

The effect of vehicle type on the performance of Humulus lupulus L. extract in O/W emulsions. Stability and impact on the skin barrier in vivo

Wpływ rodzaju podłoża na działanie ekstraktu z chmielu zwyczajnego w emulsjach O/W. Stabilność oraz bariera naskórkowa w ujęciu *in vivo*



DOI: 10.15199/62.2026.9.8

The effect of the type of oil-in-water (O/W) vehicles, differing in composition and structural organization, on physicochem. stability and in vivo cosmetic performance was evaluated. The same com. ingredient contg. Humulus lupulus L. (HL) extract was used in each. Two cosmetic formulations contg. HL, along with corresponding reference samples lacking the extract, were prepd. on an industrial scale. The pH, apparent viscosity, d., and phys. stability (using the multiple light scattering method) of the cosmetic preps. were assessed during storage for 12 weeks at 4°C, room temp., and 45°C. Subsequently, a 4-week split-face study in 33 volunteers was conducted. Changes in stratum corneum hydration, transepidermal water loss (TEWL), melanin content, erythema indices, and skin topography parameters were evaluated. The performance of the com. HL in topical O/W emulsions depended significantly on the physicochem. properties and structural organization of the base. At 4°C and room temp., all formulations remained phys. stable for 12 weeks, whereas thermal stress (45°C) clearly revealed differences between the two systems.

Oceniono wpływ rodzaju podłoża emulsyjnego typu olej w wodzie (O/W) o odmiennym składzie oraz organizacji strukturalnej na stabilność fizykochemiczną i działanie kosmetyczne w ujęciu *in vivo* po zastosowaniu w nich tego samego komercyjnego składnika zawierającego ekstrakt z chmielu zwyczajnego HL (*Humulus lupulus* L.). Przygotowano w skali przemysłowej dwie formułacje kosmetyczne zawierające HL oraz odpowiadające im próbki referencyjne pozbawione ekstraktu. Oceniano pH, lepkość pozorną, gęstość oraz stabilność fizyczną (metodą wielokrotnego rozpraszania światła) preparatów kosmetycznych przechowywanych przez 12 tygodni w temp. 4°C, w temperaturze pokojowej oraz w temp. 45°C. Następnie przeprowadzono czterotygodniowe badanie *in vivo* z udziałem 33 ochotników. Oceniano zmiany nawilżenia warstwy rogowej naskórka, poziomu przeznaskórkowej utraty wody (TEWL), zawartości melaniny, poziomu zaczerwienienia oraz parametrów topografii skóry. Działanie komercyjnego składnika zawierającego *Humulus lupulus* L. w emulsjach O/W do stosowania miejscowego w znacznym stopniu zależało od właściwości fizykochemicznych oraz organizacji strukturalnej podłoża. W temp. 4°C i w temperaturze pokojowej wszystkie formułacje pozostawały fizycznie stabilne przez 12 tygodni, natomiast zastosowanie stresu termicznego w temp. 45°C wyraźnie uwidoczniło różnice między oboma systemami.

Keywords: *Humulus lupulus* (hops), O/W emulsion, vehicle active interaction, multiple light scattering, skin barrier, in vivo assessment

Słowa kluczowe: *Humulus lupulus* (chmiel zwyczajny), emulsja O/W, interakcja podłoże-substancja aktywna, wielokrotne rozpraszanie światła, bariera skórna, badania *in vivo*

Skuteczność formułacji kosmetycznych do stosowania miejscowego zależy nie tylko od aktywności biologicznej składnika w niej zawartego, lecz przede wszystkim od właściwości fizykochemicznych podłoża kosmetycznego.

Warstwa rogowa naskórka stanowi główną barierę skóry, a skład, właściwości reologiczne oraz międzyfazowe produktu kosmetycznego mogą wpływać na czas jego pozostawiania na skórze, działanie okluzyjne lub nawilżające, dostępność



Mgr Magdalena DZIENISIK (ORCID: 0009-0000-8121-6150) w roku 2004 uzyskała stopień magistra na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Obecnie realizuje doktorat wdrożeniowy w ramach Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Jest dyrektorką Działu Badań i Rozwoju w firmie Bandi Cosmetics, gdzie kieruje zespołem technologów, nadzoruje projektowanie i rozwój efektywnych produktów do pielęgnacji skóry, dba o utrzymanie obecnego portfolio od strony produkcyjnej i formalnej oraz o bezpieczeństwo stosowania produktów kosmetycznych. Specjalność – formułowanie, innowacje i poprawne spełnianie wymagań legislacyjnych stawianych wyrobom kosmetycznym wprowadzanym na rynek.



Dr Marta MARZEC (ORCID: 0000-0003-1482-8274) w roku 2015 uzyskała stopień magistra, a w 2019 r. stopień doktora na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Jest adiunktem w Zakładzie Chemii Stosowanej tej samej uczelni. Specjalność – preparatyka i badania fizykochemiczne produktów kosmetycznych z zakresu kosmetyki białej, nowoczesne substancje czynne w produktach kosmetycznych, badania aplikacyjno-aparaturowe kosmetyków, synteza nano-cząstek lipidowych, z naciskiem na ich zastosowanie w chemii kosmetycznej.

* Adres do korespondencji:

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

składnika na powierzchni skóry oraz wynikającą z tego efektywność w zakresie wpływu na barierę skórną¹⁻³). W związku z tym podłoża kosmetycznego nie należy postrzegać jako obojętnego nośnika, szczególnie w przypadku złożonych składników pochodzenia roślinnego, których rozpuszczalność, zachowanie na granicy faz oraz stabilność mogą w znacznym stopniu zależeć od obecności w recepturze składników bazowych. Emulsje typu olej w wodzie (O/W) są powszechnie stosowane jako podłoża preparatów miejscowych, ponieważ umożliwiają wprowadzenie zarówno składników hydrofilowych, jak i lipofilowych, zapewniając jednocześnie korzystne właściwości aplikacyjne. Ich działanie zależy jednak od równowagi pomiędzy fazą rozproszoną, układem emulgującym, substancjami modyfikującymi konsystencję, humektantami, emolientami oraz właściwościami reologicznymi fazy ciągłej. Zmiany któregośkolwiek z tych elementów mogą wpływać na migrację cząstek, tworzenie filmu oraz podatność emulsji na śmietanowanie, flokulację lub koalescencję⁴⁻⁶). Ekstrakty roślinne wprowadzają dodatkowy poziom złożoności, ponieważ zawierają chemicznie zróżnicowane składniki i są często dostarczane w wieloskładnikowych układach rozpuszczalnikowych. W konsekwencji wprowadzenie ekstraktu roślinnego może wpływać zarówno na stabilność fizyczną, jak i na działanie gotowej formuacji na skórę. Chmiel zwyczajny (*Humulus lupulus* L., HL) zawiera prenylowane chalkony, kwasy goryczkowe, polifenole oraz składniki lotne, którym przypisuje się działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne⁷⁻¹²). Co istotne, wcześniejsze badania wykazały, że działanie *in vivo* miejscowo stosowanego ekstraktu może zależeć od zastosowanego systemu galenowego¹³). W badaniu tym różnice pomiędzy kremami O/W i W/O wiązano z działaniem preparatu zależnym od formuacji, w tym z różnicami obserwowanymi w doświadczeniach z wykorzystaniem komór dyfuzyjnych. Niniejsze badanie dotyczy pokrewnego zagadnienia formuacyjnego: czy istotne różnice w działaniu kosmetycznym mogą występować również w obrębie tego samego typu emulsyjnego O/W, gdy zmienia się skład podłoża oraz stopień jego organizacji strukturalnej. W związku z tym postawiono hipotezę, że organizacja fizykochemiczna podłoża O/W będzie wpływać zarówno na stabilność fizyczną, jak i na charakter odpowiedzi bariery skórnej *in vivo* na aplikację formuacji zawierającej ten

sam komercyjny składnik HL. Zbadano 2 podłoża emulsyjne O/W o wyraźnie różnym składzie i lepkości pozornej, każde w postaci formuacji zawierającej HL oraz odpowiadającej jej formuacji referencyjnej, przygotowanej bez składnika aktywnego. Preparaty charakteryzowano pod względem pH, lepkości pozornej, gęstości oraz stabilności, ocenianej metodą wielokrotnego rozpraszania światła, w trakcie 12 tygodni przechowywania w 3 różnych temperaturach. Efekt pielęgnacyjny (działanie na skórę) oceniano w 4-tygodniowym badaniu typu *split-face*, wykorzystując nieinwazyjne metody pomiaru nawilżenia warstwy rogowej naskórka, poziomu przeznaskórkowej utraty wody TEWL (*transepidermal water loss*), kolorytu skóry oraz jej topografii.

Celem pracy było zidentyfikowanie różnic związanych z podłożem, bez przypisywania obserwowanych efektów niebadanym mechanizmom uwalniania lub przenikania składników aktywnych.

Część doświadczalna

Materiały

Recepturowanie emulsji O/W do stosowania miejscowego zawierających ekstrakt z *Humulus lupulus* L.

Początkowo oceniano szerszy zakres formuacji emulsyjnych, jednak w niniejszym badaniu przedstawiono jedynie te, które ze względu na najkorzystniejszy ogólny profil właściwości fizykochemicznych wybrano do szczegółowej charakterystyki. Do oceny *in vivo* opracowano 4 emulsje O/W przeznaczone do stosowania miejscowego, oznaczone kodami DW01–DW04. Formuacje DW01 i DW03 zawierały 3,0% mas. komercyjnego składnika HL, natomiast DW02 i DW04 stanowiły odpowiadające im formuacje referencyjne pozbawione ekstraktu. Pary DW01/DW02 oraz DW03/DW04 reprezentowały 2 odrębne układy emulsyjne typu O/W. Surowcem aktywnym zastosowanym w emulsjach DW01 i DW03 był Senseryn™ (Provital, S.A., Barcelona, Hiszpania), ekstrakt na bazie propanodiolu i gliceryny, otrzymywany z szyszek chmielu odmiany *Cascade*, o następującym składzie INCI: Propanediol, Glycerin, *Humulus Lupulus* (Hops) Extract oraz Citric Acid. Ekstrakt był standaryzowany na zawartość 0,10–0,30% całkowitej ilości polifenoli i zgodnie z informacjami producenta¹⁴) zawierał składniki pochodzenia naturalnego zgodne z normą¹⁵). Wcześniejsza charakterystyka ekstraktu przeprowadzona metodą HPLC-DAD potwierdziła obecność ksantohumolu, prenylowanego chalkonu o działaniu przeciwutleniającym⁹). Dokładny skład oraz parametry technologiczne otrzymywania formuacji DW01–DW04 stanowią informacje zastrzeżone firmy Bandi Cosmetics sp. z o.o. (Czosnów, Polska). Z tego względu składniki podano zgodnie z ich nazwami INCI, w myśl art. 19 rozporządzenia¹⁶), natomiast ich stężenia przedstawiono w postaci zakresów stosowanych w Portalu Zgłaszania Produktów Kosmetycznych CPNP (*Cosmetic Products Notification Portal*)¹⁷):



Prof. dr hab. Izabela NOWAK (ORCID: 0000-0002-1113-9011) w roku 1997 uzyskała stopień doktora, a w 2008 r. stopień doktora habilitowanego na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Była stypendystką Fundacji Fulbrighta oraz Kościuszkowskiej. W 2014 r. otrzymała nominację profesorską. Od 2009 r. jest kierownikiem Zakładu Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii UAM. W latach 2019–2024 pełniła funkcję prezesa ZG PTChem. Specjalność – synteza i modyfikacja nowych uporządkowanych mezoporowatych materiałów, synteza wysokowartościowych i masowych chemikaliów z użyciem heterogenicznych katalizatorów, w tym z użyciem biomasy, nowatorskie metody analityczne w zakresie chemii kosmetycznej, farmaceutycznej i stosowanej, nowoczesne strategie preparatyki i badania kosmetyków oraz kosmeceutyków.

** Adres do korespondencji:

Zakład Chemii Stosowanej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań tel.: +48 618-291-580, e-mail: nowakiza@amu.edu.pl

Table 1. Composition of formulations DW01–DW04

Tabela 1. Skład formułacji DW01–DW04

Emulsja	Skład (INCI)
DW01 (zawartość 3% mas. HL)	Aqua/Water (B), Coco-Caprylate/Caprates (F), Isostearyl Isostearate (F), Propanediol (F), Trehalose (F), Tripelargonin (F), Arachidyl Alcohol (F), Glycerin (F), Glyceryl Stearate (F), Pentaerythrityl Distearate (G), Pentylene Glycol (G), Butylene Glycol (G), <i>Humulus Lupulus</i> (Hops) Extract (H), Ceramide NP (G), Carnosine (G), Hydroxyphenyl Propamidobenzoic Acid (G), Saccharomyces/Acetobacter/ <i>Camellia Sinensis</i> Leaf Extract Ferment Filtrate (G), <i>Plukenetia Volubilis</i> Seed Oil (G), Olea Europaea (Olive) Fruit Oil (G), Tocopherol (H), Behenyl Alcohol (G), Stearic Acid (G), Arachidyl Glucoside (G), Lecithin (G), Sodium Acrylates Copolymer (G), Hydroxypropyl Starch Phosphate (H), Polyglyceryl-10 Laurate (H), Hydroxyacetophenone (G), Caprylyl Glycol (G), Citric Acid (H), Ascorbyl Palmitate (H), 1,2-Hexanediol (G)
DW02 (niezawierająca HL; formułacja referencyjna dla DW01)	Aqua/Water (B), Coco-Caprylate/Caprates (F), Isostearyl Isostearate (F), Propanediol (F), Trehalose (F), Tripelargonin (F), Arachidyl Alcohol (F), Glyceryl Stearate (F), Pentaerythrityl Distearate (G), Pentylene Glycol (G), Glycerin (G), Butylene Glycol (G), Ceramide NP (G), Carnosine (G), Hydroxyphenyl Propamidobenzoic Acid (G), Saccharomyces/Acetobacter/ <i>Camellia Sinensis</i> Leaf Extract Ferment Filtrate (G), <i>Plukenetia Volubilis</i> Seed Oil (G), Olea Europaea (Olive) Fruit Oil (G), Tocopherol (H), Behenyl Alcohol (G), Stearic Acid (G), Arachidyl Glucoside (G), Lecithin (G), Sodium Acrylates Copolymer (G), Hydroxypropyl Starch Phosphate (H), Polyglyceryl-10 Laurate (H), Hydroxyacetophenone (G), Caprylyl Glycol (G), Citric Acid (H), Ascorbyl Palmitate (H), 1,2-Hexanediol (G)
DW03 (zawartość 3% mas. HL)	Aqua/Water (B), Glycerin (E), Coco-Caprylate/Caprates (F), Isostearyl Isostearate (F), Hydrogenated Vegetable Oil (F), Trehalose (F), Panthenol (F), Squalane (F), Propanediol (F), Arachidyl Alcohol (F), Glyceryl Stearate (F), Pentaerythrityl Distearate (F), Dimethicone (G), <i>Humulus Lupulus</i> (Hops) Extract (H), Carnosine (G), Allantoin (G), Ceramide NP (G), Saccharomyces/Acetobacter/ <i>Camellia Sinensis</i> Leaf Extract Ferment Filtrate (G), Bacillus Ferment (H), <i>Plukenetia Volubilis</i> Seed Oil (G), Olea Europaea (Olive) Fruit Oil (G), Tocopherol (H), Pentylene Glycol (G), Butylene Glycol (G), Behenyl Alcohol (G), Stearic Acid (G), Arachidyl Glucoside (G), Sodium Acrylates Copolymer (G), Lecithin (G), Hydroxyphenyl Propamidobenzoic Acid (H), Hydroxypropyl Starch Phosphate (H), Polyglyceryl-10 Laurate (H), Caprylyl Glycol (G), Citric Acid (H), Ascorbyl Palmitate (H), Hydroxyacetophenone (G), 1,2-Hexanediol (G)
DW04 (niezawierająca HL; formułacja referencyjna dla DW03)	Aqua/Water (B), Glycerin (F), Coco-Caprylate/Caprates (F), Isostearyl Isostearate (F), Hydrogenated Vegetable Oil (F), Trehalose (F), Panthenol (F), Squalane (F), Arachidyl Alcohol (F), Glyceryl Stearate (F), Pentaerythrityl Distearate (F), Dimethicone (G), Carnosine (G), Allantoin (G), Ceramide NP (G), Saccharomyces/Acetobacter/ <i>Camellia Sinensis</i> Leaf Extract Ferment Filtrate (G), Bacillus Ferment (H), <i>Plukenetia Volubilis</i> Seed Oil (G), Olea Europaea (Olive) Fruit Oil (G), Tocopherol (H), Pentylene Glycol (G), Butylene Glycol (G), Behenyl Alcohol (G), Stearic Acid (G), Arachidyl Glucoside (G), Sodium Acrylates Copolymer (G), Lecithin (G), Hydroxyphenyl Propamidobenzoic Acid (H), Hydroxypropyl Starch Phosphate (H), Polyglyceryl-10 Laurate (H), Caprylyl Glycol (G), Citric Acid (H), Ascorbyl Palmitate (H), Hydroxyacetophenone (G), 1,2-Hexanediol (G)

(A) 75–100% mas., (B) 50–75% mas., (C) 25–50% mas., (D) 10–25% mas., (E) 5–10% mas., (F) 1–5% mas., (G) 0,1–1% mas. oraz (H) 0–0,1% mas. (tabela 1).

Formulacje wykonano zgodnie z wcześniej szczegółowo opracowaną metodyką, a następnie zoptymalizowano pod względem układu emulgującego, składników funkcjonalnych oraz warunków procesu w celu zapewnienia stabilności fizykochemicznej, jakości mikrobiologicznej i powtarzalności jakościowej⁹. Zarówno w skali laboratoryjnej, jak i przemysłowej fazę wodną i olejową ogrzewano oddzielnie do temp. 80–85°C, następnie łączono ze sobą, homogenizowano i mieszano podczas kontrolowanego chłodzenia. Do emulsji DW01 i DW03 wprowadzano komercyjny surowiec HL w ilości 3,0% mas, w temperaturze poniżej 40°C, w celu ograniczenia narażenia termolabilnych składników na działanie podwyższonej temperatury. Odpowiadające im formułacje referencyjne wytwarzano w ten sam sposób, bez dodatku ekstraktu chmielowego.

Metodyka badań

Charakterystyka fizykochemiczna opracowanych emulsji

Pomiar pH. Wartość pH emulsji mierzono za pomocą pH-metru CP-411 (Elmetron, Zabrze, Polska), zgod-

nie z wewnętrzną procedurą opracowaną przez Bandi Cosmetics sp. z o.o. Pomiary wykonywano w dniu przygotowania formułacji (T0) oraz po 1 (T1), 4 (T4), 8 (T8) i 12 tygodniach (T12) przechowywania w temp. 4°C, w temperaturze pokojowej (15–25°C/2 Ph. Eur./WHO/GMP) oraz w temp. 45°C. Dla każdej próbki pomiar wykonywano 3-krotnie.

Pomiar lepkości. Lepkość pozorną emulsji określano za pomocą wiskozymetru rotacyjnego IKA® ROTAVISC me-vi (IKA Poland sp. z o.o., Warszawa, Polska). Pomiary wykonywano w temp. 24,8±0,5°C, za pomocą wrzeciona nr 10 i prędkości obrotowej 10 rpm. Analizy przeprowadzano w T0, T1, T4, T8 i T12 dla próbek przechowywanych w temp. 4°C, pokojowej (15–25°C/2 Ph. Eur./WHO/GMP) oraz 45°C. Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 pomiarów.

Pomiar gęstości. Gęstość emulsji oznaczano za pomocą metalowego piknometru P-1 o objętości 100 mL (POL-ZAF sp. z o.o., Gdańsk, Polska), zgodnie z normą¹⁸. Piknometr składał się z cylindrycznego naczynia oraz dopasowanej pokrywki z centralnym otworem umożliwiającym usunięcie nadmiaru próbki i pęcherzyków powietrza. Pomiary wykonywano w T0 oraz T12 po przechowywaniu w temp. 4°C, w temperaturze pokojowej (15–25°C/2 Ph. Eur./WHO/GMP) oraz w temp. 45°C. Dla każdej próbki pomiar wykonywano 3-krotnie.

Ocena stabilności fizycznej metodą wielokrotnego rozpraszania światła

Stabilność fizyczną preparatów oceniano metodą wielokrotnego rozpraszania światła MLS (*multiple light scattering*) za pomocą analizatora Turbiscan Lab Expert (Formulacion, L’Union, Francja). Każdą emulsję przenoszono w równych ilościach do 3 szklanych fiolek, unikając powstawania pęcherzyków powietrza oraz zapewniając czystość ścianek naczynia i płaską powierzchnię menisku próbki. Próbkę przechowywano przez 12 tygodni w temp. 4°C, w temperaturze pokojowej (15–25°C/2 Ph. Eur./WHO/GMP) oraz 45°C, a analizowano w T0, T1, T2, T3, T4, T8 oraz T12. Stabilność oceniano na podstawie zmian profilu wstecznego rozpraszania światła (Δ BS) oraz wskaźnika stabilności TSI (*turbiscan stability index*).

Instrumentalna ocena wpływu emulsji na stan bariery skórnej (*in vivo*)

Badanie *in vivo* opracowanych formułacji wraz z instrumentalną oceną skóry przeprowadzono w 2 kolejnych etapach. W pierwszym etapie oceniono grupę I, a na podstawie wstępnej analizy uzyskanych wyników badanie rozszerzono o grupę II. Każdy etap trwał 4 tygodnie, a pomiary instrumentalne wykonywano przed rozpoczęciem stosowania produktów (T0) oraz po 1 (T1), 3 (T3) i 4 (T4) tygodniach regularnego stosowania. Uczestników rekrutowano zgodnie z zasadami określonymi w Deklaracji Helsińskiej i jej późniejszych zmianach, obowiązującymi przepisami prawa polskiego i Unii Europejskiej oraz wytycznymi Cosmetics Europe, na podstawie wcześniej ustalonych kryteriów włączenia i wykluczenia^{19–21}). Wszyscy uczestnicy otrzymali pisemne informacje dotyczące badania oraz instrukcje stosowania produktów, a następnie wyrazili świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu. Przed każdą sesją pomiarową uczestnicy przechodzili 15-minutowy okres aklimatyzacji (temperatura pomieszczenia 19–22°C; wilgotność względna 40–60%), mający na celu wyrównanie temperatury powierzchni skóry oraz stabilizację wydzielania potu. Dodatkowo ochotnicy zostali poproszeni o niestosowanie testowanych produktów na minimum 2 h przed wykonywaniem pomiarów. Przed rozpoczęciem badań *in vivo* potwierdzono bezpieczeństwo produktów poprzez ocenę ich jakości mikrobiologicznej, badanie skuteczności systemu konserwującego (*challenge test*) oraz dermatologiczne testy płatkowe, w tym ocenę tolerancji produktów na skórę wrażliwą. Protokół z badań został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (zgoda nr 477/24 z dnia 27 czerwca 2024 r.). Ze względu na to, że formułacje DW01/DW02 oraz DW03/DW04 oceniano w odrębnych grupach badanych, bezpośrednie porównanie obu formułacji zawierających ekstrakt HL traktowano jako porównanie eksploracyjne.

Charakterystyka grupy ochotników. Panel ochotników składał się z 33 osób, podzielonych na 2 grupy. Grupę I tworzyło 16 uczestników (14 kobiet i 2 mężczyzn) w wieku od < 25 do > 55 lat, o różnych typach skóry, w tym normalnej,

mieszanej, tłustej, trądzikowej i naczynkowej. Piętnaście osób miało skórę wrażliwą i skłonność do podrażnień. Grupę II stanowiło 17 uczestników (14 kobiet i 3 mężczyzn) w wieku od 26 do > 55 lat, o różnych typach skóry; 8 osób miało skórę wrażliwą. Zastosowano 4-tygodniowy schemat badania typu *split-face*. Każdy uczestnik stosował 2 formułacje 2 razy dziennie, rano i wieczorem, na oczyszczoną skórę twarzy, w tym także na okolice oczu. W grupie I formułację DW01 stosowano na lewej stronie twarzy, a DW02 na prawej, natomiast w grupie II na lewej stronie twarzy stosowano formułację DW03, a na prawej DW04. W trakcie badania uczestnicy nie stosowali innych produktów kosmetycznych do stosowania miejscowego o podobnym działaniu ani produktów samoopalających oraz zostali poinstruowani, aby unikać nadmiernej ekspozycji na promieniowanie UV, w tym opalania na słońcu i korzystania z solarium. Wszelkie objawy silnego podrażnienia lub reakcje alergiczne należało niezwłocznie zgłaszać osobie prowadzącej badania.

Aparatura do instrumentalnej oceny skóry. W celu oceny wpływu zaprojektowanych emulsji na stan skóry przeprowadzono nieinwazyjne pomiary instrumentalne. Pomiary wybranych parametrów biofizycznych skóry przeprowadzano za pomocą zintegrowanego systemu wyposażonego w odpowiednie sondy (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Kolonia, Niemcy). Wybrane parametry dostarczały uzupełniających informacji na temat nawilżenia warstwy rogowej naskórka, funkcjonowania bariery skórnej, kolorytu skóry oraz topografii jej powierzchni (tabela 2).

Analiza statystyczna. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Statistica 13.3 (StatSoft, Kraków, Polska). Zmiany parametrów skóry w czasie analizowano oddzielnie dla każdej formułacji, stosując test Friedmana. W przypadku stwierdzenia istotnych statystycznie zmian w czasie przeprowadzono porównania parami wartości wyjściowych (T0) z kolejnymi punktami pomiarowymi (T1, T3 i T4) za pomocą testu Wilcoxa z korektą Holma dla wielokrotnych porównań. Różnice między odpowiadającymi sobie formułacjami w obrębie poszczególnych grup badanych oceniano na podstawie

Table 2. Biophysical parameters of the skin assessed *in vivo* and the corresponding measurement probes

Tabela 2. Parametry biofizyczne skóry oceniane *in vivo* oraz odpowiadające im sondy pomiarowe

Sonda	Parametr skóry	Procedura pomiarowa
Corneometer® CM 825	nawilżenie warstwy rogowej naskórka	3–5 pomiarów/obszar
Tewameter® TM 300	przeznaskórkowa utrata wody (TEWL)	20–22 pomiary/obszar
Mexameter® MX 18	zawartość melaniny oraz poziom zaczerwienienia	3–5 pomiarów/obszar
Visioscan® VC 98	topografia powierzchni skóry oceniana za pomocą parametrów SELS: gładkość, szorstkość i złuszczenie	3 pomiary/obszar

zmian w porównaniu z wartością wyjściową po 4 tygodniach stosowania ($\Delta T_4 = T_4 - T_0$) w grupie I (DW01 i DW02), a w grupie II (DW03 i DW04), stosując test Wilcozona. Eksploracyjne porównanie formulacji zawierających ekstrakt z chmielu, badanych w niezależnych grupach, czyli DW01 w grupie I oraz DW03 w grupie II, przeprowadzono za pomocą testu U Manna i Whitneya na podstawie wartości ΔT_4 . Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

Wyniki badań

Charakterystyka fizykochemiczna emulsji do stosowania miejscowego zawierających ekstrakt z *Humulus lupulus* L. (HL) oraz emulsji referencyjnych

Analiza pH. Wartość pH wszystkich badanych emulsji pozostawała względnie stabilna przez 12 tygodni przechowywania w różnych warunkach temperaturowych. Zaprojektowane pary preparatów różniły się początkową wartością pH: dla DW01 i DW02 wynosiła ona odpowiednio $5,55 \pm 0,01$ i $5,56 \pm 0,01$, natomiast dla DW03 oraz DW04 pomiar pH wykazał wartość $6,40 \pm 0,01 - 0,02$. W 1. tygodniu przechowywania we wszystkich formulacjach zaobserwowano niewielki wzrost pH, po którym następowała stabilizacja lub stopniowe obniżanie jego wartości. W przypadku emulsji DW01 w temp. 4°C i pokojowej zaobserwowano niewielkie zmiany, przy czym wartość pH osiągnęła $5,67 \pm 0,01$ w 4. tygodniu badania (T4) oraz $5,61 \pm 0,01$ w T12. W warunkach przyspieszonego starzenia w temp. 45°C pH pozostawało stabilne i wynosiło $5,64 \pm 0,01$ od T4 do T12. Emulsja DW02 wykazywała nieco większe wahania, szczególnie w temp. 4°C , gdzie pH osiągnęło maksymalną wartość $5,73 \pm 0,01$ w 8. tygodniu badania (T8), a następnie powróciło do wartości $5,56 \pm 0,01$ w T12. W 12. tygodniu (T12) wartości pH odnotowane dla DW02 w temperaturze pokojowej i 45°C wynosiły odpowiednio $5,63 \pm 0,02$ oraz $5,65 \pm 0,01$. DW01 wykazywała mniejsze zmiany pH niż DW02, szczególnie w temperaturze pokojowej. Emulsje DW03 i DW04 wykazywały podobny początkowy wzrost pH w zależności od temperatury przechowywania, osiągając w 1. tygodniu (T1) wartości 6,47–6,50. W temp. 45°C wartości pH pozostawały zbliżone do poziomu początkowego, a w 4. tygodniu (T4) wynosiły $6,38 \pm 0,01$ dla DW03 oraz $6,41 \pm 0,01$ dla DW04. Zaobserwowane stopniowe obniżanie wartości pH było najbardziej widoczne w warunkach przyspieszonego starzenia. W 12. tygodniu wartości pH dla DW03 wynosiły $6,25 \pm 0,01$, $6,32 \pm 0,01$ oraz $6,22 \pm 0,02$, odpowiednio w temp. 4°C , pokojowej i 45°C . Korespondujące wartości dla DW04 wynosiły $6,38 \pm 0,01$, $6,36 \pm 0,01$ oraz $6,27 \pm 0,02$. Spadek pH był bardziej wyraźny w przypadku DW03 i DW04 niż w przypadku DW01 i DW02 oraz zauważalnie największy w podwyższonej temperaturze. Niemniej jednak wszystkie formulacje wykazywały jedynie niewielkie zmiany pH w ciągu całego 12-tygodniowego okresu przechowywania.

Analiza lepkości. Pomiary lepkości pozornej wykazały wyraźny podział badanych formulacji na 2 grupy o odmiennych wartościach lepkości. Emulsje z grupy I (DW01 i DW02) charakteryzowały się mniejszą lepkością początkową. Dla DW01 lepkość wynosiła $10680 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ w tygodniu wyjściowym (T0). Podczas przechowywania w temp. 4°C stopniowo zmniejszała się do $8200 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ w 12. tygodniu (T12). W temperaturze pokojowej lepkość ulegała wahaniom, osiągając $11720 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ w T4, a następnie $9600 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ w T12, co odpowiadało 10-proc. spadkowi w porównaniu z T0. W temp. 45°C zaobserwowano wyraźny wzrost lepkości do $23920 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ w T4. Emulsja DW02 charakteryzowała się wyższą początkową lepkością, wynoszącą $15760 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. W temperaturze pokojowej wartość parametru wzrosła do maksymalnej wartości $24040 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ w T8, a następnie zmniejszyła się do $20080 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ w T12, co odpowiadało 27-proc. wzrostowi w porównaniu z T0. W temp. 45°C lepkość osiągnęła wartość $26320 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ w T4, a następnie stopniowo zmniejszała się do $21600 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ w T12. Emulsje z grupy II (DW03 i DW04) wykazywały znacznie większą początkową lepkość, wynoszącą odpowiednio 45900 i $46800 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. W temp. 4°C lepkość obu formulacji nieznacznie wzrosła, osiągając w T12 wartości $50200 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ dla DW03 i $49400 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ dla DW04. W temperaturze pokojowej obserwowano stopniowe zmniejszanie lepkości, przy czym wartości końcowe wynosiły $42400 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ dla DW03 i $41600 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ dla DW04, co odpowiadało spadkom o odpowiednio 8 i 11%. Największy spadek odnotowano w temp. 45°C , gdzie w T12 lepkość wynosiła $30000 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ dla DW03 i $31900 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ dla DW04. W warunkach przyspieszonego starzenia spadek lepkości formulacji DW04 był zatem nieco mniejszy niż w przypadku formulacji DW03.

Analiza gęstości. Początkowa gęstość emulsji DW01 i DW02 wynosiła odpowiednio $0,8617 \pm 0,0015$ oraz $0,9344 \pm 0,0009 \text{ g/cm}^3$. Po 12 tygodniach przechowywania DW01 wykazywała wyraźny wzrost gęstości we wszystkich badanych temperaturach, osiągając wartość ok. $0,985 \text{ g/cm}^3$. W przypadku DW02 zmiany były mniej intensywne, a wzrost gęstości wynosił 4–5% w zależności od temperatury przechowywania. Emulsje DW03 i DW04 wykazywały znacznie większą stabilność parametru gęstości. Początkowa gęstość wynosiła $1,0040 \pm 0,0001 \text{ g/cm}^3$ dla DW03 oraz $0,9894 \pm 0,0006 - 0,0011 \text{ g/cm}^3$ dla DW04. Po 12 tygodniach (T12) zmiany gęstości DW03 pozostawały poniżej 0,2% we wszystkich warunkach przechowywania. W przypadku DW04 obserwowano niewielki wzrost gęstości zależny od temperatury, wynoszący od 0,2% w temp. 4°C do 1,2% w temp. 45°C . Emulsje DW03 i DW04 charakteryzowały się znacznie większą stabilnością gęstości niż emulsje DW01 i DW02. Spośród wszystkich formulacji DW03 charakteryzowała się najmniejszymi zmianami, w tym spadkiem gęstości o zaledwie 0,1% po przechowywaniu w temp. 45°C , natomiast największą zmianę w przypadku DW04 stanowił wzrost gęstości o 1,2% w temp. 45°C .

Stabilność fizyczna emulsji do stosowania miejscowego zawierających ekstrakt z *Humulus lupulus* L. (HL) oraz emulsji referencyjnych

Analiza metodą wielokrotnego rozpraszania światła wykazała, że wszystkie 4 emulsje pozostawały stabilne przez 12 tygodni przechowywania w temp. 4°C oraz w temperaturze pokojowej. W tych warunkach TSI nie przekraczał wartości 1,0 dla DW01 i DW02 ani 2,0 dla DW03 i DW04. Przechowywanie w temp. 45°C doprowadziło do zależnej od formulacji destabilizacji, przy czym zaobserwowano wyraźne różnice między zastosowanymi układami emulsyjnymi (grupami I i II). W przypadku emulsji DW01 wartość TSI w temp. 45°C wzrastała gwałtownie, z 2,95 w T1 do 5,37 w T2, 6,89 w T3 i 8,24 w T4, wskazując na postępującą destabilizację już od początku badania (rys. 1a). Emulsja DW02 również wykazywała reakcję na stres termiczny w 1. tygodniu badania (T1), kiedy wartość TSI osiągnęła 4,09.

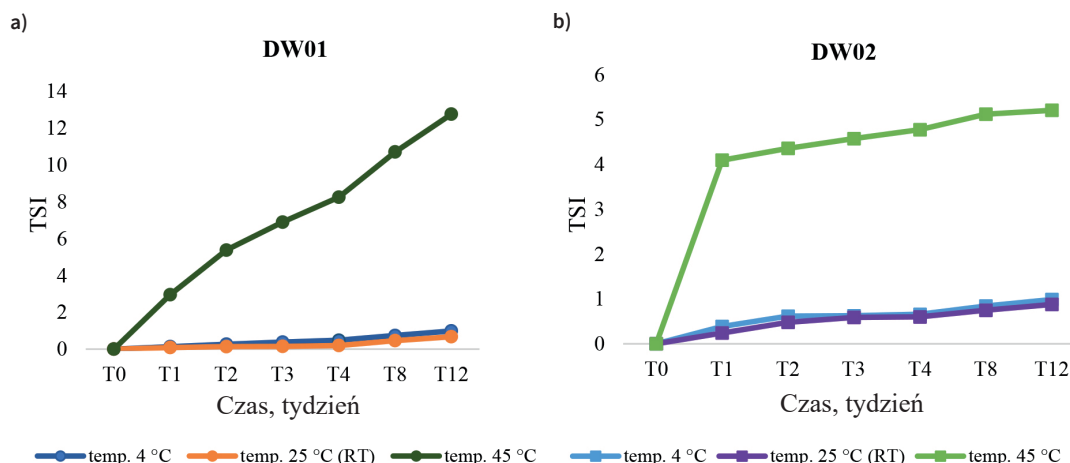


Fig. 1. Changes in the Turbiscan Stability Index of the topical formulations: a) DW01, and b) DW02 stored under various temperature conditions (4°C, RT, 45°C) for 12 weeks

Rys. 1. Zmiany wskaźnika stabilności (TSI) opracowanych formulacji: a) DW01 i b) DW02, podczas 12-tygodniowego przechowywania w różnych temperaturach (4, 25, 45°C)

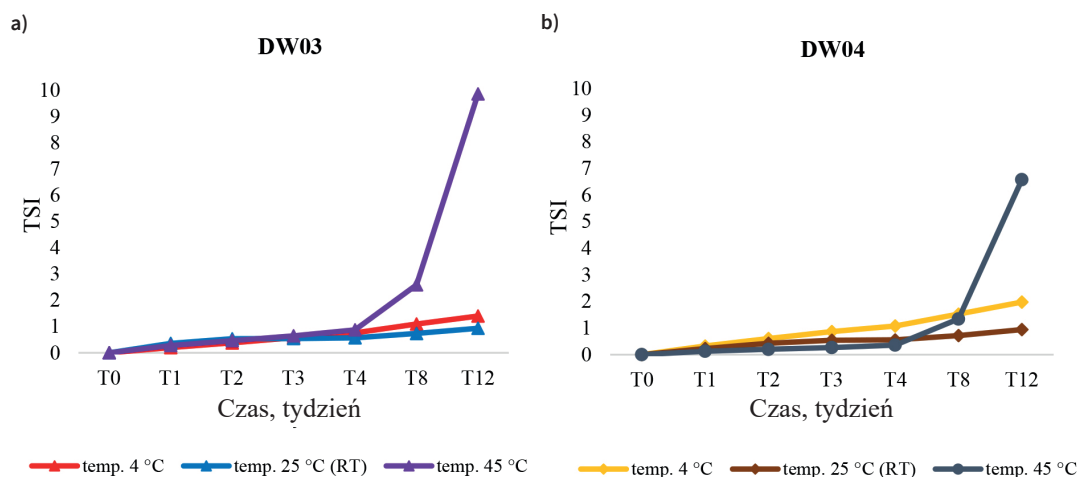


Fig. 2. Changes in the Turbiscan Stability Index of the topical formulations a) DW03, and b) DW04 stored under various temperature conditions (4°C, RT, 45°C) for 12 weeks

Rys. 2. Zmiany wskaźnika stabilności (TSI) opracowanych formulacji: a) DW03 i b) DW04, podczas 12-tygodniowego przechowywania w różnych temperaturach (4, 25, 45°C)

Jednak późniejszy wzrost był mniej wyraźny, a wartości TSI wynosiły 4,36, 4,58, 4,77, 5,12 i 5,21, odpowiednio w T2, T3, T4, T8 i T12 (rys. 1b).

Profile Δ BS uzyskane w temp. 45°C były zgodne z wynikami TSI. W przypadku DW01 początkowo zaobserwowano spadek intensywności światła wstecznie rozproszonego w całej objętości próbki, przy czym zmiany te stopniowo nasilały się między T1 a T4. W czasie T8 i T12 profile przesunęły się w kierunku wartości wynoszących ok. -3%, co wskazywało na dalsze zmiany strukturalne układu, a nie na jego pełny powrót do stanu początkowego. W przypadku DW02 poziom intensywności odbicia wstecznego zmniejszył się o ok. 5% już w T1, a w T12 wartość osiągnęła ok. -30% na całej wysokości próbki. Narastające różnice między profilami rejestrowanymi od T4 do T12 wskazywały, że zmiany strukturalne, potencjalnie związane ze stopniowym zwiększaniem rozmiaru kropli lub ich koalescencją, postępowały przez cały okres przechowywania. W temperaturze pokojowej profile Δ BS formulacji DW01 i DW02 wykazywały znacznie mniejsze zmiany i na ogół pozostawały zbliżone do profilu początkowego. W przypadku DW01 większość wartości mieściła się w zakresie od 0 do -2%, przy czym w T12 w dolnej części próbki odnotowano miejscowy spadek do ok. -2,5%. W temp. 4°C lokalne zmiany wartości Δ BS dla DW01 wynosiły od ok. -6–3%, natomiast maksymalna zmiana obserwowana dla DW02 osiągnęła ok. 4% w T12.

W przypadku emulsji DW03 i DW04 destabilizacja podczas przechowywania w temp. 45°C następowała później niż w przypadku emulsji DW01 i DW02. Wartości TSI pozostawały niskie w ciągu pierwszych 4 tygodni, a w T8 wzrosły do odpowiednio 2,58 i 1,34 (rys. 2). W T12 wartość TSI osiągnęła

9,85 dla DW03 i 6,57 dla DW04, co wskazuje na wyraźną utratę stabilności w końcowym etapie przechowywania w warunkach przyspieszonego starzenia.

Profil Δ BS formulacji DW04 przechowywanej w temp. 45°C ulegał jedynie niewielkim zmianom w ciągu pierwszych 4 tygodni, co potwierdzało dobrą stabilność układu w początkowym okresie przechowywania. W T12 w górnej części próbki odnotowano

jednak wyraźny spadek wartości Δ BS, sięgający ok. -65%, co wskazywało na znaczne miejscowe klarowanie układu oraz migrację fazy. W przypadku DW03 zmiany stały się widoczne wcześniej, a profile zarejestrowane w T4 i T8 wykazywały większe odchylenia od profilu początkowego. W T12 wartość Δ BS w górnej części próbki zmniejszyła się o ponad 30%. W temperaturze pokojowej zarówno DW03, jak i DW04 zachowywały względną stabilność, a zmiany wartości Δ BS przez cały okres badania nie przekraczały 10%. W dolnej części próbek obserwowano niewielki wzrost intensywności światła wstecznie rozproszonego. W przypadku DW03 między T4 a T12 na większości wysokości próbki odnotowano stopniowy spadek wartości Δ BS o ok. 5%, czyli nieco większy niż w przypadku DW04. W temp. 4°C procesy destabilizacji przebiegały wolniej. Po 12 tygodniach całkowita zmiana wartości Δ BS dla DW03 wynosiła 5–6% i była nieco mniejsza niż w przypadku DW04.

Opracowane układy emulsyjne różniły się znacznie w odpowiedzi na stres termiczny wywołany przez przechowywanie emulsji w podwyższonej temperaturze. Formułacje DW01 i DW02 wykazywały oznaki destabilizacji już w 1. tygodniu przechowywania w temp. 45°C, podczas gdy DW03 i DW04 pozostawały stosunkowo stabilne aż do 8. tygodnia (T8). Wpływ dodatku ekstraktu z chmielu zależał od zastosowanego podłoża emulsyjnego. Emulsja DW01 ulegała destabilizacji szybciej niż odpowiadająca jej formuła referencyjna DW02, pozbawiona ekstraktu, natomiast formułacje DW03 i DW04 zachowywały się podobnie w początkowym okresie przechowywania, chociaż w T12 emulsja DW03 osiągnęła wyższą globalną wartość TSI. Niemniej jednak formuła DW03 wykazywała większą ogólną odporność na wczesną destabilizację termiczną w porównaniu z DW01. W standardowych warunkach przechowywania, czyli w temp. 4°C i temperaturze pokojowej, niskie wartości TSI oraz niewielkie zmiany Δ BS potwierdziły zadowalającą stabilność wszystkich badanych formułacji przez 12-tygodniowy okres trwania badania.

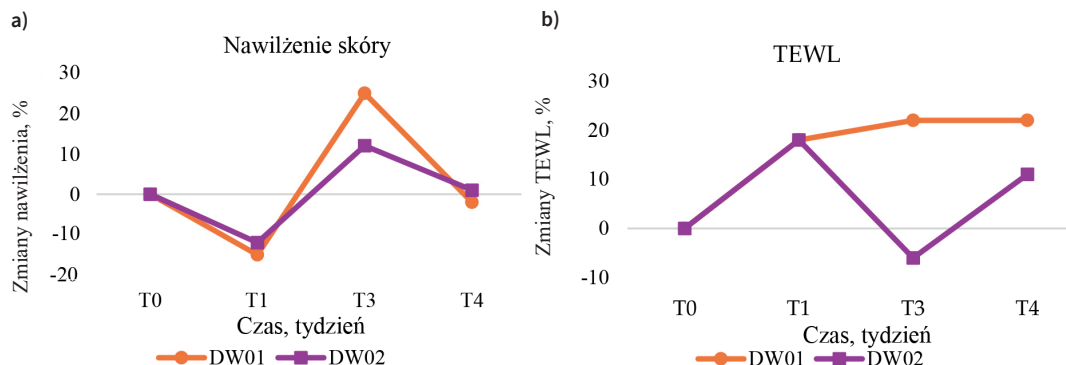


Fig. 3. Changes in skin hydration (a) and transepidermal water loss (b) determined for the DW01 and DW02 topical formulations during a 4-week *in vivo* study (group I)

Rys. 3. Zmiany nawilżenia skóry (a) i przeznaskórkowej utraty wody (b) dla opracowanych emulsji DW01 i DW02 podczas 4-tygodniowych badań *in vivo* (grupa I)

Wpływ zaprojektowanych emulsji na parametry skóry (ocena *in vivo*)

Nawilżenie skóry i przeznaskórkowa utrata wody. W grupie I DW01 i odpowiadająca jej formuła referencyjna DW02 niezawierająca HL wykazywały porównywalne profile nawilżenia warstwy rogowej naskórka (rys. 3a). Dla obu formułacji potwierdzono istotny ogólny wpływ stosowania tych produktów: dla DW01 $p = 0,031$, a dla DW02 $p = 0,038$. Po 1. tygodniu stosowania (T1) nawilżenie zmniejszyło się w porównaniu z wartością wyjściową (T0) dla obu formułacji (T0 vs. T1: DW01, p skorygowane metodą Holma $p_{adj} = 0,042$; DW02, $p_{adj} = 0,036$). W T3 obserwowano przejściowy wzrost nawilżenia, w porównaniu z wartością wyjściową zmiana ta była istotna statystycznie dla DW01 ($p_{adj} = 0,016$), ale nie dla DW02 ($p_{adj} = 0,068$). W T4 nawilżenie powróciło do wartości zbliżonych do wartości wyjściowych. Na obszarze skóry poddawanej działaniu DW01 nawilżenie było o mniej niż 2% mniejsze niż w T0, natomiast w przypadku DW02 nie obserwowano istotnej zmiany (T0 vs. T4: DW01, $p_{adj} = 0,812$; DW02, $p_{adj} = 0,924$). Zmiany względem wartości wyjściowej w T4 nie różniły się istotnie między DW01 i DW02 ($p = 0,701$).

W badaniu zaobserwowano istotny wpływ aplikacji zaprojektowanych produktów na wartość parametru TEWL zarówno dla emulsji DW01 ($p = 0,004$), jak i DW02 ($p = 0,026$) (rys. 3b). Po 1. tygodniu trwania badania TEWL wzrósł o 18% w przypadku obu formułacji w porównaniu z wartością wyjściową (T0 vs. T1: DW01, $p_{adj} = 0,021$; DW02, $p_{adj} = 0,034$). W T3 TEWL w obszarze skóry poddawanej działaniu DW02 był o 6% niższy niż w T0, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie ($p_{adj} = 0,192$). Po 4 tygodniach trwania testu TEWL był o 22% wyższy niż wartość wyjściowa dla DW01 i o 11% wyższy dla DW02 (T0 vs. T4: DW01, $p_{adj} = 0,006$; DW02, $p_{adj} = 0,048$). Wzrost TEWL względem wartości wyjściowej w 4. tygodniu (T4) był istotnie większy dla DW01 niż dla DW02 ($p = 0,039$).

W grupie II, w której badano emulsję DW03 oraz odpowiadającą jej formułę referencyjną DW04 niezawiera-

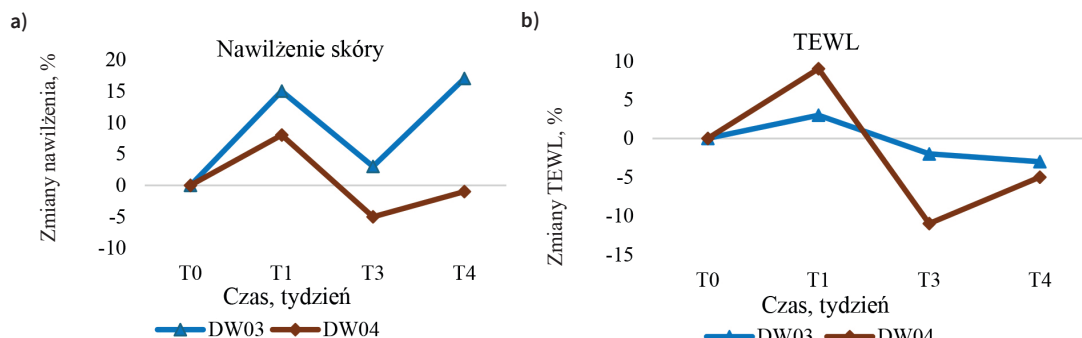


Fig. 4. Changes in skin hydration (a) and transepidermal water loss (b) determined for the DW03 and DW04 topical formulations during a 4-week in vivo study (group II)

Rys. 4. Zmiany nawilżenia skóry (a) i przeskórnącej utraty wody (b) dla opracowanych emulsji DW03 i DW04 podczas 4-tygodniowych badań *in vivo* (grupa II)

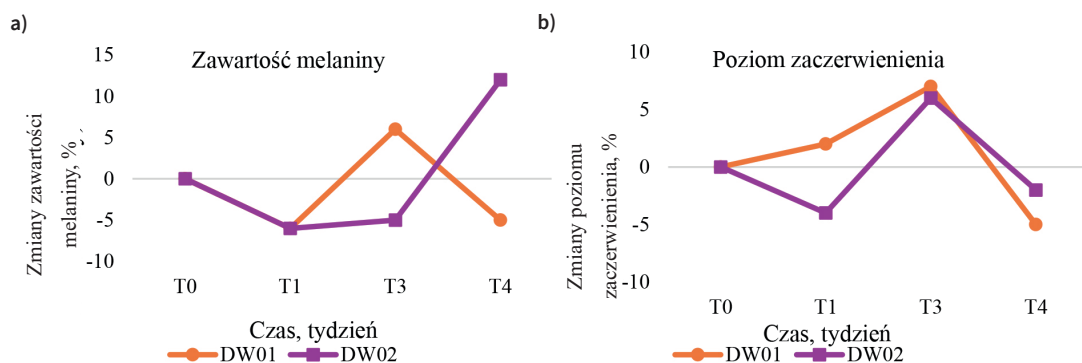


Fig. 5. Changes in skin melanin content (a) and erythema level (b) determined for the DW01 and DW02 topical formulations during a 4-week in vivo study (group I)

Rys. 5. Zmiany zawartości melaniny (a) i poziomu zaczerwienienia (b) dla opracowanych emulsji DW01 i DW02 podczas 4-tygodniowego badania *in vivo* (grupa I)

jącą HL, obserwowano odmienny profil zmian nawilżenia (rys. 4a). Dla obu formułacji potwierdzono istotność statystyczną wyników dotyczących nawilżenia: dla DW03 $p < 0,001$, a dla DW04 $p = 0,045$. Po tygodniu stosowania nawilżenie wzrosło w porównaniu z wartością wyjściową o 15% w obszarze skóry poddawanej działaniu DW03 oraz o 8% w obszarze poddawany działaniu DW04 (T0 vs. T1: DW03, $p_{adj} = 0,008$; DW04, $p_{adj} = 0,049$). W T3 nawilżenie było o 3% wyższe niż wartość wyjściowa dla DW03 i o 5% niższe dla DW04, jednak żadna z tych zmian nie była istotna statystycznie (DW03, $p_{adj} = 0,368$; DW04, $p_{adj} = 0,123$). Po 4 tygodniach stosowania emulsji DW03 nawilżenie wzrosło o 17% ($p_{adj} = 0,002$), natomiast w przypadku DW04 odnotowano nieistotny statystycznie spadek o 1% ($p_{adj} = 0,744$). Zmiany względem wartości wyjściowej w 4. tygodniu (T4) różniły się istotnie między DW03 i DW04 ($p = 0,004$).

Zmiany wartości TEWL w czasie dla DW03 nie były istotne statystycznie ($p = 0,284$), w związku z czym dla tej formułacji nie przeprowadzono dalszych porównań *post hoc* (rys. 4b). W przypadku emulsji DW03 TEWL wzrósł o 3% w 1. tygodniu (T1), natomiast w T4 był o 3% niższy niż wartość wyjściowa. W przypadku DW04 zmiany TEWL w czasie były istotne statystycznie ($p = 0,017$). W T1 TEWL wzrósł o 9% w porównaniu z wartością wyjściową ($p_{adj} = 0,039$). W okresie T1–T3 TEWL zmniejszył się o 11%, a w T4 był o 5% niższy niż wartość wyjściowa. Różnica między T0 a T4 nie była jednak istotna statystycznie ($p_{adj} = 0,204$). Zmiana TEWL względem wartości wyjściowej

w T4 nie różniła się istotnie między DW03 a DW04 ($p = 0,591$).

Eksploracyjne porównanie formułacji zawierających ekstrakt z chmielu wykazało odmienny charakter wpływu na omawiane parametry skóry po 4 tygodniach stosowania. W porównaniu z wartościami wyjściowymi formułacja DW03 zwiększała nawilżenie skóry o 17% i zmniejszała TEWL o 3%, natomiast formułacja DW01 zmniejszała nawilżenie o ok. 2% i zwiększała TEWL o 22%. Zmiany względem wartości wyjściowych w 4. tygodniu badania (T4) różniły się istotnie między DW01 i DW03 zarówno w zakresie parametru nawilżenia skóry ($p = 0,002$), jak i wartości TEWL ($p = 0,005$).

Parametry kolorytu skóry. W grupie I parametry kolorytu skóry wykazywały zmiany zależne od zastosowanego podłoża kosmetycznego oraz od czasu stosowania (rys. 5). W przypadku wskaźnika melaniny dla formułacji DW01 stwierdzono istotne statystycznie zmiany w czasie ($p = 0,041$). W porównaniu z wartością wyjściową (T0) zawartość melaniny zmniejszyła się o 6% w T1, wzrosła o 6% w T3, a następnie ponownie zmniejszyła się o 5% w T4. Zmiany obserwowane w T1 i T3 nie były istotne statystycznie ($p_{adj} = 0,083$ i $p_{adj} = 0,071$), natomiast spadek odnotowany w T4 był istotny statystycznie ($p_{adj} = 0,046$). W przypadku formułacji DW02 również stwierdzono istotne statystycznie zmiany zawartości melaniny w czasie ($p = 0,009$). Wartość ta zmniejszyła się o 6% w T1 i o 5% w T3, a następnie w T4 wzrosła o 12%. Zmiany zaobserwowane w T1 i T3 nie były istotne statystycznie ($p_{adj} = 0,118$ i $p_{adj} = 0,142$), natomiast wzrost odnotowany w T4 był istotny statystycznie ($p_{adj} = 0,012$). W T4 zmiana względem wartości wyjściowej różniła się istotnie między DW01 a DW02 ($p = 0,006$). Poziom rumienia w obszarze skóry poddawanej działaniu emulsji DW01 wzrósł o 2% w T1 i o 7% w T3, a następnie w 4. tygodniu (T4) zmniejszył się o 5% w porównaniu z wartością wyjściową. Zmiany zaczerwienienia w czasie były istotne statystycznie ($p = 0,018$), natomiast zmiana w T1 nie była istotna statystycznie ($p_{adj} = 0,284$), a wzrost w T3 i następujący po nim spadek w T4 były istotne statystycznie (odpowiednio $p_{adj} = 0,034$).

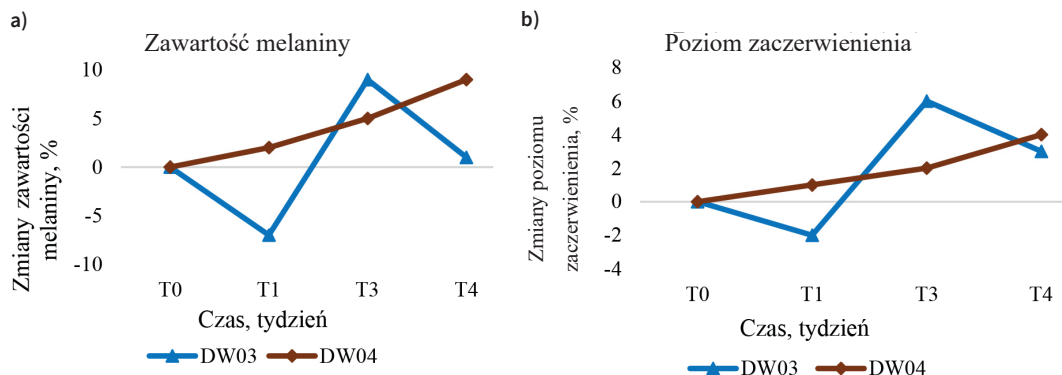


Fig. 6. Changes in skin melanin content (a) and erythema level (b) determined for the DW03 and DW04 topical formulations during a 4-week in vivo study (group II)

Rys. 6. Zmiany zawartości melaniny (a) i poziomu zaczerwienienia (b) dla opracowanych emulsji DW03 i DW04 podczas 4-tygodniowego badania *in vivo* (grupa II)

i $p_{adj} = 0,048$). W przypadku formułacji DW02 poziom rumienia zmniejszył się o 4% w T1, wzrósł o 6% w T3, a następnie ponownie zmniejszył się o 2% w T4. Zmiany te nie były istotne statystycznie w czasie ($p = 0,089$), dlatego nie przeprowadzono dalszych porównań *post hoc*. W 4. tygodniu (T4) zmiana zaczerwienienia skóry względem wartości wyjściowej różniła się istotnie między DW01 i DW02 ($p = 0,041$).

W grupie II, w przypadku formułacji DW03, zaobserwowano początkowo zmniejszenie obu wskaźników kolorytu skóry, po czym w kolejnych pomiarach następował ich wzrost, natomiast DW04 wykazywała ogólną tendencję wzrostową (rys. 6). W przypadku DW03 zmiany zawartości melaniny w czasie były istotne statystycznie ($p = 0,006$). Wskaźnik ten zmniejszył się o 7% w T1 ($p_{adj} = 0,021$), wzrósł o 9% w T3 ($p_{adj} = 0,013$), a w T4 pozostał o 1% powyżej wartości wyjściowej ($p_{adj} = 0,721$). W odniesieniu do formułacji DW04 zawartość melaniny wzrosła o odpowiednio 2, 5 i 9% w T1, T3 i T4, a jej zmiany w czasie były istotne statystycznie ($p = 0,022$). Zmiany w T1 i T3 nie były istotne statystycznie (odpowiednio, $p_{adj} = 0,442$ i $p_{adj} = 0,086$), natomiast wzrost o 9% w T4 był istotny statystycznie ($p_{adj} = 0,027$). W 4. tygodniu badania zmiana poziomu melaniny względem wartości wyjściowej różniła się istotnie między DW03 a DW04 ($p = 0,031$). W przypadku zaczerwienienia dla DW03 odnotowano zmniejszenie wartości o 2% w 1. tygodniu (T1), a następnie wzrost o 6% w T3 i o 3% w T4. Zmiany wskaźnika rumienia w czasie były istotne statystycznie ($p = 0,044$). Zmiana w T1 oraz wzrost w T4 nie były istotne statystycznie ($p_{adj} = 0,312$ i $p_{adj} = 0,118$), natomiast wzrost w T3 był istotny statystycznie ($p_{adj} = 0,049$). Stosowanie

emulsji DW04 stopniowo zwiększało zaczerwienienie skóry, o 1% w T1, 2% w T3 i 4% w T4. Zmiany wskaźnika rumienia w czasie nie były jednak istotne statystycznie ($p = 0,164$). W ostatnim tygodniu T4 zmiana względem wartości wyjściowej nie różniła się istotnie między DW03 i DW04 ($p = 0,493$).

Porównanie formułacji DW01 oraz DW03 wykazało odmienne zmiany

parametrów kolorytu skóry po 4 tygodniach stosowania. W przypadku formułacji DW01 odnotowano zmniejszenie o 5% zarówno poziomu melaniny, jak i rumienia w porównaniu z wartością wyjściową, natomiast w przypadku DW03 stwierdzono wzrost zawartości melaniny o 1% oraz zaczerwienienia o 3%. Zmiany względem wartości wyjściowej różniły się istotnie między DW01 i DW03 zarówno w zakresie melaniny ($p = 0,029$), jak i rumienia ($p = 0,017$). W przypadku formułacji DW01 zmniejszenie ocenianych parametrów kolorytu zaobserwowano dopiero w końcowym etapie badania, podczas gdy początkowe spadki odnotowane dla DW03 w T1 nie utrzymały się do T4. Również formułacje referencyjne niezawierające ekstraktu różniły się pod względem obserwowanych zmian, w przypadku DW02 w T4 odnotowano wzrost zawartości melaniny pomimo niewielkiego zmniejszenia poziomu rumienia, natomiast w przypadku DW04 obserwowano stopniowy wzrost obu parametrów.

Parametry topografii skóry. W grupie I zarówno emulsja DW01, jak i odpowiadająca jej formułacja referencyjna DW02 niezawierająca HL, spowodowały mierzalne zmiany topografii skóry po 4 tygodniach stosowania (rys. 7). Wskaźnik SER (parametr szorstkości skóry, *surface*

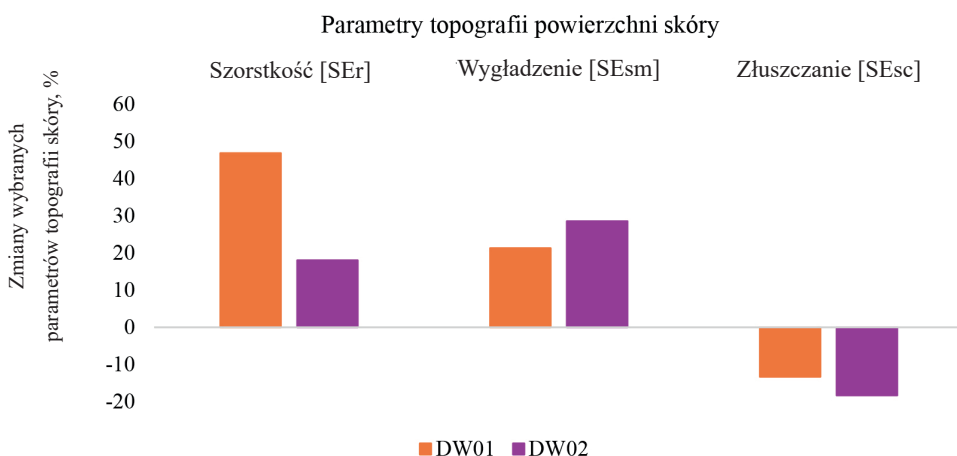


Fig. 7. Changes in selected skin topography parameters determined for the DW01 and DW02 topical formulations during in vivo studies (group I) after 4 weeks of application

Rys. 7. Zmiany wybranych parametrów topografii skóry określone dla opracowanych emulsji DW01 i DW02 podczas badań *in vivo* (grupa I), po 4-tygodniowym okresie stosowania

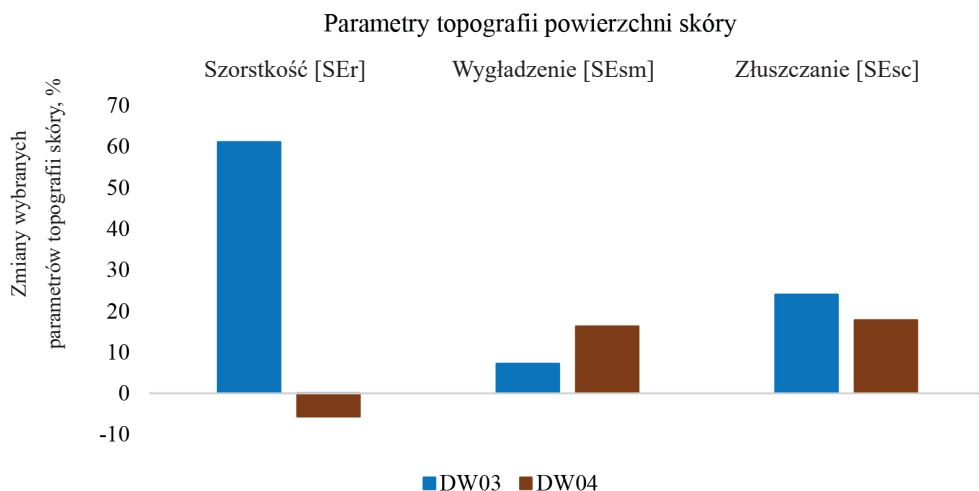


Fig. 8. Changes in selected skin topography parameters determined for the DW03 and DW04 topical formulations during in vivo studies (group II) after 4 weeks of application

Rys. 8. Zmiany wybranych parametrów topografii skóry określone dla opracowanych emulsji DW03 i DW04 podczas badań in vivo (grupa II), po 4-tygodniowym okresie stosowania

evaluation of living skin – roughness) wzrósł o 47% po zastosowaniu DW01 oraz o 18% po zastosowaniu DW02 w porównaniu z wartością wyjściową (T0). Zmiany między T0 a T4 były istotne statystycznie zarówno dla DW01 ($p = 0,003$), jak i DW02 ($p = 0,041$). Porównanie indywidualnych zmian względem wartości wyjściowej wykazało istotnie większy wzrost SEr dla DW01 niż dla DW02 ($p = 0,018$). Wskaźnik złuszczenia SEsc (skin scaliness) zmniejszył się o 13% w obszarze skóry poddawanej działaniu DW01 oraz o 18% w obszarze skóry poddawanej działaniu DW02. Zmiany te były istotne statystycznie w porównaniu z wartością wyjściową (DW01 $p = 0,027$; DW02 $p = 0,011$). Jednak stopień zmniejszenia wskaźnika SEsc nie różnił się istotnie między obiema formułacjami ($p = 0,284$). Wskaźnik gładkości SEsm (skin smoothness) wzrósł o 21% po zastosowaniu formułacji DW01 oraz o 29% po zastosowaniu formułacji DW02. Zmiany względem wartości wyjściowej były istotne statystycznie dla obu formułacji (DW01 $p = 0,015$; DW02 $p = 0,006$). Choć wzrost był liczbowo mniejszy dla DW01, różnica $\Delta T4$ między DW01 i DW02 nie osiągnęła istotności statystycznej ($p = 0,079$). Tym samym DW01 i DW02 wykazywały podobny wpływ na parametr SEsc, natomiast różnice w ich wpływie na szorstkość (SEr) były wyraźniejsze.

W grupie II formułacje DW03 oraz DW04 wykazywały odmienne zmiany parametrów topografii skóry po 4 tygodniach stosowania (rys. 8). Wskaźnik SEr wzrósł o 61% po zastosowaniu DW03 ($p = 0,001$), natomiast w przypadku DW04 odnotowano jego zmniejszenie o 6%; zmiana ta nie była istotna statystycznie ($p = 0,214$). Porównanie $\Delta T4$ wykazało istotną różnicę między DW03 a DW04 ($p = 0,002$). Wskaźnik SEsc wzrósł o 24% w obszarze skóry poddawanej działaniu DW03 oraz o 18% w obszarze skóry poddawanej działaniu DW04. Obie zmiany między T0 a T4 były istotne statystycznie (DW03 $p = 0,009$; DW04 $p = 0,026$), jednak różnica między obiema formułacjami nie była istotna statystycznie ($p = 0,173$). Wskaźnik SEsm wzrósł o 7% po zastosowaniu DW03 oraz

o 16% po zastosowaniu DW04. Zmiana obserwowana dla DW03 nie była istotna statystycznie ($p = 0,168$), natomiast wzrost odnotowany dla DW04 był istotny statystycznie ($p = 0,018$). Zmiany względem wartości wyjściowej różniły się istotnie między DW03 a DW04 ($p = 0,041$), co wskazuje na mniej nasilone zmiany parametru SEsm po zastosowaniu formułacji zawierającej ekstrakt z chmielu.

Porównanie formułacji zawierających ekstrakt HL wykazało różnice w zmianach parametrów topografii skóry po 4 tygodniach stosowania. Wskaźnik SEr wzrósł o 47% po zastosowaniu DW01 oraz o 61% po zastosowaniu DW03. Różnica między

niezależnymi grupami badanymi nie była istotna statystycznie ($p = 0,112$). Wskaźnik SEsc zmniejszył się o 13% po zastosowaniu DW01, podczas gdy po zastosowaniu DW03 wzrósł o 24%, co przełożyło się na istotną statystycznie różnicę między grupami ($p = 0,003$). Wzrost wskaźnika SEsm był większy dla DW01 niż dla DW03 i wynosił odpowiednio 21 i 7%; różnica ta również była istotna statystycznie ($p = 0,027$).

Omówienie wyników

Wpływ struktury podłoża na stabilność fizyczną emulsji O/W zawierających ekstrakt HL

Badanie zaprojektowano w celu oceny, czy 2 podłoża należące do tej samej klasy postaci emulsji O/W mogą znacząco różnić się zdolnością do zastosowania w formułacji zawierającej ten sam komercyjny składnik HL. Zagadnienie to jest istotne, ponieważ wcześniejsze badania wykazały wyraźną zależność działania miejscowego HL od zastosowanego systemu galenowego, porównując kremy O/W i W/O¹³). W niniejszym badaniu porównanie było węższe i ukierunkowane na aspekty formułacyjne: oba systemy były emulsjami O/W, jednak ich skład oraz stopień organizacji strukturalnej wyraźnie się różniły. Wyniki wskazują, że różnice te były wystarczające do uzyskania odmiennych profili stabilności, co potwierdza, że architektura formułacji jest istotnym czynnikiem determinującym właściwości złożonych składników pochodzenia roślinnego. Wszystkie formułacje wykazywały stosunkowo niewielkie zmiany pH podczas 12 tygodni przechowywania. Emulsje DW01 i DW02 utrzymywały pH w umiarkowanie kwaśnym zakresie 5,55–5,73, natomiast dla DW03 i DW04 wartości te mieściły się w zakresie 6,22–6,50. Choć pH może wpływać na działanie emulgatorów, stopień hydratacji polimerów oraz stan jonizacji składników formułacji²²), różnic w stabilności obu systemów podłoży nie można wyjaśnić wyłącznie różnicami w pH. Najbardziej wyraźną różnicą fizykochemiczną była wartość lepkości pozornej, jej początkowe

wartości dla DW03 i DW04 wynosiły odpowiednio ok. 45900 i 46800 mPa·s w porównaniu z 10680 mPa·s dla DW01 oraz 15760 mPa·s dla DW02. Większa lepkość fazy ciągłej powinna ograniczać ruchliwość kropeł fazy rozproszonej i może opóźniać ich grawitacyjne przemieszczanie się, a tym samym rozdział faz w emulsjach o uporządkowanej strukturze^{4, 5)}. Ponieważ lepkość mierzono przy jednym ustalonym parametrze pomiaru rotacyjnego, a nie w całym zakresie szybkości ścinania, uzyskane dane należy interpretować jako wartości porównawcze lepkości pozornej, a nie jako pełną charakterystykę właściwości reologicznych. Wyniki pomiarów gęstości oraz analizy metodą MLS wskazywały na większą stabilność fizyczną podłoży DW03/DW04. Po 12 tygodniach zmiany wartości gęstości pozostawały poniżej 0,2% dla DW03 i nie przekraczały 1,2% dla DW04, podczas gdy DW01 i DW02 wykazywały znacznie większe różnice. W temp. 4°C oraz w temperaturze pokojowej wszystkie formułacje wykazywały niskie wartości wskaźnika TSI przez cały okres badania, co sugerowało zadowalającą stabilność fizyczną w testowanych warunkach przechowywania. W temp. 45°C DW01 i DW02 wykazywały mierzalne oznaki destabilizacji już od 1. tygodnia badania, podczas gdy DW03 i DW04 pozostawały stosunkowo stabilne przez pierwsze 4 tygodnie, a wzrost TSI następował dopiero w późniejszym okresie. Oznacza to, że podłoże o większej lepkości pozornej nie zapobiegało destabilizacji termicznej, lecz opóźniało jej wystąpienie. Profile wstecznego rozpraszania światła dodatkowo wskazywały na zależne od formułacji zmiany strukturalne. W formułacjach DW01 i DW02 zmiany obejmowały znaczną część wysokości próbki, natomiast w DW03 i DW04 pojawiały się później i były zlokalizowane bardziej w jej górnej części. Obserwacje te są zgodne ze zmianami w oddziaływaniach między kroplami oraz ich migracji, jednak sama metoda MLS nie pozwala jednoznacznie rozróżnić flokulacji, koalescencji ani zmian wielkości kropeł⁶⁾. Ponieważ nie wykonano uzupełniających badań mikroskopowych ani analizy wielkości kropeł, nie można jednoznacznie przypisać obserwowanej destabilizacji konkretnemu mechanizmowi wykraczającemu poza to, co wynika z danych dotyczących wstecznego rozpraszania światła. Porównanie formułacji zawierających ekstrakt HL z odpowiadającymi im formułacjami referencyjnymi również wymaga ostrożnej interpretacji. Komercyjny surowiec HL zawierał propanodiol, glicerynę, ekstrakt z *Humulus lupulus* L. oraz kwas cytrynowy, natomiast formułacje referencyjne przygotowano poprzez pominięcie komercyjnego składnika, a nie poprzez zastąpienie pozostałych składników jego podłoża innymi substancjami. W związku z tym różnic między DW01 i DW02 oraz między DW03 i DW04 nie można przypisać wyłącznie składnikom pochodzącym z chmielu. Odzwierciedlają one efekt związany z wprowadzeniem kompletnego komercyjnego składnika zawierającego HL do każdego z podłoży. Ograniczenie to ma szczególne znaczenie w kontekście badań formułacyjnych i nie pozwala na wnioskowanie o swoistym działaniu synergistycznym ekstraktu HL w połączeniu z poszczególnymi substancjami pomocniczymi.

Wpływ struktury podłoża na odpowiedź bariery skórnej *in vivo*

Nawilżenie warstwy rogowej naskórka oraz wskaźnik TEWL uznano za podstawowe parametry związane z funkcjonowaniem bariery skórnej, ponieważ opisują uzupełniające się aspekty gospodarki wodnej naskórka. Nawilżenie odzwierciedla zawartość wody w powierzchniowej warstwie rogowej naskórka, natomiast parametr TEWL odzwierciedla bierny przepływ wody przez barierę naskórkową^{1, 2, 23)}. Parametry te należy interpretować łącznie: wzrost nawilżenia bez towarzyszącego zmniejszenia TEWL może przede wszystkim odzwierciedlać działanie humektantowe, podczas gdy zmniejszenie TEWL może wskazywać na poprawę kontroli utraty wody poprzez tworzenie filmu powierzchniowego, uzupełnianie lipidów lub częściowe działanie okluzyjne. Najbardziej spójną odpowiedź w zakresie parametrów bariery skórnej obserwowano w przypadku emulsji DW03. Po 4 tygodniach badania nawilżenie warstwy rogowej naskórka wzrosło o 17% względem wartości wyjściowej, a zmiana ta różniła się istotnie od tej obserwowanej dla odpowiadającej jej formułacji referencyjnej DW04. Wskaźnik TEWL w obszarze skóry poddawanej działaniu DW03 pozostawał zbliżony do wartości wyjściowej, zmniejszając się o 3%. Zaś w przypadku DW04 TEWL również utrzymywał się na poziomie zbliżonym do wartości wyjściowej, ale nie obserwowano utrzymującego się wzrostu nawilżenia. Podłoże DW03/DW04 zawierało kilka składników o potwierdzonym działaniu humektantowym lub wspierającym funkcjonowanie bariery skórnej, w tym glicerynę, pantenol, skwalan, ceramid NP oraz uwodorniony olej roślinny²⁴⁻²⁷⁾. Dodatkowy wzrost nawilżenia obserwowany dla DW03 może zatem być związany z wprowadzeniem komercyjnego składnika, ekstraktu HL. Ponieważ jednak formułacja referencyjna nie była dopasowana pod względem pozostałych składników wprowadzanych wraz z surowcem, nie można oddzielić udziału składników pochodzących z chmielu od wpływu propanodiolu i gliceryny obecnych w komercyjnym składniku HL. W przypadku podłoża DW01/DW02 obserwowany profil zmian był inny. Po 4 tygodniach testowania poziom nawilżenia powrócił do wartości zbliżonych do wyjściowych dla obu formułacji, podczas gdy parametr TEWL wzrósł o 22% dla DW01 i o 11% dla DW02, a wzrost ten był istotnie większy dla emulsji DW01. W związku z tym wprowadzenie komercyjnego składnika HL do tego podłoża nie poprawiło parametrów związanych z funkcjonowaniem bariery skórnej. Różnica między DW01 a DW03 jest istotna, jednak formułacje te badano w niezależnych grupach, a ich bezpośrednie porównanie miało charakter eksploracyjny. Wyniki należy zatem interpretować jako wskazujące na odmienne zmiany parametrów skóry, a nie jako kontrolowane potwierdzenie przewagi jednej formułacji nad drugą. Dodatkową cechą różnicującą skład obu systemów emulsyjnych była obecność dimetikonu, uwodornionego oleju roślinnego, pantenolu i skwalanu w DW03/DW04 oraz ich brak w DW01/DW02. W połączeniu z bardziej uporządkowaną fazą lipidową składniki te mogły sprzyjać tworzeniu bardziej ciągłego i trwałego filmu na powierzchni skóry, wspierając

zatrzymywanie wody i ograniczając jej utratę przesnaskórkową. Interpretacja ta jest zgodna z korzystniejszym profilem nawilżenia i TEWL obserwowanym dla DW03 w porównaniu z DW01. Jednocześnie lepsze właściwości fizykochemiczne systemu DW03/DW04 sugerują, że jego większa odporność na destabilizację mogła wynikać z łącznego wpływu obecności składnika silikonowego, składu fazy lipidowej oraz bardziej uporządkowanej struktury podłoża. Ponieważ jednak oba podłoża emulsyjne różniły się pod względem kilku zmiennych formuacyjnych, nie można wyodrębnić specyficznego udziału dimetikonu od wpływu pozostałych substancji pomocniczych. Wyniki wskazują zatem, że o ogólnych właściwościach fizykochemicznych formuacji oraz ich działaniu na skórę decydowały przede wszystkim skład jakościowy i organizacja strukturalna podłoża, a nie sama obecność HL. Wskaźniki melaniny, rumienia oraz topografii skóry uzyskane za pomocą aparatu Visioscan traktowano jako parametry drugorzędne. Obserwowane zmiany były niewielkie, zróżnicowane i zależne od formuacji, a ich charakter nie wskazywał na jednolite działanie depigmentacyjne ani przeciwrumieniowe, ani na ogólny wpływ formuacji zawierających ekstrakt HL na topografię skóry. Wskaźniki SELS (*surface evaluation of living skin*) opisują odrębne cechy optyczne i topograficzne skóry związane z szorstkością (SEr), złuszczeniem (SEsc) oraz gładkością (SEsm) i nie powinny być traktowane jako jeden zbiorczy wskaźnik poprawy stanu skóry^{28–30}). Ponieważ na wartości tych parametrów mogą również wpływać pozostałości formuacji na powierzchni skóry, lipidy powierzchniowe, odbicie światła oraz wyjściowe różnice w mikrorzeźbie skóry, należy je interpretować jako uzupełniające parametry opisowe, które nie stanowią bezpośredniej oceny integralności bariery naskórkowej.

Zależność między stabilnością formuacji a jej działaniem na skórę

Łączna analiza wyników badań fizykochemicznych i *in vivo* wykazała, że system podłoża DW03/DW04 charakteryzował się zarówno opóźnioną destabilizacją termiczną, jak i najkorzystniejszym profilem zmian parametrów nawilżenia w formuacji zawierającej HL. Zbieżność tych obserwacji sugeruje, że struktura podłoża może wpływać na sposób oddziaływania formuacji ze skórą. Bardziej uporządkowana strukturalnie emulsja może tworzyć na skórze trwalszy i bardziej równomierny film, wpływać na zatrzymywanie wody w warstwie rogowej naskórka oraz modyfikować miejscową dostępność składników aktywnych. Sugerowane mechanizmy znajdują uzasadnienie w opisanych w literaturze zależnościach między właściwościami reologicznymi emulsji, zdolnością do tworzenia filmu na powierzchni skóry a działaniem preparatów stosowanych miejscowo^{4, 24–27}). Ich udział w obserwowanych efektach pozostaje jednak przypuszczeniem, ponieważ nie był bezpośrednio oceniany w niniejszym badaniu. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki nie pozwalają ocenić różnic w uwalnianiu, przenikaniu przez skórę ani biodostępności związków pochodzących z chmielu. W niniejszym badaniu nie przeprowadzono oceny uwalniania *in vitro*, badań przenikania

przesnaskórkowego, oceny retencji w skórze ani ilościowej analizy zawartości ksantohumolu w gotowych emulsjach. W związku z tym zależność między strukturą podłoża a odpowiedzią *in vivo* należy interpretować jako zależność między właściwościami formuacji a jej działaniem na skórę, a nie jako dowód na określony mechanizm dostarczania składników do skóry. Rozróżnienie to ma istotne znaczenie dla właściwej interpretacji wyników w kontekście formuacji stosowanych miejscowo. Wyniki badań w warunkach przyspieszonego starzenia należy interpretować w analogiczny sposób. Ekspozycja na temp. 45°C stanowiła użyteczny wskaźnik umożliwiający porównanie stabilności obu systemów O/W, jednak nie pozwalała na bezpośrednie przewidzenie okresu trwałości produktu. Wzrost wartości parametru TSI obserwowany dla DW03 i DW04 między T8 a T12 wskazuje, że bardziej uporządkowany strukturalnie system ulegał destabilizacji podczas długotrwałego stresu termicznego, jednak destabilizacja następowała później niż w przypadku podłoża DW01/DW02 o mniejszej lepkości. W temp. 4°C oraz w temperaturze pokojowej wszystkie 4 formuacje pozostawały fizycznie stabilne przez cały 12-tygodniowy okres obserwacji.

Ograniczenia badania oraz ich znaczenie dla projektowania formuacji do stosowania miejscowego

Przy interpretacji wyników i formułowaniu wniosków z badania należy uwzględnić kilka ograniczeń. Po pierwsze, formuacje referencyjne nie zawierały odpowiedników składników obecnych w komercyjnym ekstrakcie HL, dlatego nie można jednoznacznie oddzielić wpływu składników pochodzących z chmielu od wpływu pozostałych składników wprowadzanych wraz z ekstraktem. Po drugie, ze względu na ograniczenia wynikające z ochrony informacji zastrzeżonych dokładne składniki przemysłowych formuacji podano w postaci wykazów INCI oraz zakresów stężeń zgodnych z CPNP, co ogranicza możliwość pełnej interpretacji mechanistycznej oraz niezależnego odtworzenia składu podłoża. Po trzecie, lepkość pozorną mierzono w jednym ustalonym warunku pomiaru, a nie przeprowadzono pomiarów wielkości rozkładu cząstek, badań mikroskopowych ani badań uwalniania, przenikania ani retencji w skórze. Ograniczenia te utrudniają formułowanie wniosków dotyczących mechanizmów, nie podważają jednak stwierdzenia, że oba systemy podłoża emulsji O/W wyraźnie różniły się pod względem stabilności fizycznej oraz odpowiedzi *in vivo* związanej z funkcjonowaniem bariery skórnej. Również projekt badania *in vivo* wiązał się z istotnymi ograniczeniami. Emulsje DW01/DW02 oraz DW03/DW04 oceniano na oddzielnych grupach ochotników, przydział formuacji do poszczególnych stron twarzy był ustalony, a nie losowy, grupy badane były zróżnicowane pod względem wieku i typu skóry, a w badaniu nie uwzględniono niepoddawanego działaniu formuacji obszaru kontrolnego twarzy. Czterotygodniowy okres obserwacji dodatkowo ograniczał możliwość wyciągania wniosków dotyczących utrzymywania się efektów w dłuższej perspektywie czasowej. Niemniej jednak porównania typu *split-face*

w obrębie poszczególnych grup ograniczały wpływ zmienności międzysobicznej w podstawowych porównaniach formułacji zawierającej HL z odpowiadającą jej formułacją referencyjną. Zbieżność wyników badań fizykochemicznych i oceny funkcji bariery skórnej potwierdza główny wniosek, że skład podłoża do stosowania miejscowego jest istotnym czynnikiem determinującym działanie formułacji. Dalsze badania powinny obejmować odpowiednio zaprojektowane formułacje kontrolne uwzględniające składniki towarzyszące komercyjnemu ekstraktowi HL, losowy przydział stron twarzy, referencyjny obszar pozbawiony pielęgnacji, bardziej jednorodne grupy badawcze oraz pomiary uwalniania i retencji składników w skórze, aby umożliwić określenie mechanizmów leżących u podstaw obserwowanej zależności działania od zastosowanego podłoża.

Podsumowanie

Wykazano, że działanie komercyjnego składnika zawierającego *Humulus lupulus* L. w emulsjach O/W do stosowania miejscowego w znacznym stopniu zależy od właściwości fizykochemicznych oraz organizacji strukturalnej podłoża. W temp. 4°C oraz w temperaturze pokojowej wszystkie formułacje pozostawały fizycznie stabilne przez 12 tygodni, natomiast zastosowanie stresu termicznego w temp. 45°C wyraźnie uwiarydliło różnice między oboma systemami. Bardziej uporządkowane strukturalnie podłoże DW03/DW04 charakteryzowało się znacznie większą lepkością pozorną, niewielkimi zmianami gęstości oraz opóźnioną destabilizacją w porównaniu z DW01/DW02. W badaniu *in vivo* emulsja DW03 wykazywała najbardziej spójne działanie w zakresie parametrów związanych z funkcjonowaniem bariery skórnej, zwiększając nawilżenie warstwy rogowej naskórka o 17% przy jednoczesnym utrzymaniu poziomu TEWL zbliżonego do wartości wyjściowej. Formułacja DW01 nie zapewniała natomiast utrzymującego się efektu zwiększenia nawilżenia i wiązała się z niekorzystnym wzrostem wskaźnika TEWL. Wyniki dotyczące kolorytu i topografii skóry były zróżnicowane i należy je traktować jako parametry drugorzędne, których zmiany zależały od zastosowanej formułacji. Ponieważ formułacje referencyjne nie uwzględniały składników towarzyszących obecnych w komercyjnym składniku HL, a także nie przeprowadzono badań uwalniania ani przenikania, obserwowanych efektów nie można przypisać wyłącznie związkowi pochodzącemu z chmielu ani określone mu mechanizmowi dostarczania składników do skóry. Mimo wskazanych ograniczeń wyniki potwierdzają, że podłoże nie jest obojętnym nośnikiem, lecz istotnym czynnikiem determinującym zarówno stabilność fizykochemiczną formułacji, jak i jej działanie na skórę. Racjonalne projektowanie formułacji do stosowania miejscowego zawierających składniki pochodzenia roślinnego powinno zatem uwzględniać zarówno skład i organizację strukturalną podłoża, jak i właściwości zastosowanych substancji aktywnych.

Badania były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach szóstej edycji pro-

gramu Ministra Edukacji i Nauki „Doktorat wdrożeniowy”, nr grantu DWD/6/0333/2022.

Autorzy pragną podziękować dr Magdalenie Ciupińskiej za wsparcie w realizacji badań in vivo przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy.

Otrzymano: 08-09-2026

Zrecenzowano: 09-09-2026

Zaakceptowano: 10-09-2026

Opublikowano: 17-09-2026

LITERATURA

- [1] M. Lodén, *Am. J. Clin. Dermatol.* 2003, **4**, 771, <https://doi.org/10.2165/00128071-200304110-00005>.
- [2] E. Proksch, J.M. Brandner, J.M. Jensen, *Exp. Dermatol.* 2008, **17**, 1063, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>.
- [3] A.V. Rawlings, C.R. Harding, *Dermatol. Ther.* 2004, **17**, 43, <https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04s1005.x>.
- [4] T.F. Tadros, *Adv. Colloid Interface Sci.* 2004, **108–109**, 227, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.025>.
- [5] L. Gilbert, C. Picard, G. Savary, M. Grisel, *Colloids Surf. A: Phys. Eng. Asp.* 2013, **421**, 150, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.01.003>.
- [6] D. Langevin, *Langmuir* 2023, **39**, 3821, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c03423>.
- [7] A.C. Dweck, *Handbook of natural ingredients*, Independently Published, 2017, ISBN 978-1521883303.
- [8] M. Karabin, T. Hudcova, L. Jelinek, P. Dostalek, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016, **15**, 542, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>.
- [9] M. Dzienisik, M. Marzec, I. Nowak, *Materials* 2026, **19**, 821, <https://doi.org/10.3390/ma19040821>.
- [10] M. Biendl, Z. Kolenc, B. Čeh, I.J. Košir, *Agric. Conspec. Sci.* 2012, **77**, 61.
- [11] O.R. Pereira, G. Santos, M.J. Sousa, *Cosmetics* 2022, **9**, 139, <https://doi.org/10.3390/cosmetics9060139>.
- [12] J.F. Stevens, J.E. Page, *Phytochemistry* 2004, **65**, 1317, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>.
- [13] Z. Hurth, M.-L. Faber, F. Gendrisch, M. Holzer, B. Haarhaus, A. Cawelius, K. Schwabe, C.M. Schempp, U. Wölfe, *Pharmaceuticals* 2022, **15**, 350, <https://doi.org/10.3390/ph15030350>.
- [14] S.A. Provital, Certificate of Analysis for Senseryn™; Manufacturer's Commercial Document, Provital SA, Barcelona 2020.
- [15] ISO 16128-2:2017, *Guidelines on technical definitions and criteria for natural and organic cosmetic ingredients and products. Part 2. Guidelines on ingredient and product calculation*.
- [16] Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products, *Dz.Urz. UE* L342/59, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?uri=CELEX%3A32009R1223>.
- [17] European Commission. Cosmetic Products Notification Portal (CPNP), User Manual Referring to Article 13, EC, Brussels, Belgium, https://single-market-economy.ec.europa.eu/sectors/cosmetics/cosmetic-product-notification-portal_en, dostęp 22.07.2026 r.
- [18] ISO 2811:2016, *Farby i lakiery. Oznaczanie gęstości. Cz. 1. Metoda piknometryczna*.
- [19] World Medical Association, *JAMA* 2013, **310**, nr 20, 2191, <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>.
- [20] Ustawa z dnia 4 października 2018 r. o produktach kosmetycznych, *Dz.U.* 2008, poz. 2227, <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=W-DU20180002227>, dostęp 21.01.2026 r.
- [21] Cosmetics Europe, *Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products*; Cosmetics Europe, Brussels 2008.
- [22] R.Y. Lochhead, [w:] *Cosmetic nanotechnology. Polymers and colloids in cosmetics* (red. S.E. Morgan, K.O. Havelka, R.Y. Lochhead), *ACS Symposium Series* 2007, **961**, 3, <https://doi.org/10.1021/bk-2007-0961.ch001>.
- [23] F. Bouwer, M. Brits, J.M. Viljoen, *Pharmaceutics* 2025, **17**, 1586, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17121586>.
- [24] A. Nadarzynski, J. Scholz, M.S. Schröder, *Cosmetics* 2022, **9**, 53, <https://doi.org/10.3390/cosmetics9030053>.
- [25] K. De Paepe, M.-P. Derde, D. Roseeuw, V. Rogiers, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2000, **14**, 272, <https://doi.org/10.1046/j.1468-3083.2000.00103.x>.
- [26] R. Ghadially, B.E. Brown, S.M. Sequeira-Martin, K.R. Feingold, Elias, P.M. Feingold, *J. Clin. Investig.* 1995, **95**, 2281, <https://doi.org/10.1172/JCI117919>.
- [27] J.W. Fluhr, R. Darlenski, C. Surber, *Br. J. Dermatol.* 2008, **159**, 23, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08643.x>.
- [28] C. Trojahn, G. Dobos, M. Schario, L. Ludriksone, U. Blume-Peytavi, J. Kottner, *Skin Res. Technol.* 2015, **21**, 69, <https://doi.org/10.1111/srt.12158>.
- [29] A. Dzwigałowska, A. Solyga-Żurek, R.M. Dębowska, I. Eris, *Skin Res. Technol.* 2013, **19**, 155, <https://doi.org/10.1111/srt.12027>.
- [30] C. Pretel-Lara, R. Sanabria-de la Torre, S. Arias-Santiago, T. Montero-Vilchez, *J. Clin. Med.* 2024, **13**, 5861, <https://doi.org/10.3390/jcm13195861>.