022). Bardzo ważnym faktem jest to, że trądzik wśród nastolatków ma wpływ na zdrowie psychiczne, przyczyniając się do niskiej samooceny, a w skrajnych przypadkach depresji oraz myśli samobójczych. Agresywny marketing produktów do pielęgnacji skóry czy leków na trądzik, który był i jest prowadzony na platformie mediów społecznościowych, wzmógł presję psychologiczną i w dużej mierze pomógł w zwiększeniu popytu na te produkty. Zainicjowało to trend, w którym producenci coraz częściej reklamują produkty do pielęgnacji skóry trądzikowej w internecie oraz inwestują w badania zarówno funkcjonujących już na rynku formułacji jak i rozwój innych, nowych, bardziej innowacyjnych. Wielu lekarzy apeluje o wczesną i intensywną interwencję w przypadku ciężkich postaci trądziku, aby zapobiec w późniejszych etapach życia powstawaniu blizn. Rynek kosmetyków przeciwtrądzikowych według typu produktu jest podzielony na maseczki, kremy i balsamy, kosmetyki do mycia skóry i toniki oraz inne. Przy czym oczekuje się, że w przyszłości segment kremów i balsamów będzie miał dominujący udział w rynku. Prognozuje się, że segment „inne” odnotuje najszybszy wzrost sprzedażowy. Sektor produktów kosmetycznych „inne” obejmuje: żele, płyny do mycia twarzy, olejki eteryczne i serum, które można stosować w leczeniu problemów z trądzikiem. Produkty te są kompatybilne z prawie wszystkimi rodzajami skóry, a na rynku dostępne są również specjalistyczne produkty do skór tłustych i mniej tłustych. Biorąc pod uwagę użytkowników końcowych produktów przeciwtrądzikowych rynek kosmetyków do pielęgnacji skóry trądzikowej można podzielić na odbiorców - mężczyźni i kobiety (Rys. 2).

**Rysunek 2. Globalny rynek kosmetyków do pielęgnacji skóry trądzikowej z podziałem na typy produktów oraz użytkowników końcowych prognozy na lata 2021-2026 (www.GlobalMarket EstimatesResearch.com)**



Znaczenie internetu i zwiększająca się liczba platform e-commerce, jak i coraz większa świadomość docelowych odbiorców, szczególnie w krajach rozwijających się będzie motorem wzrostu światowego rynku kosmetyków przeciwtrądzikowych w prognozowanym okresie do roku 2028. Zwiększona dostępność kosmetyków przeciwtrądzikowych w sklepach stacjonarnych i internetowych będzie napędzać rozwój rynku. Wprowadzenie nowych produktów, wykorzystanie organicznych składników i rosnąca popularność aplikacji społecznościowych zwiększają zapotrzebowanie na nowe rozwiązania w technologii kosmetyków.

Przykłady kosmetyków do pielęgnacji przeciwtrądzikowej:

- Cleanance COMEDOMED (Rys. 3) - koncentrat przeznaczony do pielęgnacji skóry tłustej i trądzikowej, zawiera składnik Comedoclastin™, w postaci ekstraktu roślinnego z ostropestu plamistego.

Rysunek 3. Avene Cleanance Comedomed - koncentrat przeciw niedoskonałościom (www.avene.com)

**Ingredients INCI:** Avene Thermal Spring Water (Avene aqua), **Isopropyl alcohol**, PEG-6, Glycerin, **Silybum marianum fruit extract**, silica, Polyacrylate-13, Polyisobutene, Polysorbate 20, Sorbitan isostearate, Water (Aqua).

Deklaracje producenta wskazują, że produkt jest przeznaczony dla skóry z niedoskonałościami, pomaga zmniejszać ryzyko powstawania krost i zaskórników oraz ogranicza ponowne pojawianie się zmian trądzikowych. Produkt w postaci skoncentrowanej formuły zawiera kluczowy składnik aktywny w postaci Comedoclastin i reguluje nadmierne wydzielanie sebum. Wartość dodaną, zdaniem producenta stanowi woda termalna Avene o właściwościach kojących i łagodzących podrażnienia. Składnik aktywny stanowi mieszaninę sklasyfikowaną w Europejskiej bazie chemikaliów (ECHA/rozporządzenie CLP) zarejestrowaną pod nazwą i numerem: *Silybum marianum*, ext. EC Number: 283-298-7 EC Name: *Silybum marianum*, ext. CAS Number: 84604-20-6 Molecular formula: Not available - UVCB substance: IUPAC Name: Extract of Chardon marie without support. Szczegółowe informacje na temat składnika aktywnego, jego zastosowania oraz metody pozyskiwania znajdują się w patencie nr WO2018002338A (Saurat i in., 2018). Treści zawarte w zastrzeżeniu patentowym obejmują między innymi opis sposobu ekstrakcji składników aktywnych z ostropestu plamistego, przy wykorzystaniu rozpuszczalników w postaci mieszaniny alkohol izopropylowy/woda w stosunku 90:10. Uzyskany taką metodą ekstrakt z *Silybum marianum achene* ma zawierać 0,2% sylimaryny. Warto zaznaczyć, że deklaracje działania kosmetyku znajdują również potwierdzenie w dokumentacji z badań *in vitro*, które obejmują analizę

genetyczną. Badania te umożliwiły pomiar poziomu ekspresji genów kodujących enzymy sebogeniczne FADS2 i SCD1 (enzymy biorące udział w syntezie specyficznych lipidów wchodzące w skład łoju, których inhibicja powoduje zmniejszenie aktywności gruczołów łojowych). Wyniki badania w odniesieniu do rozpuszczalnika (izopropanolu) wykazały, że ekstrakt z *Silybum marianum achene* o niskiej zawartości sylimaryny znacząco hamował ekspresję tych dwóch genów, w przeciwieństwie do ekstraktu *Silybum marianum achene* bogatego w sylimarynę. Dokumentacja patentowa zawiera również wyniki badań klinicznych dotyczące leczenia trądziku młodzieńczego w odniesieniu do metodyki badań *in vitro* kosmetyku. Zbadano dziesięciu nastoletnich pacjentów z trądzikiem młodzieńczym, których poddano “terapii” przez okres 18 tygodni kosmetykiem zawierającym ekstrakt z *Silybum marianum achene* o niskiej zawartości sylimaryny. Analizę uzyskanych efektów terapeutycznych prowadzono zgodnie z metodą globalnej analizy stanu klinicznego IGA (ang. Investigator Global Assessment) zaakceptowaną przez FDA (ang. Food and Drug Administration) i stosowaną przez ekspertów dermatologii klinicznej. Uzyskane wyniki wskazały na wyraźną poprawę stanu klinicznego trądziku młodzieńczego w 8 na 10 przypadków, jak i dalszą stabilność uzyskanych wyników. Reasumując, linia produktów Comedomed Avene, została opracowana dla systematycznej, nieinwazyjnej pielęgnacji cery trądzikowej, której działanie jest oparte o potencjał bioaktywny ekstraktu z ostropestu wykazującego właściwości regulującej łoju, jako alternatywę lub wspieranie retinoidoterapii.

- La Roche-Posay Effaclar 2021 (Rys. 4) - EFFACLAR H ISO-BIOME Plus - krem nawilżający; zgodnie z deklaracją producenta produkt zawiera unikalną frakcję o właściwościach prebiotycznych w postaci biomasy, o właściwościach wzmacniających barierę ochronną skóry. Produkt winien być stosowany w celu wspierania prawidłowego funkcjonowania mikrobiomu. Ta unikatowa frakcja w formule jest łączona z niacynamidem, pantenolem, proceradem, skwalanem oraz wyciągiem z ziaren arnoty właściwej. Producent deklaruje skuteczność formuły w oparciu o prebiotyczne działanie składnika *Aqua Posae Filiformis*, który stanowi ekstrakt z komórek bakterii, pozyskiwany na drodze biotechnologicznej. Bioprocess polega na hodowli bakterii z gatunku *Vitroscilla filiformis* w pożywce zawierającej wodę (pochodzenia La Roche-Posay). Działanie tego unikatowego składnika zawierającego biomasę bakterii, naturalnie występujących w wodach termalnych wykazano w pracy doświadczalnej z udziałem probantów ze skórą skłoną do atopii i trądziku (Gueniche i in., 2021).

Rysunek 4. EFFACLAR H ISO-BIOME krem La Roche Posay (www.larocheposay)

**LA ROCHE-POSAY**  
LABORATOIRE DERMATOLOGIQUE

**EFFACLAR H ISO-BIOME KREM**

**NATYCHMIASTOWO I INTENSYWNE KOI, NAWILŻA SKÓRĘ PRZEZ 48H'**

**REGENERUJE BARIERĘ OCHRONNĄ SKÓRY W 1H\*, DZIEŃ PO DNUI ZMNIĘSZA ZACZERWIENIENIA I ŁUSZCZENIE SIĘ SKÓRY**

**LA ROCHE-POSAY**  
LABORATOIRE DERMATOLOGIQUE

**EFFACLAR H ISO-BIOME**  
SON RÉPARATEUR APAISANT  
ANTI-MARQUES  
HYDRATANT LONGUE DURÉE

ULTRA SOOTHING  
HYDRATING CARE  
ANTI-IRRITATION

**BIOPRODUIT**  
DE LA ROCHE-POSAY

**PL EFFACLAR H ISO-BIOME KREM**  
**WSKAZANIA:**  
Skóra wrażliwa, skłonna do trądziku, uwrażliwiona wysuszającymi kuracjami przeciwtrądzikowymi. Twarz i okolice oczu

**INNOWACJA:**  
**Aqua Posae Filiformis** to unikalna prebiotyczna frakcja od La Roche-Posay, pozyskiwana z biomasy, znana jest z właściwości wzmacniających barierę ochronną skóry, aby wspierać prawidłową funkcję mikrobiomu. Zawarta w kojacej, nawilżającej i regenerującej formule z [**Niacynamidem, Panthenolem, Skwalanem oraz wyciągiem z ziaren Arnoty właściwej**], o fizjologicznym pH.

**REZULTATY:**  
Natychnmiastowo i intensywnie koi i nawilża skórę przez 48h\*. Dzień po dniu zmniejsza zaczerwienienia i łuszczenie się skóry. Widocznie zmniejszone niedoskonałości (-49%\*\*), zaskórniki (-16%\*\*\*) oraz przebarwienia.

\*Test instrumentalny.  
\*Badanie kliniczne na 43 osobach, aplikacja 2 razy dziennie, 2 tygodnie stosowania.

**KONSYSTENCJA:**  
Nietłusta, nie klei się. Niekomedogenny. Bez alkoholu etylowego. Testowany pod kontrolą dermatologiczną w połączeniu z przesuszającą kuracją przeciwtrądzikową.

**SPOSÓB UŻYCIA:**  
Natóż na oczyszczoną, suchą skórę twarzy, codziennie rano i wieczorem. Najlepiej użyć przed końcem: patrz opakowanie.

**Ingredients INCI:**  
**Aqua / Water / Eau**, Glycerin, **Squalane**, Dimethicone, **Panthenol**, Zea Mays Starch / Corn Starch, Niacinamide, Ammonium Polyacryloyldimethyl Taurate, Myristyl Myristate, **Bixa Orellana Seed Extract**, Stearic Acid, Potassium Cetyl Phosphate, Glyceryl Stearate Se, Sodium Hydroxide, Myristic Acid, 2-oleamido-1,3-octadecanediol, Pamitic Acid, Hydroxyacetophenone, Capryloyl Glycine, Caprylyl Glycol, **Vitreoscilla Ferment**, Citric Acid, Maltodextrin, Xanthan Gum, Parfum / Frangrance

Warto wskazać, że składnik kosmetyczny znajduje się w europejskiej bazie nomenklatury INCI Cosmille Europe w postaci *Vitreoscilla ferment*. Więcej informacji na jego temat znajduje się w Bazie Europejskiego Urzędu Patentowego pod numerem EP2830588A1, gdzie zdefiniowano ferment (efekt bioprocesu z udziałem bakterii rodzaju *Vitreoscilla* sp.) i wskazano na jego funkcjonalność, która jest związana z zapobieganiem i/lub leczeniem stanów hiperłojotokowych, niezwiązanych ze stanem łupieżu skóry głowy. Składnik aktywny składa się z lizatu mikroorganizmów i całości lub części pożywki hodowlanej, która została wykorzystana w procesie fermentacji. Składnik zawiera frakcję cytoplazmatyczną i cytozolową, fragmenty ściany komórkowej oraz metabolity uwolnione podczas lizy komórek. Ponadto dostępne są dane porównujące lizat komórek *Vitreoscilla filiformis* w stosunku do supernatantu (płyn uzyskany po separacji biomasy komórkowej) w kontekście właściwości antyoksydacyjnych i przeciwstarzeniowych *in vivo/in vitro* (Genard S., 2015). Dodatkowo praca Gueniche i innych (2021) opisuje wyniki badań *in vitro* potwierdzające działanie immunomodulacyjne i łagodzące surowca, z jednoczesnym wskazaniem metody hodowli drobnoustrojów. Warto wskazać, że szczegółowa analiza materiałów źródłowych wskazuje na

rozbieżności pomiędzy deklaracją marketingową pochodzenia i składnika, a jego faktycznym wytworzeniem.

- VICHY NORMADERM Phytosolution (Rys.5) – krem korygujący niedoskonałości dedykowany skórze trądzikowej. Zgodnie z deklaracją producenta produkt zapewnia kompleksową pielęgnację skóry tłustej i trądzikowej z klinicznie potwierdzoną skutecznością. Redukuje niedoskonałości (zmiany zapalne, zaskórniki, widoczne pory oraz przebarwienia potrądzikowe); wpływa regenerująco na skórę, poprawiając jej teksturę i ujednolicając koloryt. Według deklaracji producenta produkt zawiera Bifida Ferment Lysate (BFL), składnik aktywny stanowiący mieszaninę w postaci biofermentu zawierający metabolity drobnoustrojów, fragmenty cytoplazmatyczne i składniki ściany komórkowej i kompleks polisacharydowy otrzymany na drodze hodowli i inaktywacji biomasy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* sp., którego udział w procesie tworzenia surowca polega na biosyntezie korzystnych dla skóry substancji jak aminokwasy, witaminy z grupy B czy związki mineralne. Warto wskazać, że stosowanie produktu ma historię w badaniach klinicznych, w których stwierdzono, że produkt jest przeznaczony do stosowania miejscowego a stosowany w żelu jest bezpieczny i skuteczny w leczeniu łagodnego lub umiarkowanego trądziku (Strugar i in., 2019). W innej pracy wykazano właściwości immunomodulujące składnika BFL w odpowiedzi na stres oksydacyjny indukowany przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wang i in., 2023).



**Rysunek 5. VICHY NORMADERM Phytosolution – krem korygujący niedoskonałości, dla skóry trądzikowej (www.vichy.com)**



**01/03**  
**Kwas salicylowy pochodzenia naturalnego**  
Pozyskiwany z wyciągu z liści roślin zielonych. Posiada działanie keratolityczne (dogłębnie oczyszczające).

**02/03**  
**Kwas hialuronowy naturalnego pochodzenia**  
Nawilża i ujędrnia dla efektu świeżej, promiennej cery.

**03/03**  
**Lizat fermentacyjny produktu bakterii bifida**  
Pochodna probiotyku. Wzmacnia barierę ochronną skóry i zmniejsza jej wrażliwość na czynniki zewnętrzne. Redukuje suchość skóry.

Źródło: [www.vichy.pl/pielęgnacja-twarzy/phytosolution---krem-korygujacy-niedoskonalosci-do-skory-trądzikowej-normaderm](http://www.vichy.pl/pielęgnacja-twarzy/phytosolution---krem-korygujacy-niedoskonalosci-do-skory-trądzikowej-normaderm)

Skład INCI:  
AQUA / WATER - GLYCERIN - **SALICYLIC ACID** - ISONONYL ISONONANOATE - BUTYLENE GLYCOL - KAOLIN - ZINC SULFATE - **BIFIDA FERMENT LYSATE** - SODIUM HYDROXIDE - SODIUM POLYACRYLATE - **SODIUM HYALURONATE** - SODIUM BENZOATE - PHENOXYETHANOL - ASCORBYL GLUCOSIDE - CAPRYLYL GLYCOL - HYDROLYZED ALGIN - TRISODIUM ETHYLENEDIAMINE DISUCCINATE - BIOSACCHARIDE GUM-1 - ACRYLATES/C10-30 ALKYL ACRYLATE CROSSPOLYMER - PARFUM / FRAGRANCE

Dane literaturowe dotyczące testów z wykorzystaniem produktu (Wang i in., 2023) przedstawiają wyniki randomizowanego badania prowadzonego w Hiszpanii i Polsce. Uzyskane dane wskazują, że pielęgnacja skóry produktem w połączeniu z kombinacją adapalenu i nadtlenku benzoilu zapewnia lepszą skuteczność w niwelowaniu niepożądanych zmian u dorosłych kobiet z łagodnym trądzikiem. Publikacja zawiera istotne wyniki opisujące kluczowy parametr jakim jest ilościowy profil lipidowy. Wyniki badania pokazują, że funkcja bariery skórnej uległa poprawie po 90 dniach codziennego stosowania testowej pielęgnacji stanowiącej uzupełnienie ustalonej kombinacji i standardowego emolientu. Autorzy wskazują, że testowa pielęgnacja poprawiła profil wolnych kwasów tłuszczowych, jednocześnie przywracając równowagę profilu form rezerwowych odgrywających rolę w łagodzeniu dyskomfortu skóry. Nie zaobserwowano takiej poprawy w przypadku standardowego emolientu (wariant kontrolny).

### **3. Trądzik – patofizjologia i terapia**

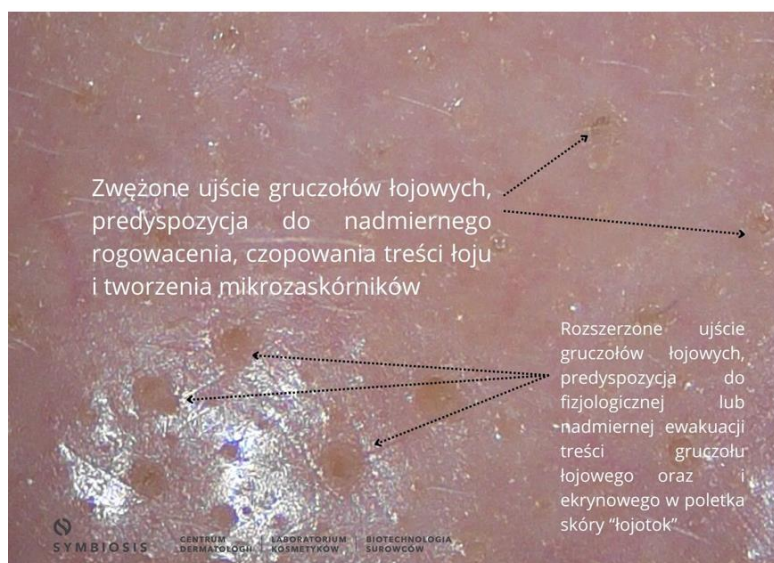
#### **3.1 Etiologia powstawania trądziku**

Powszechnie uważa się, że u podłoża przyczyn powstawania trądziku leży wiele szlaków molekularnych, z których cztery uznano za najistotniejsze w patofizjologii tego schorzenia. Są to: nadmierne rogowacenie mieszków włosowych, nadmierna kolonizacja skóry

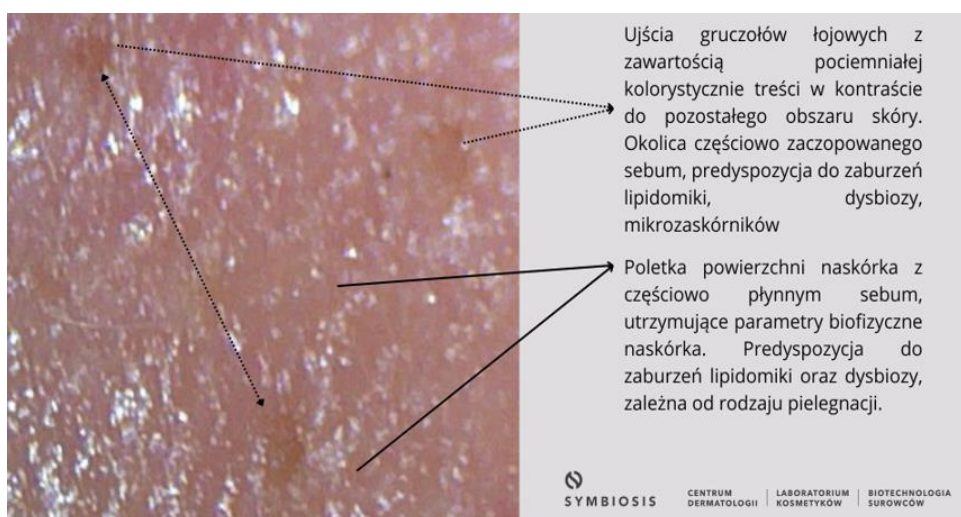
drobnoustrojami z gatunku *Cutibacterium acnes*, nadmierne wytwarzanie sebum i złożone mechanizmy zapalne z udziałem interleukiny-1 (IL-1) oraz czynnika martwicy nowotworu (ang. TNF, *Tumor Necrosis Factor*). W rekomendacjach terapeutycznych podkreśla się, że trądzik jest przede wszystkim chorobą o podłożu zapalnym. Koncepcja „subklinicznego stanu zapalnego” i jego wpływu na rozwój oraz progresję zmian trądzikowych w powiązaniu z kaskadą reakcji procesu zapalnego stanowią główny mechanizm w nowym rozumieniu patogenezy trądziku. Badania prowadzone przez Jeremy i in. (2003) wskazały na nowe elementy dotyczące koncepcji wczesnego przedklinicznego stanu zapalnego w trądziku, który zazwyczaj utrzymuje się przez cały cykl życia zmiany trądzikowej. Badacze udokumentowali przedmianową, folikulocentryczną fazę zapalną trądziku, o czym świadczy wyraźnie zwiększona liczba limfocytów T CD4+; liczba makrofagów; zwiększona ekspresja okołopęcherzykowej IL-1 i zwiększenie ekspresji genów związanych z syntezą naskórkowej  $\alpha$ -integriny. Poziom tych komórek i mediatorów zapalnych jest podwyższony zarówno w skórze normalnej, jak i we wczesnych grudkach u osób z trądzikiem, w porównaniu z prawidłową skórą osób bez trądziku. Dodatkowo u osób z trądzikiem w zmianach występowało zwiększone stężenie mediatorów stanu zapalnego w porównaniu ze skórą niezajętą zmianami.

Inną przyczyną powstawania zmian trądzikowych jest nieprawidłowe złuszczenie się naskórka w okolicy mieszków włosowych, które prowadzi do niedrożności kanału włosowo-łojowego. Choć istnieje wzajemne oddziaływanie między czynnikami patogenetycznymi, prawdopodobnie najważniejsze jest nieprawidłowe rogowacenie, złuszczenie i przerost oraz aktywność gruczołów łojowych. Uważa się, że wszystkie te czynniki razem wywołują mikrozaskórnik, stanowiący początkowo kosmetyczny prekursor wszystkich zmian trądzikowych. Mikrozaskórnik stwarza bowiem warunki patofizjologiczne do zaczopowania treści łoju w gruczole łojowym, wydzielanego pierwotnie w celach fizjologicznych na powierzchnię poletek skóry, w celu utrzymania prawidłowych parametrów biofizycznych bariery naskórkowej (Tanghetti, 2013).

**Rysunek 6. Powierzchnia naskórka z obrazowaniem stanu gruczołów łojowych oraz bez oceny płynności sebum w poletkach skóry. Ocena predyspozycji do mikrozaskórników po eksfoliacji sebum (metoda własna). Okolica przynosowa policzka - mikrokamera DinoCapture.  
Fot. Ewa Kilian-Pięta Centrum Dermatologii Symbiosis 2023.**



**Rysunek 7. Zdjęcie powierzchni naskórka zdrowego z obrazowaniem stanu powierzchni gruczołów łojowych oraz predyspozycji do zaburzeń lipidomiki oraz tworzenia mikrozaskórnika bez eksfoliacji sebum. Okolica przynosowa policzka - mikrokamera DinoCapture.  
Fot. Ewa Kilian-Pięta Centrum Dermatologii Symbiosis 2023.**



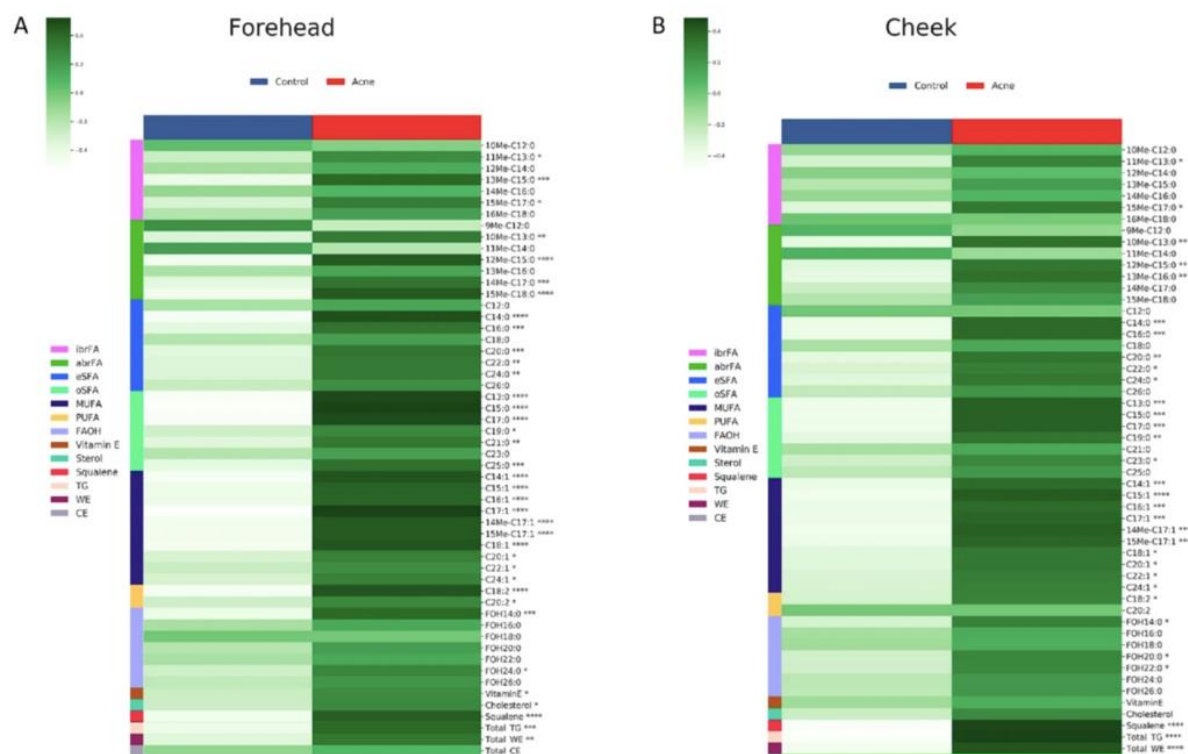
- **Sebum**

Nadprodukcja sebum jest kluczowa w kontekście predyspozycji do powstawania oraz rozwoju trądziku. Zwiększone wydzielanie sebum jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na patogenezę trądziku. Potwierdzona jest dodatnia korelacja pomiędzy szybkością wydzielania sebum a liczbą mikrozaskórników oraz nasileniem zmian

trądzikowych. Ponadto zaburzenie składu płaszcza lipidowego skóry jest ważnym czynnikiem patogenicznego działania sebum. Niedobór kwasu linolowego, wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych i peroksydacja skwalenu zalicza się do czynników wywołujących trądzik. Niezrównoważony stosunek trójglicerydów do estrów wosków oraz wyższy poziom jednonienasyconych kwasów tłuszczowych charakteryzują sebum trądzikowe. Płeć oraz gęstość umiejscowienia gruczołów łojowych i receptorów hormonalnych prawdopodobnie przyczynia się do powstawania różnych typów trądziku. Rozmieszczenie sebum na twarzy jest wówczas nierównomierne, z większą intensywnością w strefie T (czoło-nos-podbródek) w porównaniu do strefy U (kości policzkowe-policzki-szczęka) (Li i in., 2017).

Okoro i in. (2021) przeprowadzili badania nad składem sebum i wykazali, że kontrastuje on z przypadkowymi pomiarami poziomu sebum oznaczonymi za pomocą Sebumetru w tych samych miejscach skóry u pacjentów w podobnym wieku oraz tej samej płci (Rys. 8).

**Rysunek 8. Mapy ciepłone - proporcji lipidów oznaczonych ilościowo (w µg) w sebum pobranym za pomocą plastrów Sebutatepe z czoła (A) i policzków (B). Trójglicerydy (TG), estry wosków (WE) i estry cholesterolu (CE) oznaczono za pomocą HPTLC (wysokosprawne chromatografia cienkowarstwowa), podczas gdy wolne kwasy tłuszczowe (FFA), alkohole tłuszczowe (FOH), skwalen i cholesterol oznaczono ilościowo za pomocą GCMS (chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas) (Okoro i in., 2021)**



Badania porównujące ocenę instrumentalną natłuszczenia naskórka z ilościowym składem sebum są kluczowe w ocenie parametrów biofizycznych naskórka. Dlatego tak ważne jest, aby podczas opracowania receptury kosmetyków przeznaczonych do pielęgnacji skóry poddanej leczeniu retinoidami, uwzględnić dane literaturowe dotyczące zaburzenia składu sebum przed, w trakcie oraz po zakończonej kuracji. Autorzy badania podkreślają, że ogólne wyniki wskazały na wyższe wydzielanie sebum u pacjentów z trądzikiem w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto większa ilość sebum w trądziku zawierała inne proporcje i charakteryzowała się znacznie wyższym poziomem poszczególnych lipidów, tj. skwalenu, cholesterolu, wolnych kwasów tłuszczowych, triglicerydów i estrów wosków (Rys.8). Poziom nieutlenionego skwalenu korelował dodatnio z liczbą zmian oraz występowaniem nadtlenu skwalenu oraz wyczerpaniem się witaminy E w sebum w obszarze zmian trądzikowych. Ta istotna informacja wydaje się być jedną z kluczowych przy projektowaniu kosmetyków przeznaczonych do pielęgnacji cery trądzikowej oraz przy doborze metody leczenia dermatologicznego w połączeniu z pielęgnacją. Na szczególne uwzględnienie zasługują wskazania do użycia dodatków o potencjale antyoksydacyjnym, co w konsekwencji zapewnia działanie ochronne. Autorzy wykazali, że spośród wolnych kwasów tłuszczowych w sebum trądzikowym większość stanowiły te o rozgałęzionych łańcuchach. Na ich poziom wpływa wiele czynników, takich jak synteza *de novo* przez warstwę ziarnistą naskórka (łac. *stratum granulosum*), metabolizm drobnoustrojów skórnych i dieta. Obecny w sebum trądzikowym kwas propionowy jest wytwarzany albo w wyniku metabolizmu drobnoustrojów, albo katabolizmu aminokwasów (Crown i in., 2015). Kwas walerianowy jest prekursorem nieparzystych, prostych łańcuchów C13:0, C15:0, C17:0, których stężenie uznano za jedne z najbardziej podwyższonych przy zmianach trądzikowych. Zwiększona aktywność desaturazy kwasów tłuszczowych prowadząca do wyższego stosunku C16:1/C16:0 została powiązana z inicjującymi trądzik skutkami diety o wysokim ładunku glikemicznym (Smith i in., 2008)). Obniżone stężenie kwasu linolowego zostało odnotowane nie tylko przez powyżej cytowanych autorów, ale również w innych pracach (Downing i in., 1986). Wyższe poziomy skwalenu i mniejsze cholesterolu w trądziku sugerują hamowanie biosyntezy cholesterolu przez skwalen. Warto zaznaczyć, że już w 1995 wykazano działanie absorbujące skwalenu w stosunku do anionów ponadtlennokowych w keratynocytach narażonych na działanie stresu oksydacyjnych, co sugeruje ochronną rolę tej cząsteczki, działającej w połączeniu z dysmutazą ponadtlennokową w warunkach stanu zapalnego (Aioi i in., 1995). Jednak warto zaznaczyć, że gromadzenie nadtlenu skwalenu może indukować odpowiedź zapalną keratynocytów poprzez aktywację enzymu lipooksygenazy zdolnego do wytwarzania sprzężonych wodoronadtlenków poprzez utlenianie

wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Ponadto obserwowana jest większa produkcja cytokin prozapalnych takich jak IL-6. Inni naukowcy zbadali rolę utlenionego skwalenu w rozwoju stanu zapalnego (Ottaviani i in., 2006). W tym celu linię komórkową ludzkich keratynocytów HaCaT potraktowano utlenionym skwalenem. Wyniki wykazały, że skwalen stymulował proliferację komórek i aktywność lipooksygenazy. Ponadto zaobserwowano wzmocnienie NF- $\kappa$ B, kompleksu białkowego funkcjonującego jako czynnik transkrypcyjny regulujący odpowiedź immunologiczną na infekcję, a następnie wzrost ekspresji genów i wydzielania prozapalnej cytokiny IL-6 oraz wywołanie odpowiedzi hiperproliferacyjnej keratynocytów kanałów łojowych. Zatem nadtlenek skwalenu odgrywa ważną rolę w patogenezie trądziku, wywierając działanie prozapalne na jednostkę włosowo-łojową.

- **Keratynizacja**

Zmiany w keratynizacji ujść gruczołów łojowych i mieszków włosowych są integralną częścią patogenezy trądziku. Występują w subklinicznych, „kosmetycznych” stadiach tworzenia się zmian trądzikowych w postaci mikrozaskórników. Filagryna jest kluczowym białkiem budującym naskórek, przyczyniającym się do strukturalnej i funkcjonalnej integralności *stratum corneum*. Jedną z przyczyn zmian trądzikowych lub konsekwencji mikrozaskórników jest wzrost koncentracji filagryny w keratynocytach ułożonych wzdłuż ściany mieszków włosowych. Wykazano również, że bakterie *Propionibacterium acnes* (obecnie *Cutibacterium acnes*) stymulują syntezę filagryny w keratynocytach, a także w eksplantach ludzkiej skóry (Jarrousse i in., 2007). Co ważne, nie wiadomo, czy zmiany w ekspresji genów związanych z biosyntezą filagryny odnotowane przy trądziku są zdarzeniami pierwotnymi czy wtórnymi. Interesująca jest sugerowana koncepcja mówiąca, że zmniejszona zdolność do syntezy filagryny w wyniku mutacji genetycznej bezpośrednio koreluje z mniejszą zdolnością do tworzenia zmian trądzikowych. Jednakże dotychczasowe badania nie dostarczają przekonujących dowodów jednoznacznie potwierdzających tę hipotezę (Fournière i in., 2020).

Korneocyty to martwe komórki, zlokalizowane w warstwie rogowej naskórka. Są spłaszczone i pozbawione jąder. Stanowią końcowy efekt procesu rogowacenia. Korneocyty połączone są ze sobą za pomocą korneodesmosomów. W procesie samozłuszczenia skóry zachodzi „rozpad korneodesmosomów” i następuje uwolnienie korneocytów z powierzchni naskórka. Proces ten jest regulowany przez proteazy serynowe. Inhibitory proteazy serynowej obejmują izoformy inhibitora limfonablonkowego typu Kazal (LEKTI). Kalikreina (KLK podgrupa zewnątrzkomórkowych proteaz serynowych) oddziela się od swoich inhibitorów LEKTI ze względu na niski odczyn pH na powierzchni naskórka. Następuje rozszczepienie zewnątrzkomórkowych części korneodesmosomu i korneocyty zostają usunięte. Skóra skłonna

do trądziku znajduje się w ciągłym stanie subklinicznego stanu zapalnego, którego nasilenie może wzrosnąć w przypadku nałożenia się jednego lub większej liczby wymienionych wcześniej patomechanizmów np. zaburzonego składu sebum, zwiększonej biosyntezy filagryny oraz rogowacenia naskórka zależnego od odczynu pH na jego powierzchni. Ponadto u pacjentów z trądzikiem obserwuje się również zmiany w funkcjonowaniu i integralności bariery skórnej (Stalder i in., 2014).

- **Odczyn pH**

Kwaśny odczyn całej powierzchni skóry po raz pierwszy został wykazany przez Heuss w 1892 roku. Natomiast pierwsze badanie naukowe dotyczące odczynu pH powierzchni skóry przeprowadzili Schade i Marchionini już w 1928 r., nazywając je „płaszczem kwasowym” (Surber i in., 2018). Wcześniej uważano, że pot ekrynowy zawierający kwas mlekowy jest głównym czynnikiem determinującym kwaśne pH warstwy rogowej naskórka. Jednak to wolne kwasy tłuszczowe, będące donorami protonów, powstające w wyniku hydrolizy masłowej min. fosfolipidów naskórka, odgrywają ważną rolę w procesie zakwaszania. Aktywność lipolityczna drobnoustrojów i gruczołów łojowych prowadzi do biosyntezy kwasów tłuszczowych, które gromadzą się na powierzchni skóry, przyczyniając się do jej zakwaszenia. Ponadto kwas urokanowy wytwarzany w wyniku metabolizmu histydyny ma wpływ nie tylko na odczyn pH, ale również na fotoprotekcję naskórka (Krien i in., 2000; ). Oprócz wspomnianych wcześniej mechanizmów pasywnych, aktywne szlaki wymagające energii, takie jak te związane z utrzymaniem prawidłowego stężenia jonów sodu i wodoru, wpływają na pH skóry. Zmiana prawidłowego pH skóry w kierunku zasadowym przyczynia się do dysfunkcji bariery ochronnej, predysponując skórę do szeregu dermatoz zapalnych i infekcyjnych, w tym trądziku pospolitego. Odczyn pH skóry ma bezpośredni wpływ na keratynizację mieszków włosowych. Keratynizacja naskórka wymaga działania kilku enzymów zależnych od pH. Enzymy  $\beta$ -glukocerebrozydaza i kwaśna sfingomielinaza biorą udział w syntezie ceramidów i wymagają odczynu pH w zakresie 5,6-4,5. Tworzenie i przetwarzanie struktur lameralnych w naskórku zachodzi w środowisku kwaśnym i dezorganizuje się w środowisku zasadowym (Nováčková i in., 2021). Krótkotrwały wzrost pH w kierunku neutralnym jest powiązany z aktywacją proteaz serynowych biorących udział w fizjologicznym złuszczeniu się naskórka poprzez degradację desmogleiny (mieszanka kadheryn i glikoprotein biorących udział w tworzeniu desmosomów łączących komórki naskórka). Utrzymująca się aktywność proteazy serynowej, ze względu na stale podwyższone pH, może hamować wydzielanie ciałek blaszkowatych (keratynosomy bogate w ceramidy oraz fosfolipidy tworzące spoiwo międzykomórkowe) i stymulować hiperproliferyzację naskórka (Hachem i in., 2021; Giuseppe I



in., 2021). Ciałka blaszkowate (keratynosomy) znajdują się w ziarenkach keratohialiny i wypełniają komórki tworzące warstwę ziarnistą naskórka. Wydzielane są do przestrzeni międzykomórkowych podczas obumierania keratynocytów, produkując lipidy tworzące spoiwo międzykomórkowe w warstwie rogowej w trakcie końcowego etapu rogowacenia naskórka. Parakeratoza pęcherzykowa (patologiczne rogowacenie, obecność jądrzastych keratynocytów w warstwie rogowej bezjądrzastych komórek naskórka) jest obserwowana w skłonnych do trądziku obszarach twarzy dorosłych, występuje w następstwie rozrostu naskórka i może być konsekwencją nieprawidłowego pH. Fizjologiczne działanie bakteriobójcze na powierzchni naskórka zachodzi przy pH równym 5,5; dzięki obecności i aktywacji dermicydiny oraz azotynów obecnych w pocie. Wraz ze wzrostem pH skóry zmianie ulega mikrobiota skóry, zwłaszcza w zakresie przedstawicieli z gatunków *Cutibacterium acnes* i *Staphylococcus aureus*, których populacja wzrasta wraz z ograniczoną aktywnością peptydów przeciwdrobnoustrojowych (Weller i in., 2001).

- ***Cutibacterium acnes* jako czynnik patofizjologiczny trądziku**

Coraz więcej danych literaturowych wskazuje na powiązanie stanu dysbiozy mikrobioty skóry z patofizjologią trądziku. Szczególne znaczenie nadaje się bakteriom z gatunku *C. acnes*. Są to litofilne, Gram-dodatnie mikroorganizmy stanowiące oportunistyczną mikrobiotę skóry. Dominują w okolicach gruczołów łojowych, w miejscach charakteryzujących się wysokim stężeniem lipidów oraz wilgotnych (Platsidaki i Dessinioti, 2018). Dane literaturowe wskazują na terapeutyczne efekty związane z redukcją populacji bakterii z gatunku *C. acnes* (bezpośrednio przez antybiotyki lub pośrednio przez retinoidy hamujące wytwarzanie sebum). Literatura wskazuje na koncepcję dysbiozy populacji *C. acnes* na skórze dotkniętej trądzikiem w porównaniu ze skórą normalną (Arjun i in., 2020). Należy podkreślić, że *C. acnes* jest gatunkiem zdolnym do biosyntezy lipaz, które mogą hydrolizować trójglicerydy do kwasów tłuszczowych. Zidentyfikowano między innymi enzymy zaliczane do lipaz triacyloglicerolowych (GehA i GehB) (Falcocchio i in., 2006). Oprócz zdolności do hydrolizy lipidów, gatunek ten wykazuje zdolność do syntezy enzymów metabolizujących glikolipidy. W lejku mieszków łojowych zidentyfikowano dwie endoglikoceramidazy wytwarzane przez *C. acnes*. Zakłada się, że białka te aktywują hydrolizę wiązań glikozydowych pomiędzy oligosacharydami i ceramidami glikosfingolipidów, co może odgrywać kluczową rolę w utrzymaniu bariery lipidowej w kopercie rogowej korneocytów. Na tej podstawie można postawić hipotezę, że *C. acnes* może metabolizować glikosfingolipidy (np. gangliozydy) w celu uzyskania dostępu do węglowodanów jako składników odżywczych (Mayslich i in., 2021). Ponadto krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe są wytwarzane przez *C. acnes* podczas



aktywności fermentacyjnej, która zachodzi na powierzchni naskórka. Kwas propionowy, kwas octowy, kwas masłowy i kwas walerianowy są wytwarzane przez *C. acnes*, w szczególności w obecności gliceryny, która stanowi źródło pokarmu dla drobnoustrojów (Shu i in., 2013). Prace Shu i in. (2013) oraz Wang i in. (2018) donoszą, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe mogą hamować wzrost i nadmierną kolonizację bakterii z gatunku *Staphylococcus aureus*. Nakamura i in. (2020) podali, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe wytwarzane przez *C. acnes* mogą hamować tworzenie biofilmu przez *Staphylococcus epidermidis*, choć mechanizm nie jest dotąd poznany. Sanforda i in. (2019) podają natomiast, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe syntetyzowane przez *C. acnes* mogą mieć niekorzystny wpływ na funkcję barierową skóry. Kwasy w określonych warunkach mogą hamować aktywność deacetylazy histonowej w keratynocytach, co w konsekwencji nasila produkcję cytokin. Dlatego istotne jest, aby podczas leczenia trądziku uwzględnić profil składu lipidów obecnych w formule leków oraz kosmetyków stosowanych miejscowo.

Inny mechanizm związany z obecnością *C. acnes* dotyczy wytwarzania porfiryny w szlaku biosyntezy witaminy B12 (kobalaminy). Bakterie wymagają obecności kobalaminy jako kofaktora wielu reakcji enzymatycznych, m.in. dla aktywności mutazy metylomalonylo-CoA, kluczowego enzymu w cyklu Wooda-Werkmana, który prowadzi do biosyntezy propionianu. Podczas syntezy kobalaminy mogą gromadzić się różne cząsteczki prekursorowe, takie jak protoporfiryna IX, uroporfiryna III i koproporfiryna III (Shu i in., 2013). W warunkach beztlenowych wydaje się, że dominuje protoporfiryna IX, podczas gdy w warunkach tlenowych występuje w większej ilości koproporfiryna III. Ilość wytwarzanych porfiryn przez *C. acnes* jest szczepozależna (Shu i in., 2013) Jako działanie niepożądane koproporfiryna III może indukować agregację *S. aureus* i inicjować tworzenie biofilmu). Ponadto koproporfiryna III może wyzwać produkcję cytokin w narażonych na czynnik stresowy komórkach naskórka (Wollenberg i in., 2014).

Dodatkowo bakterie z gatunku *C. acnes* są zdolne do biosyntezy dwóch bakteriocyn - acneciny i tiopeptydu kumycyny. Acnecin to związek, który został zidentyfikowany w 1978 r., ale od tego czasu doniesiono jedynie, że Acnecin ma działanie wyłącznie bakteriostatyczne, a nie bakteriobójcze. Natomiast tiopeptyd kumycyny zidentyfikowano niedawno dzięki genomycznym badaniom porównawczym. Wykazano, że peptyd ten skutecznie eliminuje bakterie z gatunku *S. epidermidis*, zapewniając w ten sposób *C. acnes* przewagę konkurencyjną w procesie kolonizacji skóry (Fujimura i Nakamura, 1978).

## 4. Retinoidoterapia

### 4.1 Retinoidy jako leki

Retinoidy to grupa leków, pochodnych witaminy A, dostępnych w postaci kapsułek do przyjmowania doustnego lub kremów i żeli do stosowania na skórę. Retinoidy przyjmowane doustnie stosuje się w leczeniu różnych postaci ciężkiego trądziku, ciężkiego wyprysku dłoni, który nie reaguje na leczenie kortykosteroidami, ciężkich postaci łuszczycy i innych chorób skóry, a także niektórych rodzajów nowotworów skóry. Do retinoidów zaliczają się takie substancje czynne jak acytretyna, adapalen, alitretynoina, beksaroten, izotretynoina, tazaroten i tretynoina.

Retinoidy stosowane na skórę stosuje się w leczeniu różnych schorzeń skóry, w tym łagodnego i umiarkowanego trądziku (Motamedi i in., 2021). Mechanizm działania retinoidów polega na swoistym działaniu przez wiązanie się z receptorami znajdującymi się w jądrze komórkowym. Wyróżniamy dwa mechanizmy działania ze względu na rodzaj receptorów: RAR (ang. *Retinoic Acid Receptor*), które są receptorami dla kwasu retinowego oraz RXR (ang. *Retinoic X Receptors*) będące receptorami retinoidowymi X. Tretynoina, izotretynoina i tazaroten wiążą się z receptorami RAR, natomiast alitretynoina zarówno z RAR, jak i RXR. Beksaroten jest selektywnym agonistą RXR. Poprzez wiązanie RAR retinoidy wpływają na ekspresję genów zaangażowanych w fizjologiczne procesy proliferacji komórek nabłonkowych między innymi keratynocytów oraz sebocytów - kluczowych w patogenezie powstawania trądziku oraz na aktywację lub tłumienie procesów zapalnych. Ponadto normalizują nieprawidłowe złuszczenie komórek naskórka w trądziku poprzez przyspieszenie proliferacji nabłonka mieszkowego i przyspieszenie złuszczenia korneocytów, które prowadzi do wydalania dojrzałych zaskórników i zahamowanie tworzenia się mikrozaskórników (Motamedi i in., 2021).

Retinoidy zostały dopuszczone do obrotu w wielu państwach członkowskich UE, jednak w przypadku kobiet w ciąży muszą być stosowane zgodnie z warunkami nowego programu zapobiegania ciąży (kobiety w wieku rozrodczym muszą stosować skuteczną metodę antykoncepcji przez 1 miesiąc przed rozpoczęciem leczenia, podczas leczenia i 1 miesiąc po jego zakończeniu). Również retinoidy w stosowaniu miejscowym nie mogą być stosowane przez kobiety ciężarne i kobiety planujące dziecko.

Alitretynoina została dopuszczona na szczeblu centralnym (pozwolenie Komisji Europejskiej) jako lek Panretin do leczenia zmian skórnych u pacjentów z AIDS i mięsakiem Kaposiego. Beksaroten został dopuszczony do obrotu w drodze procedury centralnej jako Targretin do leczenia chłoniaka skóry z komórek T (CTCL, rzadki nowotwór tkanki

limfatycznej). W przypadku retinoidów stosowanych miejscowo (adapalen, alitretynoina, izotretynoina, tazaroten i tretynoina) dostępne dane według EMA - Europejskiej Agencji Leków wskazują, że wchłanianie ogólnoustrojowe po zastosowaniu miejscowym jest znikome i jest mało prawdopodobne, że produkty te spowodują uszkodzenie płodu w przypadku ciężarnych. Jednakże, jako środek ostrożności, również miejscowe stosowanie retinoidów jest przeciwwskazane u kobiet w ciąży i kobiet planujących ciążę. Z innych działań niepożądanych u pacjentów przyjmujących doustne retinoidy rzadko zgłaszano przypadki depresji, lęku pogłębionego przez depresję i zmiany nastroju.

Europejska Agencja Leków (ang. EMA - European Medicine Agency) zapewnia ocenę naukową, nadzór i monitorowanie bezpieczeństwa produktów leczniczych stosowanych u ludzi i do celów weterynaryjnych w UE. Do głównych zadań Europejskiej Agencji Leków należy dopuszczanie do obrotu produktów leczniczych w UE i ich kontrolowanie. Przedsiębiorstwa farmaceutyczne składają do EMA wnioski o pozwolenie na dopuszczenie do obrotu danego produktu leczniczego. Pozwolenia wydaje Komisja Europejska. Przedsiębiorstwa, które otrzymają takie pozwolenie, mogą wprowadzać dany produkt leczniczy do obrotu w całej UE, a także w państwach EOG (kraje objęte europejskim obrotem gospodarczym leków). Z uwagi na szeroki zakres scentralizowanej procedury, większość innowacyjnych leków wprowadzanych do obrotu w Europie jest zatwierdzanych przez EMA. Przegląd dotyczący bezpieczeństwa leków zawierających retinoidy wszczęto w dniu 8 lipca 2016 r. na wniosek Wielkiej Brytanii na podstawie art. 31 dyrektywy 2001/83/WE. Przegląd został najpierw przeprowadzony przez Komitet ds. oceny ryzyka w ramach Nadzoru nad Bezpieczeństwem Farmakoterapii, który wydał zbiór zaleceń. Zalecenia zostały przesłane do Komitetu ds. Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi i ostatecznie zaakceptowane. Opinia Komitetu ds. Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi została przekazana do Komisji Europejskiej, która w dniu 21.06.2018 r. wydała ostateczną, prawnie wiążącą decyzję obowiązującą we wszystkich państwach członkowskich UE. Europejska Agencja Leków zakończyła przegląd leków zawierających retinoidy i potwierdziła, że konieczna jest aktualizacja fragmentu dotyczącego środków zapobiegania ciąży. Ponadto ostrzeżenie dotyczące możliwości wystąpienia zaburzeń neuropsychiatrycznych (depresja, stany lękowe i zmiany nastroju) ma zostać zawarte w drukach informacyjnych dotyczących przepisywania retinoidów doustnych.

- **Leczenie trądziku retinoidami**

Ekspertskie grupy lekarzy specjalistów z zakresu dermatologii zajmujących się trądzikiem konsekwentnie rekomendują, aby pacjenci byli leczeni kombinacją retinoidoterapii i terapii przeciwdrobnoustrojowej. Najnowsze wytyczne Amerykańskiej Akademii

Dermatologicznej (AAD - Guidelines of care for the management of acne vulgaris Publication: Journal of the American Academy of Dermatology, Publisher: Elsevier, Date: May 2024 American Academy of Dermatology, Inc.) i Europejskiego Forum Dermatologicznego (EDF) zgadzają się, że retinoidy odgrywają zasadniczą rolę w leczeniu tej szeroko rozpowszechnionej choroby. AAD stwierdza, że retinoidy są podstawą miejscowej terapii trądziku, ponieważ działają komedolitycznie, usuwają prekursorowe mikrozaskórniki i działają przeciwzapalnie. Pomimo jednolitych zaleceń dotyczących miejscowego stosowania retinoidów, niedawno badanie praktyki przepisywania retinoidów w latach 2012-2014 wykazało, że dermatolodzy przepisywali retinoidy zaledwie w niespełna 60% przypadków, podczas gdy „niederdermatolodzy” przepisywali je tylko w 32 % (Galderma International).

Jednym z ważniejszych leków należących do retinoidów stosowanych w leczeniu trądziku jest izotretynoina (kwas 13- cis -retinowy, 13- cis RA). Izotretynoina jest retinoidową pochodną witaminy A stosowaną w leczeniu ciężkiego, opornego trądziku. Pierwszy produkt zawierający izotretynoinę został zatwierdzony przez FDA 7 maja 1982. Izotretynoina to lek, który jako jedyny wpływa na wszystkie czynniki etiologiczne związane z trądzikiem a mechanizm działania jest związany z wpływem na progresję cyklu komórkowego, różnicowanie i apoptozę komórek (Sapana Desai i Adam Friedman, 2024).

Izotretynoina zmniejsza wydzielanie sebum już po 2 tygodniach stosowania. Dawka 0,5-1,0 mg/kg/dobę radykalnie zmniejsza wydzielanie sebum o około 90% w ciągu 6 tygodni. W przeciwieństwie do tretynoiny (kwas all-trans-retinowego), izotretynoina ma niewielką lub żadną zdolność wiązania się z komórkowymi białkami wiążącymi retinol lub receptorami jądrowymi kwasu retinowego (RAR i RXR), ale może działać jako prolek, który jest przekształcany wewnątrzkomórkowo do metabolitów. Z tej obserwacji wynika, że lek wywiera szybki i silny wpływ na hamowanie wytwarzania sebum. Badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmu działania tego leku, wskazują, że w czasie jego stosowania dochodzi apoptozy komórek łojowych, co w konsekwencji ogranicza produkcję sebum (Nelson i in., 2006). Analiza ekspresji genów w skórze pacjentów z trądzikiem wskazała, że lipokalina 2, która koduje żelatynazę neutrofilową, jest jednym z genów o najwyższym poziomie ekspresji po tygodniu leczenia izotretynoiną, a traci taką aktywność po 8 tygodniach po zaprzestaniu terapii (Nelson i in., 2006). Obserwacje naukowców wskazują zatem, że żelatynaza neutrofilowa pośredniczy we wczesnym działaniu izotretynoiny na gruczoły łojowe.

Terapia izotretynoiną polega na podaniu doustnym. Metabolizm leku zachodzi w wątrobie z udziałem cytochromu P-450, a głównym metabolitem jest 4-okso-izotretynoina. Około 20-30% dawki ulega metabolizmowi na drodze izomeryzacji do tretynoiny. Wydalanie

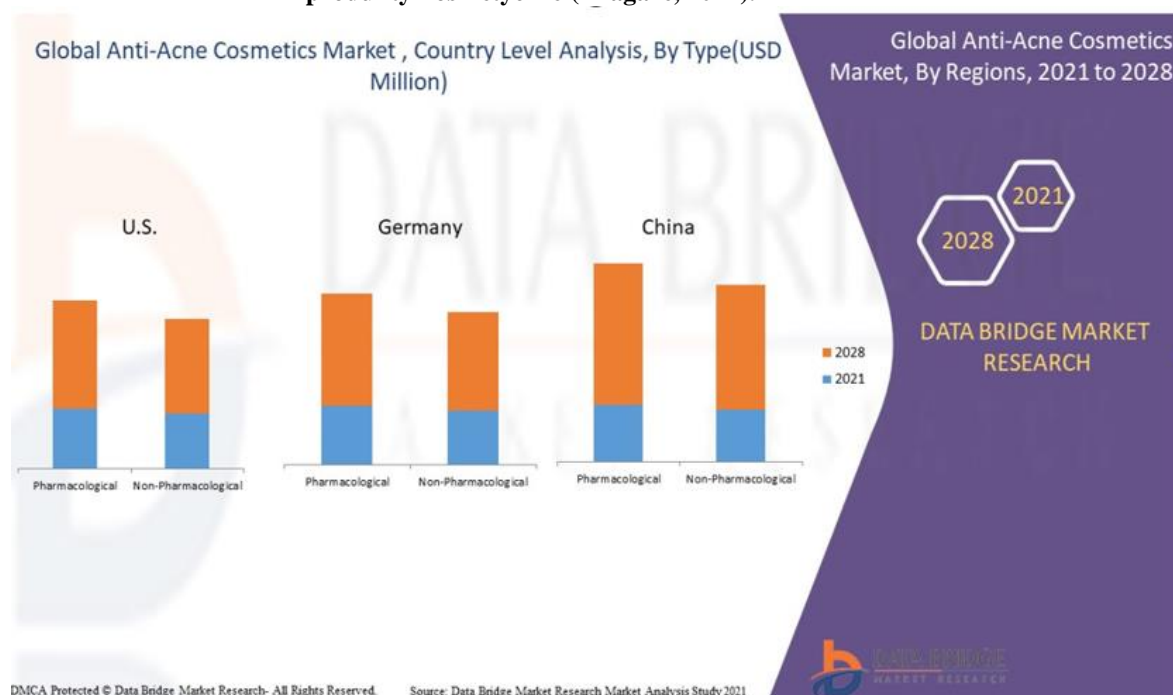
następuje z moczem i kałem. Ważnym parametrem farmakokinetycznym jest czas połowicznego rozpadu. Oznacza on czas, po upływie którego stężenie izotertynoiny we krwi zmniejsza się do połowy. W przypadku związku wyjściowego czas ten wynosi 19 h, a głównego metabolitu 29 h. Po zakończeniu leczenia stężenie retinoidów wraca do poziomu fizjologicznego po około 2 tygodniach. W przypadku stosowania zewnętrznego lek wchłania się wewnątrzustrojowo w bardzo niewielkich stężeniach.

Dawkowanie leku jest ustalane indywidualnie, najczęściej 1-2 razy na dobę, po posiłku, w dawce 0,5 – 1,0 mg/kg mc./d. Zwiększenie dobowej dawki nie pozwala na uzyskanie dodatkowych korzyści. Leczenie trwa 16–24 tygodni (Sapana Desai i Adam Friedman, 2024). W Polsce stosowanych jest kilka preparatów zawierających izotretynoinę, takich jak Aknenormin 10 mg i 20 mg, Curacne 5 mg, 10 mg, 40 mg i Izotek 10 mg i 20 mg.

Wskazaniem do stosowania izotretynoiny są ciężkie postaci trądziku (trądzik guzkowy, skupiony lub trądzik z ryzykiem powstania trwałych blizn) oporne na leczenie lekami przeciwbakteryjnymi działającymi ogólnie oraz lekami stosowanymi miejscowo. W czasie terapii obserwuje się objawy niepożądane związane z hiperwitaminozą witaminy A jak suchość skóry, wysychanie błon śluzowych nosa i gardła, zapalenie czerwieni wargowej, suchość oczu z zapaleniem spojówek i odwracalne zmętnienie rogówek, nietolerancja soczewek kontaktowych (Sapana Desai i Adam Friedman, 2024).

Warto również dodać, że globalny rynek produktów przeciwtrądzikowych jest podzielony według rodzaju branży tj. farmakologiczna (leki) i niefarmakologiczna (kosmetyki). Wielkość światowego rynku leczenia trądziku została wyceniona na 10,8 miliarda USD w 2022 roku. Przewiduje się, że wartość ta wzrośnie do 11,9 mld USD w 2024 roku i do 15,7 mld USD w roku 2030. Kluczowe marki objęte raportem globalnego roku kosmetyków do pielęgnacji cery trądzikowej to Higher Education Skincare, The Proactiv Company Sàrl, Vichy Laboratories, Glaxo Healthcare, La Roche-Posay, L'OREAL SA, Xieon Life Sciences Pvt. Ltd., Urban Skin Rx, Dr. Jart+, COSRX, Johnson & Johnson Services, Inc., Clinique Laboratories, llc, Anacalima, Sesderma, Deciem Beauty Group Inc., Unilever, HUM Nutrition, Inc., GALDERMA, Murad LLC, Circumference Inc., ROHTO Pharmaceutical Co., Ltd. i KOSÉ Corporation (Phagare, 2024).

**Rysunek 9. Prognozy rynku produktów do trądziku na lata 2021-2028 z podziałem na leki i produkty kosmetyczne (Phagare, 2024).**



#### 4.2 Retinoidy w kosmetyce

Naskórek człowieka zawiera dwie główne formy witaminy A - retinol i estry retinyłu. Witamina A jest magazynowana w keratynocytach, a powstaje w reakcji estryfikacji retinolu do estrów retinyłu, katalizowanej przez acetylotransferazę acylo-CoA i acylotransferazę lecytynowo-retinolową. Ekspresja genów związanych z syntezą tych białek enzymatycznych jest modulowana przez promieniowanie UV. Z drugiej strony retinol jest „prowitaminą” kwasu retinowego, utlenia się do aldehydu retinowego, który z kolei utlenia się do kwasu retinowego, biologicznie aktywnej formy witaminy A. Związki w postaci estrów retinyłowych są uważane za formę magazynującą witaminę A.

Witamina A to grupa związków rozpuszczalnych w tłuszczach, do której zalicza się retinol, palmitynian retinyłu, octan retinyłu, linoleinian retinyłu i retinal (retinaldehyd). Informacje dotyczące bezpieczeństwa i klasyfikacji chemicznej zawarte są w Europejskiej Bazie Chemikaliów (ECHA): retinol - CAS: 68-26-8 /11103-57-4, palmitynian retinyłu - CAS: 79-81-2 i octan retinyłu - CAS: 27-47-9, retinaldehyd - CAS: 116-31-4). Charakter chemiczny retinoidów obejmuje wielonienasycony łańcuch lipidowy, a ich właściwości fizyczne zapewniają maksymalną absorpcję w zakresie długości fali od 320 do 390 nm, czyniąc te związki zdolne do interakcji z promieniami UV lub cząsteczkami tlenu, w efekcie czego mogą powstawać reaktywne formy tlenu lub wolne rodniki (Darlenski i in., 2010). Miejscowo zaaplikowany retinol wywiera podobne działanie biologiczne, ale mniej intensywne niż kwas

retinowy. Retinol, podobnie jak jego estry, może ulegać przekształceniu w kwas retinowy, który wykazuje wyższą aktywność biologiczną w keratynocytach. W ten sam sposób retinaldehyd, który ulega przekształceniu w formę magazynującą (estry retinolu - retinyl), jak i w formę aktywną (kwas retinowy), wykazuje lepsze działanie biologiczne niż kwas retinowy (Sheila i in., 2013). Ponadto wykazano, że retinaldehyd wpływa pozytywnie na prawidłowy proces proliferacji naskórka, a także zwiększenie syntezy białka CD44, związanego z biosyntezą hialuronianu w naskórku. CD44 jest polimorficzną glikoproteiną przezbłonową, która ma kilka izoform generowanych w wyniku zmian potranslacyjnych. Wykazano, że dwie główne funkcje CD44 to regulacja proliferacji keratynocytów w odpowiedzi na bodźce zewnątrzkomórkowe oraz utrzymanie lokalnej homeostazy hialuronianu (Kaya i in., 2006). Zmniejszenie biosyntezy CD44 zaobserwowano także u pacjentów cierpiących na liszaj twardzinowy, który prawdopodobnie przyczynia się do odkładania hialuronianu w skórze, a w efekcie zaniku naskórka (Kaya i in., 2006). Głównym wskazaniem do stosowania retinaldehydu i kwasu retinowego jest leczenie heliodermii (tzw. fotostarzenia), która wiąże się ze starzeniem się skóry, często przedwczesnym, wywołanym długotrwałą ekspozycją na słońce. Zmiany chorobowe zależą bezpośrednio od przyjętej dawki słonecznej.

W 2016 r. Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów wydał opinię dotyczącą witaminy A. Za najważniejsze toksykologiczne punkty końcowe uznano teratogeny potencjał witaminy A oraz wpływ tego związku na wątrobę i skórę. Ponadto stwierdzono, że witamina A w postaci retinolu, octanu retinyli, palmitynianu retinyli, w maksymalnym stężeniu 0,05% w balsamach do ciała jest bezpieczna, podobnie jak w stężeniu 0,3% (równoważnika retinolu) w pozostałych produktach do ciała. Jednocześnie produkty do pielęgnacji skóry niemowląt, takie jak balsamy i kremy do ciała, zawierające witaminę A uznano za bezpieczne dla dzieci w wieku 1-3 lat. Warto jednak zaznaczyć, że wskazana opinia nie uwzględnia synergistycznego działania witaminy A docierającej do organizmu człowieka a pochodzącej z różnych źródeł, jak pochodne linoleinianu retinyli i retinal, również z suplementów diety i kosmetyków. Komisja oszacowała, że w sytuacjach ekstremalnych narażenie na witaminę A może prowadzić do przyjętej dziennej dawki ogólnoustrojowej wynoszącej 4855 IU dla osoby dorosłej, co stanowi do 97% UL (ang. *Upper Level*- górny tolerowany poziom spożycia) normy żywieniowej człowieka wynoszącej 5000 IU/dzień witaminy A. Retinol, palmitynian retinyli oraz octan retinyli mają zostać włączone do załącznika III, rozporządzenia UE dotyczącego kosmetyków. Tym samym będą dodane do wykazu substancji, których stosowanie podlega ograniczeniom. Projekt rozporządzenia zakłada, że składniki będą musiały spełniać wymagania związane ze stężeniami granicznymi ustalonymi na poziomy - 0,05% dla balsamów oraz 0,3% dla

pozostałych produktów kosmetycznych. Takie ograniczenia oznaczają, iż produkty dostępne na rynku nie będą mogły zawierać wyższych stężeń retinolu, palmitynian retinyłu oraz octanu retinyłu. Komisja Europejska wskazuje również na obowiązek zamieszczenia informacji na temat ostrzeżeń w stosowaniu witaminy A w kosmetykach.

Poniżej przedstawiono przykłady produktów kosmetycznych zawierających witaminę A.

**PHARMACERIS T PURE RETINOL 0.3 (Rys. 10)** - krem z retinolem przeznaczony dla osób dotkniętych trądzikiem wieku dorosłego. Deklaracja producenta wskazuje, że jest to produkt do codziennej pielęgnacji, na noc, dla osób dorosłych, wymagających efektywnego działania przeciwtrądzikowego wraz z działaniem przeciwzmarszczkowym z tendencją do powstawania niedoskonałości, zmian trądzikowych, zaskórników oraz nadmiernego łojotoku, dla skóry tłustej i mieszanej. Produkt w postaci kremu zawiera wysokie stężenie czystego retinolu (0,3%), wykazuje zrównoważone działanie przeciwtrądzikowe i przeciwzmarszczkowe, stanowiąc skuteczną kurację przywracającą prawidłowe funkcjonowanie skóry w okresie zmian hormonalnych. Dla zbilansowania komfortu skóry, w recepturze zastosowano nawilżające i odżywcze składniki emolientowe (wyciąg z lili, masło Shea, wosk z oliwek, olej z bawełny) oraz 4% biomimetycznego skwalanu, wzmacniającego barierę lipidową naskórka.

**Rysunek 10. Krem Pharmaceris T pureRetinol**

pureRETINOL 0.3  
RETINOL 0.3%  
MASŁO SHEA  
WOSK Z OLIVEK  
SKWALAN BIOMIMETYCZNY  
OLEJ BAWELNIANY

T Alfabet zdrowej skóry

Pharmaceris  
T  
TRĄDZIK  
ZRÓWNOWAŻONE DZIAŁANIE  
PRZECIWTĄDZIKOWO-  
PRZECIWMARSZCZKOWE

pureRETINOL 0.3  
składowany w mikrosferycznych  
nanopowłokach

KREM Z RETINOLEM  
NA TRĄDZIK WIEKU  
DOROSŁEGO  
na noc  
pureRETINOL 0.3  
RETINOL NIGHT CREAM  
ADULT ACNE  
T - ZONE OILY SKIN

retinol 0.3%  
masło Shea  
wosk z oliwek  
biomimetyczny  
olej bawełniany

retinol 0.3%  
Shea butter  
olive wax  
biomimetic squalane  
cottonseed oil

Składniki / INCI:  
Aqua (Water), Hydrogenated Polydecene,  
Squalane, Glycerin, Pentaerythryl  
Tetraistearate, Butyrospermum Parkii (Shea)  
Butter, Cetearyl Glucoside, Cetearyl Alcohol,  
1,2-Xexanediol, Hydrogenated Olive Oil Decyl  
Esters, Gossypium Herbaceum (Cotton) Seed  
Oil, Potassium Cetyl Phosphate, **Retinol**,  
Sodium Polyacrylate, Hydroxyacetophenone,  
Pentylene Glycol, Glyceryl Behenate, Paraffin,  
Xanthan Gum, Polyglyceryl-3 Methylglucose  
Distearate, C10-18 Triglycerides, Tocopheryl  
Acetate, BHA, Stearic Acid, Cera Alba (Beeswax),  
Ceramide NR, Ethylhexylglycerin, Clintonia  
Borealis (Lily) Root Extract, **BHT**,  
Phenoxyethanol, Parfum (Fragrance).

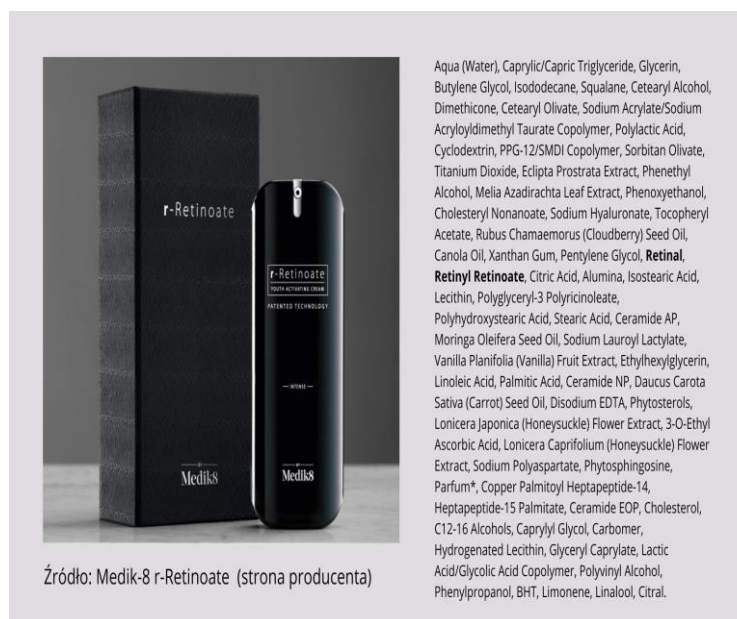
Źródło: Folder reklamowy i opakowanie  
Krem Pharmaceris T pureRetinol



Deklaracja marketingowa producenta sugeruje, że wchodzący w skład produktu retinol został zakapsułkowany w mikrosferycznych, ceramidowych nośnikach, które zapewniają jego stabilność i zabezpieczają witaminę przed utlenianiem. W składzie produktu znajduje się również związek chemiczny – butylohydroksytoluen (BHT), popularny przeciwutleniacz retinolu. W wykazie składników, na etykiecie znajduje się również składnik Ceramid NR. Ceramidy to grupa organicznych związków zaliczanych do sfingolipidów, zbudowanych ze sfingozyny połączonej wiązaniem amidowym z kwasem tłuszczowym. Według nomenklatury “INCI” jest to: Ceramide + kombinacja liter N, A, O, S, P, H. Litery oznaczają związki chemiczne, które są budulcami konkretnych rodzajów ceramidów (“A” oznacza kwasu alpha-hydroksylowy, “N” to niehydroksykwasu tłuszczowe, “S” sfingozyna, a “P” to fitosfingozyna) ([www.ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing](http://www.ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing)). Warto zwrócić uwagę, że skład kosmetyku wskazuje na obecność BHT. Jest to syntetyczny przeciwutleniacz stosowany powszechnie w lekach, kosmetykach i żywności oraz do stabilizacji oksydacyjnej retinolu. Składnik znajduje się w aneksie III Rozporządzenia Kosmetycznego, w którym to znajduje się wykaz substancji, które mogą się znaleźć w kosmetyku wyłącznie we wskazanych stężeniach. Panel ekspertów z Cosmetic Ingredient Review (CIR) stwierdził, że składnik jest bezpieczny w kosmetykach, a w późniejszym czasie doprecyzował bezpieczeństwo w stężeniu 0,8% w kosmetykach spłukiwanych i nie spłukiwanych ([www.ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing](http://www.ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing)).

**Medik-8 R-RETINOATE® INTENSE (Rys.11)** - intensywny krem odmładzający. Deklaracje producenta wskazują, że aldehyd retinowy jest tak samo bioaktywny i skuteczny jak kwas retinowy, a jednocześnie delikatny dla skóry jak tradycyjny retinol. Producent wskazuje również, że badania nad aldehydem retinowym potwierdzają silne działanie antybakteryjne składnika. Dzięki temu produkt r-Retinoate Intense jest ukierunkowany na niwelowanie niedoskonałości (brak stanów zapalnych o etiologii bakteryjnej). r-Retinoate Intense w widoczny sposób redukuje drobne zmarszczki, wyrównuje koloryt skóry i wygładza jej strukturę, zapewniając młodszy wygląd. Połączenie retinoinianu retinyli oraz aldehydu retinowego zapewnia wyraźne odmłodzenie skóry. Dane literaturowe wskazują, że retinoinian retinyli wspomaga syntezę kolagenu osiem razy sprawniej niż retinol (Kim i in., 2003).

## Rysunek 11. Medik 8 r-Retinoate



## 5. Wykorzystanie biotechnologii do otrzymywania innowacyjnych surowców kosmetycznych

Bez dyskusyjnie branża kosmetyczna bardzo intensywnie się rozwija. Obszary, które wymagają zainteresowania ze strony naukowców i producentów kosmetyków skupiają się wokół konieczności opracowania nowych surowców kosmetycznych, przygotowania innowacyjnych formułacji kosmetycznych i rozwijaniu metod pozwalających na ocenę efektywności działania surowców kosmetycznych, jak i gotowych formułacji. Przed branżą kosmetyczną stawiane są nowe wyzwania i definiowane są realne potrzeby.

Obecnie kluczowa jest odpowiedź na potrzebę innowacyjnych surowców do produkcji formułacji kosmetycznych. Wieloletnie doświadczenie i analiza surowców dostępnych na polskim i zagranicznym rynku wskazuje, że istnieje wręcz konieczność opracowania i wdrożenia produktów o dobrze scharakteryzowanym składzie i potwierdzonej skuteczności działania. Większość obecnych na rynku surowców, zwłaszcza tych otrzymanych w procesach biotechnologicznych charakteryzuje się skrajnie niską zawartością substancji aktywnych, co przy udziale takiego surowca w ostatecznej formułacji w stężeniu 0,5-3% pozwala wnioskować, że aktywność takiej substancji aktywnej w produkcie jest znikoma. Kolejnym problemem, z którym borykają się firmy produkujące kosmetyki jest dostępność surowców, importowanych, dotychczas, z takich krajów jak Rosja czy Indie. Ponadto sytuacja polityczna na świecie przyczyniła się do zastoju logistycznych wszystkich importowanych towarów, co w

konsekwencji utrudnia zaplanowaną, kontraktową produkcję. Dlatego też producenci surowców kosmetycznych zgłaszają pilną potrzebę uniezależnienia się od państw dostarczających surowce ze wskazaniem konieczności ich produkcji w rodzimym kraju. Od lat obserwowanych jest kilka kierunków związanych z opracowaniem nowych surowców, które szczególnie chcą być rozwijane w Europie, w tym w Polsce. Pierwszy to roślinne surowce poddawane procesowi fermentacji, przy udziale różnych gatunków drobnoustrojów prozdrowotnych. Proces fermentacji surowców roślinnych w istotny sposób zwiększa ich aktywność funkcjonalną, jak i właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne czy przeciwdrobnoustrojowe. W trakcie procesu fermentacji zachodzi szereg zmian biochemicznych (biotransformacji), jak i syntez nowych związków chemicznych, w postaci metabolitów komórkowych drobnoustrojów (kwas mlekowy, kwas hialuronowy). Samą wartością funkcjonalną są również same lizaty drobnoustrojów (nieaktywne komórki), które wykazują właściwości immunomodulacyjne i immunostymulujące jak i przeciwdrobnoustrojowe. Udział biotechnologii w rozwoju branży kosmetycznej jest również związany z dynamicznym postępem analityki. Nowe metody badawcze pozwalają na lepszą ocenę jakości i funkcjonalności samych surowców jak i ostatecznych produktów kosmetycznych. Do takich metod należy zaliczyć głównie analizę chromatograficzną, badania proteomiczne, testy prowadzone na liniach komórkowych, analizę synergizmu różnych surowców roślinnych, badanie przenikalności substancji aktywnych przez barierę skóry czy analizę zmian zachodzących w skórze probantów (analiza zmiany głębokości zmarszczek, zmianę kolorytu skóry, właściwości fotoprotekcyjne). Nie bez znaczenia jest fakt, że wyżej wymienione metody badawcze stają się coraz bardziej przystępne cenowo w związku z czym producenci coraz chętniej inwestują w ww. badania, których wyniki przyczyniają się do zwiększenia konkurencyjności sprzedawanych surowców/produktów.

### **Mikroorganizmy jako naturalni producenci związków kosmetycznych**

W kosmetologii wykorzystywane są dwie grupy drobnoustrojów - bakterie i grzyby, z rozróżnieniem na pleśnie i drożdże. Obie grupy mikroorganizmów wykazują zdolność do prowadzenia szeregu przemian metabolicznych między innymi poprzez produkcję szeregu białek enzymatycznych. Zdolności enzymatyczne drobnoustrojów są wykorzystywane do prowadzenia procesu fermentacji różnych surowców w efekcie czego powstaje szereg produktów, w tym metabolitów drobnoustrojów o atrakcyjnych właściwościach prozdrowotnych.

Fermentacja to proces biochemiczny, który polega na rozkładzie związków organicznych za pomocą enzymów wydzielanych przez mikroorganizmy. Dzięki fermentacji, zachodzącej w cytoplazmie, drobnoustroje uzyskują energię, którą następnie zużywają podczas procesów

życiowych. Wyróżniamy kilka rodzajów fermentacji: tlenową i beztlenową, co jest uwarunkowane przez rodzaj metabolizmu, który wykorzystują mikroorganizmy prowadzące proces. Można również zastosować podział według produktu, który powstaje w czasie fermentacji jak: fermentacja mlekowa, produkt końcowy - kwas mlekowy, fermentacja octowa - kwas octowy, fermentacja masłowa - kwas masłowy, fermentacja propionowa - kwas propionowy, fermentacja etanolowa - etanol. Fermentacji mogą ulegać surowce roślinne w postaci biomasy pozyskanej z różnych części (świeże i suszone warzywa, owoce, zioła), surowce odpadowe (melasa, wytloki, wody poprocesowe, wycierka ziemniaczana, odpadowy glicerol, nasiona, namok, drożdże browarnicze, serwatka i inne).

Najbardziej znanym w kosmologii metabolitem drobnoustrojów jest kwas mlekowy (ang. *lactic acid*) zwany również kwasem alfa-hydroksypropionowym (ang. *2-hydroxypropanoic acid*), jest on jednym z kwasów alfa-hydroksylogowych (AHA). Związek ten może być otrzymywany na drodze syntezy chemicznej, ale większym zainteresowaniem cieszy się jako metabolit drobnoustrojów wytwarzany głównie metodami biotechnologicznymi z zastosowaniem odpowiednich bakterii fermentacji mlekowych (LAB, ang. *Lactic Acid Bacteria*). Wspólną cechą tej grupy mikroorganizmów jest zdolność biosyntezy kwasu mlekowego jako głównego metabolitu. Fermentacja sacharydów z udziałem LAB zachodzi z wykorzystaniem różnych szlaków metabolicznych. Bakterie fermentacji mlekowej możemy ze względu na metabolizm podzielić na: homofermentatywne, gdy wytwarzają niemal wyłącznie kwas mlekowy; heterofermentatywne, gdy oprócz kwasu mlekowego produkowane są CO<sub>2</sub>, kwas octowy (warunki tlenowe), aldehyd octowy i/lub etanol (warunki beztlenowe) oraz fakultatywnie heterofermentatywne (Pietraszek i in., 2014). W produktach kosmetycznych wykorzystuje się różne stężenia kwasu mlekowego. W zakresie od 1 do 10% wykazuje on właściwości nawilżające, w stężeniach 30-50% występuje w peelingach, pełniąc funkcję głęboko złuszczącą. Kwas mlekowy wykazuje również właściwości antybakteryjne, przeciwstarzeniowe i pełni rolę regulatora pH, jest również jednym z głównych składników NMF, czyli naturalnego czynnika nawilżającego, dzięki czemu wpływa na nawilżenie i nawodnienie skóry, utrzymując prawidłowy poziom wilgoci naskórka (Beer., 2007). Dzięki takiemu działaniu skóra jest miękka, gładka i promienna. Do innych, ważnych cech charakterystycznych można zaliczyć zdolność rozpuszczania w wodzie, alkoholu oraz glikolu propylenowym.

Karotenoidy to duża grupa naturalnych lipofilowych barwników syntezowanych przez rośliny a także mikroorganizmy, szeroko rozpowszechnionych w naturze. Jedną z pierwszych mikrobiologicznych syntez karotenu na skalę przemysłową wykonano w 1996 na terenie

dawnego ZSSR. Od tego czasu znacznie udoskonalono zarówno same szczepy mikroorganizmów-producentów, jak i warunki ich hodowli oraz metody pozyskiwania końcowych produktów. Najbardziej wydajne szczepy to te należące do mikroalg, drożdży oraz grzybów (należące do gatunków *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella*, *Pfaffia rhodozyma*, *Dunaliella salina*, *Rhodotorula glutinis* czy *Blakeslea trispora*) (Duliński., 2019). Związki o charakterze karotenoidów mają bardzo dobre właściwości przeciwutleniające, wykazują zdolność do hamowania reakcji wolnorodnikowych towarzyszących ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe. W reakcjach chemicznych pozwalają na skuteczną neutralizację dwóch najbardziej reaktywnych form tlenu jak singletowy tlen cząsteczkowy i rodniki nadtlenkowe. Najbardziej znanym, szeroko stosowanym w kosmetykach i suplementach diety związkiem należącym do karotenoidów jest  $\beta$ -karoten, pomarańczowy barwnik, który w żywych tkankach jest częściowo utleniany do retinalu, stanowi więc źródło witaminy A. Działanie karotenoidów łączone jest również z pobudzaniem syntezy kolagenu oraz elastyny, poprawę gęstości, elastyczności skóry oraz odbudowę uszkodzonych włókien kolagenowych.

Obecnie jednym z bardziej innowacyjnych dodatków do kosmetyków są bioaktywne peptydy. Odgrywają one ważną rolę w procesie wzrostu komórek skóry, aktywując je do produkcji białek podporowych np. kolagenu. Współtworzą także ochronny płaszcz hydrolipidowy naskórka. Dlatego też są one używane, jako składnik aktywny, obok witamin, kwasów AHA i przeciwutleniaczy w produkcji kremów przeciwzmarszczkowych. Peptydy naturalnie występują w naszym organizmie, powstają podczas biosyntezy białek i pełnią w skórze funkcje przekaźników komórkowych. Z wiekiem ich biosynteza zostaje zaburzona, stąd też istnieje potrzeba pozyskiwania tych związków na drodze biotechnologicznej.

Kwas  $\gamma$ -poliglutaminowy (PGA), to anionowy homopoliamid zsyntetyzowany z jednostek kwasu D- i L-glutaminowego połączonych wiązaniem amidowym pomiędzy grupami alfa-amino-jednego aminokwasu i grupą  $\gamma$ -karboksylową drugiego aminokwasu jest to kolejny związek wytwarzany między innymi przez bakterie z rodzaju *Bacillus* sp. i *Staphylococcus* sp. (Lee i in., 2014). Ten anionowy biopolimer cechuje się biokompatybilnością, biodegradowalnością oraz zdolnością do absorpcji wody. W związku z tym może być stosowany w kosmetykach o właściwościach nawilżających. W jednym z badań sprawdzono aktywność przeciwdrobnoustrojową kwasu  $\gamma$ -poliglutaminowego produkowanego przez *Bacillus subtilis* D7. Zauważono, że PGA hamował rozwój bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, jednakże nie blokował wzrostu patogennych drożdży. Powyższe wyniki sugerują, że stosowanie tego biopolimeru w kosmetykach może wzmacniać działanie środków konserwujących (Danfeng i in., 2022).

Kolejną grupą metabolitów drobnoustrojów są aminokwasy. Największy potencjał do ich biosyntezy mają takie mikroorganizmy jak *Brevibacterium divaricatum*, bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonadaceae* czy z rodzaju *Corynebacterium*. Związki o charakterze aminokwasowym wykazują właściwości nawilżające i regulujące pH skóry. W przemyśle kosmetycznym stosowane są zwłaszcza w preparatach *anti-aging*, dzięki temu, że wykazują działanie złuszczące, antyoksydacyjne i nawilżające (Ratz-Łyko., 2012).

Innym, bardzo popularnym metabolitem produkowanym przez drobnoustroje jest toksyna botulinowa. Wyróżnia się siedem jej typów produkowanych przez różne szczepy bakterii z gatunku *Clostridium botulinum*. W praktyce kosmetycznej są oznaczane jako typ: A, B, C, D, E, F oraz G. Najczęściej stosowana jest terapia botulinowa typu A o komercyjnej nazwie preparatu - Botox. Zastosowanie tej naturalnej toksyny powoduje zahamowanie wydzielania acetylocholino. Zapewnia to prawidłowy przepływ sygnału od nerwów do mięśni, co w konsekwencji prowadzi do rozluźnienia mięśni i wygładzenia zmarszczek.

Keratyna jest również szeroko rozpowszechnionym składnikiem preparatów kosmetycznych. Hydrolizaty keratyny mogą powstawać w procesie hydrolizy enzymatycznej z wykorzystaniem keratynaz. Enzymy keratynolityczne wytwarzane są przez niektóre mikroorganizmy, przykładowo bakterie z rodzaju *Bacillus* sp. (Sajna i in., 2015). Komponent ten jest zalecany do stosowania w szamponach i odżywkach do włosów, które wymagają spłukiwania.

Bardzo ważną grupą związków biofunkcjonalnych są witaminy. Do produkcji witamin na drodze mikrobiologicznej stosuje się fermentację z zastosowaniem mikroorganizmów (beta-karoten, kwas gama-linolowy, kwas orotowy, kwas pantotenowy, prowitamina D3, ryboflawina, tiamina, cyjanokobalamina, witamina F). Do najlepszych producentów witamin zalicza się:

- Witaminy z grupy B - bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* sp., *Ruminococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Clostridium* sp., *Propionibacterium* sp., *Fusobacterium* sp., *Bacteroides* sp.
- Witamina K2 - bakterie z gatunku *Bacillus subtilis*
- Witamina E - *Euglena gracilis*
- Witamina B7 - *Serratia marcescens*
- Witamina B12 - bakterie z gatunku *Pseudomonas denitrificans* i *Propionibacterium shermanii*
- Witamina D - drożdże z rodzaju *Saccharomyces* sp., *Candida* sp. i pleśnie z rodzaju *Trichoderma* sp., *Cephalosporium* sp. i *Fusarium* sp..

Witaminy pełnią w kosmetykach różne funkcje m.in. koenzymów, regulatorów keratynizacji naskórka, substancji nawilżająco-zmiękczejących czy antyutleniaczy. Szczególnie

ważną funkcją witamin jest działanie przeciwutleniające. Wolne rodniki, wytwarzane przez światło ultrafioletowe lub zanieczyszczenia są skutecznie neutralizowane przez witaminy i tracą tym samym zdolność do uszkodzeń komórek skóry (Hancock, 2002). Produkcja witamin na skalę przemysłową odbywa się za pomocą metod syntezy chemicznej lub za pomocą ekstrakcji z naturalnych substancji, jednak w wielu przypadkach są to procesy wymagające dużego nakładu energii i generujące wysokie koszty składowania oraz utylizacji substancji odpadowych. W związku z tym przemysł zaczął poszukiwać możliwości zastąpienia syntez chemicznych, procesami biotechnologicznymi (Duliński., 2010). Obecnie wiele witamin jest wytwarzane takimi metodami. W Tab. 1 zostały przedstawione przykłady witamin produkowanych przez mikroorganizmy.

**Tabela 1. Witaminy produkowane metodami biotechnologicznymi (Duliński, 2010)**

<b>Witamina</b>	<b>Źródło pochodzenia</b>	<b>Metoda pozyskiwania</b>
Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach		
Witamina E	Glon słodkowodny	Fermentacja glukozy
Witamina K2	Mutant szczepu <i>Bacillus subtilis</i>	Fermentacja ekstraktu z soi
Witaminy rozpuszczalne w wodzie		
Witamina C	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Fermentacja sacharozy
	<i>Gluconbacter oxydans</i>	Biotransformacja D-sorbitolu do L-sorbozy w cyklu Reichsteina
Witamina B7	<i>Serratia marcescens</i>	Fermentacja glukozy

Enzymy to kolejna grupa związków o dużym potencjale w przemyśle kosmetycznym. Przykładem jest dysmutaza nadtlenkowa, która ma właściwości zatrzymania tworzenia wolnych rodników i kontroli uszkodzenia skóry spowodowanego przez zanieczyszczenia w powietrzu i wodzie, mikroorganizmy oraz szkodliwe czynniki chemiczne. Kombinacje SOD i peroksydazy

stosuje się w kremach z filtrem przeciwsłonecznym. Są zmiataczami wolnych rodników, przez co zmniejszają rumień. Proteazy w kremach są wykorzystywane do oczyszczania i wygładzania skóry przez usuwanie jej martwych lub uszkodzonych elementów. Endoglikozydaza i papaina są szeroko stosowane w pastach do zębów i płynach do płukania ust, powodują wybielanie zębów, usuwają płytkę nazębną i nieprzyjemny zapach osadów na zębach i tkance dziąseł. Lakaza, oksydaza, peroksydaza i oksydazy polifenolowe są wykorzystywane w preparatach do farbowania włosów, lipazy jak katalaza, papaina, bromelaina, i subtilizyna w preparatach do pielęgnacji skóry, a izomeraza disiarczkowa, oksydaza sulfhydrylowa glutationu i transglutaminaza w produktach wykorzystywanych do falowania włosów.

Pigmenty otrzymywane na drodze biotechnologicznej w przemyśle mogą być wykorzystywane jako substancje barwiące, ale również wykazują szereg różnych właściwości funkcjonalnych jak np.:

- astaksantyna (kolor różowo-czerwony); producenci: *Haematococcus* sp., *Chlorella zofingiensis*, *Neochloris vimmeri*, *Phaffia rhodozyma*; działanie: antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, fotoprotective;
- kanaksantyna (kolor pomarańczowy); producenci: *Bradyrhizobium* sp., *Monascus reseau*, *Haloferax alexandrinus*; działanie antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe;
- zeaksantyna (kolor żółty); producenci: *Staphylococcus aureus*, *Flavobacterium* sp.
- beta karoten (kolor pomarańczowy); producenci: *Blakeslea trispora*, *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Neurospora* sp.; działanie: antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe;
- prodigiozyna (kolor czerwony); producenci: *Serratia marcescens*, *Vibrio* sp., *Alteromonas rubra*, *Pseudoalteromonas rubra*
- ksantomonadyna (kolor żółty); producenci: *Xanthomonas oryzae*; działanie: ochronne przeciw promieniowaniu UV
- melanina (kolor czarny); producenci: *Saccharomyces neoformans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Streptomyces chibanensis*, *Streptomyces kathirae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* sp.; działanie antyoksydacyjne
- piocyjanina (kolor niebieski i zielony); producent: *Pseudomonas aeruginosa*; działanie: cytotoksyczne, przeciwzapalne.

Produkcja pigmentów na drodze biotechnologicznej odbywa się z wykorzystaniem tanich podłoży hodowlanych, a główny produkt ekstrahuje się różnymi technikami analitycznymi za pomocą rozpuszczalników, a następnie identyfikuje się różnymi technikami analitycznymi, jak TLC, UV-vis, FTIR, ESI-MS, NMR, HPLC i chromatografia żelowa. Drobnoustroje są zdolne



do produkcji pigmentów w postaci związanej z biomasą lub wydzielane do podłoża hodowlanego.

Postbiotyki to związki chemiczne bądź fragmenty komórek, których głównym zadaniem jest wspieranie saprofitycznej mikrobioty skóry. Postbiotyki to wszystkie związki bioaktywne, które są produkowane przez bakterie w czasie procesu fermentacji (kwasy tłuszczowe, witaminy, aminokwasy, bakteriocyny, enzymy) a także fragmenty mikroorganizmów i elementy wewnątrzkomórkowe wchodzące w skład biomasy drobnoustrojów (Krzyżostan, 2019). Do produktów kosmetycznych mogą być dodawane jedynie nieaktywne metabolicznie tzw. lizaty drobnoustrojów, najczęściej należące do gatunków *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus helveticus* czy *Lactobacillus plantarum*. Zastosowanie drobnoustrojów w takiej postaci z jednej strony pozwala na pozostawienie funkcjonalności surowca związanej z obecnością drobnoustrojów probiotycznych (immunomodulacja, immunostymulacja, właściwości przeciwdrobnoustrojowe, probiotyczne i antyoksydacyjne), a z drugiej pozwala na zapewnienie bezpieczeństwa kosmetyku. Warunkiem, nawet w przypadku użycia lizatów, jest wykorzystanie mikroorganizmów bezpiecznych, najlepiej tych o udowodnionych właściwościach prozdrowotnych (Krzyżostan, 2019). Warto wskazać, że pozyskiwanie lizatów odbywa się w podwyższonej, jednak nie zbyt wysokiej temperaturze, z uwagi na ochronę związków termolabilnych.

Postbiotyki obecne w produkcie kosmetycznym chronią skórę przed patogenami i innymi niekorzystnymi czynnikami środowiska zewnętrznego. Ponadto wspomagają barierę immunologiczną skóry, jej regenerację oraz łagodzą podrażnienia. Niwelują również efekty starzenia się skóry poprzez przywrócenie jej odpowiedniego pH, osłabienie procesów fotostarzenia i poprawę szczelności bariery naskórkowej (Krzyżostan, 2019).

Drożdże z rodzaju *Yarrowia* sp. charakteryzują się szeregiem właściwości, z których każda może mieć swoje zastosowanie w przemyśle kosmetycznym. Pierwszą kluczową cechą jest skład biomasy drożdży, który stanowią głównie białka i aminokwasy egzogenne (45-50% białka), wysoka zawartość  $\beta$ -glukanów (25-30%), witaminy z grupy B (m.in. B1, B2, B3, B4, B5, B7, B9, B12), witaminy C, D i E oraz tłuszcze nienasycone (ponad 90% ogólnej zawartości tłuszczów). Ponadto stanowią unikalne źródło związków biologicznie aktywnych jak  $\alpha$ -ketoglutaran, jabłczan cytruliny czy koenzym Q10. Dzięki tym właściwościom biomasa drożdży *Yarrowia* sp. wykazuje właściwości immunomodulacyjne, przeciwnowotworowe, stymulujące syntezę białek, przeciwdrobnoustrojowe, prebiotyczne i antyoksydacyjne.

## **II Cel pracy**

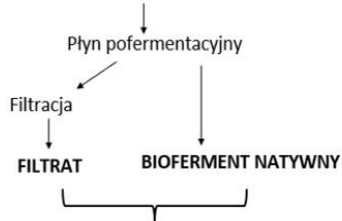
Celem pracy było opracowanie nowej linii produktów kosmetycznych przeznaczonych dla osób w trakcie retinoidoterapii.

Główny cel badań został zrealizowany poprzez wykonanie 4 kluczowych zadań:

1. Opracowanie dwóch innowacyjnych surowców kosmetycznych z wykorzystaniem metod biotechnologicznych.
2. Opracowanie receptury jakościowo-ilościowej trzech formułacji kosmetycznych (serum do twarzy, krem do twarzy i żel do mycia twarzy) z dodatkiem nowo opracowanych surowców.
3. Charakterystyka i ocena bezpieczeństwa, stabilności, właściwości funkcjonalnych nowo opracowanych formułacji kosmetycznych.
4. Przygotowanie dokumentacji warunkującej komercjalizację nowych formułacji kosmetycznych.

### III Schemat prac eksperymentalnych

Synteza kwasu AKG przez drożdże z rodzaju *Yarrowia* sp.



#### Opracowanie 9 formułacji kosmetycznych

- Krem do twarzy z biofermentem natywnym **Kb**
- Krem do twarzy z filtratem **Kf**
- Krem bez dodatku funkcjonalnego **Kk**
- Serum do twarzy z biofermentem natywnym **Sb**
- Serum do twarzy z filtratem **Sf**
- Serum bez dodatku funkcjonalnego **Sk**
- Żel do mycia twarzy z biofermentem natywnym **Zb**
- Żel do mycia twarzy z filtratem **Zf**
- Żel do mycia twarzy bez dodatku funkcjonalnego **Zk**



#### Badania formułacji kosmetycznych

- Analiza fizyko-chemiczna
- Test konserwacji
- Test stabilności
- Testy aplikacyjno-użytkowe
- Testy dermatologiczne
- Testy aparaturowe
- Ocena właściwości biofunkcyjnych
- Potencjał antyoksydacyjny
- Potencjał przeciwdrobnoustrojowy
- Potencjał prebiotyczny
- Ocena kompatybilności masy z opakowaniem



#### Przygotowanie dokumentacji wdrożeniowej

- Opracowanie treści etykiety dla nowo opracowanych produktów
- Przygotowanie raportów bezpieczeństwa
- Kosztorys produkcji nowych produktów kosmetycznych

### IV Materiały i metody

## 1. Materiały

### 1.1 Mikroorganizmy

Mikroorganizmy wykorzystane w trakcie realizacji pracy przedstawia Tab. 2.

Tabela 2. Zestawienie gatunków drobnoustrojów

Lp.	Nazwa gatunku/szczepu	Zastosowanie w pracy
<b>Bakterie</b>		
1	<i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689	Właściwości przeciwdrobnoustrojowe
2	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Właściwości przeciwdrobnoustrojowe
3	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Właściwości przeciwdrobnoustrojowe; test konserwacji
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	Właściwości przeciwdrobnoustrojowe
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4356	Właściwości prebiotyczne
6	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	Właściwości prebiotyczne
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	Właściwości prebiotyczne
8	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 8287	Właściwości prebiotyczne
9	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	Właściwości prebiotyczne
10	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 5289	Właściwości prebiotyczne
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Właściwości przeciwdrobnoustrojowe; test konserwacji
12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	Właściwości prebiotyczne
13	<i>Cutibacterium acnes</i> ATCC 11827	Właściwości przeciwdrobnoustrojowe
14	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Właściwości przeciwdrobnoustrojowe; test konserwacji
15	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Właściwości przeciwdrobnoustrojowe
16	<i>Streptococcus thermophilus</i> DSM 18616	Właściwości prebiotyczne
<b>Grzyby drożdżopodobne</b>		
17	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Właściwości przeciwdrobnoustrojowe; test konserwacji
18	<i>Yarrowia lipolytica</i> KBMŻ_1	Biosynteza kwasu alfa-ketoglutarowego

## 1.2 Podłoża mikrobiologiczne

W pracy wykorzystano następujące podłoża mikrobiologiczne: agar odżywczy z 2% glukozą, bulion odżywczy, MRS broth, MRS agar, Sabouraud CAF Agar, YPD. Podłoża zakupiono w firmach BTL Polska Sp. z o.o. (Warszawa), Merck KGaA (Niemcy), Oxoid Ltd (Anglia) i Liofilchem S.r.l. (Włochy). W celu oznaczenia liczebności określonych drobnoustrojów wykorzystano następujące podłoża mikrobiologiczne: Muller-Hinton agar, bioMerieux (ogólna liczba drobnoustrojów), chromogenic CPS, bioMerieux (*Enterococcus* sp. i *Escherichia coli*), Biovare – ENDO, Heipha (potencjalnie patogenne *E. coli*), TSC, Biocorp (beztlenowe bakterie z rodzaju *Clostridium* sp.), MRS agar, Oxoid (bakterie z rodzaju *Lactobacillus* sp.), CHROM agar Candida (*Candida* sp.), CHROM agar Company (*Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp.).

## 1.3 Podłoża produkcyjne

W pracy wykorzystano podłoże produkcyjne w celu syntezy kwasu alfa-ketoglutazarowego (AKG). Skład podłoża wykorzystanego w pracy nad selekcją bakterii zdolnych do syntezy AKG przedstawiono w Tab. 3. Skład podłoża produkcyjnego dla drożdży *Y. lipolytica* zdolnych do syntezy AKG wytypowano na podstawie badań przeprowadzonych przez Maciejewską-Gil (2023).

**Tabela 3. Skład podłoża produkcyjnego**

Składnik pożywki	Stężenie (g/L)
Glicerol bezwodny	100,0 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,4 g/L
NaCl	1,0 g/L
Tiamina	3,0 µg/L

## 1.4 Surowce kosmetyczne

Surowce stosowane do przygotowania formułacji kosmetycznych przedstawia Tab. 4.

**Tabela 4. Zestawienie surowców kosmetycznych wykorzystanych do przygotowania formułacji typu krem do twarzy, serum do twarzy i żel do mycia twarzy**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Dystrybutor
1	Woda	Aqua	Woda wodociągowa
2	Mocznik	Urea	Adara Company
3	D-panthenol	Panthenol	Adara Company
4	Gliceryna farmaceutyczna roślinna	Glycerin	Adara Company

5	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	Adara Company
6	Emulpharma K10 RSPO MB	Cetearyl Glucoside, Sorbitan Oliviate, Cetearyl Alcohol	Adara Company
7	Masło shea	Butyrospermum Parkii Butter	Adara Company
8	Olej z ogórecznika lekarskiego	Borago Officinalis Seed Oil	Adara Company
9	Witamina E	Tocopheryl Acetate	Adara Company
10	Kaprynian kokosowy, trójgliceryd kaprylowo-kaprynowy	Coco Caprylate/Caprata, Caprylic/ Capric Triglyceride,	Adara Company
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	Adara Company
12	Dibursztynian trisodowo-etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	Enzym Sp. z o.o.
13	Kwas cytrynowy 3%	Citric Acid	Enzym Sp. z o.o.
14	Pelargonian poliglicerylu-4	Polyglyceryl-4 Pelargonate	Enzym Sp. z o.o.
15	Bioferment natywy	<i>Yarrowia lipolytica</i> Ferment Lysate, Alpha-Ketoglutaric Acid, Propionic Acid, Citric Acid	Wyrób własny
16	Filtrat	<i>Yarrowia lipolytica</i> Ferment Filtrate Alpha-Ketoglutaric Acid, Propionic Acid, Citric Acid	Wyrób własny

### 1.5 Sól fizjologiczna

Roztwór soli fizjologicznej stosowano w celu wykonania szeregów rozcieńczeń w czasie wykonywania analiz mikrobiologicznych jak również do przygotowania zawiesin drobnoustrojów wskaźnikowych (testy konserwacji). W celu przygotowania roztworu o stężeniu 0,9 % odważano 9 g NaCl i rozpuszczano w 1 L wody destylowanej. Gotowy roztwór poddano sterylizacji w 121°C przez 15 minut.

### 1.6 Opakowania kosmetyczne

Nowoopracowane produkty konfekcjonowano do docelowych opakowań jednostkowych, które stanowiły butelki z PP (polipropylen) typu airless o pojemności 30 ml dla serum do twarzy i 50 ml dla kremu do twarzy oraz transparentną butelkę PET (polietylen) o objętości 200 ml z pompką dozującą dla żelu myjącego. Opakowania zostały zakupione w sklepie internetowym [www.centrumopakowan.pl](http://www.centrumopakowan.pl).

## 2. Metody

### 2.1 Synteza kwasu alfa-ketoglutazarowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica*

Hodowlę produkcyjną prowadzono z wykorzystaniem bioreaktora z mieszadłem mechanicznym Biostat C+ firmy Sartorius o objętości całkowitej 30 L. Objętość podłoża produkcyjnego wynosiła 20 L, natomiast inokulum 2 L. Proces prowadzono w 30°C ze stałym natężeniem przepływu powietrza (1 vvm tj. 20 L/min lub 100 L/min) oraz automatycznie zmieniającą się szybkością obrotów mieszadła utrzymującą stężenie rozpuszczonego tlenu w podłożu na minimalnym poziomie 30%. Wartość pH była utrzymywana na stałym poziomie 3,5 za pomocą automatycznego dozowania 30% wodorotlenku sodu. Hodowle prowadzono przez 8-9 dni. Próby pobierano co 24 godziny i analizowano w aspekcie stężenia metabolitów (analizy chromatograficzne), liczebności drożdży (posiewy mikrobiologiczne) oraz stężenia biomasy drożdży. Ponadto podczas trwania procesów rejestrowano objętość pobranego roztworu NaOH oraz zmiany stężenia rozpuszczonego tlenu w podłożu oraz związane z tym zmiany szybkości obrotów mieszadła. Po zakończeniu hodowli, płyn pofermentacyjny wraz z zawieszoną w nim biomasą poddano obróbce technologicznej w celu łagodnej inaktywacji zawartych w płynie mikroorganizmów. Zostały przetestowane takie metody jak naprzemienna inkubacja we wrzącej łąźni wodnej i natychmiastowe schładzanie w środowisku ciekłego azotu, w trzech interwałach czasowych (3 x po 10 min/1 min) oraz dezintegracja w młynku kulkowym przez 20 minut. Podstawowym wskaźnikiem, pozwalającym na ocenę efektywności zastosowanych zabiegów była liczba żywych komórek, które pozostały po procesie inaktywacji; w efekcie przeprowadzonych zabiegów uzyskano płyn pofermentacyjny zawierający „lizat”. W kolejnym etapie uzyskany bioferment podzielono na dwie części. Pierwszą stanowił natywny bioferment zawierający nieaktywną biomasę drożdży *Yarrowia lipolytica* wraz z metabolitami drobnoustrojów, w tym kwas alfa-ketoglutazarowy, drugą natomiast stanowił bioferment pozbawiony biomasy drobnoustrojów uzyskany poprzez filtrację natywnego biofermentu przez membranę o wielkości por 0,22 mikrometra.

## 2.2 Przygotowanie formułacji kosmetycznych

W ramach realizowanej pracy przygotowano 9 formułacji kosmetycznych (Tab.5).

Tabela 5. Oznaczenie przygotowanych formułacji

LP	Opis formułacji	Oznaczenie formułacji
1	Krem do twarzy zawierający bioferment natywny	Kb
2	Krem do twarzy zawierający filtrat pozbawiony biomasy	Kf
3	Krem do twarzy, bez dodatku biofunkcjonalnego (kontrola)	Kk
4	Serum do twarzy zawierające bioferment natywny	Sb
5	Serum do twarzy zawierające filtrat pozbawiony biomasy	Sf
6	Serum do twarzy, bez dodatku biofunkcjonalnego (kontrola)	Sk
7	Żel do mycia twarzy zawierający bioferment natywny	Żb
8	Żel do mycia twarzy zawierający filtrat	Żf
9	Żel do mycia bez dodatku biofunkcjonalnego (kontrola)	Żk

Szczegółowe składy formułacji wraz ze wskazaniem znaczenia składników przedstawiono w tabelach 6-11.

Pierwszą przygotowaną formułacją był krem nawilżający do twarzy typu emulsja O/W (Tab. 6-7). Składniki fazy I dodano do wody i mieszano do rozpuszczenia poszczególnych substancji podgrzewając na mieszadle magnetycznym, do osiągnięcia temperatury 70°C. Następnie składniki fazy II wymieszano ręcznie w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny i dodano do fazy I w celu zagęszczenia układu fazy wodnej. Połączone fazy I i II mieszano ręcznie a następnie homogenizowano przez 1 min celem uzyskania jednorodnej krystalicznej żelowej konsystencji za pomocą IKA T 50 homogenizator Ultra-Turrax z prędkością obrotową 6000 obr./min. W trakcie przygotowania fazy I i II, naważono do zlewki składniki fazy III (faza tłuszczowa). Po naważeniu, zlewkę umieszczono w łaźni wodnej i ogrzano do temperatury 70°C w celu stopienia składników. Po uzyskaniu klarownego roztworu, uzyskaną mieszaninę tłuszczową (faza III) dodano powoli do zlewki fazy wodnej, żelowej (fazy I i II) jednocześnie homogenizując 10000 obr./min 2 min. Następnie zlewkę z emulsją umieszczono pod mieszadłem mechanicznym, kontynuując proces mieszania do schłodzenia emulsji do temperatury 40°C. Następnie dodano kolejno składniki fazy IV oraz zmierzono odczyn pH emulsji. Odczyn pH wynosił 4,5 wobec czego dodano regulator alkalizujący (wodorotlenek sodu) do osiągnięcia pH 5,0-5,5 by zachować fizjologiczny zakres działania na leczony naskórek. Kolejnym etapem tworzenia formuły kremu było dodanie składników fazy IV, które



naważono po schłodzeniu masy do 40°C i dodano kolejno podczas mieszania. Jako układ konserwujący wykorzystano mieszaninę soli sodowej kwasu lewulinowego oraz sorbinianu potasu. Kolejnym dodanym składnikiem fazy IV był dibursztynian trisodu etylenodiaminy. Następnym składnikiem fazy IV dodanym podczas tworzenia formułacji kremu był składnik aktywny w postaci natywnego biofermentu zwierającego (nieodwirowaną) biomasę drożdży *Yarrowia lipolytica* (Kb) lub w postaci samego filtratu (Kf), pozbawionego biomasy drożdży. Formuła po dodaniu została poddana ponownie homogenizacji 10000 obr/min. przez 3 min w celu poprawy jednorodności i dyspersji składnika aktywnego w emulsji. Zastosowano 10% stężenie biofermentu/filtratu.

**Tabela 6. Skład kremu do twarzy ze składnikiem biofunkcyjnym**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
Faza I				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Mocznik	Urea	3,0	humektant
3	D-panthenol	Panthenol	1,0	składnik aktywny
Faza II				
4	Gliceryna farmaceutyczna roślinna	Glycerin	3	humektant
5	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,2	zagęstnik
Faza III				
6	Emulpharma K10 RSPO MB	Cetearyl Glucoside, Sorbitan Olivat, Cetearyl Alcohol	5,0	emulgator
7	Masło shea	Butyrospermum Parkii Butter	1,0	emolient
8	Olej z ogórecznika lekarskiego	Borago Officinalis Seed Oil	2,0	emolient
9	Witamina E	Tocopheryl Acetate	1,0	antyoksydant
10	Kaprynian kokosowy, trójgliceryd kaprylowo-kaprynowy	Coco Caprylate/Caprata, Caprylic/ Capric Triglyceride,	4,0	emolient
Faza IV				
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5	konserwant

12	Dibursztynian trisodowo-etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1	substancja chelatująca
13	Bioferment natywy / Filtrat	Yarrowia lipolytica Ferment Lysate, Alpha-Ketoglutaric Acid, Propionic Acid, Citric Acid/ Yarrowia lipolytica Ferment Filtrate Alpha-Ketoglutaric Acid, Propionic Acid, Citric Acid	10	substancja aktywna

Wariant kontrolny kremu wykonano analogicznie jak z biofermentem (Kf, Kb). Jako regulatora pH zastosowano roztwór wodny 3% kwasu cytrynowego w celu uzyskania odczynu pH kremu w zakresie 5,3-5,5 oraz aby zachować proporcje wagowe poszczególnych faz (Tab.7).

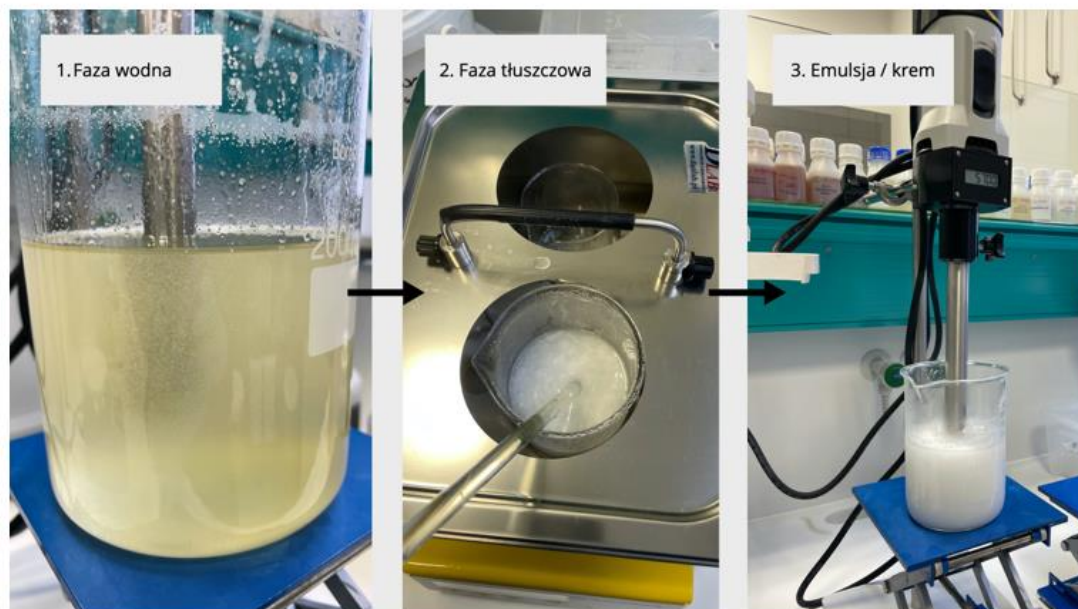
**Tabela 7. Skład kremu do twarzy bez składnika biofunkcjonalnego**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
Faza I				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Mocznik	Urea	3,0	humektant
3	D-panthenol	Panthenol	1,0	składnik aktywny
Faza II				
4	Gliceryna farmaceutyczna roślinna	Glycerin	3	humektant
5	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,2	zagęstnik
Faza III				
6	Emulpharma K10 RSPO MB	Cetearyl Glucoside, Sorbitan Oliviate, Cetearyl Alcohol	5,0	emulgator
7	Masło shea	Butyrospermum Parkii Butter	1,0	emolient
8	Olej z ogórecznika lekarskiego	Borago Officinalis Seed Oil	2,0	emolient
9	Witamina E	Tocopheryl Acetate	1,0	antyoksydant

10	Kaprynian kokosowy, trójgliceryd kaprylowo-kaprynowy	Coco Caprylate/Caprates, Caprylic/ Capric Triglyceride,	4,0	emolient
Faza IV				
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5	konserwant
12	Dibursztynian trisodowo-etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1	substancja chelatująca
13	Kwas cytrynowy 3%	Citric Acid	10	regulator pH

Ostatecznie otrzymano trzy warianty kremu do twarzy, dwa produkty z dodatkiem biofunkcyjnym tj. krem do twarzy z natywnym biofermentem i krem do twarzy z filtratem jak i trzeci produkt – krem do twarzy bez dodatku biofunkcyjnego, wariant kontrolny. Schematyczne przygotowanie formułacji przedstawiono na Rys. 12.

**Rysunek 12. Przygotowanie formułacji typu krem do twarzy (Fot. Laboratorium Symbiosis, opracowanie własne)**



Drugim produktem kosmetycznym było serum do twarzy. Szczegółowe składniki formułacji przedstawiono w Tab. 8-9. Fazę I stanowił bioferment natywny/filtrat w połączeniu z wodą w stosunku 1:1. Następnie składniki fazy II wymieszano ręcznie w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny w zlewce pomocniczej i dodano do fazy I w celu zagęszczenia układu

fazy wodnej (I). W kolejnym etapie połączono fazy I i II i homogenizowano przez 1 min w celu uzyskania jednorodnej żelowej konsystencji za pomocą homogenizatora IKA T 50 Ultra-Turrax z prędkością obrotów 6000 obr./min. Następnie dodano kolejno składniki fazy III. Odczyn pH mieścił się w zakresie 4,0-4,5. Jako zagęstnik zastosowano gumę ksantanową. W celu optymalizacji procesu dozowania fazy II do I wykorzystano połączenie gumy ksantanowej z gliceryną oraz pantenolem w naczyniu pomocniczym, które znacznie ułatwiają dozowanie lepkiego roztworu gumy do naczynia głównego, co skraca czas mieszania i homogenizacji w celu uzyskania jednorodnego żelu z fazy wodnej. Odpowiedni, wcześniej zoptymalizowany czas homogenizacji (maksymalnie 1 min.) zastosowano nie tylko w celu uzyskania homogeniczności serum, Ostatecznie, po połączeniu wszystkich faz, uzyskano jednorodną lekko mętną, jasno żółtą i półpłynną, żelową formułę serum.

**Tabela 8. Skład serum do twarzy ze składnikiem biofunkcyjnym**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
Faza I				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Bioferment natywny/Filtrat	Yarrowia lipolytica Ferment Lysate, Alpha-Ketoglutaric Acid, Propionic Acid, Citric Acid/ Yarrowia lipolytica Ferment Filtrate Alpha-Ketoglutaric Acid, Propionic Acid, Citric Acid	50	substancja aktywna
Faza II				
3	Gliceryna farmaceutyczna roślinna	Glycerin	3	humektant
4	D-Panthenol	Panthenol	3	substancja aktywna/humektant
5	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,2	zagęstnik
Faza III				
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5	konserwant
12	Dibursztynian trisodowo-etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1	substancja chelatująca

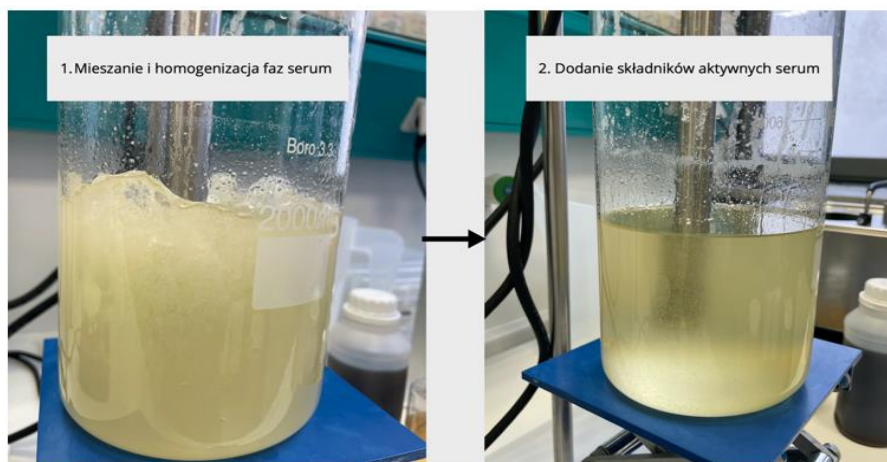
Próbkę kontrolną przygotowano analogicznie jak próby badane, przy czym zamiast składnika pochodzenia mikrobiologicznego dodano kwas cytrynowy w stężeniu 3% (Tab.9).

**Tabela 9. Skład serum do twarzy bez składnika biofunkcjonalnego – próba kontrolna**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
Faza I				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Kwas cytrynowy roztwór 3%	Citric Acid	10	substancja aktywna
Faza II				
3	Gliceryna farmaceutyczna roślinna	Glycerin	3	humektant
4	D-Panthenol	Panthenol	3	substancja aktywna/humektant
5	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,2	zagęstnik
Faza III				
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5	konserwant
12	Dibursztynian trisodowo- etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1	substancja chelatuująca

Ostatecznie otrzymano trzy warianty serum do twarzy, dwa produkty z dodatkiem biofunkcjonalnym tj. serum do twarzy z natywnym biofermentem i serum do twarzy z filtratem jak i trzeci produkt – serum do twarzy bez dodatku biofunkcjonalnego, wariant kontrolny. Schematyczne przygotowanie formułacji przedstawiono na Rys.13.

**Rysunek 13. Przygotowanie formułacji typu serum do twarzy.  
(Fot. Laboratorium Symbiosis, opracowanie własne)**



Trzecim produktem kosmetycznym jest żel do mycia twarzy. Szczegółowe składy formuacji przedstawiono w Tab. 10-11. Fazę I stanowiło połączenie składnika biofunkcjonalnego z wodą. Składniki fazy II wymieszano ręcznie w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny bez grudek (w zlewce pomocniczej) i dodano do fazy I w celu zagęszczenia układu fazy wodnej (I). Połączone fazy I i II mieszano ręcznie a następnie homogenizowano przez 1 min w celu uzyskania jednorodnej żelowej konsystencji za pomocą homogenizatora IKA T 50 Ultra-Turrax z prędkością obrotową z 6000 obr./min. Podczas homogenizacji, zmniejszono obroty do 5000 obr/min i dodano składnik fazy III surfaktant (pelargonian poliglicerylu-4) by nie doprowadzić do spieniania żelu. Ostatnim etapem było przygotowanie fazy IV. Ostatecznie uzyskano lekko mętny jasny żółto-brązowy jednorodny żel.

**Tabela 10. Skład żelu do mycia twarzy ze składnikiem biofunkcyjnym**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
Faza I				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Bioferment natywny/Filtrat	Yarrowia lipolytica Ferment Lysate, Alpha-Ketoglutaric Acid, Propionic Acid, Citric Acid/ Yarrowia lipolytica Ferment Filtrate, Alpha-Ketoglutaric Acid, Propionic Acid, Citric Acid	10	substancja aktywna
Faza II				
3	D-panthenol	Panthenol	3	substancja aktywna, humektant
4	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,5	zagęstnik
Faza III				
5	Pelargonian poliglicerylu-4	Polyglyceryl-4 Pelargonate	5,0	surfaktant
Faza IV				
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5	konserwant
12	Dibursztynian trisodowo-etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1	substancja chelatująca

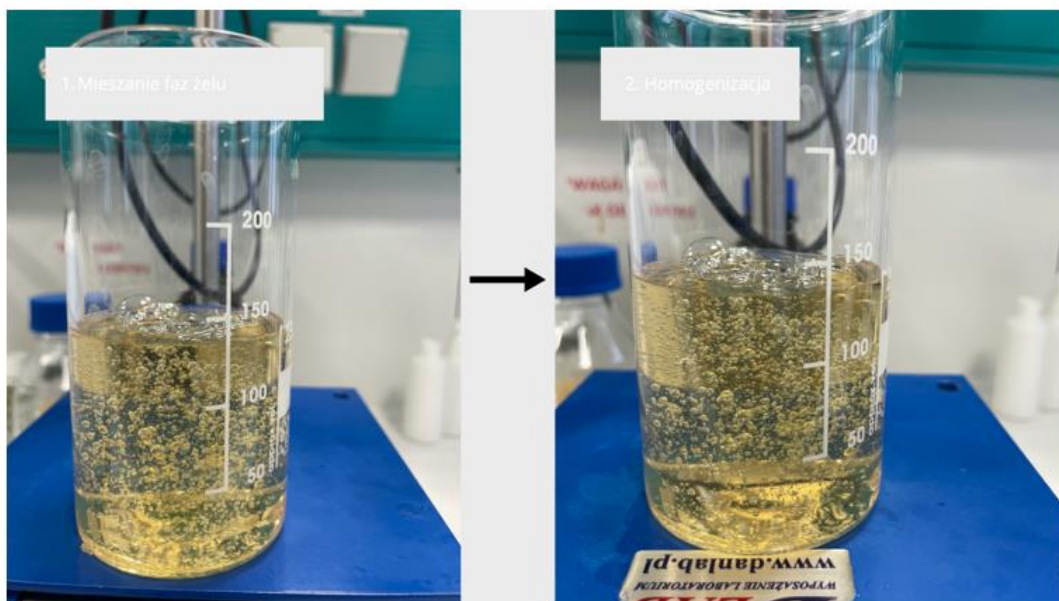
Próbkę kontrolną przygotowano analogicznie jak próby badane, przy czym zamiast składnika pochodzenia mikrobiologicznego dodano kwas cytrynowy w stężeniu 3% (Tab. 11).

**Tabela 11. Skład żelu do mycia twarzy bez składnika biofunkcjonalnego – próba kontrolna**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
Faza I				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Kwas cytrynowy roztwór 3%	Citric Acid	10	substancja aktywna
Faza II				
3	D-panthenol	Panthenol	3	substancja aktywna, humektant
4	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,5	zagęstnik
Faza III				
5	Pelargonian poliglicerylu-4	Polyglyceryl-4 Pelargonate	5,0	surfaktant
Faza IV				
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5	konserwant
12	Dibursztynian trisodowo- etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1	substancja chelatuująca

Ostatecznie otrzymano trzy warianty żelu do mycia twarzy, dwa produkty z dodatkiem biofunkcjonalnym tj. żel do mycia twarzy z natywnym biofermentem i żel do mycia twarzy z filtratem jak i trzeci produkt – żel do mycia twarzy bez dodatku biofunkcjonalnego, wariant kontrolny. Schematyczne przygotowanie formulacji przedstawiono na Rys.14.

**Rysunek 14. Przygotowanie formułacji typu żel do mycia twarzy  
(Fot. Laboratorium Symbiosis, opracowanie własne)**



## **2.3 Analiza fizykochemiczna**

### **2.3.1 Odczyn pH**

Oznaczenie wykonano według normy BN-77/6140-01/07. Do zlewki o pojemności 100 ml odważono 5 g wcześniej przygotowanej formułacji. Do pomiaru zastosowano pehametr firmy Shott (Rys.15) wyposażony w elektrodę kombinowaną.

**Rysunek 15. Pehametr firmy Shott**





### **2.3.2 Lepkość**

Lepkość formułacji kosmetycznych jest istotnym parametrem fizykochemicznym, to od niej zależy smarowność produktu oraz uwalnianie z niej substancji czynnych. Lepkość zdefiniować można jako właściwość substancji płynnych oraz plastycznych ciał stałych, którą charakteryzuje opór wewnętrzny stawiany przez badane substancje, przeciw płynięciu. Pomiar lepkości dokonuje się za pomocą lepkościomierza. Urządzenie to mierzy opór lepkościowy na kręcącym się dysku, zanurzonym w badanym ośrodku. Na skutek obrotów wrzeczona pomiarowego następuje ścinanie badanej próbki, której miarą lepkości jest prędkość obrotowa ustalająca się po przyłożeniu zadanego momentu obrotowego. Opór stawiany ruchowi wrzeczona przez badaną próbkę zmienia się proporcjonalnie do wielkości wrzeczona i szybkości jego obracania się. Zależy on od lepkości badanej substancji. Wartość kąta odchylenia wrzeczona w odniesieniu do sprężyny daje wartość momentu obrotowego. Stosunek momentu obrotowego do prędkości wrzeczona nazywany jest lepkością istotną, wyrażoną w jednostce [mPa·s]. Wiskozymetry rotacyjne charakteryzują się dużą dokładnością pomiarów. W celu zbadania lepkości formułacji kosmetycznej w wąskich zlewkach umieszczono przygotowane próbki. Pomiar wykonywano przy użyciu wszystkich wrzeczion, rozpoczynając od najwolniejszych obrotów.

### **2.3.3 Gęstość**

Gęstość produktu oznaczano zgodnie z normą PBW 49 wyd.1 z dnia 07.06.2016.

### **2.3.4 Stężenie metali ciężkich**

Zawartość metali ciężkich oznaczano za pomocą absorpcyjnej spektrometrii atomowej zgodnie z wytycznymi normy PN-EN ISO 17294-2:2016-11.

### **2.3.5 Stabilność mechaniczna**

Stabilność mechaniczną badano z wykorzystaniem testu wirówkowego. Próbki produktów kosmetycznych o masie 30 g każda umieszczono w 50 ml probówkach typu Falcon i poddano odwirowaniu w wirówce z prędkością 300 obr/min przez 10 min. Po zakończeniu wirowania, próbki analizowano pod kątem braku lub obecności rozwarstwienia produktu.

### 2.3.6 Potencjał antyoksydacyjny

- Zawartość polifenoli ogółem – metoda Folin-Ciocalteu

Zawartości związków redukujących ogółem oznaczono w oparciu o metodykę z wykorzystaniem odczynnika Folin-Ciocalteu (FC). Zasada metody polega na spektrofotometrycznym pomiarze absorbancji prób ( $\lambda=750$  nm) z dodatkiem odczynnika FC (Fluka). Uzyskane wyniki zaprezentowano jako mg standardu (kwercetyna lub kwas galusowy) na 1 gram suchej masy ekstraktu lub 1 mL produktu, które uzyskano po podstawieniu wartości absorbancji do równania regresji z krzywej standardowej.

- Potencjał przeciwrodnikowy – zdolność wygaszania rodnika DPPH $\cdot$

Potencjał przeciwrodnikowy oznaczono w oparciu o zdolność wygaszania rodnika DPPH $\cdot$ . Zasada metody polega na spektrofotometrycznym pomiarze zmian stężenia stabilnego rodnika DPPH $\cdot$  (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl) (Merck-Sigma, Warszawa), w odniesieniu do zdolności zmiatania rodników przez Trolox (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksyłowy). Obliczony % zmiatania podstawiono do krzywych standardowych dla Troloxu (Merck-Sigma, Warszawa) ( $y=551,17x-3,0305$ ,  $r^2=0,9816$ ). Potencjał przeciwrodnikowy wyrażono w mg Troloxu w przeliczeniu na 100 g surowca.

### 2.3.7 Analiza chromatograficzna

Stężenie glicerolu i kwasów organicznych oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na chromatografie Hitachi - L-2000 Series LaChrom Elite (zestaw: automatyczny podajnik próbek L-2200, pompa podwójna L-2130, z detektorem refraktometrycznym RID L-2490 oraz detektorem UV L-2400). Do oznaczeń użyto kolumnę Rezex ROA Organic Acid H $^+$  (8%) – 300 x 7,80 mm (Phenomenex). Jako eluent stosowano 0,0225N H $_2$ SO $_4$ , przy przepływie 0,6 ml/min, izokratycznie. Oznaczenia prowadzono w temperaturze 30°C. Próby nanoszono na kolumnę w ilości 10  $\mu$ l. Czas rozdziału wynosił 30 minut. Identyfikacji jakościowej i ilościowej dokonano metodą standardu zewnętrznego z wykorzystaniem powierzchni oraz wysokości pików (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem programu EZChrom Elite).

## 2.4 Metody mikrobiologiczne

### 2.4.1 Przygotowanie inokulum grzybów

Grzyby namnażano w podłożu YPD w temperaturze 30°C przez 22 h. Po namnożeniu biomasy, hodowlę wirowano (4000 obr./min.) a osad przemyto dwa razy 0,9% NaCl w celu

usunięcia pozostałości pożywki namnażającej i metabolitów drobnoustrojów. Osad biomasy zawieszono w 0,9% NaCl w celu uzyskania gęstości optycznej roztworu równej 1 McFarlanda.

#### **2.4.2 Przygotowanie inokulum bakterii**

Bakterie namnażano w podłożu dedykowanym danej grupie rodzajowej w temperaturze 37°C przez 22-24 h. Po namnożeniu biomasy, hodowlę wirowano (4000 obr./min.) a osad przemyto dwa razy 0,9% NaCl w celu usunięcia pozostałości pożywki namnażającej i metabolitów drobnoustrojów. Osad biomasy zawieszono w 0,9% NaCl w celu uzyskania gęstości optycznej roztworu równej 1 McFarlanda.

#### **2.4.3 Oznaczanie liczebności drobnoustrojów – metoda zalewowa Kocha**

Liczebność drobnoustrojów oznaczano metodą rozcieńczeń dziesiętnych. Płytki zalano upłynnionym podłożem dedykowanym danej grupie mikroorganizmów. Po zestaleniu podłoża, płytki wraz z materiałem inkubowano przez 48-72 h w temperaturze odpowiedniej dla danej grupy drobnoustrojów (bakterie - 37°C, grzyby - 30°C). Hodowle prowadzono w warunkach tlenowych lub względnie beztlenowych.

#### **2.4.4 Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej i prebiotycznej metodą studzienkowo-dyfuzyjną**

W celu oznaczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej i prebiotycznej opracowanych formułacji kosmetycznych wykorzystano metodę studzienkowo-dyfuzyjną. W pierwszym etapie 100 µL namnożonej hodowli bakterii lub grzybów przeniesiono na podłoże agarowe Muller-Hinton. Następnie w podłożu wydrążono studzienki, do których naniesiono po 50 µL badanej próby (formułacji kosmetycznej). Płytki inkubowano przez 48 h w temperaturze 37°C w odpowiednich dla danej grupy warunkach gazowych. Aktywność przeciwdrobnoustrojową oceniono na podstawie strefy przejaśnienia lub zagęszczenia biomasy wokół studzienek.

### **2.5 Metody badania formułacji kosmetycznych**

#### **2.5.1 Ocena stabilności produktów kosmetycznych**

Próby formułacji kosmetycznych o masie 25 g umieszczono w neutralnych chemicznie, szklanych przezroczystych probówkach i przechowywano 12 tygodni bez dostępu światła. Z każdego wariantu formułacji wykonano 3 próby i umieszczono w 4°C, 22°C i 37°C. Parametry poszczególnych prób poddawano ocenie po 2, 4, 6 i 12 tygodniach od rozpoczęcia testu. Każdorazowo, próby przechowywane w temperaturze 4°C i 37°C, dzień przed wykonaniem oceny umieszczano w temperaturze pokojowej w celu ujednoczenia warunków badania. Metodą

organoleptyczną analizowano barwę, zapach, konsystencję, ewentualną obecność osadu oraz pianotwórczość formułacji.

### **2.5.2 Ocena czystości mikrobiologicznej produktów kosmetycznych**

Ocenę czystości mikrobiologicznej nowo opracowanych produktów wykonano zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 2.4.3. Analizę wykonywano bezpośrednio po przygotowaniu próbek oraz po 2, 6 i 12 tygodniach od przygotowania.

### **2.5.3 Test kompatybilności masy kosmetycznej z opakowaniem**

Próbki kosmetyków o masie 20 g umieszczono w opakowaniach docelowych i przechowywano 12 tygodni bez dostępu światła. Z każdego wariantu formułacji wykonano po 4 próby i umieszczono w  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  i w temperaturze pokojowej. Parametry poszczególnych próbek poddawano ocenie po 4, 8 i 12 tygodniach od rozpoczęcia testu. Każdorazowo, próby przechowywane w temperaturze  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ , dzień przed wykonaniem oceny umieszczano w temperaturze pokojowej w celu ujednoczenia warunków badania. Metodą organoleptyczną analizowano barwę, zapach, konsystencję oraz łatwość aplikacji kosmetyków. W celu oceny barwy, z uwagi na nieprzezroczystość opakowań, przenoszono po 5 g próbek do szklanych, przezroczystych probówek. Ocenę konsystencji dokonywano organoleptycznie. Uzyskane wyniki porównywano z wynikami prowadzonego równocześnie testu stabilności produktów kosmetycznych.

### **2.5.4 Ocena szczelności opakowania**

W celu oceny szczelności opakowań kosmetycznych, napełnione 70 g produktów myjących opakowania umieszczano w pozycji horyzontalnej i pozostawiano na 24 h w temperaturze pokojowej na ręczniku papierowym, w odstępach 15-20 cm. Po tym czasie analizowano obecność ewentualnych śladów po masie kosmetycznej.

### **2.5.5 Test konserwacji**

W pierwszej kolejności przygotowano kultury szczepów wskaźnikowych (2.4.1 i 2.4.2). Po rozmrożeniu stoków glicerolowych, zawiesinę przelano do 10 ml podłoża bulion odżywczy wzbogaconego glukozą. Następnie prowadzono 24 – godziną hodowlę w temperaturze  $30^{\circ}\text{C}$  (drożdże) lub  $37^{\circ}\text{C}$  (bakterie). Po czasie hodowli przygotowano zawiesinę drobnoustrojów w 0.9% NaCl tak aby ich liczebność była zbliżona do  $10^5$  jtk/ml. Następnie, przygotowane próbki formułacji kosmetycznych o masie 15 g, znajdujące się w sterylnych probówkach typu Falcon, zakażano przez jednorazowe wprowadzenie 150  $\mu\text{l}$  inokulum pojedynczego szczepu

mikroorganizmu. Po wprowadzeniu inokulum próby dokładnie wymieszano i wykonywano analizę mikrobiologiczną bezpośrednio po zakażeniu oraz po 7, 14 i 28 dniach od zakażenia, w celu ustalenia liczebności mikroorganizmów w próbach. W międzyczasie próby przechowywano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła.

### 2.5.6 Ocena organoleptyczna

Formulacje kosmetyczne przeanalizowano pod kątem właściwości organoleptycznych. Parametry, kryteria oraz metody analizy przedstawia Tab.12.

**Tabela 12. Ocena organoleptyczna formulacji kosmetycznych**

<b>Analizowany parametr</b>	<b>Metoda analizy</b>	<b>Kryteria</b>
Kolor płynu	Ocena wizualna	Nie dotyczy
Przezroczystość płynu	Ocena wizualna	Transparentny/Mętny
Zapach	Powąchanie	Charakterystyczny/kwiatowy/aldehydowy/ słodki/cytrusowy/ziolowy/świeży/korzenny/ owocowy/żywiczny/ gnilny/kwaśny/mdlący/inny – jaki?
Konsystencja	Zaaplikowanie na powierzchnię skóry, obserwacja	Jedwabista/klejąca/kremowa/ziarnista /gęsta/ zbita/delikatna
Łatwość rozprowadzania	Zaaplikowanie na powierzchnię skóry, obserwacja	Bardzo wysoka/umiarkowanie wysoka/niska/ bardzo niska
Śliskość	Zaaplikowanie na powierzchnię skóry, obserwacja	Bardzo wysoka/umiarkowanie wysoka/niska/ bardzo niska
Łatwość spłukiwania	Zaaplikowanie na powierzchnię skóry, obserwacja pod bieżącą wodą	Bardzo wysoka/umiarkowanie wysoka/niska/ bardzo niska
Wrażenie ściągnięcia lub przesuszenia skóry	Zaaplikowanie na powierzchnię skóry	Obecne/brak

### 2.5.7 Testy dermatologiczne

Testy prowadzono pod nadzorem lekarza dermatologa. Ocena właściwości alergizujących i podrażniających preparatu, przeprowadzono na grupie ochotników. Probanci zostali dobrani zgodnie z Deklaracją Helsińską i wytycznymi COLIPA (ang. The Cosmetic Toiletry and Perfumery Association). Badanie przeprowadzono przy pomocy plastrów komorowych z bibułkami filtracyjnymi, na które nanoszono badany produkt, a następnie całość

została przyklejona na skórę ramienia lub okolice międzyłopatkową. Próby były zdejmowane po 48 h, a odczytu dokonano po 15-20 minutach i 72 h od zdjęcia plastra wg ogólnie przyjętej skali w badaniach dermatologicznych i oceniano przez lekarza dermatologa. Odczyn dodatni potwierdzał alergizujące właściwości preparatu, a ujemny – brak właściwości alergizujących. Metodyka wykonanych badań był zgodna z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczącego produktów kosmetycznych; Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility 1997; Cosmetics Europe - The Personal Care Association Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products 2008.

### **2.5.8 Testy aplikacyjno-użytkowe**

Badania potwierdzające lub wykluczające deklarowane właściwości i działania kosmetyku prowadzono w warunkach domowych oraz w Centrum Dermatologii Symbiosis Sp. z o.o. (Kod res. I- 000000171099, W-30 V- 01, VII-001, VIII-1200 ) w Poznaniu pod nadzorem lekarza dermatologa, technologa oraz kosmetologa przy udziale probantów – ochotników. Do badań aplikacyjno-użytkowych została wytypowana grupa 60 osób, odpowiadającym wskazaniom do stosowania produktu. Dobór probantów odbywał się wg wstępnej oceny stanu skóry oraz zdrowia. Ze względu na przeznaczenie nowoopracowanych produktów osoby uczestniczące w badaniu były w trakcie kuracji izotretynoiną i zadeklarowały chęć poprawy wyglądu oraz kondycji skóry.

Sposób prowadzenia badań w warunkach domowych (panel domowy).

Zakwalifikowani do badań przez prowadzącego probanci otrzymali po jednym opakowaniu żelu do mycia twarzy, serum do twarzy oraz kremu do twarzy. Probantów podzielono na trzy grupy po 20 osób (n=20), które otrzymały:

Grupa (Gb) - produkty z biofermentem natywnym: żel do mycia twarzy (Żb), serum do twarzy (Sb), krem do twarzy (Kb)

Grupa (Gf) - produkty z biofermentem w postaci filtratu: żel do mycia twarzy (Żf), serum do twarzy (Sf), krem do twarzy (Kf)

Grupa (Gk) - produkty bez składnika biofunkcjonalnego: żel do mycia twarzy (Żk), serum do twarzy (Sk), krem do twarzy (Kk)

Ochotnicy zostali zobowiązani do stosowania otrzymanych produktów według dedykowanej instrukcji:

1. Niewielką ilość żelu do mycia twarzy (jedną dozę pompki) nanieś na dłonie i delikatnie spienić, tworząc mieszaninę z ciepłą wodą z kranu. Następnie umyć twarz jednokrotnie i dokładnie spłukać oraz osuszyć twarz ręcznikiem.
2. Następnie niewielką ilość serum do twarzy (jedna doza pompki) nanieś na dłonie, rozmasować, ocierając dłonie o siebie i całą powierzchnią dłoni wmasować produkt w skórę twarzy.
3. Po wchłonięciu serum jedną dozę pompki kremu do twarzy nanieś na dłonie i wmasować na całą powierzchnię skóry twarzy. W razie potrzeby powtórzyć czynność stosując dodatkową dozę kremu.

Produkty stosować rano i wieczorem.

Ponadto ochotnicy zostali zobowiązani do:

- regularnego stosowania otrzymanego produktu zgodnie z zastosowaniem deklarowanym przez producenta
- nie powinni stosować w czasie trwania badań preparatów o identycznym bądź analogicznym przeznaczeniu
- powinni obserwować reakcję skóry w miejscach aplikacji produktów i szczegółowo odnotowywać uwagi dotyczące własności użytkowe testowanego kosmetyku
- w przypadku wystąpienia w miejscu stosowania kosmetyków jakichkolwiek negatywnych objawów, natychmiast przerwać stosowanie kosmetyku oraz bezzwłocznie zgłosić się do osoby prowadzącej badanie.

Osobom uczestniczącym w badaniu nie stawiano żadnych specjalnych wymagań, w celu oceny działania kosmetyków w realnych warunkach, w których będą one w praktyce stosowane. Na wyniki badań mogły mieć wpływ jedynie takie czynniki jak: intensywność leczenia trądziku, stan zdrowia, rodzaj i kondycja skóry, uwarunkowania genetyczne, cechy osobnicze, indywidualne upodobania, tryb życia, warunki środowiska naturalnego itp. Indywidualne oceny własności użytkowych badanych produktów uzyskane od probantów opracowano w sprawozdaniu z badań ankietowych (badania aplikacyjno-użytkowe). Czas trwania badań wynosił 2 tygodnie.

Opracowano pytania związane z oceną produktów (badania aplikacyjne).

1. Czy uważa Pani/Pan, że zastosowane produkty wpłynęły korzystnie na poprawę kondycji skóry? Odpowiedzi:

- Korzystny wpływ
- Nie zauważono zmian
- Pogorszenie stanu cery

2. Czy jest Pani/Pan zadowolona z konsystencji preparatu typu krem użytego w badaniach?

Odpowiedzi:

- Konsystencja przyjemna w użytkowaniu
- Konsystencja średnio przyjemna w użytkowaniu
- Konsystencja nieprzyjemna w użytkowaniu

3. Czy jest Pani/Pan zadowolona z konsystencji preparatu typu serum użytego w badaniach?

Odpowiedzi:

- Konsystencja przyjemna w użytkowaniu
- Konsystencja średnio przyjemna w użytkowaniu
- Konsystencja nieprzyjemna w użytkowaniu

4. Czy jest Pani/Pan zadowolona z właściwości myjących preparatu typu żel do mycia twarzy użytego w badaniach? Odpowiedzi:

- Konsystencja przyjemna w użytkowaniu nie ściąga skóry po umyciu
- Konsystencja średnio przyjemna w użytkowaniu i występuje ściągnięcie cery po umyciu
- Konsystencja nieprzyjemna w użytkowaniu

5. Czy po zakończeniu badań z wykorzystaniem produktów żel do mycia twarzy, serum do twarzy, krem do twarzy zauważył/a Pani/Pan zmniejszenie podrażnień, uczucia suchości oraz poprawę nawilżenia cery: Odpowiedzi:

- Tak, nastąpiła wyraźna poprawa,
- Nie, nie odczuwam istotnej poprawy
- Nastąpiło pogorszenie objawów.

W trakcie prowadzenia badań dokonano oceny wpływu kosmetyku na stan skóry i ogólne odczucia ochotników w oparciu o długoterminową, wielokrotną aplikację badanego produktu na skórę, zgodnie z jego przeznaczeniem i sposobem użycia. Badania miały na celu potwierdzenie lub wykluczenie deklarowanego działania produktu. Deklarowane działanie produktu uznano za potwierdzone, gdy liczba pozytywnych odpowiedzi stanowiła co najmniej 50% ogólnej liczby odpowiedzi uzyskanych od probantów w badaniu.

### **2.5.9 Badania aparaturowe**

Badania aparaturowe przy udziale probantów prowadzono w Centrum Dermatologii Symbiosis Sp. z o.o. (Kod res. I- 000000171099, W-30 V- 01, VII-001, VIII-1200 ) w Poznaniu pod nadzorem lekarza dermatologa, technologa oraz kosmetologa przy udziale probantów – ochotników. Dobór probantów został opisany w pkt. Badania aplikacyjno-użytkowe.

### **2.5.10 Badanie stopnia nawilżenia skóry - TEWL**

Ocenę długości utrzymywania się prawidłowego stopnia nawilżenia skóry – badanie TEWL (ang. *Transepidermal Water Loss*) prowadzono za pomocą urządzenia Tewametr® TM 210. Pomiar jest dokonywany przez dwie pary czujników wewnątrz sondy (temperatura i



względna wilgotność) analiza przez mikroprocesor. Pomiary wykonywano w pomieszczeniu zacienionym, w temperaturze (+/-20°C), wilgotności względnej (40 - 60%). Miejsca badania skóra (czoła, policzka, brody). Pomiaru utrzymania się prawidłowego stopnia nawilżenia skóry dokonywano czterokrotnie:

1. przed rozpoczęciem stosowania produktów kosmetycznych
2. Jeden tydzień po rozpoczęciu stosowania produktów kosmetycznych
3. Po dwóch tygodniach stosowania produktów kosmetycznych
4. Po czterech tygodniach stosowania produktów kosmetycznych.

#### **2.5.11 Badanie poziomu wilgotności skóry - Corneometr**

W badaniach oceniających poziom wilgotności skóry wykorzystano aparat Corneometr®CM 820. Pomiary wykonywano w pomieszczeniu zacienionym, w temperaturze (+/- 20°C), względnej wilgotności stałej wynoszącej 40 – 60%. Pomiaru poziomu wilgotności skóry dokonywano czterokrotnie:

1. przed rozpoczęciem stosowania produktów kosmetycznych
2. Jeden tydzień po rozpoczęciu stosowania produktów kosmetycznych
3. Po dwóch tygodniach stosowania produktów kosmetycznych
4. Po czterech tygodniach stosowania produktów kosmetycznych.

Miejsce badania skóra czoła, policzka, brody.

#### **2.5.12 Poziom elastyczności skóry**

Poziom elastyczności skóry mierzono za pomocą urządzenia Reviscometr® RVM 600. Pomiary (1-sekundowe) pod kątem 0/180°, 45/225°, 90/270°, 135/315°dokonywano w temperaturze (+/- 20°C) i wilgotności względnej (40 -60%) czterokrotnie:

1. przed rozpoczęciem stosowania produktów kosmetycznych
2. Jeden tydzień po rozpoczęciu stosowania produktów kosmetycznych
3. Po dwóch tygodniach stosowania produktów kosmetycznych
4. Po czterech tygodniach stosowania produktów kosmetycznych. Miejsce pomiaru skóra policzka.

#### **2.5.13 Odczyn pH skóry**

Odczyn pH skóry mierzono z wykorzystaniem urządzenia Skin-pH-Meter® PH905; jest to szybkie, proste i ekonomiczne narzędzie do pomiaru pH na powierzchni skóry i skóry głowy. Sposób wykonania pomiaru przedstawiono na Rys.16.

**Rysunek 16. Pomiar pH skóry probanta**



## **2.6. Dokumentacja wdrożeniowa**

W ramach pracy doktorskiej przygotowano dokumentację technologiczną konieczną do wdrożenia produktów na rynek – raporty bezpieczeństwa, karty charakterystyki składników biofunkcyjnych i treści etykiet. Dokumenty przygotowano zgodnie z treścią Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30.11.2009 r.

## V Wyniki i dyskusja

### 1. Biosynteza kwasu alfa-ketoglutowego

Pierwszym etapem prowadzonych prac było przygotowanie kluczowego surowca kosmetycznego, efektu fermentacji glicerolu przy udziale drożdży z gatunku *Yarrowia lipolytica* w kierunku syntezy kwasu alfa-ketoglutowego. Należy wskazać, że metodologia prowadzenia bioprosesu stanowiła przedmiot szczegółowych badań prowadzonych przez Panią Paulinę Maciejewską – Gil (2023). W efekcie prowadzonych prac został ustalony skład podłoża produkcyjnego jak i wybór parametrów hodowli. W niniejszej pracy wykorzystano pozyskaną wcześniej wiedzę i przeprowadzono biosyntezę AKG zgodnie z opracowaną metodyką. W efekcie przeprowadzonego procesu fermentacji uzyskano bioferment natywny, w którym oznaczono: biomasę drożdży *Y. lipolytica* w stężeniu 9,5 g/L, kwas alfa-ketoglutowy w stężeniu 14,2 g/L, kwas pirogronowy w stężeniu 12,3 g/L i kwas cytrynowy w stężeniu 2,1 g/L.

Rysunek 17. Schemat etapów biosyntezy kwasu alfa-ketoglutowego



Po zakończeniu fermentacji, mikroorganizmy pozostające w fermentacji poddano dezaktywacji. Na tym etapie prac badano wpływ naprzemiennej inkubacji w zmiennych warunkach temperaturowych oraz dezintegrację ścian komórkowych drobnoustrojów przy użyciu łaźni ultradźwiękowej. Wyniki analiz przedstawia Tab. 13. Naprzemienne zastosowanie niskiej i wysokiej temperatury pozwoliło na całkowite i trwałe zahamowanie procesów życiowych drobnoustrojów wchodzących w skład biofermentu. W przypadku zastosowania łaźni ultradźwiękowej, liczba drobnoustrojów uległa istotnemu obniżeniu z wartości  $10^8$  do  $10^5$  jtk/ml. Ostatecznie, niecałkowita eliminacja żywych drobnoustrojów z biofermentu a także obecność pozostałości cukrów dostępnych dla drobnoustrojów spowodowało, że ich liczba

wzrosła do wartości  $6,6 \times 10^7$  jtk/ml w 72 godzinie przechowywania biofermentu w temperaturze pokojowej. Z uwagi na fakt, iż produkt kosmetyczny zgodnie z wymaganiami Głównego Inspektoratu Sanitarnego musi być pozbawiony żywych drobnoustrojów, w dalszej części badań wykorzystano metodę termiczną, która w przeprowadzonych testach okazała się skuteczna.

Z uzyskanego na drodze biotechnologicznej płynu pofermentacyjnego zawierający kwas alfa-ketoglutaryowy (a także inne metabolity) i lizat biomasy drożdży z rodzaju *Yarrowia* sp. uzyskano dwa surowce o potencjale aplikacyjnym. Pierwszy to **bioferment natywny**, czyli płyn pofermentacyjny poddany jedynie obróbce termicznej w celu dezaktywacji drobnoustrojów. Drugi to **filtrat**, czyli produkt pozyskany poprzez filtrację biofermentu natywnego w celu separacji biomasy drobnoustrojów.

**Tabela 13. Skład biofermentu natywnego i filtratu**

<b>Składnik</b>	<b>Bioferment natywny</b>	<b>Filtrat</b>
Biomasa <i>Yarrowia lipolytica</i>	obecna	nieobecna
Kwas alfa-ketoglutaryowy	14,2 g/L	14,2 g/L
Kwas pirogronowy	12,3 g/L	12,3 g/L
Kwas cytrynowy	2,1 g/L	2,1 g/L
Fragmenty ściany komórkowej <i>Yarrowia lipolytica</i>	obecne	obecne

## 2. Przygotowanie formułacji kosmetycznych

Przygotowanie formułacji kosmetycznych, w tym wybór surowców kosmetycznych jak i ich stężeń jest kluczowym etapem, który determinuje nie tylko właściwości fizyko-chemiczne formułacji, ich stabilność mikrobiologiczną i organoleptyczną jak i właściwości funkcjonalne. Biorąc pod uwagę mnogość surowców dostępnych na polskim i zagranicznym rynku jak i ich innowacyjny a jednocześnie trudny do przewidzenia charakter, opracowanie składu jakościowo-ilościowego formułacji nie jest zadaniem prostym. Tym większa trudność związana jest z udziałem w formułacji składnika pochodzenia biotechnologicznego, w tym mikrobiologicznego. W niniejszej pracy zdecydowano się na surowce pochodzenia naturalnego o udokumentowanych właściwościach.

W tej części badań przygotowano trzy różne formułacje kosmetyczne – krem do twarzy, serum do twarzy i żel do mycia twarzy. Dodatkowo dla każdego typu formułacji przygotowano kontrolę (bez dodatku funkcjonalnego).

**Tabela 14. Oznaczenie przygotowanych formułacji**

<b>LP</b>	<b>Opis formułacji</b>	<b>Oznaczenie formułacji</b>
1	Krem zawierający bioferment natywny	Kb
2	Krem zawierający filtrat pozbawiony biomasy	Kf
3	Krem kontrolny, bez dodatku biofunkcjonalnego	Kk
4	Serum zawierające bioferment natywny	Sb
5	Serum zawierające filtrat pozbawiony biomasy	Sf
6	Serum kontrolne, bez dodatku biofunkcjonalnego	Sk
7	Żel zawierający bioferment natywny	Żb
8	Żel zawierający filtrat	Żf
9	Żel do mycia bez dodatku biofunkcjonalnego	Żk

Pierwszą przygotowaną formułacją był krem do twarzy typu emulsja O/W o właściwościach nawilżających. Krem nawilżający jest najbardziej popularnym typem należącym do asortymentu typu kremy. Lekka formuła tej formułacji nie obciąża skóry twarzy, nadając jej zdrowy, naturalny wygląd. Podczas tworzenia formułacji emulsji uwzględniono jej lipofilowość, składniki warunkujące nawilżenie oraz kwaśny odczyn pH naskórka, które są najważniejszym czynnikiem determinującym zachowanie się substancji czynnej w kontakcie ze skórą trądzikową. Wykonano trzy wersje kremu: Kb – krem zawierający bioferment natywny, Kf – krem zawierający filtrat pozbawiony biomasy drożdży, Kk – krem kontrolny, bez dodatku biofunkcjonalnego (Tab. 15 i 16).

W pierwszym etapie przygotowano bazę w postaci emulsji. Składniki fazy I dodano do wody i mieszano do rozpuszczenia poszczególnych substancji podgrzewając na mieszadle magnetycznym, mieszając do osiągnięcia temperatury 70°C. Następnie składniki fazy II wymieszano ręcznie w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny i dodano do fazy I w celu zagęszczenia układu fazy wodnej. Połączone fazy I i II mieszano ręcznie a następnie homogenizowano przez 1 min celem uzyskania jednorodnej krystalicznej żelowej konsystencji za pomocą IKA T 50 homogenizator Ultra-Turrax z prędkością obrotową 6000 obr./min. W trakcie przygotowania fazy I i II, naważono do zlewki składniki fazy III (faza tłuszczowa). Po naważeniu, zlewkę umieszczono w łaźni wodnej i ogrzano do temperatury 70°C w celu stopienia

składników. Po uzyskaniu klarownego roztworu, uzyskaną mieszaninę tłuszczową (faza III) dodano powoli do zlewki fazy wodnej, żelowej (fazy I i II) jednocześnie homogenizując 10000 obr./min 2 min. Następnie zlewkę z emulsją umieszczono pod mieszadłem mechanicznym, kontynuując proces mieszania do schłodzenia emulsji do temperatury 40°C. Następnie dodano kolejno składniki fazy IV oraz zmierzono odczyn pH emulsji. Odczyn pH wynosił 4,5 wobec czego dodano regulator alkalizujący (wodorotlenek sodu) do osiągnięcia pH 5,0-5,5; aby zachować fizjologiczny zakres działania na leczony naskórek. Jako zagęstnik zastosowano gumę ksantanową, która pełni funkcję modyfikatora reologii emulsji nadając jej korzystne walory sensoryczne podczas aplikacji na skórę, zmniejszając lepkość i nadając aksamitne wykończenie po wchłonięciu. Guma ksantanowa jest również substancją pomocniczą, silnym stabilizatorem systemów na bazie emulsji i środków powierzchniowo czynnych. Tworzy krystalicznie czyste preparaty, ma wysoką tolerancję na elektrolity co jest bardzo istotne w przypadku zastosowania wysokiego stężenia składników bioaktywnych bogatych w kwasy organiczne (Alhalmi i in., 2018). W oparciu o doświadczenie wykorzystano połączenie gumy ksantanowej z gliceryną w naczyniu pomocniczym, które znacznie ułatwia dozowanie do naczynia głównego oraz skraca czas mieszania i homogenizacji w celu uzyskania krystalicznego żelu z fazy wodnej. Takie zastosowanie technologii procesu jest szczególnie istotne podczas skalowania procesu produkcji. Składniki fazy I takie jak mocznik, stanowią podstawowy składnik naturalnego czynnika nawilżającego (ang. Natural Moisturizing Factor - NMF) niezbędny do utrzymania odpowiedniego uwodnienia keratyny naskórka. Gliceryna i mocznik są również stosowane w dostępnych na rynku kosmetykach, którym przypisuje się właściwości higroskopijne, jako sugerowaną rolę zamienną dla (NMF). Jest jednak jasne, że zarówno funkcja bariery naskórka, jak i mechanizm właściwości jego warstwy rogowej nie zależą tylko od zawartości wody, ale co ważniejsze, od organizacji molekularnej lipidomiki oraz białek. W czasie opracowania receptury kremu uwzględniono potencjał synergistycznego połączenia gliceryny i mocznika jako promotora dla uwalniania substancji czynnych (w tym, głównie składników biofermetu) (Björklund i in., 2013). Zastosowano połączenie funkcji pomocniczej reologicznej składników kosmetyku z korzystnym odżywczym działaniem na naskórek. Stanowi to szczególnie istotną alternatywę do pielęgnacji cery suchej podczas leczenia izotretynoiną. Koncepcję takiej mieszaniny wykorzystano w formule jako alternatywę dla popularnych promotorów przenikania (tj. glikol propylenowy czy butylenowy) stosowanych w kremach. Obserwacje (Costa-Balogh i in., 2006; Nowacka i in., 2012) wskazały, że gliceryna i mocznik mogą zachować właściwości fizyczne uwodnionego lipidu w naskórku z nadmierną suchością, nie powodując podrażnienia. Kolejnym etapem tworzenia formuły kremu było

dodanie składników fazy IV, które naważono po schłodzeniu masy do 40°C i dodawano kolejno podczas mieszania. Jako układ konserwujący wykorzystano mieszaninę soli sodowej kwasu lewulinowego oraz sorbinianu potasu. Dobór stężenia układu konserwującego oparto na wynikach badań (Pinto i in., 2021), które wskazały skuteczny zakres działania bakteriostatycznego kosmetyku z zachowaniem mikrobioty kolonizującej naskórek. Kolejnym dodanym składnikiem fazy IV wpływającym na stabilność bakteriostatyczną kremu był dibursztynian trisodu etylenodiaminy, biodegradowalny środek chelatujący, który wyróżnia się tym, że jest bardzo selektywny w stosunku do problematycznych metali przejściowych. Wykazano, że kompleksy metali z biodegradowalnym ligandem, kwasem etylenodiaminodibursztynowym, wykazują działanie przeciwbakteryjne wobec grzybów i bakterii (Costa i in., 2008). Następnym składnikiem fazy IV dodanym podczas tworzenia formułacji kremu był składnik aktywny w postaci natywnego biofermentu zawierającego (nieodwirowaną) biomasę drożdży *Yarrowia lipolytica* (Kb) lub w postaci samego filtratu (Kf), pozbawionego biomasy drożdży. Formuła po dodaniu składnika pochodzenia biotechnologicznego została poddana ponownie homogenizacji 10000 obr/min. przez 3 min w celu poprawy jednorodności i dyspersji składnika w emulsji. Zastosowano 10% stężenie biofermentu/filtratu. Należy wskazać, że nieaktywne komórki biomasy drożdży z rodzaju *Yarrowia* sp. to cenne źródło aminokwasów, peptydoglikanu oraz nukleotydów. Kwas alfa-ketoglutarynowy obecny w biofermencie/filtracie według danych literaturowych może znaleźć pełnić wiele funkcji m.in. udział w syntezie białek, stymulację syntezy kolagenu, modulację układu odpornościowego i opóźnianie procesów starzenia (Saghi i in., 2023). Niewiele jest jednak doniesień literaturowych na temat jego funkcji/ zastosowania w pielęgnacji skóry. Z uwagi na plejotropowy charakter kwasu alfa-ketoglutarynowego został zastosowany w opracowanych formułacjach jako aktywny składnik o właściwościach regenerujących, przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych. Dane literaturowe wskazują, że kwas AKG ma pozytywny wpływ na ekspresję mRNA w filagrynie, palmitoilotransferazie serynowej i inwolukrynie, co może zwiększać zdolność zatrzymywania wody w warstwie rogowej naskórka i utrzymywać barierową funkcję skóry (Yang i in., 2022). Ponadto obecność kwasu pirogronowego może przyczyniać się do synergistycznego działania antyoksydacyjnego i przeciwzapalnego. AKG jest stosowany w kosmetyce i dermatologii jako peeling chemiczny do pielęgnacji oraz wspomaganie leczenia cery trądzikowej z hiperpigmentacją w stężeniu powyżej 30%, wykazano że w niskich dawkach może hamować aktywność cyklooksygenazy-2 (COX-2), enzymu odgrywającego kluczową rolę w wytwarzaniu mediatorów stanu zapalnego zwanych prostaglandynami (Sarkar i in., 2024). Ponadto stwierdzono, że kwas pirogronowy

(inny metabolit syntetyzowany przez drożdże *Yarrowia* sp.) hamuje wytwarzanie interleukiny-6 (IL-6), cytokiny prozapalnej, która bierze udział w reakcji skóry wobec urazów i stanów zapalnych. Zmniejszając poziom IL-6 i hamując aktywność COX-2, kwas pirogronowy może pomóc w ograniczeniu stanu zapalnego, który przyczynia się do przebarwień pozapalnych, co czyni go użytecznym składnikiem zmniejszającym ryzyko tego rodzaju powikłań podczas leczenia izotretynoiną. Naturalne pochodzenie kwasu cytrynowego obecnego w biofermentacji/filtracji, stanowi składnik pomocniczy aktywny oraz regulator pH formuły, które winno być w zakresie pH 5,3-5,5. Warto wskazać, że forma składnika aktywnego w postaci filtratu pozbawionego biomasy komórek drożdży *Yarrowia* sp. wydaje się być bardziej korzystna w tworzeniu formuły ze względu na krótszy czas homogenizacji końcowej. Jest to istotny aspekt technologii podczas skalowania procesu. Krem z dodatkiem filtratu charakteryzował się mniej intensywnym, drożdżowym zapachem co może mieć znaczenie w komunikacji marketingowej kosmetyku.

**Tabela 15. Skład kremu do twarzy ze składnikiem biofunkcyjnym**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
Faza I				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Mocznik	Urea	3,0-5,0	humektant
3	D-panthenol	Panthenol	1,0-5,0	składnik aktywny
Faza II				
4	Gliceryna farmaceutyczna roślinna	Glycerin	3-5	humektant
5	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,2-0,5	zagęstnik
Faza III				
6	Emulpharma K10 RSPO MB	Cetearyl Glucoside, Sorbitan Oliviate, Cetearyl Alcohol	5,0-6,0	emulgator
7	Masło shea	Butyrospermum Parkii Butter	1,0-3,0	emolient
8	Olej z ogórecznika lekarskiego	Borago Officinalis Seed Oil	2,0-4,0	emolient
9	Witamina E	Tocopheryl Acetate	1,0	antyoksydant



10	Kaprynian kokosowy, trójgliceryd kaprylowo- kaprynowy	Coco Caprylate/Caprinate, Caprylic/ Capric Triglyceride,	4,0-8,0	emolient
Faza IV				
11	Lewulinian sodu, sorbiniian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5-1,9	konserwant
12	Dibursztynian trisodowo- etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1-0,5	substancja chelatująca
13	Bioferment natywy/ Filtrat	Yarrowia lipolytica Ferment Lysate, Alpha-Ketoglutaric Acid, Pyruvic Acid, Citric Acid /  Yarrowia Lipolytica Ferment Filtrate, Alpha-Ketoglutaric Acid, Pyruvic Acid, Citric Acid	10	substancja aktywna

Wariant kontrolny kremu do twarzy (Tab. 16) wykonano analogicznie jak te z dodatkiem składników biofunkcjonalnych (Kf, Kb). Jako regulator pH zastosowano roztwór wodny 3% kwasu cytrynowego w celu uzyskania odczynu w zakresie 5,3-5,5 oraz aby zachować proporcje wagowe poszczególnych faz.

**Tabela 16. Skład kremu do twarzy bez składnika biofunkcjonalnego**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
Faza I				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Mocznik	Urea	3,0-5,0	humektant
3	D-panthenol	Panthenol	1,0-5,0	składnik aktywny
Faza II				
4	Gliceryna farmaceutyczna roślinna	Glycerin	3-5	humektant
5	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,2-0,5	zagęstnik
Faza III				

6	Emulpharma K10 RSPO MB	Cetearyl Glucoside, Sorbitan Oliviate, Cetearyl Alcohol	5,0-6,0	emulgator
7	Masło shea	Butyrospermum Parkii Butter	1,0-3,0	emolient
8	Olej z ogórecznika lekarskiego	Borago Officinalis Seed Oil	2,0-4,0	emolient
9	Witamina E	Tocopheryl Acetate	1,0	antyoksydant
10	Kaprynian kokosowy, trójgliceryd kaprylowo-kaprynowy	Coco Caprylate/Capratae, Caprylic/ Capric Triglyceride,	4,0-8,0	emolient
Faza IV				
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5-1,9	konserwant
12	Dibursztynian trisodowo- etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1-0,5	substancja chelatująca
13	Kwas cytrynowy 3%	Citric Acid	10	regulator pH

Drugim produktem kosmetycznym było serum do twarzy. Według praktyki kosmetycznej serum to kosmetyk charakteryzujący się silniejszym działaniem w porównaniu do kremu, głównie z uwagi na wyższą koncentrację składników aktywnych. Oprócz tego jest produktem o lekkiej, często żelowej konsystencji. Zgodnie z danymi literaturowymi celem stosowania produktu jest wzmocnienie i zintensyfikowanie codziennej pielęgnacji skóry podczas leczenia izotretynoiną, w konsekwencji czego skóra staje się przesuszona, co wynika z redukcji poziomu lipidów i innych substancji wchodzących w skład naturalnego czynnika nawilżającego (Armengot-Carbo i in., 2015).

Technologia produkcji serum jest oparta o wodny roztwór (1:1) biofermentu natywnego/filtratu. Tak wysokie stężenie składnika biofunkcyjnego ma na celu wytworzenie zupełnie nowego produktu charakteryzującego się bardzo wysoką koncentracją białek enzymatycznych i aminokwasów, postbiotyków i innych związków pochodzenia mikrobiologicznego. Warto wskazać, że biomasa drożdży z gatunku *Yarrowia lipolytica* jest wykorzystywana do produkcji produktów o wysokiej zawartości składników odżywczych. Stanowi źródło białka, aminokwasów, kwasów tłuszczowych, witamin, 2-fenyletanolu. Ponadto gatunek ten posiada status GRAS (ang. Generally Recognized as Safe) co oznacza potwierdzone bezpieczeństwo stosowania w bardzo szerokim zakresie (Eszterbauer i in., 2023).

Należy wskazać, że z uwagi na wspomniane bezpieczeństwo nie ma ograniczeń w stosowaniu tego surowca w kosmetykach w aspekcie stężeń. Obecnie, na polskim i zagranicznym rynku nie ma surowca czy kosmetyku, który zawierałby lizaty komórek drożdży z rodzaju *Yarrowia* sp. lub/i metabolity jak np. kwas alfa-ketoglutaryny. Kwas alfa-ketoglutaryny może przyczynić się do poprawy właściwości antyoksydacyjnych surowca kosmetycznego i/lub formułacji kosmetycznej. Chen i in. wykazali, że AKG może znacznie poprawić aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, jak i obniżyć poziom dialdehydu malonowego, co w konsekwencji prowadzi do poprawy zdolności antyoksydacyjnych, bez efektu drażniącego (Chen i in., 2015).

Szczegółowy skład formułacji przedstawiono w Tabeli 17. Fazę I stanowił bioferment natywny/filtrat w połączeniu z wodą w stosunku 1:1. Następnie składniki fazy II wymieszano ręcznie w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny w zlewce pomocniczej i dodano do fazy I w celu zagęszczenia układu fazy wodnej (I). Następnie połączono fazy I i II i homogenizowano przez 1 min w celu uzyskania jednorodnej żelowej konsystencji za pomocą homogenizatora IKA T 50 Ultra-Turrax z prędkością obrotów 6000 obr./min. Następnie dodano kolejno składniki fazy III. Odczyn pH mieścił się w zakresie 4,0- 4,5 wobec czego nie dodano regulatora alkalizującego, z założeniem by zachować maksymalną aktywność biologiczną kwasu alfa-ketoglutaryny obecnego w biofermencie/filtracie. Jako zagęstnik zastosowano gumę ksantanową, która nadaje korzystne walory sensoryczne podczas aplikacji na skórę, zmniejszając lepkość i dając odczucie aksamitnego wykończenia po wchłonięciu produktu. W celu optymalizacji procesu dozowania fazy II do I wykorzystano połączenie gumy ksantanowej z gliceryną oraz pantenolem w naczyniu pomocniczym, które znacznie ułatwiają dozowanie lepkiego roztworu gumy do naczynia głównego, co ostatecznie skraca czas mieszania i homogenizacji w celu uzyskania jednorodnego żelu z fazy wodnej. Odpowiedni, wcześniej zoptymalizowany czas homogenizacji (maksymalnie 1 min.) zastosowano nie tylko w celu uzyskania homogeniczności serum, ale przede wszystkim w celu uzyskania odpowiedniej lepkości produktu. Lepkość serum zależy od stężenia gumy ksantanowej. Należy wskazać, że zachowanie odpowiedniej lepkości żelu nie jest zadaniem łatwym i wymaga wielu prób i optymalizacji jakościowo-ilościowej składników receptury. Niekorzystny wpływ mogą mieć takie składniki jak wysokie stężenie soli oraz obecność kwasów organicznych (Brunchi i in., 2019). Innym ważnym parametrem są siły ścinające podczas procesu homogenizacji biopolimeru, których optymalny dobór, z jednej strony musi zapewniać homogenność, z drugiej stabilność żelu, zwłaszcza podczas przechowywania gotowego produktu. Bardzo ważnym parametrem w technologii otrzymywania serum jest temperatura. W tym przypadku proces jest prowadzony „na zimno” w temperaturze pokojowej, dzięki czemu jest energooszczędny.

Temperatura pokojowa procesu ma jeszcze jedną bardzo ważną zaletę, która dotyczy „ochrony” składników bioaktywnych. Ponadto, połączenie funkcji reologicznej humektantów z korzystnym łagodzącym działaniem pantenolu stanowi szczególną wartość w aspekcie pielęgnacji cery suchej i bardzo suchej. Ostatecznie, po połączeniu wszystkich faz, uzyskano jednorodną lekko mętną, jasno żółtą i półpłynną, żelową formułę serum.

**Tabela 17. Skład serum do twarzy ze składnikiem biofunkcyjnym**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
<b>Faza I</b>				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Bioferment natywne/Filtrat	Yarrowia lipolytica Ferment Lysate, Alpha-Ketoglutaric Acid, Pyruvic Acid, Citric Acid / Yarrowia Lipolytica Ferment Filtrate, Alpha-Ketoglutaric Acid, Pyruvic Acid, Citric Acid	50	substancja aktywna
<b>Faza II</b>				
3	Gliceryna farmaceutyczna roślinna	Glycerin	3-5	humektant
4	D-Panthenol	Panthenol	3-5	substancja aktywna/humektant
5	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,2-0,5	zagęstnik
<b>Faza III</b>				
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5-1,9	konserwant
12	Dibursztynian trisodowo-etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1-0,5	substancja chelatująca

Próbę kontrolną przygotowano analogicznie jak próby badane, przy czym zamiast składnika pochodzenia mikrobiologicznego dodano kwas cytrynowy w stężeniu 3% (Tab. 18). Wybór kwasu cytrynowego jest podyktowany jego udowodnionymi właściwościami fizykochemicznymi i funkcjonalnymi. Obecność kwasu propionowego oraz cytrynowego przyczynia się do utrzymania kwaśnego odczynu pH naskórka, zmniejszając tym samym ryzyko hiperpigmentacji podczas leczenia (Moussou i in., 2014).

**Tabela 18. Skład serum do twarzy bez składnika biofunkcjonalnego – próba kontrolna**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
Faza I				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Kwas cytrynowy roztwór 3%	Citric Acid	10	substancja aktywna
Faza II				
3	Gliceryna farmaceutyczna roślinna	Glycerin	3-5	humektant
4	D-Panthenol	Panthenol	3-5	substancja aktywna/humektant
5	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,2-0,5	zagęstnik
Faza III				
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5-1,9	konserwant
12	Dibursztynian trisodowo- etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1-0,5	substancja chelatuująca

Trzecim przygotowanym produktem kosmetycznym był żel do mycia twarzy (Tab. 19 i 20). Założenie teoretyczne zakładało stosowanie żelu do mycia twarzy w celu kompleksowego i synergistycznego działania opracowanej linii produktów podczas codziennej pielęgnacji przez potencjalnych użytkowników. Na etapie testów aplikacyjno-użytkowych stosowanie żelu o znanym i zbliżonym recepturowo składzie ma na celu wykluczyć wpływ innych kosmetyków (nie znanych koordynatorowi badań) na wyniki badań. Żel do mycia twarzy jest przeznaczony dla osób w czasie retinoidoterapii i ma bardzo wysoki potencjał wdrożeniowy, ze względu na brak na rynku polskim tak dedykowanego produktu zawierającego składniki naturalnego, mikrobiologicznego pochodzenia.

Jako bazę kosmetyku zastosowano mieszaninę wody z składnikiem biofunkcjonalnym (bioferment natywny/filtrat) w stężeniu 10%. Takie, a nie wyższe stężenie tego składnika było podyktowane mniej kontrolowanym dozowaniem kosmetyku na skórę oraz obecnością w nim surfaktantu, który może jako składnik powierzchniowo czynny znacznie zwiększyć potencjał narażenia na substancje obecne w formule. Potencjał narażenia poszczególnych składników kosmetycznych uwzględniania się w marginesu bezpieczeństwa substancji stosowanych w

kosmetykach. Margines bezpieczeństwa odnosi się do różnicy między dawką substancji użytej w kosmetyku, a dawką która może być potencjalnie szkodliwą dla zdrowia (potencjał narażenia) (Fabio i in., 2021). Fazę I stanowiło połączenie składnika biofunkcjonalnego z wodą. Składniki fazy II wymieszano ręcznie w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny bez grudek (w zlewce pomocniczej) i dodano do fazy I w celu zagęszczenia układu fazy wodnej (I). Połączone fazy I i II mieszano ręcznie a następnie homogenizowano przez 1 min w celu uzyskania jednorodnej żelowej konsystencji za pomocą homogenizatora IKA T 50 Ultra-Turrax z prędkością obrotową z 6000 obr./min. Podczas homogenizacji, zmniejszono obroty do 5000 obr/min i dodano składnik fazy III tj. surfaktant by nie doprowadzić do spieniania żelu. Pelargonian poliglicerylu-4 to niejonowy łagodny środek powierzchniowo czynny a jednocześnie solubilizator, środek nawilżający i pieniający. Stanowi efekt polimeryzacji kwasu pelargonowego i gliceryny (komponent alkoholowy). W formule kosmetyku zastosowano minimalne stężenie składnika myjącego, który ma na celu efektywne umycie skóry twarzy bez efektu ściągania czy podrażnienia wrażliwej skóry podczas leczenia dermatologicznego retinoidami (Kato i in., 2003). Ostatnim etapem było przygotowanie fazy IV. Ostatecznie uzyskano lekko mętny jasny żółto-brązowy jednorodny żel.

**Tabela 19. Skład żelu do mycia twarzy ze składnikiem biofunkcyjnym**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
Faza I				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Kwas cytrynowy roztwór 3%	Citric Acid	10	substancja aktywna
Faza II				
3	D-panthenol	Panthenol	3-5	substancja aktywna, humektant
4	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,5-1	zagęstnik
Faza III				
5	Pelargonian poliglicerylu-4	Polyglyceryl-4 Pelargonate	5,0-10	surfaktant
Faza IV				
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5-1,9	konserwant

12	Dibursztynian trisodowo-etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1-0,5	substancja chelatująca
----	--	---------------------------------------	---------	------------------------

Równolegle przygotowano wariant żelu bez składnika biofunkcjonalnego jako wariant kontrolny (Tab. 20). W tym wariacie zastosowano 3% roztwór kwasu cytrynowego zamiast biofermentu natywnego czy filtratu.

**Tabela 20. Skład żelu do mycia twarzy bez składnika biofunkcjonalnego – próba kontrolna**

Lp.	Nazwa komercyjna	Nazwa INCI	Stężenie g/100g +/-5	Funkcja
Faza I				
1	Woda	Aqua	ds	rozpuszczalnik
2	Bioferment natywny/Filtrat	Yarrowia lipolytica Ferment Lysate, Alpha-Ketoglutaric Acid, Pyruvic Acid, Citric Acid/ Yarrowia lipolytica Ferment Filtrate, Alpha-Ketoglutaric Acid, Pyruvic Acid, Citric Acid	10	substancja aktywna
Faza II				
3	D-panthenol	Panthenol	3-5	substancja aktywna, humektant
4	Guma kasantanowa	Xanthan Gum	0,5-1	zagęstnik
Faza III				
5	Pelargonian poliglicerylu-4	Polyglyceryl-4 Pelargonate	5,0-10	surfaktant
Faza IV				
11	Lewulinian sodu, sorbinian potasu	Sodium Levulinate, Potassium Sorbate	0,5-1,9	konserwant
12	Dibursztynian trisodowo-etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,1-0,5	substancja chelatująca

### 3. Charakterystyka fizyko-chemiczna formułacji kosmetycznych

Kolejnym etapem prac była podstawowa charakterystyka opracowanych formułacji kosmetycznych. Ten etap badań jest obligatoryjny i pozwala na wstępną ocenę jakości opracowanych produktów. Stanowi również element potwierdzający stabilność fizykochemiczną formuły pozwalająca na określenie minimalnej daty przydatności do użycia oraz obligatoryjny załącznik do raportu bezpieczeństwa (ang. Safety Assessment Report), warunkujący wprowadzenie produktu na rynek. Charakterystykę właściwości fizyko-chemicznych zaprezentowano w tabelach 21-23.

**Tabela 21. Właściwości fizyczne i chemiczne oraz stabilność kremu do twarzy**

Wariant formułacji	Kb	Kf	Kk
<b>Charakterystyka fizyko-chemiczna formułacji kosmetycznej</b>			
Postać / wygląd	Jednorodna emulsja / krem	Jednorodna emulsja / krem	Jednorodna emulsja / krem
Barwa	Kremowa biało - beżowa	Kremowa biało - beżowa	Biała
Zapach	Charakterystyczny (słabo wyczuwalny) drożdżowy	Charakterystyczny (słabo wyczuwalny) drożdżowy	Bez zapachu
Wartość pH	5,25 Przyjęty zakres 4,5-5,5	4,4 Przyjęty zakres 4,0-5,0	5,3 Przyjęty zakres 4,5-5,0
Lepkość mPa*s	2826,0 47,1%; SP:L4; RPM:100; T:22,9°C	3236,1 53,9%; SP:L4; RPM:100; T:22,9°C	3022,9 50,4%; SP:L4; RPM:100; T:22,9°C
Gęstość g/cm <sup>3</sup>	0,969	0,985	0,985
<b>Wstępna ocena stabilności produktu kosmetycznego - test temperaturowy 24 h</b>			
Badane parametry	Barwa, zapach, konsystencja (Pomiary wykonane w temperaturze pokojowej 22°C)		
Zakres temperatur badania	4°C, 20°C, 40°C		
Wynik badania	Pozytywny (Bez zmian)	Pozytywny (Bez zmian)	Pozytywny (Bez zmian)
Wstępna ocena stabilności produktu kosmetycznego test wirówkowy po 24h (szybkość wirowania 2000 obr/min, czas wirowania na 3 min.)			



Wynik badania	Pozytywny (Bez rozwarstwienia faz)	Pozytywny (Bez rozwarstwienia faz)	Pozytywny (Bez rozwarstwienia faz)
---------------	---------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------

**Tabela 22. Właściwości fizyczne i chemiczne oraz stabilność serum do twarzy**

Wariant formułacji	Sb	Sf	Sk
<b>Charakterystyka fizyko-chemiczna formułacji kosmetycznej</b>			
Postać/wygląd	płynny przejrzysty żel	płynny przejrzysty żel	płynny przejrzysty żel
Barwa	jasno - żółta	jasno - żółta	jasno - żółta
Zapach	Charakterystyczny (słabo wyczuwalny) drożdżowy	Charakterystyczny (słabo wyczuwalny) drożdżowy	Bez zapachu
Wartość pH	4,1 (przyjęty zakres 3,5-4,5)	4,1 (przyjęty zakres 3,5-4,5)	4,1 (przyjęty zakres 3,5-4,5)
Lepkość mPa*s	278,4 92,8%; SP:L2; RPM:100; T:22,8°C	278,4 92,8%; SP:L2; RPM:100; T:22,8°C	278,4 92,8%; SP:L2; RPM:100; T:22,8°C
Gęstość g/cm <sup>3</sup>	1,009	1,009	1,009
<b>Wstępna ocena stabilności produktu kosmetycznego - test temperaturowy 24 h</b>			
Badane parametry	Barwa, zapach, konsystencja (Pomiary wykonane w temperaturze pokojowej 22°C)		
Zakres temperatur badania	4°C, 20°C, 40°C		
Wynik badania	Pozytywny (Bez zmian)	Pozytywny (Bez zmian)	Pozytywny (Bez zmian)
<b>Wstępna ocena stabilności produktu kosmetycznego test wirówkowy po 24h (szybkość wirowania 2000 obr/min., czas wirowania na 3 min.)</b>			
Wynik badania	Pozytywny (Bez rozwarstwienia faz)	Pozytywny (Bez rozwarstwienia faz)	Pozytywny (Bez rozwarstwienia faz)

**Tabela 23. Właściwości fizyczne i chemiczne oraz stabilność żelu do mycia twarzy**

Wariant formułacji	Żb	Żf	Żk
<b>Charakterystyka fizyko-chemiczna formułacji kosmetycznej</b>			

Postać/wygląd	przejrzysty żel	przejrzysty żel	przejrzysty żel
Barwa	jasno - żółta	jasno - żółta	jasno - żółta
Zapach	Charakterystyczny (słabo wyczuwalny) drożdżowy	Charakterystyczny (słabo wyczuwalny) drożdżowy	Bez zapachu
Wartość pH	4,95 (przyjęty zakres 4,5-5,5)	4,95 (przyjęty zakres 4,5-5,5)	4,95 (przyjęty zakres 4,5-5,5)
Lepkość mPa*s	375,4 31,3%; SP:L3; RPM:100; T:22,9°C	375,4 31,3%; SP:L3; RPM:100; T:22,9°C	375,4 31,3%; SP:L3; RPM:100; T:22,9°C
Gęstość g/cm <sup>3</sup>	0,9565	0,9565	0,9565
<b>Wstępna ocena stabilności produktu kosmetycznego - test temperaturowy 24 h</b>			
Badane parametry	Barwa, zapach, konsystencja (Pomiary wykonane w temperaturze pokojowej 22°C)		
Zakres temperatur badania	4°C, 20°C, 40°C		
Wynik badania	Pozytywny (Bez zmian)	Pozytywny (Bez zmian)	Pozytywny (Bez zmian)
<b>Wstępna ocena stabilności produktu kosmetycznego test wirówkowy po 24h (szybkość wirowania 2000 obr/min., czas wirowania na 3 min.)</b>			
Wynik badania	Pozytywny (Bez rozwarstwienia faz)	Pozytywny (Bez rozwarstwienia faz)	Pozytywny (Bez rozwarstwienia faz)

Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady WE 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych, konieczna jest weryfikacja formułacji kosmetycznych w aspekcie obecności zanieczyszczeń i substancji niedozwolonych. W załączniku II do Rozporządzenia (WE) nr 1223/2009 można znaleźć ponad 1600 substancji zakazanych do stosowania w produktach kosmetycznych. W tym wykazie znajdują się np. metale ciężkie takie jak ołów, kadm, arsen, nikiel czy rtęć. Pomimo oficjalnego zakazu ich stosowania wyżej wymienione substancje niedozwolone mogą być obecne w produktach kosmetycznych w niezamierzonych ilościach śladowych. Zgodnie z Art. 17 Rozp. nr 1223/2009 dopuszczalna jest niezamierzona obecność małej ilości substancji niedozwolonej, pochodzącej z zanieczyszczeń składników naturalnych lub syntetycznych, procesu wytwarzania, przechowywania, migracji z opakowania, która przy zastosowaniu zasad Dobrej Praktyki

Produkcyjnej jest ze względów technologicznych nie do uniknięcia, pod warunkiem, że produkty kosmetyczne je zawierające są nadal bezpieczne dla zdrowia ludzi w normalnych lub dających się przewidzieć warunkach stosowania. Nie trzeba wyszczególniać ich w składzie wyrobu podanym na etykiecie (Art. 19 Rozp. 1223/2009). W przypadku obecności ilości śladowych substancji niedozwolonych należy jednak przedstawić dowody na to, że ich uniknięcie jest niemożliwe ze względów technicznych. Standardowo weryfikacja metali ciężkich odbywa się na podstawie deklaracji i oświadczeń ich zawartości w dokumentacji poszczególnych surowców kosmetycznych lub na podstawie analizy finalnego kosmetyku. Jest to ważny i obligatoryjny aspekt warunkujący bezpieczeństwo produktu.

Wyniki analizy stężenia metali ciężkich przedstawia Tab.24.

**Tabela 24. Zanieczyszczenia, śladowe ilości substancji niedozwolonych w opracowanych formułacjach**

Oznaczany wskaźnik	Norma badawcza	Jednostka	Badania formułacja								
			Kb	Kf	Kk	Sb	Sf	Sk	Żb	Żf	Żk
Nikiel	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	0,017	0,058	0,076	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,010
Rtęć	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,010	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,010
Ołów	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,050	<0,05 0	<0,05 0	<0,05 0	<0,05 0	<0,05 0	<0,05 0	<0,05 0	<0,050
Kadm	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,010	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,01 0	<0,010
Arsen	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,050	<0,05 0	<0,05 0	<0,05 0	<0,05 0	<0,05 0	<0,05 0	<0,05 0	<0,050

Uzyskane wyniki badań wskazują, że opracowane formułacje kosmetyczne spełniają wymagania Rozporządzenia WE 1223/2009, a oznaczone stężenia metali ciężkich są bezpieczne dla zdrowia potencjalnych użytkowników.

#### **4. Test konserwacji**

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych sprzedawanych na terenie Unii Europejskiej nakłada na producentów obowiązek posiadania wyników testu konserwacji (tzw. Challenge Test). Jest jednym z kluczowych testów wykorzystywanych w ocenie jakości produktów kosmetycznych. Jego zadaniem jest sprawdzenie i potwierdzenie tzw. stabilności mikrobiologicznej kosmetyku, wykazującej czy produkt jest dostatecznie chroniony przed

rozwojem drobnoustrojów, dzięki zastosowaniu środków konserwujących. Dodatkowo, wykonując test konserwacji można wyznaczyć najniższe stężenie substancji konserwującej, która zapewni ochronę formułacji kosmetycznej i jej stabilność mikrobiologiczną oraz określenie czasu przydatności kosmetyku do użycia. Skuteczność układu konserwującego ocenia się liczbowo z uwzględnieniem dwóch profili A i B. W opracowanych formułacjach zastosowano konserwant w postaci mieszaniny soli sodowej kwasu lewulinowego oraz sorbinianu potasu. Dobór stężenia układu konserwującego oparto na wynikach badań (Pinto i in., 2021), które wskazały skuteczny zakres działania bakteriostatycznego kosmetyku z zachowaniem bezpieczeństwa dla mikrobioty kolonizującej naskórek.

W celu oceny działania substancji konserwującej próby formułacji kosmetycznych sztucznie zakażano pojedynczymi szczepami drobnoustrojów wskaźnikowych z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*. Analizę mikrobiologiczną wykonano bezpośrednio po zakażeniu (T0) oraz po 7 (T1), 14 (T2) i 28 (T3) dniach od zakażenia w celu ustalenia liczebności mikroorganizmów w próbach. Wyniki przedstawiono w Tab. 25-27.

**Tabela 25. Test konserwacji dla formułacji typu krem do twarzy**

Badany parametr	Kryterium akceptacji	Wynik w czasie T0, T1,T2,T3		
		Kb	Kf	Kk
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g
<i>Escherichia coli</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g
<i>Candida albicans</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g

**Tabela 26. Test konserwacji dla formułacji typu serum do twarzy**

Badany parametr	Kryterium akceptacji	Wynik w czasie T0, T1,T2,T3		
		Sb	Sf	Sk
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g

<i>Staphylococcus aureus</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g
<i>Escherichia coli</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g
<i>Candida albicans</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g

**Tabela 27. Test konserwacji dla formułacji typu żel do mycia twarzy**

Badany parametr	Kryterium akceptacji	Wynik w czasie T0, T1, T2, T3		
		Żb	Żf	Żk
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g
<i>Escherichia coli</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g
<i>Candida albicans</i>	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g	Nieobecne w 1 g

Przeprowadzony test konserwacji wykazał, że zastosowana substancja konserwująca zapewnia bezpieczeństwo mikrobiologiczne i zabezpiecza każdą formułację kosmetyczną przed wzrostem drobnoustrojów niepożądanych. Warto wskazać, że zastosowanie składnika w postaci biofermentu lub filtratu, w którego skład wchodzi szereg związków chemicznych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (kwasy organiczne, białka enzymatyczne, bakteriocyny) dodatkowo zabezpiecza produkt przed ewentualnym rozwojem drobnoustrojów. Z drugiej strony istnieje pewne niebezpieczeństwo związane ze stosowaniem składników pochodzenia mikrobiologicznego, z uwagi na możliwość niekontrolowanego wzrostu komórek (w tym przypadku drożdży z rodzaju *Yarrowia* sp.). Dlatego kluczowa jest weryfikacja skuteczności dezaktywacji biomasy drobnoustrojów w surowcu.

## 5. Jakość mikrobiologiczna

Kluczowym parametrem warunkującym bezpieczeństwo formułacji kosmetycznej jest jego czystość mikrobiologiczna, zarówno zaraz po produkcji jak i w czasie przechowywania. Parametr ten jest szczególnie ważny w przypadku formułacji, które w składzie zawierają

składnik pochodzenia mikrobiologicznego. Zgodnie z normą PN-EN ISO 17516: 2014-11 produkty kosmetyczne dzielimy na dwie kategorie: Kategoria I: kosmetyki przeznaczone dla dzieci poniżej trzeciego roku życia i stosowane w okolicach oczu, co w przypadku kosmetyków dedykowanych do pielęgnacji skóry podczas leczenia dermatologicznego jest również kryterium pożądanym. Kategoria II: pozostałe kosmetyki. Dla kategorii I maksymalny limit akceptacji ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych wynosi  $2,0 \times 10^2$  jtk/g, drobnoustroje specyficzne (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*) nieobecne w 1 g. Dla kategorii II maksymalny limit akceptacji ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych wynosi  $2,0 \times 10^3$  jtk/g, drobnoustroje specyficzne (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*) nieobecne w 1 g. To badanie czystości mikrobiologicznej decyduje o tym, czy dany produkt zostanie dopuszczony do obrotu. Wymóg badania czystości mikrobiologicznej produktów kosmetycznych oraz surowców przeznaczonych do ich produkcji wynika z Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 i obowiązuje na terenie całej Unii Europejskiej.

Badania czystości mikrobiologicznej gotowych formułacji przeprowadzono w trzech wariantach temperaturowych 4°C, 20°C i 37°C, w czterech punktach czasowych T0 (bezpośrednio po produkcji), T2 (2 tygodnie po produkcji), T4 (4 tygodnie po produkcji) i T8 (8 tygodni po produkcji). Uzyskane wyniki badań przedstawiono w tabelach 28-30.

**Tabela 28. Wyniki badań mikrobiologicznych formułacji kosmetycznych typu krem do twarzy.**

Badany parametr	Metoda	Kryterium akceptacji	Jednostka miary	Wynik w czasie T0, T2, T4, T8 w temperaturze 4°C, 20°C i 37°C		
				Kb	Kf	Kk
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych	PN-EN ISO 21149:2017-07	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych psychrofilnych	PN-EN ISO 21149:2017-07	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drożdży i pleśni mezofilnych	PN-EN ISO 16212:2017-08	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drożdży i pleśni psychrofilnych	PN-EN ISO 16212:2017-08	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PN-EN ISO 22717:2016-01	nieobecne w 1g	-	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g
<i>Candida albicans</i>	PN-EN ISO 18416:2016-01	nieobecne w 1g	-	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g
<i>Staphylococcus aureus</i>	PN-EN ISO 22718:2016-01	nieobecne w 1g	-	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g

**Tabela 29. Wyniki badań mikrobiologicznych formulacji kosmetycznych typu serum do twarzy**

Badany parametr	Metoda	Kryterium akceptacji	Jednostka miary	Wynik w czasie T0, T2, T4, T8 w temperaturze 4°C, 20°C i 37°C		
				Sb	Sf	Sk
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych	PN-EN ISO 21149:2017-07	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych psychrofilnych	PN-EN ISO 21149:2017-07	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drożdży i pleśni mezofilnych	PN-EN ISO 16212:2017-08	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drożdży i pleśni psychrofilnych	PN-EN ISO 16212:2017-08	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PN-EN ISO 22717:2016-01	nieobecne w 1g	-	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g
<i>Candida albicans</i>	PN-EN ISO 18416:2016-01	nieobecne w 1g	-	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g
<i>Staphylococcus aureus</i>	PN-EN ISO 22718:2016-01	nieobecne w 1g	-	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g

**Tabela 30. Wyniki badań mikrobiologicznych formulacji kosmetycznych typu żel do mycia twarzy.**

Badany parametr	Metoda	Kryterium akceptacji	Jednostka miary	Wynik w czasie T0, T2, T4, T8 w temperaturze 4°C, 20°C i 37°C		
				Żb	Żf	Żk
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych	PN-EN ISO 21149:2017-07	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$

Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych psychrofilnych	PN-EN ISO 21149:2017-07	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drożdży i pleśni mezofilnych	PN-EN ISO 16212:2017-08	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drożdży i pleśni psychrofilnych	PN-EN ISO 16212:2017-08	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PN-EN ISO 22717:2016-01	nieobecne w 1g	-	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g
<i>Candida albicans</i>	PN-EN ISO 18416:2016-01	nieobecne w 1g	-	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g
<i>Staphylococcus aureus</i>	PN-EN ISO 22718:2016-01	nieobecne w 1g	-	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g	nieobecne w 1g

Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że wszystkie opracowane formułacje kosmetyczne charakteryzują się bardzo dobrą stabilnością mikrobiologiczną w czasie przechowywania w różnych, skrajnych warunkach temperaturowych. Wyniki przedstawiają, że wszystkie badane próbki uzyskały kategorię I czystości mikrobiologicznej kosmetyku. Dla żadnej formułacji nie zaobserwowano wzrostu drobnoustrojów, ani potencjalnie patogennych jak i mezofilnych i psychrofilnych.

## 6. Ocena stabilności produktów kosmetycznych

Jednymi z najważniejszych analiz produktów kosmetycznych są testy stabilności (testy starzeniowe) i kompatybilności z opakowaniem. Testy stabilności mają na celu określenie czasu przydatności produktu kosmetycznego, podczas przechowywania w odpowiednich warunkach temperaturowych w przeznaczonych do tego opakowaniach w trakcie użytkowania zgodnie z jego przeznaczeniem (Ozga, 2012). Niemożliwe jest jednak, aby produkt nie był zmienny w czasie, w różnych temperaturach, jest to zależne to od zmian środowiskowych oraz od długości przeznaczenia do użytku produktu. Podczas badań stabilności można zastosować różne zakresy temperatur oraz czasy testowania.

Próby formułacji kosmetycznych poddano ocenie stabilności w czasie i w różnych warunkach temperaturowych. Badania prowadzono przez 12 tygodni w temperaturze 4°C, 20°C i 37°C, analizując parametry formułacji po 2, 4, 8 i 12 tygodniach od rozpoczęcia testu. Wyniki oceny przedstawiają Tab. 31-33.



Tabela 31. Ocena stabilności formułacji typu krem do twarzy

Wariant formułacji	Temperatura przechowywania	Punkt czasowy	Barwa	Zapach	Konsystencja
<b>Kb</b>	4°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	20°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	37°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości
		T8	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości
		T12	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości
<b>Kf</b>	4°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	20°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	37°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości

		T12	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości	
<b>Kk</b>	4°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	
	20°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	37°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości	
		T12	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości	

**Tabela 32. Ocena stabilności formułacji typu serum do twarzy**

<b>Wariant formułacji</b>	<b>Temperatura przechowywania</b>	<b>Punkt czasowy</b>	<b>Barwa</b>	<b>Zapach</b>	<b>Konsystencja</b>	
<b>Sb</b>	4°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	
	20°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	37°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian

		T4	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości
		T8	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości
		T12	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości
<b>Sf</b>	4°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	20°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	37°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości
		T12	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości
<b>Sk</b>	4°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	20°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	37°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian

		T8	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości
		T12	Bez zmian	Bardziej intensywny	Obniżenie lepkości

**Tabela 33. Ocena stabilności formułacji typu żel do mycia twarzy**

<b>Wariant formułacji</b>	<b>Temperatura przechowywania</b>	<b>Punkt czasowy</b>	<b>Barwa</b>	<b>Zapach</b>	<b>Konsystencja</b>
<b>Żb</b>	4°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	20°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	37°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Obniżenie lepkości
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Obniżenie lepkości
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Obniżenie lepkości
<b>Żf</b>	4°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	20°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	37°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian

		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Obniżenie lepkości
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Obniżenie lepkości
<b>Żk</b>	4°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	20°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T12	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
	37°C	T0	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
		T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian

W czasie 12 tygodni przechowywania nie wykazano znaczących zmian barwy wszystkich testowanych formułacji. Jedyne zaobserwowane zmiany dotyczyły intensywności zapachu i zmiany konsystencji wszystkich 9 badanych formułacji, zwłaszcza w przypadku produktów typu krem do twarzy i serum do twarzy. Jednak obserwacje te dotyczą jedynie prób przechowywanych w podwyższonej temperaturze (37°C), co zapewne ma związek ze zmianami reologicznymi emulsji/hydrożelu.

## 7. Ocena kompatybilności matrycy kosmetycznej z opakowaniem

Ważnym etapem przy wdrożeniu kosmetyku na rynek jest wybranie odpowiedniego opakowania tak, aby nie wykazywało braku kompatybilności z masą kosmetyczną, zapewniało wygodne dozowanie, zabezpieczało masę przed działaniem czynników środowiskowych oraz zapewniało stabilność masy w zmiennych warunkach temperaturowych. Kompatybilność opakowania z masą kosmetyku zależy głównie od rodzaju tworzywa, z którego zostało wykonane. Wzajemne oddziaływanie tworzywa opakowaniowego i masy kosmetycznej jest weryfikowane na podstawie testów kompatybilności, które polegają na sprawdzeniu ich interakcji w różnych warunkach temperaturowych. Opakowanie nie może wywierać wpływu na

skład masy, zmieniać jej barwy, zapachu i lepkości. Kompatybilność masy kosmetyku z opakowaniem wiąże się również z jego formą, postacią, sposobem dozowania i przeznaczeniem formułacji. Ostatecznie jako opakowania do badanych formułacji kosmetycznych wybrano butelki z PP (polipropylen) typu airless o pojemności 30 ml dla serum do twarzy i 50 ml dla kremu do twarzy oraz transparentną butelkę PET (polietylen) o objętości 200 ml z pompką dozującą dla żelu myjącego.

**Tabela 34. Test użytkowy kremu do twarzy - opakowanie butelka typu airless 50 ml – test typu dozowanie masy**

Warianty kremu do twarzy	Doza użytkowa (g/doza)	Ocena dozy
Kb	0,4	Poprawna
Kf	0,4	Poprawna
Kk	0,5	Poprawna

**Tabela 35. Test użytkowy serum do twarzy - opakowanie typu airless 30 ml – test typu dozowanie masy**

Warianty serum do twarzy	Doza użytkowa (g/doza)	Ocena dozy
Sb	0,4	Poprawna
Sf	0,4	Poprawna
Sk	0,5	Poprawna

Wytypowane opakowanie typu airless pozwala na poprawne dozowanie porcji kremu lub serum. Określenie dozy kosmetyku jest istotne ze względu na bezpieczeństwo użytkowania. Dzięki wyznaczeniu tego wskaźnika, w raporcie bezpieczeństwa wylicza się dawkę narażenia na poszczególne substancje, określając profil toksykologiczny formułacji. Dla produktów typu serum czy krem bierze się pod uwagę miejsca zastosowania tj. skóra twarzy, której powierzchnia aplikacji to średnio 565 cm<sup>2</sup>, określona zgodnie z wytycznymi (RIVM report 320104001/2006 holenderski Państwowy Instytut Zdrowia) oraz wytyczne SCCS/1602/18 (ang. SCCS, Scientific Committee on Consumer Safety) dla przeciętnego konsumenta o wadze 60 kg oraz masy stosowanego produktu 1,54 g/dzień. Wobec czego podczas opracowania instrukcji użytkowania serum (deklaracje na etykiecie opakowania), można założyć, że wmasowanie jednej dozy formułacji po umyciu rano i wieczorem mieści się w zakresie norm i jest bezpieczne pod względem ilości zastosowanego kosmetyku.

**Tabela 36. Test użytkowy żelu do mycia twarzy - opakowanie typu PET 200 ml  
– test typu dozowanie masy**

Żel do mycia twarzy	Doza użytkowa (g/jedna doza)	Ocena dozy
Żb	1,1	Poprawna
Żf	1,1	Poprawna
Żk	1,1	Poprawna

Masa dobowej dawki kosmetyku myjącego przeznaczonego do mycia twarzy determinuje między innymi jego doza. Dla żelu myjącego do twarzy, suma masy kosmetycznej podzielonej na dobę wynosi 5 g/dzień. Wytyczne zostały określone w raporcie dotyczącym warunków dla bezpiecznego stosowania kosmetyków - RIVM report 320104001/2006 oraz SCCS/1602/18. Wobec tego można założyć, że 1-2 dozy są bezpieczne a jednocześnie będą wystarczające na poranną i wieczorną higienę skóry twarzy.

#### **8. Testy starzeniowe kompatybilności matrycy kosmetycznej z opakowaniem**

Równolegle przeprowadzono testy starzeniowe i poddano ocenie zarówno opakowanie jak i masę (Tab. 37). Próbkę kosmetyku typu serum do twarzy w opakowaniach airless przechowywano w temperaturze pokojowej 22°C oraz w zmiennych warunkach temperatury od 4°C do 40°C (warunki stresowe). Czas badania wynosił 12 tygodni. Próbkę kontrolnej serum do twarzy nie badano, ponieważ produkt nie będzie ostatecznie komercjalizowany.

**Tabela 37. Testy starzeniowe kompatybilności serum do twarzy z biofermentem natywnym z opakowaniem typu airless 30 ml**

Warunku przechowywania		Temperatura pokojowa 22°C	Temperatura 4°C - 40°C
Wygląd opakowania	Szczelność	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian
	Deformacja	Nie zaobserwowano	Nie zaobserwowano
Wygląd masy	Postać	Bez zmian	Bez zmian
	Zapach	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian

**Tabela 38. Test starzeniowy kompatybilności serum do twarzy z filtrem z opakowaniem typu airless 30 ml**

Warunki przechowywania		Temperatura pokojowa 22°C	Temperatura 4°C - 40°C
Wygląd opakowania	Szczelność	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian
	Deformacja	Nie zaobserwowano	Nie zaobserwowano
Wygląd masy	Postać	Bez zmian	Bez zmian
	Zapach	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian

Wyniki badań kompatybilności masy z opakowaniem podczas testów starzeniowych wykazały brak interakcji między masą i opakowaniem. Nie zmieniła się postać, barwa oraz zapach obu próbek masy serum. Opakowanie również nie uległo deformacji, nie zmieniło barwy oraz nie straciło szczelności. Warto podkreślić, że podczas badań kompatybilności użytkowej, testom powinna zostać poddana również etykieta kosmetyku aby ocenić jakość i odporność na zdzieranie oraz zachowanie koloru.

Podobną metodologię zastosowano również w przypadku kremu do twarzy. Wyniki (Tab. 39) badań kompatybilności masy z opakowaniem podczas testów starzeniowych wykazały brak interakcji pomiędzy masą i opakowaniem. Nie zmieniła się postać, barwa oraz zapach prób masy kremu. Opakowanie również nie uległo deformacji, nie zmieniło barwy oraz nie straciło szczelności.

**Tabela 39. Test starzeniowy kompatybilności kremu do twarzy z biofermentem natywnym z opakowaniem butelka typu airless 50 ml**

Warunku przechowywania		Temperatura pokojowa 22°C	Temperatura 4°C - 40°C
Wygląd opakowania	Szczelność	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian
	Deformacja	Nie zaobserwowano	Nie zaobserwowano
Wygląd masy	Postać	Bez zmian	Bez zmian
	Zapach	Bez zmian	Bez zmian



Warunku przechowywania		Temperatura pokojowa 22°C	Temperatura 4°C - 40°C
Wygląd opakowania	Szczelność	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian
	Deformacja	Nie zaobserwowano	Nie zaobserwowano
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian

**Tabela 40. Test starzeniowy kompatybilności kremu do twarzy z filtrem z opakowaniem butelka typu airless 50 ml**

Warunku przechowywania		Temperatura pokojowa 22°C	Temperatura 4°C - 40°C
Wygląd opakowania	Szczelność	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian
	Deformacja	Nie zaobserwowano	Nie zaobserwowano
Wygląd masy	Postać	Bez zmian	Bez zmian
	Zapach	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian

Wyniki badań kompatybilności masy z opakowaniem podczas testów starzeniowych również wykazały brak interakcji między masą żelu do mycia twarzy i opakowaniem. Nie zmieniła się postać, barwa oraz zapach badanych próbek żelu. Opakowanie również nie uległo deformacji, nie zmieniło barwy oraz nie straciło szczelności.

**Tabela 41. Test starzeniowy kompatybilności żelu do mycia twarzy z biofermentem natywnym z opakowaniem typu PET 200 ml**

Warunki przechowywania		Temperatura pokojowa 22°C	Temperatura 4°C - 40°C
Wygląd opakowania	Szczelność	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian
	Deformacja	Nie zaobserwowano	Nie zaobserwowano
Wygląd masy	Postać	Bez zmian	Bez zmian
	Zapach	Bez zmian	Bez zmian

Warunki przechowywania		Temperatura pokojowa 22°C	Temperatura 4°C - 40°C
Wygląd opakowania	Szczelność	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian
	Deformacja	Nie zaobserwowano	Nie zaobserwowano
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian

**Tabela 42. Test starzeniowy kompatybilności żelu do mycia twarzy z filtratem z opakowaniem typu PET 200 ml**

Warunki przechowywania		Temperatura pokojowa 22°C	Temperatura 4°C - 40°C
Wygląd opakowania	Szczelność	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian
	Deformacja	Nie zaobserwowano	Nie zaobserwowano
Wygląd masy	Postać	Bez zmian	Bez zmian
	Zapach	Bez zmian	Bez zmian
	Barwa	Bez zmian	Bez zmian

**Rysunek 18. Opakowania wykorzystane w testach kompatybilności a. butelka PET airless 30 ml, b. butelka PET airless 50 ml c. butelka PET z pompką dozującą 200 ml**



**a.**



**b.**



**c.**

## 9. Ocena funkcjonalności formułacji kosmetycznych

### 9.1 Potencjał antyoksydacyjny

Właściwości antyoksydacyjne surowców kosmetycznych jak i gotowych formułacji kosmetycznych to jeden z kluczowych, funkcjonalnych filarów dzisiejszej kosmologii. Związki o potencjale antyoksydacyjnym to chemiczne substancje naturalnego pochodzenia, które neutralizują niszczący wpływ oksydantów, a także hamują ich powstawanie. Jest to niezwykle ważne działanie, ponieważ wolne rodniki potrafią przyczynić się do szeregu niepożądanych zmian w organizmie, w tym skórze. Antyoksydacyjne działanie przeciwutleniaczy polega na hamowaniu działania wolnych rodników, czyli niedopuszczeniu do powstawania reakcji utleniania w organizmie. Dzięki tym związkom chemicznym możliwe jest zapobieganie m.in. przedwczesnemu starzeniu się skóry oraz prewencja oksydacyjnego uszkodzenia lipidów naskórka. Potencjał antyoksydacyjny formułacji kosmetycznej przyczynia się w efekcie do redukcji przebarwień, regenerowania skóry, przywrócenia naturalnej bariery hydrolipidowej, a także jej ochrony przeciw fotostarzeniu.

Z uwagi na skład, jak i przewidywane właściwości antyoksydacyjne opracowanych formułacji kosmetycznych, wykonano analizę tego potencjału, a wyniki przedstawiono w Tab. 43.

Tabela 43. Aktywność antyoksydacyjna i przeciwrodnikowa formułacji kosmetycznych

Lp.	Typ formułacji	DPPH mmol Tx/g s.m	ABTS mmol Tx/g s.m	Aktywność chelatująca 1500 ppm (%)
1	Kb	3,8-4,0	4,7-5,0	12,0-13,0
2	Kf	3,0-3,4	3,7-4,0	10,5-12,0
3	Kk	2,1-2,5	2,8-3,2	8,5-9,0
4	Sb	4,5-5,0	6,2-7,0	14,2-15,0
5	Sf	3,9-4,5	5,7-6,1	13,7-14,5
6	Sk	3,1-4,0	5,0-5,5	12,8-13,5
7	Žb	2,5-3,0	4,2-4,5	11,2-11,5
8	Žf	2,5-3,4	4,0-4,7	10,9-11,2
9	Žk	1,8-2,0	3,6-4,0	10,2-10,8
10	Bioferment natywny	7,6-8,5	9,5-11,2	22,5-25,0
11	Filtrat	6,2-6,9	8,1-8,8	15,0-16,0

Analiza potencjału antyoksydacyjnego opracowanych formułacji kosmetycznych wykazała największą aktywność dla formułacji typu serum zawierającej bioferment natywny, dla której parametr DPPH jest równy 4,5-5,0 mmol Tx/g s.m., wskaźnik ABTS wynosi 6,3-7,0 mmol Tx/g s.m. a aktywność chelatująca 14,2-15,0 %. Nieznacznie niższe wyniki otrzymano dla formułacji krem z biofermentem natywnym dla której parametr DPPH jest równy 3,8-4,0 mmol Tx/g s.m., wskaźnik ABTS wynosi 4,7-5,0 mmol Tx/g s.m. a aktywność chelatująca 12,0-13,0 %. Przeprowadzone analizy wskazują, że wyższym potencjałem antyoksydacyjnym charakteryzują się formułacje zawierający natywny bioferment niż te zawierające filtrat. Natomiast najniższy potencjał antyoksydacyjny wykazano dla formułacji nie zawierających składnika bioaktywnego.

## **9.2 Potencjał przeciwdrobnoustrojowy i prebiotyczny**

Ważną cechą, świadczącą o funkcjonalności formułacji kosmetycznej jest również aktywność przeciwko patogenom, zwłaszcza tych które mogą zasiedlać zewnętrzną powierzchnię skóry. Faktem jest, że barierowe funkcje skóry są wspierane poprzez jej naturalną mikrobiotę, jednak szereg czynników zewnętrznych i środowiskowych może zaburzać zarówno funkcjonowanie skóry jak i przyczynić się do ograniczenia bioróżnorodności jakościowo-ilościowej składu mikrobioty skóry. Dlatego też szczególnie ważne jest, aby innowacyjne formułacje kosmetyczne z jednej strony stymulowały zasiedlanie i wzrost drobnoustrojów prozdrowotnych, w tym probiotycznych, z drugiej natomiast wykazywały charakter przeciwdrobnoustrojowy przeciwko potencjalnym patogenom skóry.

Analizując właściwości prozdrowotne opracowanych formułacji kosmetycznych badano ich wpływ na szczepy bakterii patogennych jak i szczepy drobnoustrojów potencjalnie probiotycznym. W badaniach wykorzystano metodę studzienkowo-dyfuzyjną i formułacje niezawierające substancji konserwujących. Dodatek konserwantu jest wymagany w większości formułacji, jednak w tym badaniu jego obecność spowodowałaby zahamowanie wzrostu drobnoustrojów wobec których analizowano aktywność przeciwdrobnoustrojową. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tab. 44-45.

**Tabela 44. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa formułacji kosmetycznych**

Lp	Typ formułacji	Szczep wzorcowy							
		1	2	3	4	5	6	7	8
		Strefa zahamowania wzrostu drobnoustrojów (mm)							
1	Kb	8,0±2,0	9,0±2,0	11,0±2,0	14,0±3,0	13,0±2,0	15,0±3,0	13,0±2,0	6,0±2,0
2	Kf	8,0±2,0	9,0±2,0	8,0±2,0	9,0±2,0	8,0±2,0	9,0±2,0	8,0±2,0	9,0±2,0
3	Kk	1,0±0,0	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW
4	Sb	11,0±2,0	14,0±3,0	13,0±2,0	15,0±3,0	13,0±2,0	16,0±2,0	11,0±2,0	14,0±3,0
5	Sf	11,0±2,0	14,0±3,0	13,0±2,0	15,0±3,0	13,0±2,0	6,0±2,0	11,0±2,0	14,0±3,0
6	Sk	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW
7	Žb	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW
8	Žf	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW
9	Žk	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW
10	Bioferment natywny	15,0±3,0	19,0±3,0	22,0±3,0	25,0±3,0	20,0±3,0	23,0±3,0	21,0±3,0	10,0±3,0
11	Filtrat	12,0±2,0	13,0±2,0	12,0±2,0	13,0±2,0	11,0±2,0	12,0±2,0	14,0±2,0	7,0±1,0

NW – nie wykazano strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów

**Legenda:**

- 1 - *Clostridium difficile* ATCC 9689
- 2 - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- 3 - *Escherichia coli* ATCC 25922
- 4 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- 5 - *Cutibacterium acnes* ATCC 11827TM
- 6 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- 7 - *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615
- 8 - *Candida albicans* ATCC 10231

Z uzyskanych wyników badań można wywnioskować, że dodatek surowca kosmetycznego w postaci biofermentu natywnego lub filtratu otrzymanego na drodze biotechnologicznej wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec wytypowanych do testów gatunków patogennych. Największy potencjał przeciwdrobnoustrojowy wykazano dla biofermentu natywnego wobec gatunków *Pseudomonas aeruginosa* (25,0±3,0 mm) i *Staphylococcus aureus* (23,0±3,0 mm), co przełożyło się na aktywność przeciwdrobnoustrojową formułacji typu krem i serum zawierających ten dodatek. W przypadku formułacji typu serum z biofermentem aktywność wobec *Pseudomonas aeruginosa* była równa 15,0±3,0 mm a wobec *Staphylococcus*

*aureus* wynosiła  $16,0\pm 3,0$  mm. Niewiele niższą aktywność wykazano dla formułacji typu krem z biofermentem; wobec *Pseudomonas aeruginosa* była równa  $14,0\pm 3,0$  mm a wobec *Staphylococcus aureus* wynosiła  $15,0\pm 3,0$  mm. Nie wykazano znaczącej aktywności przeciwdrobnoustrojowej w przypadku formułacji kontrolnych, niezawierających składnika funkcjonalnego w postaci biofermentu czy filtratu jak i w przypadku formułacji typu żel do mycia.

**Tabela 45. Aktywność prebiotyczna formułacji kosmetycznych**

Lp.	Typ formułacji	Szczep wzorcowy							
		1	2	3	4	5	6	7	8
		Strefa stymulacji wzrostu drobnoustrojów (mm)							
1	Kb	$4,0\pm 1,0$	$5,0\pm 1,0$	$3,0\pm 1,0$	$4,0\pm 1,0$	$2,0\pm 1,0$	$5,0\pm 1,0$	NW	NW
2	Kf	$2,0\pm 1,0$	$2,0\pm 1,0$	$1,0\pm 0,0$	$2,0\pm 0,0$	$1,0\pm 0,0$	$2,0\pm 1,0$	NW	NW
3	Kk	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW
4	Sb	$3,0\pm 1,0$	$3,0\pm 1,0$	$2,0\pm 1,0$	$2,0\pm 1,0$	$3,0\pm 1,0$	$5,0\pm 1,0$	NW	NW
5	Sf	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW
6	Sk	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW
7	Żb	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW
8	Żf	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW
9	Żk	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW
10	Bioferment natywny	$4,0\pm 1,0$	$5,0\pm 1,0$	$3,0\pm 1,0$	$4,0\pm 1,0$	$2,0\pm 1,0$	$5,0\pm 1,0$	NW	NW
11	Filtrat	$2,0\pm 1,0$	$5,0\pm 1,0$	$3,0\pm 1,0$	$5,0\pm 1,0$	$3,0\pm 1,0$	$3,0\pm 1,0$	NW	NW

NW – nie wykazano strefy stymulacji wzrostu drobnoustrojów

**Legenda:**

- 1 - *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356
- 2 - *Lactobacillus casei* ATCC 393
- 3 - *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917
- 4 - *Lactobacillus brevis* ATCC 8287
- 5 - *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103
- 6 - *Lactobacillus reuteri* ATCC 5289
- 7 - *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745
- 8 - *Streptococcus thermophilus* FP 4 (DSM 18616)

Uzyskane wyniki badań wskazują, że bioferment natywny jak i filtrat nie charakteryzuje aktywność stymulująca wzrost bakterii o potencjale probiotycznym. Maksymalna strefa zwiększonego stężenia biomasy wokół studzienki był równa 5,0 mm wobec *Lactobacillus reuteri*. Potencjał prebiotyczny składników funkcjonalnych znalazł odzwierciedlenie w aktywności probiotycznej przygotowanych formułacji. Największy w przypadku kremu do twarzy z biofermentem.

## **10. Badania aparaturowe**

Badanie z udziałem ludzi ma na celu ocenę wpływu kosmetyku na bezpieczeństwo i tolerancję skóry oraz ocenę skuteczności w zakresie deklarowanego sposobu użytkowania (rozszerzona deklaracja producenta). Deklaracja o produkcie kosmetyku, którą chcemy udowodnić poprzez wykonanie odpowiednich badań *in vivo*, powinna być zgodna z rozporządzeniem kosmetycznym 1223/2009 oraz rozporządzeniem 655/2013 dotyczących oświadczeń marketingowych kosmetyku. Dobór odpowiednich metod mających na celu potwierdzanie deklaracji jest obowiązkiem osoby odpowiedzialnej za produkt (producenta kosmetyku). Dowód deklarowanego działania musi znajdować się w dokumentacji produktu w postaci załącznika do raportu bezpieczeństwa. Ważnym elementem są informacje o składnikach aktywnych kosmetyku, bo to one nadają kierunek późniejszym deklaracjom marketingowym na opakowaniu. Należy jednak pamiętać, że zgodnie z dokumentem technicznym (załącznik Rozporządzenia 655/2013 dotyczącym oświadczeń o produktach kosmetycznych) właściwości składnika użytego w recepturze nie mogą być przekładane na właściwości produktu finalnego i nie świadczą o kierunkowym działaniu produktu. Warto podkreślić iż kluczowym aspektem w badaniach *in vivo*, z udziałem ludzi jest fakt, iż zgodnie z Rozporządzeniem CLP 1272/2008 (dotyczącym mieszanin chemicznych), nie można badać na ludziach „półproduktów” w postaci mieszanin np. samych surowców kosmetycznych. Dlatego badanie kosmetyku powinno odbywać się w oparciu o zasady etyczne, których podstawę stanowi Deklaracja Helsińska i które są zgodne z zaleceniami GCP (ang. Good Clinical Practice) i obowiązującymi przepisami.

### **10.1 Ocena miejscowej tolerancji skórnej produktu kosmetycznych kremu i serum do twarzy**

Pierwszym etapem badań prowadzonych z udziałem ochotników była identyfikacja lub wykluczenie własności uczulających i drażniących badanych produktów. Dobór probantów – ochotników, został przeprowadzony przez specjalistę dermatologa po badaniu przedmiotowym i podmiotowym zgodnie z Deklaracją Helsińską z 1964 roku (z późniejszymi uzupełnieniami), przepisami polskimi i unijnymi oraz wytycznymi COLIPA, z zastosowaniem

kryteriów włączenia i wyłączenia do/z badań. Wytypowano 20 ochotników w wieku od 18 do 69 lat. W tym 15 osób z wywiadem alergicznym z wykluczeniem osób uczulonych na składniki produktu. Poinformowano, aby w czasie badania nie przyjmowali leków antyhistaminowych oraz nie stosowali innych środków farmakologicznych (zarówno ogólnoustrojowych jak i miejscowych) mogących mieć wpływ na wynik badania, jak również nie poddawali się naświetlaniom skóry. Skóra w miejscu nakładania produktów była prawidłowa, bez żadnych zmian chorobowych. Wszystkie osoby zakwalifikowane do badania po zapoznaniu się z metodologią testu i uzyskaniu wyjaśnień, wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu. Sposób prowadzenia badań dla kremu do twarzy i serum do twarzy polegał na wykonaniu testów płatkowych (okluzyjnych). Badanie oceniało stopień drażnienia i właściwości uczulające produktów a jego przebieg polegał na nanoszeniu na krążki bibułowe produktu kosmetycznego, które następnie umocowano plastrem hipoalergicznym na skórze pleców, w okolicy międzyłopatkowej. Sposób prowadzenia badań dla żelu do mycia twarzy polegał na przeprowadzeniu testu naskórkowego otwarty (bez okluzji). Próby odczytywano (dla żelu do mycia twarzy) zdejmowano (dla serum do twarzy i kremu do twarzy) po 48 godzinach. Pierwszego odczytu dokonywano zaraz po zdjęciu próby, a następnie po 72 godzinach od nałożenia testu. Ocena była dokonywana zgodnie z ogólnie przyjętą skalą w skórnych testach płatkowych. Skóra badanych osób oraz odczucia subiektywne były oceniane przed, w trakcie i po zakończeniu badania przez lekarza. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tab. 46.

**Tabela 46. Wyniki testów płatkowych (okluzyjnych) – serum do twarzy**

LP	Inicjały	Płeć	Wywiad alergiczny	Wynik podrażnienie	Wynik uczulenie
1	Z.S	M	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
2	E.K	K		Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
3	K.M	K	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
4	M.M	K		Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
5	A.K	K		Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
6	P.P	M	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
7	N.N	K		Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
8	S.T	K		Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
9	J.R	K	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
10	J.N	K	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
11	G.W	K	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)



12	E.L	K	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
13	W.P	K	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
14	P.R	K	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
15	P.I	K	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
16	D.M	K	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
17	K.L	M	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
18	S.W	M	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
19	S.N	M	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)
20	F.K	K	A	Sb (-) Sf (-) Sk (-)	Sb (-) Sf (-) Sk (-)

**Legenda: Serum do twarzy: z natywnym biofermentem (Sb), filtratem (Sf), bez składnika aktywnego - próbka kontrolna (Sk). Płeć: K - kobieta, M – mężczyzna. Rodzaj skóry: A - osoby z wywiadem alergicznym**  
**Ocena wyniku testów płatkowych dokonana przez lekarza dermatologa: (-) – wynik ujemny; brak odczynu (-/+) – wynik wątpliwy; możliwy odczyn rumieniowy, lecz nie wyczuwalny palcem (+) – wynik słabo dodatni; rumień i naciek, wyczuwalny dotykiem (++) – wynik średnio dodatni; rumień i grudki (+++) – wynik silnie dodatni; rumień, pęcherzyki lub nadżerki.**

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań nie stwierdzono własności uczulających i drażniących badanych trzech wersji serum. Dzięki temu badaniu wszystkie produkty w postaci serum zostały zakwalifikowane do dalszego etapu badań na ludziach. Wynik i opinia nie dotyczy osób, u których występuje alergia na którykolwiek ze składników badanego kosmetyku.

**Tabela 47. Wyniki testów płatkowych (okluzyjnych) – krem do twarzy**

LP	Inicjały probanta	Płeć	Wywiad alergiczny	Wynik podrażnienie	Wynik uczulenie
1	Z.S	M	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
2	E.K	K		Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
3	K.M	K	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
4	M.M	K		Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
5	A.K	K		Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
6	P.P	M	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
7	N.N	K		Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
8	S.T	K		Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
9	J.R	K	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
10	J.N	K	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)

11	G.W	K	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
12	E.L	K	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
13	W.P	K	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
14	P.R	K	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
15	P.I	K	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
16	D.M	K	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
17	K.L	M	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
18	S.W	M	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
19	S.N	M	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)
20	F.K	K	A	Kb (-) Kf (-) Kk (-)	Kb (-) Kf (-) Kk (-)

**Legenda: Krem do twarzy:** z natywnym biofermentem (Kb), z filtratem (Kf), bez składnika aktywnego - próbka kontrolna (Kk). **Płeć:** K - kobieta, M – mężczyzna. **Rodzaj skóry:** A - osoby z wywiadem alergicznym **Ocena wyniku testów platkowych dokonana przez lekarza dermatologa:** (-) – wynik ujemny; brak odczynu (-/+) – wynik wątpliwy; możliwy odczyn rumieniowy, lecz nie wyczuwalny palcem (+) – wynik słabo dodatni; rumień i naciek, wyczuwalny dotykiem (++) – wynik średnio dodatni; rumień i grudki (+++) – wynik silnie dodatni; rumień, pęcherzyki lub nadżerki.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań nie stwierdzono własności uczulających i drażniących badanych kremów. Wszystkie warianty kremu spełniają kryteria bezpieczeństwa dermatologicznego i zostały zakwalifikowane do dalszego etapu badań tj. testów aplikacyjnych. Wynik i opinia nie dotyczy osób, u których występuje alergia na którykolwiek ze składników badanego kosmetyku.

**Tabela 48. Wyniki testów naskórkowych otwartych (nieokluzyjnych) – żel do mycia twarzy**

LP	Inicjały	Płeć	Wywiad alergiczny	Wynik podrażnienie	Wynik uczulenie
1	Z.S	M	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
2	E.K	K		Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
3	K.M	K	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
4	M.M	K		Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
5	A.K	K		Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
6	P.P	M	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
7	N.N	K		Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
8	S.T	K		Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
9	J.R	K	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)

10	J.N	K	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
11	G.W	K	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
12	E.L	K	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
13	W.P	K	A	Żb (-/+) Żf (-/+) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
14	P.R	K	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
15	P.I	K	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
16	D.M	K	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
17	K.L	M	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
18	S.W	M	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
19	S.N	M	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)
20	F.K	K	A	Żb (-) Żf (-) Żk(-)	Żb (-) Żf (-) Żk(-)

**Żel do mycia twarzy: z natywnym biofermentem (Żb), z filtratem (Żf), bez składnika aktywnego - próbka kontrolna (Żk) Płeć: K - kobieta, M – mężczyzna. Rodzaj skóry: A - osoby z wywiadem alergicznym**

**Ocena wyniku testów platkowych okonana przez lekarza dermatologa: (-) – wynik ujemny; brak odczynu (-/+ ) – wynik wątpliwy; możliwy odczyn rumieniowy, lecz nie wyczuwalny palcem (+) – wynik słabo dodatni; rumień i nacieki, wyczuwalny dotykiem (++) – wynik średnio dodatni; rumień i grudki (+++) – wynik silnie dodatni; rumień, pęcherzyki lub nadżerki.**

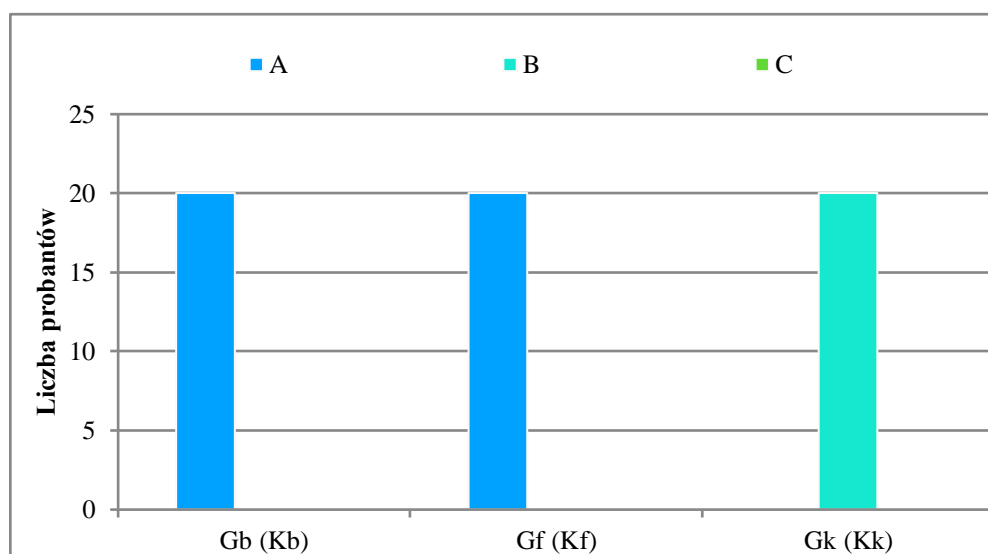
Na podstawie wyników przeprowadzonych badań nie stwierdzono własności uczulających i drażniących badanych żeli do mycia twarzy. W dwóch przypadkach wynik był wątpliwy dla wariantu żelu do mycia twarzy z biofermentem natywnym oraz filtratem. Pomimo to produkty zostały uznane jako te spełniające kryteria bezpieczeństwa dermatologicznego i zostały zakwalifikowane do dalszego etapu badań aplikacyjnych. Wynik i opinia nie dotyczy osób, u których występuje alergia na którykolwiek ze składników badanego kosmetyku.

## **11. Badania aplikacyjno-użytkowe**

Drugim etapem badań było potwierdzenie skuteczności deklarowanej metody pielęgnacji z udziałem kolejno stosowanych rano i wieczorem formułacji kosmetycznych zgodnie z rozszerzoną deklaracją marketingową, która wskazuje, że produkty posiadają dodatkowe właściwości użytkowe dla pielęgnacji cery leczonej dermatologicznie retinoidami tj. wspierają łagodzenie podrażnień, poprawę nawilżenia, zmniejszenie uczucia ściągania oraz suchości cery i utrzymanie dobrej kondycji naskórka podczas leczenia.

Ochotnicy wykonali testy domowe, zgodnie z metodologią przedstawioną w rozdziale Materiały i Metody. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 19-23.

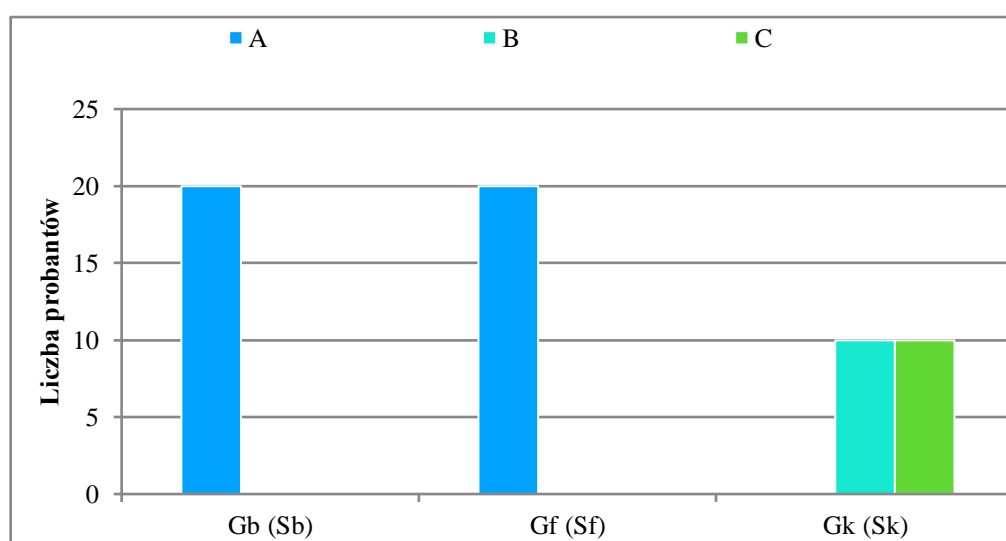
**Rysunek 19. Ocena sensoryczno-jakościowa kremu do twarzy**



**Legenda:** Pytanie: Czy jest Pani/Pan zadowolona z konsystencji preparatu użytego kremu do twarzy?  
Odpowiedzi: (A) Konsystencja przyjemna w użytkowaniu, (B) Konsystencja średnio przyjemna w użytkowaniu, (C) Konsystencja nieprzyjemna w użytkowaniu Oś Y: Liczba probantów (n=20)

Dane przedstawione na Rys. 19 wskazują, że wszyscy probanci grupy Gb i Gf (n=20) ocenili produkt Kb oraz Kf jako „konsystencja przyjemna w użytkowaniu”. Krem kontrolny ocenili probanci grupy Gk (n=20) jako: „konsystencja średnio przyjemna w użytkowaniu”. Wynik ten potwierdza, iż obecność składnika aktywnego zarówno w postaci biofermentu natywnego oraz filtratu, korzystnie wpływa na walory sensoryczne dotyczące konsystencji podczas stosowania kremu. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi  $<0,05$ .

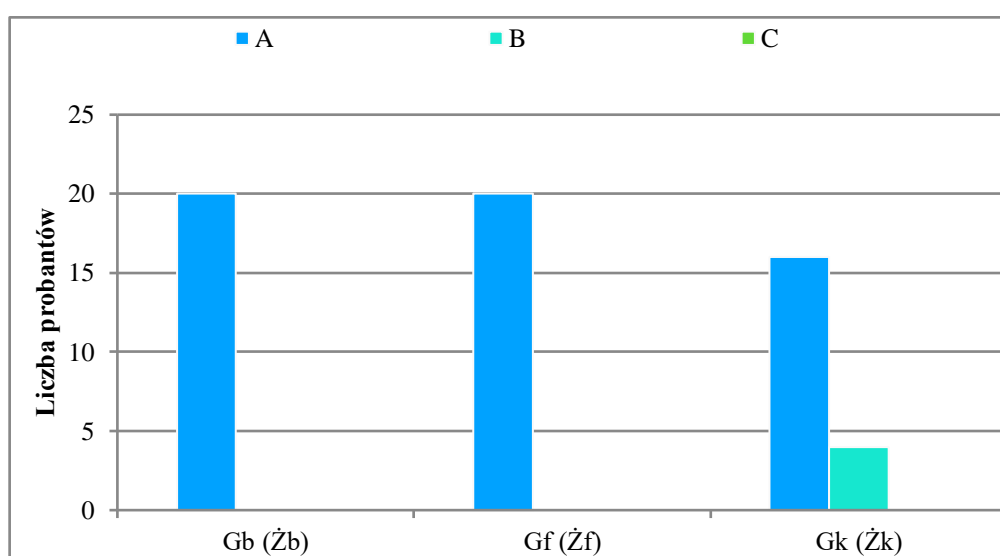
**Rysunek 20. Ocena sensoryczno-jakościowa serum do twarzy**



**Legenda:** Pytanie: Czy jest Pani/Pan zadowolona z konsystencji preparatu użytego serum do twarzy?  
Odpowiedzi: (A) Konsystencja przyjemna w użytkowaniu, (B) konsystencja średnio przyjemna w użytkowaniu, (C) Konsystencja nieprzyjemna w użytkowaniu. Oś Y: Liczba probantów (n=20)

Dane przedstawione na Rys. 20 wskazują, że wszyscy probanci grupy Gb i Gf (n=20) ocenili produkt Sb oraz Sf jako „konsystencja przyjemna w użytkowaniu”. Serum kontrolne ocenili probanci grupy Gk (n=10) jako „konsystencja średnio przyjemna w użytkowaniu” oraz (n=10) jako "Konsystencja nieprzyjemna w użytkowaniu”. Wynik ten potwierdza, iż obecność składnika aktywnego zarówno w postaci biofermentu natywnego oraz filtratu, korzystnie wpływa na walory sensoryczne dotyczące konsystencji podczas stosowania serum. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi <0,05.

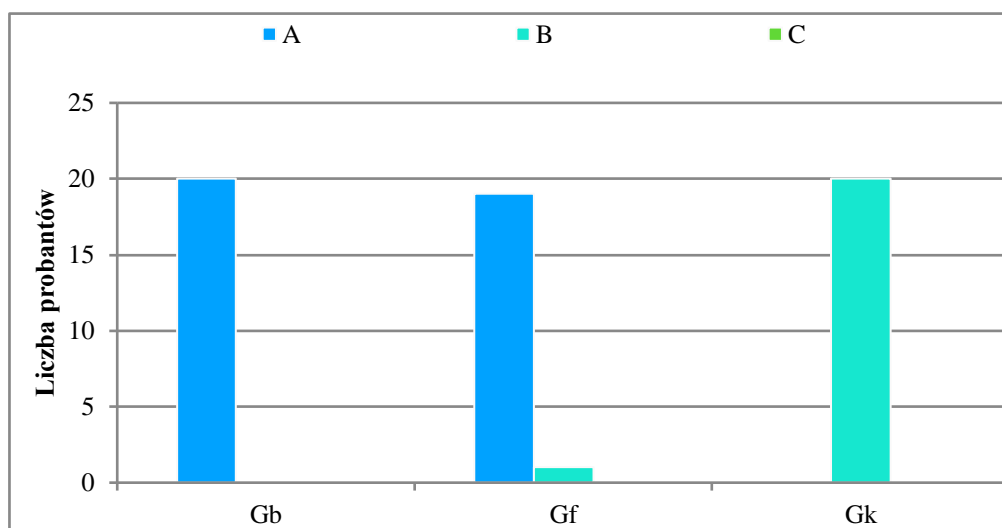
**Rysunek 21. Ocena sensoryczno-jakościowa żelu do mycia twarzy**



**Legenda:** Pytanie: Czy jest Pani/Pan zadowolona z właściwości myjących preparatu typu żel do mycia twarzy? Odpowiedzi: (A) Konsystencja przyjemna w użytkowaniu nie ściąga skóry po umyciu, (B) konsystencja średnio przyjemna w użytkowaniu i występuje ściągnięcie cery po umyciu, (C) Konsystencja nieprzyjemna w użytkowaniu. Oś Y: Liczba probantów (n=20)

Przedstawione na Rys. 21 dane wskazują, że wszyscy probanci grup Gb i Gf (n=20) ocenili produkt Żb oraz Żf jako „konsystencja przyjemna w użytkowaniu nie ściąga skóry po umyciu”. Żel kontrolny ocenili probanci Gk (n=16) według kryterium jak Żb i Żf oraz (n=4) jako "konsystencja średnio przyjemna w użytkowaniu i występuje ściągnięcie cery po umyciu”. Wynik badania wskazuje na korzystny wpływ biofermentu natywnego oraz filtratu na walory sensoryczne podczas użytkowania żelu do mycia. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi <0,05.

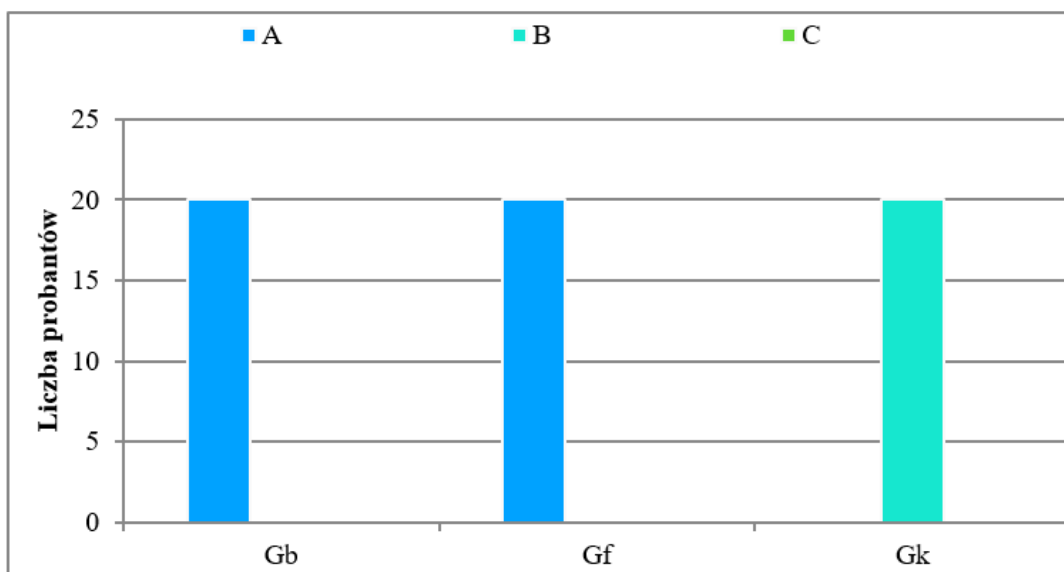
**Rysunek 22. Ocena sensoryczno – hedonistyczna podczas stosowania pielęgnacji z wykorzystaniem wszystkich opracowanych formułacji kosmetycznych**



**Legenda:** Grupa Gb (n=20) stosowali produkty Kb, Sb, Żb, Grupa Gf (n=20) stosowała produkty Kf, Sf, Żf, Grupa Gk (n=20) stosowała produkty Kk, Sk, Żk. Pytanie: Czy uważa Pani/Pan że zastosowane produkty wpłynęły korzystnie na poprawę kondycji skóry? Odpowiedzi: (A) Korzystny wpływ, (B) Nie zauważono zmian, (C) Pogorszenie stanu cery.

Dane wynikowe przedstawione na Rys. 22 wskazują, że wszyscy probanci grupy Gb (n=20) i znaczna większość probantów grupy Gf (n=18) ocenili pielęgnację jako mająca „Korzystny wpływ”. W grupie Gk wszyscy probanci (n=20) jako wskazali ocenę - „Nie zauważono zmian”. Wynik ten potwierdza, iż obecność składnika aktywnego zarówno w postaci biofermentu natywnego oraz filtratu, korzystnie wpływa na skuteczność pielęgnacji i uzasadnia uzupełnienie danych za pomocą rozszerzonych badań aparaturowych. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi  $<0,05$ .

**Rysunek 23. Ocena sensoryczna - hedonistyczna wpływu redukcji podrażnienia skóry podczas stosowania pielęgnacji z wykorzystaniem wszystkich opracowanych formułacji kosmetycznych**



**Legenda:** Grupa Gb (n=20) stosowali produkty Kb, Sb, Żb, Grupa Gf (n=20) stosowała produkty Kf, Sf, Żf, Grupa Gk (n=20) stosowała produkty Kk, Sk, Żk. Pytanie: Czy po zakończeniu badań z wykorzystaniem badanych produktów zauważył/a Pani/Pan zmniejszenie podrażnień, uczucia suchości oraz poprawę nawilżenia cery? Odpowiedź: (A) Tak nastąpiła wyraźna poprawa, (B) Nie odczuwam istotnej poprawy, (C) Nastąpiło pogorszenie objawów.

Dane przedstawione na Rys. 23 wskazują, że wszyscy probanci grup Gb i Gf (n=20) ocenili pielęgnację jako „Tak nastąpiła wyraźna poprawa”. Cała grupa Gk (n=20) oceniła formułację jako „Nie odczuwam istotnej poprawy”. Wynik ten potwierdza, iż obecność składnika aktywnego zarówno w postaci biofermentu natywnego oraz filtratu, korzystnie wpływa na skuteczność deklarowanego działania i uzasadnia uzupełnienie danych za pomocą rozszerzonych badań aparaturowych. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi  $<0,05$ .

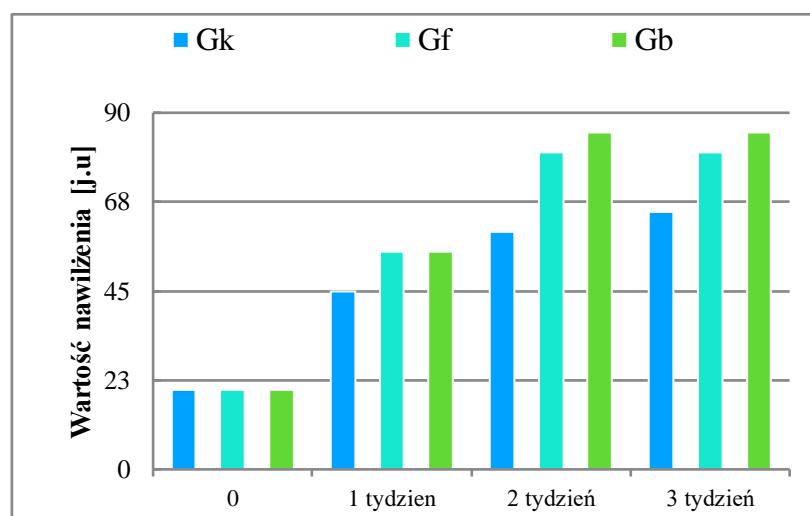
## 12. Badanie parametrów biofizycznych

- **Nawilżenie skóry**

Pierwszym badanym parametrem był poziom nawilżenia naskórka. Parametr ten jest bardzo istotny z uwagi na fakt, iż stosowanie retinoidoterapii powoduje nadmierne przesuszenie naskórka. W naturalnym procesie złuszczenia się komórek naskórka kluczową rolę odgrywa proteolityczna degradacja desmosomów uwarunkowana aktywnością proteaz i dezaktywacją ich inhibitorów. Proces ten jest zależny od lipidów macierzy międzykomórkowej. Podczas leczenia retinoidoterapią mechanizm ten może być upośledzony ze względu na przyspieszony cykl samo złuszczenia tzw. „turnover time” i powodować upośledzenie funkcji barierowej, która objawia się znacznym spadkiem poziomu nawilżenia,. Dlatego wymagana jest w szczególności metoda pielęgnacji przy użyciu żelu opartego na łagodnym surfaktancie oraz aplikowania serum

i kremu zawierającego składnik aktywny w postaci biofermentu o właściwościach antyoksydacyjnych, przeciwzapalnych oraz odżywczych. Bardzo ważny jest też komponent kwasów organicznych obecnych w biofermencie, tj. kwas propionowy, który przy udziale humektantów takich jak mocznik, wspiera modyfikacje keratyny do wiązania wody w naskórku i tym samym aktywnie wspiera odbudowę bariery hydrolipidowej w kopercie rogowej naskórka. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi  $<0,05$ .

**Rysunek 24. Kinetyka zmian wartości nawilżenia skóry probantów zmierzona przed i po badaniu**



Legenda: Gb - grupa stosująca zestaw kosmetyków z biofermentem natywnym  
 Gf - grupa stosująca zestaw kosmetyków z filtratem Gk – grupa kontrolna  
 (n=20) każda, \* –  $p<0,05$ .

Na podstawie uzyskanych danych, przedstawionych na Rys. 24 można wywnioskować, że wszystkie osoby, które brały udział w badaniu wraz z upływem czasu trwania testu wskazały na poprawę parametru nawilżenia naskórka. Doświadczenia pokazały lepsze wyniki parametru nawilżenia. Zmiany parametru nawilżenia wahały się średnio w zakresie od 20-85 [j.u.]. W Tab.49 została przedstawiona interpretacja wyników. Im dłuższy czas stosowania kosmetyku tym parametr ulegał większej poprawie. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi  $<0,05$ .

**Tabela 49. Interpretacja wyników pomiaru nawilżenia naskórka**

Stopień nawilżenia naskórka	Wynik pomiaru [j.u.]
Skóra bardzo sucha	$<30$
Skóra sucha	30-45



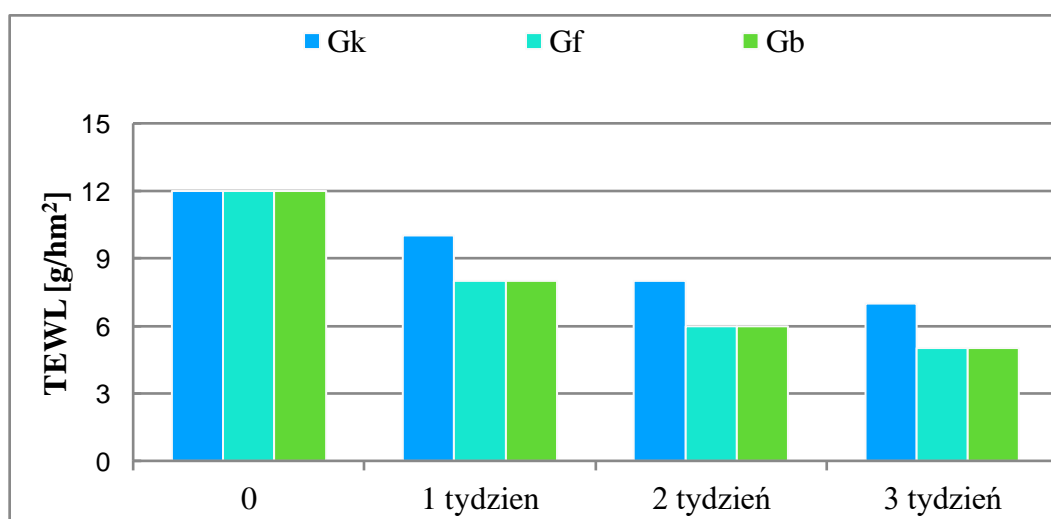
Skóra dostatecznie nawilżona	>45
------------------------------	-----

Warstwa rogowa spełnia ważną funkcję nawadniającą, co warunkuje utrzymanie miękkości skóry i elastyczność. Utrata tej funkcji może skutkować suchością, pojawieniem się łusek i pęknięć, które często towarzyszą chorobom skóry lub dysfunkcją bariery hydrolipidowej. Dzięki pomiarowi nawilżenia, który jest zależnością między pojemnością elektryczną a zawartością wody w naskórku możemy zauważyć, że im więcej wody w tkance, tym mniejszy opór elektryczny i przewodzenie prądu, tym wyższa wartość parametru nawilżenia.

- **Transepidermalna utrata wody (ang. *Transepidermal Water Loss, TEWL*)**

Kolejnym ważnym parametrem pozwalającym na ocenę stanu skóry jest TEWL (ang. *Transepidermal Water Loss*) - przesnaskórkowa utrata wody. Parametr określa ilość wody, która została utracona przez naskórek w jednostce czasu w wyniku procesu parowania. Poziom TEWL mierzono przy pomocy tewametru, otrzymując informację o dyfuzji wody niezwiązanej przez proteoglikany w kierunku warstwy rogowej naskórka. Tewametr jest sondą pozwalającą na pośrednią ocenę stanu bariery naskórkowej na podstawie oceny gradientu prężności pary wodnej nad powierzchnią naskórka. Gęstość parowania mierzona jest przez dwie pary czujników (temperatury i wilgotności względnej) wewnątrz pustego cylindra. Jest to pomiar w otwartej komorze. Mikroprocesor dokonuje analizy i przeliczenia na wartości liczbowe. Uzyskane wyniki zamieszczono na Rys. 25 a ich interpretację w Tab. 50. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi <0,05.

**Rysunek 25. Kinetyka zmian wartości TEWL probantów zmierzona przed i po przeprowadzonym badaniu**



**Legenda:** Gb - grupa stosująca zestaw kosmetyków z biofermentem natywnym  
 Gf - grupa stosująca zestaw kosmetyków z filtratem Gk – grupa kontrolna

(n=20) każda, \* – p<0,05.

Na podstawie wyników przedstawionych na Rys. 25 można zaobserwować, że u wszystkich probantów nastąpiła poprawa parametru TEWL. Zmiany parametru transepidermalnej utraty wody wahały się średnio w zakresie 12-5 [g/hm<sup>2</sup>]. Ponadto zaobserwowano, że im dłuższy czas stosowania produktu tym parametr ulegał poprawie. Parametr TEWL jest wyznacznikiem statusu i integralności bariery skórnej. Odpowiednie nawodnienie skóry ma kluczowe znaczenie dla funkcji ochronnej skóry. Zdolność skóry do utrzymywania wody jest przede wszystkim związana z warstwą rogową naskórka, która stanowi o barierowości skóry. Zgodnie z praktyką kosmetologiczną, zawartość wody w naskórku > 10% zapewnia prawidłowy i zdrowy wygląd skóry. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi <0,05.

**Tabela 50. Interpretacja wyników TEWL (ang. Transepidermal Water Loss)**

Interpretacja wyników	Wartość TEWL [g/hm <sup>2</sup> ]
Skóra bardzo zdrowa	0-10
Skóra zdrowa	10-15
Skóra normalna	15-25
Skóra w złym stanie	25-30
Skóra w stanie krytycznym	> 30

Naturalna bariera lipidowa skóry pełni funkcję zabezpieczającą nie tylko przed nadmierną przesnaskórkową utratą wody, ale również przed nadmiernym wnikaniem substancji niepożądanych, w tym toksycznych. Efektywność bariery naskórkowej określana jest wartością wskaźnika przesnaskórkowej utraty wody. Na podstawie wyników zaprezentowanych na Rys. 26 można stwierdzić, że składniki formuły produktów przyczyniły się do poprawy wydolności bariery naskórkowej probantów podczas leczenia retinoidami. Skóra nawilżona prawidłowo wiąże około 20% wody zawartej w organizmie, przy czym większość wody znajduje się w skórze właściwej. To warunkuje jej prawidłowe napięcie oraz równowagę w zakresie utrzymania funkcji procesów metabolicznych. Woda w skórze migruje zawsze z jej wnętrza w kierunku powierzchni i odparowuje. Wysuszenie skóry jest więc zjawiskiem naturalnym. Ponadto woda wprowadzona do skóry z zewnątrz nie jest w niej zatrzymywana i szybko odparowuje. Stan nawilżenia skóry nie zależy jedynie od ilości wody dostarczonej z zewnątrz

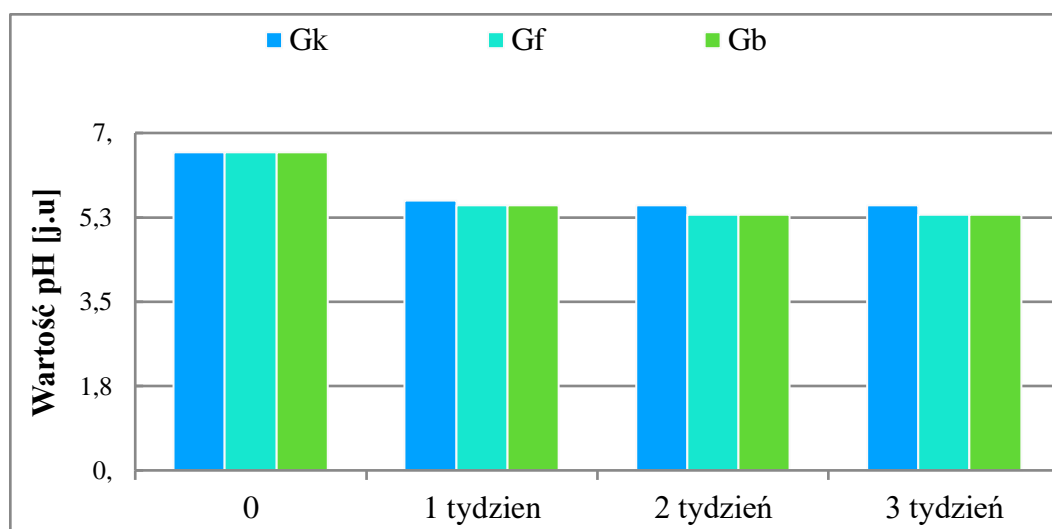
do organizmu, ale przede wszystkim od zdolności skóry do jej zatrzymania. Pomiedzy szybkością migracji wody na zewnątrz i jej odparowywaniem, a szybkością jej przenikania powinna być równowaga. Zahamowanie naturalnej utraty wody ze skóry można uzyskać dzięki ograniczeniu jej parowania m.in. przez zmniejszenie gradientu stężeń, przez zwiększenie zdolności skóry do wiązania wody (obecność substancji higroskopijnych) oraz przez tworzenie układów barierowych np. bariery lipidowej. Niewłaściwe nawilżenie skóry, jej suchość i utrata elastyczności zaburzają procesy integracyjne tego narządu w zakresie funkcji ochronno-obronnych, co manifestuje się jej nadwrażliwością (tj. brakiem tolerancji na powszechnie występujące czynniki środowiskowe). Skóra odwodniona staje się bardziej podatna na niekorzystne działanie czynników fizykochemicznych (temperatura, wiatr, promieniowanie UV, mikrourazy, woda, detergenty). Niedostatecznie nawilżona skóra jest skutkiem podwyższenia wartości pH naskórka w kierunku zasadowego i wskaźnika TEWL. Akwaporyny - białka błonowe stanowią podstawę mechanizmu regulującego wiązanie wody w naskórku. Wyróżniamy dwie grupy akwaporyn. Pierwszą grupę stanowią akwaporyny biorące udział w transporcie wyłącznie cząsteczek wody oraz drugą tzw. „akwagliceroporyny” (wśród których wyróżniamy akwaporynę-3) mające zdolność transportowania oprócz wody niskocząsteczkowych substancji, takich jak glicerol, mocznik czy amoniak. Wykazano związek pomiędzy aktywnością transportową akwaporyny-3 glicerolu a metabolizmem lipidów skórnych oraz regulacją procesu dojrzewania keratynocytów, a tym samym formowania bariery naskórkowej. Podczas leczenia retinoidami kluczową rolę odgrywa aktywność akwaporyny 3, która reguluje transport wody oraz glicerolu pomiędzy komórkami skóry (Song i in., 2008). Dotychczasowe badania wykazały niekorzystny wpływ zarówno zbyt niskiego, jak i zbyt wysokiego stężenia akwaporyny-3 w skórze człowieka. Niskie stężenie akwaporyny-3 w skórze przyczynia się do redukcji nawilżenia warstwy rogowej naskórka. Z kolei zbyt wysokie stężenie może być przyczyną pojawienia się wyprysku oraz prowadzić do nadmiernej proliferacji keratynocytów, której rezultatem mogą być zaburzenia funkcji barierowych naskórka (Kang i in., 2006).

- **Odczyn pH skóry**

Bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na procesy enzymatyczne uczestniczące w procesie proliferacji komórek naskórka jest odczyn pH. U zdrowych dzieci po urodzeniu wartość pH jest zbliżona do neutralnego około pH = 6,5. Zmienia się ono po kilku tygodniach i tak jak u dorosłych osiąga pH 4,5 - 5,5 (Rahma i in., 2022). Na wartość pH naskórka mają wpływ czynniki endo- i egzogenne, takie jak np.: fosfolipaza A2, składniki NMF, składniki potu, łoju, metabolity bakterii, chemiczne związki organiczne i nieorganiczne aplikowane na

skórę. Objawy występujące podczas użytkowania formułacji kosmetycznej oceniane jako „uczulenie na kosmetyki”, mogą być również spowodowane zwiększoną wrażliwością receptora TRPV1 (ang. *Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype*) (Xiao i in., 2023). Receptor ten jest wrażliwy na wiele bodźców chemicznych, w tym na działanie temperatury wyższej niż 42°C oraz na zmiany wartości pH. Skóra bezpośrednio po umyciu charakteryzuje się podwyższonym pH (7.0 lub bardziej zasadowe). Podczas stosowania zasadowych mydeł potasowych może wystąpić znaczna różnica i zmiana odczynu między myciem a momentem zastosowania kremu czy serum, które mają odczyn kwaśny. Zmiana wartości pH, w tak krótkim czasie może aktywować receptory TRPV1 (odbierane przez receptor i aktywowane w ten sam sposób jak w przypadku wystąpienia oparzenia chemicznego), co w konsekwencji może spowodować efekt nietolerancji. Taki efekt może również wystąpić podczas retinoidoterapii. Dlatego w badanych produktach wykorzystano podczas testów trzy formuły: żel do mycia twarzy, serum do twarzy i krem do twarzy, aby uniknąć wpływu innych kosmetyków myjących, poza kontrolą badacza. Stosowanie tzw. „kwaśnej” pielęgnacji opartej na składnikach biofunkcyjnych (kwas alfa-ketoglutarynowy, kwas propionowy, kwas cytrynowy) w postaci natywnego biofermentu lub filtratu, jak również w próbie kontrolnej zawierającej kwas cytrynowy, wpłynęło korzystnie na utrzymanie kwaśnego odczynu płaszcza lipidowego, ale również przyczyniło się do podniesienia progu tolerancji chemicznej naskórka po myciu skóry. Dzięki zastosowaniu, kolejno żelu do mycia twarzy o wartości pH równej 4,5 (w kontakcie z wodą pH wzrasta), serum do twarzy (Sb i Sf), których wartość pH wynosiła średnio 4,1 oraz kremu do twarzy (Kb i Kf) o wartości pH 5,2 (Rys. 26) prawdopodobnie spowodowano stopniowe bodźcowanie naskórka, generując jednocześnie efekt odporności i zmniejszając reaktywność receptorów TRPV1. Stosowanie „kwaśnej” pielęgnacji wydaje się szczególnie istotne podczas leczenia retinoidami, podczas której zachodzi konieczność fotoprotekcji kremami SPF o wysokim współczynniku (min. 50 SPF), których to specyfikacja fizykochemiczna formuły wymaga zazwyczaj odczynu pH 6.5-8.0 by zachować stabilność fizykochemiczną (Smaoui i in., 2017). Poprawa parametru TEWL może być skutkiem wpływu składnika aktywnego biofermentu natywnego na ekspresję genów związanych z biosyntezą akwaporyn.

Rysunku 26. Kinetyka zmian wartości odczynu pH naskórka u probantów



Legenda: Gb - grupa stosująca zestaw kosmetyków z biofermentem natywnym  
Gf - grupa stosująca zestaw kosmetyków z filtratem Gk – grupa kontrolna  
(n=20) każda, \* –  $p < 0,05$ .

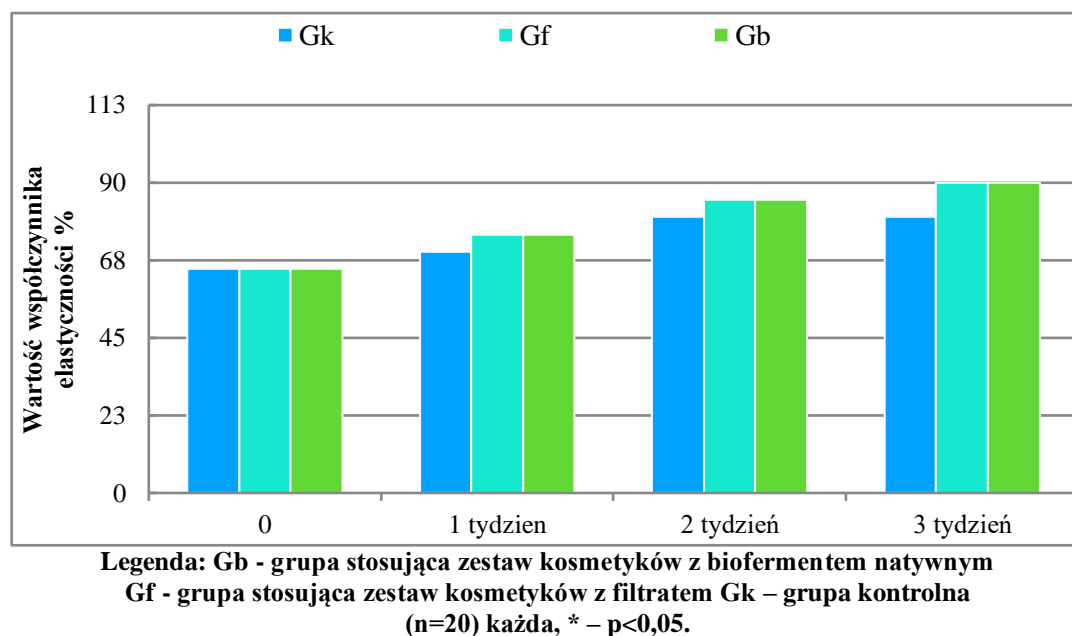
- **Elastyczność skóry**

Elastyczność skóry jest to biomechaniczna cecha skóry właściwej oraz naskórka. Skóra właściwa zawiera włókna kolagenowe i elastynowe oraz wodę, co decyduje o jej elastyczności i plastyczności. Jednak to biologia keratynocytów i korneocytów ma kluczowe znaczenie dla elastyczności i barierowej funkcji naskórka. Białka takie jak filagryna, charakteryzują się wysokim stopniem nieuporządkowania konformacyjnego (ang. *intrinsic disorder*), które umożliwia białkom reorganizację i udział w tworzeniu określonych struktur komórkowych. Mechanizm ten ułatwia np. proteolityczne uwalnianie aktywnych form filagryny lub tworzenie granul keratohydraliny. Niektóre białka keratynocytów, jak profilagryna ulegają procesowi rozdziału faz ciecz-ciecz (ang. *Liquid-liquid phase separation* - LLPS), w którym to wymienione białka ulegają spontanicznej separacji fazowej w środowisku wodnym, co prowadzi do formowania się struktur wewnątrzkomórkowych pozbawionych organelli. Proces LLPS wpływa na organizację i dynamikę tych struktur, co jest kluczowe dla różnicowania się keratynocytów i utrzymania ich elastyczności. Białka macierzy komórkowej jak lorecyryna są intensywnie usieciowane poprzecznymi wiązaniami, tworząc elastyczną, ale odporną na rozerwanie warstwę korneocytów. Elastyczność to przede wszystkim progresywne różnicowanie się keratynocytów, od warstwy podstawnej do warstwy rogowej, zapewnia stopniowe kształtowanie się elastycznej, ale odpornej na uszkodzenia warstwy korneocytów. Charakterystyczne cechy białek keratynocytów, takie jak *intrinsic disorder* i LLPS, wspólnie z organizacją i usieciowaniem białek macierzy komórkowej, umożliwiają tworzenie elastycznej,

ale mocnej bariery naskórkowej, co jest kluczowe dla funkcji tej tkanki (Shamilov i in., 2021). Również odpowiednie pH aktywuje enzymy proteolityczne, takie jak kaspazy i kalpajny, odpowiedzialne za dojrzewanie keratynocytów. Niskie pH wpływa na konformację i aktywność białek keratynocytów, takich jak filagryna czy lorecyryna, co wpływa na właściwości fizyczne tych białek, w tym na ich zdolność do tworzenia usieciowanej macierzy korneocytów. Kwasy organiczne jak mlekowy i piroglutaminowy utrzymują niskie pH warstwy rogowej naskórka. Ponadto te same kwasy odgrywają kluczową rolę w aktywacji enzymów proteolitycznych i dojrzewaniu korneocytów. Ponadto niektóre kwasy (np. mlekowy) mogą bezpośrednio wpływać na strukturę i elastyczność białek macierzy komórkowej (Shamilov i in., 2021). Kwaśny odczyn pH stymuluje syntezę i organizację lipidów międzykomórkowych, takich jak ceramidy, cholesterol i wolne kwasy tłuszczowe. Prawidłowa bariera lipidowa nadaje elastyczność i szczelność warstwie rogowej. Podsumowując, odpowiedni odczyn pH oraz obecność kwasów organicznych w naskórku są niezbędne dla prawidłowego różnicowania keratynocytów, dojrzewania korneocytów oraz formowania elastycznej, ale odpornej bariery naskórkowej. Zaburzenia tych parametrów mogą prowadzić do utraty elastyczności i integralności naskórka. Terapia retinoidami, w tym izotretynoiną może niekorzystnie wpływać na fizjologię keratynocytów i korneocytów, przyczyniając się do osłabienia elastyczności naskórka. Izotretynoina zaburza prawidłowe różnicowanie keratynocytów, hamując ich przejście do warstwy ziarnistej i rogowej. Prowadzi to do nieprawidłowej formacji korneocytów. Izotretynoina obniża ekspresję genów i zmienia konformację kluczowych białek strukturalnych, takich jak filagryna, lorecyryna i involucryna. Zaburzenia te osłabiają prawidłowe usieciowanie i elastyczność korneocytów, co wpływa na barierę lipidową, zakłócając syntezę i organizację lipidów międzykomórkowych, takich jak ceramidy i wolne kwasy tłuszczowe. Prowadzi to do osłabienia bariery lipidowej, co w konsekwencji zmniejsza elastyczność i szczelność warstwy rogowej. Utrata wilgotności naskórka prowadzi do jego większej sztywności i utraty elastyczności. Retinoidoterapia wpływa na różnicowanie keratynocytów, ma wpływ na białka strukturalne oraz barierę lipidową i nawilżenie skóry, co może istotnie osłabiać elastyczność i integralność warstwy rogowej naskórka. Zwiększa to ryzyko suchości, łuszczenia i pęknięcia skóry w trakcie leczenia retinoidami (Leyden i in., 2021). Na podstawie wyników przedstawionych na Rys. 27 można stwierdzić, że parametr elastyczności skóry u badanych probantów oscylował średnio w zakresie wartości 60 – 90 [%]. Zasada w interpretacji wyników polega na zależności – im wyższa wartość współczynnika elastyczności skóry, tym skóra jest bardziej elastyczna. Wartość parametru na poziomie 100 %

odpowiada elastyczności skóry noworodka. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi  $<0,05$ .

**Rysunek 27. Kinetyka zmian współczynnika elastyczności skóry**



Poniżej przedstawiono dokumentację fotograficzną prezentującą stan skóry probantów przed zastosowaniem pielęgnacji serią produktów Yarrowia Lipolytica Ferment Lysate/Flitrate w czasie terapii jak i stosowania pielęgnacji (Rys. 28-30).

**Rysunek 28. Stan cery w trakcie leczenia trądziku izotretynoim. Zdjęcie po lewej - przed wdrożeniem pielęgnacji; zdjęcie po prawej - w trakcie leczenia i po 1 tygodniu od wdrożenia pielęgnacji.  
Fot. Centrum dermatologii Symbiosis Ewa Kilian-Pięta**



Na zdjęciach powyżej (Rys. 28) przed zastosowaniem pielęgnacji widoczne są liczne grudki i krosty zapalne oraz niewielkie nasilenie rumienia i przetłuszczenie cery. Po tygodniu stosowania pielęgnacji widoczna jest znaczna poprawa stanu cery, ustąpienie zmian grudkowo-krostkowych, zmniejszenie natłuszczenia i ustąpienie rumienia. Efekt redukcji rumienia prawdopodobnie jest związany z poprawą parametrów biofizycznych bariery lipidowej skóry i poprawy jej nawilżenia. Natomiast redukcja zmian zapalnych i zmniejszenie przetłuszczenia to efekt leczenia retinoidami.

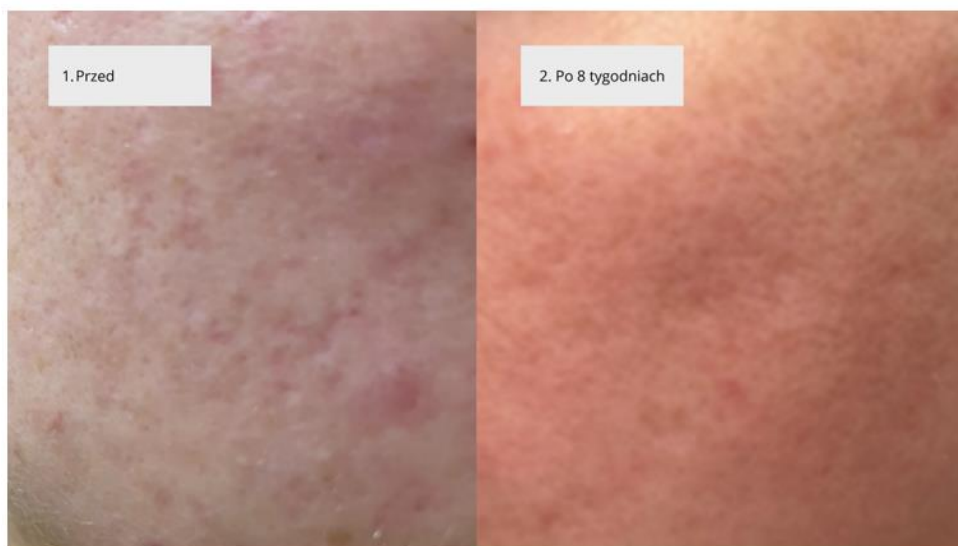
**Rysunek 29. Stan cery w trakcie leczenia trądziku izotretynoiną. Zdjęcie po lewej – stan skóry przed zastosowaniem pielęgnacji; zdjęcie po prawej - po 4 tygodniu stosowania pielęgnacji i terapii.  
Fot. Centrum dermatologii Symbiosis Ewa Kilian-Pięta**





Stan cery (Rys. 29) przed rozpoczęciem leczenia i pielęgnacji nowoopracowaną linią produktów kosmetycznych, wskazuje na liczne grudki oraz niewielkie zmarszczki mimiczne poprzeczne czoła, które prawdopodobnie są wynikiem dysfunkcji bariery lipidowej w kopercie rogowej i zaburzonym składzie sebum, który prowadzi do nasilenia zmian grudkowych oraz utraty elastyczności w obrębie warstwy rogowej naskórka tworząc „zagniecenia”/ bruzdy w miejsca marszczenia się skóry podczas ekspresji mimicznej. Stan cery na zdjęciu wykonanym w trakcie leczenia i po 4 tygodniach stosowania pielęgnacji nowoopracowaną linią produktów kosmetycznych wskazuje na znaczną poprawę w postaci ustąpienia grudek oraz zmniejszenia się zmarszczek mimicznych bez efektu rumienia, łuszczenia czy podrażnienia.

**Rysunek 30. Stan cery w trakcie leczenia trądziku izotretynoiną. Zdjęcie po lewej – stan skóry przed zastosowaniem pielęgnacji; zdjęcie po prawej - po 8 tygodniach stosowania pielęgnacji i terapii.  
Fot. Centrum dermatologii Symbiosis Ewa Kilian-Pięta**



Stan cery (Rys. 30) przed wdrożeniem pielęgnacji w trakcie leczenia trądziku bliznowaciejącego izotretynoiną. Na zdjęciu widoczny jest efekt leczenia w postaci ustąpienia krost i torbieli zapalnych, natomiast zauważalne jest zaburzenie pigmentacji w postaci obszarów hipopigmentacji, hiperpigmentacji oraz zmian pozapalnych. Stan cery po 8 tygodniach od wdrożenia pielęgnacji i kontynuacji leczenia wskazuje na znaczną poprawę stanu skóry przejawiającą się wygładzeniem cery, zmniejszeniem zmian przerostowych naskórka oraz blizn, co jest efektem leczenia. Ponadto zaobserwowano również znaczne wyrównanie kolorytu skóry, które prawdopodobnie jest efektem pielęgnacji i utrzymania kluczowych fizjologicznych parametrów biofizycznych naskórka, jak odpowiednia wydolność bariery lipidowej, nawilżenie,

odczyn pH i odpowiedni TEWL, co warunkuje prawidłową melanogenezę i prawidłowe rozmieszczenie melaniny (Ischia i in., 2016).

**Reasumując, przeprowadzone testy *in vitro* i *in vivo* wskazują na wysoki potencjał biofunkcyjny opracowanych formułacji, zarówno tych zawierających bioferment natywny jak i tych zawierających filtrat. Niektóre testy wykazały lepsze właściwości formułacji zawierających bioferment natywny (potencjał antyoksydacyjny, właściwości przeciwdrobnoustrojowe). Jednak z uwagi na cechy organoleptyczne i technologiczne biofermentu natywnego (zapach bardziej intensywny, mętny płyn, zmienność w czasie przechowywania) i filtratu (mniej intensywny zapach drożdżowy, klarowny płyn, stabilny podczas przechowywania) do wdrożenia wytypowano formułacje kosmetyczne zawierające filtrat uzyskany z natywnego biofermentu metodą filtracji.**

**Dla formułacji: krem do twarzy z filtrem, serum do twarzy z filtrem i żel do mycia twarzy z filtrem przygotowano treści etykiet i raporty bezpieczeństwa.**

### **13. Opracowanie treści etykiet**

Rozporządzenie 1223/2009 dotyczące kosmetyków zawiera wytyczne dotyczące informacji, które muszą zostać umieszczone na opakowaniach. Wyróżniamy dwie kategorie tych informacji; pierwsza stanowi treści i oznakowania oraz druga, zawierająca oświadczenia o produkcie. Szczegółowe wytyczne rozporządzenia można znaleźć w rozdziale VI informacje dla konsumentów, artykuł 19, oznakowanie, ww. rozporządzenia. Poniżej wskazano kluczowe elementy, które powinny znajdować się na etykiecie kosmetyku i stanowić nieusuwalne, łatwe do odczytania i widoczne informacje.

Oznakowanie:

1. Firma lub Imię i nazwisko oraz adres osoby odpowiedzialnej za produkt. Osoba odpowiedzialna to podmiot, który wprowadza kosmetyk na rynek i dysponuje dokumentacją kosmetyku. Wytyczne i definicję dotyczące „osoby odpowiedzialnej” zawiera Ustawa o kosmetykach z 4 października 2018 r., która precyzuje jaki podmiot powinien być umieszczony na opakowaniu kosmetyku. Osobą odpowiedzialną może być tzw. „producent” nie posiadający zakładu wytwórczego kosmetyków, który realizuje produkcję kontraktową kosmetyków u zarejestrowanego wytwórcy w Państwowej Powiatowej Stacji Sanitarno - Epidemiologicznej. Analogicznie osoba „osobą odpowiedzialną” może być producent, będący jednocześnie zarejestrowanym wytwórcą. W przypadku kosmetyków importowanych spoza rynku europejskiego jest nim dystrybutor. Przykład oznaczenia osoby odpowiedzialnej na etykiecie: Symbiosis Sp. z o.o. ul. Rubież 46 H, 61-612 Poznań

2. Masa lub objętość, wyrażona nominalnie w gramach lub miligramach, w przypadku opakowania większych niż 5 gram lub mililitrów. Podczas projektowania etykiety czy kartonika kosmetyku, należy uwzględnić obowiązkowo wytyczne Rozporządzenia Rady Ministrów z dnia 11 października 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań dotyczących oznakowań towarów paczkowanych. Precyzuje ono wielkość czcionki, która wynosi minimum: 2 mm - dla produktu o masie do 50 g; 3 mm - dla produktu o masie powyżej 50 g do 200 g; 4 mm - dla produktu o masie powyżej 200 g do 1000 g; 6 mm - dla produktu o masie powyżej 1 kg. Poprawność tych oznaczeń i zgodności z deklarowaną masą czy objętością kontroluje Główny Urząd Miar.
3. Data, do której dany produkt kosmetyczny, przechowywany w odpowiednich warunkach, zachowuje swoje pierwotne właściwości, który poprzedza symbol określony w załączniku VII Rozporządzenia 1223/2009 pkt 3 lub zwrot: "najlepiej użyć przed końcem". Data jest wskazana w sposób jednoznaczny - zawiera miesiąc i rok albo dzień, miesiąc i rok. Na opakowaniu można zamieścić informację uzupełniającą na temat wskazania warunków przechowywania, które muszą być spełnione w celu zagwarantowania określonej trwałości.
4. Numer partii produktu lub oznaczenia pozwalające na identyfikację produktu kosmetycznego, który umożliwia śledzenie produkcji i identyfikację serii, w przypadku konieczności wycofania produktu.
5. Funkcja produktu kosmetycznego. Kosmetyk powinien być oznaczony nazwą, która jednoznacznie identyfikuje produkt np. żel do mycia twarzy, serum do twarzy, krem do twarzy. Gdy zostanie zamieszczona tylko deklaracja „żel” istnieje ryzyko, że konsument pomyli produkt spłukiwany myjący, z żelem do pielęgnacji i pozostawi go na skórze stwarzając ryzyko podrażnienia czy alergii.
6. Wykaz składników poprzedzony jest określeniem „ingredients”. Składnik oznacza każdą substancję lub mieszaninę celowo zastosowaną w formule bez uwzględnienia zanieczyszczeń surowców, które należy wykazać w raporcie bezpieczeństwa. Składniki w wykazie wymienia się w porządku malejącym, według masy w momencie ich dodawania do produktu kosmetycznego. Składniki o stężeniu mniejszym niż 1 % mogą być wymienione w dowolnej kolejności po składnikach, których stężenie jest wyższe niż 1 %. Składniki powinny być nazwane zgodnie z Międzynarodowym Nomenklaturą Kosmetyczną (INCI). Nazwy INCI to nazwy systematyczne opracowane przez Międzynarodowy Komitet ds. Nazewnictwa Składników Kosmetycznych w celu identyfikacji składników kosmetyków. Nazwy INCI

różnią się od nazw chemicznych i nazw handlowych i zostały utworzone w celu zapewnienia standardowego terminu do deklaracji składnika na etykiecie produktu kosmetycznego. INCI® jest zastrzeżonym znakiem towarowym organizacji Personal Care Products Council (ang. PCPC). PCPC jest właścicielem i zastrzega sobie wszelkie prawa w odniesieniu do znaku towarowego „INCI”. Ujednolicone nazwy składników kosmetyków do celów etykietowania zostały zebrane i zaktualizowane przez Komisję Europejską w bazie danych „Cosing”. Jest to baza danych Komisji Europejskiej zawierająca informacje o substancjach i składnikach kosmetycznych zawartych w kosmetykach, która znajduje się pod linkiem <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/>

7. Informacje podaje się w języku określonym przepisami państwa członkowskiego, w którym dany produkt jest udostępniany użytkownikowi końcowemu, tj. w Polsce obowiązuje treść w j. polskim.

#### Oświadczenia o produkcji

1. Na etykiecie kosmetyku oraz podczas udostępniania na rynku i reklamowania w różnych kanałach komunikacji, tekst, nazwy, znaki towarowe, obrazy lub inne znaki nie mogą być używane tak, aby przypisywać produktowi kosmetycznemu cechy lub funkcje, których nie posiadają. Zatem każdy przekaz marketingowy, mogący wpłynąć na decyzję o zakupie musi spełniać wymogi podstawowych kryteriów Rozporządzenia Komisji (UE) nr 655/2013 z dnia 10 lipca 2013 r. określające wspólne kryteria dotyczące uzasadniania oświadczeń stosowanych w związku z produktami kosmetycznymi. Przykładem naruszającym tę zasadę może być informowanie, że kosmetyk posiada zezwolenie lub został zatwierdzony przez organ UE, jako zaletę eksponując cechę, która jest powszechna u wszystkich innych kosmetyków, które objęte są wymogiem notyfikacji przed wprowadzeniem na rynek.

2. Deklaracje marketingowe można podzielić na kilka kategorii:

- Oświadczenia o działaniu - nawilżanie, redukcja zmarszczek, ochrona przeciwsłoneczna. Naruszeniem wytycznych jest deklarowanie działania leczniczego: Leczenie trądziku, leczenie foto starzenia, działanie przeciwnowotworowe. Tego rodzaju deklaracje wymagają potwierdzenia w badaniach aplikacyjno-użytkowych lub aparaturowych na probantach.
- Oświadczenia o wrażeniach sensorycznych – łatwość wchłaniania produktu, konsystencja tłusta, ciężka, lekka, pozostawiająca lub nie pozostawiająca film na skórze czy włosach. Tego rodzaju deklaracje ocenia badający ekspert.

- Oświadczenia o odczuciach konsumentów – stanowią osobiste wrażenia odnośnie cech sensorycznych lub działania kosmetyku, i mogą obejmować ocenę jego atrakcyjności. Tego rodzaju oświadczenia potwierdzają badania ankietowe.

- Oświadczenia porównawcze - stosowane są gdy producent chce zaprezentować swój produkt w zestawieniu z innym, konkurencyjnym lub z własnej oferty. W tym przypadku kluczowa jest zasada ochrony interesów konkurentów i uczciwego handlu, dlatego te deklaracje podlegają dyrektywie dotyczącej reklamy wprowadzającej w błąd i reklamy porównawczej.

Poniżej przedstawiono treści etykiet dla nowo opracowanych produktów.

- Krem do twarzy ze składaniem biofunkcjonalnym w postaci filtratu biofermentu *Yarrowia lipolytica*
- Oznakowanie:

Nazwa serii:	Yarrowia AKG
Nazwa produktu:	Nawilżająco - łagodzący krem do twarzy
Nazwa produktu ANG:	Moisturizing and calming face cream
Dodatkowe oznaczenia pod nazwą: składniki	Yarrowia lipolytica Ferment Alpha-Ketoglutaric Acid
Rodzaj opakowania:	Butelka PET z pompką dozującą
Rodzaj etykieta // karton	Tylko etykieta // bez kartonu
Pojemność opakowania:	50 ml
PAO	bez PAO //
Kod kreskowy	Wstawić kod kreskowy na etykiecie
Data i seria	Treść: Najlepiej użyć przed końcem + miejsce do umieszczenia miesiąc i rok + nr serii 4 cyfry
Uzlechetnienia etykiety	Etykieta tłoczna
logo	Logo producenta // marki
Znak // ikona	Ikona: przeznaczony dla skóry wrażliwej Ikona: testowany na grupie probantów podczas leczenia dermatologicznego izotretynoiną Ikona: do twarzy leczonej dermatologicznie Ikona: drożdże <i>Yarrowia</i> AKG własna technologia

Ingredients	Aqua, Yarrowia lipolytica Ferment Filtrate, Polyglyceryl-4 Pelargonate, Panthenol Alpha-Ketoglutaric Acid, Pyruvic Acid, Citric Acid, Xanthan Gum, Sodium Levulinate, Potassium Sorbate, Trisodium Ethylenediamine Disuccinate
-------------	--

### Oświadczenia:

Sposób użycia:  
Po dokładnym umyciu i osuszeniu twarzy nanieś niewielką ilość produktu na dłoń i wmasuj w skórę twarzy do całkowitego wchłonięcia. Opcjonalnie przed wmasowaniem kremu zastosuj niewielką ilość serum Yarrowia AKG wmasowując kolejno serum i następnie krem.

### Opis produktu:

Yarrowia AKG krem do twarzy nawilżająco-łagodzący stworzony specjalnie do pielęgnacji skóry twarzy podczas leczenia dermatologicznego izotretynoiną. Formuła została stworzona specjalnie do regeneracji bariery hydrolipidowej oraz łagodzenia suchego i podrażnionego naskórka. Formuła produktu oparta na unikatowym biofermencie pozyskanym na drodze fermentacji drożdży *Yarrowia lipolytica* i kwasie alfa-ketoglutarym, o działaniu antyoksydacyjnym i łagodzącym. Regeneruje barierę hydrolipidową skóry. Badania potwierdzone w badaniach aparaturowych u 20 probantów leczonych izotretynoiną. Potwierdzone działania antyoksydacyjne i przeciwzapalne w badaniach *in vitro*. Koi suchą skórę z podrażnieniami

- Serum do twarzy ze składaniem biofunkcjonalnym w postaci filtratu biofermentu *Yarrowia lipolytica*

### Oznakowanie:

Nazwa serii:	Yarrowia AKG
Nazwa produktu:	Serum nawilżające do twarzy
Nazwa produktu ANG:	Serum moisturizing for face
Dodatkowe oznaczenia pod nazwą: składniki	Yarrowia lipolytica Ferment Alpha-Ketoglutaric Acid
Rodzaj opakowania:	Butelka Airless 30 ml biała
Rodzaj etykieta // karton	Tylko etykieta // bez kartonu // zabezpieczenie otwarcia // naklejka dodatkowa
Pojemność opakowania:	30 ml
PAO	bez PAO //
Kod kreskowy	Wstawić kod kreskowy na etykiecie
Data i seria	Treść: Najlepiej użyć przed końcem + miejsce do umieszczenia miesiąc i rok + nr serii 4 cyfry

Uszlechcenia etykiety	Etykieta tłoczna
Logo	Logo producenta // marki
Znak // ikona	Ikona: przeznaczony dla skóry wrażliwej Ikona: testowany na grupie probantów podczas leczenia dermatologicznego izotretynoina Ikona: do użycia na twarzy przed kremem Ikona: drożdże Yarrowia AKG własna technologia
Ingredients	Yarrowia Lipolytica Ferment Filtrate, Aqua, Panthenol, Glycerin, Alpha-Ketoglutaric Acid, Pyruvic Acid, Citric Acid, Xanthan Gum, Sodium Levulinate, Potassium Sorbate, Trisodium Ethylenediamine Disuccinate

#### Oświadczenia:

##### Sposób użycia:

Po dokładnym umyciu i osuszeniu twarzy nanieś niewielką ilość produktu na dłoń i wmasuj w skórę twarzy oraz do całkowitego wchłonięcia. Następnie odpowiednią ilość kremu Yarrowia AKG wmasuj od razu po serum.

##### Opis produktu:

Yarrowia AKG serum do twarzy nawilżająco-łagodząca delikatna formuła, stworzona specjalnie dla regeneracji bariery hydrolipidowej suchej i podrażnionej skóry podczas leczenia dermatologicznego izotretynoiną. Formuła produktu oparta na unikatowym biofermencie pozyskanym na drodze fermentacji drożdży *Yarrowia lipolytica* i kwasie alfa-ketoglutarynowym, o działaniu antyoksydacyjnym i łagodzącym.

Regeneruje barierę hydrolipidową skóry. Badania potwierdzone w badaniach aparaturowych u 20 probantów leczonych izotretynoiną.

Potwierdzone działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne w testach *in vitro*.

Koi suchą skórę z podrażnieniami.

- Żel do mycia twarzy ze składaniem biofunkcjonalnym w postaci filtratu biofermentu *Yarrowia lipolytica*

#### Oznakowanie:

Nazwa serii:	Yarrowia AKG
Nazwa produktu:	Ultra-delikatny żel do mycia twarzy
Nazwa produktu ANG:	Ultra gentle for face for face
Dodatkowe oznaczenia pod nazwą: składniki	Yarrowia lipolytica Ferment Alpha-Ketoglutaric Acid
Rodzaj opakowania:	Butelka PET z pompką dozującą
Rodzaj etykiety // karton	Tylko etykieta // bez kartonu
Pojemność opakowania:	200 ml
PAO	bez PAO //

Kod kreskowy	Wstawić kod kreskowy na etykiecie
Data i seria	Treść: Najlepiej zużyć przed końcem + miejsce do umieszczenia miesiąc i rok + nr serii 4 cyfry
Uszlechcenia etykiety	Etykieta tłoczna
logo	Logo producenta // marki
Znak // ikona	Ikona: przeznaczony dla skóry wrażliwej Ikona: testowany na grupie probantów podczas leczenia dermatologicznego izotretynoiną Ikona: do mycia twarzy leczonej dermatologicznie Ikona: drożdże Yarrowia AKG własna technologia
Ingredients	Aqua, Yarrowia lipolytica Ferment Filtrate, Polyglyceryl-4 Pelargonate, Panthenol Alpha-Ketoglutaric Acid, Pyruvic Acid, Citric Acid, Xanthan Gum, Sodium Levulinate, Potassium Sorbate, Trisodium Ethylenediamine Disuccinate

#### Oświadczenia:

##### Sposób użycia:

Nanieś niewielką ilość produktu na dłonie zwilżone ciepłą wodą. Dokładnie umyj twarz i okolice oczu. Jeśli zmywasz makijaż, opcjonalnie powtórz czynność dwukrotnie.

##### Opis produktu:

Yarrowia AKG ultra-delikatny żel do mycia twarzy, stworzony z myślą o najbardziej wrażliwej skórze podczas leczenia dermatologicznego izotretynoiną. Formuła o żelowej konsystencji delikatnie oczyszcza, pozostawiając skórę miękką, bez uczucia ściągnięcia. Receptura oparta o unikatowy składnik bioferment, efekt metabolizmu drożdży *Yarrowia lipolytica* z kwasem alfa-ketoglutarynowym oraz łagodnym składniku myjącym pozyskiwanym ze słonecznika.

Przebadany na grupie 20 osób podczas leczenia izotretynoiną

Testowany dermatologicznie

Testowany *in vivo* (badania aparaturowe) i *in vitro*

## 14. Opracowanie raportu bezpieczeństwa

Raport bezpieczeństwa produktu kosmetycznego jest opinią eksperta oceniającego, który potwierdza, że wprowadzony na rynek kosmetyk jest bezpieczny w normalnym i przewidywalnym użytkowaniu i jest zgodny z wymogami rozporządzenia (WE) nr 1223/2009. Minimalne wymagania dotyczące raportu bezpieczeństwa dla produktu kosmetycznego są określone w załączniku I do rozporządzenia. Bezpieczeństwo produktów kosmetycznych opiera się na bezpieczeństwie składników zastosowanych w formułach podlegających weryfikacji i ocenie. Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów (ang. SCCS *Scientific Committee on Consumer Safety*) ocenia bezpieczeństwo składników wymienionych w załącznikach II, III, IV, V i VI rozporządzenia. *Safety assessor* jest odpowiedzialny za ocenę bezpieczeństwa wszystkich składników receptury kosmetyku.



Raport bezpieczeństwa produktu kosmetycznego składa się z dwóch części:

Część A – Informacje dotyczące bezpieczeństwa produktu kosmetycznego

Część B – Ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego.

Część A ma na celu zebranie wszystkich danych z badań przeprowadzonych w laboratorium oraz składników użytych w formułacji niezbędnych do oceny bezpieczeństwa. Część A składa się z dziesięciu sekcji.

Część B to opinia oceniającego bezpieczeństwo kosmetyków na podstawie danych zebranych w części A i składa się z czterech części.

Informacje dotyczące bezpieczeństwa produktu kosmetycznego 10 sekcji:

### **1. Ilościowy i jakościowy skład produktu jest recepturą składników kosmetyku.**

Ta sekcja powinna zawierać nazwę chemiczną, handlową użytego surowca kosmetycznego, nazwę INCI, numer CAS, EINECS / ELINC lub numer WE, jeśli to możliwe, oraz procent wagowy w preparacie.

### **2. Właściwości fizyczne/chemiczne i stabilność produktu kosmetycznego.**

Zgodnie z wytycznymi Komisji Europejskiej dotyczących raportów bezpieczeństwa produktów kosmetycznych właściwości fizyczne i chemiczne mogą obejmować identyfikację chemiczną, formę fizyczną, cząsteczkową masę, rozpuszczalność, współczynnik podziału, czystość substancji, a dla polimerów średnią masę cząsteczkową i zakres. Ta sekcja wymaga oceny stabilności produktu kosmetycznego w racjonalnych przewidywalnych warunkach przechowywania. Wytyczne dotyczące stabilności produktów kosmetycznych zostały opublikowane przez COLIPA (obecnie Cosmetics Europe) i CTFA (obecnie Personal Products Council) w marcu 2004 r.

### **3. Jakość mikrobiologiczna**

Sekcja ta zawiera informacje na temat obecności/braku drobnoustrojów w surowcach i/lub gotowych produktach. Wytyczne dotyczące jakości mikrobiologicznej produktów gotowych zostały opublikowane w wytycznych SCCS dotyczących testowania substancji kosmetycznych i ocenie ich bezpieczeństwa. Zgodnie z nimi produkty kosmetyczne są dzielone na dwie kategorie: kategoria 1 dotyczy produktów przeznaczonych dla dzieci poniżej 3 lat lub w przypadku produktów, które będą stosowane w okolicach oczu i błon śluzowych. Kategoria 2 dotyczy wszystkich innych produktów. W przypadku produktów kategorii 1 całkowita liczba tlenowych mikroorganizmów mezofilnych nie powinna przekraczać 100 jtk/g lub 100 jtk/ml. W przypadku produktów kategorii 2 całkowita liczba tlenowych mikroorganizmów mezofilnych nie powinna przekraczać 1000 jtk/g lub 1000 jtk/ml. Patogeny z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Candida*

*albicans* nie powinny być wykrywalne w 1 g lub 1 ml produktu kosmetycznego z kategorii 1 oraz w 0,1 g lub 0,1 ml produktu kosmetycznego z kategorii 2. Jakość mikrobiologiczna produktu jest weryfikowana przez *Safety Assesora* na podstawie raportu z testów mikrobiologicznych w tym testu konserwacji.

#### **4. Zanieczyszczenia, informacje o materiale opakowaniowym.**

Zanieczyszczenia to niezamierzone substancje obecne w składnikach formułacji oraz opakowaniach. Dozwolone są śladowe ilości substancji zabronionych, pod warunkiem że produkt jest bezpieczny, a jego obecność jest technicznie nieunikniona. Materiał opakowania ma bezpośredni kontakt z produktem. Załącznik I do rozporządzenia (WE) 1223/2009 wymaga, aby osoba oceniająca bezpieczeństwo kosmetyków wzięła pod uwagę takie cechy jak czystość i stabilność opakowania. Osoba oceniająca bezpieczeństwo kosmetyków weryfikuje możliwość migracji substancji z opakowania do produktu na podstawie dokumentacji typu karta charakterystyki opakowania oraz rodzaju masy kosmetyku.

#### **5. Normalne i dające się racjonalnie przewidzieć stosowanie kosmetyku.**

„Normalne lub przewidywalne” zastosowanie kosmetyku, to wytyczne na podstawie których wylicza się narażenie na składniki produktu. Przykładem takim może być pasta do zębów, której użycie można przewidzieć tj: mycie i szczotkowanie zębów oraz spłukanie, dwa razy dziennie, ale jej spożycie jest zabronione i nie zostało uwzględnione w raporcie bezpieczeństwa produktu kosmetycznego.

#### **6. Narażenie na produkt kosmetyczny.**

Jest to część raportu, która ma na celu oszacowanie bezpiecznej ilości/dawki produktu kosmetycznego w postaci tzw. dozy kosmetyku na dzień, który wchodzi w kontakt z zewnętrznymi częściami ludzkiego ciała, w tym zębami i błonami śluzowymi jamy ustnej w normalnym i dającym się racjonalnie przewidzieć użyciu oraz częstotliwości używania. W stosownych przypadkach należy wziąć pod uwagę drogi narażenia wtórnego.

#### **7. Profil toksykologiczny substancji.**

Jest to określenie i opisanie zagrożenia toksykologicznego każdej substancji znajdującej się w produkcie gotowym. W tej części raportu zawiera się odpowiednie punkty końcowe, aby uzasadnić decyzję dotyczącą tego, czy dany składnik jest bezpieczny. Punkty końcowe, które mogą być istotne, to ostra toksyczność, podrażnienie i działanie żrące, podrażnienie skóry i działanie żrące na skórę, podrażnienie błon śluzowych (podrażnienie oczu), działanie uczulające na skórę, absorpcja, toksyczność po podaniu wielokrotnym, mutagenność / genotoksyczność, rakotwórczość, toksyczność reprodukcyjna, toksykokinetyka i fototoksyczność. Tam, gdzie nie zaobserwowano działań niepożądanych poziom efektu

należy ustalić na podstawie danych literaturowych, aby można było obliczyć margines bezpieczeństwa. Ogólnie przyjmuje się, że margines bezpieczeństwa powinien wynosić co najmniej 100, aby uznać substancję za bezpieczną do stosowania w kosmetykach. Jeżeli nie można określić poziomu NOAEL (Poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków, ang. No Observed Adverse Effect Level) margines bezpieczeństwa nie może zostać obliczony.

#### **8. Działania niepożądane i poważne działania niepożądane.**

Celem tego rozdziału jest monitorowanie bezpieczeństwa produktu po jego wprowadzeniu do obrotu i podejmowanie w razie potrzeby działań naprawczych.

#### **9. Inne istotne informacje o produkcie kosmetycznym.**

##### **Część B oceny bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

Część B stanowi uzasadnioną opinię osoby oceniającej bezpieczeństwo kosmetyków na temat bezpieczeństwa produktu, która zawiera wnioski z oceny badań oraz wyliczeń zawartych w części A. W tej sekcji stwierdza się, czy produkt jest bezpieczny, bezpieczny z ograniczeniami czy nie jest bezpieczny dla użytkownika. Jeśli osoba oceniająca bezpieczeństwo kosmetyków stwierdzi, że produkt nie jest bezpieczny, wówczas produktu nie wolno wprowadzać do obrotu. Weryfikacja etykiety, obowiązkowe ostrzeżenia na etykietach oraz kontrola instrukcji użytkowania, również podlega opinii. W tej części raportu bezpieczeństwa produktu kosmetycznego osoba oceniająca bezpieczeństwo kosmetyków powinna zawrzeć wszelkie ostrzeżenia dotyczące składników a wymienione w załącznikach III – VI do rozporządzenia (WE) nr 1223/2009 oraz wszelkie informacje dotyczące środków ostrożności dotyczące produktów przeznaczonych do użytku profesjonalnego.

##### **Rozumowanie**

Osoba oceniająca bezpieczeństwo produktu kosmetycznego, stwierdzając czy produkt kosmetyczny jest bezpieczny dla zdrowia ludzkiego i zgodny z rozporządzeniem (WE) nr 1223/2009, jest zobligowana do wyjaśnienia przebiegu rozumowania skutkującego sformułowaniem wniosków końcowych. Raport z oceny bezpieczeństwa powinien zostać poddany aktualizacji jeśli wystąpi jedno z poniższych: nowe ustalenia naukowe i dane toksykologiczne dotyczące substancji dostępne, które mogłyby zmodyfikować wynik istniejącej oceny bezpieczeństwa; zmiany występują w składzie lub specyfikacji surowców.

W niniejszej pracy przygotowano trzy raporty bezpieczeństwa, które stanowią załącznik nr 1, 2 i 3.

## **Załącznik nr 1**

### **RAPORT BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO Krem do twarzy nawilżająco-lagodzący Yarrowia AKG**

Wprowadzająca do obrotu osoba odpowiedzialna „producent”: Symbiosis Sp. z o.o.

Sporządzone przez: Ewa Kilian-Pięta Manager Regulatory

Autoryzowane przez: Lekarz Medycyny Safety Assessor Natalia Saxion

Data utworzenia: 1.08.2024 r.

Przygotowany zgodnie z załącznikiem I Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczącego produktów kosmetycznych

Spis treści:

#### **CZESC A – Informacje na temat bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

1. Ilościowy i jakościowy skład produktu kosmetycznego
2. Właściwości fizyczne/chemiczne oraz stabilność produktu kosmetycznego
3. Jakość mikrobiologiczna
4. Zanieczyszczenia, ilości śladowe, informacje o materiale z którego wykonano opakowanie
5. Normalne i dające się racjonalnie przewidzieć stosowanie
6. Narażenie na działanie produktu kosmetycznego
7. Narażenie na działanie substancji
8. Profil toksykologiczny substancji
9. Działanie niepożądane i ciężkie działanie niepożądane
10. Informacje o produkcie kosmetycznym

#### **CZESC B – Ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

1. Wniosek z oceny
2. Ostrzeżenia i instrukcje stosowania umieszczane na etykiecie

### 3. Rozumowanie

### 4. Kwalifikacje eksperta i zatwierdzenie części B

## CZESC A - Informacje na temat bezpieczeństwa produktu kosmetycznego

### 1. Ilościowy i jakościowy skład produktu kosmetycznego

Producent oświadcza że, produkt będący przedmiotem niniejszego raportu został wykonany i będzie produkowany zgodnie z systemem jakości GMP na podstawie normy PN-EN ISO 22716, nie był testowany na zwierzętach zgodnie z art 18 rozporządzenia 1223/2009/WE oraz nie zawiera substancji CMR kategorii 1A, 1B oraz 2 zgodnie z rozporządzenia 1272/2008/WE

Nazwa handlowa	Nazwa INCI	Zawartość w produkcie [%]	Numer CAS	Funkcja
Woda	Aqua	DS	7732-18-5	rozpuszczalnik
Mocznik	Urea	5,0	57-13-6	humektant
D-Panthenol	Aqua Panthenol	5,0	7732-18-5 81-13-0/16485-10-2	składnik aktywny
Gliceryna farmaceutyczna roślinna	Glycerin	5,0	56-81-5	humektant
Guma ksantanowa	Xanthan Gum	0,5	11138-66-2	zagęstnik
Emulpharma K10 RSPO MB	Cetearyl Glucoside Sorbitan Olivat Cetearyl Alcohol	6,0	67762-27-0 226159-33-1 223706-40-9	emulgator
Masło shea	Butyrospermum Parkii Butter	3,0	194043-92-0	emolient
Olej z ogórecznika lekarskiego	Borago Officinalis Seed Oil	4,0	225234-12-8	emolient

Witamina E	Tocopheryl Acetate	1,0	7695-91-2	antyoksydant
Kaprynian kokosowy, Trójgliceryd kaprylowo-kaprynowy	Coco Caprylate/Caprate, Caprylic/ Capric Triglyceride,	8,0	95912-86-0 73398-61-5	emolient
Lewulinian sodu, Sorbinian potasu	Sodium Levulinate Potassium Sorbate Aqua	1,9	19856-23-6 246334-61-5 7732-18-5	konserwant
Dibursztynian trisodowo-etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate Aqua	0,5	178949-82-1 7732-18-5	substancja chelatująca
Filtrat <i>Yarrowia lipolytica</i>	Yarrowia Lipolytica Ferment Filtrate Alpha-Ketoglutaric Acid, Pyruvic Acid Citric Acid	10,0	n/a 328-50-7 127-17-3 77-92-9	substancja aktywna

Karty charakterystyki surowców oraz certyfikaty analiz, pozwalają dokonać identyfikacji substancji, informują o ich właściwościach, obecności potencjalnych zanieczyszczeń oraz profilu toksykologicznym. Dostarczone przez producenta karty charakterystyki surowców użytych w gotowym produkcie znajdują się w załączniku nr 1.

## 2. Właściwości fizyczne/chemiczne oraz stabilność produktu kosmetycznego

- **Właściwości fizyczne/chemiczne gotowego produktu kosmetycznego**

Wygląd: jednorodna emulsja/krem

Barwa: kremowa biało-beżowa

Zapach: charakterystyczny (słabo wyczuwalny) drożdżowy

pH: 4,4 ; Przyjęty zakres 4,0- 5,0

Lepkość: 3236,1 mPa\*s

Gęstość: 0,985 g/cm<sup>3</sup>

Szczegółowe wyniki przedstawiono w rozdziale Wyniki i dyskusja Tabela 21.

- **Stabilność gotowego produktu kosmetycznego**

Prowadzono wstępny test stabilności produktu kosmetycznego – 24 godzinny test temperaturowy. Barwa, zapach, konsystencja nie uległy zmianie. Badanie prowadzono w temperaturach 4°C, 20°C i 40°C. Pomiary wykonano w temperaturze pokojowej, w 22°C.

Następnie wykonano test wirówkowy po 24 h, poddając produkt wirowaniu przez 3 min 2000 obr/min. Wynik: nie zaobserwowano rozwarstwiania faz.

Badany produkt kosmetyczny poddano ocenie stabilności w czasie i w różnych warunkach temperaturowych. Badania prowadzono przez 12 tygodni w temperaturze 4°C, 20°C i 37°C, analizując parametry formułacji po 2, 4, 8 i 12 tygodniach od rozpoczęcia testu. Wyniki oceny wykazały intensyfikację zapachu badanej próbki oraz zmniejszenie lepkości po 4,8 o 12 tygodniach przechowywania w temperaturze 37°C, bez cech rozwarstwienia.

Wyniki – Rozdział Wyniki i dyskusja Tabela 31, 39,40.

- **Termin trwałości produktu kosmetycznego wyznaczono na 24 miesiące od daty produkcji.**

Termin trwałości określono na podstawie składu gotowego produktu, przewidywanego czasu zużycia przez użytkownika i wyników testów stabilności.

### **3. Jakość mikrobiologiczna**

- **Jakość mikrobiologiczna substancji i mieszanin**

Dostarczone przez producenta karty charakterystyki surowców nie wzbudzają zastrzeżeń pod kątem czystości mikrobiologicznej. Dla surowców z niskim ryzykiem mikrobiologicznym nie przeprowadzono oceny. Pozostałe surowce spełniają wymagania mikrobiologiczne, co umożliwia ich zastosowanie w produkcji kosmetyku.

- **Jakość mikrobiologiczna gotowego produktu kosmetycznego**

Produkt spełnia wymagania jakościowe i ilościowe dotyczące czystości mikrobiologicznej dla

produktu. Badanie jakości mikrobiologicznej formulacji nie wykazało wzrostu drobnoustrojów w badanej próbce. Zgodnie z normą PN-EN ISO 17516:2014-11 badana próbka spełnia kryterium kategorii I czystości mikrobiologicznej. Wyniki testu konserwacji potwierdzają, że zastosowany konserwant zabezpiecza formulację przez wzrostem niepożądanych grup drobnoustrojów.

Wyniki – Rozdział Wyniki i dyskusja Tabela 28.

- **Potencjał przeciwdrobnoustrojowy i prebiotyczny - testy *in vitro* właściwości kremu do twarzy z filtratem**

Wyniki – Rozdział Wyniki i dyskusja Tabela 44 i 45.

#### **4. Zanieczyszczenia, ilości śladowe, informacje o materiale z którego wykonano opakowanie**

- **Zawartość śladowych ilości substancji niedozwolonych**

Wyniki – Rozdział Wyniki i dyskusja Tabela 24.

Ze względów technicznych uniknięcie zanieczyszczeń śladowych jest niemożliwe. Nie są spodziewane inne zanieczyszczenia i śladowe ilości substancji niedozwolonych, które mogą wpłynąć na bezpieczeństwo produktu. Zgodnie z rozporządzeniem 1223/2009/WE dopuszczone jest zastosowanie tych składników.

- **Informacje o materiale z którego wykonano opakowanie**

<b>Rodzaj opakowania</b>	<b>Dostawca</b>
butelka PP airless 50ml	n/a

Możliwe zastosowanie opakowania do celów spożywczych nie wnosi zastrzeżeń do jego stosowania w produkcie kosmetycznym, a potencjalne migracje substancji lub niestabilność mogące wpływać na bezpieczeństwo produktu nie są spodziewane.

Przeprowadzono test kompatybilności masy z opakowaniem. Wyniki badań kompatybilności masy z opakowaniem podczas testów starzeniowych wykazały brak interakcji pomiędzy masą i



opakowaniem. Nie zmieniła się postać, barwa oraz zapach prób masy kremu. Opakowanie również nie uległo deformacji, nie zmieniło barwy oraz nie straciło szczelności.

## 5. Normalne i dające się racjonalnie przewidzieć stosowanie

Krem do twarzy Yarrowia AKG zawierający filtrat *Yarrowia lipolytica*

Sposób użycia: Po dokładnym umyciu i osuszeniu twarzy nanieś niewielką ilość produktu na dłoń i wmasuj w skórę twarzy do całkowitego wchłonięcia. Opcjonalnie przed wmasowaniem kremu zastosuj niewielką ilość serum Yarrowia AKG wmasowując kolejno serum i następnie krem.

## 6. Narażenie na działanie produktu kosmetycznego

Miejsce zastosowania	twarz
Powierzchnia aplikacji (1) (2)	565 cm <sup>2</sup>
Ilość zastosowanego produktu	1,54 g/ dzień wg SCCS
Czas trwania i częstość stosowania	2.14 raza na dzień wg SCCS
Populacja docelowa i narażona	osoby dorosłe
Waga ciała dorosłych	60 kg
Faktor retencji	1,0

(1) Według wytycznych SCCS/1628/21

(2) Według wytycznych RIVM report 320104001/2006

Produkt przebadano dermatologicznie pod kątem właściwości drażniących i uczulających, wnioski z badań znajduje się w sekcji 10 niniejszego raportu.

## 7. Narażenie na działanie substancji

- **Obliczenie marginesu bezpieczeństwa**

Zgodnie z wytycznymi SCCS/1628/21 oraz wykorzystując dostępne dane producentów substancji, opinie komitetów naukowych oraz dostępne bazy danych toksykologicznych

obliczono margines bezpieczeństwa dla produktu typu krem do twarzy

Dzienna ekspozycja na produkt wynosi:

$$E_{\text{produkt}} = 24.14 \text{ mg/kg bw/dzień}$$

Dawkę narażenia ogólnoustrojowego dla składników wyrobu obliczono ze wzoru:

$$SED = E_{\text{produkt}} (\text{mg/kg bw/dzień}) \times C (\%) / 100 \times DAp (\%) / 100$$

gdzie:

C – maksymalne stężenie składnika w produkcie

DAp – absorpcja przeznaskórkowa; jeżeli jest nieznana przyjmuje się 50%

Margines bezpieczeństwa stosowania

$$MoS = POD_{\text{sys}} / SED$$

SKŁADNIKI WG INCI	Maksymalne możliwe stężenie składnika w gotowym produkcie (%)	Absorpcja przez skórę (%)	SED	MoS
Aqua	ds 100	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, stanowi główną składową organizmu człowieka		
Urea	5,0	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS ( ang. Generally Recognized as Safe), występuje naturalnie w organizmie człowieka		
Panthenol	3,75	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS		
Glycerin	5,0	Nie dotyczy, substancja szeroko stosowana w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, wg FDA zaliczana jako GRAS		
Xanthan Gum	0,5	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS, szeroko stosowana jako dodatek spożywczy		
Cetearyl Glucoside	4,2	Składnik jest bezpieczny do stosowania na skórę i błony śluzowe. W produktach kosmetycznych nie istnieją ograniczenia stosowania.		
Sorbitan Olivat	2,4	Nie dotyczy; toksyczność nie jest spodziewana; pochodna alkoholu cetearylowego i kwasów tłuszczowych pochodzących z oliwy z oliwek		

Cetearyl Alcohol	1,44	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS, szeroko stosowana jako dodatek spożywczy		
Butyrospermum Parkii Butter	3,0	Nie dotyczy; substancja nie jest toksyczna, tradycyjnie stosowana w medycynie ludowej. Brak ograniczeń co do stosowania w produktach kosmetycznych.		
Borago Officinalis Seed Oil	3,0	Nie dotyczy, substancją jest bezpieczna, stosowana jako środek spożywczy. Oceniony przez CIR jako bezpieczny do stosowania w kosmetykach.		
Tocopheryl Acetate	1,0	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna w obecnym stężeniu. Szeroko stosowana w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.		
Coco Caprylate/Caprates	4,0	10	0,097	MOS >100; NOAEL >1000 mg/kg/d wg dostępnych danych substancja nie jest toksyczna
Caprylic/ Capric Triglyceride	4,0	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS		
Sodium Levulinate	0,57	50	0,0688	DNEL 5mk/kg bw/d MOS >100
Potassium Sorbate	0,38	Zastosowano w ilości zgodnej z wymaganiami rozporządzenia 1223/2009/WE. Maksymalne stężenie w gotowym produkcie 0,6%		
Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,185	Nie dotyczy, substancja nie przenika przez barierę naskórkową		
Yarrowia lipolytica Ferment Filtrate	9,8	Toksyczność nie jest przewidziana. Substancja bogata w aminokwasy, kwasy organiczne i białka.		
Alpha-Ketoglutaric Acid	0,142	Nie dotyczy, substancja występuje naturalnie w organizmie człowieka. W obecnym stężeniu nie wykazuje działania toksycznego.		
Pyruvic Acid	0,123	Może być promotorem przenikania	Występuje naturalnie w organizmie człowieka, w użytym stężeniu jest bezpieczny w produktach kosmetycznych	
Citric Acid	0,021	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS. Szeroko stosowana w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.		

## 8. Profil toksykologiczny substancji

Profil toksykologiczny poszczególnych substancji wchodzących w skład produktu kosmetycznego, oraz dane o źródłach informacji zawarte są w załączniku nr 2.

## 9. Działanie niepożądane i ciężkie działanie niepożądane

Poddany ocenie produkt jest dopiero wprowadzany na rynek, nie ma więc informacji o jakichkolwiek działaniach niepożądanych. Po analizie użytych składników i ich ocenie toksykologicznej, działania niepożądane nie są spodziewane.

Zgodnie w wymogiem art. 23 rozp. 1223/2009/WE osoba wprowadzająca produkt do obrotu ma obowiązek dokumentowania i zgłaszania działania niepożądanego wywołanego przez produkt kosmetyczny.

W przypadku wystąpienia ciężkiego działania niepożądanego osoba odpowiedzialna za produkt ma obowiązek powiadomić odpowiednie organy państwowe. Zakres działań osoby odpowiedzialnej za rozwiązanie problemu w takim przypadku wskazano w przewodniku – *Wytyczne w sprawie zgłaszania ciężkich działań niepożądanych*. Wszelkie informacje na temat działań niepożądanych muszą być aktualizowane i udostępniane osobie prowadzącej ocenę bezpieczeństwa w celu zamieszczenia zmian w raporcie bezpieczeństwa.

## **10. Informacje o produkcie kosmetycznym**

### **• Produkt kosmetyczny przebadano pod kątem własności drażniących i uczulających.**

Badania dermatologiczne testy płatkowe okluzyjne zostały przeprowadzone na grupie 20 osób (w tym 15 osób z wywiadem alergicznym). Na podstawie wyników przeprowadzonych badań nie stwierdzono właściwości uczulających i drażniących kremu do twarzy. Krem do twarzy z fitratem spełnia kryteria bezpieczeństwa dermatologicznego i zostały zakwalifikowany do dalszego etapu badań tj. testów aplikacyjnych na probantach podczas leczenia dermatologicznego izotretynoiną.

### **• Testy aplikacyjno-użytkowych oraz aparaturowe, potwierdzające deklarowane działanie produktu**

Produkt kosmetyczny podano badaniu właściwości aplikacyjno-użytkowych celem potwierdzenia deklarowanego przez producenta działania.

**Wyniki:** Rozdział Wyniki i dyskusja, punkty 10 i 11, Rysunki: 19, 22, 23, 24, 25, 26, 27)

**Wnioski:** Na podstawie przeprowadzonych badań aplikacyjno-użytkowych, stwierdzono, że badany produkt stosowany zgodnie z przeznaczeniem i zaleceniami, charakteryzuje się deklarowanym działaniem. Oświadczenia dotyczące deklaracji działania kremu oraz sposobu łączenia pielęgnacji z serum u osób podczas leczenia izotretynoiną zostały potwierdzone w badaniach aparaturowych i aplikacyjno - użytkowych na grupie 20 probantów z grupą kontrolną 20 osób stosujących placebo.

- **Testy *in vitro* - Potwierdzenie potencjału antyoksydacyjnego**

Wyniki – Rozdział Wyniki i dyskusja Tabela 43.

## **CZĘŚĆ B Ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

### **1. Wniosek z oceny**

Produkt **KREM YARROWIA AKG** zawierający filtrat *Yarrowia lipolytica* wprowadzany na rynek przez podmiot odpowiedzialny Symbiosis Sp. z o.o. poddano ocenie bezpieczeństwa. Po analizie składu produktu, uwzględniając normalne i dające się przewidzieć narażenie, stwierdza się, że produkt jest bezpieczny i stosowany zgodnie z zaleceniami producenta, nie stanowi zagrożenia dla zdrowia i życia ludzi.

Zastosowane składniki oraz ich stężenia w produkcie są dopuszczone do stosowania w kosmetykach zgodnie z rozporządzeniem 1223/2009/WE. Składniki regulowane rozporządzeniem 1223/2009/WE zostały użyte zgodnie z wymogami rozporządzenia.

Oceniając profil toksyczności zastosowanych składników, ich strukturę chemiczną i historię bezpiecznego stosowania, stwierdza się, że nie ma prawdopodobnych zagrożeń bezpieczeństwa wynikających z normalnego stosowania tego produktu, jeśli jest on stosowany zgodnie z zaleceniami lub w przewidywalnych warunkach stosowania.

Na podstawie oceny bezpieczeństwa dla zdrowia człowieka gotowego produktu, jego składu, budowy chemicznej oraz poziomu narażenia stwierdza się, że recepturę produktu uznaje się za bezpieczną w stosowaniu.

Ponadto producent oświadcza że, produkt będący przedmiotem niniejszego raportu został wykonany i będzie produkowany zgodnie z systemem jakości GMP na podstawie normy PN-EN ISO 22716, nie był testowany na zwierzętach zgodnie z art 18 rozporządzenia 1223/2009/WE oraz nie zawiera substancji CMR kategorii 1A, 1B oraz 2 zgodnie z rozporządzenia 1272/2008/WE

### **2. Ostrzeżenia i instrukcje stosowania umieszczone na etykiecie**

Dodatkowe informacje na etykiecie wynikające z wytycznych art 19 rozporządzenia 1223/2009/WE i obecności określonych składników, nie są wymagane.

Zalecane jest aby produkt przechowywany był w temperaturze pokojowej z dala od źródeł światła i ciepła.

### **3. Rozumowanie**

Kosmetyk będący przedmiotem oceny bezpieczeństwa **KREM YARROWIA AKG zawierający filtrat *Yarrowia lipolytica*** to krem nawilżająco-łagodzący stworzony specjalnie do pielęgnacji skóry twarzy podczas leczenia dermatologicznego izotretynoiną” (deklaracja producenta).

W trakcie badań potwierdzono stabilność fizykochemiczną gotowego produktu, jego kompatybilność z opakowaniem, oraz oszacowano termin trwałości kosmetyku.

Zastosowane do otrzymania masy kosmetycznej składniki zostały użyte w dozwolonych stężeniach i warunkach stosowania określonych w rozporządzeniu 1223/2009/WE.

Potwierdzono czystość mikrobiologiczną gotowego produktu oraz skuteczność układu konserwującego.

Dokonano oceny ryzyka na podstawie analizy dostępnych danych, profilu toksyczności poszczególnych składników, w uzasadnionych przypadkach wyznaczono margines bezpieczeństwa.

Dla składników, dla których dostępna była wartość toksyczności systemowej wyznaczono margines bezpieczeństwa. We wszystkich przypadkach MoS był wartością większą niż 100.

Oceny toksykologicznej składników zawartych w produkcie kosmetycznym (zał. 1) dokonano na podstawie danych zawartych w:

- karcie charakterystyki poszczególnych substancji
- bazie ECHA
- bazie o składnikach kosmetycznych CIR
- opinii SCCS
- bazie danych FDA.

Ponadto gotowy produkt przebadano pod kątem właściwości drażniących i uczulających oraz poddano testom aplikacyjno-użytkowym oraz aparaturowym potwierdzając jego bezpieczeństwo oraz deklarowane przez producenta działanie.

#### **4. Kwalifikacje eksperta i zatwierdzenie części B**

Imię i nazwisko	Natalia Saxion
Kwalifikacje	Lekarz Medycyny, Safety Assessor nr 2599518
Adres	ul. Rubież 46 H, 61-612 Poznań
Telefon	502 189 324

## Załącznik nr 2

### **RAPORT BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO Serum nawilżające do twarzy Yarrowia AKG**

Wprowadzająca do obrotu osoba odpowiedzialna „producent”: Symbiosis Sp. z o.o.

Sporządzone przez: Ewa Kilian-Pięta Manager Regulatory

Autoryzowane przez: Lekarz Medycyny Safety Assessor Natalia Saxion

Data utworzenia: 1.08.2024 r.

Przygotowany zgodnie z załącznikiem I Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczącego produktów kosmetycznych

Spis treści:

#### **CZESC A – Informacje na temat bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

1. Ilościowy i jakościowy skład produktu kosmetycznego
2. Właściwości fizyczne/chemiczne oraz stabilność produktu kosmetycznego
3. Jakość mikrobiologiczna
4. Zanieczyszczenia, ilości śladowe, informacje o materiale z którego wykonano opakowanie
5. Normalne i dające się racjonalnie przewidzieć stosowanie
6. Narażenie na działanie produktu kosmetycznego
7. Narażenie na działanie substancji
8. Profil toksykologiczny substancji
9. Działanie niepożądane i ciężkie działanie niepożądane
10. Informacje o produkcie kosmetycznym

#### **CZESC B – Ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

1. Wniosek z oceny
2. Ostrzeżenia i instrukcje stosowania umieszczane na etykiecie
3. Rozumowanie
4. Kwalifikacje eksperta i zatwierdzenie części B

#### **CZESC A - Informacje na temat bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

- 1. Ilościowy i jakościowy skład produktu kosmetycznego**

Za dostarczone informacje dotyczące składu jakościowego i ilościowego produktu odpowiada osoba zlecająca wykonanie raportu.

Producent oświadcza że, produkt będący przedmiotem niniejszego raportu został wykonany i będzie produkowany zgodnie z systemem jakości GMP na podstawie normy PN-EN ISO 22716, nie był testowany na zwierzętach zgodnie z art 18 rozporządzenia 1223/2009/WE oraz nie zawiera substancji CMR kategorii 1A, 1B oraz 2 zgodnie z rozporządzenia 1272/2008/WE.

Nazwa handlowa	Nazwa INCI	Zawartość w produkcie [%]	Numer CAS	Funkcja	Dane dostawcy
Woda	Aqua	DS	7732-18-5	rozpuszczalnik	-
Bioferment natywny	Yarrowia lipolytica Ferment Filtrate Alpha-Ketoglutaric Acid Pyruvic Acid Citric Acid	50,0	n/a 328-5-7 127-17-3 77-92-9	substancja aktywna	-
Gliceryna farmaceutyczna roślinna	Glycerin	5,0	56-81-5	humektant	-
D-Panthenol	Aqua Panthenol	5,0	7732-18-5 81-13-0/16485-10-2	składnik aktywny	-
Guma ksantanowa	Xanthan Gum	0,5	11138-66-2	zagęstnik	-
Lewulinian sodu, Sorbinian potasu	Sodium Levulinate Potassium Sorbate Aqua	1,9	19856-23-6 246334-61-5 7732-18-5	konserwant	-
Dibursztynian trisodowo-etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate Aqua	0,5	178949-82-1 7732-18-5	substancja chelatująca	-

Karty charakterystyki surowców oraz certyfikaty analiz pozwalają dokonać identyfikacji substancji, informują o ich właściwościach, obecności potencjalnych zanieczyszczeń oraz



profilu toksykologicznym. Dostarczone przez producenta karty charakterystyki surowców użytych w gotowym produkcie znajdują się w załączniku nr 1.

## **2. Właściwości fizyczne/chemiczne oraz stabilność produktu kosmetycznego**

- **Właściwości fizyczne/chemiczne gotowego produktu kosmetycznego**

Wygląd: płynny przejrzysty żel

Barwa: jasno - żółta

Zapach: charakterystyczny (słabo wyczuwalny) drożdżowy

pH: 4,1 (przyjęty zakres 3,5-4,5)

Lepkość: 278,4 mPa\*s; 92,8%; SP:L2; RPM:100; T:22,8°C

Gęstość: 1,009 g/cm<sup>3</sup>

Szczegółowe wyniki przedstawiono w rozdziale Wyniki i dyskusja Tabela 22.

- **Stabilność fizykochemiczna gotowego produktu kosmetycznego**

Przeprowadzono wstępny test stabilności produktu kosmetycznego – 24 godzinny test temperaturowy. Barwa, zapach, konsystencja nie uległy zmianie. Badanie prowadzono w zakresach temperatur 4°C, 20°C i 40°C. Pomiarów wykonano w temperaturze pokojowej 22°C. Następnie wykonano test wirówkowy po 24 h, poddając produkt wirowaniu przez 3 minuty, 2000 obr/min. Wynik: nie zaobserwowano rozwarstwiania faz.

Badany produkt kosmetyczny poddano ocenie stabilności w czasie i w różnych warunkach temperaturowych. Badania prowadzono przez 12 tygodni w temperaturze 4°C, 20°C i 37°C, analizując parametry formułacji po 2, 4, 8 i 12 tygodniach od rozpoczęcia testu. Wyniki oceny wykazały intensyfikację zapachu badanej próbki oraz zmniejszenie lepkości formułacji po 4,8 i 12 tygodniach przechowywania w temperaturze 37°C (Rozdział Wyniki i dyskusja Tabela 32).

- **Termin trwałości produktu kosmetycznego wyznaczono na 24 miesiące od daty produkcji.**

Termin trwałości określono na podstawie składu gotowego produktu, przewidywanego czasu zużycia przez użytkownika i wyników testów stabilności.

## **3. Jakość mikrobiologiczna**

- **Jakość mikrobiologiczna surowców kosmetycznych**

Dostarczone przez producenta karty charakterystyki surowców nie wzbudzają zastrzeżeń pod kątem czystości mikrobiologicznej. Dla surowców z niskim ryzykiem mikrobiologicznym nie przeprowadzono oceny. Pozostałe surowce spełniają wymagania mikrobiologiczne, co umożliwia ich zastosowanie w produkcji kosmetyku.

- **Jakość mikrobiologiczna gotowego produktu kosmetycznego**

Produkt spełnia wymagania jakościowe i ilościowe dotyczące czystości mikrobiologicznej dla produktu. Badanie jakości mikrobiologicznej formulacji nie wykazało wzrostu drobnoustrojów w badanej próbce. Zgodnie z normą PN-EN ISO 17516:2014-11 badana próbka spełnia kryterium kategorii i czystości mikrobiologicznej.

Wyniki - Rozdział Wyniki i dyskusja, pkt. 5 Tabela 29.

Wyniki testu konserwacji zawarte w Rozdziale Wyniki i dyskusja, pkt. 4 Tabela 26 potwierdzają stabilność mikrobiologiczną produktu i zabezpieczają formulację przed wzrostem niepożądanych drobnoustrojów.

- **Potencjał przeciwdrobnoustrojowy i prebiotyczny w testach *in vitro*; potwierdzenie oświadczeń marketingowych producenta**

Wyniki - Rozdział Wyniki i dyskusja, pkt. 9.2 Tabela 44 i 45.

#### **4. Zanieczyszczenia, ilości śladowe, informacje o materiale z którego wykonano opakowanie**

- **Zawartość śladowych ilości substancji niedozwolonych**

Wyniki - Rozdział Wyniki i dyskusja Tabela 24.

Ze względów technicznych uniknięcie zanieczyszczeń śladowych jest niemożliwe. Nie są spodziewane inne zanieczyszczenia i śladowe ilości substancji niedozwolonych, które mogą wpłynąć na bezpieczeństwo produktu. Zgodnie z rozporządzeniem 1223/2009/WE dopuszczone jest zastosowanie tych składników.

- **Informacje o materiale z którego wykonano opakowanie**

<b>Rodzaj opakowania</b>	<b>Dostawca</b>
butelka PP airless 30ml	n/a

Możliwe zastosowanie opakowania do celów spożywczych nie wnosi zastrzeżeń do jego stosowania w produkcie kosmetycznym, a potencjalne migracje substancji lub niestabilności mogące wpływać na bezpieczeństwo produktu nie są spodziewane.

Przeprowadzono test kompatybilności masy z opakowaniem. Wyniki badań kompatybilności masy z opakowaniem podczas testów starzeniowych wykazały brak interakcji pomiędzy masą i opakowaniem. Nie zmieniła się postać, barwa oraz zapach prób masy serum. Opakowanie również nie uległo deformacji, nie zmieniło barwy oraz nie straciło szczelności.

## 5. Normalne i dające się racjonalnie przewidzieć stosowanie

### **SERUM nawilżające do twarzy YARROWIA AKG - zawierające filtrat *Yarrowia lipolytica***

Sposób użycia: Po dokładnym umyciu i osuszeniu twarzy nanieś niewielką ilość produktu na dłoń i wmasuj w skórę twarzy oraz do całkowitego wchłonięcia. Następnie odpowiednią ilość kremu Yarrowia AKG wmasuj od razu po serum.

## 6. Narażenie na działanie produktu kosmetycznego

Miejsce zastosowania	twarz
Powierzchnia aplikacji (1) (2)	565 cm <sup>2</sup>
Ilość zastosowanego produktu	1,54 g/ dzień wg SCCS
Czas trwania i częstość stosowania	2.14 razy na dzień wg SCCS
Populacja docelowa i narażona	osoby dorosłe
Waga ciała dorosłych	60 kg
Faktor retencji	1,0

(1) według wytycznych SCCS/1628/21

(2) według wytycznych RIVM report 320104001/2006

Produkt przebadano dermatologicznie pod kątem właściwości drażniących i uczulających, wniosek z badań znajduje się w sekcji 10 niniejszego raportu

## 7. Narażenie na działanie substancji niepożądanych

- **Obliczenie marginesu bezpieczeństwa**

Zgodnie z wytycznymi SCCS/1628/21 oraz wykorzystując dostępne dane producentów surowców, opinie komitetów naukowych oraz dostępne bazy danych toksykologicznych obliczono margines bezpieczeństwa.

Dzienna ekspozycja na produkt wynosi:

$$E_{\text{produkt}} = 24.14 \text{ mg/kg bw/dzień}$$

Dawkę narażenia ogólnoustrojowego dla składników wyrobu obliczono ze wzoru:

$$SED = E_{\text{produkt}} (\text{mg/kg bw/dzień}) \times C (\%) / 100 \times DAp (\%) / 100$$

gdzie:

C – maksymalne stężenie składnika w produkcie

DAp – absorpcja przeznaskórkowa; jeżeli jest nieznana przyjmuje się 50%

Margines bezpieczeństwa stosowania

$$MoS = POD_{\text{sys}} / SED$$

SKŁADNIKI WG INCI	Maksymalne możliwe stężenie składnika w gotowym produkcie (%)	Absorpcja przez skórę (%)	SED	MoS
Aqua	ds 100	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, stanowi główną składową organizmu człowieka		
Yarrowia lipolytica Ferment Filtrat	49,0	Toksyczność nie jest przewidziana. Substancja bogata w aminokwasy, kwasy organiczne i białka.		
Alpha-Ketoglutaric Acid	0,71	Nie dotyczy, substancja występuje naturalnie w organizmie człowieka. W obecnym stężeniu nie wykazuje działania toksycznego.		
Pyruvic Acid	0,615	100, może być promotorem przenikania	Występuje naturalnie w organizmie człowieka, w użytym stężeniu jest bezpieczny w produktach kosmetycznych	
Citric Acid	0,105	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS. Szeroko stosowany w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.		
Glycerin	5,0	Nie dotyczy, substancja szeroko stosowana w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, wg FDA zaliczana jako GRAS		
Panthenol	3,75	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS		
Xanthan Gum	0,5	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS, szeroko stosowana jako dodatek spożywczy		

Sodium Levulinate	0,57	50	0,0688	DNEL 5mk/kg bw/d MOS >100
Potassium Sorbate	0,38	Zastosowano w ilości zgodnej z wymaganiami rozporządzenia 1223/2009/WE. Maksymalne stężenie w gotowym produkcie 0,6%		
Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,185	Nie dotyczy, substancja nie przenika przez barierę naskórkową		

## 8. Profil toksykologiczny substancji

Profil toksykologiczny poszczególnych substancji wchodzących w skład produktu kosmetycznego oraz dane o źródłach informacji zawarte są w załączniku nr 2.

## 9. Działanie niepożądane i ciężkie działanie niepożądane

Poddany ocenie produkt jest dopiero wprowadzany na rynek, nie ma więc informacji o jakichkolwiek działaniach niepożądanych. Po analizie użytych składników i ich ocenie toksykologicznej działania niepożądane nie są spodziewane.

Zgodnie w wymogiem art. 23 rozp. 1223/2009/WE osoba wprowadzająca produkt do obrotu ma obowiązek dokumentowania i zgłaszania działania niepożądanego wywołanego przez produkt kosmetyczny.

W przypadku wystąpienia ciężkiego działania niepożądanego osoba odpowiedzialna za produkt ma obowiązek powiadomić odpowiednie organy państwowe. Zakres działań osoby odpowiedzialnej za rozwiązanie problemu w takim przypadku wskazano w przewodniku – *Wytyczne w sprawie zgłaszania ciężkich działań niepożądanych*. Wszelkie informacje na temat działań niepożądanych muszą być aktualizowane i udostępniane osobie prowadzącej ocenę bezpieczeństwa w celu zamieszczenia zmian w raporcie bezpieczeństwa.

Wszelkie informacje na temat działań niepożądanych muszą być aktualizowane i udostępniane osobie prowadzącej ocenę bezpieczeństwa w celu zamieszczenia zmian w raporcie bezpieczeństwa.

## 10. Informacje o produkcie kosmetycznym

- **Produkt kosmetyczny przebadano pod kątem właściwości drażniących i uczulających.**

Badania dermatologiczne testy płatkowe okluzyjne zostały przeprowadzone na grupie 20 osób (w tym 15 osób z wywiadem alergicznym). Na podstawie wyników prowadzonych badań nie

stwierdzono własności uczulających i drażniących badanego produktu typu serum do twarzy. Wszystkie warianty serum spełniają kryteria bezpieczeństwa dermatologicznego i zostały zakwalifikowane do dalszego etapu badań tj. testów aplikacyjnych na probantach podczas leczenia izotretynoiną. Wyniki i opinie nie dotyczy osób u których występuje alergia na którykolwiek ze składników badanego kosmetyku.

- **Testy aplikacyjno-użytkowych oraz badania aparaturowe, potwierdzające deklarowane działanie produktu**

Produkt kosmetyczny podano testom aplikacyjno-użytkowym oraz aparaturowym na grupie 20 probantów oraz 20 probantów z produktem placebo, celem potwierdzenia deklarowanego przez producenta działania i zawarto je w sprawozdaniu.

**Wyniki:** Rozdział Wyniki i dyskusja, punkty 10 i 11, Rysunki: 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27)

**Wnioski:** Na podstawie przeprowadzonych badań aplikacyjno-użytkowych stwierdzono, że badany produkt stosowany zgodnie z przeznaczeniem i zaleceniami charakteryzuje się deklarowanym działaniem.

- **Analiza potencjału antyoksydacyjnego - potwierdzenie oświadczeń w testach *in vitro***

Wyniki - Rozdział Wyniki i dyskusja, pkt. 9 Tabela 43.

## **CZESC B – Ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

### **1. Wniosek z oceny**

Produkt SERUM nawilżające YARROWIA AKG zawierające filtrat *Yarrowia lipolytica* wprowadzany na rynek przez podmiot odpowiedzialny Symbiosis Sp. z o. o. poddano ocenie bezpieczeństwa. Po analizie składu produktu, uwzględniając normalne i dające się przewidzieć narażenie, stwierdza się, że produkt jest bezpieczny i stosowany zgodnie z zaleceniami producenta nie stanowi zagrożenia dla zdrowia i życia ludzi.

Zastosowane składniki oraz ich stężenia w produkcie są dopuszczone do stosowania w kosmetykach zgodnie z rozporządzeniem 1223/2009/WE. Składniki regulowane rozporządzeniem 1223/2009/WE zostały użyte zgodnie z wymogami rozporządzenia.

Oceniając profil toksyczności zastosowanych składników, ich strukturę chemiczną i historię bezpiecznego stosowania, stwierdza się, że nie ma prawdopodobnych zagrożeń bezpieczeństwa wynikających z normalnego stosowania tego produktu, jeśli jest on stosowany zgodnie z zaleceniami lub w przewidywalnych warunkach stosowania.

Na podstawie oceny bezpieczeństwa dla zdrowia człowieka gotowego produktu, jego składu,

budowy chemicznej oraz poziomu narażenia stwierdza się, że recepturę produktu uznaje się za bezpieczną w stosowaniu.

Ponadto producent oświadcza, że produkt będący przedmiotem niniejszego raportu został wykonany zgodnie z systemem jakości GMP na podstawie normy PN-EN ISO 22716, nie był testowany na zwierzętach zgodnie z art 18 rozporządzenia 1223/2009/WE oraz nie zawiera substancji CMR kategorii 1A, 1B oraz 2 zgodnie z rozporządzenia 1272/2008/WE

## **2. Ostrzeżenia i instrukcje stosowania umieszczone na etykiecie**

Dodatkowe informacje na etykiecie wynikające z wytycznych art 19 rozporządzenia 1223/2009/WE i obecności określonych składników nie są wymagane.

Zalecane jest aby produkt przechowywany był w temperaturze pokojowej z dala od źródeł światła i ciepła.

## **3. Rozumowanie**

Kosmetyk będący przedmiotem oceny bezpieczeństwa **SERUM nawilżające do twarzy YARROWIA AKG zawierające filtrat *Yarrowia lipolytica*** to nawilżająco-łagodząca delikatna formuła, stworzona specjalnie dla regeneracji bariery hydrolipidowej oraz łagodzenia suchej i podrażnionej skóry podczas leczenia dermatologicznego izotretynoiną (deklaracja producenta).

W trakcie badań potwierdzono stabilność fizykochemiczną gotowego produktu, jego kompatybilność z opakowaniem, oraz oszacowano termin trwałości kosmetyku.

Zastosowane do otrzymania masy kosmetycznej składniki zostały użyte w dozwolonych stężeniach i warunkach stosowania określonych w rozporządzeniu 1223/2009/WE.

Potwierdzono czystość mikrobiologiczną gotowego produktu oraz skuteczność układu konserwującego.

Dokonano oceny ryzyka na podstawie analizy dostępnych danych, profilu toksyczności poszczególnych składników, w uzasadnionych przypadkach wyznaczono margines bezpieczeństwa.

Dla składników, dla których dostępna była wartość toksyczności systemowej PODsys wyznaczono margines bezpieczeństwa. We wszystkich przypadkach MoS był wartością większą niż 100.

Oceny toksykologicznej składników zawartych w produkcie kosmetycznym (zał. 1) dokonano na podstawie danych zawartych w:

- karcie charakterystyki poszczególnych substancji

- bazie ECHA
- bazie o składnikach kosmetycznych CIR
- opinii SCCS
- bazie danych FDA.

Ponadto gotowy produkt przebadano pod kątem właściwości drażniących i uczulających oraz badaniom aparaturowym i aplikacyjno-użytkowym potwierdzając jego bezpieczeństwo oraz deklarowane przez producenta działanie.

#### 4. Kwalifikacje eksperta i zatwierdzenie części B

<b>Imię i nazwisko</b>	Natalia Saxion
<b>Kwalifikacje</b>	Lekarz Medycyny, Safety Assessor 2599518
<b>Adres:</b>	ul. Rubież 46 H, 61-612 Poznań
<b>Telefon:</b>	502 189 324
<b>E-mail:</b>	<a href="mailto:biuro@symbiosis.pl">biuro@symbiosis.pl</a>

#### Załącznik nr 3

### **RAPORT BEZPIECZEŃSTWA PRODUKTU KOSMETYCZNEGO ŻEL do mycia twarzy YARROWIA AKG**

Wprowadzająca do obrotu osoba odpowiedzialna „producent”: Symbiosis Sp. z o.o.

Sporządzone przez: Ewa Kilian-Pięta Manager Regulatory

Autoryzowane przez: Lekarz Medycyny Safety Assessor Natalia Saxion

Data utworzenia: 1.08.2024 r.

Przygotowany zgodnie z załącznikiem I Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczącego produktów kosmetycznych

#### SPIS TREŚCI

#### **CZESC A – Informacje na temat bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

##### 1. Ilościowy i jakościowy skład produktu kosmetycznego



2. Właściwości fizyczne/chemiczne oraz stabilność produktu kosmetycznego
3. Jakość mikrobiologiczna
4. Zanieczyszczenia, ilości śladowe, informacje o materiale z którego wykonano opakowanie
5. Normalne i dające się racjonalnie przewidzieć stosowanie
6. Narażenie na działanie produktu kosmetycznego
7. Narażenie na działanie substancji
8. Profil toksykologiczny substancji
9. Działanie niepożądane i ciężkie działanie niepożądane
10. Informacje o produkcie kosmetycznym

#### **CZESC B – Ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

1. Wniosek z oceny
2. Ostrzeżenia i instrukcje stosowania umieszczane na etykiecie
3. Rozumowanie
4. Kwalifikacje eksperta i zatwierdzenie części B

#### **CZESC A - Informacje na temat bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

##### **1. Ilościowy i jakościowy skład produktu kosmetycznego**

Za dostarczone informacje dotyczące składu jakościowego i ilościowego produktu odpowiada osoba zlecająca wykonanie raportu.

Producent oświadcza że, produkt będący przedmiotem niniejszego raportu został wykonany i będzie produkowany zgodnie z systemem jakości GMP na podstawie normy PN-EN ISO 22716, nie był testowany na zwierzętach zgodnie z art 18 rozporządzenia 1223/2009/WE oraz nie zawiera substancji CMR kategorii 1A, 1B oraz 2 zgodnie z rozporządzenia 1272/2008/WE.

Nazwa handlowa	Nazwa INCI	Zawartość w produkcie [%]	Numer CAS	Funkcja
Woda	Aqua	DS	7732-18-5	rozpuszczalnik
Filtrat Yarrowia Lipolytica	Yarrowia lipolytica Ferment Filtrate Alpha-Ketoglutaric Acid Pyruvic Acid Citric Acid	10,0	n/a 328-5-7 127-17-3 77-92-9	substancja aktywna
D-Panthenol	Aqua Panthenol	5,0	7732-18-5 81-13-0/16485-10-2	składnik aktywny
Guma ksantanowa	Xanthan Gum	1,0	11138-66-2	zagęstnik
Pelargonian poliglicerylu-4	Polyglyceryl-4 Pelargonate	10,0	2570327-84-1	surfaktant
Lewulinian sodu, Sorbinian potasu	Sodium Levulinate Potassium Sorbate Aqua	1,9	19856-23-6 246334-61-5 7732-18-5	konserwant
Dibursztynian trisodowo-etylenodiaminy	Trisodium Ethylenediamine Disuccinate Aqua	0,5	178949-82-1 7732-18-5	substancja chelatująca

Karty charakterystyki surowców oraz certyfikaty analiz, pozwalają dokonać identyfikacji substancji, informują o ich właściwościach, obecności potencjalnych zanieczyszczeń oraz profilu toksykologicznym. Dostarczone przez producenta karty charakterystyki surowców użytych w gotowym produkcie znajdują się w załączniku nr 1.

## 2. Właściwości fizyczne/chemiczne oraz stabilność produktu kosmetycznego

- **Właściwości fizyczne/chemiczne gotowego produktu kosmetycznego**

Wygląd: przejrzysty żel

Barwa: jasno - żółta

Zapach: charakterystyczny (słabo wyczuwalny) drożdżowy

pH: 4,95 (przyjęty zakres 4,5-5,5)

Lepkość: 375,4 mPa\*s; 31,3%; SP:L3; RPM:100; T:22,9°C

Gęstość: 0,9565 g/cm<sup>3</sup>

Szczegółowe wyniki przedstawiono w rozdziale Wyniki i dyskusja Tabela 23.

- **Stabilność gotowego produktu kosmetycznego**

Przeprowadzono wstępny test stabilności produktu kosmetycznego – 24 godzinny test temperaturowy. Barwa, zapach, konsystencja nie uległy zmianie. Badanie prowadzono w zakresach temperatur 4°C, 20°C i 40°C. Pomiary wykonano w temperaturze pokojowej, w 22°C. Następnie wykonano test wirówkowy, poddając produkt wirowaniu przez 3 min, 2000 obr/min. Wynik: nie zaobserwowano rozwarstwiania faz.

Badany produkt kosmetyczny poddano ocenie stabilności w czasie i w różnych warunkach temperaturowych. Badania prowadzono przez 12 tygodni w temperaturze 4°C, 20°C i 37°C, analizując parametry formulacji po 2, 4, 8 i 12 tygodniach od rozpoczęcia testu. Wyniki oceny wykazały obniżenie lepkości formulacji po 4,8 i 12 tygodniach przechowywania w temperaturze 37°C (Rozdział Wyniki i dyskusja Tabela 33).

- **Termin trwałości produktu kosmetycznego wyznaczono na 24 miesiące od daty produkcji.**

Termin trwałości określono na podstawie składu gotowego produktu, przewidywanego czasu zużycia przez użytkownika i wyników testów stabilności.

### **3. Jakość mikrobiologiczna**

- **Jakość mikrobiologiczna surowców kosmetycznych**

Dostarczone przez producenta karty charakterystyki surowców kosmetycznych nie wzbudzają zastrzeżeń pod kątem czystości mikrobiologicznej. Dla surowców z niskim ryzykiem mikrobiologicznym nie przeprowadzono oceny. Pozostałe surowce spełniają wymagania mikrobiologiczne, co umożliwi ich zastosowanie w produkcji kosmetyku.

- **Jakość mikrobiologiczna gotowego produktu kosmetycznego**

Produkt spełnia wymagania jakościowe i ilościowe dotyczące czystości mikrobiologicznej dla produktu kosmetycznego. Badanie jakości mikrobiologicznej formułacji nie wykazało wzrostu drobnoustrojów w badanej próbce. Zgodnie z normą PN-EN ISO 17516:2014-11 produkt typu żel do mycia twarzy spełnia kryterium kategorii I czystości mikrobiologicznej.

Wyniki przedstawiono w rozdziale Wyniki i dyskusja pkt. 5, Tabela 30 .

Wyniki testu konserwacji zostały natomiast przedstawione w rozdziale Wyniki i dyskusja pkt. 4 Tabela 27. potwierdzają skuteczność zastosowanej substancji konserwującej i zabezpieczają formułację przed wzrostem niepożądanych grup drobnoustrojów.

#### **4. Zanieczyszczenia, ilości śladowe, informacje o materiale z którego wykonano opakowanie**

- **Zawartość śladowych ilości substancji niedozwolonych**

Wyniki rozdział Wyniki i dyskusja Tabela 24 .

Ze względów technicznych uniknięcie zanieczyszczeń śladowych jest niemożliwe. Nie są spodziewane inne zanieczyszczenia i śladowe ilości substancji niedozwolonych, które mogą wpłynąć na bezpieczeństwo produktu. Zgodnie z rozporządzeniem 1223/2009/WE dopuszczone jest zastosowanie tych składników.

- **Informacje o materiale z którego wykonano opakowanie**

<b>Rodzaj opakowania</b>	<b>Dostawca</b>
butelka PP 200 ml z pompką dozującą	n/a

Możliwe zastosowanie opakowania do celów spożywczych nie wnosi zastrzeżeń do jego stosowania w produkcie kosmetycznym, a potencjalne migracje substancji lub niestabilności mogące wpływać na bezpieczeństwo produktu nie są spodziewane.

Przeprowadzono test kompatybilności masy z opakowaniem. Wyniki badań kompatybilności masy z opakowaniem podczas testów starzeniowych wykazały brak interakcji pomiędzy masą i

opakowaniem. Nie zmieniła się postać, barwa oraz zapach prób masy kremu. Opakowanie również nie uległo deformacji, nie zmieniło barwy oraz nie straciło szczelności.

## 5. Normalne i dające się racjonalnie przewidzieć stosowanie

### Żel do mycia twarzy YARROWIA AKG zawierający filtrat Yarrowia lipolytica

Sposób użycia: Nanieś niewielką ilość produktu na dłonie zwilżone ciepłą wodą. Dokładnie umyj twarz i okolice oczu. Jeśli zmywasz makijaż, opcjonalnie powtórz czynność dwukrotnie.

## 6. Narazenie na działanie produktu kosmetycznego

Miejsce zastosowania	twarz
Powierzchnia aplikacji (1) (2)	565 cm <sup>2</sup>
Ilość zastosowanego produktu	5 g/ dzień wg SCCS
Czas trwania i częstość stosowania	2.14 raza na dzień wg SCCS
Populacja docelowa i narażona	osoby dorosłe
Waga ciała dorosłych	60 kg
Faktor retencji	0,10

(1) według wytycznych SCCS/1628/21

(2) Według wytycznych *RIVM report 320104001/2006*

Produkt przebadano dermatologicznie pod kątem właściwości drażniących i uczulających, wniosek z badań znajduje się w sekcji 10 niniejszego raportu.

## 7. Narazenie na działanie substancji niepożądanych

- **Obliczenie marginesu bezpieczeństwa**

Zgodnie z wytycznymi SCCS/1628/21 oraz wykorzystując dostępne dane producentów substancji, opinie komitetów naukowych oraz dostępne bazy danych toksykologicznych obliczono margines bezpieczeństwa.

Dzienna ekspozycja na produkt wynosi:

$$E_{\text{produkt}} = 8,33 \text{ mg/kg bw/dzień}$$

Dawkę narażenia ogólnoustrojowego dla składników wyrobu obliczono ze wzoru:

$$SED = E_{\text{produkt}} (\text{mg/kg bw/dzień}) \times C (\%) / 100 \times DAp (\%) / 100$$

gdzie:

C – maksymalne stężenie składnika w produkcji

DAp – absorpcja przeznaskórkowa; jeżeli jest nieznana przyjmuje się 50%

Margines bezpieczeństwa stosowania

$$MoS = POD_{\text{sys}} / SED$$

SKŁADNIKI WG INCI	Maksymalne możliwe stężenie składnika w gotowym produkcie (%)	Absorpcja przez skórę (%)	SED	MoS
Aqua	ds 100	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, stanowi główną składową organizmu człowieka		
Yarrowia lipolytica Ferment Filtrat	9,8	Toksyczność nie jest przewidziana. Substancja bogata w aminokwasy, kwasy organiczne i białka.		
Alpha-Ketoglutaric Acid	1,42	Nie dotyczy, substancja występuje naturalnie w organizmie człowieka. W obecnym stężeniu nie wykazuje działania toksycznego.		
Pyruvic Acid	0,123	100, może być promotorem przenikania	Występuje naturalnie w organizmie człowieka, w użytym stężeniu jest bezpieczny w produktach kosmetycznych	
Citric Acid	0,021	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS. Szeroko stosowany w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.		
Panthenol	3,75	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS.		
Xanthan Gum	0,5	Nie dotyczy, substancja nie jest toksyczna, wg FDA zaliczana jest jako GRAS, szeroko stosowana jako dodatek spożywczy.		
Polyglyceryl-4 Pelargonate	10,0	50, może być promotorem przenikania	0,024	Według dostępnych danych toksyczność nie jest spodziewana

Sodium Levulinate	0,57	50	0,0688	DNEL 5mk/kg bw/d MOS >100
Potassium Sorbate	0,38	Zastosowano w ilości zgodnej z wymaganiami rozporządzenia 1223/2009/WE. Maksymalne stężenie w gotowym produkcie 0,6%		
Trisodium Ethylenediamine Disuccinate	0,185	Nie dotyczy, substancja nie przenika przez barierę naskórkową		

## 8. Profil toksykologiczny substancji

Profil toksykologiczny poszczególnych substancji wchodzących w skład produktu kosmetycznego oraz dane o źródłach informacji zawarte są w załączniku nr 2.

## 9. Działanie niepożądane i ciężkie działanie niepożądane

Poddany ocenie produkt jest dopiero wprowadzany na rynek, nie ma więc informacji o jakichkolwiek działaniach niepożądanych. Po analizie użytych składników i ich cenie toksykologicznej działania niepożądane nie są spodziewane.

Zgodnie w wymogiem art. 23 rozp. 1223/2009/WE osoba wprowadzająca produkt do obrotu ma obowiązek dokumentowania i zgłaszania działania niepożądanego wywołanego przez produkt kosmetyczny.

W przypadku wystąpienia ciężkiego działania niepożądanego osoba odpowiedzialna za produkt ma obowiązek powiadomić odpowiednie organy państwowe. Zakres działań osoby odpowiedzialnej za rozwiązanie problemu w takim przypadku wskazano w przewodniku – *Wytyczne w sprawie zgłaszania ciężkich działań niepożądanych*. Wszelkie informacje na temat działań niepożądanych muszą być aktualizowane i udostępniane osobie prowadzącej ocenę bezpieczeństwa w celu zamieszczenia zmian w raporcie bezpieczeństwa.

Wszelkie informacje na temat działań niepożądanych muszą być aktualizowane i udostępniane osobie prowadzącej ocenę bezpieczeństwa w celu zamieszczenia zmiana raporcie bezpieczeństwa.

## 10. Informacje o produkcie kosmetycznym

- **Produkt kosmetyczny przebadano pod kątem własności drażniących i uczulających.**

Badania dermatologiczne testy płatkowe otwarte zostały przeprowadzone na grupie 20 osób (w tym 15 osób z wywiadem alergicznym). Na podstawie wyników przeprowadzonych badań nie

stwierdzono własności uczulających i drażniących badanego żelu do mycia twarzy. W dwóch przypadkach wynik był wątpliwy dla wariantu żelu do mycia twarzy z filtrem. Mimo to produkt został znany jako spełniający kryteria bezpieczeństwa dermatologicznego i został zakwalifikowany do dalszego etapu badań aplikacyjnych na probantach podczas leczenia izotretynoiną. Wynik i opinia nie dotyczy osób u których wystąpiła alergia na którykolwiek ze składników badanego kosmetyku.

• **Testy aplikacyjno-użytkowych oraz aparaturowe, potwierdzające deklarowane działanie produktu**

Produkt kosmetyczny podano testom aplikacyjno-użytkowym oraz aparaturowym na grupie 20 probantów celem potwierdzenia deklarowanego przez producenta działania.

Wyniki: rozdział Wyniki i dyskusja punkt 10 i 11, Rysunki: 21, 22 i 23, 24, 25, 26 i 27.

Wnioski: Na podstawie przeprowadzonych badań aplikacyjno-użytkowych oraz aparaturowych stwierdzono, że badany produkt stosowany zgodnie z przeznaczeniem i zaleceniami, charakteryzuje się deklarowanym działaniem.

• **Analiza potencjału antyoksydacyjnego - potwierdzenie właściwości w testach *in vitro***

Wyniki - rozdział Wyniki i dyskusja pkt. 9, Tabela 43.

**CZESC B – Ocena bezpieczeństwa produktu kosmetycznego**

**1. Wniosek z oceny**

Produkt ŻEL do mycia twarzy YARROWIA AKG zawierający filtrat *Yarrowia lipolytica* wprowadzany na rynek przez podmiot odpowiedzialny Symbiosis Sp. z o.o. poddano ocenie bezpieczeństwa. Po analizie składu produktu, uwzględniając normalne i dające się przewidzieć narażenie stwierdza się, że produkt jest bezpieczny i stosowany zgodnie z zaleceniami producenta, nie stanowi zagrożenia dla zdrowia i życia ludzi.

Zastosowane składniki oraz ich stężenia w produkcie dopuszczone są do stosowania w kosmetykach zgodnie z rozporządzeniem 1223/2009/WE. Składniki regulowane rozporządzeniem 1223/2009/WE zostały użyte zgodnie z wymogami rozporządzenia.

Oceniając profil toksyczności zastosowanych składników, ich strukturę chemiczną i historię bezpiecznego stosowania, stwierdza się, że nie ma prawdopodobnych zagrożeń bezpieczeństwa wynikających z normalnego stosowania tego produktu, jeśli jest on stosowany zgodnie z zaleceniami lub w przewidywalnych warunkach stosowania. Na podstawie oceny



bezpieczeństwa dla zdrowia człowieka gotowego produktu, jego składu, budowy chemicznej oraz poziomu narażenia stwierdza się, że recepturę produktu uznaje się za bezpieczną w stosowaniu;

Ponadto producent oświadcza że, produkt będący przedmiotem niniejszego raportu został wykonany i będzie produkowany zgodnie z systemem jakości GMP na podstawie normy PN-EN ISO 22716, nie był testowany na zwierzętach zgodnie z art 18 rozporządzenia 1223/2009/WE oraz nie zawiera substancji CMR kategorii 1A, 1B oraz 2 zgodnie z rozporządzenia 1272/2008/WE

## **2. Ostrzeżenia i instrukcje stosowania umieszczone na etykiecie**

Dodatkowe informacje na etykiecie wynikające z wytycznych art 19 rozporządzenia 1223/2009/WE i obecności określonych składników nie są wymagane.

Zalecane jest aby produkt przechowywany był w temperaturze pokojowej z dala od źródeł światła i ciepła.

## **3. Rozumowanie**

Kosmetyk będący przedmiotem oceny bezpieczeństwa ŻEL do mycia twarzy YARROWIA AKG to“ultra-delikatny żel do mycia twarzy, stworzony z myślą o najbardziej wrażliwej skórze podczas leczenia dermatologicznego izotretynołą (deklaracja producenta).

W trakcie badań potwierdzono stabilność fizykochemiczną gotowego produktu, jego kompatybilność z opakowaniem oraz oszacowano termin trwałości kosmetyku.

Zastosowane do otrzymania masy kosmetycznej składniki zostały użyte w dozwolonych stężeniach i warunkach stosowania określonych w rozporządzeniu 1223/2009/WE.

Potwierdzono czystość mikrobiologiczną gotowego produktu oraz skuteczność układu konserwującego.

Dokonano oceny ryzyka na podstawie analizy dostępnych danych, profilu toksyczności poszczególnych składników, w uzasadnionych przypadkach wyznaczono margines bezpieczeństwa.

Dla składników, dla których dostępna była wartość toksyczności systemowej PODsys wyznaczono margines bezpieczeństwa. We wszystkich przypadkach MoS był wartością większą niż 100.

Oceny toksykologicznej składników zawartych w produkcie kosmetycznym (zał. 1) dokonano na podstawie danych zawartych w:

- karcie charakterystyki poszczególnych substancji

- bazie ECHA
- bazie o składnikach kosmetycznych CIR
- opinii SCCS
- bazie danych FDA.

Ponadto gotowy produkt przebadano pod kątem właściwości drażniących i uczulających oraz badaniom aplikacyjno-użytkowym potwierdzając jego bezpieczeństwo oraz deklarowane przez producenta działanie.

#### **4. Kwalifikacje eksperta i zatwierdzenie części B**

<b>Imię i nazwisko</b>	Natalia Saxion
<b>Kwalifikacje</b>	Lekarz Medycyny, Safety Assessor
<b>Adres</b>	ul. Rubież 46 H, 61-612 Poznań
<b>Telefon</b>	502 189 324
<b>E-mail</b>	<a href="mailto:biuro@symbiosis.pl">biuro@symbiosis.pl</a>

## VI Wnioski

1. Płyn pofermentacyjny pozyskany w procesie biotechnologicznym z wykorzystaniem drożdży z rodzaju *Yarrowia* sp. i odpadowego glicerolu może stanowić biofunkcjonalny surowiec kosmetyczny.
2. Zarówno płyn pofermentacyjny (bioferment natywny) jak i filtrat pozbawiony biomasy, mogą stanowić składnik funkcjonalny produktów kosmetycznych takich jak krem do twarzy, serum do twarzy i żel do mycia twarzy.
3. Zastosowanie biofermentu natywnego i filtratu pozwoliło na otrzymanie stabilnych fizykochemicznie i atrakcyjnych organoleptycznie trzech formułacji kosmetycznych.
4. Otrzymane formułacje charakteryzują się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym i właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, szczególnie wobec *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*.
5. Formułacje kosmetyczne zarówno te z biofermentem natywnym jak i filtrem nie wykazują działania drażniącego i otrzymały pozytywne oceny potencjalnych użytkowników.
6. Wszystkie opracowane formułacje przyczyniły się do poprawy takich parametrów skóry jak poziom nawilżenia, pH, elastyczność jak i TEWL.

## VII Literatura

- Aioi A., Shimizu T., Kuriyama K. (1995) Effect of squalene on superoxide anion generation induced by a skin irritant, lauroylsarcosine. *Int. J. Pharm.* 113:159–164.
- Arjun M., Singh B.S., Paul M., Sethi M.D., Anthony A., Romeo M.D., Oke A., Anakwenze M.D., Joseph A., Abboud M.D., Surena Namdari M.D. (2020) Strategies to decolonize the shoulder of *Cutibacterium acnes*. A review. *J. Shou. Elbow Sug.* 29 (4): 660-666.
- Armengot-Carbo M., Hernández-Martín Á., Torrelo A. (2015) The role of filaggrin in the skin barrier and disease development, *actas dermo-sifiliográficas*. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 106: 2: 86-95.
- Barnard E., Johnson T., Ngo T., Arora U., Leuterio G., McDowell A. (2020) Porphyrin production and regulation in cutaneous *Propionibacteria*. *mSphere* 5:19.
- Bouloc A., Roo E., Imko-Walczuk B., Moga A., Chadoutaud B., Dréno B. (2017) A skincare combined with combination of adapalene and benzoyl peroxide provides a significant adjunctive efficacy and local tolerance benefit in adult women with mild acne. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 31(10):1727-1731.
- Björklund S., Engblom J., Thuresson K., Sparr E. (2013) Glycerol and urea can be used to increase skin permeability in reduced hydration conditions. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50(5):638-645.
- Brown G. (2023) Targeting the retinoic acid pathway to eradicate cancer stem cell. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 2373.
- Claesen J., Spagnolo J.B., Ramos S.F., Kurita K.L., Byrd A.L., Aksenov A.A. (2020). A *Cutibacterium acnes* antibiotic modulates human skin microbiota composition in hair follicles. *Sci. Transl. Med.* 12:5445.
- Concilla A., Laughter M.R., Colby L., Presley A., Anderson J., Rundle C.W. (2022) The dermatologist on social media: when the pros outweigh the cons. *Comment W Risks and Benefits of Using Social Media in Dermatology: Cross-sectional Questionnaire Study* Report 5(1).
- Condorelli G., Hachem M.L., Zambruno G., Nystrom A., Candi E., Castiglia D. (2021) Notch-ing up knowledge on molecular mechanisms of skin fibrosis: focus on the multifaceted Notch signalling pathway. *J. Biomed. Scie.* 28: 1-17.
- Costa N., Bombardieri C., Kuribayashi J., de Camargo, M., Andrade L., Kagohara E. and Espósito B. (2008) Antimicrobial activity of ethylenediaminedisuccinate metal complexes. *Short Communication. Chem. Bio.* 5: 2156-2159.
- Costa-Balogh F.O., Wennerström H., Wadsö L., Sparr E. (2006) How small polar molecules protect membrane systems against osmotic stress: the urea-water-phospholipid system. *J. Phys. Chem. B.* 110(47):23845-23852.
- Crown S.B., Marze N., Antoniewicz M.R. (2015) Catabolism of branched chain amino acids contributes significantly to synthesis of odd-chain and even-chain fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *PLoS One* 10(12): e0145850.
- Darlenski R., Surber C., Fluhr J.W. (2010) Topical retinoids in the management of photodamaged skin: from theory to evidence-based practical approach. *Br. J. Dermatol.* 163 (6):1157-65.
- Desai M.D., Friedman M.D. (2024) Isotretinoin for rosacea: A systematic review. *JAAD International* 16:112-118.
- Downing D.T., Stewart M.E., Wertz, P.W., Strauss, J.S. (1986) Essential fatty acids and acne. *J. Am. Acad. Dermatol.* 14, 221–225.
- Falcocchio S., Ruiz C., Pastor F.J., Saso L., Diaz P. (2006) *Propionibacterium acnes* GehA lipase, an enzyme involved in acne development, can be successfully inhibited by defined natural substances. *J. Mol. Cat. Enzym.* 40(3-4):132-137.

- Fournière M, Latire T, Souak D, Feuilloley MGJ, Bedoux G. (2020) *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: Two Major Sentinels of Skin Microbiota and the Influence of Cosmetics. *Microorganisms* 8(11):1752.
- Fujimura S., Nakamura T. (1978) Purification and properties of a bacteriocin-like substance (Acnein) of oral *Propionibacterium acnes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14, 893-898.
- Genard S. (2015) Verwendung eines lysats einer bakterienkultur von *Vitreoscilla* sp. gattung zur prävention und/oder behandlung von hyperseborrhoischer kopfhaut. Patent nr EP2830588A1.
- Gueniche A., Liboutet M., Cheilian S., Fagot D., Juchaux F., Breton L. (2021) *Vitreoscilla filiformis* extract for topical skin care: A review. *Front Cell Infect. Microbiol.* 11: 747663.
- Gupta S. (2022) Cosmetics Market Research Report Information By Product Type (Skin Cosmetics, Hair Cosmetics, Nail Cosmetics, Eye Cosmetics And Others), By Category (Organic & Natural And Conventional), By Distribution Channel (Store-Based And Non-Store-Based), And By Region (North America, Europe, Asia-Pacific, And Rest Of The World) – Market Forecast Till 2032 ID: MRFR/CR/2290-CR
- Hachem J.P., Man M.Q., Crumrine D., Uchida Y., Brown B., Rogiers V., Roseeuw D., Feingold K.R., Elias P.M. (2005) Sustained serine proteases activity by prolonged increase in pH leads to degradation of lipid processing enzymes and profound alterations of barrier function and stratum corneum integrity. *J. Investigative Derma.* 125, 3: 510-520.
- Hart, Prue H., Norval M. (2021) The multiple roles of urocanic acid in health and disease. *J. Invest. Derma.* 141.3: 496-502.
- Ischia M., Napolitano A., Michalczyk-Wetula D., Płonka P.M. (2016) Melanin 'dust' or 'ghost'? *Exp. Dermatol.* 25(7):505-6.
- Jarrousse V., Castex-Rizzi N., Khammari A. (2007) Modulation of integrins and filaggrin expression by *Propionibacterium acnes* extracts on keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 299:441-447.
- Jeremy A.H., Holland D.B., Roberts S.G (2003) Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *J. Invest. Dermatol.* 121:20-27.
- Kaya G., Tran Ch., Sorg O., Hotz R., Grand D., Carraux P., Didierjean L., Stamenkovic I., Saurat J.H. (2006) Hyaluronate fragments reverse skin atrophy by a CD44-dependent mechanism. *PLoS Med.* 3(12): e493.
- Kim B.H., Lee Y.S., Kang K.S.(2003) The mechanism of retinol-induced irritation and its application to anti-irritant development. *Toxicol Lett.* 146:65-73.
- Krien P.M., Kermici M. (2000) Evidence for the existence of a self-regulated enzymatic process within the human stratum corneum an unexpected role for urocanic acid. *J. Invest. Dermatol.* 115:414-420.
- Li X., He C., Chen Z., Gan Y., Jia Y. (2017) A review of the role of sebum in the mechanism of acne pathogenesis. *J. Cosmet. Derma.* 16(2):168-173.
- Li D., et al. (2022) Recent advances in microbial synthesis of poly- $\gamma$ -glutamic acid: a review. *Foods* 5: 739.
- Pinto D., Ciardiello T., Franzoni M. et al. (2021) Effect of commonly used cosmetic preservatives on skin resident microflora dynamics. *Sci. Rep.* 11, 8695.
- Liu S., He L., Yao K. (2018) The antioxidative function of alpha-ketoglutarate and its applications. *Biomed. Res.* 2018:3408467.
- Lukić M., Pantelić I., Savić S.D. (2021) Towards optimal pH of the skin and topical formulations: from the current state of the art to tailored products. *Cosmetics* 8, 3: 69.

- Mahe Y.F., Perez M.J., Tacheau C., Fanchon C., Martin R., Rousset F., Seite S. (2013) A new *Vitreoscilla filiformis* extract grown on spa water-enriched medium activates endogenous cutaneous antioxidant and antimicrobial defenses through a potential Toll-like receptor 2/protein kinase C, zeta transduction pathway. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 30;6:191-6.
- Mayslich C., Grange P.A., Dupin N. (2021) *Cutibacterium acnes* as an opportunistic pathogen: An update of its virulence-associated factors. *Microorganisms* 9(2), 303.
- Milanović M., Bekić M., Đokić J., Vučević D., Čolić M., Tomić S. (2024) Exogenous  $\alpha$ -ketoglutarate modulates redox metabolism and functions of human dendritic cells, altering their capacity to polarise T cell response. *Int. J. Biol. Sci;* 20(3):1064-1087.
- Motamedi M., Chehade A., Sanghera R., Grewal P. (2021) A clinician's guide to topical retinoids. *J. Cutan. Med. Surg.* 26(84):120347542110350.
- Nakamura K., O'Neill A.M., Williams M.R., Cau L., Nakatsuji T., Horswill A.R., Gallo R.L. (2020) Short chain fatty acids produced by *Cutibacterium acnes* inhibit biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Sci. Rep.* 10, 21237: 1-11.
- Naeini S.H., Mavaddatiyan L., Kalkhoran Z.R., Taherkhani S., Talkhabi M. (2023) Alpha-ketoglutarate as a potent regulator for lifespan and healthspan. Evidences and perspectives. *Exp Gerontol;*175:112154.
- Nelson A.M., Gilliland K.L., Cong Z., Thiboutot D.M. (2006)13-cis-retinoic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in human SEB-1 sebocytes. *J. Invest. Dermatol.* 126:2178-2189.
- Nowacka A., Douezan S. Wadsö L. Topgaard D., Sparr E. (2012). Small polar molecules like glycerol and urea can preserve the fluidity of lipid bilayers under dry conditions. *Soft Matter.* 8: 1482.
- Nováčková A.,Sagrafena I., Pullmannová P., Paraskevopoulos G., Dwivedi A., Mazumder A., Růžičková K., Slepička P., Zbytovská J., Vávrová K. (2021) Sustained serine proteases activity by prolonged increase in pH leads to degradation of lipid processing enzymes and profound alterations of barrier function and stratum corneum integrity. *J. Invest. Derma.* 141 (8): 1915-1921.
- Nsengiyumva E.M., Heitz M.P., Alexandridis P. (2023) Salt and temperature effects on xanthan gum polysaccharide in aqueous solutions. *Int. J. Mol. Sci.* 25(1):490.
- Okoro O.E., Adenle A., Ludovici M. (2021) Lipidomics of facial sebum in the comparison between acne and non-acne adolescents with dark skin. *Sci. Rep.* 11, 16591.
- Ottaviani M., Alestas T., Flori E., Mastrofrancesco A., Zouboulis C.C., Picardo M. (2006) Peroxidated squalene induces the production of inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes: A possible role in acne vulgaris. *J. Investig. Dermatol.* 126:2430–2437
- Phagare M. (2024) Anti Acne Cosmetic Market Report 2024 (8 th Global Edition)
- Platsidaki E., Dessinioti C. (2018) Recent advances in understanding *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) in acne. *Reserch* 7:F100, 1-12.
- Raport EADV Congres, Milan (2022) Dermatology and its Use in Social Media „Social Media and Clinical Research in Dermatology”
- Sanford J. A., O'Neill A. M., Zouboulis C. C., Gallo R. L. (2019). Short-chain fatty acids from *Cutibacterium acnes* activate both a canonical and epigenetic inflammatory response in human sebocytes. *J. Immunol.* 202, 1767–1776.

- Santucci F., Setola R., Ernesto D.P., Fabio P., Grazia M.G. (2021) Smart system for worker safety: scenarios and risk. In Proceedings of the 31st European Safety and Reliability Conference (ESREL 2021).
- Saurat J.H., Sorg O., Leti M., Fabre B. (2018) Novel *Silybum marianum* achene extract and uses thereof in dermatology and dermo-cosmetics. Patent nr. WO2018002338A.
- Schaller M., Loewenstein M., Borelli C., Jacob K., Vogeser M., Burgdorf W.H.C.(2005). Induction of a chemoattractive proinflammatory cytokine response after stimulation of keratinocytes with *Propionibacterium acnes* and coproporphyrin III. Br. J. Dermatol. 153, 66-71.
- Sheila M., O'Byrne H., William S. (2013) Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. J. Lipid Res. 54(7): 1731–1743.
- Shu M., Kuo S., Wang Y., Jiang Y., Liu Y.T., Gallo R.L. (2013) Porphyrin metabolisms in human skin commensal *Propionibacterium acnes* bacteria: potential application to monitor human radiation risk. Curr. Med. Chem. 20, 562–568.
- Smith R.N., Braue A., Varigos G.A., Mann N.J. (2008) The effect of a low glycemic load diet on acne vulgaris and the fatty acid composition of skin surface triglycerides. J. Dermatol. Sci. 50, 41-52.
- Stalder J. F., et al. (2014) Fragility of epidermis and its consequence in dermatology. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 28: 1-18.
- Strugar T.L., Kuo A., Seite S., Lin M., Lio P. (2019) Connecting the dots: from skin barrier dysfunction to allergic sensitization, and the role of moisturizers in repairing the skin barrier. J. Drugs. Dermatol. 1;18(6):581.
- Surber Ch., Humbert P., Abels Ch., Maibach H. (2018) The acid mantle: a myth or an essential part of skin health? Curr. Probl. Dermatol. 54:1-10.
- Tanghetti E.A. (2013) The role of inflammation in the pathology of acne. J. Clin. Aesthet. Dermatol. 6(9): 27-35.
- Wang Z., Choi J.E., Wu C.C., Di Nardo A. (2018) Skin commensal bacteria *Staphylococcus epidermidis* promote survival of melanocytes bearing UVB-induced DNA damage, while bacteria *Propionibacterium acnes* inhibit survival of melanocytes by increasing apoptosis. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 34:405-414.
- Wang R., Yan S., Ma X., Zhao J., Han Y., Pan Y., Zhao H. (2013) The pivotal role of Bifida Ferment Lysate on reinforcing the skin barrier function and maintaining homeostasis of skin defenses *in vitro*. Clin Cosmet Investig Dermatol. 6: 191-196.
- Walters R.M., Mao G., Gunn E.T., Hornby S. (2012) Cleansing formulations that respect skin barrier integrity. Dermatol. Res. Pract. 2012:2012:495917.
- Weller R., Price R.J., Ormerod AD. (2001) Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, *Candida* and bacterial skin pathogens. J. Appl. Microbiol. 90(4):648-52.
- Wollenberg M.S., Claesen J., Escapa I.F., Aldridge K.L., Fischbach M.A., Lemon K. P. (2014) *Propionibacterium*-produced coproporphyrin III induces staphylococcus aureus aggregation and biofilm formation. mBio 5, 1–10.
- Yang F., Zhou Z., Guo M., Zhou Z. (2022) The study of skin hydration, anti-wrinkles function improvement of anti-aging cream with alpha-ketoglutarate. J. Cosm. Dermatol. 21(4):1736-1743.
- Zhang Ch., Wu D., Qiu X. (2018) Stimulatory effects of amino acids on  $\gamma$ -polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis*. Scie. Rep. 8: 17934.