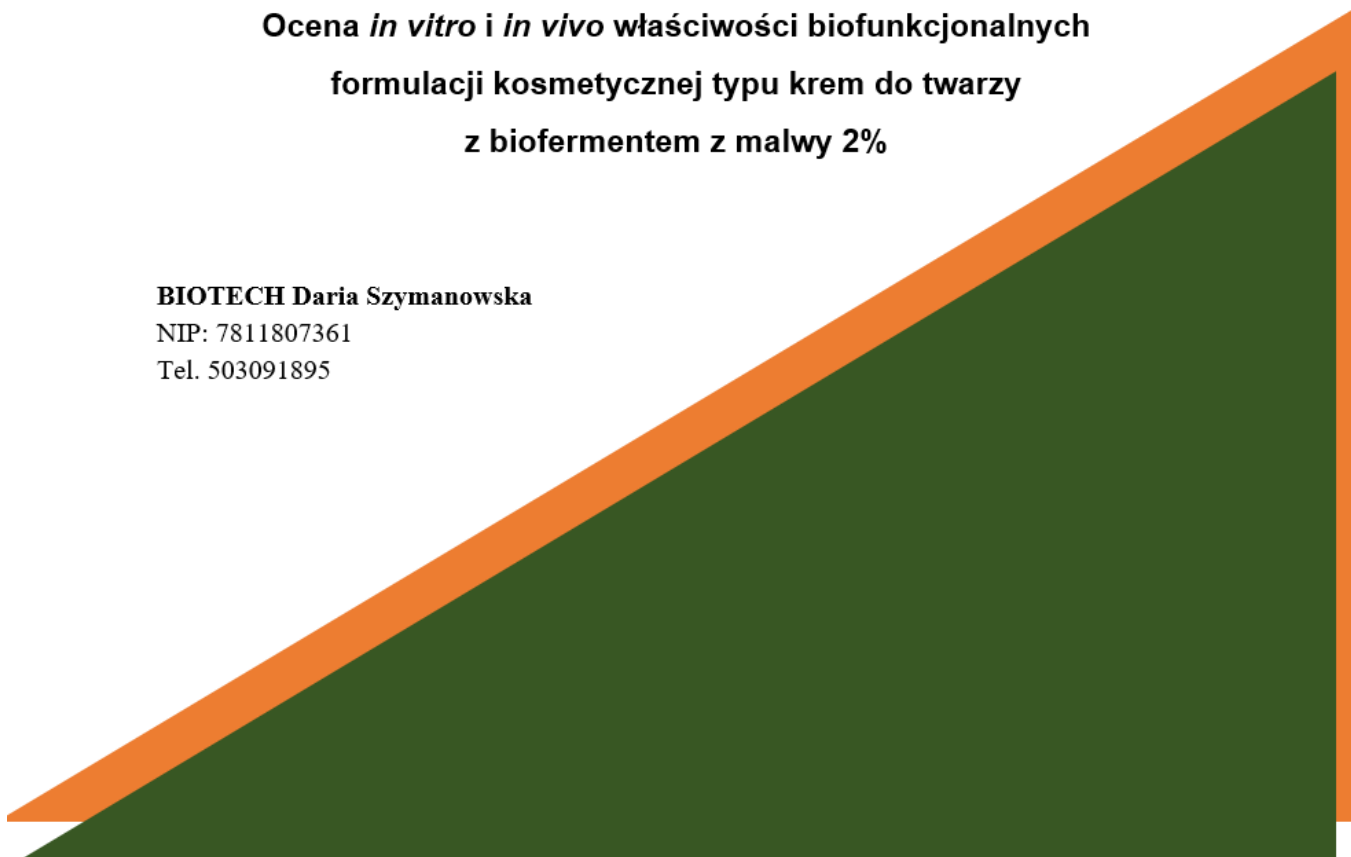


**Ocena *in vitro* i *in vivo* właściwości biofunkcjonalnych
formulacji kosmetycznej typu krem do twarzy
z biofermentem z malwy 2%**

BIOTECH Daria Szymanowska

NIP: 7811807361

Tel. 503091895



1. Przygotowanie formulacji kosmetycznej typu krem do twarzy

Przygotowano formulację typu krem do twarzy zgodnie z następującym składem INCI: Aqua, Urea, Panthenol, Coco caprylate/ Caprate, Caprylic/Capric Triglyceride, Alcea rosea Ferment Filtrate, Cetearyl Glucoside, Sorbitan olivate, Cetearyl Alcohol, Butyrylospermum Parkii Butter, Borago Officinalis Seed Oil, Tocopherol Acetate Sodium Levulinate, Potassium Sorbate.

2. Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej i prebiotycznej metodą studzienkowo-dyfuzyjną

W celu oznaczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej i prebiotycznej opracowanych formulacji kosmetycznych wykorzystano metodę studzienkowo-dyfuzyjną. W pierwszym etapie 100 μ L namnożonej hodowli bakterii lub grzybów przeniesiono na podłoże agarowe Muller-Hinton. Następnie w podłożu wydrążono studzienki, do których naniesiono po 50 μ L badanej próby (formulacji 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.

3. Ocena stabilności produktu kosmetycznego

Próby formulacji kosmetycznych o masie 25 g umieszczono w neutralnych chemicznie, szklanych przezroczystych probówkach i przechowywano 12 tygodni bez dostępu światła. Z każdego wariantu formulacji 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 ujednolicenia warunków badania. Metodą organoleptyczną analizowano barwę, zapach, konsystencję, ewentualną obecność osadu oraz pianotwórczość formulacji.

4. Ocena czystości mikrobiologicznej produktu kosmetycznego

Ocenę czystości mikrobiologicznej nowo opracowanych produktów wykonano z wykorzystaniem klasycznych podłoży mikrobiologicznych i zgodnie z metodologią wykonywania analizy metodą zalewową Kocha. Analizę wykonywano bezpośrednio po przygotowaniu prób oraz po 2, 6 i 12 tygodniach od przygotowania.

5. 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 formuacji wykonano po 4 próby i umieszczono w -10°C , 4°C , 37°C i w temperaturze pokojowej. Parametry poszczególnych prób poddawano ocenie po 4, 8 i 12 tygodniach od rozpoczęcia testu. Każdorazowo, próby przechowywane w temperaturze -10°C , 4°C , 37°C , dzień przed wykonaniem oceny umieszczano w temperaturze pokojowej w celu ujednolicenia 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 prób do szklanych, przezroczystych probówek. Ocenę konsystencji dokonywano organoleptycznie. Uzyskane wyniki porównywano z wynikami prowadzonego równocześnie testu stabilności produktów kosmetycznych.

6. Test konserwacji

W pierwszej kolejności przygotowano kultury szczepów wskaźnikowych. Po rozmrożeniu stoków glicerolowych, zawiesinę przelano do 10 ml podłoża bulion odżywczy wzbogaconego glukozą. Następnie prowadzono 24 – godziną hodowlę w temperaturze 30°C (drożdże) lub 37°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 formuacji kosmetycznych o masie 15 g, znajdujące się w sterylnych probówkach typu Falcon, zakażano przez jednorazowe wprowadzenie 150 μl 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.

7. Ocena organoleptyczna

Formulacje kosmetyczne przeanalizowano pod kątem właściwości organoleptycznych. Parametry, kryteria oraz metody analizy przedstawia tabela poniżej.

Tabela Ocena organoleptyczna formuacji kosmetycznych

Analizowany parametr	Metoda analizy	Kryteria
Kolor płynu	Ocena wizualna	Nie dotyczy
Przezroczystość płynu	Ocena wizualna	Transparentny/Mętny

Zapach	Powąchanie	Charakterystyczny/kwiatowy/aldehydowy/ słodki/cytrusowy/ziółowy/świeży/korzenny/ owocowy/żywiczy/ gnilny/kwaśny/mdławy/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
Wrażenie ściągnięcia lub przesuszenia skóry	Zaaplikowanie na powierzchnię skóry	Obecne/brak

8. Testy dermatologiczne

Testy prowadzono pod nadzorem lekarza dermatologa. Ocena właściwości alergizujących i podrażniających preparatu, przeprowadzono na grupie ochotników. Probandzi 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 okolicę 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.

9. Testy aplikacyjno-użytkowe

Badania potwierdzające lub wykluczające deklarowane właściwości i działania kosmetyku prowadzono w warunkach domowych przy udziale probantów – ochotników. Do badań aplikacyjno-użytkowych została wytypowana grupa 20 osób. Dobór probantów odbywał się wg wstępnej oceny stanu skóry oraz zdrowia.

Sposób prowadzenia badań w warunkach domowych (panel domowy).

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

Grupa (Gb) - krem z biofermentem z malwy 2 %

Grupa (Gf) - krem z biofermentem z malwy 1 %

Grupa (Gk) - krem bez składnika biofunkcjonalnego

Ochotnicy zostali zobowiązani do stosowania otrzymanych produktów według dedykowanej instrukcji:

Niewielką ilość kremu do twarzy (jedna doza pompki) nanieść na dłonie, rozmasować, ocierając dłonie o siebie i całą powierzchnią dłoni wmasować produkt w skórę twarzy.

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 szczególnie odnotowywać uwagi dotyczące właściwości 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 właściwości użytkowych badanych produktów uzyskane od probantów opracowano w sprawozdaniu z badań ankietowych (badania aplikacyjno-użytkowe). Czas trwania badań wynosił 4 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 po zakończeniu badań z wykorzystaniem produktu 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.

10. Badania aparaturowe

Badania aparaturowe przy udziale probantów pod nadzorem technologa przy udziale probantów – ochotników. Dobór probantów został opisany w pkt. Badania aplikacyjno-użytkowe.

• 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

- **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.

- **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.

- **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 rysunku poniżej.

Rysunek. Pomiar pH skóry probanta



- **Głębokość zmarszczek**

Badanie wykonane zostało przy użyciu aparatu pomiarowego NATI V3 firmy Skin Diagnosis by Beauty of Science. Mikrofotografie skóry zostały wykonane w rozdzielczości 1280 x 1024. Średnia wartość szerokości zmarszczek uzyskana jest z pomiarów przeprowadzonych u wszystkich ochotników. Ostateczny wynik obejmuje procent zmiany wartości szerokości zmarszczek w stosunku do wartości wyjściowej.

Wyniki badań

I OCENA WŁAŚCIWOŚCI TECHNOLOGICZNYCH FORMULACJI TYPU KREM DO TWARZY Z DODATKEIM BIOFERMENTU

Charakterystyka fizyko-chemiczna formulacji kosmetycznej

Charakterystyka opracowanej formulacji kosmetycznej to etap obligatoryjny i pozwala na wstępną ocenę jakości opracowanych produktów. Stanowi również element potwierdzający stabilność fizyko-chemiczną formuły pozwalający na określenie minimalnej daty przydatności do użycia. Charakterystykę właściwości fizyko-chemicznych zaprezentowano w tabeli poniżej.

Tabela. Właściwości fizyczne i chemiczne oraz stabilność kremu do twarzy z dodatkiem biofermentu

Wariant formulacji	Krem biofermentem z malwy
Postać / wygląd	Jednorodna emulsja / krem
Barwa	Kremowa biało - beżowa
Zapach	Charakterystyczny (słabo wyczuwalny)
Wartość pH	5,11 Przyjęty zakres 4,5-5,5
Lepkość mPa*s	2826,0 47,1%; SP:L4; RPM:100; T:22,9°C
Gęstość g/cm ³	0,966

Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady WE 1223/2009 dotyczącym produktów kosmetycznych, konieczna jest weryfikacja formulacji 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 tabela poniżej.

Tabela. Zanieczyszczenia, śladowe ilości substancji niedozwolonych w formulacji krem do twarzy z biofermentem z malwy.

Oznaczany wskaznik	Norma badawcza	Jednostka	Badania formulacja	
			Kb	Kk
Nikiel	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	0,017	0,076
Rtęć	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,010	<0,010
Ołów	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,050	<0,050
Kadm	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,010	<0,010
Arsen	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,050	<0,050

**Legenda: Kb - krem z dodatkiem biofermentu z malwy
Kk - krem bez dodatku biofermentu**

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

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. 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 tabeli poniżej

Tabela. Test konserwacji dla formułacji typu krem do twarzy

Badany parametr	Kryterium akceptacji	Wynik w czasie T0, T1,T2,T3	
		Kb	Kk
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	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
<i>Escherichia coli</i>	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

Przeprowadzony test konserwacji wykazał, że zastosowana substancja konserwująca zapewnia bezpieczeństwo mikrobiologiczne i zabezpiecza formułację kosmetyczną przed wzrostem drobnoustrojów niepożądanych. Warto wskazać, że zastosowanie składnika w postaci biofermentu, w którego skład wchodzi szereg związków chemicznych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (kwas 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. Dlatego kluczowa jest weryfikacja skuteczności dezaktywacji biomasy drobnoustrojów w surowcu.

Jakość mikrobiologiczna

Ważnym parametrem warunkującym bezpieczeństwo formułacji kosmetycznej jest jej 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 gotowej 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 tabeli poniżej.

Tabela. 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	Kk
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych	PN-EN ISO 21149:2017-07	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych psychrofilnych	PN-EN ISO 21149:2017-07	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drożdży i pleśni mezofilnych	PN-EN ISO 16212:2017-08	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drożdży i pleśni psychrofilnych	PN-EN ISO 16212:2017-08	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$

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

Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że opracowana formuacja kosmetyczna charakteryzuje 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. Nie zaobserwowano wzrostu drobnoustrojów, ani potencjalnie patogennych, jak i mezofilnych i psychrofilnych.

Ocena stabilności produktu kosmetycznego

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 formuacji 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 formuacji po 2, 4, 8 i 12 tygodniach od rozpoczęcia testu. Wyniki oceny przedstawia tabela poniżej.

Tabela. Ocena stabilności formulacji typu krem do twarzy z biofermentem z malwy

Wariant formulacji	Temperatura przechowywania	Punkt czasowy	Barwa	Zapach	Konsystencja
Kb	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
Kk	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

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

Testy starzeniowe kompatybilności matrycy kosmetycznej z opakowaniem

Równolegle przeprowadzono testy starzeniowe i poddano ocenie zarówno opakowanie, jak i masę. Próbkę kosmetyku typu krem 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 8 tygodni.

Tabela. Testy starzeniowe kompatybilności kremu do twarzy z biofermentem z malwy 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

II OCENA FUNKCJONALNOŚCI FORMULACJI KOSMETYCZNYCH

Potencjał antyoksydacyjny

Właściwości antyoksydacyjne surowców kosmetycznych oraz gotowych formułacji kosmetycznych to jeden z kluczowych, funkcjonalnych filarów dzisiejszej kosmetologii. 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 niedopuszczaniu 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 opracowanej formułacji kosmetycznej, wykonano analizę tego potencjału, a wyniki przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela. Aktywność antyoksydacyjna i przeciwrodnikowa formułacji kosmetycznych zawierających bioferment z malwy

Typ formułacji	DPPH mmol Tx/g s.m	ABTS mmol Tx/g s.m	Aktywność chelatuująca 1500 ppm (%)
Kb	3,8-3,9	4,7-5,9	12,9-14,3
Kk	2,1-2,5	2,8-3,2	8,5-9,0

Przeprowadzone analizy wskazują, że krem do twarzy z biofermentem z malwy charakteryzuje się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym w porównaniu do formułacji nie zawierających składnika bioaktywnego.

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 formułacji kosmetycznej z dodatkiem biofermentu z malwy badano jej wpływ na szczepy bakterii patogennych jak i szczepy drobnoustrojów potencjalnie probiotycznych. W badaniach wykorzystano metodę studzienkowo-dyfuzyjną i formułacje niezawierające substancji konserwujących. Dodatek konserwantu jest wymagany w większości formułacji, jednak w tym badaniu jego obecność

spowodowałyby zahamowanie wzrostu drobnoustrojów wobec których analizowano aktywność przeciwdrobnoustrojową. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa formulacji kosmetycznej typu krem do twarzy z biofermentem z malwy

Typ formulacji	Szczep wzorcowy							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Strefa zahamowania wzrostu drobnoustrojów (mm)							
Kb	7,0±2,0	7,0±2,0	9,0±2,0	10,0±3,0	11,0±2,0	11,0±2,0	9,0±2,0	3,0±2+1,0
Kk	1,0±0,0	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW

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 z malwy otrzymanego na drodze biotechnologicznej wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec wytypowanych do testów gatunków patogennych. Największy potencjał przeciwdrobnoustrojowy wykazano dla biofermentu natywnego wobec gatunków *Cutibacterium acnes* (11,0±2,0 mm) i *Staphylococcus aureus* (11,0±2,0 mm), co przełożyło się na aktywność przeciwdrobnoustrojową formulacji typu krem. Nie wykazano znaczącej aktywności przeciwdrobnoustrojowej w przypadku formulacji kontrolnej, niezawierającej składnika funkcjonalnego w postaci biofermentu. Należy wskazać, że gatunek *Cutibacterium acnes* może przyczyniać się do powstawania stanów zapalnych na skórze twarzy, dlatego biofunkcjonalność formulacji w aspekcie działania przeciwdrobnoustrojowego wobec tego gatunku jest bardzo pożądana, zwłaszcza w przypadku skóry problematycznej.

Tabela. Aktywność prebiotyczna formułacji kosmetycznej typu krem do twarzy z biofermentem z malwy

Typ formułacji	Szczep wzorcowy							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Strefa stymulacji wzrostu drobnoustrojów (mm)							
Kb	4,0±1,0	5,0±1,0	3,0±1,0	4,0±1,0	2,0±1,0	7,0±1,0	NW	NW
Kk	NW	NW	NW	NW	NW	NW	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 formułacja kosmetyczna typu krem z dodatkiem biofermentu z malwy charakteryzuje się umiarkowaną aktywnością stymulującą wzrost bakterii o potencjale probiotycznym. Maksymalna strefa zwiększonego stężenia biomasy wokół studzienki była równa 7,0 mm, wobec *Lactobacillus reuteri*.

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.

Ocena miejscowej tolerancji skórnej produktu kosmetycznego krem 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 polegał na wykonaniu testów płatkowych (okluzyjnych). Badanie oceniało stopień drażnienia i właściwości uczulające produktów a jego przebieg polegał na nanoszeniu na krawężki bibułowe produktu kosmetycznego, które następnie umocowano plastrem hipoalergicznym na skórze pleców, w okolicy międzyłopatkowej. 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 tabeli poniżej.

Tabela. Wyniki testów płatkowych (okluzyjnych) – krem do twarzy z dodatkiem biofermentu z malwy

LP	Inicjały probanta	Płeć	Wywiad alergiczny	Wynik podrażnienie	Wynik uczulenie
1	Z.S	M	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
2	E.K	K		Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
3	K.M	K	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
4	M.M	K		Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
5	A.K	K		Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
6	P.P	M	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
7	N.N	K		Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
8	S.T	K		Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
9	J.R	K	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
10	J.N	K	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
11	G.W	K	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
12	E.L	K	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
13	W.P	K	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
14	P.R	K	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
15	P.I	K	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
16	D.M	K	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
17	K.L	M	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
18	S.W	M	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
19	S.N	M	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
20	F.K	K	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)

Legenda: Krem do twarzy: z biofermentem (Kb), bez składnika aktywnego - próbka kontrolna (Kk). 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.

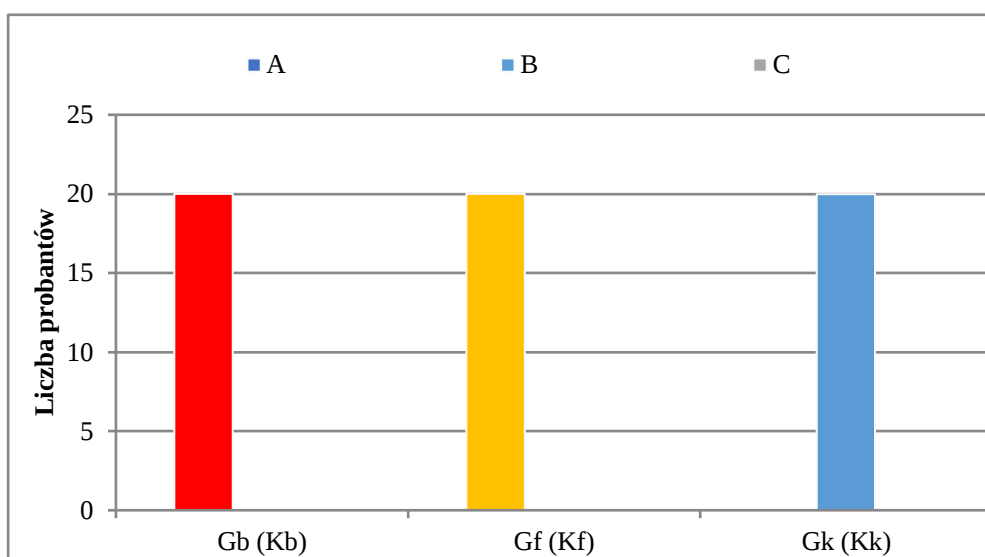
Na podstawie wyników przeprowadzonych badań nie stwierdzono własności uczulających i drażniących badanego produktu. Produkt z dodatkiem biofermentu spełnia kryteria bezpieczeństwa dermatologicznego i został zakwalifikowany do dalszego etapu badań tj. testów aplikacyjnych. Wynik i opinia nie dotyczy osób, u których występuje alergia na którykolwiek ze składników badanego kosmetyku.

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, tj. wspierają łagodzenie podrażnień, poprawę nawilżenia, zmniejszenie uczucia ściągania oraz suchości cery i utrzymanie dobrej kondycji naskórka podczas leczenia.

Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku poniżej.

Rysunek. Ocena sensoryczno-jakościowa kremu do twarzy z biofermentem z malwy



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)

Gb – krem do twarzy z biofermentem z malwy 2%

Gf - krem do twarzy z biofermentem z malwy 1%

Gk - krem do twarzy bez składnika biofunkcjonalnego

Dane przedstawione na rysunku 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, korzystnie wpływa na walory sensoryczne dotyczące konsystencji podczas stosowania kremu

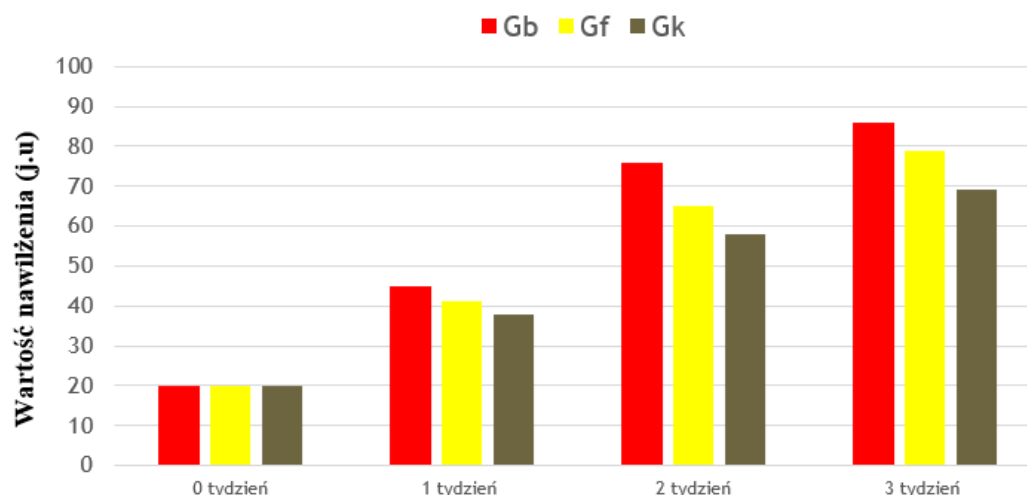
Badanie parametrów biofizycznych skóry

• Nawilżenie skóry

Pierwszym badanym parametrem był poziom nawilżenia 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. Bardzo ważny jest też komponent kwasów organicznych obecnych w biofermentcie, tj. kwas mlekowy, który przy udziale humektantów takich jak mocznik, wspiera modyfikację 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. Kinetyka zmian wartości nawilżenia skóry probantów zmierzona przed i po badaniu



Legenda: Gb - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 2%
 Gf - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 1%
 Gk – grupa kontrolna
 (n=20) każda, * – $p<0,05$.

Na podstawie uzyskanych danych, przedstawionych na rysunku 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 20-86 [j.u.]. W tabeli poniżej 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. Interpretacja wyników pomiaru nawilżenia naskórka

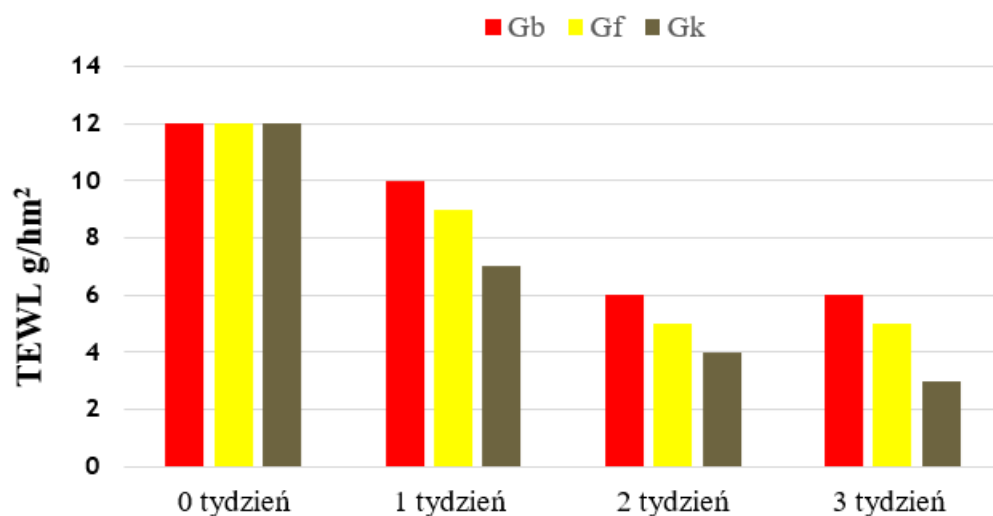
Stopień nawilżenia naskórka	Wynik pomiaru [j.u.]
Skóra bardzo sucha	<30
Skóra sucha	30-45
Skóra dostatecznie nawilżona	>45

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*) - przeznaskórkowa 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 rysunku poniżej. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi <0,05.

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



Legenda: Gb - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 2%
 Gf - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 1%
 Gk – grupa kontrolna
 (n=20) każda, * – p<0,05.

Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku powyżej można zaobserwować, że u wszystkich probantów nastąpiła poprawa parametru TEWL. Zmiany parametru transepidermalnej utraty wody wahały się średnio w zakresie 12-4 [g/hm²]. 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.

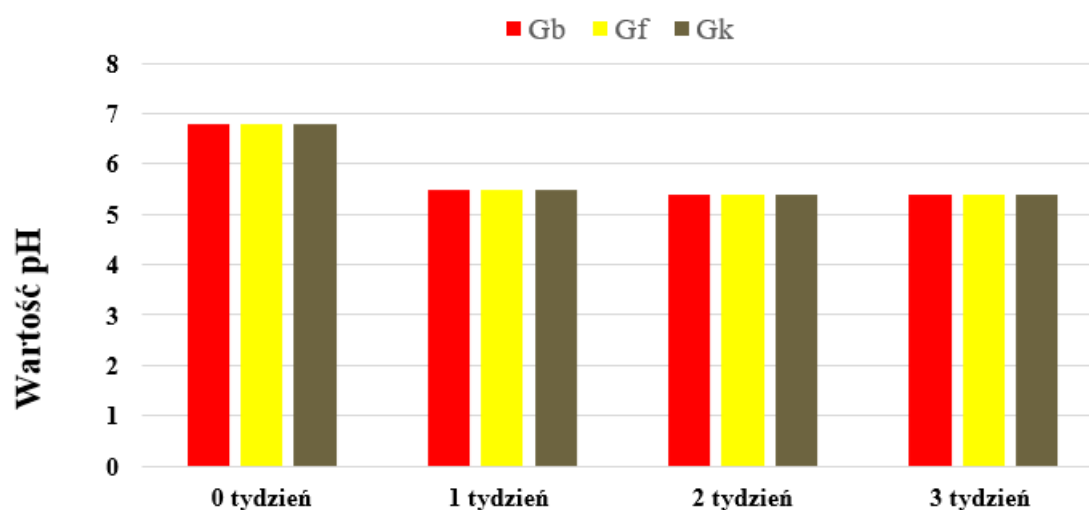
Tabela. Interpretacja wyników TEWL (ang. Transepidermal Water Loss)

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

• 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). Stosowanie „kwaśnej” pielęgnacji wydaje się szczególnie istotne w przypadku cery wrażliwej, 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).

Rysunku. Kinetyka zmian wartości odczynu pH naskórka u probantów



Legenda: Gb - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 2%

Gf - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 1%

Gk – grupa kontrolna

(n=20) każda, * – p<0,05.

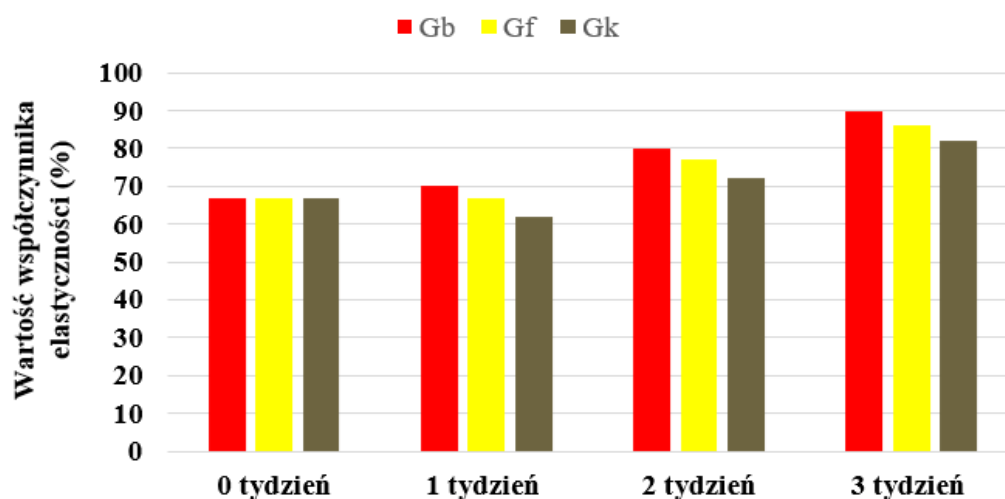
• Elastyczność skóry

Elastyczność skóry jest to biomechaniczną cechą 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. Niskie pH wpływa na konformację i aktywność białek keratynocytów, takich jak filagryna czy lorecyrina, co wpływa na właściwości fizyczne

tych białek, 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). 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. Utrata wilgotności naskórka prowadzi do jego większej sztywności i utraty elastyczności.

Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku poniżej 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. Kinetyka zmian współczynnika elastyczności skóry



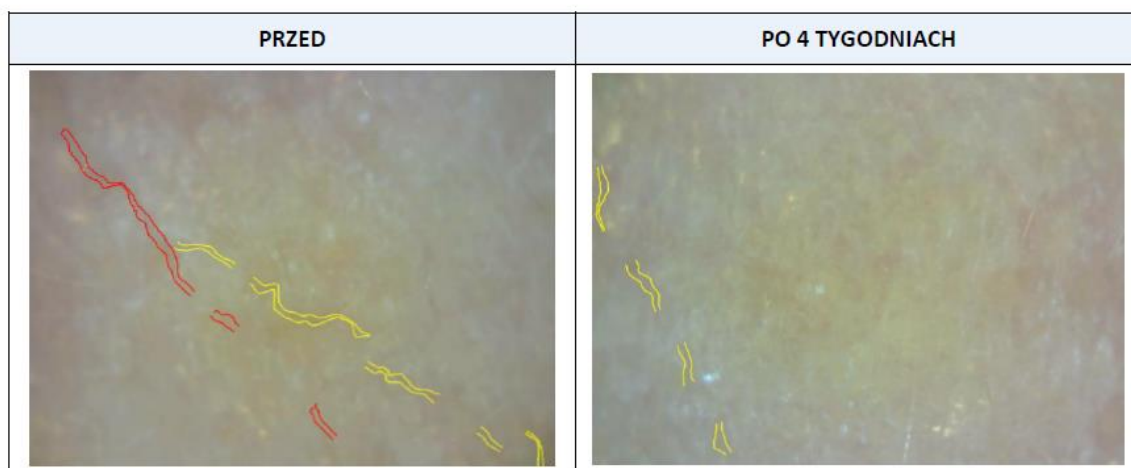
Legenda: Gb - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 2%
 Gf - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 1%
 Gk – grupa kontrolna
 (n=20) każda, * – $p<0,05$.

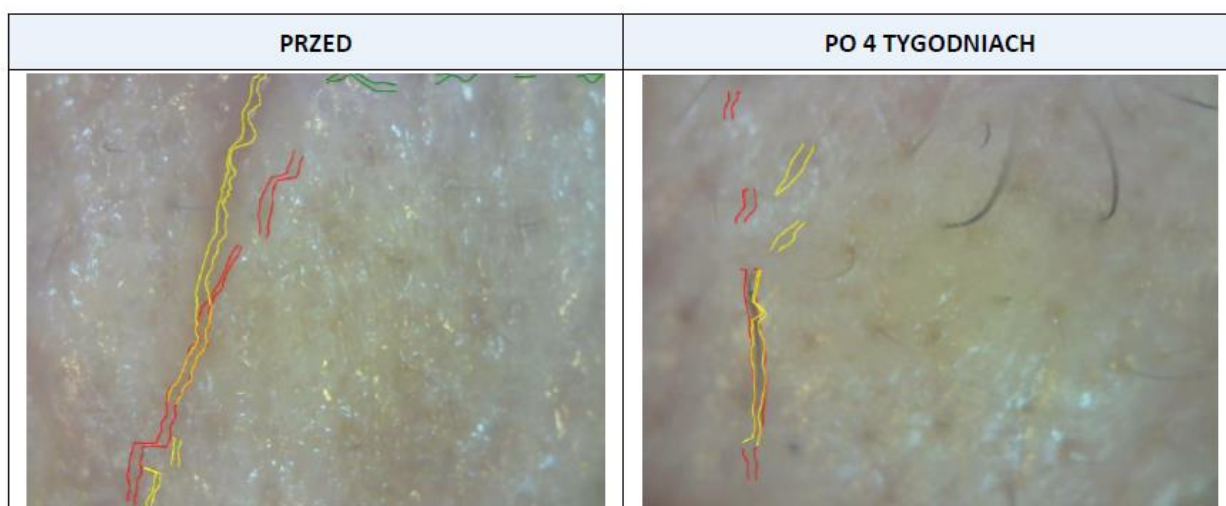
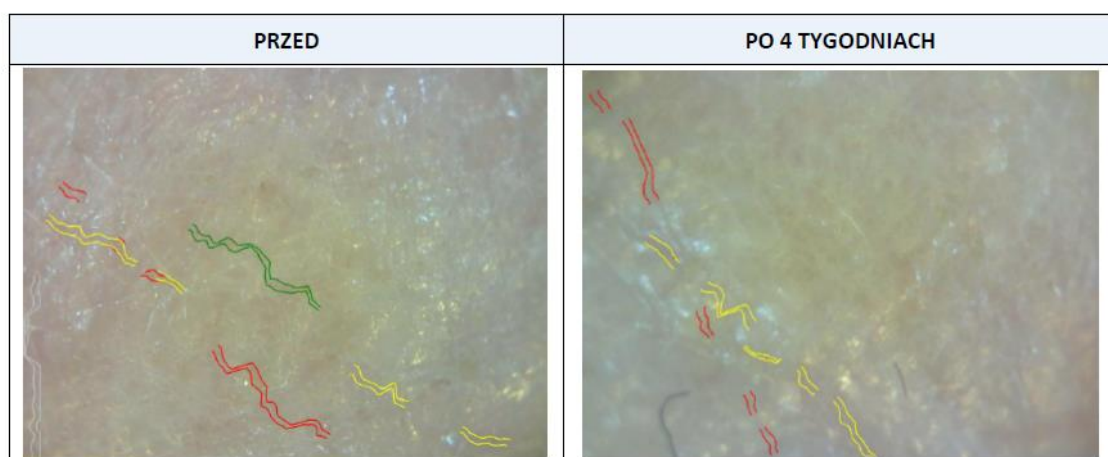
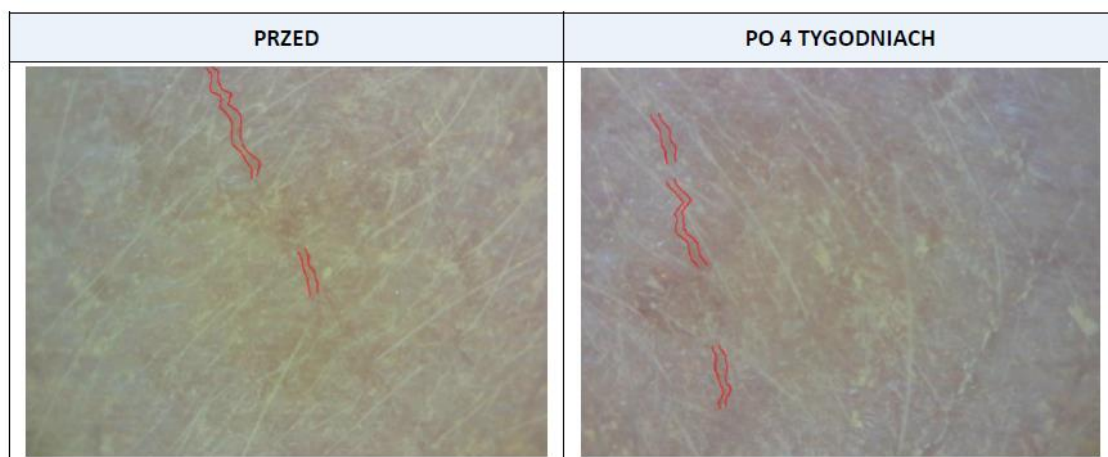
Pomiar parametru – Szerokość zmarszczek

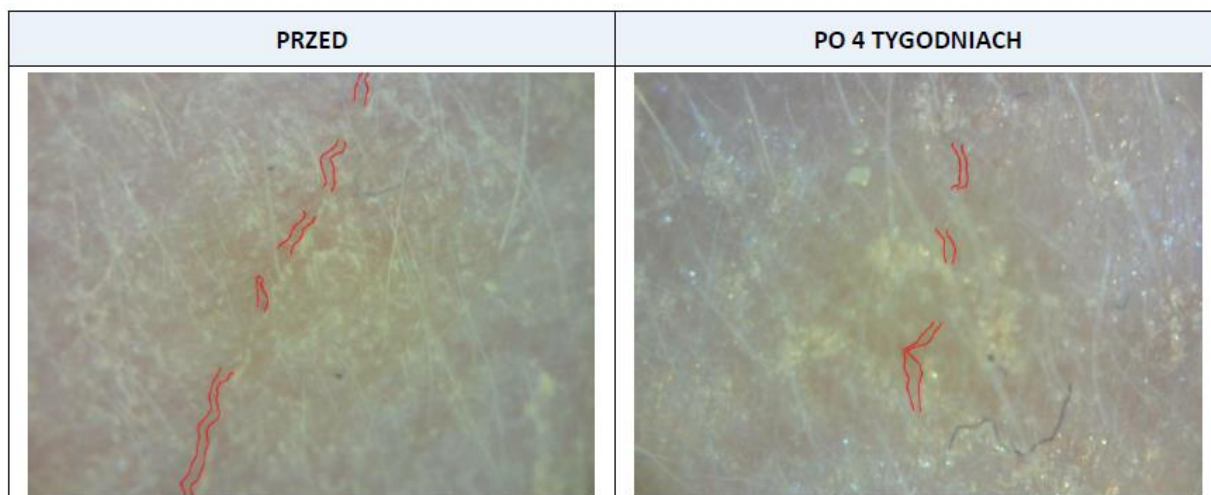
Jedną z metod badania aparaturowego skóry jest profilometria, jest to metoda pozwalająca na zbadanie gładkości skóry i głębokości zmarszczek. W ramach przeprowadzonych badań z udziałem probantów stosujących krem do twarzy z dodatkiem biofermnetu z malwy w stężeniu 2 % wykonano profilometrię bezpośrednią, czyli badanie mikrotopograficzne skóry, które polega na przyłożeniu głowicy urządzenia, wyposażonej w kamerę, do naskórka i obrazowaniu na monitorze. Następnie komputer dokonuje analizy gładkości na podstawie szeregu czynników. Metody te są stosowane, np. do oceny stopnia wpływu czynników zewnętrznych na powierzchnię skóry.

Uzyskane wyniki przedstawiono poniżej.

CZAS POMIARU	ŚREDNIA WARTOŚĆ PARAMETRU szerokość zmarszczek [mm]	OTRZYMANY WYNIK
PRZED	0,0936	-12,61%
PO 4 TYGODNIACH	0,0818	







Badanie wykonane zostało przy użyciu aparatu pomiarowego NATI V3 firmy Skin Diagnosis by Beauty of Science. Mikrofotografie skóry zostały wykonane w rozdzielczości 1280 x 1024. Średnia wartość szerokości zmarszczek uzyskana jest z pomiarów przeprowadzonych u wszystkich ochotników. Ostateczny wynik obejmuje procent zmiany wartości szerokości zmarszczek w stosunku do wartości wyjściowej. Przedstawiono mikrofotografie skóry wybranych ochotników. Spadek wartości szerokości zmarszczek jest wynikiem pozytywnym.

SKALA



Przeprowadzone badanie aparaturowe dla produktu „Krem do twarzy z dodatkiem 2% biofermentu z malwy” wykazuje poprawę parametrów skóry ocenianych przy pomocy specjalistycznych urządzeń pomiarowych w zakresie: analizy zmarszczek: spadek wartości o 12,61%.

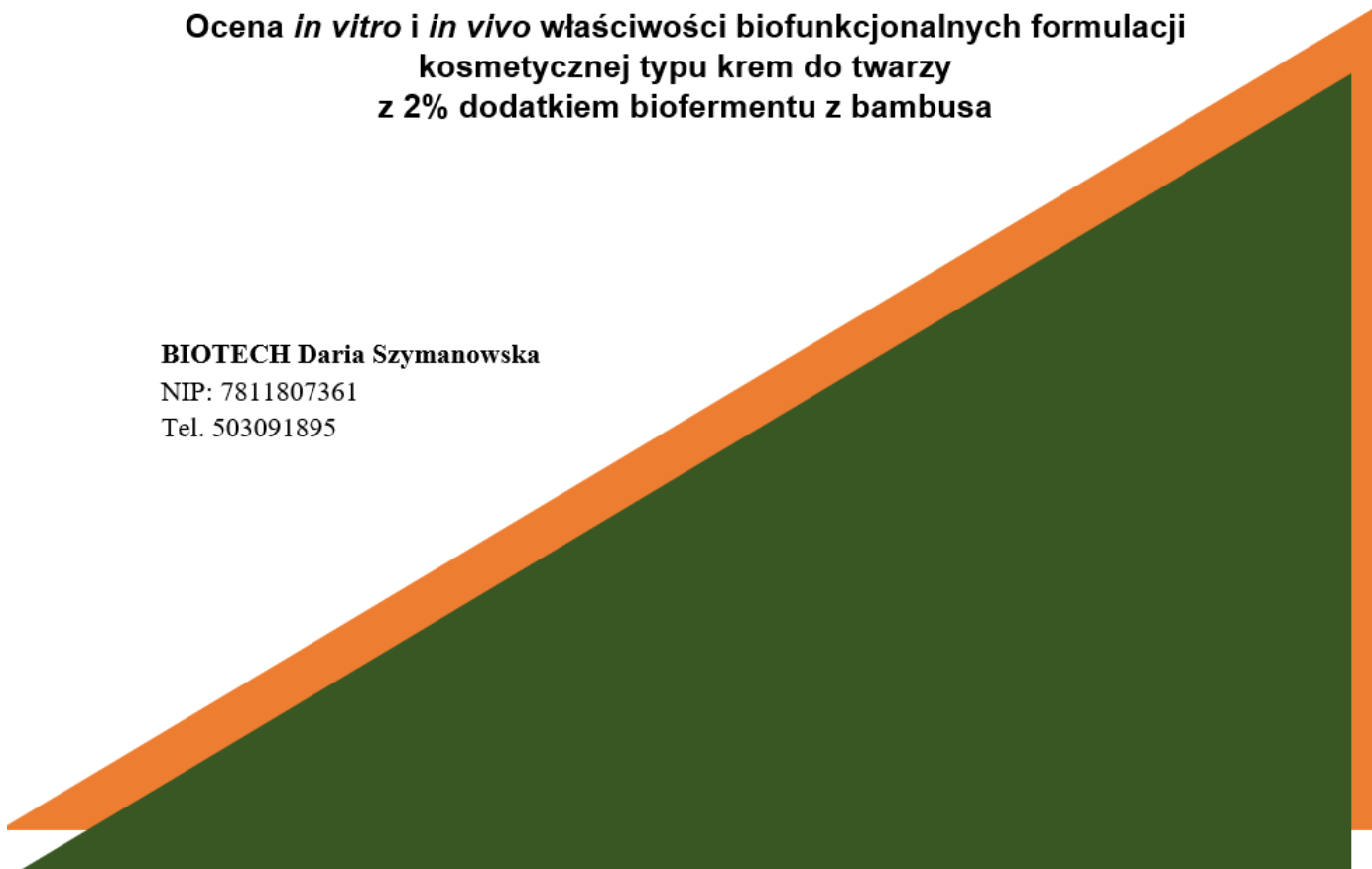
Reasumując, przeprowadzone testy *in vitro* i *in vivo* wskazują na wysoki, potwierdzony badaniami eksperymentalnymi potencjał biofunkcjonalny formułacji typu krem do twarzy z biofermentem z malwy.

**Ocena *in vitro* i *in vivo* właściwości biofunkcjonalnych formułacji
kosmetycznej typu krem do twarzy
z 2% dodatkiem biofermentu z bambusa**

BIOTECH Daria Szymanowska

NIP: 7811807361

Tel. 503091895



1. Przygotowanie formułacji kosmetycznej typu krem do twarzy

Przygotowano formułację typu krem do twarzy zgodnie z następującym składem INCI: Aqua, Urea, Panthenol, Coco caprylate/ Caprate, Caprylic/Capric Triglyceride, Bambusa vulgaris Ferment Filtrate, Cetearyl Glucoside, Sorbitan olivate, Cetearyl Alcohol, Butyrylospermum Parkii Butter, Borago Officinalis Seed Oil, Tocopherol Acetate Sodium Levulinate, Potassium Sorbate.

2. 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 μ L namnożonej hodowli bakterii lub grzybów przeniesiono na podłoże agarowe Muller-Hinton. Następnie w podłożu wydrążono studzienki, do których naniesiono po 50 μ L 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.

3. Ocena stabilności produktu kosmetycznego

Próby formułacji kosmetycznych o masie 25 g umieszczono w neutralnych chemicznie, szklanych przezroczystych próbkach 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 ujednolicenia warunków badania. Metodą organoleptyczną analizowano barwę, zapach, konsystencję, ewentualną obecność osadu oraz pianotwórczość formułacji.

4. Ocena czystości mikrobiologicznej produktu kosmetycznego

Ocenę czystości mikrobiologicznej nowo opracowanych produktów wykonano z wykorzystaniem klasycznych podłoży mikrobiologicznych i zgodnie z metodologią wykonywania analizy metodą zalewową Kocha. Analizę wykonywano bezpośrednio po przygotowaniu prób oraz po 2, 6 i 12 tygodniach od przygotowania.

5. 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°C, 4°C, 37°C i w temperaturze pokojowej. Parametry poszczególnych prób poddawano ocenie po 4, 8 i 12 tygodniach od rozpoczęcia testu. Każdorazowo, próby przechowywane w temperaturze -10°C, 4°C, 37°C, dzień przed wykonaniem oceny umieszczano w temperaturze pokojowej w celu ujednolicenia 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 prób do szklanych, przezroczystych probówek. Ocenę konsystencji dokonywano organoleptycznie. Uzyskane wyniki porównywano z wynikami prowadzonego równocześnie testu stabilności produktów kosmetycznych.

6. Test konserwacji

W pierwszej kolejności przygotowano kultury szczepów wskaźnikowych. Po rozmrożeniu stoków glicerolowych, zawiesinę przelano do 10 ml podłoża bulion odżywczy wzbogaconego glukozą. Następnie prowadzono 24 – godziną hodowlę w temperaturze 30°C (drożdże) lub 37°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 µl 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.

7. Ocena organoleptyczna

Formułacje kosmetyczne przeanalizowano pod kątem właściwości organoleptycznych. Parametry, kryteria oraz metody analizy przedstawia tabela poniżej.

Tabela Ocena organoleptyczna formułacji kosmetycznych

Analizowany parametr	Metoda analizy	Kryteria
Kolor płynu	Ocena wizualna	Nie dotyczy

Przezroczystość płynu	Ocena wizualna	Transparentny/Mętny
Zapach	Powąchanie	Charakterystyczny/kwiatowy/aldehydowy/ słodki/cytrusowy/ziołowy/świeży/korzenny/ owocowy/żywiczy/ gnilny/kwaśny/mdławy/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
Wrażenie ściągnięcia lub przesuszenia skóry	Zaaplikowanie na powierzchnię skóry	Obecne/brak

8. Testy dermatologiczne

Testy prowadzono pod nadzorem lekarza dermatologa. Ocena właściwości alergizujących i podrażniających preparatu, przeprowadzono na grupie ochotników. Probandzi 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 okolicę 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.

9. Testy aplikacyjno-użytkowe

Badania potwierdzające lub wykluczające deklarowane właściwości i działania kosmetyku prowadzono w warunkach domowych przy udziale probantów – ochotników. Do

badan aplikacyjno-użytkowych została wytypowana grupa 20 osób. Dobór probantów odbywał się wg wstępnej oceny stanu skóry oraz zdrowia.

Sposób prowadzenia badań w warunkach domowych (panel domowy).

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

Grupa (Gb) - krem z biofermentem z Bambusa 2 %

Grupa (Gf) - krem z biofermentem z Bambusa 1 %

Grupa (Gk) - krem bez składnika biofunkcjonalnego

Ochotnicy zostali zobowiązani do stosowania otrzymanych produktów według dedykowanej instrukcji:

Niewielką ilość kremu do twarzy (jedna doza pompki) nanieść na dłonie, rozmasować, ocierając dłonie o siebie i całą powierzchnią dłoni wmasować produkt w skórę twarzy.

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 użytkowych 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 4 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 po zakończeniu badań z wykorzystaniem produktu 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.

10. Badania aparaturowe

Badania aparaturowe przy udziale probantów pod nadzorem technologa przy udziale probantów – ochotników. Dobór probantów został opisany w pkt. Badania aplikacyjno-użytkowe.

• 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. Pomiaru 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

- **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.

- **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.

- **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 rysunku poniżej.

Rysunek. Pomiar pH skóry probanta



- **Struktura skóry 3 D**

Badanie wykonano zgodnie z procedurą badawczą SKINLAB P.S.A. (PO-08 Realizacja badań) pod nadzorem lekarza specjalisty. Badanie prowadzono w warunkach domowych. Zakwalifikowani do badania uczestnicy otrzymali do testowania badany produkt oraz zostali poinformowani o warunkach prowadzenia badania, o obszarze oraz częstotliwości stosowania produktu. Pomiary parametrów skóry prowadzono w Laboratorium SKINLAB P.S.A. w Krakowie zgodnie z ustalonym wcześniej planem. Pomiary prowadzone są z użyciem aparatów pomiarowych DermaLab Combo firmy CORTEX, Technology/ASW 300 firmy, ARAM HUMAN Vision System / NATI V3 firmy SKIN DIAGNOSIS BY BEAUTY OF SCIENCE, w zależności od wybranych parametrów.

Wyniki badań

I OCENA WŁAŚCIWOŚCI TECHNOLOGICZNYCH FORMULACJI TYPU KREM DO TWARZY Z DODATKEIM BIOFERMENTU

Charakterystyka fizyko-chemiczna formulacji kosmetycznej

Charakterystyka opracowanej formulacji kosmetycznej to etap obligatoryjny, który pozwala na wstępną ocenę jakości opracowanych produktów. Stanowi również element potwierdzający stabilność fizykochemiczną formuły pozwalający na określenie minimalnej daty przydatności do użycia. Charakterystykę właściwości fizyko-chemicznych zaprezentowano w tabeli poniżej.

Tabela. Właściwości fizyczne i chemiczne oraz stabilność kremu do twarzy z dodatkiem biofermentu

Wariant formulacji	Krem biofermentem z bambusa
Postać / wygląd	Jednorodna emulsja / krem
Barwa	Kremowa biało - beżowa
Zapach	Charakterystyczny (słabo wyczuwalny)
Wartość pH	5,25 Przyjęty zakres 4,5-5,5
Lepkość mPa*s	2826,0 47,1%; SP:L4; RPM:100; T:22,9°C
Gęstość g/cm ³	0,969

Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady WE 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych, konieczna jest weryfikacja formulacji 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 tabela poniżej.

Tabela. Zanieczyszczenia, śladowe ilości substancji niedozwolonych w formulacji krem do twarzy z biofermentem z bambusa.

Oznaczany wskaźnik	Norma badawcza	Jednostka	Badania formulacja	
			Kb	Kk
Nikiel	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	0,017	0,076
Rtęć	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,010	<0,010
Ołów	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,050	<0,050
Kadm	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,010	<0,010
Arsen	PN-EN ISO 17294-2:2016-11	mg/kg	<0,050	<0,050

**Legenda: Kb – krem z dodatkiem biofermentu z bambusa
Kk -krem bez dodatku biofermentu**

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

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. 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 tabeli poniżej

Tabela. Test konserwacji dla formułacji typu krem do twarzy

Badany parametr	Kryterium akceptacji	Wynik w czasie T0, T1,T2,T3	
		Kb	Kk
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	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
<i>Escherichia coli</i>	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

Przeprowadzony test konserwacji wykazał, że zastosowana substancja konserwująca zapewnia bezpieczeństwo mikrobiologiczne i zabezpiecza formułację kosmetyczną przed wzrostem drobnoustrojów niepożądanych. Warto wskazać, że zastosowanie składnika w postaci biofermentu, 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. Dlatego kluczowa jest weryfikacja skuteczności dezaktywacji biomasy drobnoustrojów w surowcu.

Jakość mikrobiologiczna

Ważnym 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 gotowej formuacji 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 tabeli poniżej.

Tabela. Wyniki badań mikrobiologicznych formuacji 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	Kk
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych	PN-EN ISO 21149:2017-07	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych psychrofilnych	PN-EN ISO 21149:2017-07	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Ogólna liczba drożdży i pleśni mezofilnych	PN-EN ISO 16212:2017-08	$\leq 10^3$	jtk/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$

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

Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że opracowana formuła kosmetyczna charakteryzuje 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. Nie zaobserwowano wzrostu drobnoustrojów, ani potencjalnie patogennych, jak i mezofilnych i psychrofilnych.

Ocena stabilności produktu kosmetycznego

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 od zmian środowiskowych oraz od długości przeznaczenia do użytku produktu. Podczas badań stabilności można zastosować różne zakresy temperatur oraz czasy testowania.

Próby formuły 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 formuły po 2, 4, 8 i 12 tygodniach od rozpoczęcia testu. Wyniki oceny przedstawia tabela poniżej.

Tabela. Ocena stabilności formulacji typu krem do twarzy z biofermentem z bambusa

Wariant formulacji	Temperatura przechowywania	Punkt czasowy	Barwa	Zapach	Konsystencja
Kb	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
Kk	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
--	--	-----	-----------	---------------------	--------------------

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

Testy starzeniowe kompatybilności matrycy kosmetycznej z opakowaniem

Równolegle przeprowadzono testy starzeniowe i poddano ocenie zarówno opakowanie jak i masę. Próbkę kosmetyku typu krem 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 8 tygodni.

Tabela. Testy starzeniowe kompatybilności kremu do twarzy z biofermentem z bambusa 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

II OCENA FUNKCJONALNOŚCI FORMULACJI KOSMETYCZNYCH

Potencjał antyoksydacyjny

Właściwości antyoksydacyjne surowców kosmetycznych oraz gotowych formułacji kosmetycznych to jeden z kluczowych, funkcjonalnych filarów dzisiejszej kosmetologii. 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 niedopuszczaniu 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 opracowanej formułacji kosmetycznej, wykonano analizę tego potencjału, a wyniki przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela. Aktywność antyoksydacyjna i przeciwrodnikowa formułacji kosmetycznych zawierających bioferment z bambusa

Typ formułacji	DPPH mmol Tx/g s.m	ABTS mmol Tx/g s.m	Aktywność chelatuująca 1500 ppm (%)
Kb	3,8-4,0	4,7-5,0	12,0-13,0
Kk	2,1-2,5	2,8-3,2	8,5-9,0

Przeprowadzone analizy wskazują, że krem do twarzy z biofermentem z bambusa charakteryzuje się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym w porównaniu do formułacji nie zawierających składnika bioaktywnego.

Potencjał przeciwdrobnoustrojowy i prebiotyczny

Ważną cechą, świadczącą o funkcjonalności formułacji kosmetycznej jest również aktywność przeciwko patogenom, zwłaszcza tym 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 formułacji kosmetycznej z dodatkiem biofermentu z bambusa badano wpływ na szczepy bakterii patogennych, jak i szczepy drobnoustrojów potencjalnie probiotycznych. W badaniach wykorzystano metodę studzienkowo-dyfuzyjną i formułacje niezawierające substancji konserwującej. Dodatek konserwantu jest wymagany w większości formułacji, jednak w tym badaniu jego obecność

spowodowałyby zahamowanie wzrostu drobnoustrojów wobec których analizowano aktywność przeciwdrobnoustrojową. Uzyskane wyniki przedstawiono tabeli poniżej.

Tabela. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa formulacji kosmetycznej typu krem do twarzy z biofermentem z bambusa

Typ formulacji	Szczep wzorcowy							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Strefa zahamowania wzrostu drobnoustrojów (mm)							
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
Kk	1,0±0,0	NW	NW	NW	NW	NW	NW	NW

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 z bambusa otrzymanego na drodze biotechnologicznej wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec wytypowanych do testów gatunków patogennych. Największy potencjał przeciwdrobnoustrojowy wykazano dla biofermentu natywnego wobec gatunków *Pseudomonas aeruginosa* (14,0±2,0 mm) i *Staphylococcus aureus* (15,0±3,0 mm), co przełożyło się na aktywność przeciwdrobnoustrojową formulacji typu krem. Nie wykazano znaczącej aktywności przeciwdrobnoustrojowej w przypadku formulacji kontrolnej, niezawierającej składnika funkcjonalnego w postaci biofermentu.

Tabela. Aktywność prebiotyczna formulacji kosmetycznej typu krem do twarzy z biofermentem z bambusa

Typ formulacji	Szczep wzorcowy							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Strefa stymulacji wzrostu drobnoustrojów (mm)							
Kb	4,0±1,0	5,0±1,0	3,0±1,0	4,0±1,0	2,0±1,0	5,0±1,0	NW	NW

Kk	NW	NW	NW	NW	NW	NW	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 formułacja kosmetyczna typu krem z dodatkiem biofermentu z bambusa charakteryzuje się umiarkowaną aktywnością stymulującą wzrost bakterii o potencjale probiotycznym. Maksymalna strefa zwiększonego stężenia biomasy wokół studzienki był równa 5,0 mm wobec *Lactobacillus reuteri*.

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.

Ocena miejscowej tolerancji skórnej produktu kosmetycznego krem 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 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. 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 tabeli poniżej.

Tabela. Wyniki testów płatkowych (okluzyjnych) – krem do twarzy z dodatkiem biofermentu z bambusa

LP	Inicjały probanta	Płeć	Wywiad alergiczny	Wynik podrażnienie	Wynik uczulenie
1	Z.S	M	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
2	E.K	K		Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
3	K.M	K	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
4	M.M	K		Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
5	A.K	K		Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)
6	P.P	M	A	Kb (-) Kk (-)	Kb (-) Kk (-)

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

Legenda: Krem do twarzy: z biofermentem (Kb), bez składnika aktywnego - próbka kontrolna (Kk). 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.

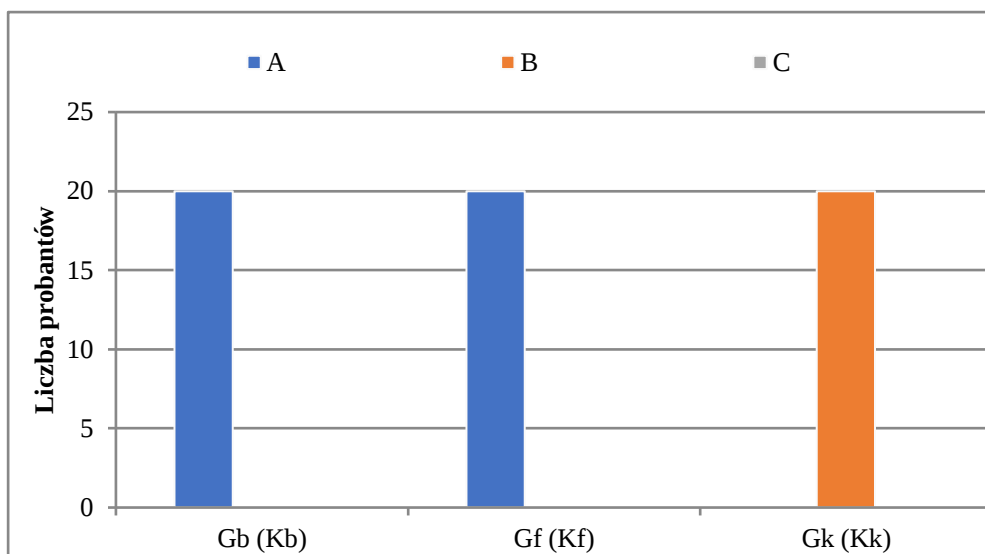
Na podstawie wyników przeprowadzonych badań nie stwierdzono własności uczulających i drażniących badanego produktu. Produkt z dodatkiem biofermentu spełnia kryteria bezpieczeństwa dermatologicznego i zostały zakwalifikowany do dalszego etapu badań tj. testów aplikacyjnych. Wynik i opinia nie dotyczy osób, u których występuje alergia na którykolwiek ze składników badanego kosmetyku.

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, tj. wspierają łagodzenie podrażnień, poprawę nawilżenia, zmniejszenie uczucia ściągania oraz suchości cery i utrzymanie dobrej kondycji naskórka podczas leczenia.

Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku poniżej.

Rysunek. Ocena sensoryczno-jakościowa kremu do twarzy z biofermentem z bambusa



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)

Gb – krem do twarzy z biofermentem z bambusa 2%

Gf - krem do twarzy z biofermentem z bambusa 1%

Gk - krem do twarzy bez składnika biofunkcjonalnego

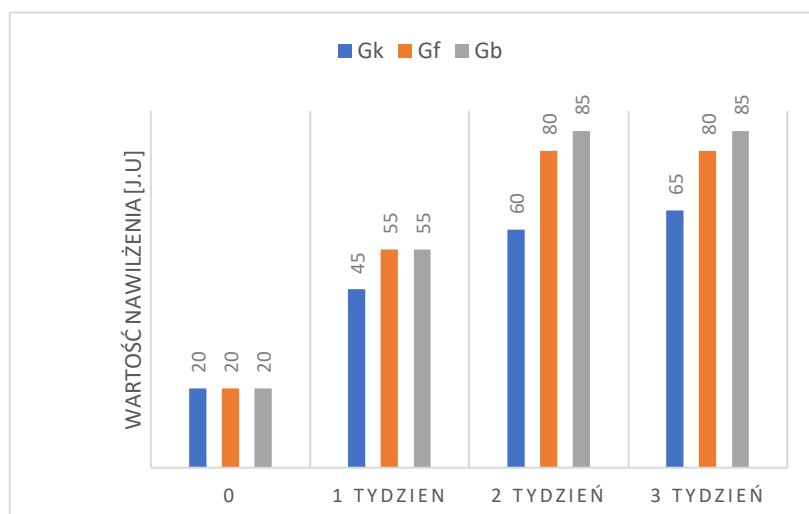
Dane przedstawione na rysunku wskazują, że wszyscy probanci grupy Gb i Gf (n=20) ocenili produkt Kb oraz Kf jako „konsystencja przyjemna w użytkowaniu”. Krem kontrolny ocenili probanci grupy Gk (n=20) jako: „konsystencja średnio przyjemna w użytkowaniu”. Wynik ten potwierdza, iż obecność składnika aktywnego zarówno w postaci biofermentu, korzystnie wpływa na walory sensoryczne dotyczące konsystencji podczas stosowania kremu

Badanie parametrów biofizycznych skóry

• Nawilżenie skóry

Pierwszym badanym parametrem był poziom nawilżenia 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. Bardzo ważny jest też komponent kwasów organicznych obecnych w biofermentcie, tj. kwas mlekowy, 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. Kinetyka zmian wartości nawilżenia skóry probantów zmierzona przed i po badaniu



Legenda: Gb - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 2%
 Gf - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 1%
 Gk – grupa kontrolna
 (n=20) każda, * – p<0,05.

Na podstawie uzyskanych danych, przedstawionych na rysunku 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 tabeli poniżej 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. Interpretacja wyników pomiaru nawilżenia naskórka

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

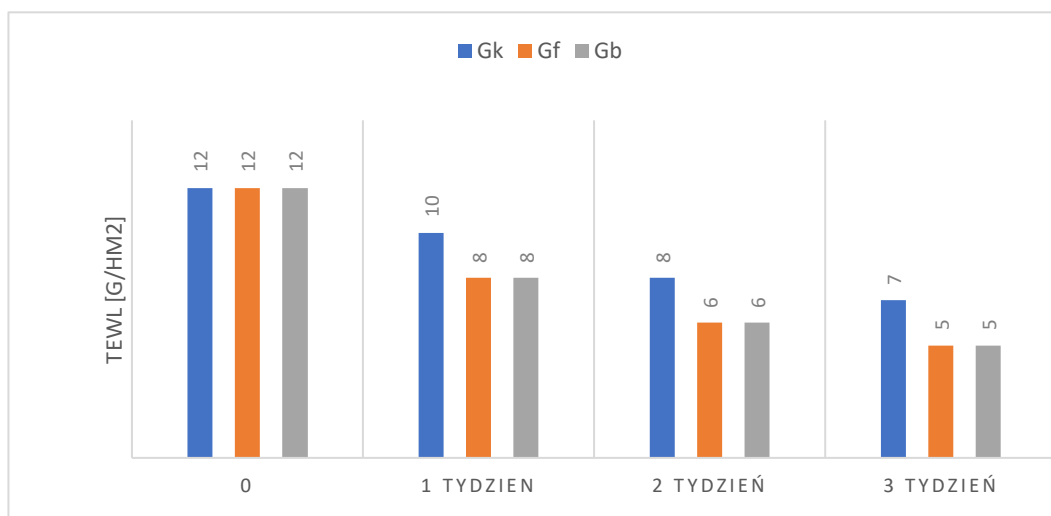
Warstwa rogowa spełnia ważną funkcję nawadniającą, co warunkuje utrzymanie miękkości skóry i elastyczność. Utrata tej funkcji może skutkować suchością, pojawieniem się łusek i pęknięć, które często towarzyszą chorobom skóry lub dysfunkcją bariery hydrolipidowej. Dzięki pomiarowi nawilżenia, który jest 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*) - przeznaskórkowa 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 rysunku poniżej. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i p wynosi $<0,05$.

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



Legenda: Gb - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 2%
Gf - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 1%
Gk – grupa kontrolna
(n=20) każda, * – $p<0,05$.

Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku powyżej można zaobserwować, że u wszystkich probantów nastąpiła poprawa parametru TEWL. Zmiany parametru transepidermalnej utraty wody wahały się średnio w zakresie 12-5 [g/hm²]. 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 kosmetyczną, zawartość wody w naskórku > 10% zapewnia prawidłowy i zdrowy wygląd skóry. Uzyskane wyniki są istotne statystycznie i $p < 0,05$.

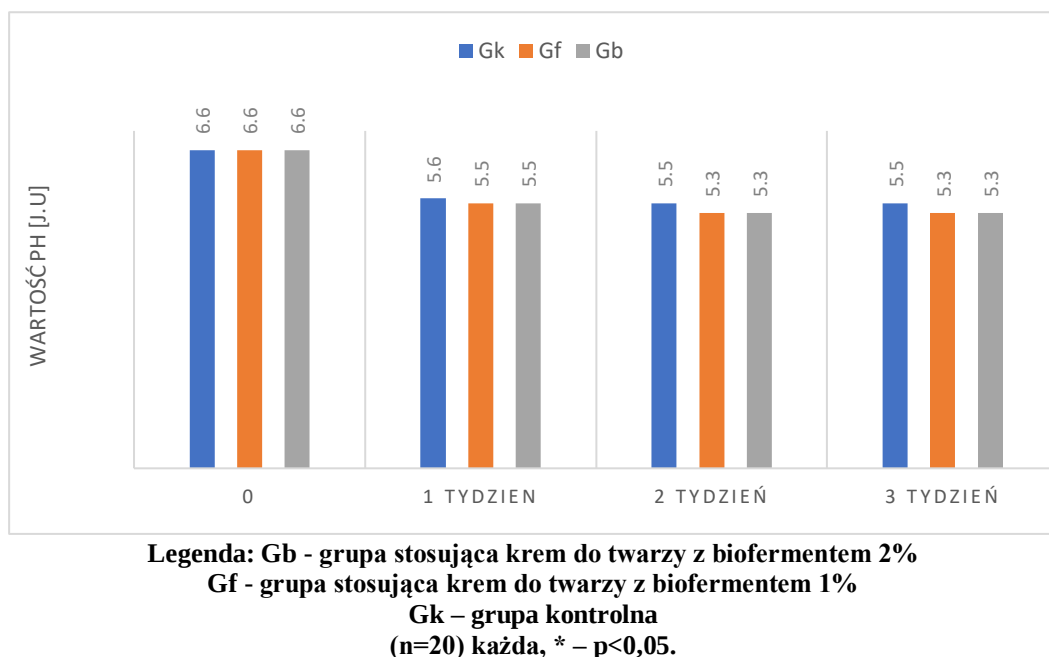
Tabela. Interpretacja wyników TEWL (ang. Transepidermal Water Loss)

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

- **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). Stosowanie „kwaśnej” pielęgnacji wydaje się szczególnie istotne w przypadku cery wrażliwej, 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 na ekspresję genów związanych z biosyntezą akwaporyn.

Rysunku. Kinetyka zmian wartości odczynu pH naskórka u probantów



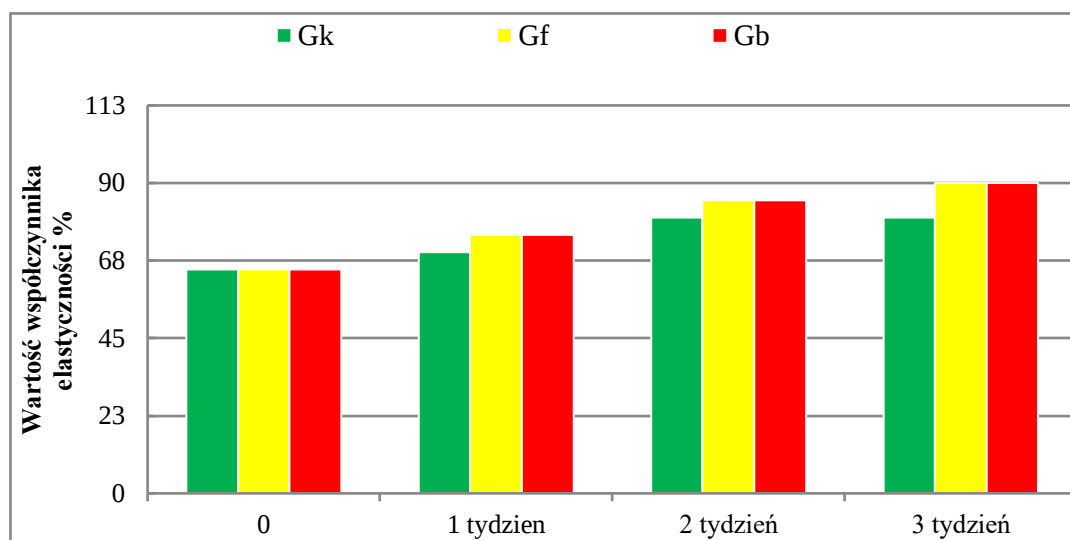
- **Elastyczność skóry**

Elastyczność skóry jest to biomechaniczną cechą 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. Niskie pH wpływa na konformację i aktywność białek keratynocytów, takich jak filagryna czy lorecyryna, co wpływa na właściwości fizyczne tych białek, 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). 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. Utrata wilgotności naskórka prowadzi do jego większej sztywności i utraty elastyczności.

Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku poniżej 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 $<0,05$.

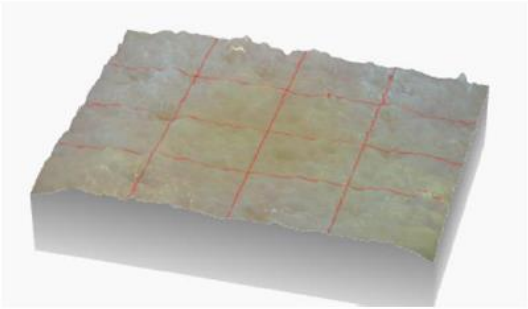
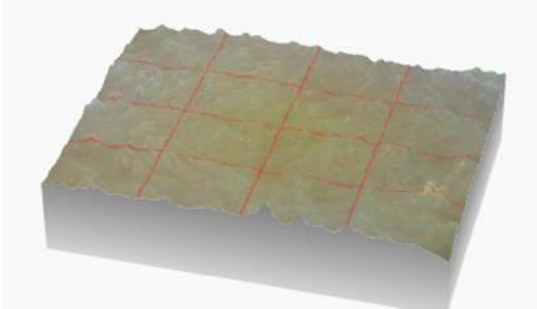
Rysunek. Kinetyka zmian współczynnika elastyczności skóry

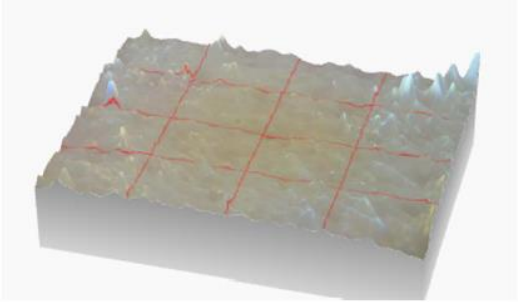
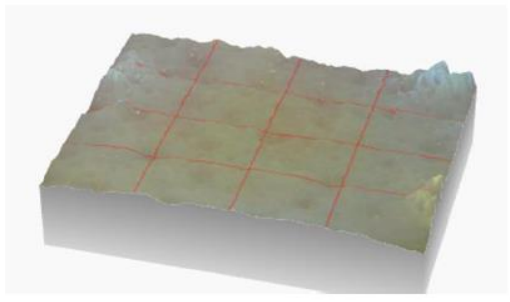


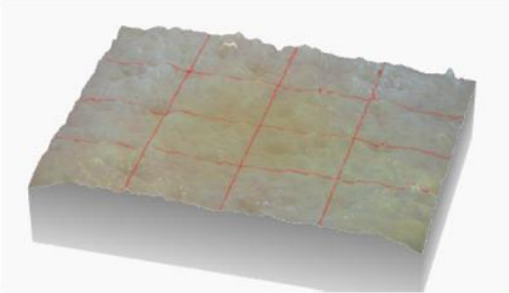
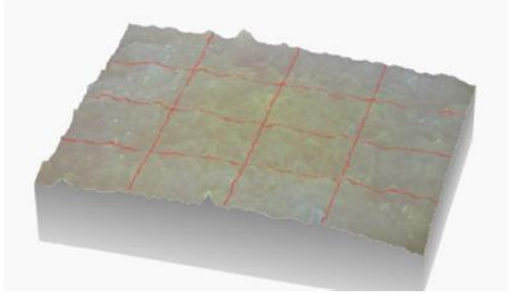
Legenda: Gb - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 2%
 Gf - grupa stosująca krem do twarzy z biofermentem 1%
 Gk – grupa kontrolna
 (n=20) każda, * – $p<0,05$.

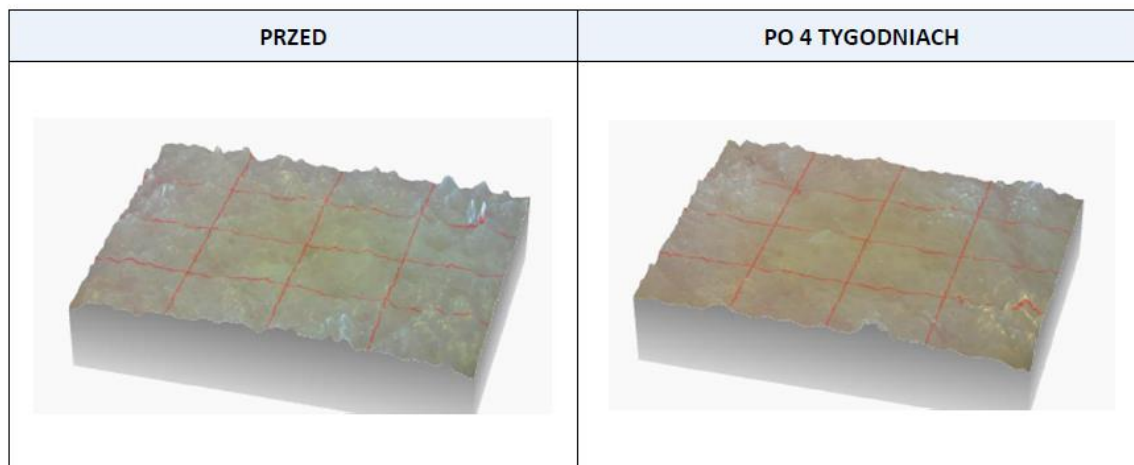
Pomiar parametru struktura skóry 3 D

CZAS POMIARU	ŚREDNIA WARTOŚĆ PARAMETRU [j.p.]	OTRZYMANY WYNIK
PRZED	9,420	POTWIERDZONO
PO 4 TYGODNIACH	7,974	

PRZED	PO 4 TYGODNIACH
	

PRZED	PO 4 TYGODNIACH
	

PRZED	PO 4 TYGODNIACH
	



Badanie wykonane zostało przy użyciu aparatu pomiarowego NATI V3 firmy Skin Diagnosis by Beauty of Science. Mikrofotografie skóry zostały wykonane w rozdzielczości 1280 x 1024. Średnia wartość struktury skóry uzyskana jest z pomiarów przeprowadzonych u wszystkich ochotników. Przedstawiono mikrofotografie skóry wybranych ochotników. Wynik porównano i odczytano z poniżej zamieszczonej skali.

SKALA – wartość wg skali BOFS

0 - 8 doskonała

8 - 10 dobra

>10 nieprawidłowa

Przeprowadzone badanie aparaturowe dla produktu „Krem do twarzy z dodatkiem 2% biofermentu z bambusa” wykazuje poprawę parametrów skóry ocenianych przy pomocy specjalistycznych urządzeń pomiarowych w zakresie: struktury skóry 3D.

Reasumując, przeprowadzone testy *in vitro* i *in vivo* wskazują na wysoki, potwierdzony badaniami eksperymentalnymi potencjał biofunkcjonalny formułacji typu krem do twarzy z biofermentem z bambusa.