

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

W ostatnich latach nastąpił dynamiczny rozwój przemysłu kosmetycznego. Z tego względu naukowcy i technolodzy nieustannie poszukują nowych substancji aktywnych, które polepszyłyby kondycję i wygląd skóry. Nowością na rynku farmaceutycznym oraz kosmetycznym są jasmonidy - hormony roślinne, które wykazują aktywność terapeutyczną.

W związku z powyższym, głównym celem przedkładanej rozprawy doktorskiej było opracowanie oraz analiza nowych preparatów zawierających kwas jasmonowy (*ang.* jasmonic acid, JA) i jego pochodne - jasmonian metylu (*ang.* methyl jasmonate, MeJ) oraz dihydrojasmonian metylu (*ang.* methyl dihydrojasmonate, MeDHJ). Podjęto także próbę zaprojektowania oraz determinacji aktywności *in vivo* nowych pochodnych kwasu jasmonowego w postaci jego koniugatów z wybranymi tetrapeptydami (JA-YPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂). Celem badań w ramach pracy doktorskiej była także ocena potencjalnego zastosowania nowych receptur zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne w preparatach do pielęgnacji skóry.

W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono charakterystykę fizykochemiczną kwasu jasmonowego i jego pochodnych. Struktury koniugatów JA-YPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂ potwierdzono za pomocą następujących metod spektroskopowych: ESI-MS, FTIR oraz NMR. Zdeterminowano również aktywność przeciwutleniającą badanych związków z wykorzystaniem metody rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu. Wykazano, że spośród wszystkich badanych substancji aktywnych, koniugat JA-YYKS-NH₂ posiadał największą, a MeDHJ - najmniejszą aktywność antyoksydacyjną, która jest związana z budową cząsteczki substancji aktywnej.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przygotowano pięć różnych preparatów (Emulsja 1, 2 i 3, żel HEC oraz żel PAA) zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Przeprowadzono ocenę organoleptyczną oraz analizę mikroskopową otrzymanych formułacji. Odnotowano także, że wartość pH wszystkich preparatów była zbliżona do wartości pH zdrowej skóry, a dodatek substancji aktywnej nie miał istotnego wpływu na wartość pH preparatów. Stwierdzono również, że lepkość przygotowanych formułacji jest determinowana przez zawartość wody w ich kompozycji, ponieważ niezależnie od typu dodanego jasmonidu, najmniejszą lepkością charakteryzował się żel PAA, natomiast największą - Emulsja 2.

Kompatybilność substancji aktywnych z bazą kosmetyczną może mieć kluczowy wpływ na stabilność gotowego preparatu. W niniejszej pracy zbadano kompatybilność krystalicznych koniugatów ze wszystkimi przygotowanymi preparatami. Stwierdzono, że badane koniugaty są najmniej kompatybilne z Emulsją 1. Związki te są natomiast kompatybilne z pozostałymi przygotowanymi bazami kosmetycznymi. Wyniki analizy DSC badanych substancji aktywnych potwierdziły wysoką czystość otrzymanych koniugatów.

Preparaty przeznaczone do aplikacji naskórkowej powinny cechować się wysoką stabilnością w czasie. Otrzymane formułacje przechowywano w różnych warunkach temperaturowych (w 4 oraz 25°C przez 70 dni oraz w 45°C przez 14 dni). Następnie przeprowadzono ocenę ich stabilności z wykorzystaniem techniki wielokrotnego rozpraszania światła (*ang.* multiple light scattering, MLS) oraz dyfrakcji laserowej (*ang.* laser diffraction, LD). Stwierdzono, że spośród wszystkich przygotowanych emulsji, najbardziej stabilne są preparaty przechowywane w temperaturze 4°C. Najmniejszą stabilnością cechowały się z kolei preparaty przechowywane w temperaturze 45 °C. W przypadku formułacji na bazie Emulsji 2, uległy one rozwarstwieniu już po 24 godzinach przechowywania w temperaturze 45°C. Odnotowano, że spośród wszystkich preparatów przechowywanych w temperaturze 4 oraz 25 °C, największą stabilnością cechowały się preparaty na bazie Emulsji 3. Jest to związane z obecnością autoemulgatora w kompozycji wspomnianych formułacji. Stwierdzono także, dodatek jasmonidów nie ma znaczącego wpływu na rozkład wielkości cząstek przygotowanych preparatów. Ponadto, potwierdzono wpływ działania ultradźwięków na rozmiar cząstek emulsji. Zmiana rozkładu wielkości cząstek wskutek działania ultradźwięków na zdyspergowaną próbkę może być bowiem wykorzystywana do detekcji zjawiska aglomeracji cząstek preparatów.

Wyniki analizy stabilności otrzymanych preparatów metodą MLS są zgodne z wynikami analizy metodą LD. Ponadto, w oparciu o wyniki analizy zmian parametru wstecznego rozproszenia w czasie stwierdzono, że najmniejszą stabilność w temperaturze przechowywania 4 oraz 25 °C wykazały preparaty na bazie Emulsji 1. Jest to prawdopodobnie związane z ich niską lepkością oraz brakiem autoemulgatora w kompozycji. Ponadto, stwierdzono zależność pomiędzy stabilnością preparatu a rozpuszczalnością substancji aktywnej w podłożu kosmetycznym. Im większa lipofilowość substancji aktywnych, tym lepsza ich rozpuszczalność w podłożu o dużej zawartości fazy tłuszczowej. Badane substancje aktywne mają charakter lipofilowy, w związku z czym są słabo rozpuszczalne w podłożu Emulsji 1 o niskiej zawartości fazy tłuszczowej (22,50 % w/w).

W pracy zbadano także wpływ dodatku kwasu jasmonowego i jego pochodnych na stabilność przygotowanych preparatów. Stwierdzono, że dodatek kwasu jasmonowego powoduje największą destabilizację Emulsji 1 oraz 2 w temperaturze przechowywania 4 oraz 25°C. Jest to prawdopodobnie związane z właściwościami fizykochemicznymi JA. Związek ten charakteryzuje się większą gęstością, niż MeJ czy MeDHJ, co może utrudniać otrzymanie homogenicznego układu i w efekcie prowadzić do obniżenia jego stabilności. Wartość zmian parametru wstecznego rozproszenia wszystkich przygotowanych formułacji, przechowywanych w temperaturze 4 oraz 25°C nie przekracza jednak progu 10 %, w związku z czym są one uznawane za preparaty stabilne. Wartość graniczna została przekroczona w przypadku preparatów na bazie Emulsji 1 przechowywanych w temperaturze 45°C. W związku z powyższym, zostały one uznane za niestabilne we wspomnianych warunkach przechowywania.

W przedkładanej rozprawie doktorskiej przeprowadzono również ocenę wpływu dodatku JA i jego pochodnych na stabilność termiczną formułacji z wykorzystaniem analizy termogravimetrycznej. Odnotowano brak wpływu dodatku substancji aktywnych na stabilność termiczną wszystkich przygotowanych preparatów. Stwierdzono, że stabilność termiczna formułacji zależy przede wszystkim od ich kompozycji. Zaobserwowano, że im większa zawartość fazy wodnej formułacji, tym szybsza jej degradacja w wyniku działania wysokich temperatur. W związku z powyższym, największą stabilnością termiczną cechowały się preparaty na bazie Emulsji 2 (20,50 % fazy wodnej), natomiast najmniejszą - preparaty na bazie żelu PAA (99% fazy wodnej). Analiza TGA została również wykorzystana do oceny zmian składu kompozycji preparatów w czasie. W oparciu o wyniki badań nie odnotowano zmian w składzie przygotowanych formułacji zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Należy wspomnieć, że stabilność termiczna preparatu nie jest tożsama z jego stabilnością w czasie.

Skuteczność działania preparatu zależy w dużej mierze od ilości substancji aktywnej, jaka uwalnia się z podłoża kosmetycznego. W związku z powyższym, badania uwalniania substancji aktywnej mogą stanowić kluczowy etap badań podczas opracowywania nowych receptur kosmetycznych oraz farmaceutycznych. Ze względu na brak danych literaturowych dotyczących uwalniania jasmonidów z półstałych form kosmetycznych, w niniejszej pracy doktorskiej opracowano metodykę badań uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych preparatów przez semiprzepuszczalne membrany syntetyczne *in vitro* do roztworu akceptorowego o określonej wartości pH oraz temperatury. Ocenę ilości uwolnionej substancji prowadzono z wykorzystaniem spektrofotometrii UV-Vis. Wykazano, że lipofilowość cząsteczki substancji aktywnej może być czynnikiem limitującym jej uwalnianie z podłoża o dużej zawartości komponentów tłuszczowych. Stwierdzono również, że rodzaj formułacji determinuje szybkość uwalniania jasmonidów, bowiem wraz ze wzrostem lepkości preparatu maleje ilość uwolnionej substancji. W oparciu o uzyskane dane empiryczne, przeprowadzono również ocenę kinetyki uwalniania jasmonidów z przygotowanych formułacji. Wysoka wartość współczynnika korelacji R^2 wskazała na dobre dopasowanie profilu uwalniania JA do modelu Korsmeyera-Peppasa. Profile uwalniania pozostałych substancji aktywnych były natomiast zgodne z modelem Higuchiego.

Nie tylko formułacja, ale również substancja aktywna powinna być stabilna w określonych warunkach przechowywania preparatu. Znaczny spadek stężenia substancji aktywnej w preparacie kosmetycznym jest zmianą ilościową i może świadczyć o niestabilności tejże substancji w zdefiniowanych warunkach przechowywania. W celu określenia stabilności JA i jego pochodnych w przygotowanych preparatach, opracowano metodykę ich oznaczania z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*ang.* high performance liquid chromatography, HPLC). Stwierdzono, że wszystkie badane jasmonidy

wykazują większą stabilność w preparatach przechowywanych w temperaturze 4°C. Jest to prawdopodobnie związane z faktem, że kwas jasmonowy i jego pochodne zaliczane są do grupy VOCs, które w wyższych temperaturach łatwo przechodzą w postać pary lub gazu. W związku z powyższym, im niższa temperatura przechowywania, tym lepsza stabilność preparatów zawierających jasmonidy. Nadto, należy nadmienić, iż jest to zgodne z tym, co zalecają producenci wzorców kwasu jasmonowego i jego pochodnych (przechowywanie produktów w niskich temperaturach w celu przedłużenia okresu ich trwałości i stabilności).

Wyniki analizy uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych przez syntetyczne membrany skłoniły do podjęcia oceny skuteczności działania przygotowanych preparatów w badaniach *in vivo* z udziałem grupy probantów. Na podstawie obliczeń statystycznych stwierdzono, że preparaty zawierające koniugaty wykazują lepsze działanie pielęgnacyjne (wzrost elastyczności / nawilżenia skóry) w porównaniu z preparatami *placebo*. Odnotowano, że preparat 2 (żel HEC + JA-YYKS-NH₂) powoduje największy wzrost nawilżenia skóry, co potwierdza hipotezę na temat potencjalnego działania nawilżającego koniugatu JA-YYKS-NH₂. Odnotowano również, że zarówno preparat 1 (żel HEC + JA-YPFF-NH₂), jak i preparat 2 powodują wzrost elastyczności skóry, co potwierdza hipotezę na temat potencjalnego działania uelastyczniającego kwasu jasmonowego. Stwierdzono jednak, że koniugat JA-YPFF-NH₂ powoduje większy wzrost elastyczności skóry, niż koniugat JA-YYKS-NH₂. Wyniki subiektywnej ankiety po zakończeniu badań były zgodne z wynikami aparaturowymi. Rezultaty badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej dowodzą, że kwas jasmonowy i jego pochodne mogą stanowić ciekawe zagadnienie dla przemysłu kosmetycznego.