

Kosmetyki - bioaktywne składniki



***Praca zbiorowa pod redakcją
Grzegorza Schroedera***

Kosmetyki - bioaktywne składniki

*Praca zbiorowa pod redakcją
Grzegorza Schroedera*

*Cursiva
2012*



Recenzenci

Prof. dr hab. Tadeusz Ossowski
Dr Joanna Kurczewska

Wydanie I
2012

Cursiva

<http://www.cursiva.pl>

ISBN 978-83-62108-17-6

Spis treści

Książka adresowa	5
Rozdział 1	7
Toksykologia nanomateriałów	
<i>Michał Cegłowski, Grzegorz Schroeder</i>	
Rozdział 2	25
Liposomy w kosmetyce – otrzymywanie, właściwości fizykochemiczne i zastosowanie	
<i>Magdalena Górzyńska, Joanna Gościańska, Izabela Nowak</i>	
Rozdział 3	49
Kwasy stosowane w kosmetykach przeznaczonych do pielęgnacji skóry trądzikowej	
<i>Marta Walasińska, Bogusława Łęska</i>	
Rozdział 4	71
Aktywność biologiczna pochodnych 6-amino-2-tiouracylu	
<i>Natalia Kliczka, Grażyna Bartkowiak, Grzegorz Schroeder</i>	
Rozdział 5	93
Koenzym Q ₁₀	
<i>Natalia Bąkowska, Grażyna Bartkowiak, Grzegorz Schroeder</i>	
Rozdział 6	121
Przeciwutleniacze stosowane w kosmetykach	
<i>Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak</i>	

Konserwanty w kosmetykach

*Katarzyna Jagodzińska, Agnieszka Feliczak-Guzik,
Izabela Nowak*

Książka adresowa

Grzegorz Schroeder

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Grażyna Bartkowiak

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Natalia Bąkowska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Michał Ceglowski

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Agnieszka Feliczak-Guzik

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Joanna Gościańska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Magdalena Górzyńska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Katarzyna Jagodzińska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Natalia Kliczka

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Bogusława Łęska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Izabela Nowak

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Agata Wawrzyńczak

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Marta Walasińska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
Wydział Chemii
Umultowska 89b
61-614 Poznań

Rozdział 1

Toksykologia nanomateriałów

Michał Cegłowski, Grzegorz Schroeder
*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii,
Umultowska 89b, 61-614 Poznań*

Nanotechnologia zajmuje się tworzeniem oraz badaniem struktur, których rozmiar przynajmniej w jednym wymiarze wynosi poniżej 100 nm. Nanomateriały poza określonymi wymiarami muszą różnić się swoimi właściwościami od tego samego materiału o niższym stopniu rozdrobnienia. Nanotechnologia to nie tylko chemia i technologia wytwarzania małych cząsteczek, ale także nauka opisująca powstawanie i zastosowanie cząsteczek o nanowymiarach posiadających unikatowe właściwości, które można wykorzystywać do otrzymywania nowych materiałów lub konstrukcji miniaturowych systemów. Nanomateriały posiadają inne właściwości chemiczne, fizyczne oraz biologiczne niż substancje je tworzące o rozmiarach większych. Wynika to z faktu, iż większość cząsteczek tworzących nanomateriały znajduje się blisko powierzchni, a co za tym idzie ich struktura elektronowa, poziomy energii, a także reaktywność jest inna niż gdyby tworzyły klasyczną sieć krystaliczną^[1].

Nanomateriały i nanocząstki zachowują właściwości fizykochemiczne charakterystyczne dla tych materiałów w skali makro, jednak dodatkowo wykazują zespół oryginalnych cech, występujących tylko w skali nano. Podstawowymi przyczynami unikatowych własności nanoobjektów są ich wymiary, a także związane z tym ujawnianie się zjawisk kwantowych. Niewielkie rozmiary umożliwiają im przenikanie przez większość barier, a ponadto powodują, że w ich przypadku obserwuje się również efekty wynikające z praw fizyki kwantowej. Dualizm charakteru nanocząstek stanowi jedną z ich największych zalet. W porównaniu do materiałów w skali makro, nanomateriały cechuje między innymi:

- bardziej rozwinięta powierzchnia właściwa,
- większa twardość,
- większa wytrzymałość i występujący jednocześnie wzrost plastyczności,
- większa odporność na pękanie,

- właściwości ślizgowe,
- większa biokompatybilność biomateriałów nanometrycznych.

Większość nanomateriałów ma dwoisty charakter: część posiadanych przez nie właściwości sprawia, że ich zastosowanie w biologii, chemii, inżynierii środowiska i medycynie staje się atrakcyjne zwłaszcza w transporcie i dostarczaniu leków oraz substancji bioaktywnych, jednak równocześnie z powodu swojej ogromnej aktywności biologicznej i cech związanych z wielkością cząstek mogą wykazywać toksyczność.

Dla tego rodzaju materiałów brak jest badań jednoznacznie określających ich wpływ na środowisko naturalne, jak również na zdrowie i życie ludzi oraz zwierząt. Z tego właśnie powodu, w toksykologii wyodrębniono specyficzną dziedzinę badań – nanotoksykologię, czyli naukę zajmującą się badaniem toksyczności nanomateriałów. Nanotoksykologię definiuje się jako dział toksykologii zajmujący się wpływem nanomateriałów na organizmy żywe^[2]. Coraz powszechniejsze stosowanie małych cząsteczek w diagnostyce medycznej, jak również w farmacji do transportu leków spowodowało, że koniecznością stało się wydzielenie nowego działu – nanomedycyny, która ma się zajmować zastosowaniem nanomateriałów w leczeniu i diagnostyce medycznej ludzi. Narodowe Instytuty Zdrowia w USA (ang. *National Institutes of Health*), zajmujące się badaniami biomedycznymi, zakwalifikowały nanomedycynę jako dziedzinę nanotechnologii, która zajmuje się leczeniem chorób oraz naprawą tkanek na poziomie molekularnym^[2]. Europejska Fundacja Naukowa (ang. *European Science Foundation*), Instytucja zajmująca się promowaniem wysokiej jakości badań naukowych prowadzonych w Europie, zakwalifikowała nanomedycynę jako naukę zapobiegającą chorobom, urazom oraz chroniącą ludzkie zdrowie przy pomocy molekularnych narzędzi oraz znajomości ludzkiego ciała na poziomie molekularnym. Mimo określenia celów i narzędzi jakimi będzie posługiwać się nanomedycyna, należy pamiętać, że przed wprowadzeniem do ciała człowieka każdy produkt nanotechnologii powinien być gruntownie zbadany pod względem właściwości toksycznych.

Wydzielenie nowych kierunków badań jest konieczne z powodu specyficznego warsztatu badawczego, koniecznego do poznania i ustalenia wpływu nanomateriałów na środowisko naturalne. Dotychczasowe klasyczne metody badawcze i diagnostyczne całkowicie zawodzą w przypadku stosowania nanomateriałów.

Nanocząstki mają różne kształty – mogą być zbudowane z pojedynczych atomów, tworząc kule, sfery lub rurki. Warstwy pojedynczych atomów tworzą jedno i kilkuwarstwowe rurki, takie jak nanorurki węglowe, nanorurki niewęglowe (np. azotku boru, TiO_2 czy ZnO), nanorurki organiczne (np. białka)

czy układy występujące jako płatki czy formy „kwiatopodobne”. Na chwilę obecną potencjał jaki może wnieść nanotechnologia do medycyny wydaje się ogromny, gdyż planuje się, że dzięki niej do użytku wejdą nanoroboty, zapewniające selektywny transport leków, czy pełniące funkcję narzędzi diagnostycznych, jak również oznaczanie biomarkerów na niskich stężeniach na poziomie komórkowym^[3]. Ze względu na tak szerokie potencjalne zastosowania coraz więcej uwagi poświęca się zbadaniu, jaki wpływ konkretne nanomateriały mogą mieć na ludzkie zdrowie oraz środowisko^[4]. Szczęólnego zainteresowania ze strony nanotoksykologii wymagają nanocząsteczki stosowane jako nośniki leków, ze względu na fakt, że są one bezpośrednio wprowadzane do krwioobiegu, co oznacza, że nie przechodzą standardowego procesu absorpcji do organizmu. Mimo iż pełnią tylko funkcję nośników właściwej substancji aktywnej, same mogą powodować negatywne skutki dla organizmu. Drugą grupą, wymagającą szczególnych analiz, są związki nierozpuszczalne, które mogą akumulować się wewnątrz tkanek lub narządów. Występowanie wymienionych zagrożeń powoduje, że każdy materiał mogący znaleźć zastosowanie w nanomedycynie powinien przejść najpierw przez szereg badań toksykologicznych^[5].

Toksykokinetyka

Toksokinetyka substancji obejmuje następujące procesy: wchłanianie, metabolizm, dystrybucję, akumulację oraz eliminację. Z uwagi na fakt, iż właściwości chemiczne, fizyczne oraz biologiczne nanocząstek różnią się od właściwości substancji w jej postaci najczęściej spotykanej, konieczne jest badanie tych procesów osobno dla samych nanocząstek. Poznanie w jaki sposób nanocząstki przechodzą przez wszystkie wymienione procesy może umożliwić skuteczną ocenę ich toksyczności.

Wchłanianie

Wchłanianie to sposób w jaki ksenobiotyk dostaje się do organizmu. W przypadku codziennego kontaktu z nanocząsteczkami należy rozpatrywać wchłanianie poprzez drogi oddechowe, przez układ pokarmowy oraz poprzez skórę. W przypadku wchłaniania nanomateriałów należy pamiętać, że ewentualne szkody, jakie mogą one wyrządzić w organizmie, zależą nie tylko od ilości nanomateriałów, ale także od ich właściwości fizykochemicznych. Im bardziej rozbudowana będzie powierzchnia nanocząstek, tym efektywniejsze będzie ich oddziaływanie z otoczeniem, a tym samym określonymi komórkami, czy tkankami. W przypadku nanomateriałów, poza opisanymi metodami wchłaniania, należy również rozpatrywać przedostanie się ich bezpośrednio

do krwioobrotu, gdyż wszelkie nanomateriały, jakie znajdą zastosowanie w medycynie, będą najprawdopodobniej wprowadzane do organizmu w postaci zastrzyków.

Układ oddechowy człowieka przystosował się do obecności pyłu, kurzu, dymu, a także mikroorganizmów, takich jak bakterie, wirusy oraz grzyby w powietrzu. Okazuje się, że obiekty o średnicy powyżej 10 μm są zatrzymywane w ludzkim nosie i nie przedostają się do dalszych odcinków układu oddechowego^[1]. Obiekty o mniejszej średnicy mogą zostać z kolei wciągnięte do płuc i w zależności od właściwości jakie posiadają, mogą osiąść w płucach lub innych odcinkach układu oddechowego. Częsteczki o średnicy poniżej 100 nm są to nanocząstki, które zdolne są do osiadania na pęcherzykach płucnych. Dzięki swojej niskiej gęstości oraz dużej mobilności nanocząstki są w stanie osadzać się nawet w głębi płuc^[6]. Nanocząstki o rozmiarach poniżej 10 nm chętnie osiadają w jamie nosowej, dzięki czemu tylko niewielka ich liczba dociera do płuc^[6]. Zjawisko to jest korzystne, gdyż należy mieć na uwadze, że miejsce w jakim osiądą nanocząstki będzie narażone na pojawienie się negatywnych skutków ich oddziaływania na organizm. Obecnie prowadzone badania skupiają się na porównaniu wpływu na stan zdrowia organizmu cząstek o tym samym składzie chemicznym, jednakże różnych rozmiarach. Ponadto porównuje się różnice w toksyczności inhalacyjnej, podczas badań prowadzonych na zwierzętach, w przypadku zastosowania dużych (skoncentrowanych) dawek nanocząstek oraz niskich dawek o stężeniach zbliżonych do takich, jakie mogą wystąpić w środowisku naturalnym. Zastosowanie pierwszej z tych metod jest tańsze, gdyż nie wymaga cyklicznego podawania tych samych ilości substancji, co znacznie skraca badanie, a także stosowane jest jako narzędzie do szybkiej oceny toksyczności. Wykazano, iż zmiany w płucach mysz, powstałe na skutek kontaktu z jednościenneymi nanorurkami węglowymi, były podobne w przypadku bezpośredniej aspiracji do gardła oraz inhalacji trwającej 4 dni^[7].

Nanocząstki znajdujące się w powietrzu głównie dostają się do organizmu poprzez układ oddechowy. Te z nich, które są rozpuszczalne, mogą po dostaniu się do płuc łatwo wnikać do układu krwionośnego organizmu. nierozpuszczalne nanocząstki, mogą z kolei ulec fagocytozie przez makrofagi, przedostać się do pęcherzyków płucnych lub wnikać do układu limfatycznego płuc. W farmakokinetyce, za proces wchłaniania przyjmujemy ciąg wydarzeń, które powodują, że ksenobiotyk dociera do krwioobrotu od miejsca wprowadzenia^[6]. Właściwości fizykochemiczne nanocząstek, takie jak rozmiar, rozpuszczalność, czy skład chemiczny, a także miejsce osadzania się w płucach mają decydujący wpływ na ilość nanocząstek, jaka ulegnie absorpcji. Wykazano ponadto, że nanocząstki wnikają z pęcherzyków płucnych do krwi^[8], co może

wywoływać nie tylko zmiany w płucach, ale także powodować niekorzystne efekty w wielu innych narządach. Przykładem mogą być tutaj nanocząstki Fe_2O_3 znakowane izotopem ^{59}Fe , które po wkropleniu do tchawicy szczurów przeniknęły w przeciągu 10 minut do krwioobiegu, przechodząc wprawdzie z płuc do naczyń włosowatych^[9]. Nanocząsteczki Fe_2O_3 po wprowadzeniu do krwioobiegu wykazują tendencje do akumulacji w wątrobie, śledzionie, nerkach oraz jądrach^[10]. W wielu badaniach ponadto wykazano, iż wchłonięcie wysoce rozdrobnionych cząsteczek z powietrza powoduje nie tylko zwiększenie częstotliwości występowania chorób układu oddechowego, ale także wzrost śmiertelności spowodowany chorobami układu krwionośnego^[11-12]. Nie udało się ustalić, czy wzrost zachorowań na choroby układu krążenia był wywołany zwiększoną obecnością nanocząstek, czy też przyczyniły się do tego substancje chemiczne również znajdujące się w zanieczyszczonym powietrzu.

Nanocząsteczki znajdujące się w jedzeniu, napojach, czy będące składnikami leków, wprowadzane są do organizmu poprzez układ pokarmowy i właśnie z przewodu pokarmowego obserwuje się ich największą absorpcję^[13]. Nanocząstki znajdujące się w powietrzu również trafiają do układu pokarmowego, gdyż część z nich zostaje wyłapana w górnych partiach układu oddechowego, a następnie po przełknięciu trafia do przełyku. Przyjmuje się, że stopień absorpcji nanocząstek poprzez układ pokarmowy rośnie wraz ze zmniejszaniem się średnicy cząstek. Badania prowadzone na cząstkach złożonych z lateksu polistyrenowego o średnicach od 50 nm do 3 μm wykazały, że największa absorpcja zachodzi dla cząstek o średnicy od 50 (wydajność absorpcji to 34%) do 100 nm (wydajność absorpcji to 26%), podczas gdy cząstki o wymiarach powyżej 1 μm zostają uwięzione wewnątrz kępek Payera (skupiska grudek limfatycznych znajdujących się w błonie śluzowej i podśluzowej jelita cienkiego)^[14]. Identyczną tendencję obserwuje się w przypadku nanocząstek złota, gdyż wykazano, że spośród nanocząstek o wymiarach 4, 10, 28 oraz 58 nm najlepiej wchłaniane przez układ pokarmowy były te o najmniejszych rozmiarach^[15]. Wykazano także, że ładunek cząsteczek odgrywa ważną rolę w przypadku ich wchłaniania przez układ pokarmowy. Okazało się, że nanocząstki naładowane dodatnio są zdecydowanie lepiej wchłaniane, niż te o ładunku ujemnym lub elektrycznie obojętne^[16].

W porównaniu z absorpcją poprzez drogi oddechowe lub układ pokarmowy, absorpcja poprzez skórę jest zdecydowanie mniej prawdopodobna w warunkach codziennego narażenia na nanocząstki różnych substancji. Najczęstszy kontakt skóry z nanocząstkami następuje podczas stosowania różnego rodzaju kosmetyków. W powszechnym użyciu w kosmetykach znajdują się nanocząstki tlenków metali (np. tlenek cynku lub dwutlenek tytanu), których głównym celem jest ochrona przed szkodliwym promieniowaniem ultrafioletowym. W trakcie

prób na zwierzętach wykazano, że tytan z tlenku tytanu praktycznie nie wchłania się do organizmu w wyniku kontaktu ze skórą^[17]. Z kolei cynk, nałożony na ludzką skórę w postaci nanocząstek tlenku cynku znajdujących się w kremie do opalania, wchłania się w niewielkich ilościach^[18]. Mimo stwierdzenia niewielkiego wchłaniania nanocząstek poprzez skórę, wciąż uważa się, iż to poprzez bezpośrednie nałożenie na skórę z czasem zaczną się wprowadzać leki umieszczone wewnątrz nośników stworzonych z nanocząstek. Dlatego właśnie tak ważne jest poznanie jakim interakcjom mogą one ulegać podczas przenikania przez skórę oraz jakie uboczne efekty mogą zostać wywołane^[19]. Obecnie najczęściej stosowanymi nanocząstkami, w produktach codziennego użytku, takich jak pasty do zębów, kremy do opalania, czy kosmetyki, są nanocząstki dwutlenku tytanu^[20]. Dytlenek tytanu w postaci drobnego pyłu był przez lata stosowany jako próba kontrolna w przypadku badań toksykologicznych *in vitro* oraz *in vivo* substancji pylistych. Okazało się, że nie jest on całkowicie obojętny dla organizmu, gdyż w wyniku dalszych badań stwierdzono występowanie raka płuc u szczurów, które przez okres całego życia były narażone na duże dawki dwutlenku tytanu standardowo stosowanego w farbach^[21]. Ponadto stwierdzono, że nanocząstki dwutlenku tytanu wykazują większą cytotoksyczność niż TiO_2 pylisty^[22]. Z tego właśnie względu konieczne jest stwierdzenie, w jakim stopniu nanocząstki TiO_2 ulegają absorpcji poprzez skórę. Przeprowadzone badania niestety nie dają jasnej odpowiedzi, gdyż część z nich wskazuje, iż nanocząstki TiO_2 przenikają przez nabłonek wyściełający tchawicę^[23], podczas gdy inne wskazują, że nanocząstki TiO_2 nie są w stanie przeniknąć przez naskórek^[24-25]. Tak rozbieżne wyniki powodują, że jak dotąd nie określono zdolności nanocząstek do przenikania przez skórę. Dodatkowo sugeruje się^[6], że w przypadku absorpcji przez skórę czynniki takie jak ruchliwość skóry, ładunek cząstek oraz płeć, czy wiek powinny być brane pod uwagę. Przykładem mogą być tutaj badania, w trakcie których stwierdzono, iż nanocząstki powstałe przez przyłączenie fulerenów C_{60} do peptydów ulegały absorpcji przez skórę dopiero podczas wykonywania przez nią ruchu^[26]. Ponadto zbadano, iż ujemnie naładowane cząstki lateksu o wymiarach między 50, a 500 nm przenikają przez naskórek, czego nie wykazały badania przeprowadzone na obojętnych lub dodatnio naładowanych cząstkach^[27]. Podsumowując, nanocząstki z pewnością wchłaniają się przez skórę i proces ten jest przyspieszony w przypadku, gdy skóra znajduje się w ruchu. W przypadku, gdy nanocząstki będą w stanie przeniknąć przez skórę właściwą, na pewno zostaną wprowadzone do układu krążenia. Jednakże ilość wchłoniętych substancji, a co za tym idzie ocena realnego zagrożenia wymaga jeszcze dalszych badań.

Ostatnim sposobem wprowadzenia nanocząstek do organizmu jest

wykonanie bezpośredniego zastrzyku do układu krwionośnego. Zabieg taki można wykonać np. w celu wprowadzenia substancji będących kontrastem w różnego rodzaju badaniach.

Metabolizm, dystrybucja, akumulacja oraz eliminacja

Nanocząstki po przeniknięciu do krwioobiegu mogą ulegać różnym przemianom, jednakże nigdy nie wykazano w badaniach laboratoryjnych, żeby uległy pełnemu rozkładowi. Nanocząstki odporne chemicznie, takie jak cząstki złota, srebra, fulereny, czy nanorurki węglowe są zbyt mało reaktywne, aby mogły ulec reakcjom enzymatycznym^[6]. Jednakże postuluje się, iż grupy funkcyjne znajdujące się na powierzchni nanocząstek mogą ulegać różnego rodzaju przemianom metabolicznym. Dla przykładu białka przyłączone do kropek kwantowych mogą zostać rozłożone przez proteazy^[28], natomiast metale lub tlenki metali tworzące kropkę kwantową mogą zostać związane przez metalotioneinę w celu wydalenia. Ostatnie badania prowadzone nad metabolizmem jednościennych nanorurek węglowych wykazały, że ulegają one rozkładowi *in vitro* pod wpływem działania mieloperoksydazy, czyli enzymu, który katalizuje reakcję powstawania kwasu podchloraowego (HClO) oraz innych rodników^[29]. W celu wyjaśnienia jakim dalszym przemianom w organizmie mogą ulegać nanorurki węglowe konieczne są dalsze badania prowadzone *in vivo*.

Nanomateriały po przeniknięciu do układu krwionośnego mogą wchodzić w reakcje z białkami z osocza, płytkami krwi, czy białymi lub czerwonymi krwinkami. Powinowactwo do składników osocza może mieć kluczowy wpływ na procesy takie jak metabolizm, dystrybucja oraz eliminacja nanocząstek. Wykazano, że zawarta w osoczu apolipoproteina-A1 łączy się z cząstkami krzemionki oraz może również się łączyć z cząstkami o podobnym charakterze, takimi jak azbest, czy dwutlenek tytanu^[30]. Efektem tworzenia tego typu połączeń przez składniki osocza może być zmniejszenie negatywnych zmian, jakie nanocząstki mogą powodować w organizmie. Dodatkowym zagrożeniem wynikającym z ich obecności we krwi jest fakt, iż cząsteczki o średnicy poniżej 200 nm mogą przechodzić przez barierę krew-mózg^[31]. Nanocząstki mogą wnikać do komórek z pominięciem standardowych procesów endocytozy. Dowodem na to jest fakt przechodzenia nanocząstek złota lub dwutlenku tytanu do wnętrza ludzkich erytrocytów, czyli komórek, które pozbawione są na swojej powierzchni receptorów odpowiedzialnych za fagocytozę^[32]. Oznacza to, że procesami odpowiedzialnymi za transport nanocząstek poprzez membrany komórek mogą być: dyfuzja, tworzenie się kanałów w błonach komórkowych lub inne, niezbadane dotąd procesy.

W celu zbadania dystrybucji nanocząstek w organizmie, wykonania badania na 5 zdrowych osobach z zastosowaniem nanocząstek węglowych znakowanych technetem podawanych pacjentom w postaci aerozolu^[8]. Radioaktywność krwi wykryto już po pierwszej minucie od podania, natomiast maksymalny poziom natężenia promieniowania został osiągnięty po 10 – 20 minutach. Inne badania wykazały, iż nanocząstki poprzez krew przenikają do organów takich jak wątroba, serce, śledziona, czy mózg^[33]. Badania wchłaniania prowadzone na organizmach szczurów za pomocą znakowanych fluoresceiną nanocząstek polistyrenu o średnicy 50 nm wykazały, iż po wprowadzeniu do krwi część nanocząstek została wchłonięta przez hepatocyty^[34]. Po 24 godzinach około 4% podanej dawki zostało usunięte wraz z żółcią. Badania fluorescencyjne produktów znajdujących się w żółci wykazały, iż nanocząstki zostały usunięte w niezmienionej formie. Z kolei radioaktywnie znakowane nanocząstki tlenku cynku, po podaniu dożylnym myszy, uległy akumulacji w płucach w przeciągu pierwszej godziny od podania, a następnie ulegały stopniowemu przenoszeniu do jelit, aby ulec usunięciu z organizmu wraz z kałem^[35]. W celu ustalenia jak następuje eliminacja nanocząstek z organizmu myszy w czasie 7 dni, wykonano badania przy użyciu nanocząstek polilaktydu/glikolidu (PLGA) podawanych doustnie^[36]. Okazało się, że po podaniu najwięcej nanocząstek (około 40%) zlokalizowało się w wątrobie, 26% w nerkach oraz 13% w mózgu, natomiast najmniejsza ilość zlokalizowała się w śledzionie. Po upływie 7 dni we wszystkich wymienionych narządach nanocząstki wciąż znajdowały się na oznaczalnym poziomie. Nanocząstki germanu, które potencjalnie mogą służyć jako kontrast przy obrazowaniu śledziony, zostały wprowadzone do krwioobiegu szczurów^[37]. Po badaniach wykonanych 24 godziny później, stwierdzono iż nanocząstki znajdowały się w przybliżeniu w równych ilościach zarówno w osoczu jak i w krwinkach czerwonych, natomiast organem, w którym znajdowała się największa liczba nanocząstek germanu było serce. Eliminacja wprowadzonego nanomateriału następowała głównie wraz z moczem.

Podsumowując, metabolizm, dystrybucja wewnątrz organizmu, akumulacja oraz eliminacja nanocząstek zależą od składu chemicznego nanocząstek, ich rozmiaru, drogi wprowadzenia oraz ich ładunku. Obecnie najczęściej bada się toksykokinetykę nanocząstek po bezpośrednim ich wprowadzeniu do krwioobiegu lub wprowadzeniu przez drogi oddechowe, natomiast rzadziej poprzez układ pokarmowy lub absorpcję poprzez skórę. Stwierdzono, że nanocząstki ulegają dystrybucji oraz akumulacji do większości tkanek i organów, a w szczególności do osocza, wątroby, śledziony, serca oraz mózgu. Eliminacja nanocząstek zachodzi wraz z moczem lub kałem, co zależny w największym stopniu od charakteru nanocząstek. Niemniej, najczęstszą drogą eliminacji nanocząstek jest układ

wydalniczy, a zatem badanie ich zawartości w moczu może służyć za sposób sprawdzania oraz oceny ich metabolizmu. Wykazanie, iż nanocząstki są w stanie przekraczać barierę krew-mózg może być ważnym odkryciem dla naukowców starających się zastosować nanocząstki jako nośniki leków. Niestety, wiąże się to również z koniecznością badania wpływu nanocząstek na ludzki ośrodkowy układ nerwowy. Badania dotyczące eliminacji nanocząstek z organizmu wykazały, iż proces ten w początkowym stadium zachodzi bardzo szybko, jednakże całkowite ich usunięcie trwa zazwyczaj bardzo długo. Przykładem mogą być nanocząstki krzemionki, które po jednorazowym wprowadzeniu do krwioobiegu wciąż były wykrywalne w organizmie po 4 tygodniach^[38] lub kropki kwantowe, które mimo upływu 133 dni od podania wciąż znajdowały się w węzłach chłonnych myszy^[39]. Fakt ten oznacza, iż w przypadku ciągłego podawania nanocząstki mogą ulegać akumulacji w organizmie.

Toksykodynamika

Toksykodynamika nanomateriałów analizuje szkodliwe skutki oddziaływania nanomateriałów na określone komórki, czy tkanki (badania *in vitro*) lub organizmy żywe (badania *in vivo*). Obejmuje ona występowanie zatruc ostrych oraz przewlekłych, a także występowanie oddziaływań synergistycznych oraz antagonistycznych.

Ditlenek tytanu

Ditlenek tytanu stał się bardzo interesującym materiałem, głównie ze względu na swoje właściwości optoelektroniczne. Jest on szeroko badany jako składnik fotoogniw, układów zdolnych do produkcji wodoru dzięki wykorzystaniu energii słonecznej oraz jako składnik samoczyszczących się okien. W kosmetyce, dwutlenek tytanu stosowany jest jako składnik kremów do opalania, ze względu na zdolność do pochłaniania promieniowania UV.

Dwutlenek tytanu występuje w postaci trzech faz: anatazu, rutylu oraz brukitu, przy czym to pierwszy z wymienionych jest odpowiedzialny za właściwości fotokatalityczne TiO_2 . W celu zbadania toksyczności dwutlenku tytanu przeprowadzono wiele badań, których celem była również ocena wpływu takich czynników jak rozmiar cząstek, dokładny skład chemiczny, czy metoda produkcji. Badania prowadzone na dehydrogenazie mleczanowej wykazały, iż dwutlenek tytanu jest najmniej toksycznym z przebadanych materiałów w obrębie rozmiaru cząstek od około 100 nm do 1 μm ^[40]. Według tych badań prowadzonych również na błonach komórkowych, najczęściej stosowane tlenki metali i niemetalu są toksyczne zgodnie z następującą kolejnością: $\text{TiO}_2 < \text{Al}_2\text{O}_3 <$

SiO_2 niezależnie od swojego rozmiaru, do momentu, aż nie przekracza on 1 μm . Badania przeprowadzone na fibroblastach oraz tkance nabłonkowej pochodzącej z płuc wykazały, iż fotoaktywacja anatazu zwiększa jego cytotoksyczność, jednakże dopiero dawka powyżej 100 mg/ml będzie wystarczająca, aby wywołać jakiegokolwiek objawy chorobowe^[41-42]. Zależność między rozmiarem cząstek, ich rozmieszczeniem (rodzajem utworzonych agregatów) oraz toksycznością została sporządzona przy użyciu badań na komórkach^[43]. Wykazano, podobnie jak w przypadku wcześniej opisanych badań, iż dwutlenek tytanu jest znacznie mniej toksyczny, niż innego rodzaju nanomateriały, takie jak krzemionka, czy nanorurki węglowe. Ponadto, dzięki odpowiedniemu dobraniu warunków syntezy udało się otrzymać mikrosferyczne TiO_2 , które dzięki swojej strukturze okazały się być materiałem biokompatybilnym^[44]. Jedynym powodem do niepokoju związanym z toksycznością dwutlenku tytanu, jest fakt, iż w niektórych badaniach wykazał on genotoksyczność^[45], która uwarunkowana była najprawdopodobniej faktem, iż cząstki nie miały budowy sferycznej^[46].

Dwutlenek krzemu

W porównaniu z dwutlenkiem tytanu, SiO_2 został przebadany bardziej dokładnie ze względu na występowanie choroby zwanej sylikozą (krzemicą), czyli chorobą płuc wywołaną krystaliczną krzemionką^[47]. Badania dotyczące nanotoksykologii dwutlenku krzemu skupiają się głównie na badaniach prowadzonych na amorficznej krzemionce^[48]. Brak toksyczności wykazano w przypadku funkcjonalizowanych fluoroforem nanocząstek SiO_2 o wymiarach poniżej 50 nm w badaniach przeprowadzonych na komórkach monocytowych^[49]. Badania cytotoksyczne prowadzone na mezoporowatym SiO_2 funkcjonalizowanym za pomocą grup alkilofosforanowych o rozmiarach około 130 nm nie wykazały praktycznie żadnej toksyczności w stosunku do komórek nowotworowych, do momentu, aż do opisanych nanocząstek nie został przyłączony lek antynowotworowy^[50]. Z kolei funkcjonalizowane nanocząstki dwutlenku krzemu, na powierzchni których osadzono związki światłoczułe, nie wykazywały żadnych właściwości toksycznych w stosunku do komórek rakowych, aż do momentu w którym nie uległy naświetleniu, co zaowocowało powstaniem reaktywnych form tlenu^[51]. Podsumowując, amorficzne nanocząstki dwutlenku krzemu są uważane za materiał biokompatybilny oraz niecytotoksyczny, pod warunkiem, że nie uległ modyfikacjom chemicznym.

Tlenki żelaza

Tlenki żelaza występują w postaci kilku faz: hematytu ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), magnetytu

(Fe_3O_4), maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oraz wustytu (FeO). Spośród wszystkich wymienionych faz to właśnie nanocząstki utworzone z magnetytu cieszą się największym zainteresowaniem, głównie ze względu na możliwość zastosowania ich w badaniach biomedycznych. Nanocząstki Fe_3O_4 o rozmiarach poniżej 10 nm posiadają właściwości superparamagnetyczne, co umożliwia zastosowanie ich jako sondy w magnetycznym rezonansie jądrowym, które łączą się ze specyficznymi komórkami lub tkankami w organizmie. Synteza nanocząstek magnetytu jest niezwykle łatwa oraz relatywnie niedroga, co dodatkowo ułatwiłoby zastosowanie ich na większą skalę. W przeciwieństwie do dwutlenku tytanu, czy krzemionki, tlenki żelaza są częściowo rozpuszczalne w środowisku kwaśnym zawierającym siderofory (związki chemiczne chelatujące jony żelaza).

Badania neurotoksyczności *in vitro* tlenków żelaza przeprowadzono używając komórek z linii PC12, które różnicują się pod wpływem obecności czynników wzrostu nerwów^[52]. Okazało się, że w obecności tlenków żelaza spadła zawartość białka GAP-43, które jest odpowiedzialne za wzrost neuronów, co oznacza, iż tlenki żelaza mogą mieć negatywny wpływ na układ nerwowy. Podejrzewa się, że za taką aktywność tlenków żelaza odpowiada ujemny ładunek ich powierzchni jaki tworzy się w fizjologicznych warunkach pH. Należy przy tym pamiętać, iż w przypadku badań neurotoksyczność niezwykle ważne jest sprawdzanie efektów krótkoterminowych oraz efektów jakie powstają na skutek chronicznego narażenia na dany czynnik.

Nanocząsteczki tlenku żelaza o wymiarach około 50 nm były przyłączone do ich powierzchni peptydu CREKA (Cys-Arg-Glu-Lys-Ala), który selektywnie łączy się z powierzchnią komórek nowotworowych^[53]. Dzięki temu uzyskano nanocząstki przyłączające się do nowotworu, co w następstwie powodowało tworzenie się skrzepów krwi, które tworzyły nowe miejsca, do których mogły się przyłączyć opisane nanocząstki. Tego typu celowana toksyczność jest nowym zastosowaniem dla tlenków żelaza i stanowi pewną odmianą dla stosowania ich wyłącznie jako czynnik kontrastowy.

Tlenek ceru(IV)

Tlenek ceru CeO_2 jest bardzo wydajnym katalizatorem reakcji utlenienia, który chociażby odpowiada za utlenienie tlenku węgla do dwutlenku węgla w katalizatorach samochodowych. W ostatnich latach wiele prac poświęcono opisowi zjawiska ochrony komórek przez nanocząstki dwutlenku ceru^[54-55]. Nanocząstki CeO_2 zapobiegają tworzeniu się reaktywnych form tlenu *in vitro* oraz *in vivo*. Dowodem na to jest fakt, iż rozkład komórek fotoreceptorowych pod wpływem światła uległ zmniejszeniu po wprowadzeniu do ich otoczenia nanocząstek CeO_2 . Oznacza to, że podawanie ów nanomateriału

w terapeutycznych dawkach może przyczynić się do zmniejszenia negatywnych efektów chorobowych pochodzących od tworzenia się reaktywnych form tlenu^[56]. We wcześniejszych badaniach z użyciem promieniowania jonizującego wykazano, iż zdrowe komórki, które poddano działaniu nanocząstek dwutlenku ceru przeżyły naświetlanie, podczas gdy komórki nowotworowe zostały zniszczone. Fakt takiego zachowania dwutlenku ceru wynika ze zdolności ceru do zmieniania stopnia utlenienia (pomiędzy Ce^{+IV} , a Ce^{+III}) oraz tego, iż CeO_2 toleruje występowanie defektów strukturalnych i w rzeczywistości jego wzór można zapisać jako CeO_{2-x} ^[57]. Ładunek powierzchniowy nanocząstek CeO_2 zbadano w szeregu różnych wartości pH oraz innych warunkach otrzymywania nanomateriału. Okazało się, że absorpcja białek rośnie wraz ze wzrostem potencjału zeta (jest to potencjał jaki występuje na granicy fazy absorpcyjnej oraz dyfuzyjnej), natomiast same nanocząstki są tym lepiej wchłaniane przez komórki, im niższy jest ich ładunek powierzchniowy. Warunki syntetyczne znacznie wpływają na punkt izoelektryczny nanocząstek CeO_2 , gdyż uzyskiwano wartości między 4,5 a 9,5 (dla odpowiednio metody mikroemulsyjnej oraz hydrotermalnej)^[58]. Tak różne wartości punktów izoelektrycznych mogą okazać się kluczowe w przypadku stosowania tego typu materiałów w układach biologicznych.

Pomimo, że pojawia się coraz więcej potencjalnych zastosowań dla nanomateriałów w przemyśle, czy medycynie, wciąż wymagają one przeprowadzenia wielu badań, których celem byłoby sprawdzenie zagrożeń, jakie niosą one ze sobą dla organizmów żywych. Właściwości fizykochemiczne nanocząstek tak znacznie różnią się od siebie, iż wciąż niemożliwe jest ich pełne sklasyfikowanie, które jednocześnie umożliwiłoby przewidzenie ich toksyczności. Nanocząstki są w stanie wnikać do organizmu poprzez drogi oddechowe, pokarmowe lub skórę, przy czym przyjmuje się, że pierwszy z wymienionych sposobów jest wciąż najczęściej spotykany w życiu codziennym. Relatywna ilość nanocząstek jaka ulegnie absorpcji przez organizm człowieka, nie zależy tylko od wymienionych sposobów ich wprowadzenia, ale także od ich składu chemicznego oraz właściwości fizykochemicznych. Metabolizm, dystrybucja, akumulacja oraz eliminacja zależą od rodzaju wprowadzonych nanocząstek, ich rozmiaru, kształtu, ładunku, a także od sposobu w jaki zostały zaabsorbowane. W wyniku procesu dystrybucji nanomateriały znajdowano w praktycznie wszystkich tkankach oraz organach, takich jak krew, płuca, nerki, wątroba, serce, śledziona oraz mózg. Badania prowadzone nad toksycznością ostrą oraz przewlekłą wciąż nie są kompletne i wymagają dalszego prowadzenia. Eksperymenty na zwierzętach wykazały, że część nanomateriałów może wywoływać negatywne efekty w organizmie człowieka, a ponadto część z nich

może ulegać akumulacji w organach oraz tkankach. Oznacza to, że nanomateriały przed wprowadzeniem do użycia w medycynie, czy innych dziedzinach nauki oraz życia muszą przejść przez dobrze zaprojektowany oraz dobrany system badań toksykologicznych.

Literatura

1. Zhao, J.; Castranova, V., Toxicology of Nanomaterials Used in Nanomedicine. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 2011, 14 (8), 593-632.
2. Oberdörster, G., Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine* 2010, 267 (1), 89-105.
3. Shvedova, A.A.; Kagan, V.E., The role of nanotoxicology in realizing the 'helping without harm' paradigm of nanomedicine: lessons from studies of pulmonary effects of single-walled carbon nanotubes. *Journal of Internal Medicine* 2010, 267 (1), 106-118.
4. Gulumian, M.; Vallyathan, V., Preface. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 2010, 73 (5-6), 339-340.
5. Linkov, I.; Satterstrom, F.K.; Corey, L.M., Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2008, 4 (2), 167-171.
6. Hagens, W.I.; Oomen, A.G.; de Jong, W.H.; Cassee, F.R.; Sips, A.J.A.M., What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2007, 49 (3), 217-229.
7. Shvedova, A.A.; Kisin, E.; Murray, A.R.; Johnson, V.J.; Gorelik, O.; Arepalli, S.; Hubbs, A.F.; Mercer, R.R.; Keohavong, P.; Sussman, N.; Jin, J.; Yin, J.; Stone, S.; Chen, B.T.; Deye, G.; Maynard, A.; Castranova, V.; Baron, P.A.; Kagan, V.E., Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 2008, 295 (4), L552-L565.
8. Nemmar, A.; Hoet, P.H.M.; Vanquickenborne, B.; Dinsdale, D.; Thomeer, M.; Hoylaerts, M.F.; Vanbilloen, H.; Mortelmans, L.; Nemery, B., Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 2002, 105 (4), 411-414.
9. Zhu, M.-T.; Feng, W.-Y.; Wang, Y.; Wang, B.; Wang, M.; Ouyang, H.; Zhao, Y.-L.; Chai, Z.-F., Particokinetics and Extrapulmonary Translocation of Intratracheally Instilled Ferric Oxide Nanoparticles in

- Rats and the Potential Health Risk Assessment. *Toxicol. Sci.* 2009, 107 (2), 342-351.
10. Li, Y., Quantification of extrapulmonary translocation of intratracheal-instilled particles in vivo in rats: Effect of lipopolysaccharide. *Toxicology* 2006, 222 (3), 195-201.
11. Dominici, F.; McDermott, A.; Daniels, M.; Zeger, S.L.; Samet, J.M., Revised Analyses of the National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study: Mortality Among Residents Of 90 Cities. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 2005, 68 (13-14), 1071-1092.
12. LeBlanc, A.J.; Cumpston, J.L.; Chen, B.T.; Frazer, D.; Castranova, V.; Nurkiewicz, T.R., Nanoparticle Inhalation Impairs Endothelium-Dependent Vasodilation in Subepicardial Arterioles. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 2009, 72 (24), 1576-1584.
13. Lomer, M.C.; Thompson, R.P.; Powell, J.J., Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc* 2002, 61 (1), 123-30.
14. Jani, P.; Halbert, G.W.; Langridge, J.; Florence, A.T., Nanoparticle Uptake by the Rat Gastrointestinal Mucosa: Quantitation and Particle Size Dependency. *J. Pharm. Pharmacol.* 1990, 42 (12), 821-826.
15. Hillyer, J.F.; Albrecht, R.M., Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 2001, 90 (12), 1927-36.
16. Hussain, N.; Jaitley, V.; Florence, A.T., Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, 50 (1-2), 107-42.
17. Sadrieh, N.; Wokovich, A.M.; Gopee, N.V.; Zheng, J.; Haines, D.; Parmiter, D.; Siitonen, P.H.; Cozart, C.R.; Patri, A.K.; McNeil, S.E.; Howard, P.C.; Doub, W.H.; Buhse, L.F., Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide from Sunscreen Formulations Containing Nano- and Submicron-Size TiO₂ Particles. *Toxicol. Sci.* 2010, 115 (1), 156-166.
18. Gulson, B.; McCall, M.; Korsch, M.; Gomez, L.; Casey, P.; Oytam, Y.; Taylor, A.; McCulloch, M.; Trotter, J.; Kinsley, L.; Greenoak, G., Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. *Toxicol. Sci.* 2010, 118 (1), 140-9.
19. Choksi, A.N.; Poonawalla, T.; Wilkerson, M.G., Nanoparticles: a closer look at their dermal effects. *J Drugs Dermatol* 2010, 9 (5), 475-81.
20. Wang, J.J.; Sanderson, B.J.S.; Wang, H., Cyto- and genotoxicity of

- ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2007, 628 (2), 99-106.
21. Lee, K.P.; Trochimowicz, H.J.; Reinhardt, C.F., PULMONARY RESPONSE OF RATS EXPOSED TO TITANIUM-DIOXIDE (TiO₂) BY INHALATION FOR 2 YEARS. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1985, 79 (2), 179-192.
22. Zhao, J.S.; Bowman, L.; Zhang, X.D.; Vallyathan, V.; Young, S.H.; Castranova, V.; Ding, M., Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles Induce JB6 Cell Apoptosis Through Activation of the Caspase-8/Bid and Mitochondrial Pathways. *J. Toxicol. Env. Health Part A* 2009, 72 (19), 1141-1149.
23. Churg, A.; Stevens, B.; Wright, J.L., Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO₂ in a tracheal explant system. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 1998, 274 (1), L81-L86.
24. Gamer, A.O.; Leibold, E.; van Ravenzwaay, B., The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicol. in Vitro* 2006, 20 (3), 301-307.
25. Sadrieh, N.; Wokovich, A.M.; Gopee, N.V.; Zheng, J.W.; Haines, D.; Parmiter, D.; Siitonen, P.H.; Cozart, C.R.; Patri, A.K.; McNeil, S.E.; Howard, P.C.; Doub, W.H.; Buhse, L.F., Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide from Sunscreen Formulations Containing Nano- and Submicron-Size TiO₂ Particles. *Toxicol. Sci.* 2010, 115 (1), 156-166.
26. Rouse, J.G.; Yang, J.Z.; Ryman-Rasmussen, J.P.; Barron, A.R.; Monteiro-Riviere, N.A., Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. *Nano Lett.* 2007, 7 (1), 155-160.
27. Kohli, A.K.; Alpar, H.O., Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *Int. J. Pharm.* 2004, 275 (1-2), 13-17.
28. Hardman, R., A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ. Health Perspect.* 2006, 114 (2), 165-172.
29. Kagan, V.E.; Konduru, N.V.; Feng, W.; Allen, B.L.; Conroy, J.; Volkov, Y.; Vlasova, I. I.; Belikova, N.A.; Yanamala, N.; Kapralov, A.; Tyurina, Y.Y.; Shi, J.; Kisin, E.R.; Murray, A.R.; Franks, J.; Stolz, D.; Gou, P.; Klein-Seetharaman, J.; Fadeel, B.; Star, A.; Shvedova, A.A., Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat Nano* 2010, 5 (5), 354-359.

30. Barrett, E.G.; Johnston, C.; Oberdorster, G.; Finkelstein, J.N., Silica binds serum proteins resulting in a shift of the dose-response for silica-induced chemokine expression in an alveolar type II cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999, *161* (2), 111-122.
31. Tsuji, J.S.; Maynard, A.D.; Howard, P.C.; James, J.T.; Lam, C.-w.; Warheit, D. B.; Santamaria, A. B., Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part IV: Risk Assessment of Nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 2006, *89* (1), 42-50.
32. Rothen-Rutishauser, B.M.; Schurch, S.; Haenni, B.; Kapp, N.; Gehr, P., Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* 2006, *40* (14), 4353-4359.
33. Oberdorster, G.; Sharp, Z.; Atudorei, V.; Elder, A.; Gelein, R.; Kreyling, W.; Cox, C., Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicol.* 2004, *16* (6-7), 437-445.
34. Ogawara, K.; Yoshida, M.; Furumoto, K.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Higaki, K.; Kimura, T., Uptake by hepatocytes and biliary excretion of intravenously administered polystyrene microspheres in rats. *J. Drug Targeting* 1999, *7* (3), 213-+.
35. Chen, J.K.; Shih, M.H.; Peir, J.J.; Liu, C.H.; Chou, F.I.; Lai, W.H.; Chang, L.W.; Lin, P.P.; Wang, M.Y.; Yang, M.H.; Yang, C.S., The use of radioactive zinc oxide nanoparticles in determination of their tissue concentrations following intravenous administration in mice. *Analyst* 2010, *135* (7), 1742-1746.
36. Semete, B.; Booysen, L.; Lemmer, Y.; Kalombo, L.; Katata, L.; Verschoor, J.; Swai, H.S., In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomed.-Nanotechnol. Biol. Med.* 2010, *6* (5), 662-671.
37. Sabbioni, E.; Fortaner, S.; Bosisio, S.; Farina, M.; Del Torchio, R.; Edel, J.; Fischbach, M., Metabolic fate of ultratrace levels of GeCl₄ in the rat and in vitro studies on its basal cytotoxicity and carcinogenic potential in Balb/3T3 and HaCaT cell lines. *J. Appl. Toxicol.* 2010, *30* (1), 34-41.
38. Cho, M.J.; Cho, W.S.; Choi, M.; Kim, S.J.; Han, B.S.; Kim, S.H.; Kim, H.O.; Sheen, Y.Y.; Jeong, J.Y., The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 2009, *189* (3), 177-183.
39. Ballou, B.; Lagerholm, B.C.; Ernst, L.A.; Bruchez, M.P.; Waggoner, A. S., Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjugate Chem.* 2004, *15* (1), 79-86.

40. Yoshida, K.; Morita, M.; Mishina, H., Cytotoxicity of metal and ceramic particles in different sizes. *JSME International Journal, Series C: Mechanical Systems, Machine Elements and Manufacturing* 2003, 46 (4), 1284-1289.
41. Sayes, C.M.; Wahi, R.; Kurian, P.A.; Liu, Y.; West, J. L.; Ausman, K.D.; Warheit, D.B.; Colvin, V.L., Correlating Nanoscale Titania Structure with Toxicity: A Cytotoxicity and Inflammatory Response Study with Human Dermal Fibroblasts and Human Lung Epithelial Cells. *Toxicol. Sci.* 2006, 92 (1), 174-185.
42. Warheit, D.B.; Webb, T.R.; Sayes, C.M.; Colvin, V.L.; Reed, K.L., Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol. Sci.* 2006, 91 (1), 227-36.
43. Soto, K. F.; Carrasco, A.; Powell, T. G.; Garza, K. M.; Murr, L. E., Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufacture dnanoparticulate materials characterized by transmissionelectron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research* 2005, 7 (2-3), 145-169.
44. Suh, W.H.; Jang, A.R.; Suh, Y.H.; Suslick, K.S., Porous, hollow, and ball-in-ball metal oxide microspheres: preparation, endocytosis, and cytotoxicity. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* 2006, 18 (14), 1832-1837.
45. Wang, J.J.; Sanderson, B.J.S.; Wang, H., Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2007, 628 (2), 99-106.
46. Yamamoto, A.; Honma, R.; Sumita, M.; Hanawa, T., Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2004, 68 (2), 244-256.
47. Brunner, T.J.; Wick, P.; Manser, P.; Spohn, P.; Grass, R.N.; Limbach, L.K.; Bruinink, A.; Stark, W.J., In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40 (14), 4374-4381.
48. Bharali, D.J.; Klejbor, I.; Stachowiak, E.K.; Dutta, P.; Roy, I.; Kaur, N.; Bergey, E.J.; Prasad, P.N.; Stachowiak, M.K., Organically modified silica nanoparticles: A nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005, 102 (32), 11539-11544.
49. Rieter, W.J.; Kim, J.S.; Taylor, K.M.L.; An, H.; Lin, W.; Tarrant, T., Hybrid silica nanoparticles for multimodal imaging. *Angewandte Chemie - International Edition* 2007, 46 (20), 3680-3682.

50. Lu, J.; Liong, M.; Zink, J.I.; Tamanoi, F., Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs. *Small* 2007, 3 (8), 1341-1346.
51. Ohulchanskyy, T.Y.; Roy, I.; Goswami, L.N.; Chen, Y.; Bergey, E.J.; Pandey, R.K.; Oseroff, A.R.; Prasad, P.N., Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Nano Lett.* 2007, 7 (9), 2835-2842.
52. Pisanic Ii, T.R.; Blackwell, J.D.; Shubayev, V.I.; Fiñones, R.R.; Jin, S., Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials* 2007, 28 (16), 2572-2581.
53. Simberg, D.; Duza, T.; Park, J. H.; Essler, M.; Pilch, J.; Zhang, L.; Derfus, A.M.; Yang, M.; Hoffman, R. M.; Bhatia, S.; Sailor, M. J.; Ruoslahti, E., Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, 104 (3), 932-936.
54. Das, M.; Patil, S.; Bhargava, N.; Kang, J. F.; Riedel, L.M.; Seal, S.; Hickman, J.J., Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials* 2007, 28 (10), 1918-1925.
55. Niu, J.; Azfer, A.; Rogers, L.M.; Wang, X.; Kolattukudy, P.E., Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 2007, 73 (3), 549-559.
56. Chen, J.; Patil, S.; Seal, S.; McGinnis, J. F., Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat. Nanotechnol.* 2006, 1 (2), 142-150.
57. Mogensen, M.; Sammes, N.M.; Tompsett, G.A., Physical, chemical and electrochemical properties of pure and doped ceria. *Solid State Ionics* 2000, 129 (1), 63-94.
58. Patil, S.; Sandberg, A.; Heckert, E.; Self, W.; Seal, S., Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* 2007, 28 (31), 4600-4607.

Rozdział 2

Liposomy w kosmetyce – otrzymywanie, właściwości fizykochemiczne i zastosowanie

Magdalena Górzyńska, Joanna Gościańska, Izabela Nowak
*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii,
Umultowska 89b, 61-614 Poznań*

1. Wstęp

Kult piękna i młodości jest znakiem rozpoznawczym naszych czasów, coraz większą wagę przywiązujemy do wyglądu zewnętrznego. Starzenie jest nieuniknionym procesem biologicznym, który czeka każdego z nas, mimo to łapiemy się wszystkich możliwych sposobów by jak najdłużej cieszyć się młodym wyglądem. W celu opóźnienia procesów starzenia oraz pielęgnacji i dodania urody powstały kosmetyki. W odpowiedzi na potrzeby milionów klientów, prowadzone są badania nad nowoczesnymi preparatami, które będą działać jeszcze silniej i efektywniej. Powstają również dermokosmetyki (nazywane także kosmeceutykami), czyli preparaty z pogranicza medycyny i kosmetyki. Zawierają one substancje biologicznie czynne i wykazują działanie zbliżone do leków.

Warto zaznaczyć, że współczesna kosmetologia to nie tylko poszukiwanie nowych substancji aktywnych, ale także metody ich wprowadzania przez skórę. Możliwość sprawnego przenikania przez naskórek zwiększyły mikroskopijskiej wielkości układy, otoczone błoną i zawierające niewielką ilość substancji aktywnych. Takie systemy nośnikowe spełniają funkcję transporterów wszelkich substancji [1,2]. Wyglądem przypominają mikrokapsuły z zamkniętą w środku cenną zawartością. Najbardziej znanymi nośnikami są liposomy („lipo” – tłuszcz, „soma” – ciało). Są to kuliste pęcherzyki o rozmiarach koloidalnych, zbudowane z jednej lub kilku dwuwarstw lipidowych [2,3]. Jako bardzo użyteczne systemy modelowe wykorzystywane są w badaniach biologicznych, fotochemii, chemii fizycznej, biochemii, medycynie, a nawet w matematyce [4,5]. Obecnie najważniejszą rolę odgrywają w gałęziach przemysłu kosmetycznego i farmaceutycznego. Niezwykle interesujący jest fakt, że ze

względem na swoje specyficzne właściwości potrafią dostarczać do organizmu m.in. substancje aktywne o działaniu kosmetycznym, hormony, antybiotyki, leki przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe i grzybobójcze, chroniąc przy tym transportowane substancje. Ogromne zainteresowanie tymi cząsteczkami wzbudził fakt, że są w pełni naturalne i kompatybilne z błoną komórkową [4,5].

Przy omawianiu tych struktur należy zwrócić uwagę na fakt, że pomimo ogromnych korzyści wynikających z ich stosowania, zaufanie do tego rodzaju nośników oraz innych nanostruktur w ostatnich latach wyraźnie zmalało. Dzieje się to za sprawą doniesień o potencjalnym ryzyku, jakim jest ich wnikanie do układu krążenia i kumulowanie się w tkankach [6].

2. Liposomy

Liposomy zostały odkryte w 1961 r. przez hematologa Alexa Banghama z Institute of Animal Physiology z Babraham podczas testowania nowego mikroskopu elektronowego [7-9]. Bardzo szybko zaobserwowano, że mogą one utrzymywać w swoim wnętrzu zarówno cząsteczki, jak również jony. Od tego momentu wykorzystywano je jako modele do badania błon biologicznych oraz nośniki.

Liposomy są zamkniętymi, kulistymi pęcherzykami, zbudowanymi z biwarstwy fosfolipidowej. Polarne główki zewnętrznej warstwy są skierowane w kierunku otaczającego je roztworu, a główki wewnętrzne chronią węglowodorowe łańcuchy ogonków obu warstw przed hydrofilowym roztworem, znajdującym się wewnątrz pęcherzyka [3,9,10]. Przenoszone substancje czynne, posiadające powinowactwo do wody, znajdują się w hydrofilowym wnętrzu, natomiast substancje hydrofobowe są transportowane przez lipidowe ścianki. Jedna kropla preparatu liposomowego zawiera 2400 milionów liposomów o średnicy 160 nm [10-12].

Typ liposomu zależy od [13]:

- składu substancji rozpraszającej,
- właściwości składników lipidowych,
- metody przygotowania,
- wielkości.

Najważniejszymi surowcami do otrzymywania liposomów są [14]:

- lecytyny,
- sfingolipidy,
- niejonowe związki powierzchniowo czynne.

Inne substancje dodawane przy produkcji liposomów to sterole, glikolipidy, kwasy i zasady organiczne, polimery syntetyczne oraz przeciwciężła. Wpływają one na ich właściwości fizykochemiczne, biologiczne, wielkość, ładunek oraz

trwałość [9].

Mimo, że amfifilowe związki niefosfolipidowe mogą budować liposomy tak samo jak fosfolipidy, to nazwa „liposomy” jest zastrzeżona dla tych drugich. Struktury zbudowane z innych substancji amfifilowych noszą nazwy takie jak: niosomy, nanosfery, nanocząstki [15].

2.1. Podział liposomów

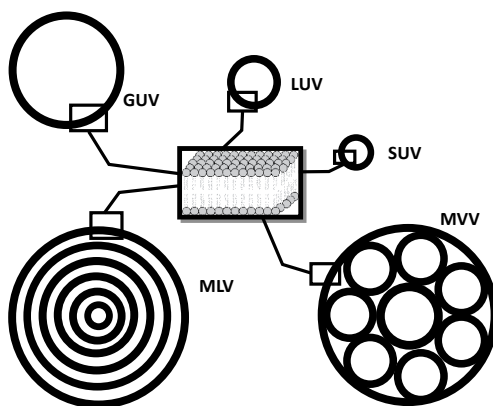
Ze względu na właściwości lipidowej otoczki, liposomy dzielimy na:

- a) obojętne – zbudowane z fosfolipidów (fosfatydylocholiny, dimirystylofosfatydylocholiny, palmityno-D,L-fosfatydylocholiny, kardiolipidów, sfingomieliny) oraz cholesterolu, którego obecność zapewnia kontrolę nad płynnością błony,
- b) dodatnie – otoczka oprócz fosfolipidów i cholesterolu zawiera również związek kationowy (stearyloaminę, bromek etylotrimetyloamoniowy),
- c) ujemne – otoczka zawiera fosfolipidy, cholesterol oraz związek o charakterze anionowym (kwas fosfatydowy, diacetylofosforan) [10,11,13].

Liposomy różnią się między sobą przede wszystkim liczbą budujących je warstw. Drugą różniącą je cechą jest stosunek wielkości przestrzeni wodnej do wielkości lipidu, potrzebnej do jego zamknięcia [15].

Ze względu na rozmiar i warstwowość, liposomy można podzielić na – rys. 1:

1. Liposomy z więcej niż jedną warstwą lipidową:
 - a) wielowarstwowe pęcherzyki lipidowe (MLV – *multilamellar vesicles*) – posiadają rozmiary od 0,4 do 10 μm,
 - b) pęcherzyki oligolamelarne (OLV – *oligolamellar vesicles*) – ich wielkość mieści się w granicach 0,1-1 μm.
2. Liposomy jednowarstwowe (UV – *unilamellar vesicles*):
 - a) małe liposomy jednowarstwowe (SUV – *small unilamellar vesicles*) – rozmiary od 0,02 do 0,05 μm,
 - b) duże liposomy jednowarstwowe (LUV – *large unilamellar vesicles*) posiadające wielkość od 0,1 do 1 μm,
 - c) olbrzymie jednowarstwowe liposomy (GUV – *giant unilamellar vesicles*) - rozmiary > 1 μm,
 - d) wielopęcherzykowe liposomy (MVV- *multivesicular vesicles*) o wielkości > 1 μm [16-19].



Rysunek 1. Rodzaje liposomów ze względu na ich wielkość i warstwowość [15].

Biorąc pod uwagę kryterium objętości przestrzeni wodnej, liposomy SUV i MLV nie mają wielu praktycznych zastosowań. Powodem tego jest fakt, że ilość zamykanego roztworu jest mała w stosunku do wymaganej ilości lipidu potrzebnej dla jego otoczenia. Jednakże zmienia się to wraz z charakterem transportowanego roztworu [15,16].

2.2. Otrzymywanie liposomów

Dotychczas opracowano wiele metod otrzymywania liposomów. Wybór metody zależy od pożądanego rozmiaru pęcherzyków, ich warstwowości, późniejszego zastosowania, dostępności sprzętu oraz tego czy produkcja ma być przeprowadzana w skali laboratoryjnej czy przemysłowej [13].

I Metoda hydratacji lipidu (Bangham, 1965 r.) [20]

Metoda najczęściej stosowana, służy do przygotowywania liposomów MLV. Polega na rozpuszczeniu lipidów w rozpuszczalniku organicznym, który następnie jest odparowywany. Pozostały na kolbie cienki film lipidowy ulega hydratacji pod wpływem wprowadzenia fazy wodnej. Przez lekkie wstrząsanie, wirowanie lub mieszanie lipidy odrywają się od ścian naczynia, zamykając w sobie mikrokropelki roztworu. Plusem tej metody jest prosta produkcja MLV, możliwość zamknięcia w liposomach wielu różnych substancji. Wadą jest natomiast niska objętość zamkniętego solutu oraz niejednorodny rozkład wielkości. Technikę tą stosuje się, gdy nie ma ograniczeń lub preferencji rozmiarowych i warstwowości liposomów [14-16,20].

- II Metoda sonikacji (Oezden i Hasirci, 1991 r.) [20]
Proces przeprowadza się w dezintegratorach zanurzeniowych lub wannowych. Technika tą otrzymuje się małe jednowarstwowe liposomy SUV. Wadą jest niska efektywność enkapsulacji, prawdopodobna degradacja fosfolipidów i zamkniętych roztworów, dostawanie się do preparatu cząstek oderwanych od końcówki metalu w sonikatorach zanurzeniowych oraz duża moc potrzebna do zapewnienia wydajności procesu w sonikatorach wannowych [15,16,20].
- III Prasa Frencha (Hamilton i Guo, 1984 r.) [20]
Metoda ta polega na przeciskaniu dużych liposomów przez niewielki otwór pod ciśnieniem sięgającym 200 barów i w temperaturze 4°C, dzięki czemu powstają liposomy SUV. Jest to technika prosta, szybka, wymaga delikatnego obchodzenia się z niestabilnym materiałem. Powstające pęcherzyki są nieco większe od tych otrzymywanych metodą sonikacji. Mankamentem jest konieczność utrzymania idealnej temperatury i stosunkowo niewielkie objętości otrzymywanych roztworów [15,16,20].
- IV Metoda wstrzykiwania etanolu (Batzri i Koru, 1973 r.) [20]
Metoda polega na szybkim wstrzykiwaniu, przy pomocy strzykawki z bardzo cienką igłą etanolowego roztworu lipidów do fazy wodnej. Natychmiast tworzą się liposomy MLV. Wadą tej metody jest duża heterogeniczność pęcherzyków (od 30 do 110 nm), a roztwór lizosomalny jest rozcieńczony. Trudno jest usunąć resztki etanolu oraz konieczne jest zastosowanie związków trwałych w tym alkoholu [14-16,20].
- V Metoda wstrzykiwania eteru (Deamer i Bangham, 1976 r.) [20]
Lipidy rozpuszcza się w eterze dietylowym i powoli wstrzykuje do wodnego roztworu, ogrzanego do temperatury 55-65°C lub pod zmniejszonym ciśnieniem. Temperatura wrzenia eteru wynosi 35°C, więc w tych warunkach szybko ewaporuje. Prowadzi to do powstania unilamelarnych pęcherzyków. Minusem stosowania tego sposobu jest niejednorodność powstałych liposomów, wielkości w zakresie od 70 do 190 nm, oraz możliwe zastosowanie tylko w przypadku substancji leczniczych trwałych w temperaturze 65°C [14-16,20].
- VI Dializa detergentowa (Kagawa i Rocker, 1971 r.) [20]
Lipid solubilizuje się w roztworze detergentu o wysokiej wartości krytycznego stężenia micelizacji (np. cholanu, oktyloglukozydu). Połączone roztwory poddaje się usuwaniu detergentu poprzez

dializę. W miarę postępu procesu micelle stają się coraz bogatsze w fosfolipidy i ostatecznie łączą się tworząc formuły LUV. Uzyskany roztwór można zagęścić poprzez ultrafiltrację. Zaletą jest wysoka powtarzalność i jednorodność liposomów pod względem wielkości. Natomiast najważniejszym minusem są ślady detergentu w liposomach [15,16,20].

VII Odparowanie techniką faz odwróconych (Szoka i Papahadjopoulos, 1978 r.) [20]

Wodny roztwór mikrokapsulowanej substancji wprowadzany jest do roztworu fosfolipidów w rozpuszczalniku organicznym, niemieszającym się z wodą, ale mającym do niej zbliżoną gęstość. Skutkuje to pojawieniem się miceli odwróconych, a powstały układ jest emulsją typu W/O. Rozpuszczalnik organiczny poddaje się odparowaniu na wyparce próżniowej. Do pozostałości wprowadza się fazę wodną, co powoduje, że mikrokropelki pokrywają się drugą warstwą fosfolipidów i całość przekształca się w liposomy. Zaletą tej metody jest najwyższa wartość enkapsulacji oraz otrzymanie bardzo dużych liposomów. Wadą jest pozostałość rozpuszczalników oraz potencjalna możliwość denaturacji niektórych białek i zerwanie nici DNA w materiale, który ma być transportowany [14-16,20].

VIII Metoda otrzymywania liposomów w kształcie cylindrycznych ślimaków (Papahadjopoulos i Vail, 1978 r.) [20]

Metoda opiera się na obserwacji, że dodatek jonów wapnia Ca^{2+} do SUV powoduje ich przekształcenie się w dwuwarstwowe płaskie krążki, łączące się w większe płytki, które ulegają zawijaniu. Dodatek wersenianu wiąże jony wapnia, a wielowarstwowe struktury o spiralnej konfiguracji powodują powstanie LUV. Zaletą tej metody jest to, że cząsteczki mogą być zamykane w łagodnych warunkach i powstają duże, jednowarstwowe liposomy. Minusem jest konieczność użycia jedynie kwaśnych fosfolipidów [14,20].

2.3. Modyfikacje liposomów

Najprostsze jest wyprodukowanie liposomów MLV. Możliwa jest jednak modyfikacja objętości fazy wodnej zamykanej w liposomach oraz redukcja liczby dwuwarstw fosfolipidowych. Efekt ten można uzyskać przez zastosowanie metody FAT (*Frozen and Thawed*), czyli wielokrotnego zamrażania i rozmrażania. Po raz pierwszy została ona przeprowadzona w 1981 r. przez Pick'a. Zawiesinę liposomów umieszcza się w mieszaninie oziębiającej np. w ciekłym azocie lub suchym lodzie z acetonem, a następnie umieszcza w łaźni

wodnej o temperaturze 60°C. Proces ten powtarza się od kilku do kilkunastu razy [15,20,21].

Celem ujednolicenia wielkości liposomów w zawiesinie, stosuje się technikę kalibrowania VET (*Vesicles by Extrusion Technique*). Liposomy są kalibrowane (przesiewane) przez ekstrudery pod ciśnieniem od 20 do 54 atmosfer, w zależności od wielkości porów i stężenia lipidów. Pęcherzyki przeciskane są przez okrągłe, jednakowej wielkości pory w poliwęglanowych filtrach membranowych. Uzyskuje się dzięki temu mały rozrzut wielkości [15,20,21]. Zalety powyższych technik przedstawia rysunek 2.



Rysunek 2. Zalety stosowania technik VET i FAT [15].

2.4. Właściwości fizykochemiczne liposomów

2.4.1. Stabilność liposomów

Należy unikać kontaktu liposomów ze związkami powierzchniowo czynnymi, które niszczą ich błony. Emulgatory O/W zmieniają ładunek powierzchniowy nośnika, powodując zmniejszenie hydratacji i hydrolizę fosfatydylocholiny. Następuje przy tym zwiększenie płynności i przepuszczalności błony. Może to prowadzić do połączenia pęcherzyków i wycieku substancji aktywnych. Problem hydrolizy można rozwiązać zwiększając płynność łańcuchów węglowodorowych oraz oddziaływanie między fosfolipidami a makrocząsteczkami. Skutek taki uzyskuje się otaczając liposomy błoną z połączonych glikozoaminoglikanów i atelokolagenu (kolagenu typu I, w którym na skutek trawienia pepsyną usunięto telopeptydy) [21].

Z kolei rozpad sfery lipidowej spowodowany jest procesem autooksydacji, w następstwie której dochodzi do degradacji fosfolipidów. Sposobem ochrony jest obecność antyutleniaczy, uwodornionych lecytyn oraz wykorzystanie nasyconych lipidów niejonowych zamiast fosfolipidów. Destabilizację struktury powodują również silnie dysocjujące sole oraz alkohole, które obniżają zawartość wody w liposomach, co w następstwie powoduje ich rozpad [13].

Stabilność liposomów determinują siły napięcia powierzchniowego, ładunek, czy hydrofilowość. Wpływ na to ma również skład lipidowy, długość łańcuchów węglowodorowych oraz płynność dwuwarstwy [22].

2.4.2. Liposomy jako cząsteczki koloidalne

Liposomy mają charakter koloidów, dlatego ulegają charakterystycznym dla nich zjawiskom. Koloidy to układy dyspersyjne, najczęściej dwuskładnikowe, o wyglądzie układów fizycznie jednorodnych, chociaż nie są zmieszane cząsteczkowo. Składnik fazy ciągłej nazywamy substancją rozpraszającą, zaś druga substancja to zawieszona w nim faza rozproszona. W zależności od stanu skupienia tworzących je składników wyróżniamy m. in. zole, aerozole i emulsje [23-25].

Dwuwarstwa elektryczna, potencjał dzeta (ζ)

Główną przyczyną ich kinetycznej stabilności jest obecność ładunku elektrycznego na powierzchni cząstek, który powoduje gromadzenie się w pobliżu ładunku o przeciwnym znaku. Jest to szczególnie ważne w przypadku liposomów, gdyż wykorzystuje się w nich składniki o różnym stopniu zjonizowania grup polarnych [23,24]. Wyróżniamy dwa obszary występowania ładunku. Pierwszy to nieruchoma, przylegająca warstwa jonów. Promień tej

sfery nazywamy promieniem ścinania. Drugi obszar to ruchoma atmosfera jonowa, powstała w wyniku przyciągania przeciwnie naładowanych cząstek. Obie te warstwy tworzą podwójną warstwę elektryczną [23-25]. Potencjał elektryczny powstały na granicy rozdziału fazy stałej i ruchomej to potencjał elektrokinetyczny, inaczej potencjał dzeta (ζ). W znacznym stopniu zależy on od rodzaju cząstek, ośrodka rozpraszającego i obecnych w nim jonów. Do jego wyznaczania wykorzystuje się elektroforezę. Potencjał dzeta jest uzależniony od wartości ruchliwości elektroforetycznej.

$$Ue = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f(\kappa a)$$

gdzie:

Ue – ruchliwość elektroforetyczna

ε – przenikalność elektryczna ośrodka

η – lepkość ośrodka

$f(\kappa a)$ – funkcja Henry'ego

κa – stosunek promienia cząstki do podwójnej warstwy elektrycznej

ζ – potencjał dzeta [26].

Wartość potencjału elektrolitycznego zmniejsza się wraz ze wzrostem siły jonowej, więc również stężenia fazy rozproszonej. W silnym elektrolicie, w którym siła jonowa jest wysoka, wartość potencjału zanika szybciej niż w elektrolitach słabych. Niezmienna i wysoka bezwzględna wartość tego potencjału oznacza, że układ koloidalny zachowuje stabilność w czasie, a procesy starzenia zachodzą bardzo wolno. Gdy jego wartość maleje, rośnie szybkość koagulacji [26,27].

Koagulacja i flokulacja

Koagulacja to proces polegający na łączeniu się cząstek fazy zdyspergowanej w większe agregaty o nieregularnym kształcie. Towarzyszy temu zmniejszenie entalpii swobodnej i powierzchni, co jest wynikiem działania przyciągających sił van der Waals'a. W normalnym przedziale odległości występuje bariera energetyczna hamująca ten proces, jednak zwiększenie energii cieplnej cząstek prowadzi do ich zderzeń. Rosnące agregaty mogą ulegać sedymentacji, aż do rozdziału fazy rozproszonej i rozpraszającej [23,24].

Pierwszym etapem, nieprowadzącym jeszcze do bezpośredniego zetknięcia cząsteczek jest flokulacja. Dopóki między cząsteczkami występuje warstwa rozpuszczalnika, można je rozdzielić poprzez mieszanie i dodatek odpowiednich

substancji. Układ odporny na flokulację można otrzymać poprzez silne naładowanie cząstek przy bardzo niskim stężeniu elektrolitu oraz przez naniesienie warstw substancji powierzchniowo czynnych lub wielkocząsteczkowych, które powodują możliwie najniższe oddziaływania dyspersyjne [23].

Ruchy Browna

Inną własnością kinetyczną układów koloidalnych jest dyfuzja, która ze względu na większe rozmiary cząstek niż w roztworach rzeczywistych przebiega znacznie wolniej. Obserwując mikroskopowo układy dyspersyjne można dostrzec ruchy Browna, czyli intensywne, chaotyczne ruchy drgające. Są one tym silniejsze, im mniejsze są cząsteczki i wyższa temperatura. Na ruchy Browna nie ma wpływu stan skupienia faz, a jedynie działanie zewnętrznego pola sił i czas [23,26,28].

Równanie opisujące ruchy Browna [26]:

$$\bar{x}^2 = \frac{RT}{N_A} \times \frac{t}{3\pi\eta r}$$

gdzie:

$\bar{x}^2$ – kwadrat średniego rozrzutu cząstki koloidalnej na wybraną oś

η – współczynnik lepkości

r – promień cząstki koloidalnej

t – czas obserwacji

N_A – liczba Avogadro

R – uniwersalna stała gazowa

T – temperatura.

Właściwości optyczne, efekt Tyndalla

Istotne znaczenie przy omawianiu koloidów mają właściwości optyczne. Wiązka światła padając na roztwór może zostać zaabsorbowana – w przypadku roztworów właściwych lub rozproszona – w przypadku koloidów. Światło napotykając materię wzbudza jej drgania i powoduje wyprodukowanie wtórnych fal elektromagnetycznych. Rozpraszanie to dyfrakcja światła na niejednorodnościach, a układy koloidalne są przykładem ośrodka optycznie niejednorodnego. Objawia się to świeceniem ośrodka rozpraszającego, będącego efektem drgań cząsteczek [26].

Cechą charakterystyczną, odróżniającą układy koloidalne od innych jest efekt Tyndalla. W wyniku przepuszczania światła przez taki roztwór, ulega ono ugięciu, rozproszeniu na cząsteczkach fazy zdyspergowanej i przybiera

widoczną formę stożka świetlnego. Jego intensywność jest tym większa, im większa jest różnica między współczynnikiem załamania fazy rozproszonej i ośrodka dyspersyjnego oraz jeśli rozpraszane jest światło o krótszej długości fali [29,30].

Micele i krytyczne stężenie micelizacji

Agregatami o koloidalnych rozmiarach, podobnymi w swej budowie do liposomów są micele. Powstają one w wyniku agregacji cząsteczek surfaktantów, czyli związków powierzchniowo czynnych o charakterze amfifilowym. Oznacza to, że są zbudowane z hydrofilowej, polarnej głowy i liofilowego, niepolarnego ogona. W rozcieńczonych roztworach micele występują pojedynczo, natomiast po przekroczeniu wartości krytycznego stężenia micelizacji (*critical micelle concentration* w skrócie CMC) oraz temperatury Kraffta następuje samorzutny proces asocjacji cząsteczek [23,31]. Powstaje termodynamicznie trwała forma, w której hydrofobowe ogony wykazują tendencję do skupiania się, a hydrofilowe głowy stanowią osłonę powstałych ugrupowań. Osiągnięciu CMC towarzyszy skokowa zmiana zależności pewnych właściwości fizycznych roztworów surfaktantów np. przewodnictwa elektrycznego, napięcia powierzchniowego, lepkości, zmętnienia i ciśnienia osmotycznego od ich stężenia [31,32]. Graficzne przedstawienie zmierzonych właściwości jako funkcji stężenia jest metodą wyznaczania CMC [26]. Inną techniką określenia wartości CMC jest metoda solubilizacyjna. Polega na wprowadzeniu do roztworu substancji nierozpuszczalnych w danym rozpuszczalniku np. barwników i obserwacji zmiany barwy roztworu, związanej z solubilizacją barwnika w micelach. Wartość krytycznego stężenia micelizacji wykazuje dużą zależność od struktury surfaktantu, obecności elektrolitu w roztworze oraz innych substancji organicznych a także temperatury. Wartość CMC zwiększa się w przypadku wzrostu rozgałęzienia łańcuchów węglowodorowych, w obecności wiązań podwójnych oraz w wyniku przyłączenia grup polarnych. CMC zmniejsza się w przypadku zwiększenia hydrofobowości surfaktantu, dodania alkoholi, w obecności elektrolitu (szczególnie w przypadku surfaktantów jonowych) [32,33]. Temperatura tylko w nieznacznym stopniu wpływa na wartość CMC. Natomiast obecność substancji organicznych może zwiększać CMC, gdy zmienia się oddziaływanie między surfaktantem a rozpuszczalnikiem lub zmniejszać, gdy ulegają wbudowaniu w micele [32,33].

2.4.3. Parametry liposomów

Podstawowymi parametrami liposomów są [15,34]:

- a) rozmiar – najczęściej stosowane metody pomiarowe to spektroskopia korelacji fotonowej i rozpraszanie światła laserowego,
- b) liczba dwuwarstw:
 - pęcherzyki unilamelarne – jedna dwuwarstwa fosfolipidowa,
 - pęcherzyki multilamelarne – błony lipidowe układają się koncentrycznie, na przemian z warstwami wody,
- c) płynność dwuwarstw – opisuje ruchliwość budujących ją cząstek, zależy m.in. od temperatury i zawartości cholesterolu,
- d) ładunek pęcherzyków – liposomy obojętne, dodatnio i ujemnie naładowane,
- e) objętość zamknięta – stosunek objętości mikrokapsułkowanego roztworu do ilości lipidu (wyrażana w jednostkach [l/mol]),
- f) wydajność kapsułkowania – część solutu zamknięta w liposomach.

Wartość proporcjonalna do stężenia lipidu w preparacie liposomowym. Inne parametry wraz z metodami analitycznymi służącymi do ich określania podano w tabeli 1.

Tabela 1. Różne parametry służące do oceny właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych liposomów [4,5]

Właściwości fizyczne	
Parametr	Metody analityczne/instrumentalne
1 Kształt i morfologia powierzchni	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM); mikroskopia elektronowa łączona z techniką kriorytowniczą (<i>freeze fracture</i>)
2 Średni rozmiar oraz rozkład rozmiaru cząstek	Analiza fazowa światła rozproszonego; dyfrakcja laserowa (Mastersizer); dynamiczne rozpraszanie światła (Zetasizer NZ)
3 Ładunek powierzchniowy	Elektroforeza
4. Potencjał elektrokinetyczny	Pomiar potencjału zeta
5 Lamelarność/warstwowość	Niskokątowe rozpraszanie promieni X (SAXS), ³¹ P-NMR; mikroskopia elektronowa łączona z techniką kriorytowniczą
6 Skład fazowy	Mikroskopia elektronowa łączona z techniką kriorytowniczą; skaningowa różnicowa kalorymetria (DSC)
7 Zawartość składnika aktywnego	Chromatografia jonowymienna; wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)
8 Uwalnianie składnika aktywnego	Komory dyfuzyjne/dializacyjne

Właściwości chemiczne	
Parametr	Metody analityczne/instrumentalne
1 Zawartość fosfolipidów	Test Barletta, test Stewarta, HPLC
2 Zawartość cholesterolu	Test z oksydazą cholesterolową, HPLC
3 Utlenianie fosfolipidów	Spektroskopia UV, jodometria chromatografia gazowa
4 Hydroliza fosfolipidów, autoutlenianie cholesterolu	HPLC; chromatografia cienkowarstwowa
5 Osmolarność	Osmometr
Właściwości biologiczne	
1 Sterylność	Kultury bakterii aerobowych i anaerobowych
2 Pirogenicność (substancje pirogenne)	Metoda z użyciem lizatu amebocytów skrzypłocza – Test LAL (<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>)
3 Toksyczność dla zwierząt	Cytotoksyczność komórkowa, histologia, patologia

3. Zastosowanie liposomów w kosmetykach

Pomimo, że naukowcy poznali liposomy już w 1961 r., to na ich praktyczne zastosowanie w farmacji i kosmetyce czekano do lat 80., kiedy to stały się prawdziwym hitem. Firmy L’Oreal i Christian Dior pierwsze produkty oparte na formule liposomowej wprowadziły na rynek w 1987 roku [2,7].

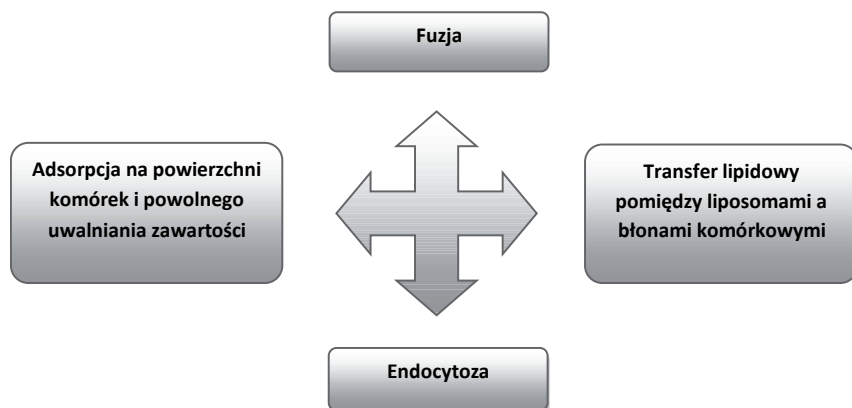
W kosmetykach stosuje się liposomy o rozmiarach mieszczących się w granicach od 100 do 300 nm [35]. Sposób ułożenia fosfolipidów w liposomach przypomina strukturę błony komórkowej. Ze względu na to podobieństwo, mają one zdolność „oszukiwania” skóry i jej głębokiej penetracji [14,35]. Czyni je to najlepszym narzędziem do wprowadzania substancji aktywnych pod powierzchnię skóry, po jej wcześniejszym zamknięciu wewnątrz pęcherzyka. Liposomy przenikają przez kolejne warstwy naskórka, rzadko osiągając warstwę ziarnistą, w tym czasie przez otaczającą je błonę stopniowo dyfunduje transportowany roztwór lub gwałtownie, jeśli powłoka zostanie rozerwana przez lipazy [10]. Pęcherzyki podczas przechowywania i przenoszenia substancji, zabezpieczają ją również przed degradującym wpływem środowiska zewnętrznego oraz przed rozkładem enzymatycznym. To powoduje, że idealnie nadają się do transportu trudno rozpuszczalnych substancji i ich uwalniania w pożądanym miejscu [36]. Materiał lipidowy, z którego zbudowane są liposomy jest w pełni biogodny i biodegradowalny. Po rozbiciu enzymatycznym zostają naturalnie wbudowane w struktury warstwy rogowej naskórka, odżywiają ją

przy tym, wzmacniają, przywracają równowagę hydrolipidową i zapobiegają wysychaniu skóry [10,11,35].

Mikrokapsułkowanie umożliwia wprowadzenie niemal dowolnych substancji czynnych, w których nie stwierdzono toksyczności. Liposomy są kompatybilne z większością surowców. Zastosowanie tej metody umożliwia kontrolowane, stopniowe uwalnianie, jest to tzw. efekt chronobiologiczny, stosowany w preparatach o przedłużonym działaniu, takich jak: „Biomoiest” Ellen Betrix, „Prolongatum” Dermiki, „Hydra+” RoC-a, „Multi-regenerative” Clarinsa [10,11].

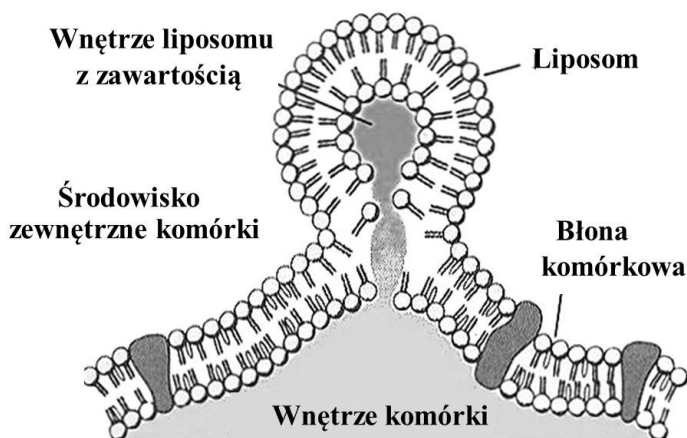
Pomiędzy liposomami a komórką skóry zachodzą różne zjawiska, podczas których dochodzi do ich wypakowania i wchłonięcia (rys. 3). Dzieje się to na zasadzie [14]:

- adsorpcji na powierzchni komórek i powolnego uwalniania zawartości (rys. 4);
- endocytozy, czyli wchłonięcia liposomów do wnętrza komórki. Dochodzi do ich strawienia przez lizosomy, co prowadzi do uwolnienia substancji *in situ*, a składniki odporne na te enzymy np. leki mogą wnikać do cytoplazmy;
- transferu lipidowego pomiędzy liposomami a błonami komórkowymi. Z lizosomalnych ścianek lipidy przechodzą do cytoplazmy i na odwrót, natomiast wodna zawartość nośnika zostaje na zewnątrz. Substancje lecznicze rozpuszczalne w tłuszczach mogą w ten sposób wnikać do komórek;
- fuzji, która polega na wtopieniu i wymieszaniu zawartości membrany pęcherzyka z błoną komórki.



Rysunek 3. Oddziaływania pomiędzy liposomem a komórką skóry [14].

Podczas tych interakcji dochodzi do upłynnienia błon komórkowych, umożliwia to przenikanie substancji aktywnych. Wykorzystując te procesy można także zastosować puste liposomy. Poprawiają one funkcje transportowe skóry, poprzez rozluźnienie gęsto upakowanych lipidów i hydratację warstwy. Przygotowuje to skórę na podanie leku w postaci wolnej. Nieobciążone liposomy regenerują warstwę ochronną naskórka, poprawiają elastyczność. Mogą również leczyć zmiany patologiczne, takie jak trądzik lub poprawiać penetrację takich składników jak np. DHA (dihroksyaceton) [18].



Rysunek 4. Adsorpcja liposomu przez komórkę [9].

Wraz z liposomami do skóry mogą wnikać szkodliwe substancje ze środowiska zewnętrznego, co mogłoby grozić chorobami skóry, a nawet nowotworem. Dlatego specyfiki zawierające liposomy należy stosować na noc, na dobrze oczyszczoną skórę. Po ich wchłonięciu należy zamknąć pory tonikiem ściągającym [12,36]. Kremy takie nie mogą zawierać środków zapachowych i barwników, gdyż ich porcje wnikałyby razem z nośnikami w strukturę skóry. Kosmetyki oparte na recepturze liposomowej przeznaczone są dla cery dojrzałej, wymagającej silnej regeneracji. Nie powinny ich używać kobiety przed 30. rokiem życia, ponieważ intensywnie odżywiana skóra „rozleniwia się” i uzależnia od tego typu preparatów [10-12,36]. Dzięki wysokiej skuteczności wystarcza 2-4 tygodniowa kuracja, aby przywrócić skórze równowagę. Nie poleca się ich do codziennej pielęgnacji. Takie kremy należy stosować od czasu do czasu, w ramach kuracji wspierającej codzienne zabiegi pielęgnacyjne.

Niektóre substancje zamknięte w liposomach mogą mieć działanie alergizujące, dlatego należy stosować kosmetyki dobrych, sprawdzonych firm, które dodają kwas hialuronowy, wiążący wilgoć. Taktyka ta zapobiega powstawaniu alergennych struktur subliposomowych [10,11]. Tabela 2 zawiera spis najbardziej popularnych substancji aktywnych wtłaczanych do liposomów.

Tabela 2. Przykłady wtłaczanych do liposomów substancji aktywnych wykorzystywanych w kosmetyce i farmacji [10,18,35].

Proteiny	Ekstrakty roślinne	Związki syntetyczne i inne	Liposomy specjalne
- kolagen	- aloes	- witaminy	- cząsteczki bogate
- elastyna	- tymianek	A,B,C,E,F	w energię np. ATP
- wyciągi zwierzęce, np. z grasicy, śledziony,	- kielki pszenicy	- pantenol	- fibronektyna
z łożyska wołowego,	- propolis	- allantoina,	- dysmutaza
z błony śluzowej żołądka i jelit młodych zwierząt,	- chmiel	- kofeina	- nadtlenkowa
z embrionów kurzych,	- Ginko biloba	- filtry UV	- karnityna
z tkanki mózgowej świń	- skrzyp polny	- kwas hialuronowy	- heparyna
-wyciąg z chrząstek i szpiku młodych zwierząt,	- kwiaty nagietka	- tyrozyna, DHA	- glutation
- płyn owodniowy, wyciąg z łożyska ludzkiego,	- żeń-szeń	- farnezol	- aminokwasy
- świeże komórki z hodowli komórek embrionalnych	- kwiaty amiki	- kwas asparaginowy	- antybiotyki
- tubulina	- kwiaty karczocha	- hormony	- koenzym Q10
- mikrosfery kolagenowe	- korzeń łopianu	- fitohormony	
	- wilczomlec	- β-hydrokyskwasy	
	- rozmaryn		

Do typowych kosmetyków, których skład opiera się na formulacji liposomowej należą [18]:

- kremy pielęgnacyjne na dzień, na noc, anti-aging oraz pod oczy (m.in. kremy przeciwzmarszczkowe Lirene, Dr Eris, BanDi, Doskonała Skóra Miraculum),
- krem-żele i balsamy po goleniu,
- samoopalacze (m.in. samoopalacz z DHA firmy Guinot),
- olejki na rozstępy,
- płyny do kąpieli,
- preparaty do sauny,

- bezalkoholowe toniki,

zaś wybrane przykłady preparatów kosmetycznych zebrano w tabeli 3.

Tabela 3. Przykładowe liposomowe preparaty kosmetyczne dostępne na rynku (na podstawie [4] oraz stron producentów).

Produkt	Producent	Kluczowe składniki liposomów
Capture	Christian Dior	Liposomy ze składnikami
Efect du Soleil	L'Oréal	środki opalające
Niosomes	Lancome (L'Oréal)	Gliceropolieter ze środkiem nawilżającym
Nactosomes	Lancome (L'Oréal)	witaminy
Formule Liposome Gel	Payot (Ferdinand Muehlens)	kwasy hialuronowy
Future Perfect Skin Gel	Estee Lauder	witamina E, palmitynian retinolu, cerebrozydy, ceramidy, fosfolipidy
Symphatic 2000	Biopharm GmbH	wyciąg z grasicy, palmitynian retinolu
Natipide II	Nattermann PL	lizosomalny żel do kremów typu „zrób to sam”
Flawless Finish	Elizabeth Arden	płynny make-up
Inovita	Pharm/Apotheke	ekstrakt z grasicy, kwas hialuronowy, witamina E
Eye Perfector	Avon	kojący krem do zmniejszenia podrażnienia oczu
Aquasome LA	Nikko Chemical Co.	ze środkiem utrzymującym wilgoć
Lumene Vitamin C	Noiro	witamina C
Faces	Lavera	z olejkiem z nasion czarnych porzeczek i z męczyńcy, witamina E
Koncentrat nawilżający z liposomami	Fitomed	z wyciągami ziołowymi z aralii (żeń - szenia syberyjskiego), siemienia lnianego, lukrecji, nasturcji i protein jedwabiu
Effective Skin Care 5D L'ARISSE	Ava	seria zawierająca aktywne składniki, np. koenzym Q10

Cashmere Care - hydralift	Dax	roślinne komórki macierzyste
Aktywny Krem Liftingujący Na Dzień Z Roślinnymi – STEM CELLS	Dermika	roślinne komórki macierzyste
HAWAII Nektarowy krem wygładzający do twarzy	Dr Irena Eris	witamina E

4. Wady i zalety liposomów

W tabeli 4 zestawiono zalety oraz wady liposomów.

Tabela 4. Zalety i wady liposomów [4,9,10-14,18,35,36]

Zalety	Wady
• Uzupełniają wymyte lipidy bez pozostawiania tłustej warstwy, • Wykazują pełną biodegradowalność, dobrze się wchłaniają, • Regulują równowagę hydrolipidową, • Ograniczają transepidermalną utratę wody, • Wygładzają skórę i przywracają jej spoistość, • Wspomagają funkcje ochronne naskórka, • Odbudowują błony keratynocytów, • Stanowią nośniki substancji hydrofilowych i hydrofobowych, • Zabezpieczają substancje aktywne, które w wodzie łatwo ulegają rozkładowi, • Umożliwiają zastosowanie mniejszych stężeń substancji czynnych niż w przypadku innych kosmetyków, • Nadają skórze elastyczność, jędrność, odżywiają ją, • Zmniejszają wykwity skórne.	• Krótki okres trwałości i przydatności, • Konieczność stosowania substancji stabilizujących, takich jak kopolimery akrylowe, • Utrata stabilności przy zbyt dużej zawartości hydrofobowych substancji aktywnych, • Wyższa cena w porównaniu z tradycyjnymi kosmetykami, • Wrażliwe na podwyższoną temperaturę, • Możliwe działanie alergizujące, • Towarzyszące wnikanie substancji szkodliwych ze środowiska zewnętrznego, • Brak możliwości wprowadzenia liposomów do receptur, których podstawowymi surowcami są detergenty, • Mogą ulec uszkodzeniu podczas homogenizacji, • Wrażliwe na substancje silnie dysocjujące

5. Inne przykłady systemów nośnikowych

Niosomy

Wytworzone z niejonowych środków powierzchniowo czynnych, otrzymywanych syntetycznie. Pierwszy preparat kosmetyczny bazujący na tego rodzaju nośnikach to „Niosomes” L'Oréal. Ich zaletą jest większa trwałość i niewyciekanie substancji aktywnych. Poza tym zachowują się identycznie jak liposomy [17,37].

Sfingosomy

Zbudowane z materiałów pochodzenia zwierzęcego: sfingozyny, ceramidów, cerebrozydów oraz sfingomieliny, z tego powodu stanowią idealny materiał służący do regeneracji naskórka. W ceramidach łańcuchy węglowodorowe są różnej długości, dlatego nachodzą na siebie i występuje między nimi więcej wiązań van der Waalsa. Dzięki zwiększonym oddziaływaniom wykazują większą wytrzymałość oraz stabilność od liposomów [18,37].

Noktosomy

Noktosomy wykorzystywane do nocnej pielęgnacji skóry. Składają się z hydrofilowego wnętrza, zawierającego glikopeptydy oraz liofilowej, ceramidowej warstwy zewnętrznej [18,37].

Marinosomy®

W swym składzie zawierają ekstrakt z naturalnych lipidów organizmów morskich np. kwas eikozapentaenowy oraz dokozaheksaenowy. Wykorzystuje się je w leczeniu chorób skórnych [19].

Etosomy

Oprócz fosfolipidów zawierają stężony etanol i wodę, dzięki czemu zwiększają elastyczność błon oraz penetrację skóry [19].

Nanocząstki

Mikroskopijne cząstki, których rozmiary wyrażane są w nanometrach. Są transporterami liofilowych substancji czynnych i mogą przenikać głęboko w strukturę skóry [19,37].

Przykładami nośników, które nie przenikają przez skórę, tylko pozostają na jej powierzchni są granulosomy i mikrokapsułki, których rozmiary osiągają 100µm. Zbudowane są z polimerów naturalnych i syntetycznych. Mikrokapsułki

są zbudowane z powłok, natomiast sieciowa struktura granulosomów umożliwia ich wypełnienie dużą ilością substancji czynnych [35]. Zestawienie innych przykładowych systemów nośnikowych, zawiera tabela 5.

Tabela 5. Porównanie liposomów, nanocząstek, granulosomów i mikrokapsulek [35]

Nośniki	Rozmiar	Skład	Struktura	Rodzaj przenoszonych substancji
Liposomy	<300nm, przenikają przez warstwę naskórka	Lipidy amifilowe	Powłoki koncentryczne	Hydrofilowe substancje czynne
Nanocząstki	<300nm, przenikają przez warstwę naskórka	Lipidy amifilowe	Powłoki koncentryczne	Liofilowe substancje czynne
Granulosomy	<100μm, pozostają na powierzchni skóry	Polimery	Układ sieciowy	Substancje płynne i rozpuszczalne
Mikrocząstki	< 100μm, pozostają na powierzchni skóry	Polimery	Układ sieciowy	Nieograniczoność

6. Podsumowanie

Przez ostatnie 30-40 lat badania nad liposomami znacznie się rozszerzyły i przekształciły w odrębną dziedzinę, zwaną technologią liposomową. Ma ona solidne teoretyczne i eksperymentalne podstawy. O postępie może świadczyć wzrost liczby patentów, dotyczących otrzymywania i zastosowania liposomów. Na podstawie produktów już obecnych można stwierdzić, że liposomy ugruntowały sobie silną pozycję na rynku. Mimo wielu zalet, posiadają także wady, które próbuje się wyeliminować poprzez odpowiednie modyfikacje powierzchni. Na rynek wprowadzane są również inne nanostrukturalne nośniki o większej stabilności i efektywniejszym działaniu. Mimo ich rywalizacji w przemyśle kosmetycznym, żaden z nich nie odniósł takiego sukcesu jak w latach 80. liposomy, które do tej pory cieszą się sporym zainteresowaniem konsumentów i naukowców.

Pomiędzy zwolennikami a przeciwnikami nanotechnologii istnieje nieustanny spór na temat bezpieczeństwa [38]. Ze względu na swoje niewielkie rozmiary, prawdopodobnie niektóre z nanocząstek potrafią wnikać do układu krwionośnego i kumulować się w tkankach [6]. Wielkość liposomów stosowanych w kosmetyce mieści się w granicach od 100 do 250-300 nm [35]. Wynika to z faktu, że nie udowodniono żeby poprawa przenikania wzrastała proporcjonalnie ze zmniejszaniem rozmiarów nośnika [6]. Poza tym w przypadku preparatów kosmetycznych wnikanie do krwiobiegu jest niewskazane. W związku z tym, że liposomy złożone z fosfolipidów są całkowicie biodegradowalne i w kosmetykach nie stosuje się liposomów mniejszych niż 100 nm, ryzyko wydaje się być tylko potencjalne [39].

Nowoczesne technologie, rozwój i wprowadzane ulepszenia świadczą o tym, że nie jest to metoda przestarzała. Istnieją liczne pola zastosowań i projekty dla zmodyfikowanych liposomów w następnych latach. Prawdziwa przyszłość liposomów tkwi jednak w poszukiwaniu leków przeciwnowotworowych, terapiach genowych i innych zastosowaniach medycznych [4].

Literatura

1. Patravale V.B., Mandawgade S.D.: Novel cosmetic delivery systems: an application update. „International Journal of Cosmetic Science” 2008, 30, 19-33.
2. Magdassi S.: Delivery systems In cosmetics. Elsevier 1997, 123, 671-679.
3. Berg J.M., Tymoczko J.T., Stryer L.: Biochemia. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 2005, 319-338.
4. Lasic D.D.: Liposomes. From physics to applications. Amsterdam: Elsevier 1993, 493-513.
5. Lasic D.D.: Novel Applications of liposomes. Tibtech 1998, 16, 307-321.
6. Nanotechnologia w kosmetykach. Red. Ilona Kurczaba. „Les Nouvelles Esthétiques- Polska” 2008, 1, 18-21.
7. Emsley J.: Piękni, Zdrowi i Witalni. Wyd.1. Warszawa: CiS, 2006, 53-57.
8. de Leeuw J., de Vijlder H.C., Bjerring P., Neumann H.A.: Liposomes in dermatology today. „JEADW” 2009, 23, 505-516.
9. Kumar K.P., Bhownik D., Deb L.: Recent trends in liposomes used as novel drug delivery system. „The pharma innovation” 2012, 1, 28-37.
10. Jurkowska S.: Surowce Kosmetyczne. Wyd.5. popr. rozsz. Wrocław: Wyższa Szkoła Fizykoterapii 2002, 212-217.

11. Jurkowska S.: Skrypt dla słuchaczy Policealnego Studium Kosmetycznego i kursów kosmetyki w Izbie Rzemiosł Różnych. Wyd.2.popr. Wrocław: Ekoprzem 2002, 95-97.
12. Molski M.: Chemia Piękna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 2009, 134-135.
13. Martini M.C.: Kosmetologia i farmakologia skóry. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2007, 432-442.
14. Glinka R.: Receptura Kosmetyczna. Łódź: Oficyna Wydawnicza 2003, 275-280.
15. Kozubek A.: Wstęp do technologii liposomowej. Wrocław: Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego 2004, 1-40.
16. Kozubek A., Sikorski A.F., Szopa J.: Molekularna organizacja komórki II. Lipidy, liposomy i błony biologiczne. Wyd.2.popr. Wrocław: Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego 1996, 90-101.
17. Janicki S., Fiebig A., Sznitowska M., Achmatowicz T.: Farmacja stosowana: podręcznik dla studentów farmacji. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2003, 78-102.
18. Bartosiewicz D., Kozubek A.: Liposomy w dermatologii. „Lek w Polsce” 2008, 7, 85-92.
19. O’Doherty M.: What are liposomes? [on-line] [dostęp 12 marca 2012]. Dostępny w Internecie: <http://www.docstoc.com/docs/74743452/What-are-liposomes>.
20. Riaz M.: Liposomes preparation methods. „Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences” 1996, nr. 19, s. 65-77.
21. Gregoriadis G.: Liposome technology. Vol.1 Liposome preparation and related techniques. Wyd.3. Londyn: Informa healthcare 2007, 35-64.
22. Jones M.N.: The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterization. „Advances In Colloid and interface science” 1995, 54, 93-128.
23. Sonntag H.: Koloidy. Warszawa: PWN 1982, 13-15, 74-158, 211-222.
24. Basiński: Zarys fizykochemii koloidów. Warszawa: PWN 1957, 9-74.
25. Dutkiewicz E.T.: Fizykochemia powierzchni. Warszawa: WNT 1998, 137-208.
26. Roztwory koloidalne i nefelometria [on-line] [dostęp 4 kwietnia 2012]. Dostępny w Internecie: www.katedrachf.umcs.lublin.pl/cwiczenia/cw-v.pdf.
27. Imura T.(i in.): Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method. „Colloid and surfaces: Biointerfaces” 2002, 27, 133-140.

28. Smoluchowski M.: O fluktuacjach termodynamicznych i ruchach Browna. [on-line] [dostęp 14 kwietnia 2012]. Dostępny w Internecie: <http://matwbn.icm.edu.pl/ksiazki/pmf/pmf25/pmf2517.pdf>.
29. Chmielewski P.: Słownik encyklopedyczny. Wrocław: Wydawnictwo Europa 2001, 172.
30. Wasiak A.: Fizyka od A do Z: repetytorium- matura. Warszawa: Wydawnictwo Kram 2005, 368.
31. Atkins P.W.: Chemia fizyczna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 2003, 680-689.
32. Nowicka G., Nowicki W.: Badanie procesu micelizacji surfaktantów jonowych. [on-line] [dostęp 12 stycznia 2012]. Dostępny w Internecie: www.staff.amu.edu.pl/~chemfiz/cw/cw_9.pdf.
33. Wyznaczanie krytycznego stężenia micelizacji surfaktantów jonowych w obecności silnego elektrolitu [on-line] [dostęp 12 stycznia 2012]. Dostępny w Internecie: <http://www.chemia.uj.edu.pl/femto/lab/pdf/micelizacja.pdf>.
34. Heurtault B., Saulnier P., Pech B., Proust J-E., Benoit J.-P.: Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. „Biomaterials” 2003, 24, 4283-4300.
35. Peters I.B.: Kosmetyka. Warszawa: REA 2002, 152-155.
36. Puzanowska-Tarasiewicz H., Wilczewska A.: Podstawy chemii kosmetycznej. Białystok: Wyższa Szkoła Kosmetologii i Ochrony Zdrowia w Białymstoku 2006, 134-135.
37. Nowak I.: Co warto wiedzieć o kosmetykach? [on-line] [dostęp 1 maja 2012]. Dostępny w Internecie: <http://www.wsipnet.pl/kfile.php?klub=26&id=3668>.
38. Snopeczyński T, Góralczyk K, Czaja K, Struciński P., Hernik A, Korcz W, Ludwicki JK.: Nanotechnologia- możliwości i zagrożenia. „Roczniki Państwowego Zakładu Higieny” 2009, 2, 101-111.
39. Teichmüller D., Blume G.: Liposomowe nośniki substancji czynnych-metoda przestarzała czy nowatorska? „International Journal of Applied Science” 2009, 3, 8-12.

Rozdział 3

Kwasy stosowane w kosmetykach przeznaczonych do pielęgnacji skóry trądzikowej

Marta Walasińska, Bogusława Łęska

*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii,
Umultowska 89b, 61-614 Poznań*

Wstęp

Trądzik to problem wielu młodych osób. Dermatolodzy wraz z pacjentami podejmując walkę z nim sięgają zarówno po sposoby sprawdzone od lat jak i korzystają z dopiero co odkrytych metod. Preparatami łączącymi w sobie znane zastosowanie od czasów starożytnych z nowoczesnymi metodami są alfa- i beta-hydroksykwasy. Chętnie są one wykorzystywane w kosmetykach do codziennej pielęgnacji jednak najlepsze działanie wykazują podczas peelingsów chemicznych, które polegają na kontrolowanym uszkodzeniu skóry, powodującym złuszczenie części naskórka, a nawet skóry właściwej. Kwasy owocowe nieświadomie wykorzystywane były już od starożytności w postaci środków do przemywania starym winem, sokiem z jabłek, serwatką. Skóra w efekcie stawała się rozjaśniona, miękka i gładka. Gdy zauważono działanie przeciwbakteryjne zaczęto stosować te preparaty także w przypadku skóry z problemami trądzikowymi aby jak najskuteczniej przywrócić wygląd sprzed choroby. Dzięki bardzo wysokiej skuteczności oraz szybkim efektom peelingsi chemiczne kwasami są najchętniej wybieranymi zabiegami przez osoby, które walczą ze skutkami przebytego trądziku.

1. Trądzik

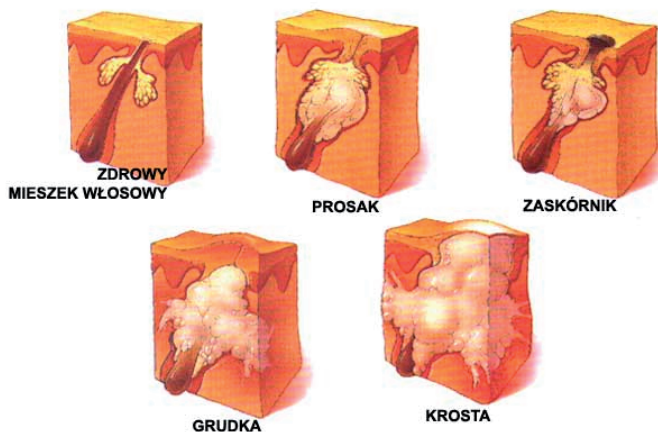
1.1. Charakterystyka choroby

Najpowszechniejszym powodem wizyt w gabinetach dermatologicznych jest trądzik pospolity- najczęstsza choroba skóry. Stanowi on nie tylko duże problemy terapeutyczne, ale także psychologiczne, emocjonalne oraz społeczne. Dolegliwość uwidacznia się w okresie dojrzewania i jest mocno nasiloną u większości nastolatków, może dotyczyć także osoby, które ukończyły 25 lat

oraz kobiety po menopauzie. Szacuje się, że u około 85% pacjentów występuje w postaci łagodnej. Badając częstotliwość zachorowań nie zauważono różnicy jeżeli chodzi o płeć. Zaobserwowano jednak, że u mężczyzn występują cięższe postaci trądziku. Zwykle uwidacznia się on na twarzy. Schorzenie wiąże się głównie z obecnością zaskórników- rozwijają się one obrębie mieszków włosowych [1-3].

1.2. Czynniki powodujące powstawanie trądziku:

- łojotok (u osób mających bardzo tłuste skóry oraz cierpiących na chorobę Parkinsona, akromegalię),
- nadmierne rogowacenie przewodów wyprowadzających i ujść mieszków włosowych (efektem jest powstawanie zaskórników),
- stan zapalny,
- predyspozycja genetyczna (u niemal połowy osób dotkniętych trądzikiem rodzic także cierpiał na tę dolegliwość),
- stres,
- zaburzenia hormonalne (nadmierne wytwarzanie progesteronu, hiperandrogenizm),
- kosmetyki (sterydy, oleje mineralne),
- dbanie o higienę,
- bakterie (głównie: *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium acnes*, *Pityrosporum avale*, *Staphylococcus albus*),
- dieta (kawa, alkohol, ostre przyprawy, chipsy) [1-4].



Rysunek 1. Droga powstawania krosty [1].

1.3. Przebieg trądziku:

- stadium początkowe (niezapalne): zaskórniki otwarte bądź zamknięte, gdy mamy do czynienia z zaskórniakiem otwartym dochodzi do wydzielenia łoju na zewnątrz,
- stadium zaawansowane (zapalne): zaskórniki zamknięte przekształcają się w grudki, krosty, guzki,
- zmiany potrądzikowe: blizny, przebarwienia [5].

1.4. Typy trądziku:

Rodzaje trądziku uzależnione od stopnia zaawansowania choroby:

- łagodny,
- umiarkowany,
- ciężki.

Rodzaje trądziku uzależnione od postaci występującej w przewadze:

- Acne comedonica (trądzik zaskórnikowy),
- Acne papulosa (grudkowy),
- Pustulosa (krostkowy),
- Papulo-pustulosa (grudkowo-krostkowy),
- Phlegmonosa (ropowniczy),
- Nadulo-cystica (guzkowo-torbielowaty),
- Conglobata (skupiony),
- Keloidea (bliznowcowy),
- Acne inversa (odwrócony).

1.5. Leczenie trądziku pospolitego:

1.5.1. Metody konwencjonalne:

Leczenie miejscowe:

Wymaga ono od pacjenta dużej systematyczności, samodyscypliny oraz cierpliwości. Często stanowi uzupełnienie kuracji lekami doustnymi. Miejscowo stosuje się przede wszystkim preparaty oczyszczające, które mogą zawierać niewielkie stężenia tymolu, mentolu, kwasu salicylowego. Ważne jest aby kosmetyki dokładnie oczyszczały oraz miały właściwości odświeżające i odkażające. W leczeniu trądziku miejscowo głównie stosuje się maści zawierające pochodne witaminy A wykazujące działanie przeciwzapalne, hamujące powstawanie mikrozaskórników, zmniejszające hiperkeratozę. Stosowane retinoidy to m.in. adapalen (Differin) i tretinoile (Retin A). Skuteczne są także preparaty przeciwbakteryjne. Jako przykład może posłużyć kwas azelainowy (np. Skinoren, Hascoderm). Działa on antybakteryjnie, przeciwłojotokowo,

keratolitycznie oraz rozjaśniająco na przebarwienia. Innymi preparatami stosowanymi w postaciach trądziku zapalnego są: klindamycyna (np. Dalacin T) oraz erytromycyna (np. Davercin, Zineryt). Dość powszechnym produktem jest także nadtlenek benzoilu, który stosuje się w dość wysokich stężeniach (ok. 10%). Działa on na florę bakteryjną. Wykazuje właściwości komedolityczne, keratolityczne, przeciwzapalne i antibakteryjne oraz złuszczące (przyczynia się do rozrywania mostków disiarczkowych keratyny). Najpopularniejsze preparaty zawierające nadtlenek benzoilu to Benzacne, Brevoxyl oraz Akneroxid. Jednakże w przypadku ich stosowania należy zachować dużą ostrożność gdyż mogą działać silnie wysuszająco, drażniąco oraz mogą wywoływać alergie [4, 5].

1.5.2. Leczenie niekonwencjonalne:

Jest ono równorzędne z leczeniem farmakologicznym. Wspomagającymi metodami są:

- krioterapia, czyli leczenie zimnem (np. ciekłym azotem),
- fototerapia – niebieska fala światła lasera działa miejscowo i wnika na ok 3 mm, promień lasera usuwa zanieczyszczenia oraz bakterie,
- laseroterapia – głównie wykorzystuje się tę metodę w celu gojenia się zmian.

Niestety nawet po wygranej walce z chorobą często na skórze pozostają ślady, przebarwienia, blizny. W celu poprawienia kondycji skóry stosuje się zabiegi silnie złuszczące: mikrodermabrazję, peelingi chemiczne, metody laserowe, a w najcięższych przypadkach nawet zabiegi chirurgiczne [3-5].

2. Dermokosmetyki i kosmeceutyki przeznaczone dla skóry trądzikowej

2.1. Właściwości:

Preparaty te przeznaczone są do pielęgnacji skóry po przebytej kuracji a także w trakcie jej trwania jako uzupełnienie leczenia. Najważniejsze cechy jakie muszą spełniać to:

- niekomedogenność,
- właściwości depigmentujące (rozjaśnianie przebarwień),
- działanie kojące,
- poprawienie nawilżenia skóry,
- działanie antyseptyczne,
- właściwości przeciwłojotokowe [5].

2.2. Kosmetyki zawierające kwasy

Wiele składników aktywnych spełnia te cechy. Jednakże chciałabym skupić się na kwasach, które ostatnio można znaleźć w różnego rodzaju kosmetykach i preparatach specjalistycznych. Dzięki skuteczności są też chętnie zalecane przez lekarzy profesjonalne zabiegi z użyciem kwasów wykonywane w gabinetach dermatologicznych i kosmetycznych.

Przykłady kosmetyków drogeryjnych oraz aptecznych z kwasami polecanych do pielęgnacji skóry trądzikowej:

- kremy – powinny wykazywać delikatne działanie złuszczące, zmniejszać liczbę zaskórników, wyrównywać koloryt skóry, nawilżać, łagodzić, działać antybakteryjnie oraz zapobiegać powstawaniu wykwitów trądzikowych.
- toniki – mają za zadanie przede wszystkim intensywnie oczyszczać i odświeżać skórę, jednocześnie nie powodując jej wysuszenia.
- maści – stosowane są punktowo na najbardziej zmienione partie skóry.
- peelingi, maseczki przeznaczone do stosowania w domu- powinny wykazywać dość silne działanie złuszczące, wygładzające powierzchnię skóry oraz wyrównujące jej koloryt.
- profesjonalne zabiegi wykonywane w gabinetach lekarskich:
 - peelingi z kwasem glikolowym,
 - peelingi z kwasem migdałowym,
 - peelingi z kwasem mlekowym [2-6].

3. Najpopularniejsze kwasy:

3.1. α -hydroksykwas (ang. alpha hydroxy acids):

To grupa związków organicznych, które zawierają co najmniej jedną grupę karboksylową (-COOH) oraz co najmniej jedną grupę hydroksylową (-OH). Mogą zawierać do 14 atomów węgla w cząsteczce. Występują w różnego rodzaju owocach, warzywach, trzcinie cukrowej oraz kwaśnym mleku. Wiadomo, że już w starożytnym Egipcie królowe stosowały okłady na bazie wina palmowego, natomiast francuskie damy używały maseczek winnych z kwasami owocowymi. Wzór ogólny hydroksykwasów to $(HO)_m-R-(COOH)_n$.

Pozyskiwanie kwasów:

- metody naturalne (z ekstraktów roślinnych),
- sposób syntetyczny (synteza chemiczna),
- metody biotechnologiczne (z wykorzystaniem bakterii).

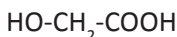
Właściwości:

- wykazują działanie złuszczące, wygładzające i rozjaśniające,
- zapobiegają powstawaniu czopów łojowych,

- stymulują proces odnowy komórek głębiej położonych,
- są w stanie aktywizować działanie fibroblastów, które są odpowiedzialne m.in. za syntezę białek,
- przyczyniają się do procesu produkcji elastyny i kolagenu,
- mogą pełnić funkcję promotorów przenikania składników aktywnych, ponieważ posiadają zdolność do głębokiego wnikania w naskórek [2-7].

3.1.1. Kwas glikolowy (ang. glycolic acid)

Jest najpopularniejszym kwasem z grupy α -hydroksykwasów. Można go pozyskać z trzciny cukrowej poddanej fermentacji. Jego źródłem mogą być także: winogrona, jabłka, agrest, buraki cukrowe. Kwas glikolowy posiada najmniejszą cząsteczkę w porównaniu z innymi alfa-hydroksykwasami i w związku z tym najłatwiej przenika przez naskórek oraz najgłębiej. Nie wykazuje jednak toksyczności, nie powoduje alergii, jest dobrze tolerowany przez skórę [2-5].



Rysunek 2. Wzór strukturalny kwasu glikolowego.

Działanie kwasu glikolowego na skórę polega na:

- złuszczeniu komórek naskórka spowodowanego rozluźnianiem i rozrywaniem wiązań komórkowych,
- hamowaniu aktywności enzymów, które są odpowiedzialne za spójność korneocytów (fosfotransferazy, sulfotransferazy, kinazy),
- pobudzaniu syntezy kolagenu i glikozaminoglikanów, która sprzyja odnowie regeneracji skóry właściwej,
- poprawie nawilżenia naskórka i zwiększeniu jego grubości, posiada zdolność wiązania wody,
- zmniejszeniu porów i blizn.

Działanie kwasu glikolowego jest uzależnione od jego stężenia:

- do 15% – wykazuje właściwości nawilżające, działa nieznacznie złuszcząco oraz przyspiesza regenerację i odnowę skóry właściwej,
- 20-30% – charakteryzuje się działaniem nawilżającym, oczyszczającym, dającym efekt peelingu,
- 50-70% – złuszcza naskórek i silnie pobudza procesy regeneracyjne skóry właściwej [2-5].

Zastosowanie:

- peelingi chemiczne wykonywane przez specjalistów (od 20% do 70% zawartości kwasu, pH: 1,6-0,6),
- peelingi do stosowania w domu,
- maseczki,
- żele do mycia twarzy głęboko oczyszczające,
- kremy złuszczące.

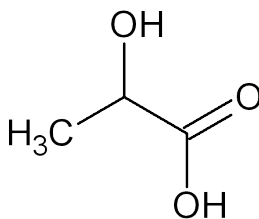
Stopień działania jest uzależniony od stężenia preparatu, pH, czasu aplikacji, grubości naniesionej substancji a także rodzaju nośnika. W przypadku peelingu chemicznego w celu uzyskania pożądanego efektu należy wykonać serię zabiegów (w zależności od potrzeb ok 5-7) w około dwutygodniowych odstępach. Stężenie kwasu powinno się zwiększać z każdym zabiegiem. Należy jednak zacząć od niewielkiego. W związku z zagrożeniami jakie niesie stosowanie wysokich stężeń kwasu pacjent powinien mieć wcześniej dobrze przygotowaną skórę oraz powinien zapoznać się z zaleceniami jakie należy przestrzegać w trakcie kuracji. Przed pierwszym zabiegiem należy przez okres 14 dni stosować krem przygotowujący zawierający 5-15% kwasu glikolowego. Podczas kuracji powinno stosować się kosmetyki z filtrem przeciwsłonecznym o wysokim faktorze i unikać promieni słonecznych. Nie powinno spożywać się alkoholu oraz ostrych przypraw. Podczas kuracji nie powinno wykonywać się dermabrazji, peelingu mechanicznego, nie wolno stosować innych preparatów silnie drażniących ani wykonywać depilacji. Przeciwskazaniem do peelingu z kwasem glikolowym są: ciąża, stany zapalne, stosowanie preparatów z retinolem, epilepsja, gorączka, alergia skórna [4-7].

Wskazania do peelingu z kwasem owocowym:

- przebarwienia potrądzikowe i posłoneczne,
- powierzchniowe blizny potrądzikowe,
- rozszerzone pory,
- zaburzenia rogowacenia i nawilżenia.

3.1.2. Kwas mlekowy (ang. lactic acid)

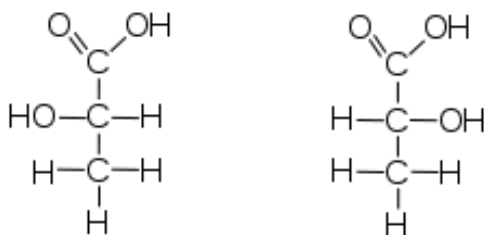
Kwas mlekowy ma postać gęstej, bezbarwnej cieczy łatwo rozpuszczalnej w wodzie i alkoholu. Jego cząsteczka ma większy rozmiar od cząsteczki kwasu glikolowego w związku z czym działa łagodniej i jest nieco bezpieczniejszy. Charakteryzuje się ostrym kwaśnym smakiem. Jego naturalne źródła to: kwaśne mleko, maślanka, jogurt, jabłka, pomidory, piwo, kiszonki. Jednak na skalę przemysłową otrzymuje się go z fermentacji roztworu cukru przez bakterie *Lactobacillus delbrueckii*.



Rysunek 3. Wzór strukturalny kwasu mlekowego.

Cząsteczka kwasu mlekowego ma budowę niesymetryczną w związku z czym istnieją izomery:

- kwas D-mlekowy,
- kwas L-mlekowy (jako jedyny wykazuje aktywność biologiczną).



Kwas mlekowy L(+) Kwas mlekowy D(-)

Rysunek 4. Izomery kwasu mlekowego.

Kwas mlekowy może powstawać w mięśniach w trakcie intensywnego wysiłku fizycznego, gdy dochodzi do beztlenowej glikolizy. Jest produktem fermentacji mleczanowej u bakterii lub glikolizy beztlenowej w tkankach zwierzęcych, powstający w drodze katabolizmu glukozy bezpośrednio z kwasu pirogronowego i NADH pod wpływem dehydrogenazy mleczanowej. Ponieważ występuje naturalnie w mięśniach jest nietoksyczny i całkowicie bezpieczny. Można go znaleźć w NMF (naturalnym czynniku nawilżającym), który jest składnikiem najbardziej zewnętrznej warstwy naskórka- warstwy rogowej. Czynniki NMF odpowiada za odpowiednie nawilżenie naskórka [4, 6].

Działanie kwasu mlekowego na skórę:

- poprawa uwodnienia, ujędrnienia i elastyczności skóry,
- normalizacja procesu rogowacenia, usuwanie zrogowaciałych warstw komórek,

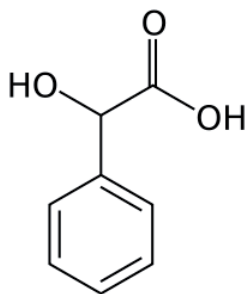
- rozjaśnianie przebarwień,
- zwężanie porów,
- działanie antybakteryjne,
- spłykanie zmarszczek,
- usuwanie brodawek, odcisków, piegów,
- zapewnienie wysokiego poziomu glikozoaminoglikanów- związków wiążących wodę,
- pobudzenie cebulek włosów (dzięki temu włosy szybciej rosną),
- stymulacja produkcji ceramidów, które zapewniają skuteczną barierę lipidową skórze,
- obniżenie pH skóry,
- zwiększenie skuteczności innych kosmetyków oraz leków [4].

Zastosowanie:

- peelingi chemiczne,
- preparaty złuszczące do skóry trądzikowej,
- kosmetyki do włosów,
- konserwant stosowany w kosmetykach.

3.1.3. Kwas migdałowy (ang. mandelic acid)

Kwas mlekowy posiada 8 atomów węgla w cząsteczce. Występuje w postaci białych kryształków. Został odkryty przy okazji podgrzewania ekstraktu z gorzkich migdałów w rozcieńczonym kwasie solnym. Jest rozpuszczalny w wodzie, alkoholu, eterze. Jego naturalne źródła to: gorzkie migdały, wiśnie, morele. Na dużą skalę jest pozyskiwany z aldehydu benzoesowego i cyjanowodoru [4-9].



Rysunek 5. Wzór strukturalny kwasu migdałowego.

Działanie kwasu migdałowego na skórę:

- wykazuje najsilniejsze właściwości antybakteryjne wśród wszystkich

kwasów alfa-hydroksylowych,

- zmniejsza grubość warstwy rogowej i normalizuje proces keratynizacji-skóra staje się gładsza,
- wzmacnia skórę zwiększając grubość warstwy twórczej naskórka,
- odbudowuje włókna sprężyste i poprawia elastyczność skóry,
- zwiększa produkcję włókien kolagenu i mukopolisacharydów,
- rozjaśnia przebarwienia i plamy posłoneczne,
- oczyszcza skórę,
- zmiękcza i wygładza skórę,
- hamuje łojotok,
- złuszcza naskórek,
- ochrona przed infekcjami.

Pod koniec lat 90. potwierdzono działanie kwasu migdałowego w przypadku leczenia trądziku młodzieńczego, hiperpigmentacji oraz uszkodzeń wywołanych przez promienie słoneczne. Zakłada się także, że dzięki bardzo skutecznemu działaniu antybakteryjnemu oraz wysokiej tolerancji oraz braku toksyczności kwas migdałowy może wkrótce stać się najważniejszym składnikiem kosmetyków przeznaczonych do pielęgnacji skóry trądzikowej [4-8].

Zastosowanie kwasu migdałowego:

- peelingi chemiczne
- kremy
- żele do mycia
- toniki

Wskazania do stosowania peelingu chemicznego z kwasem migdałowym:

- przebarwienia
- trądzik
- zmarszczki
- zwioteczała i szara cera

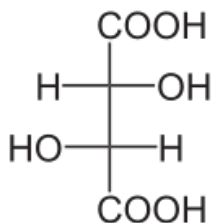
Kwas migdałowy nie uwrażliwia skóry na działanie promieni słonecznych w związku z czym w przeciwieństwie do innych kwasów alfa-hydroksylowych może być stosowany przez cały rok. Z powodu braku ryzyka wystąpienia przebarwień często peeling kwasem migdałowym nazywany jest „peelingiem letnim”. Peeling kwasem migdałowym nie wywołuje uczucia pieczenia ani podrażnień. Istotną cechą jest także to, że efekty peelingu są widoczne natychmiastowo. Kwas migdałowy jest bardzo dobrze tolerowany nawet przez pacjentów o bardzo dużej wrażliwości skóry.

Mniejsze stężenia kwasu migdałowego (5-10%) wykorzystywane są w preparatach przeznaczonych do codziennej pielęgnacji skóry tłustej ze skłonnością do trądziku, ale dzięki właściwościom złuszczącym stosowany jest

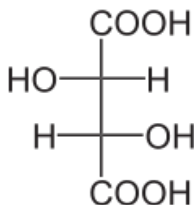
także w kosmetykach o działaniu przeciwzmarszczkowym. Przy długotrwałym regularnym stosowaniu tych kosmetyków skóra jest znacznie zmiękczone i wygładzona, jej barwa jest wyrównana. Widoczne jest spłylenie blizn i zmniejszenie zmarszczek. Plamy pigmentacyjne i przebarwienia są znacznie rozjaśnione a sama skóra bardziej elastyczna [4].

3.1.4. Kwas winowy (kwas dihydroksybursztynowy, ang. tartaric acid)

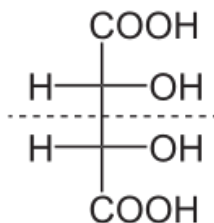
Kwas winowy nieświadomie stosowano już ponad dwa tysiące lat temu. W starożytnym Egipcie kobiety brały kąpiele z dodatkiem wina oraz stosowały kompresy z chleba moczonego w winie. Obecnie kwas winowy jest dość rzadko używany.. Jest to kwas dikarboksylowy, posiada dwie grupy hydroksylowe w pozycji alfa. Jego 4 izomery to: forma D, L, DL oraz kwas mezo-winowy. Kwas winowy występuje w postaci białych kryształków lub proszku, rozpuszcza się w wodzie oraz alkoholu. Jego naturalne źródło to wino, winogrona, buraki cukrowe. Warto zaznaczyć, że odmiana mezo nie występuje w naturze [4-10].



Kwas L-winowy



Kwas D-winowy



Kwas mezo-winowy

Rysunek 6. Wzory strukturalne kwasu winowego.

Działanie kwasu winowego na skórę:

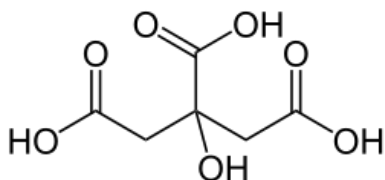
- usuwanie plam i przebarwień,
- zwężanie porów,
- właściwości zakwaszające,
- wygładzenie skóry.

Zastosowanie kwasu winowego:

- peelingi do ciała,
- płyny do kąpieli,
- kremy do codziennej pielęgnacji skóry narażonej na powstawanie przebarwień,
- preparaty przeciwpotowe,
- sole do kąpieli [8].

3.1.5. Kwas cytrynowy (ang. citric acid)

Źródłem kwasu cytrynowego są cytryny, występuje on także w: innych owocach cytrusowych, burakach, winie oraz mleku. Właściwością kwasu cytrynowego jest rozjaśnianie przebarwień. W 1784 roku został po raz pierwszy wyizolowany z soku cytrynowego. Dokonał tego Karl Wilhelm Scheele. W celach przemysłowych otrzymuje się go głównie w procesie fermentacji cukru z użyciem pleśni *Aspergillus Niger*. Kwas cytrynowy występuje w postaci bezbarwnych kryształków. Jest łatwo rozpuszczalny w wodzie. Kwas cytrynowy występuje w niewielkich ilościach w organizmach żywych, spełnia ważną rolę w metabolizmie- jest ważnym produktem przejściowym cyklu Krebsa [4, 6]].



Rysunek 7. Wzór strukturalny kwasu cytrynowego.

Działanie kwasu cytrynowego na skórę:

- rozjaśnianie przebarwień,
- usuwanie piegów,
- redukcja zrogowaciałego naskórka,
- przywracanie blasku i świeżego wyglądu skórze twarzy,
- właściwości złuszczące,
- odkażanie skóry,
- tonizowanie bardzo tłustej skóry.

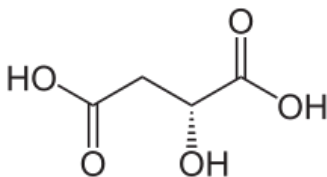
W przypadku stosowania preparatów zawierających kwas cytrynowy należy zachować szczególną ostrożność gdyż zaaplikowany nieodpowiednio może doprowadzić do podrażnień.

Zastosowanie kwasu cytrynowego w kosmetykach:

- kremy rozjaśniające, wybielające,
- peelingi chemiczne,
- płyny do higieny jamy ustnej.

3.1.6. Kwas jabłkowy (ang. malic acid):

Kwas jabłkowy występuje w wielu owocach, np. niedojrzałych jabłkach, borówkach, żurawinie. Jest naturalnym metabolitem biorącym udział w cyklu Krebsa.



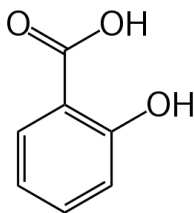
Rysunek 8. Wzór strukturalny kwasu jabłkowego.

Działanie kwasu jabłkowego na skórę:

- spłykanie blizn,
- ujędrnienie skóry,
- poprawa kolorytu skóry,
- wygładzenie skóry,
- właściwości antyalergiczne,
- przywracanie blasku.

Zastosowanie kwasu jabłkowego:

- kremy wygładzające,
- preparaty do włosów,
- kosmetyki na zrogowaciałe pięty.

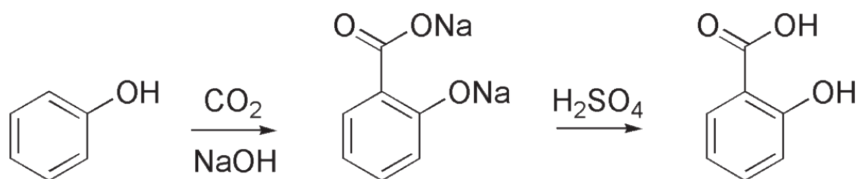


Rysunek 9. Wzór strukturalny kwasu salicylowego.

3.2. β- hydroksykwas (ang. beta hydroxy acids):

3.2.1. Kwas salicylowy (ang. salicylic acid):

Występuje w stanie stałym w formie krystalicznej. Wykazuje rozpuszczalność w alkoholu etylowym, glicerynie, eterze, olejach mineralnych, słabo rozpuszcza się w wodzie. Kwas salicylowy można pozyskać z kory wierzby, malin, liści brzozy. Posiada grupy: hydroksylową i karboksylową przyłączone do pierścienia benzenowego w pozycji orto. Na skalę przemysłową wykorzystują się reakcję Kolbego do otrzymywania kwasu salicylowego:



Rysunek 10. Reakcja Kolbego.

Kwas salicylowy jest stosowany w dermatologii od wielu lat. Wykazuje łagodniejsze działanie od kwasów AHA. Podczas jego stosowania znacznie rzadziej odczuwalne jest pieczenie, szczypanie. Może więc stanowić alternatywę dla osób wrażliwych na działanie kwasów alfa hydroksylowych. Najlepsze efekty można uzyskać przy zastosowaniu pH ok 3-4. Jest on jedynym kwasem BHA stosowanym w kosmetyce [3-12].

Działanie kwasu salicylowego na skórę:

- właściwości antyseptyczne,
- regulacja wydzielania łoju,
- spłycenie rozszerzonych porów,
- oczyszczanie skóry trądzikowej,
- pobudzenie procesów regeneracyjnych skóry właściwej,
- działanie komedolityczne, bakteriostatyczne, przeciwgrzybiczne, przeciwzapalne, keratolityczne,
- przyspieszenie procesów gojenia wyprysków i podrażnień wywołanych trądzikiem
- usuwanie przebarwień,
- regulacja zaburzeń rogowacenia

Działanie kwasu salicylowego w dużej mierze zależy od jego stężenia. W przypadku zawartości kwasu do 10% wykazuje właściwości keratoplastyczne (zmiękczone naskórek), a powyżej 10% keratolityczne (złuszczone naskórek).

Zastosowanie kwasu salicylowego:

- peelingi chemiczne,
- maści do stosowania miejscowego,
- toniki,
- żele do mycia twarzy,
- spirytus salicylowy (2%).

Wskazaniami do stosowania preparatów opartych na kwasie salicylowym jest głównie trądzik pospolity, głównie w postaci zaskórnikowej. Kosmetyki z tym kwasem są także przeznaczone do stosowania na wszelkiego rodzaju zmiany pigmentacyjne: piegi, przebarwienia posłoneczne, plamy a także

w celu wyrównania faktury skóry. Kwas salicylowy daje bardzo dobre efekty w przypadku stosowania na blizny oraz drobne zmarszczki. Może pełnić także funkcję konserwantu gdy użyjemy go w stężeniu ok 0,5%. Jednak nie jest zalecany do stosowania w preparatach przeznaczonych dla dzieci [13].

3.3. Kwasy poli-hydroksylowe (ang. poly hydroxy acids):

Kwasy poli-hydroksylowe posiadają wszystkie właściwości kwasów alfa-hydroksylowych. Różnicą natomiast jest o wiele łagodniejsze działanie, brak objawów silnego łuszczenia się skóry, nieprzyjemnego pieczenia czy zaczerwienienia skóry. Jest to głównie spowodowane budową. Kwasy poli-hydroksylowe mają znacznie większe cząsteczki w wyniku czego z wolniej wnikają w głąb skóry. W związku z tym mogą być polecane osobom z trądzikiem różowatym, łojotokiem itp.

Działanie kwasów poli-hydroksylowych na skórę:

- intensywne nawilżanie,
- łagodzenie podrażnień,
- złuszczenie,
- właściwości przeciwzmarszczkowe [2-4]

Poli- hydroksykwasы stosowane w kosmetyce:

3.3.1. Glukonolakton (ang. gluconolactone):

Jest on laktonem kwasu glukonowego- naturalnego składnika skóry. Jego źródłem jest miód, soki owocowe oraz wino.

Działanie glukonolaktonu na skórę:

- ochrona przed zanieczyszczeniami środowiska,
- przyspieszenie regeneracji komórkowej,
- zwalczanie wolnych rodników,
- wygładzenie skóry,
- właściwości przeciwzapalne,
- przyspieszanie procesu gojenia zmian trądzikowych

Preparaty z glukolaktonem są szczególnie polecane osobom walczącym z trądzikiem. Ponieważ potwierdzono licznymi badaniami, iż mimo delikatniejszego i mniej drażniącego działania w porównaniu z leczeniem nadtlenkiem benzoylu (5%) uzyskano porównywalne efekty.

Zastosowanie glukonolaktonu:

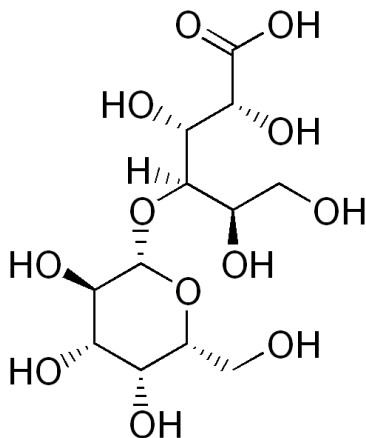
- toniki złuszczące,
- kremy do skóry z trądzikiem jednocześnie wrażliwej i suchej,
- kremy ochronne

3.3.2. Glukoheptanolakton (ang. gluco heptane lactone):

Wykazuje bardzo podobne właściwości do glukonolaktonu. Ze względu na większy rozmiar cząsteczki zapewnia lepsze nawilżenie.

3.3.3. Kwas laktobionowy (ang. lactobionic acid):

Otrzymuje się go z laktozy. Charakteryzuje się silnymi właściwościami złuszczałkowymi i zarazem nawilżającymi. Tworząc film na powierzchni skóry przeciwdziała wyparowywaniu z niej wody. Wykazuje również znaczne działanie gojące oraz łagodzące. Przeciwdziała tworzeniu się zmarszczek hamując działanie metaloproteinaz. Kwas laktobionowy stosuje się także w kuracji po przebytych peelingach chemicznych. Ponieważ łagodzi podrażnienia i stany zapalne skóry. Pielęgnuje miejsca wrażliwe i regeneruje. Wzmacnia barierę ochronną.



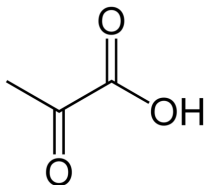
Rysunek 11. Wzór strukturalny kwasu laktobionowego.

Zastosowanie kwasu laktobionowego:

- peelingi,
- kremy łagodzące i ochronne,
- żele wygładzające

W porównaniu z budową alfa-hydroksykwasów grupa hydroksylowa w przypadku alfa-ketokwasami jest zastępowana grupą ketonową. Związku z tym kwas pirogronowy wykazuje większe właściwości lipofilowe. Naturalnym źródłem kwasu pirogronowego są jabłka, sfermentowane owoce, ocet. W skórze jest metabolitem węglowodanów, jest tam przekształcany w kwas mlekowy za

pomocą mleczanu dehydrogenazy. W reakcji z wodą tworzy kwas mlekowy. Reakcja ta jest odwracalna. Kwas pirogronowy jest rozpuszczalny w wodzie i alkoholu.



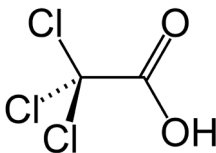
Rysunek 12. Wzór strukturalny kwasu pirogronowego.

Działanie kwasu pirogronowego:

- rozjaśniające,
- bakteriostatyczne,
- regulowanie sebum,
- zmniejszanie tłustości skóry,
- działanie przeciwzaskórnikowe,
- właściwości nawilżające,
- stymulowanie produkcji kolagenu

Głównym zastosowaniem kwasu pirogronowego w kosmetyce są peelingi chemiczne. Efekty po zabiegu można porównać do tych uzyskanych za pomocą TCA (kwas trichlorooctowy). Jest on jednak o wiele bardziej łagodniejszy i nie wykazuje tylu efektów ubocznych. W leczeniu trądziku pospolitego, łojotokowego zapalenia skóry stosuje się roztwór 40%. Natomiast w przypadku usuwania blizn i zaburzeń rogowacenia wykorzystuje się 60% kwas pirogronowy. Wadami stosowania preparatów z kwasem pirogronowym jest jego nieprzyjemny zapach oraz silne uczucie pieczenia [11].

3.5 Kwas trichlorooctowy (ang. Trichloroacetic acid, TCA)



Rysunek 13. Wzór strukturalny kwasu trichlorooctowego.

Kwas tróchlorooctowy (TCA) jest pochodną kwasu octowego. W zależności od stężenia można uzyskać efekt peelingu powierzchownego, średnio-głębokiego lub głębokiego. Działa on na zasadzie koagulacji białek czego rezultatem jest złuszczenie komórek. Stare komórki zostają zastąpione nowymi, w efekcie skóra staje się gładziej i wygląda młodziej. Stosowany dość rzadko w gabinetach kosmetycznych (stężenia 3-8 proc.) i bardzo często w lekarskich (10-40 proc.).

Działanie kwasu trichlorooctowego:

- rozjaśnia plamy i przebarwienia,
- spłyca blizny potrądzikowe, drobne zmarszczki spowodowane uszkodzeniami posłonecznymi;
- działa szybciej niż kwasy owocowe (mniejsza liczba zabiegów);
- wyższe stężenia kwasu powodują, że po zabiegu pacjent odczuwa ściągnięcie skóry, potem pojawiają się opuchlizna i ból. Skóra staje się ciemniejsza, a naskórek odchodzi płatami. Gojenie może trwać około tygodnia, więc po zabiegu trzeba zostać w domu;
- stosowany do cery dojrzałej ze zmarszczkami i nierówną pigmentacją, ewentualnie potrądzikowej z bliznami [3, 4, 12, 13].

4. Niebezpieczeństwa i środki ostrożności przy stosowaniu kwasów:

Podczas kuracji kwasami, szczególnie kiedy są to zabiegi dermatologiczne wykorzystujące ich wysokie stężenia, należy stosować się do wszelkich zaleceń oraz zachowywać wszystkie konieczne środki ostrożności.

Peelingi chemiczne dzielą się na trzy kategorie w oparciu o głębokość działania kwasu:

- powierzchowne peelingi, które złuszcza warstwę naskórka, bez wykraczania poza warstwę podstawową.
- peelingi średniej głębokości, które docierają do górnych warstw skóry właściwej.
- peelingi głębokie, które docierają do głębszych warstw skóry właściwej.

Osoba, która się poddaje leczeniu nie powinna gorączkować ani wykazywać objawów uczulenia. Zabiegi z kwasami nie są także przeznaczone dla kobiet w ciąży oraz karmiących piersią. Leczenie nie może także odbywać się w odstępie krótkiego czasu od innych zabiegów takich jak: mikrodermabrazja, peeling, lifting laserowy. Przeciwwskazaniem do zastosowania kwasów jest także korzystanie na krótko przed z solarium. Przed rozpoczęciem serii zabiegów lekarz dermatolog bądź kosmetolog powinien przeprowadzić dokładny wywiad z pacjentem oraz poinformować o wszystkich przeciwwskazaniach i ewentualnych powikłaniach. Na efekty wpływa wiele czynników. Jednym z nich jest palenie papierosów, które wydłuża gojenie się skóry oraz stosowanie innych leków np.

Tabela 1. Wskazania i przeciwwskazania do peelingów chemicznych [4].

Leczenie	Czynnik peelingujący	Rodzaj peelingu		
		Powierzchnowy AHA/BHA/LHA	Średni TCA 35% lub mieszany	Głęboki TCA > 50%, fenol
Wskazania		Fotostarzenie: nierówności skóry, chropowatość, żółte plamy drobne zmarszczki, rogowacenie naskórka, plamy posłoneczne Zaburzenia barwnikowe: melasma, przebarwienia Trądzik, usuwanie zaskórniaków	Fotostarzenie: delikatne zmarszczki; Zaburzenia barwnikowe, powierzchnowe blizny	Ciężkie stadium fotostarzenia; Zaburzenia barwnikowe; Głębokie blizny
	Całkowite (bezwzględne)	Kobiety w ciąży, karmiące, chorzy leczeni izotretynoiną, aktywna opryszczka, opryszczka wargowa rodzaje (koloryt) skóry wg skali Fitzpatrick'a V-VI	Kobiety w ciąży, karmiące, chorzy leczeni izotretynoiną, aktywna opryszczka, opryszczka wargowa, rodzaje (koloryt) skóry wg skali Fitzpatrick'a IV-VI	Kobiety w ciąży, karmiące, chorzy leczeni izotretynoiną, aktywna opryszczka, opryszczka wargowa rodzaje (koloryt) skóry wg skali Fitzpatrick'a IV-VI, Fenol: niewydolność nerek
Przeciwwskazania		Opryszczka: 4-6 tyg. po chorobie; Toksyna botulinowa: 1-2 tyg. po; Kolagen (zastrzyki): 2 tyg. przed lub po; Chirurgia twarzy: 6 tyg. po zaniku obrzęku; Elektroliza 7 dni przed lub po; Woskowanie, depilatory: 3 tyg. później	Niska odporność pacjenta, regularna ekspozycja na słońce, palenie papierosów, Częsta opryszczka, infekcje, Zażywanie estrogenów; Przerosłe blizny tk. łącznej Zaawansowane stadium AIDS	
	Względne			

tetracyklin i hormonów, które w połączeniu z zabiegami na bazie kwasów mogą wywołać przebarwienia skóry. W trakcie kuracji nie wskazane jest także picie alkoholu.

Widoczne efekty są zależne nie tylko od zachowań pacjenta ale przede wszystkim od głębokości zabiegu. Na stopień penetracji wpływa kilka czynników: stężenie preparatu, ilość nałożonego preparatu, czas zabiegu, reakcje z innymi środkami, przygotowanie skóry do zabiegu, właściwości skóry (jej grubość).

Podział peelingów chemicznych ze względu na głębokość działania:

- a) małoinwazyjne,
- b) powierzchniowe,
- c) inwazyjne,
- d) głębokie.

Należy zwrócić uwagę na fakt, że ryzyko działań niepożądanych występuje zawsze. Najczęstsze powikłania po zabiegu z kwasami:

- a) zaburzenia barwnikowe skóry,
- b) linie demarkacyjne,
- c) bliznowacenie,
- d) zaburzenia poletkowania,
- e) infekcje,
- f) świąd,
- g) rumień,
- h) zapalenie skóry,
- i) zaostrzenie zmian trądzikowych,
- j) prosaki.

Ze względu na ryzyko powikłań oraz działań niepożądanych należy zawsze zapoznać się z przeciwwskazaniami do stosowania kwasów oraz możliwymi efektami ubocznymi [4, 12-14].

Literatura

1. Z. Adamski, A. Kaszuba, „Dermatologia dla kosmetologów”, AMP Poznań, Poznań 2008
2. H.J. Brody, G.D. Monheit, S.S. Resnik, T.H. Alt, A history of chemical peeling. *Dermatol Surg* 2000; 26: 405–409
3. P. Deprez, . Textbook of Chemical Peels. Superficial, Medium, and Deep Peels in Cosmetic Practice. Informa UK, London, 2007
4. T.C. Fischer, E. Perosino, F. Poli, M.S. Viera, B. Dreno, Chemical peels in aesthetic dermatology: an update, 2009, *JEADV*, 2010, 24, 281-291
5. M. Martini, „Kosmetologia i farmakologia skóry”, Wydawnictwo

- Lekarskie PZWL, Warszawa 2006
6. A. Marzec, „Chemia kosmetyków”, Dom Organizatora TNOiK, Toruń 2005
 7. R. Glinka, M. Glinka, „Receptura kosmetyczna”, Oficyna Wydawnicza MA, Łódź 2008
 8. K. Kipper, X. Petsitis, „Kosmetyka ozdobna i pielęgnacja twarzy”, Medpharm Polska, Wrocław 2007
 9. R. Czerpak, A. Jabłońska- Trypuć, „Roślinne surowce kosmetyczne”, Medpharm Polska, Wrocław 2008
 10. B. Jaroszevska, „Kosmetyka dawniej i dziś”, Wydawnictwo Atena, Warszawa 2005
 11. W. Malinka, „Zarys chemii kosmetycznej”, Volumed, Wrocław 1999
 12. Y. Yamamoto, Guidelines for chemical peeling in Japan, J. Dermatolog., 2012, 9, 321-325
 13. T.C. Flynn, W.P. Coleman, Topical revitalization of body skin, JEADV, 2000, 14, 280-284
 14. S. Dzwonnik, W. Hawryłkiewicz, „Postępy kosmetologii”, vol.2, 2011, s. 21-23

Rozdział 4

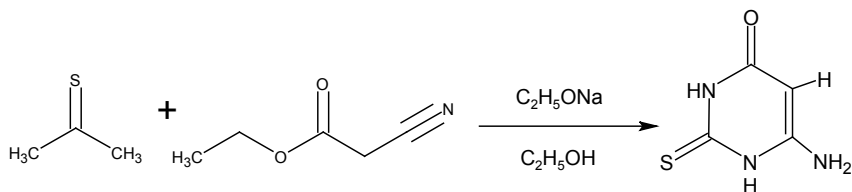
Aktywność biologiczna pochodnych 6-amino-2-tiouracylu

Natalia Kliczka, Grażyna Bartkowiak, Grzegorz Schroeder
*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii,
Umultowska 89b, 61-614 Poznań*

W literaturze chemicznej pojawia się coraz więcej informacji o nowo modyfikowanych siarkowych analogach zasad pirymidynowych. W ostatniej dekadzie wiele pochodnych pirymidynowych, zwłaszcza zawierających skumulowane pierścienie aromatyczne i/lub hetero aromatyczne, wykazało aktywność przeciwnowotworową w próbach klinicznych [1-7]. Inne związki pirymidynowe, w tym analogi strukturalne uracylu i tiouracylu, wykazują aktywność wobec centralnego układu nerwowego, przejawiającą się jako działanie przeciwbólowe, przeciwzapalne i przeciwdrgawkowe. [8-9] Do tej grupy związków należą również liczne pochodne 6-amino-2-tiouracylu. Ze względu na potencjalną aktywność biologiczną, 6-amino-2-tiouracyl stał się przedmiotem wielu badań i szeregu modyfikacji chemicznych cząsteczki. Niniejsza praca stanowi przegląd nowo syntetyzowanych pochodnych 6-amino-2-tiouracylu o stwierdzonej doświadczalnie oraz potencjalnej aktywności farmakologicznej.

1. Otrzymywanie 6-amino-2-tiouracylu

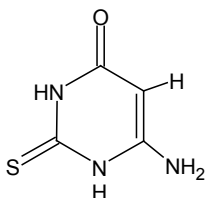
Synteze 6-amino-2-tiouracylu zaproponowali Tylor i Cheng. Jako substraty naukowcy zastosowali tiomocznik oraz ester etylowy kwasu cyjanooctowego. [10] Syntezę tę przeprowadzono w środowisku etanolowego roztworu etanolanu sodu. Przebieg reakcji obrazuje Schemat 1.



Schemat 1. Synteza 6-amino-2-tiouracylu [10].

1.1. Właściwości fizykochemiczne i spektralne 6-amino-2-tiouracylu

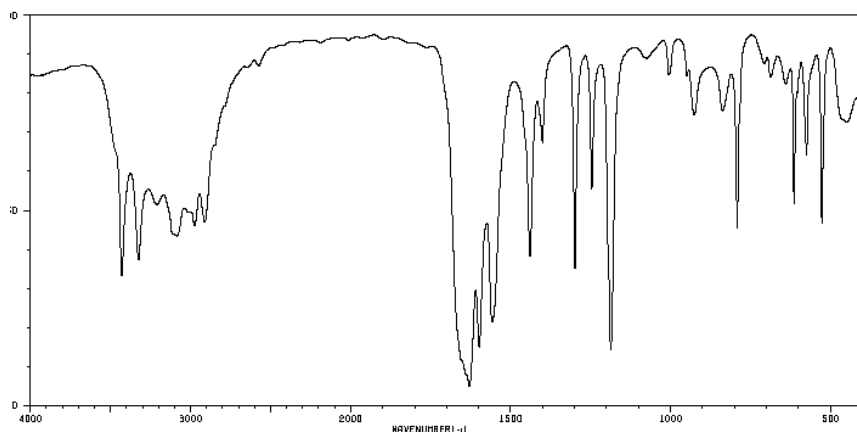
6-amino-2-tiouracyl jest związkiem o strukturze blisko spokrewnionej z uracylem i tyminą, zasadami pirymidynowymi, należącymi do podstawowych cegiełek budujących cząsteczki kwasów nukleinowych (RNA i DNA). 6-amino-2-tiouracyl jest siarkowym analogiem uracylu, w którym atom tlenu w pozycji 2 jest zastąpiony przez atom siarki, a atom wodoru w pozycji 6 został podstawiony przez grupę aminową.



Wybrane dane fizykochemiczne i spektroskopowe 6-amino-2-tiouracylu zebrano poniżej:

- wzór sumaryczny: $C_4H_5N_3OS$,
- masa molowa: 143.2,
- ciało stałe barwy białej,
- temperatura topnienia: $300^{\circ}C$.
- inna nazwa: 6-amino-2-mercapto-4-pyrimidinol;
- numer w rejestrze CAS Registry: 1004-40-6.

Aruna i Shanmugan [11] dokonali analizy widma w podczerwieni 6-amino-2-tiouracylu w zakresie $4000 - 200\text{ cm}^{-1}$. Analizę 6-amino-2-tiouracylu dokonano w postaci pastylek z KBr i jako zawiesinę w nujolu. Zaproponowana przez naukowców interpretacja uzyskanego widma IR umożliwiła autorom ustalenie struktury cząsteczki.



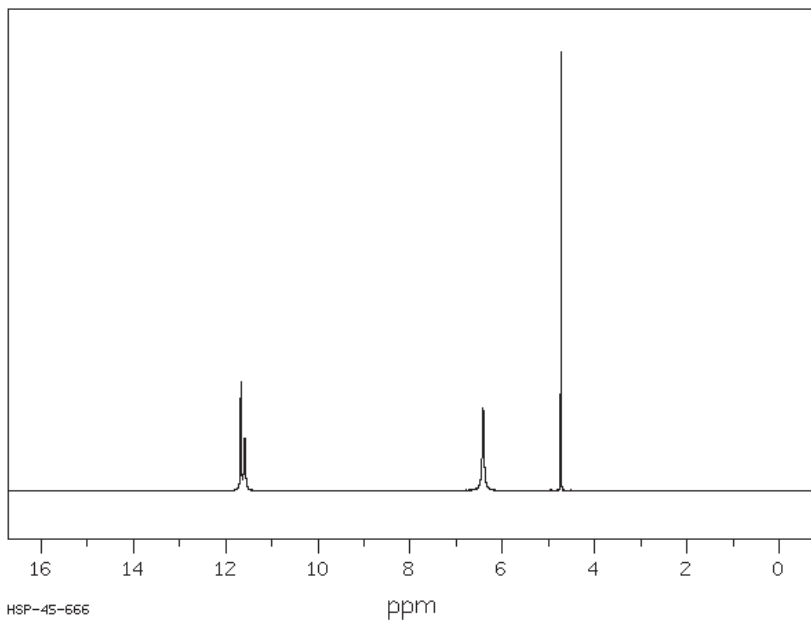
Rysunek 1. Widmo FT-IR 6-amino-2-tiouracylu (monohydratu; $C_4H_5N_3OS \cdot H_2O$), zmierzone w pastylce KBr. Widmo pochodzi z bazy widm Spectral Database for Organic Compounds; SDBS (SDBS No. 5312).

(http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)

W 1993 roku Romero wraz ze współpracownikami opublikowali dane spektralne uzyskane z analizy widm 1H NMR oraz ^{13}C NMR 6-amino-2-tiouracylu [12]. Widma zostały wykonane w roztworze $DMSO-d_6$ wobec TMS, który użyto jako standard wewnętrzny.

Tabela 1. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) występujących w widmie 1H NMR 6-amino-2-tiouracylu.

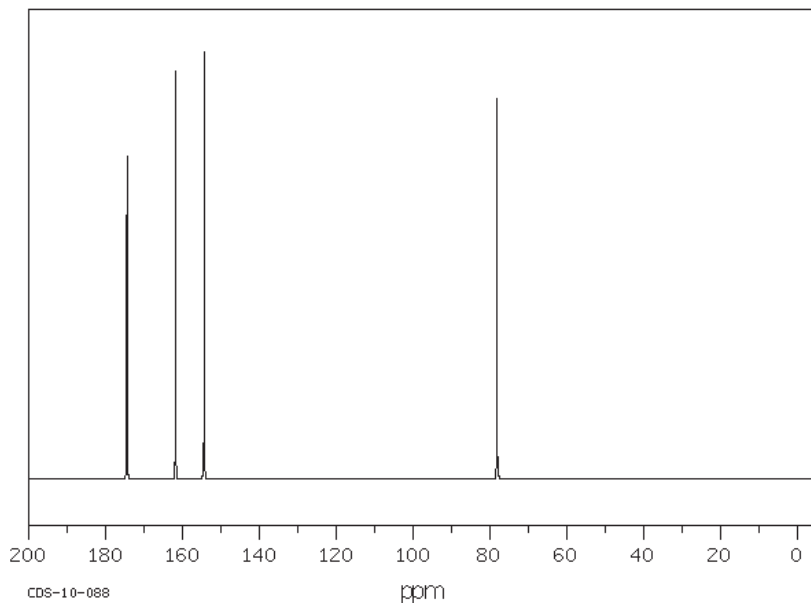
δ_{C5-H} (ppm)	δ_{C6-NH2} (ppm)	δ_{NH} (ppm)
4,71	6,39	11,63



Rysunek 2. Widmo magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR 6-amino-2-tiouracylu. Widmo pochodzi z bazy widm SDBS (<http://www.aist.go.jp>).

Tabela 2. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) występujących w widmie ^{13}C NMR 6-amino-2-tiouracylu.

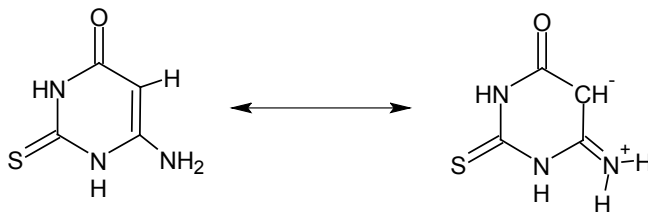
δ_{C_2} (ppm)	δ_{C_4} (ppm)	δ_{C_5} (ppm)	δ_{C_6} (ppm)
174,5	161,9	78,2	154,4



Rysunek 3. Widmo rezonansu jądrowego ^{13}C NMR 6-amino-2-tiouracylu. Widmo pochodzi z bazy widm SDBS (<http://www.aist.go.jp>).

1.2. Centra nukleofilowe 6-amino-2-tiouracylu

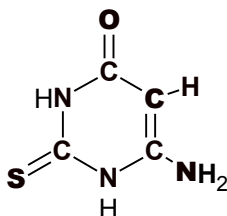
Ze względu na występowanie w strukturze 6-amino-2-tiouracylu cyklicznego układu enaminowego (Schemat 2) związek ten wyróżnia się odmienną reaktywnością z pośród siarkowych analogów zasad pirymidynowych.



Schemat 2. Formy cyklicznego układu enaminowego 6-amino-2-tiouracylu.

Badania teoretyczne przeprowadzone przez Hilal'a [13] i Loupy'a [14] wykazały, iż w cząsteczce 6-amino-2-tiouracylu znajduje się 6 centrów

nukleofilowych o cząstkowych ładunkach ujemnych. Centra te usytuowane są na egzocyklicznych atomach tlenu i siarki, atomie azotu w egzocyklicznej grupie aminowej, atomie węgla C-5 pierścienia uracylowego oraz na annularnych atomach azotu N-1 i N-3. (Schemat 3)

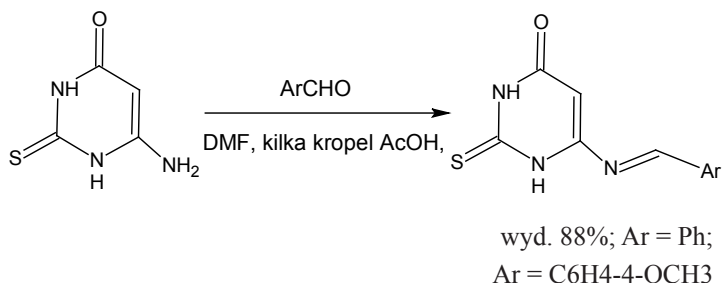


Schemat 3. Centra nukleofilowe w cząsteczce 6-amino-2-tiouracylu.

2. Reaktywność 6-amino-2-tiouracylu względem aldehydów aromatycznych

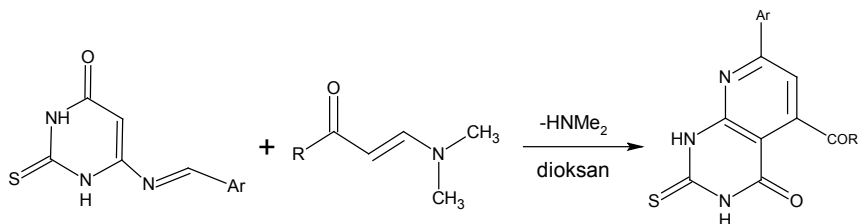
W 2007 roku zespół badawczy N.R Mohameda przeprowadził badania nad wykorzystaniem 6-amino-2-tiouracylu jako prekursora do syntezy bioaktywnych pochodnych pirymidyny.[15] Badania te opierały się na modyfikacji egzocyklicznej grupy aminowej cząsteczki 6-amino-2-tiouracylu.

Reakcja zapoczątkowująca syntezę aktywnych biologicznie pochodnych pirymidyny opierała się na kondensacji 6-amino-2-tiouracylu z aromatycznymi aldehydami w środowisku DMF i dodatkiem kilku kropli kwasu octowego. Produktami reakcji były 6-(benzylideno-amino)-2-tiouracyl oraz 6-[(4-metoksy-benzylideno)-amino]-2-tiouracyl. Przebieg reakcji przedstawia Schemat 4.



Schemat 4.

W dalszych etapach badań przeprowadzono serię syntez związków o potencjalnej aktywności biologicznej z uzyskanych wcześniej 6-(benzylideno-amino)-2-tiouracylu oraz 6-[(4-metoksy-benzylideno)-amino]-2-tiouracylu.



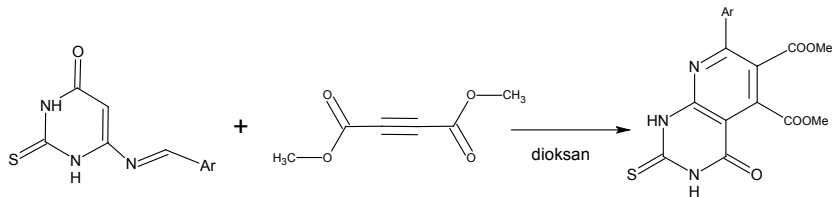
wyd. 79%; Ar = Ph; R = 2-tiofenyl

Schemat 5.

Pierwsza z syntez polegała na cykloaddycji 6-(benzylideno-amino)-2-tiouracylu z β -enaminami w środowisku bezwodnego dioksanu. Reakcji cykloaddycji towarzyszyła eliminacja dimetyloaminy (Schemat 5).

Badania nad aktywnością biologiczną nowo zsyntetyzowanego związku wykazały, że 7-fenyl-5-(tiofeno-2-karbonylo)-2-tiokso-2,3-dihydro-1H-pirydo[2,3-d]pirymidyn-4-on posiada wysoką aktywność antybakteryjną oraz antygrzybiczną. Ponadto, testy wykonane w National Cancer Institute w Bethesda ujawniły, iż 7-fenyl-5-(tiofeno-2-karbonylo)-2-tiokso-2,3-dihydro-1H-pirydo[2,3-d]pirymidyn-4-on posiada aktywność cytotoksyczną przeciwko komórkom nowotworowym płuc oraz wątroby.

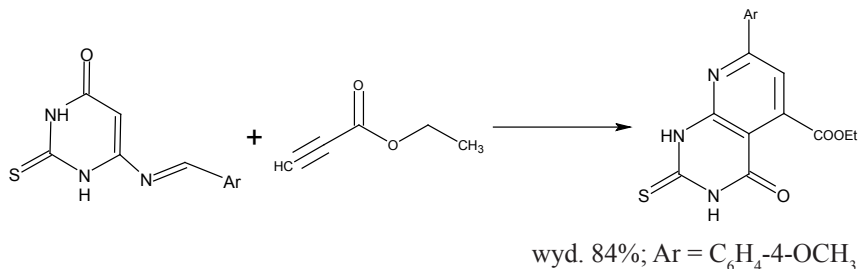
Kolejnym etapem badań była synteza 4-okso-7-fenyl-2-tiokso-1,2,3,4-tetrahydro-pirydo[2,3-d]pirymidyno-5,6-dikarboksylanu dimetylu oraz 7-(4-metoksyfenyl)-4-okso-2-tiokso-1,2,3,4-tetrahydropirydo[2,3,-d]pirymidyno-5,6-dikarboksylanu dimetylu (Schemat 6). Naukowcy reakcje te przeprowadzili z użyciem 6-(benzylideno-amino)-2-tiouracylu, 6-[(4-metoksybenzylideno)-amino]-2-tiouracylu oraz acetylenodikarboksylanu dimetylu w środowisku bezwodnego dioksanu. Produkty otrzymano z wydajnością powyżej 85%. Otrzymane pochodne pirymidyny w badaniach bioaktywności okazały się skutecznymi środkami antyseptycznymi oraz antygrzybicznymi.



wyd. 86%; Ar = Ph; Ar = C₆H₄-4-OCH₃

Schemat 6.

Syntezę innej pochodnej wykazującej szerokie spektrum aktywności przeciwnowotworowej przeprowadzono przy użyciu jako substratów 6-[(4-metoksy-benzylideno)-amino]-2-tiouracylu oraz propynianu etylu w środowisku bezwodnego dioksanu. Produkt o nazwie 7-(4-metoksyfenylo)-4-okso-2-tiokso-1,2,3,4-tetrahydropirydo[2,3-d]pirymidyno-5-karboksylan etylu otrzymano z 84% wydajnością (Schemat 7).

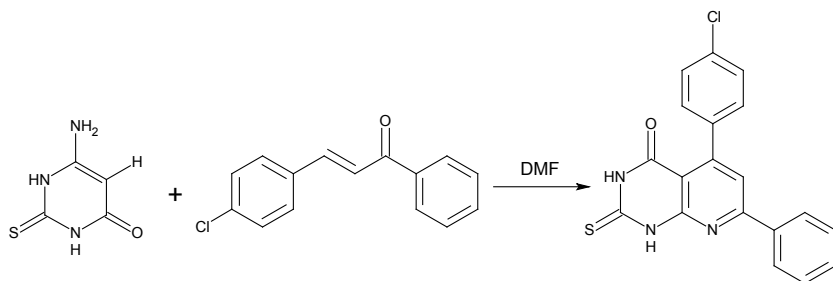


Schemat 7.

3. Reaktywność 6-amino-2-tiouracylu z 3-(4-chlorofenilo)-1-fenilo-2-propen-1-onem

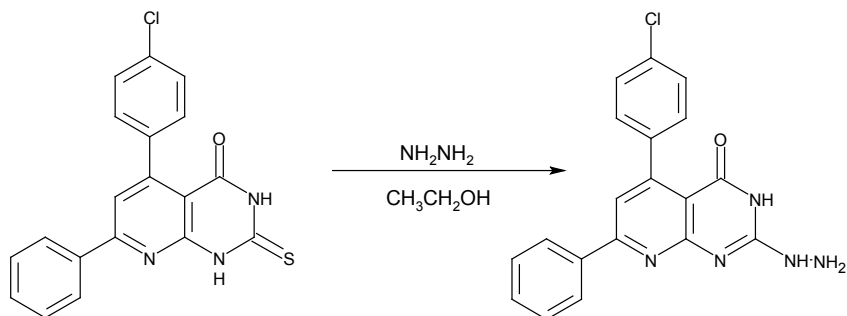
Zespół badawczy B. El-Nassana w 2010 roku opracował syntezę nowych pochodnych pirymidyn wykazujących aktywność przeciwnowotworową [16]. Naukowcy ci przeprowadzili szereg syntez, a następnie ocenili wpływ wprowadzonych podstawników na aktywność biologiczną nowo zsyntetyzowanych związków. Wyjściowym związkiem zapoczątkowującym syntezę aktywnych biologicznie pochodnych pirymidyny był 6-amino-2-tiouracyl.

Pierwszy etap badań opierał się na reakcji 6-amino-2-tiouracylu z 3-(4-chlorofenilo)-1-fenilo-2-propen-1-onem w środowisku dimetyloformamidu. W wyniku przeprowadzonej reakcji otrzymano 5-(4-chlorofenilo)-2,3-dihydro-1H-7-fenilo-2-tioksopirydo[2,3-d]pirymidin-4-on (Schemat 8).



Schemat 8.

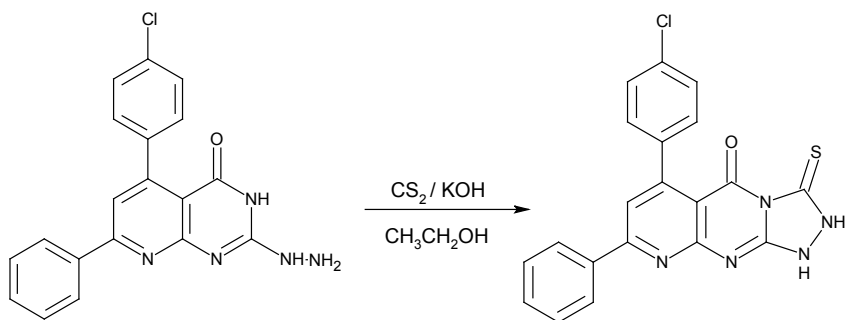
W kolejnym etapie badań otrzymany 5-(4-chlorofenilo)-2,3-dihydro-1H-7-fenilo-2--tioksopirydo[2,3-d]pirymidyn-4-on poddano działaniu hydrazyny w środowisku bezwodnego etanolu. Produkt o nazwie 5-(4-chlorofenilo)-2,3-dihydro-3H-7-fenilo-2-hydrazynopirydo[2,3-d]pirymidyn-4-on otrzymano z 70 % wydajnością (Schemat 9).



Schemat 9.

Uzyskany produkt B. El-Nassan [16] wykorzystał w kolejnych badaniach. Nowe pochodne wykazujące aktywność przeciwnowotworową uzyskał w wyniku reakcji 5-(4-chlorofenilo)-2-hydrazyno-7-fenilopirydo[2,3-d]pirymidyn-4[3H]-onu z disiarczkiem węgla oraz rodankiem amonu.

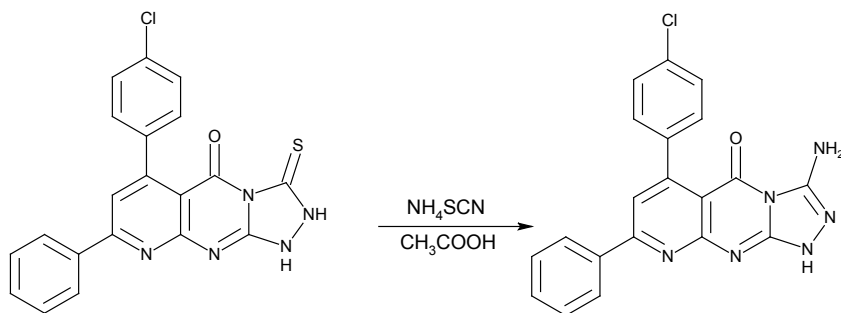
Pierwsza zaproponowana reakcja 6-(4-chlorofenilo)- 2,3-dihydro-3H-7-fenilo 2-hydrazynopirydo[2,3-d]pirymidyn-4-onu z disiarczkiem węgla oraz wodorotlenkiem potasu w środowisku bezwodnego etanolu doprowadziła do otrzymania 5 -(4-chlorofenilo)--7-fenilo-1H-pyrido [2,3-d][1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidin-3(2H)-tionu (Schemat 10).



wyd. 90%

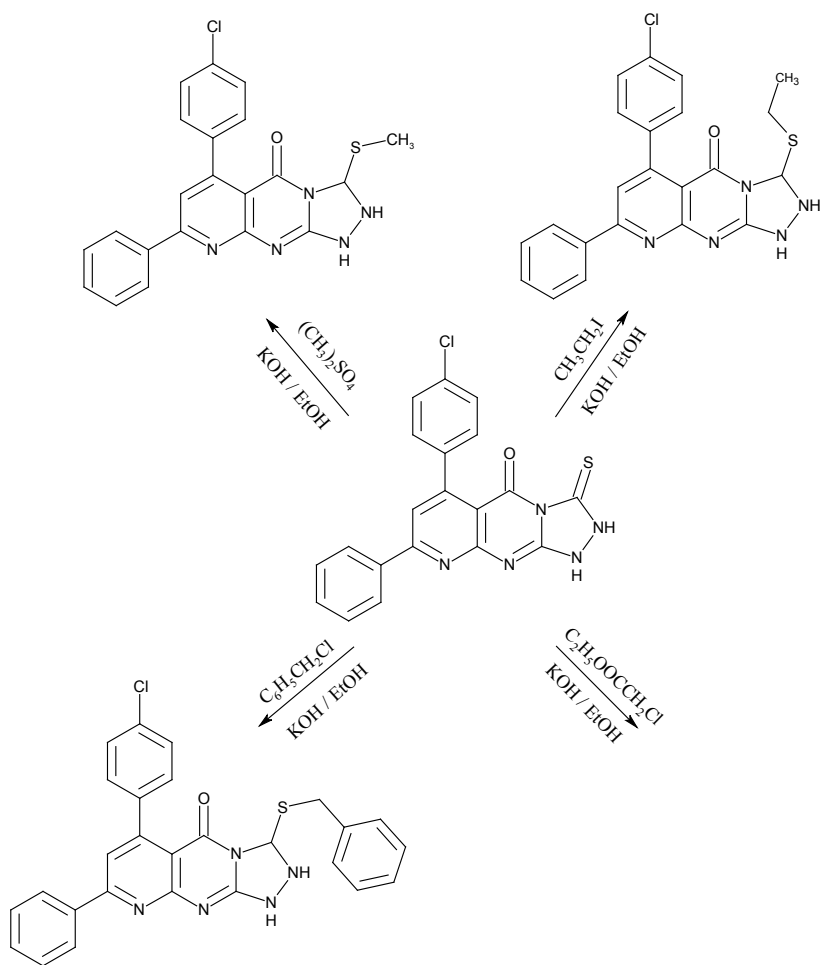
Schemat 10.

Kolejna reakcja doprowadziła do utworzenia 3-amino-6-(4-chlorofenyl)-8-fenyl-1H-pirydo[2,3-d][1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidin-5-onu. Syntezę tę przeprowadzono w środowisku kwasu octowego przy użyciu, 6-(4-chlorofenyl)-2,3-dihydro-3H-7-fenyl-2-hydrazynopirydo[2,3-d]pirymidyn-4-onu i rodanku amonu. Produkt otrzymano z 77% wydajnością (Schemat 11).



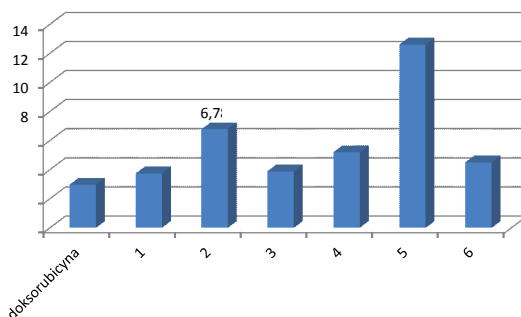
Schemat 11.

Następnie 6-(4-chlorofenyl)-5-okso-8-fenyl-1H-pirydo[2,3-d][1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidin-3(2H)-tion alkilowano halogenkami alkilowymi oraz aryłowymi uzyskując pochodne 3-alkilosulfanylowe. Alkilowanie przeprowadzono za pomocą siarczanu dimetylu, jodku etylu, chlorku benzylu oraz chlorooctanu etylu w środowisku etanolowego roztworu wodorotlenku potasu. Poniżej przedstawiono schemat reakcji alkilowania (Schemat 12).



Schemat 12.

Nowo zsyntetyzowane pochodne zostały następnie ocenione pod względem cytotoksycznego działania przeciwko komórkom nowotworowym wywołującym raka piersi. Jako wzorca naukowcy użyli doksorubicyny, skutecznego leku przeciwnowotworowego. Za miarę aktywności cytotoksycznej przyjęto parametr IC_{50} wskazujący stężenie danego związku wymaganego do zahamowania 50 % żywych komórek nowotworowych. Wyniki testów zobrazowano na wykresie (Rys 4).



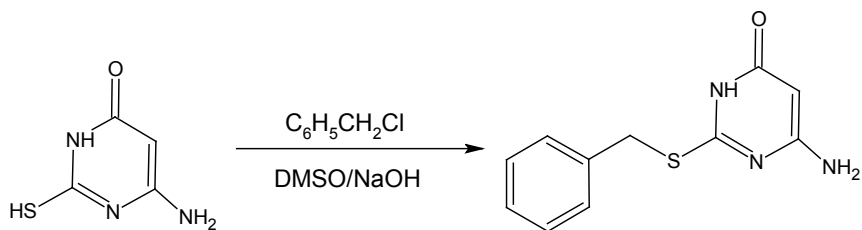
Rysunek 4.

Wyniki badania wykazały, iż największą aktywność cytotoksyczną przeciwko komórkom nowotworowym płuc wykazywała pochodna 3-amino-6-(4-chlorofenilo)-8-fenilo-1H-pyrido[2,3-d][1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidin-5-on posiadająca przy trzecim atomie węgla grupę aminową. Dobrą aktywność przeciwnowotworową wykazywały również pochodne 3 – alkilosulfanylowe. Wśród nich najbardziej skuteczna okazała się pochodna metylosulfanylowa. Pochodna posiadająca w pozycji trzeciej grupę tiolową także przejawiała aktywność przeciwnowotworową.

4. Reaktywność 6-amino-2-tiouracylu w reakcjach z chlorkami benzoilu

W 2011 roku Samir M. El-Moghazy [17] wraz ze współpracownikami opublikowali rezultaty swoich badań na temat nowych pochodnych 6-amino-2-tiouracylu. Celem badań Samir M. El-Moghazy było stworzenie nowych związków charakteryzujących się wysoką selektywnością w stosunku do komórek nowotworowych. Badania opierały się syntezie 6-amino-2-(benzylsulfanylo)pyrimidin-4-onu, który w dalszych etapach badań modyfikowano uzyskując pochodne wykazujące aktywność biologiczną.

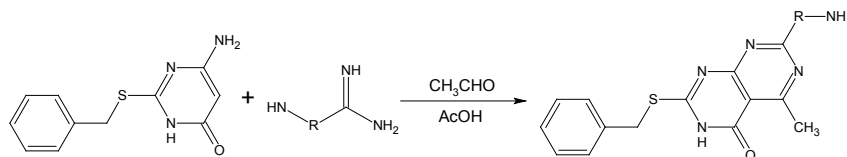
Syntezę wyjściowego reagenta przeprowadzono stosując reakcję substytucji nukleofilowej 6-amino-2-tiouracylu chlorkiem benzoilu w środowisku DMSO i wodorotlenku sodu. Otrzymano 6-amino-2-(benzylotio)pyrimidin-4-on w postaci żółtych kryształów z wydajnością 95% (Schemat 13).



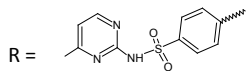
wyd. 95%

Schemat 13.

W dalszym etapie badań dokonano wiele modyfikacji otrzymanego produktu. Na szczególną uwagę zasługuje pochodna 4- {[7-(benzylotio)-4-metylo-5-okso-5,6-dihidropiryrido[4,5-d]pirymidin-2-yl]amino}-N-(4,6-dimetylopirymidin-2-yl)benzenotioamid. Otrzymano ją w reakcji 6-amino-2-(benzylotio)pirymidin-4(3H)-onu z pochodną guanidyny oraz aldehydem octowym w środowisku lodowego kwasu octowego (schemat 14). Testy biologiczne przeprowadzone na uzyskanej pochodnej wykazały jej wysoką zdolność do inhibowania kompleksu cyklin CDK4.

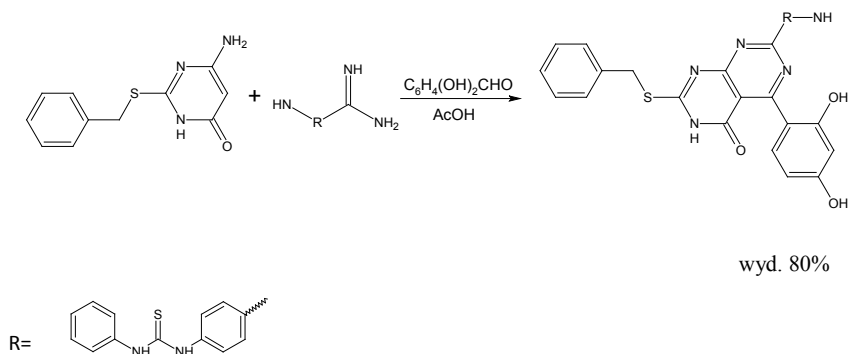


wyd. 70%



Schemat 14.

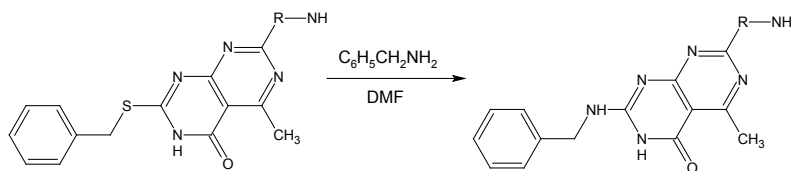
Inną pochodną otrzymaną w drugim etapie badań był 1-(4- {[7-(benzylotio)-4-(2,4-dihydroksyfenilo)-5-okso-5,6-dihidropiryrido[4,5-d]pirymidin-2-yl]amino}fenilo)-3-fenylotiomocznik. Związek ten otrzymano w analogiczny sposób prowadząc reakcję 6-amino-2-(benzylotio)pirymidin-4(3H)-onu z pochodną guanidyny oraz odpowiednim aldehydem. Produkt w postaci brązowych kryształów otrzymano z 80% wydajnością.



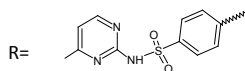
Schemat 15.

Uzyskany produkt poddano badaniu na aktywność cytotoksyczną przeciwko różnym liniom komórek nowotworowych. 1-(4-{[7-(benzylotio)-4-(2,4-dihydroksyfenilo)-5-okso-5,6-dihydropiryrido[4,5-d]pyrimidin-2-yl]amino} fenyl)-3-fenylotiomocznik okazał się skutecznym środkiem zwalczającym komórki nowotworowe raka płuc.

W dalszym cyklu badań naukowcy dokonali kolejną serię syntez nowych 2,5,7- tójpodstawionych pochodnych aminowych pirymido[4,5-d]pirymidin. Syntezy przeprowadzono wykorzystując uprzednio spreparowane dwupodstawione pochodne alkilowe, działając na nie różnymi pierwszorzędowymi aminami w środowisku DMF. Interesującą aktywność biologiczną wykazała pochodna 4-{[7-(benzyloamino)-4-metylo-5-okso-5,6-dihydropiryrido[4,5-d]pyrimidin-2-yl]amino}-N-(4,6-dimetylopyrimidin-2-yl)benzylotioamid. Otrzymano ją w reakcji substytucji 4-{[7-(benzylotio)-4-metylo-5-okso-5,6-dihydropiryrido[4,5-d]pyrimidin-2-yl]amino}- N-(4,6-dimetylopyrimidin-2-yl)benzylotioamidu z benzyloaminą w środowisku DMF (Schemat 16). Uzyskana pochodna aminowa po poddaniu testom w National Cancer Institute okazała się skutecznym środkiem przeciw złośliwemu nowotworowi skóry oraz wysoce aktywnym specyfikiem przeciwko komórkom nowotworowym raka płuc.

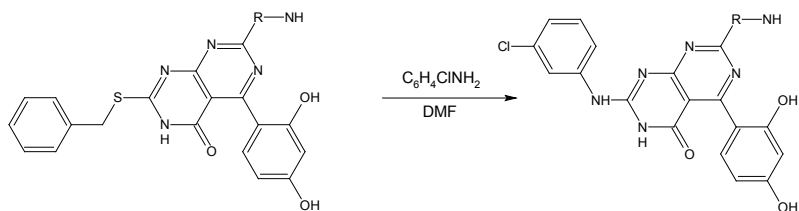


wyd. 50%

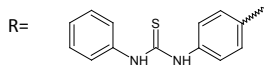


Schemat 16.

Innym przykładem otrzymanej trójpodstawionej pochodnej aminowej pirymido[4,5-d]pirymidyny jest 1-[4-({7-[(3-chlorofenyl)amino]-4-(2,4-dihydroksyfenyl)-5-okso-5,6-dihydropirymido[4,5-d]pirymidin-2-yl}amino)fenyl]-3-fenylotiomocznik. Pochodna ta w badaniach na aktywność przeciwnowotworową dowiodła swą wysoką aktywność przeciwko komórkom nowotworowym czerniaka oraz umiarkowaną aktywność przeciwko nowotworom płuc. Związek otrzymano w reakcji 1-(4-{{7-(benzylotio)-4-(2,4-dihydroksyfenyl)-5-okso-5,6-dihydropirymido[4,5-d]pyrimidin-2-yl}amino}fenyl)-3-fenylotiomocznika z 3-chlorofenylaminą w środowisku DMF i lodowego kwasu octowego. Produkt otrzymano w postaci brązowych kryształów z wydajnością 55 % (Schemat 17).

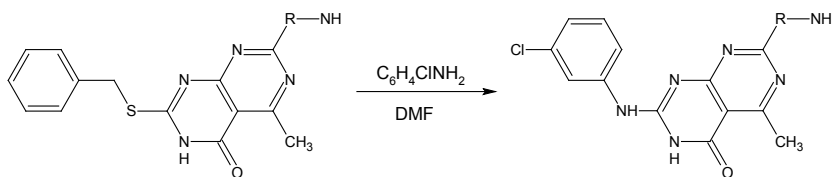


Wyd. 55%

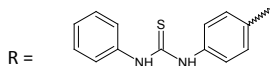


Schemat 17.

Wysoko aktywnym środkiem hamującym działanie CDK2 oraz silnie zwalczającym komórki nowotworowe nerek okazał się związek 1-[4-({7-[(3-chlorofenyl)amino]-4-metylo-5-okso-5,6-dihydropiryrido[4,5-d]pyrimidin-2-yl}amino)fenyl)-3-fenylotiomocznik. Związek w postaci fioletowych kryształów otrzymano działając na 1-(4-{[7-(benzylsulfanyl)-4-metylo-5-okso-5,6-dihydropiryrido[4,5-d]pyrimidin-2-yl]amino}-fenyl)-3-fenylotiomocznik 3-chlorofenylaminą w środowisku DMF i lodowatego kwasu octowego (Schemat 18).

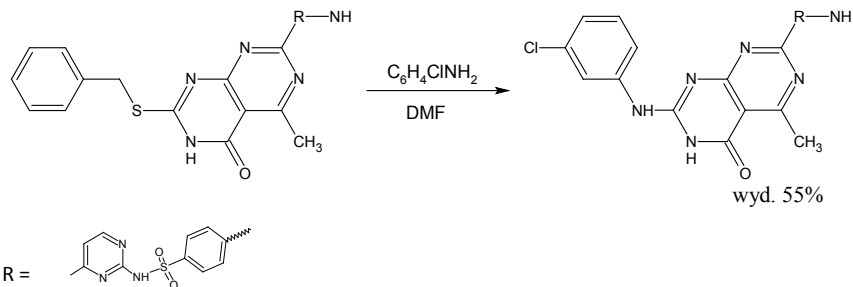


Wyd. 55 %



Schemat 18.

Inną wysoce aktywną biologicznie trójpodstawioną pochodną aminową pirydo[4,5-d]pirymidyny okazał się 4-({7-[(3-chlorofenyl)amino]-4-metylo-5-okso-5,6-dihydropiryrido[4,5-d]pyrimidin-2-yl}amino)-N-(4,6-dimetylopyrimidin-2-yl)benzenotioamid. Naukowcy otrzymali powyższy związek za pomocą reakcji 4-{[7-(benzylotio)-4-metylo-5-okso-5,6-dihydropiryrido[4,5-d]pyrimidin-2-yl]amino}-N-(4,6-dimetylopyrimidin-2-yl)benzenotioamidu z 3-chlorofenylaminą w środowisku DMF i lodowatego kwasu octowego (Schemat 19).



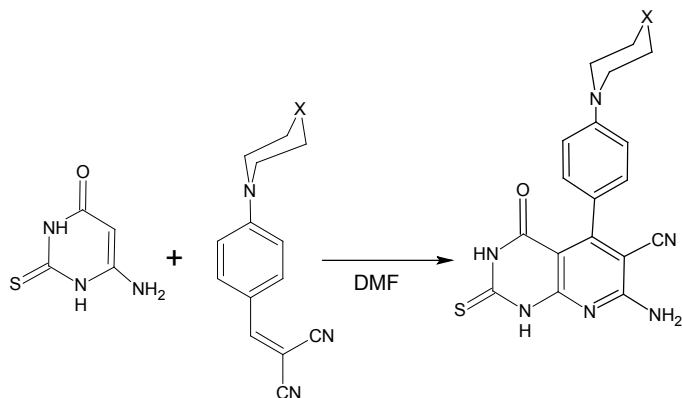
Schemat 19.

Testy biologiczne przeprowadzone na 4-({7-[(3-chlorofenilo)amino]-4-metylo-5-oksoo-5,6-dihidropirydo[4,5-d]pirymidyn-2-yl} amino)-N-(4,6-dimetylopirymidin-2-yl)benzenotioamidzie wykazały bardzo wysoką zdolność do hamowania kompleksu cyklin CDK2 oraz aktywność przeciwnowotworową zwalczającą komórki nowotworowe raka jajników, białaczki oraz złośliwego raka skóry.

5. Reaktywność 6-amino-2-tiouracylu z pochodnymi aryldenomalononitryli

W 2009 roku grupa badawcza El-Gazzar'a [18] przeprowadziła serię syntez nowych pochodnych pirydo(2,3-d)pirymidyn wykazujących szeroki wachlarz biologicznych zastosowań. Celem badań naukowców było otrzymanie bezpiecznych leków wykazujących działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe, które nie powodowałyby spotykanych powszechnie skutków ubocznych takich jak schorzenia żołądkowo-jelitowe czy nefrotoksyczność jak w przypadku niesteroidowych leków przeciwzapalnych.

Reakcja zapoczątkowująca syntezę nowych aktywnych biologicznie pochodnych pirydo(2,3-d)pirymidyn opierała się na reakcji kondensacji 6-amino-2-tiouracylu z pochodnymi aryldenomalononitryli w środowisku DMF. Produktami reakcji były 7-amino-6-cyjano-5-[4-(1-piperydynylo)fenylo]-2-tioksopirydo[2,3-d]pirymidyn-4-on, 7-amino-6-cyjano-5-[4-(4-morfolino)fenylo]-2-tioksopirydo[2,3-d]pirymidyn-4-on oraz 7-amino-6-cyjano-5-[4-(4-metylopiperazylo)fenylo]-2-tioksopirydo[2,3-d]pirymidyn-4-on (Schemat 20).

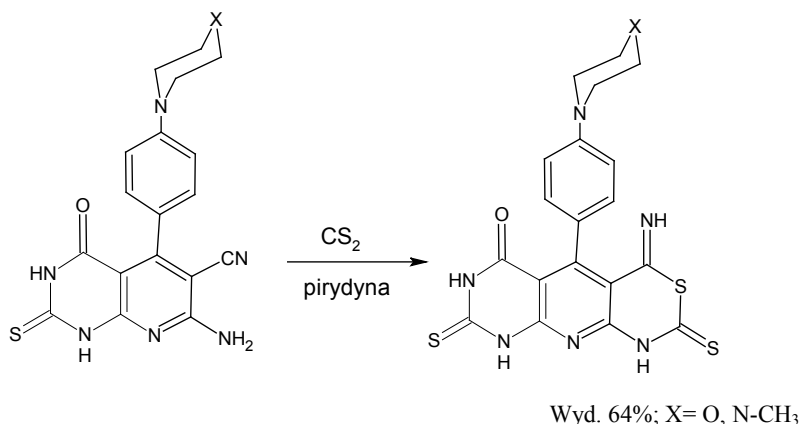


wyd. 78%; X= CH₂, O, N-CH₃

Schemat 20.

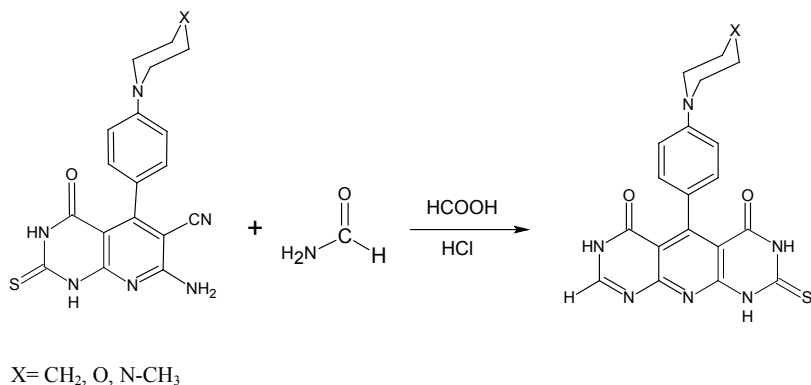
Otrzymane pochodne poddano testom biologicznym, które wykazały, iż wszystkie uzyskane pochodne pirydo(2,3-d)pirymidyny wykazywały aktywność przeciwbólową i przeciwzapalną. Najlepszym środkiem przeciwbólowym okazała się pochodna z podstawnikiem piperazynolowym, natomiast najlepszym środkiem przeciwzapalnym pochodna z podstawnikiem morfolinowym.

W kolejnym etapie badań El-Gazzar wykorzystał otrzymane pochodne do kolejnych syntez nowych związków. Używając jako substratów 7-amino-6-cyjano-5-[4-(4-morfolino)fenylo]-2-tioksopirydo[2,3-d]pirymidyn-4-on oraz 7-amino-6-cyjano-5-[4-(4-metylopiperazynylo)fenylo]-2-tioksopirydo[2,3-d]pirymidyn-4-on i poddając je działaniu disiarczku węgla w pirydynie otrzymał odpowiednio: 6-imino-5-[4-(4-morfolino)fenylo]-2-tioksopirimido[4,5:2,3]pirydo[6,5-d][1,3]-tiazyn-13-on (Schemat 21, X = O) oraz 6-imino-5-[4-(4-metylopiperazynylo)fenylo]-2-tioksopirimido[4,5:2,3]pyrido-[6,5-d][1,3]tiazyn-13-on (Schemat 21, X = NCH₃). Nowo zsyntetyzowane związki wykazywały działanie przeciwzapalne.



Schemat 21.

Inne pochodne pyrido[2,3-*d*:6,5-*d'*]diprymidyn-4,6-dionu wykazujące aktywność przeciwzapalną otrzymano w reakcji używając uzyskane w pierwszym etapie badań związki: 7-amino-6-cyano-5-[4-(1-pirerydynylo)fenylo]-2-tioksopirido[2,3-*d*]pirymidyn-4-on oraz 7-amino-6-cyano-5-[4-(4-metylopiperazylo)fenylo]-2-tioksopirido[2,3-*d*]pirymidyn-4-on z formamidem i kwasem mrówkowym wraz z zastosowaniem niewielkiej ilości kwasu solnego jako katalizatora (Schemat 22).



Schemat 22.

Przedstawione w niniejszej pracy fakty i doniesienia wykazują, iż 6-amino-2-tiouracyl jest szeroko rozpowszechnionym reagentem stosowanym do syntezy różnych biologicznie czynnych związków chemicznych. Nowo zsyntetyzowane pochodne 6-amino-2-tiouracylu stanowią obiecującą grupę związków wykazujących szerokie spektrum aktywności biologicznej. Nowe pochodne najczęściej otrzymywane w wyniku modyfikacji grupy egzo-aminowej 6-amino-2-tiouracylu wykazują aktywność przeciwzapalną, przeciwgrzybiczną, przeciwbólową, a także aktywność cytotoksyczną przeciwko różnym komórkom nowotworowym tj. raka płuc, nerek, wątroby, skóry, jajników oraz białaczki.

Literatura

1. S.N. VanderWel, P.J. Harvey, D.J. McNamara, J.T. Repine, P.R. Keller, J. Quin III, R.J. Booth, W.L. Elliott, E.M. Dobrusin, D.W. Fry, P.L. Toogood; Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones as specific inhibitors of cyclin-dependent kinase 4; *J. Med. Chem.* 48 (2005) 2371-2378.
2. P.L. Toogood, P.J. Harvey, J.T. Repine, D.J. Sheehan, S.N. VanderWel, H. Zhou, P.R. Keller, D.J. McNamara, D. Sherry, T. Zhu, J. Brodfuehrer, C. Choi, M.R. Barvian, D.W. Fry; Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6; *J. Med. Chem.* 48 (2005) 2388-2406.
3. B.D. Palmer, J.B. Smaill, G.W. Rewcastle, E.M. Dobrusin, A. Kraker, C.W. Moore, R.W. Steinkampf, W.A. Denny; Structure-activity relationships for 2-anilino-6-phenylpyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones as inhibitors of the cellular checkpoint kinase wee1; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 1931-1935.
4. K. Malagu, H. Duggan, K. Menear, M. Hummersone, S. Gomez, C. Bailey, P. Edwards, J. Drzewiecki, F. Leroux, M.J. Quesada, G. Hermann, S. Maine, C. Molyneaux, A. Le Gall, J. Pullen, I. Hickson, L. Smith, S. Maguire, N. Martin, G. Smith, M. Pass, The discovery and optimisation of pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4-diamines as potent and selective inhibitors of mTOR kinase; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 5950-5953.
5. X.L. Zhao, Y.F. Zhao, S.C. Guo, H.S. Song, D. Wang, P. Gon; Synthesis and Anti-tumor Activities of Novel [1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidines; *Molecules* 12 (2007) 1136-1146.
6. H.N. Hafez, A.B.A. El-Gazzar; Synthesis and antitumor activity of substituted triazolo[4,3-a]pyrimidin-6-sulfonamide with an incorporated thiazolidinone moiety; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 4143-4147.
7. A.S. Shawali, S.M. Sherif, M.A.A. Darwish, M.M. El-Merzabani,

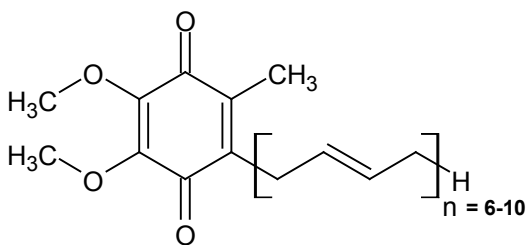
- Synthesis and antitumor screening of new 1,7-diphenyl-3-(1,3-disubstituted-1H-pyrazole-4-carbonyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidin-5(1H)-ones; *Arch. Pharm. Res.* 33 (2010) 55-60.
8. M. Y. Gavrilov, I. G. Mardanova, V. E. Kolla, M. E. Konshin, Synthesis and anti-inflammatory and analgesic activities of 2-arylamino-5,6,7,8-tetrahydroquinoline-3-carboxamides; *Pharm. Chem. J.* 22, 554 (1988).
 9. R. K. Robins, G. H. Hitchings ; Studies on Condensed Pyrimidine Systems. XIX. A New Synthesis of Pyrido [2,3-d] pyrimidines. The Condensation of 1,3-Diketones and 3-Ketoaldehydes with 4-Aminopyrimidines; *J. Am. Chem. Soc.* 80, 3449 (1958).
 10. E.C. Taylor, C. C Cheng; Notes – purine chemistry. VII. An improved synthesis of hypoxanthine; *J. Org Chem.* 25, 148 (1960).
 11. S. Aruna, G. Shanmugam; Vibrational assignments of six-membered heterocyclic compounds: Normal vibrations of 6-aminouracil and 6-amino-2-thiouracil; *Spectrochimica Acta Part A*, 41, 531 (1985).
 12. M. A. Romero, M.P Sánchez, M. Quinos, F. Sánchez, J.M Salas, M.N. Moreno; Transition metal complexes of 6-amino 2-thiouracil; crystal structure of bis(6-amino-2-thiouracilato) aquazinc(II) dehydrate; *Can. J. Chem.* 71, 29 (1993).
 13. R. Hilal, H. Moustafa, S. El- Tachet, M. F. Shibl; Equilibrium Geometry and Gas-Phase Proton Affinity of 2-Thiouracil Derivatives; *Int. J. Quant. Chem.* 87, 378 (2002).
 14. A. Loupy, H. Rodriguez, R. Pérez, M. Suárez, A. Lam, N. Cabrales; Alkylation of Some Pyrimidine and Purine Derivatives Using Microwave-Assisted Methods, *Heterocycles*, 55, 290 (2001).
 15. N. R Mohamed, M. T. El-Saidi, Y.M.Ali, M. H Elnagdi; Utility of 6-amino-2-thio-uracil as a precursor for the synthesis of bioactive pyrimidine derivatives; *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 6227, (2007)..
 16. B. Hala El-Nassan; Synthesis and antitumor activity of novel pyrido[2,3-d][1,2,4]triazolo[4,3-a] pyrimidin-5-one derivatives; *Eur. J. Med. Chem.* 46, 2031-2036 (2010)
 17. S. M. El-Moghazy, D. A. Ibbahim, N. M. Abdelgawad, N. A. H. Farag, A. S. El-Khouly; Design, synthesis and biological evaluation of novel pyrimido[4,5-d]pyrimidine CDK2 inhibitors as anti-tumor agents; *Scientia Pharmaceutica*, 79, 429–447 (2011).
 18. Abdel-Rahman B. A. El-Gazzar, Hend N. Hafez; Synthesis of 4-substituted pyrido[2,3-d]pyrimidin-4(1H)-one as analgesic and anti-inflammatory agents; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 3392 (2009).

Rozdział 5

Koenzym Q₁₀

Natalia Bąkowska, Grażyna Bartkowiak, Grzegorz Schroeder
*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii,
Umultowska 89b, 61-614 Poznań*

2,3-Dimetoksy-5-metylo-6-poliizoprenylo-benzochinon, zwany powszechnie koenzymem Q₁₀ należy do pochodnych 1,4-benzochinonu. Związek ten zbudowany jest z pierścienia aromatycznego, zawierającego dwie grupy karbonylowe w pozycji para, dwie grupy metoksyłowe, grupę metylową oraz długi łańcuch węglowodorowy złożony z dziesięciu jednostek izoprenowych (rysunek 1). Koenzym Q₁₀ uważany jest bardzo często za substancję witaminopodobną ze względu na budowę.



Rysunek 1. Struktura koenzymu Q₁₀

Koenzym Q₁₀ został po raz pierwszy wyizolowany z komórek mięśnia sercowego wołu w 1957 roku przez F. Crane’a [1]. Rok później K. Folkers wraz ze swoją grupą badawczą w korporacji Merck określili jego strukturę chemiczną [2]. W latach sześćdziesiątych XX wieku Yamamura jako pierwszy na świecie zastosował koenzym Q₁₀, homolog ubichinonu, w terapii choroby serca [3]. W 1966 roku Mellors i Tappel odkryli antyoksydacyjne właściwości CoQ₁₀ [4, 5], a w 1970 roku w Japonii została opracowana metoda syntezy czystego koenzymu.

W 1978 r. Peter Mitchell otrzymał Nagrodę Nobla za teorię chemiosmotyczną, w której opisał działanie Q_{10} . W dalszych badaniach Mitchell wyjaśnił dokładnie rolę ubichinonu w transferze protonów i przemianach energetycznych.[6]

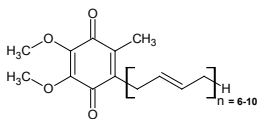
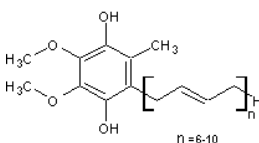
W przyrodzie istnieje wiele homologów ubichinonu różniących się liczbą jednostek izoprenowych (tabela 1).

Tabela 1. Występowanie homologów koenzymu Q_{10} w wybranych organizmach.

Organizm	Typ homologu
Drożdże	Q_6 Q_7
Grzyby	Q_6 Q_7 Q_8 Q_9 Q_{10}
Rośliny	Q_8 Q_9 Q_{10}
Bezkręgowce	Q_7 Q_8 Q_9 Q_{10}
Kręgowce	Q_9 Q_{10}
Człowiek	Q_{10}

Koenzym Q_{10} występuje w dwóch formach – utlenionej formie chinonowej czyli jako ubichinon oraz w formie zredukowanej, fenolowej, jako ubichinol (tabela 2).

Tabela 2. Właściwości fizykochemiczne ubichinonu i ubichinolu.

CHARAKTERYSTYKA FIZYKOCHEMICZNA		
Nazwa	2,3-Dimetoksy-5-metylo-6-polizoprenylo-benzochinon, Ubidekarenon, Ubichinon, Koenzym Q_{10} , CoQ_{10} , Q_{10}	2,3-Dimetoksy-5-metylo-6-polizoprenylo-benzohydrochinon, Ubichinol, $CoQ_{10}H_2$
Wzór sumaryczny	$C_{59}H_{90}O_4$	$C_{59}H_{92}O_4$
Wzór strukturalny		
Masa molowa [g/mol]	862	864
Temperatura topnienia	49,0 °C	49,5 °C

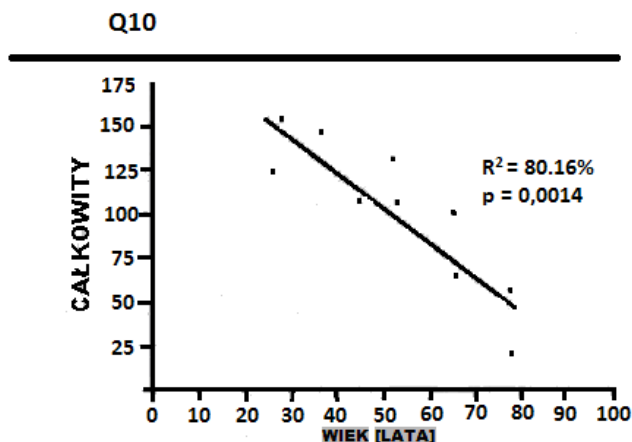
Stan skupienia		Stały
Barwa		Pomarańczowa
Rozpuszczalność	H ₂ O	Brak
	Tłuszcze	Umiarkowana
	Rozpuszczalniki niepolarne	Dobra

Występowanie koenzymu Q₁₀

Koenzym Q₁₀ znany jest również pod nazwą ubichinon, co od ang. „ubiquitous” oznacza wszechobecny. Związek ten występuje powszechnie w komórkach organizmów żywych. Ubichinon jest niezbędnym elementem zapewniającym ich prawidłowe funkcjonowanie. Synteza Q₁₀ rozpoczyna się w retikulum endoplazmatycznym. Ubichinon zlokalizowany jest w wewnętrznej błonie mitochondrium, występuje również w aparacie Golgiego, lizosomach oraz peroksysomach. Pośredniczy on w transporcie elektronów w łańcuchu oddechowym oraz generuje gradient protonowy w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Ubichinon pełni wiele istotnych funkcji, zestawionych w tabeli 2.

Informacje ogólne o ubichinonie

Pierścień ubichinonu przyjmuje dwie możliwe orientacje w obrębie błony komórkowej. W jednym przypadku Q₁₀ związany jest z hydrofobowym obszarem dwuwarstwy błony komórkowej, natomiast w innym związek ten wiąże się z jej polarną powierzchnią. Rodzaj orientacji znajduje odzwierciedlenie w poziomach energetycznych cząsteczki. Forma Q₁₀ o pofałdowanym łańcuchu izoprenowym jest bardziej stabilna niż ta o łańcuchu rozciągniętym. [7]. Organizm potrafi samodzielnie syntetyzować koenzym Q₁₀ [8, 9]. Badania *in vivo* przeprowadzone na grupie osób w dwóch przedziałach wiekowych: 18-25 i 60-72 lat wykazały, że poziom Q₁₀ w komórkach skóry wraz z wiekiem maleje [10] (rysunek 2). Zjawisko to wpływa na większą podatność skóry na działanie czynników zewnętrznych. W przypadku seniorów poziom ubichinonu był aż o 33% niższy w stosunku do osób młodych.



Rysunek. 2. Poziom Q_{10} w komórkach u osób w różnych przedziałach wiekowych [10].

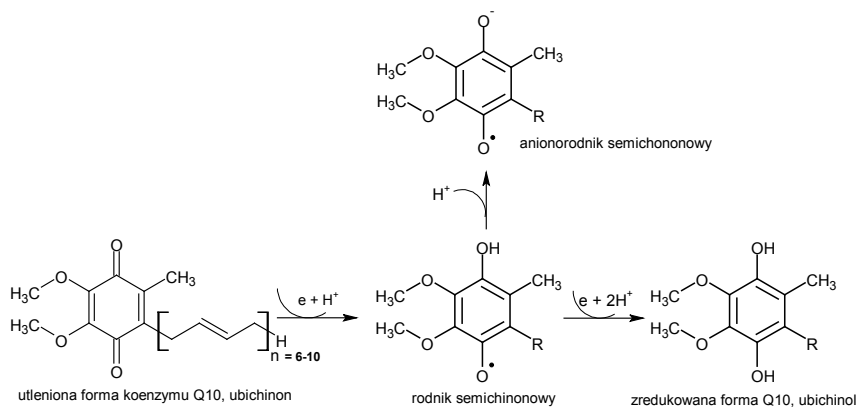
Przyczynami tego zjawiska są między innymi:

- genetyczne mutacje, wywołane działaniem wolnych rodników [10],
- starzenie się [10-14],
- choroby nowotworowe [10-14],
- działanie inhibitorów reduktazy HBA-CoA [15].

Początkowo skutki niedoboru objawiają się w postaci przewlekłego zmęczenia oraz ogólnego obniżenia wydolności organizmu. Znaczne obniżenie poziomu koenzymu Q_{10} prowadzi do wielu poważnych schorzeń związanych z układem krążenia, chorobami przyzębia i serca [16] (tabela 4).

Badania wykazały, że regularne przyjmowanie ubichinonu w postaci preparatów farmaceutycznych lub suplementów diety, zawierających skoncentrowaną dawkę tego związku pozwala uzupełnić jego niedobór w organizmie. Wyłącznie regularne oraz długotrwale stosowanie tego koenzymu przynosi trwałe efekty. Należy podkreślić, że ubichinon znalazł zastosowanie jako dodatek wspomagający tradycyjne leczenie. Stosowanie samego suplementu diety zawierającego Q_{10} nie gwarantuje poprawy stanu zdrowia. Mimo tego, że koenzym ten zaliczany jest do związków całkowicie bezpiecznych, zalecana jest konsultacja lekarska przed przystąpieniem do kuracji.

Redukcja ubichinonu do ubichinolu wiąże się z przeniesieniem protonów i jednoczesną produkcją elektronów. Koenzym Q_{10} występuje w postaci form przedstawionych na schemacie (rysunek 3).



Rysunek 3. Schemat utleniania-redukcji ubichinonu, R = 10 jednostek izoprenowych [15].

Tabela 3. Zawartość Q₁₀ w wybranych produktach spożywczych [9,17].

Produkt spożywczy		CoQ ₁₀ [μg/g]	Produkt spożywczy		CoQ ₁₀ [μg/g]
Mięso	Mięso z renifera	157,9	Warzywa	Kalafior	2,7
	Wołowina	36,5		Groch	2,7
	Wątróbka wieprzowa	22,7		Fasola	1,8
	Szynka wieprzowa	20,0		Marchew	1,7
	Kurczak	14,0		Pomidory	0,9
Ryby	Śledź	15,9	Owoce	Ziemniaki	0,5
	Tuńczyk	15,9		Jabłka	1,3
	Pstrąg	8,5		Pomarańcze	1,4
	Ser żółty	1,3		Truskawki	1,4
Nabiał	Jogurt	2,4		Czarna porzeczka	3,4
	Jaja	1,2		Poziomka	1,5
	Mleko (1,5%)	0,1		Gruszka	1,1

Zawartość Q₁₀ w komórkach jest zróżnicowana i zależy głównie od jej metabolizmu. Przykładową zawartość koenzymu w poszczególnych narządach zestawiono w tabeli 3.

Ubichinon syntetyzowany w komórkach organizmów żywych zaliczany jest do stereoizomerów typu *trans*.

Zaletą tego związku jest brak toksyczności. Naukowcy twierdzą, że jest

całkowicie bezpieczny dla zdrowia. Badania wykazały, że jest stosunkowo dobrze przyswajalny przez organizm. Jedynie w przypadku wąskiej grupy pacjentów zaobserwowano wystąpienie skutków ubocznych jego stosowania. Niekorzystne efekty objawiły się jedynie w postaci mdłości [17, 18].

Ubichinon dobrze rozpuszcza się w tłuszczach, dlatego zaleca się przyjmowanie Q_{10} po posiłkach. [18]

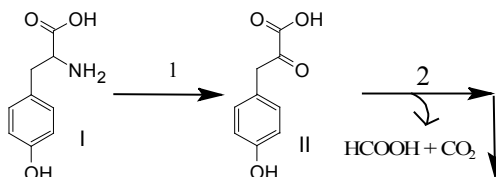
Tabela 4. Zawartość ubichinonu i ubichinolu w wybranych narządach człowieka [9]

Narząd	CoQ ₁₀ (mg/g)	CoQ ₁₀ H ₂ (mg/g)
Serce	114	47
Nerki	67	73
Wątroba	55	95
Mięśnie	40	60
Mózg	13	23
Trzustka	33	100
Śledziona	25	87
Płuca	8	24
Tarczycza	25	68
Jądra	11	78
Jelito	12	93

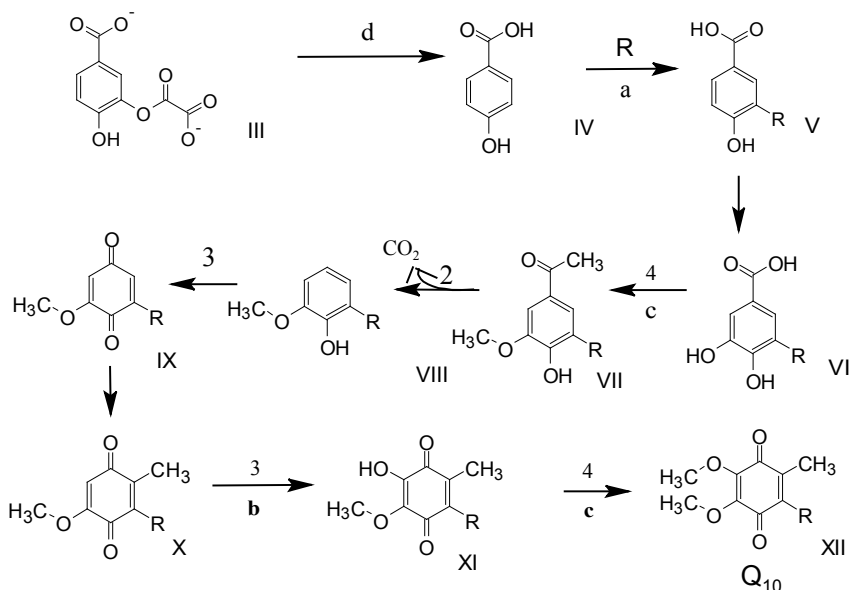
Metody otrzymywania koenzymu Q_{10}

Schemat syntezy koenzymu O_{10} z tyrozyny przedstawia rysunek 4, a tworzenie łańcucha poliizoprenowego R – rysunek 5.

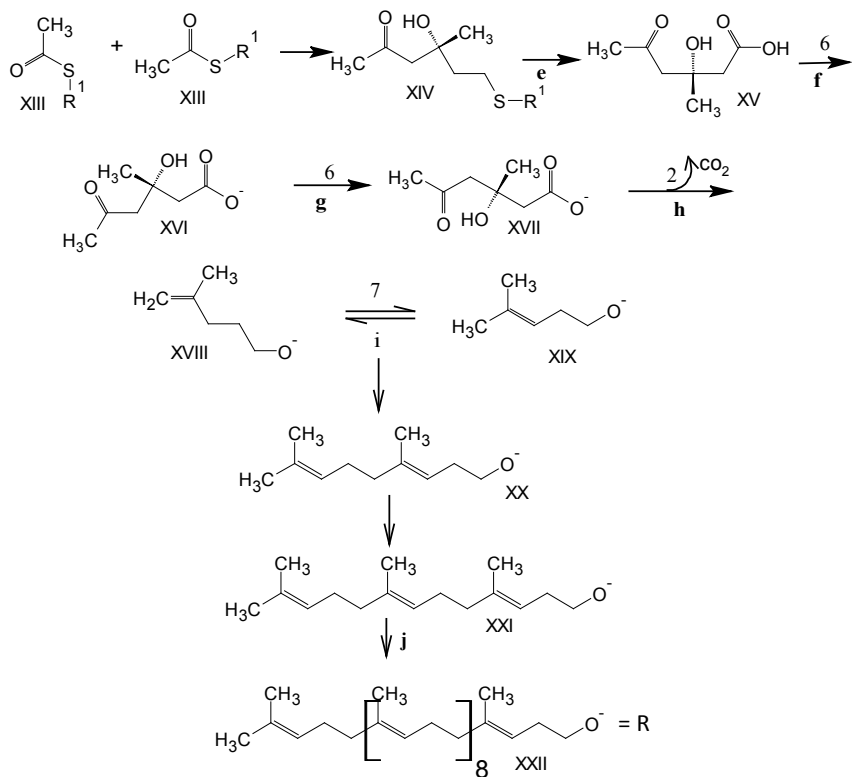
EUKARIOTY



BAKTERIE I DROŻDŻE



Rysunek 4. Schemat syntezy ubichinonu: I – tyrozyna; II – 4-hydroksyfenylopirogronian; III – choryzmian; IV – 4-hydroksybenzoesan; V – 4-hydroksy-3-poliprenylobenzoesan; VI – 4,5-dihydroksy-3-poliprenylobenzoesan; VII – 4-hydroksy-5-metoksy-3-poliprenylobenzoesan; VIII – 6-metoksy-2-poliprenylofenol; IX – 6-metoksy-2-poliprenylo-1,4-benzochinon; X – 6-metoksy-3-metylo-2-poliprenylo-1,4-benzochinon; XI – 5-hydroksy-6-metoksy-3-metylo-2-poliprenylo-1,4-benzochinon; XII – ubichinon; R – podstawnik poliizoprenowy [9].



Rysunek 5. Schemat syntezy łańcucha izoprenowego R koenzymu Q₁₀: XIII- acetyloCoA; XIV-3-hydroksy-3-metyloglutaryloCoA (HMG-CoA), XV- mewalonian, XVI- fosforan mewalonylu; XVII-dwufosforan mewalonylu; XVIII-pirofosforan izopentyłu (IPP), XIX-pirofosforan dimetyllallilu(DMAPP); XX- pirofosforan geranylu, XXI- pirofosforan farnezyłu, XXII-dwufosforan dekaprenylu; 1 – deaminacja, 2 – w organizmie dekarboksylacja, 3 – C-hydroksylacja, 4 – O-metylacja; 5 – C-metylacja, 6 – fosforylacja, 7 – izomeryzacja; a – transferaza poliprenylowa, b – metoksy-6-metylo-5-poliprenylo-benzochinohydroksylaza, c – 2,4-dihydroksy-5-poliprenylobenzoeso-metylotransferaza, d – syntaza antranilanowa, e – reduktaza HMG- CoA, f –kinaza mewalonylu, g – kinaza fosfomewalonylu, h – dekarboksylaza fosforanu mewalonylu, i – izomeraza izopentyłu, j – transferaza transprenylowa [9].

Koenzym Q₁₀ możemy otrzymać drogą [19]:

- ekstrakcji z tkanek zwierzęcych,
- fermentacji przy udziale mikroorganizmów,

- syntezy chemicznej,

Biologiczne metody otrzymywania ubichinonu różnią się diametralnie od syntezy chemicznej, zarówno pod względem substratów jak i całego procesu technologicznego. Obecnie ubichinon uzyskiwany jest głównie w wyniku syntezy chemicznej, co jest główną przyczyną wysokich cen suplementów diety zawierających dodatek Q₁₀. Wynika to ze znacznych kosztów produkcji i oczyszczania uzyskanego preparatu. Komercyjne uzyskiwanie koenzymu na drodze fermentacji pozwoliłoby znacznie obniżyć koszty produkcji, a tym samym wpłynąć na cenę preparatów. Warto dodać, że biologiczne metody pozyskiwania tego związku są znacznie bardziej wydajne niż metody sztuczne. Do naturalnych potencjalnych producentów ubichinonu zaliczamy bakterie *A. Tumefaciens*, które indukują mutację bakterii *Rhodobacter sphaeroides*. Zmutowane bakterie typu *R. sphaeroides* potrafią efektywnie wyprodukować Q₁₀ zarówno w warunkach świetlnych jak i ciemności. Badania wykazały, że najwydajniej bakterie te pracują w temperaturze 30-35 stopni Celsjusza.[20] Istnieje szereg parametrów, które należy kontrolować podczas prowadzenia procesu fermentacji należą do nich m.in.:

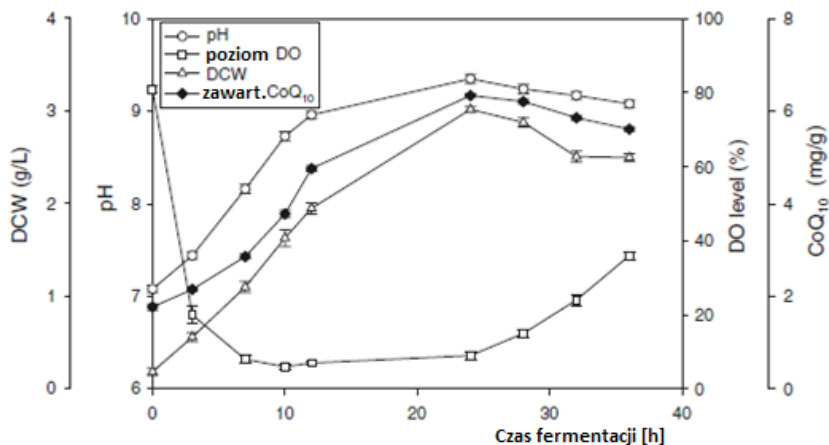
- pH,
- poziom rozpuszczonego tlenu, DO (ang. *dissolved oxygen*),
- masa suchej celi, DCW (ang. *dry-cell weight*),
- temperatura.

Metody fermentacji możemy podzielić ze względu na ilość wsadu do komory fermentacyjnej. Zbiorniki, w których przeprowadza się proces fermentacji mogą być wypełnione całkowicie lub częściowo. W zależności od stopnia wypełnienia uzyskuje się różne wydajności procesu [20]. Zależność tę przedstawia tabela 5.

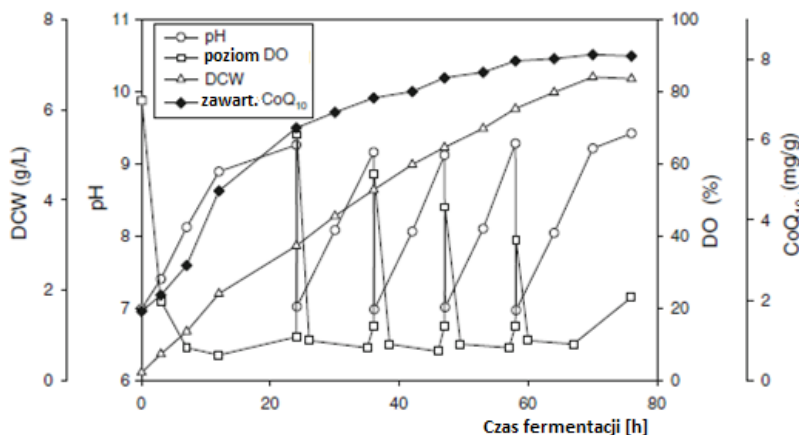
Tabela 5. Rezultat produkcji Q₁₀ za pomocą różnych metod fermentacji przy użyciu różnych bakterii fotosyntetycznych [20].

Bakteria	Skala procesu fermentacji	Metoda fermentacji	Zawartość Q ₁₀ (mg/g DCW)
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	30,0	Częściowe wypełnienie	12,5
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	1,0	Całkowite wypełnienie	4,61
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	0,3	Całkowite wypełnienie	8,70

Koenzym ekstrahowany z *R. sphaeroides* może być następnie analizowany za pomocą zmodyfikowanych metod Matsumura i Takahashi.[20].



Rysunek 6. Zależność pH, poziomu DO, DCW i zawartości Q_{10} od czasu fermentacji prowadzonej w zbiorniku częściowo wypełnionym, temp. procesu $<30^{\circ}\text{C}$, 200 obrotów/minutę (rpm), 50 lux. [20].



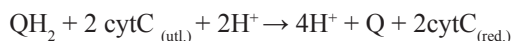
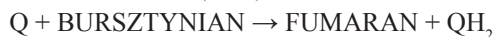
Rysunek 7. Zależność pH, poziomu tlenu rozpuszczonego (DO), DCW i zawartości Q_{10} od czasu fermentacji prowadzonej w zbiorniku całkowicie wypełnionym wsadem, temp. procesu $<30^{\circ}\text{C}$, 200 obrotów/minutę (rpm), 50 lux [20].

Funkcja koenzymu Q10 w organizmie

Peter Mitchell, twórca teorii chemiosmotycznej, w latach sześćdziesiątych

XX wieku wykazał, że związek ten stanowi istotny element łańcucha oddechowego, który pośredniczy w transporcie elektronów, w efekcie czego wytwarzana jest energia w postaci ATP. Energia ta jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania wszystkich narządów. Łańcuch oddechowy składa się z kompleksów, pełniących funkcję pomp protonowych. Kompleksy te katalizują przeniesienie elektronów.[9]

[Oznaczenia: Q -koenzym Q₁₀, C-cytochrom C [9]]



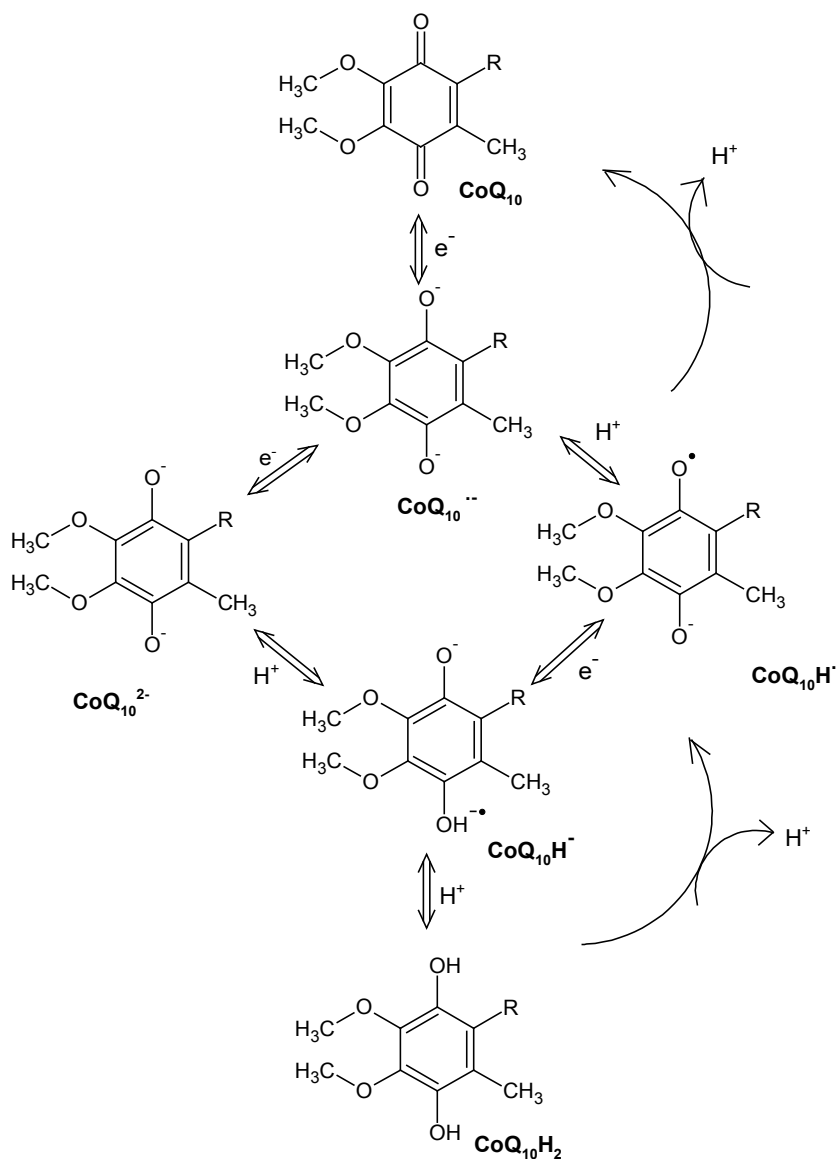
Przepływ elektronów, zgodnie z teorią chemiosmotyczną, generuje gradient protonowy, który tworzy się w poprzek błony mitochondrium. Wytworzona w ten sposób siła protonomotoryczna zostaje w dalszym etapie wykorzystana przez syntezę ATP. Syntetaza zlokalizowana jest w błonie mitochondrialnej; wykorzystuje ona do produkcji ATP proces [Pi + ADP], tj. przyłączenie jednostki fosforanowej (Pi) do adenozyndifosforanu (ADP). Obecność dwóch wiązań bezwodnikowych sprawia, że adenozyntrifosforan jest cząsteczką bogatą w energię, która jest niezbędna do pracy wszystkich komórek naszego ciała.[15]

Przemiany wolnorodnikowe koenzymu Q₁₀

Schemat przemian wolnorodnikowych, jakim ulega Q₁₀ w organizmie, przedstawiono na rysunku 8. Obrazuje on równowagę pomiędzy dwiema głównymi postaciami tego koenzymu: utlenioną czyli ubichinonem (CoQ₁₀) oraz zredukowaną, czyli ubichinolem (CoQ₁₀H₂). Przejście jednej formy w drugą zachodzi poprzez nietrwałe formy pośrednie – rodnik ubisemichinonowy (CoQ₁₀H) i anionorodnik ubisemichinonowy (CoQ₁₀⁻).

Q₁₀ pełni następujące funkcje w organizmie:

- pośredniczy w transporcie elektronów w łańcuchu oddechowym [9, 15, 18, 21],
- generuje gradient protonowy [9, 15, 21],
- pośredniczy w tworzeniu energii ATP [10, 21],
- chroni przed działaniem wolnych rodników tj. wykazuje właściwości antyoksydacyjne [10],
- chroni przed szkodliwym działaniem promieniowania UVA i UVB [10],
- przyspiesza syntezę tokoferolu, silnego antyutleniacza,



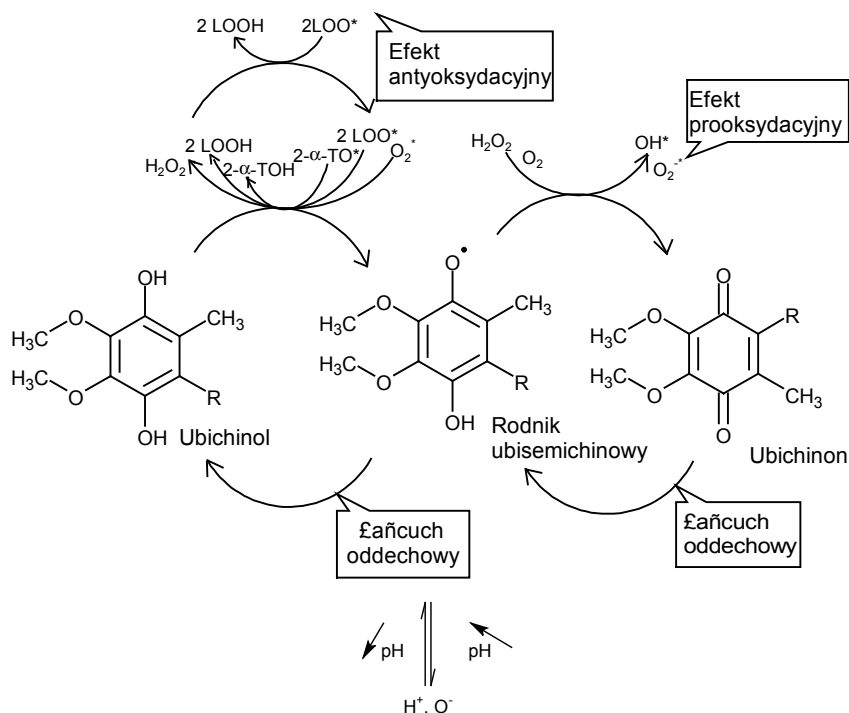
Rysunek 8. Przemiany koenzymów Q w reakcjach wolnorodnikowych [9].

CoQ₁₀ – ubichinon, CoQ₁₀H₂ – ubichinol, CoQ₁₀^{•-} – anionorodnik ubisemichinonowy, CoQ₁₀H[•] – rodnik ubisemichinonowy, CoQ₁₀H⁻, CoQ₁₀H²⁻ – aniony ubisemichinonowe

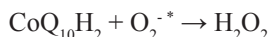
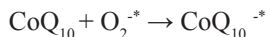
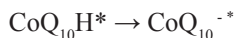
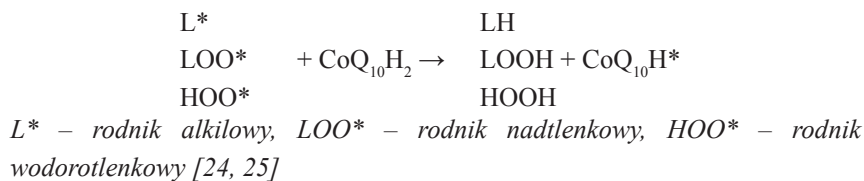
- stabilizuje oddziaływanie pomiędzy fosfolipidami, a białkami budującymi błonę komórkową [9, 22],
- integruje i stabilizuje pracę kanałów wapniowych [9, 23],
- redukuje powierzchnię korneocytów [10, 21].

Właściwości anti- i pro- oksydacyjne Q₁₀

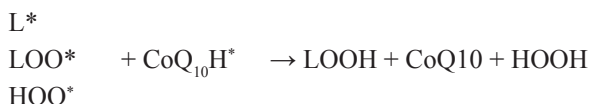
Udowodniono, że koenzym Q₁₀ wykazuje zarówno właściwości antyoksydacyjne jak i prooksydacyjne. W rzeczywistości to dwie z form Q₁₀ wykazują właściwości antyoksydacyjne, są to: ubichinol (CoQ₁₀) i rodnik ubisemichinonowy (CoQH*[•]). Ubichinol wychwytuje wolne rodniki, zapobiegając tym samym peroksydacji lipidów [9, 24].



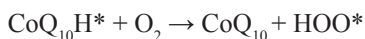
Rysunek 9. Właściwości anti- i pro-oksydacyjne Q₁₀ [9].



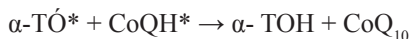
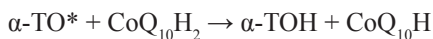
Właściwości antyoksydacyjne pozwalają chronić białka i DNA przed szkodliwym działaniem utleniaczy [9, 26] Ubichinol oddając atom wodoru przechodzi w formę rodnika ubisemichinonowego $CoQ_{10}H^*$, który może reagować zgodnie z schematem:



W wyniku reakcji powstaje Q_{10} , który nie wykazuje właściwości antyoksydacyjnych.



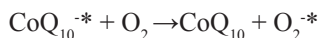
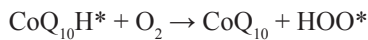
W błonach komórkowych poza rodnikiem ubisemichinonowym i ubichinolem występuje również α - tokoferol (witamina E). Występowanie tych silnych antyutleniaczy oparte jest na wzajemnej współpracy. Witamina E na skutek działania ubichinolu przechodzi z formy utlenionej (nieaktywnej) do aktywnej biologicznie formy zredukowanej. Tokoferol (α -TOH) reaguje zgodnie ze schematem:



Ubichinol w odróżnieniu od witaminy E (α -TOH) chroni zarówno przed

inicjacją jak i propagacją przemian wolnorodnikowych lipidów. Tokoferol może jedynie opóźnić proces propagacji.

Działanie prooksydacyjne Q₁₀ polega na tworzeniu reaktywnych form tlenu. Przykład ilustruje schemat:



Rodniki zostają przekształcone w nadtlenek wodoru i tlen cząsteczkowy [25].

Zastosowania medyczne koenzymu Q₁₀

Medycyna stanowi dziedzinę, w której Q₁₀ zyskał szczególną rolę. Wraz z wiekiem poziom koenzymu Q₁₀ maleje w komórkach. Objawem niedoboru ubichinonu jest przewlekłe zmęczenie. Szczególnie narażeni na tę dolegliwość są sportowcy, którzy na co dzień borykają się ze wzmożonym wysiłkiem fizycznym. Przeprowadzone badania wykazały, że skutki niedoboru tego koenzymu prowadzą do poważnych dolegliwości związanych z chorobami serca, układu krążenia, problemami z nadciśnieniem tętniczym, miażdżycą czy chorobami przyzębia (tabela 6).

Tabela 6. Choroby wywołane niskim poziomem Q₁₀.

Choroby	Źródło	Choroby	Źródło
Nowotwory	[9, 18]	Zespół przewlekłego zmęczenia	[16,18]
Nadciśnienie tętnicze	[7, 18, 29]	Parkinsona	[2, 9]
Niewydolność wieńcowa	[9, 18]	Cukrzyca	[2, 9, 18, 32]
Miażdżycy	[7-9]	Migrena	[9]
AIDS	[7, 9]	Alzheimerera	[9, 31]
Parodontoza	[18]	Stwardnienie rozsiane	[9, 33]

Dyrektor Instytutu Badań Biomedycznych w Austin, Karl Folkers, określany mianem ojca koenzymu Q_{10} , na podstawie badań przeprowadzonych wśród swoich pacjentów wykazał, że 75% chorych na serce cierpi na niedobór Q_{10} [17, 18].

W dziewięciu przypadkach na dziesięć wśród pacjentów Folkersa ubichinon pomógł zwalczyć nowotwór. Specjaliści twierdzą, że regularne stosowanie ubichinonu przez ok. 2-8 miesięcy przynosi trwałe efekty w leczeniu.

Edward Wilkinson i Karl Folkers zajmowali się leczeniem pacjentów z chorobami przyzębia. Leczenie wspomagane ubichinonem przyniosło poprawę stanu zdrowia pacjentów, obrzęki dziąseł zniknęły, krwawienie ustąpiło, zmniejszyła się także liczba kieszonek okołozębowych. Wiadomo też, że ubichinon regularnie stosowany obniża ciśnienie tętnicze. Antyoksydacyjne właściwości Q_{10} zastosowano w walce z miażdżycą. Wykorzystuje się tu fakt, że ubichinon wychwytuje wolne rodniki, zapobiegając utlenianiu kwasów tłuszczowych, które odkładają się w tętnicach.

Zastosowanie koenzymu Q_{10} w kosmetyce

Ubichinon zwany eliksirem młodości znalazł, także zastosowanie w kosmetyce. Głównym zadaniem tego związku jest zahamowanie procesów starzenia. Q_{10} dostępny w postaci tabletek, kapsulek, kremów oraz maści stanowi jeden z najbardziej rozchwytywanych produktów na rynku kosmetycznym.

Skóra stanowi jeden z największych organów największych naszego ciała. Głównym zadaniem tej powłoki jest ochrona organizmu przed wnikaniem do jej powierzchni toksyn oraz drobnoustrojów chorobotwórczych.

Organ ten z wiekiem ulega procesowi starzenia. Zjawisko to wynika z uwarunkowań genetycznych oraz działania hormonów. Inną z przyczyn przyspieszających proces starzenia się skóry jest tzw. stres oksydacyjny [10, 25].

Zjawisko to polega na zachwianiu równowagi między procesami oksydacyjnymi i antyoksydacyjnymi. Działanie enzymów i witamin takich jak:

- dysmutaza ponadtlenkowa,
- katalaza,
- transferaza 5-glutationowa,
- glutation,
- witaminy A, C, E,
- ubichinol, rodnik ubisemichinonowy,

pozwała pozbyć się nadmiaru reaktywnych form tlenu (RTF) z komórek. Decydującą rolę odgrywają pochodne formy tlenu takie jak: 1O_2 , O_2^- , HO_2^- , HO^* , H_2O_2 . Wzrost poziomu zawartości tych niezwykle aktywnych jednostek prowadzi do:

- agregacji białek [25];
- zniszczenia III-rzędowej struktury białek [9, 10, 25];
- modyfikacji elementów budujących komórki [25];
- zaburzenia prawidłowego funkcjonowania komórek [9, 10, 25];
- peroksydacji lipidów [9, 10, 25];
- genetycznych mutacji [10, 25];
- efektów cytotoksycznych [25].

Wystawienie skóry na promieniowanie UVA i UVB wywołuje powstawanie zmarszczek w okolicach oczu, zwanych potocznie kurzymi łapkami. Badania przeprowadzone na grupie seniorów, wykazały redukcję zmarszczek po sześciu miesiącach aplikowania Q_{10} .

Ekspozycja na promieniowanie słoneczne i ultrafioletowe prowadzi do wielu niekorzystnych zmian w skórze. Można wymienić następujące skutki działania promieni UVA i UVB na skórę:

- pojawienie się zmarszczek,
- utrata elastyczności,
- utrata jędrności,
- utrata młodzieńczego wyglądu,
- pojawienie się przebarwień na skórze.

Procesowi starzenia się skóry towarzyszy wzrost grubości warstwy korneocytów. Dla porównania u osoby 18 letniej wynosi ona 1020 μm , a u osoby w 38 roku życia 1080 μm . Testy wykazały, że półroczna kuracja wspomagana ubiquinonem pozwala zredukować grubość warstwy korneocytów [10].

Metody analityczne stosowane w badaniach koenzymu Q_{10}

W literaturze opisano kilka metod za pomocą, których można oznaczyć zawartość formy utlenionej i zredukowanej koenzymu Q_{10} : Analiza tego związku wymaga użycia metody charakteryzującej się wysoką czułością, selektywnością oraz precyzją, szczególnie jeśli oznaczamy zawartość tego związku w płynach ustrojowych takich jak moczu czy surowica krwi.[34]. Obecnie stosuje się takie metody jak:

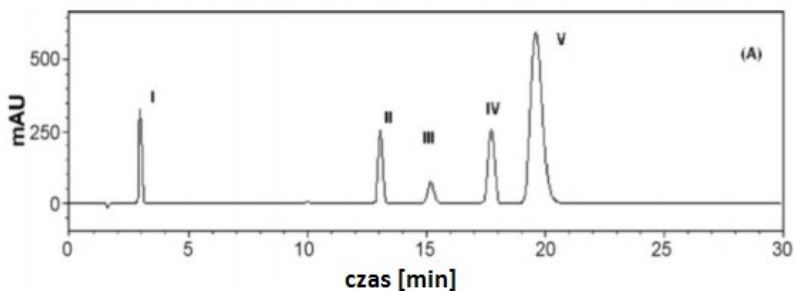
- wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa HPLC,
- spektrometria mas MS,
- spektroskopia UV,
- magnetyczny rezonans jądrowy NMR,
- FT-IR,
- EPR – elektronowy rezonans paramagnetyczny,
- woltametria.

Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (HPLC) należy do najczęściej

stosowanych metod analizy. Użycie odpowiedniego detektora pozwala określić zawartość formy zredukowanej (HPLC z detekcją elektrochemiczną) lub utlenionej (HPLC z detekcją UV). Istnieje również możliwość jednoczesnego oznaczenia obu form koenzymu, wymaga to użycia HPLC z detekcją kulometryczną. Obecnie stosuje się również połączenia chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (HPLC – MS), gdy chcemy oznaczyć zawartość Q_{10} i jego homologów w organizmie.[9]

Do określania zawartości koenzymu Q_{10} w preparatach farmaceutycznych opracowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z niewodną fazą odwróconą (ang. *non-aqueous reversed phase* high performance liquid chromatography, NARP-HPLC), stosując kolumnę Kromasil C8 i mieszaninę acetonitryl-izopropanol 84:16 (v/v) jako fazę ruchomą. Metoda ta umożliwia rozdział i oznaczanie także związków pokrewnych, jak 2,3-dimetoksy-5-metylo-*p*-benzochinon (I), solanesol (II), solanesyloaceton (III) i izodekaprenol (IV), powstających jako produkty uboczne i zanieczyszczenia podczas syntezy i przetwarzania koenzymu Q_{10} . Do identyfikacji tych substancji posłużyła spektrometria mas APCI (ang. *atmospheric pressure chemical ionization*).

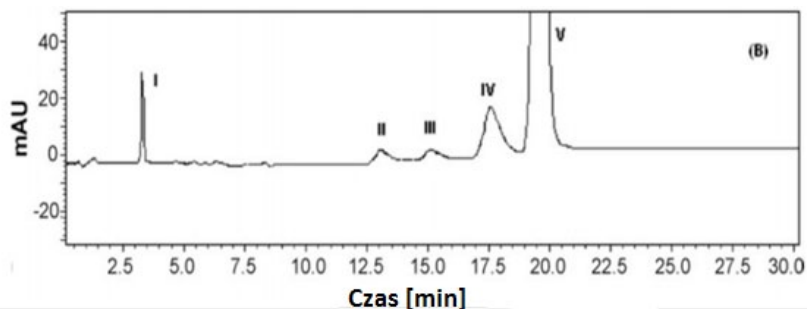
Technika NARP-HPLC (NARP = *non-aqueous reversed phase*) pozwala określić zarówno zawartość jak i stopień czystości otrzymanego związku.[34]. Rysunek 10 przedstawia chromatogram wzorcowego koenzymu Q_{10} (V), do którego dodano badanych substancji pokrewnych (I-IV).



Rysunek 10. Chromatogram Q_{10} (V), domieszkowanego substancjami pokrewnymi (I-IV) [34].

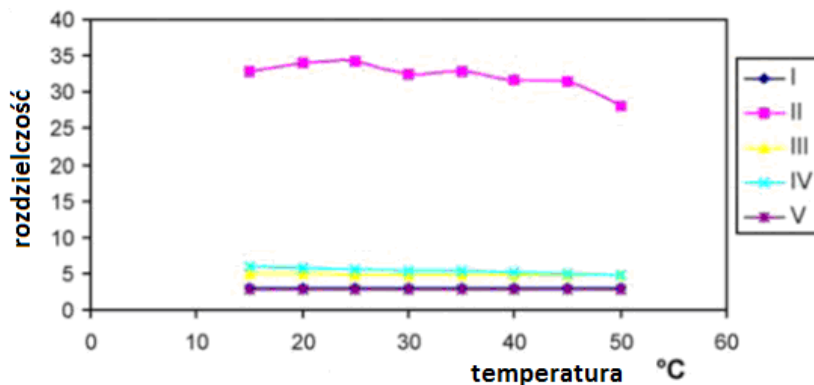
Chromatogram ten posłużył do wyznaczenia czasów retencji poszczególnych składników mieszaniny. Chromatogram NARP-HPLC jednej z formułacji komercyjnych (kapsulek, zawierających koenzym Q_{10}) przedstawiono na rysunku 11. Stężenia substancji pokrewnych koenzymowi Q_{10} (I-IV) były rzędu 0,1-1,0%. Substancje zidentyfikowano przez porównanie uzyskanych czasów

retencji z czasami retencji pojedynczych substancji wzorcowych i przez analizę widm APCI-MS poszczególnych substancji.



Rysunek 11. Chromatogram przykładowego komercyjnego zanieczyszczonego produktu zawierającego Q_{10} (V), domieszkowanego substancjami pokrewnymi (I-IV) [34].

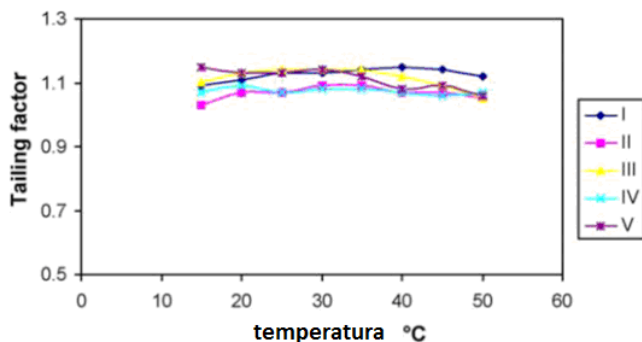
W poszukiwaniu optymalnej metody rozdziálu koenzymu Q_{10} i jego potencjalnych zanieczyszczeń przebadano wpływ temperatury kolumny (w zakresie od 15 do 50° C) na rozdzielczość (rysunek 12) i „ogonowanie” pików (rysunek 13); zbadano też wpływ dodatku alkoholu izopropylowego do fazy ruchomej na czas retencji poszczególnych składników mieszaniny (I-V).



Rysunek 12. Zależność rozdzielczości chromatogramu od temperatury kolumny dla związków** [34].

Do bardzo skutecznych i obecnie powszechnie stosowanych metod oczyszczania ubichinonu należy HSCCC (ang. *High-speed counter*

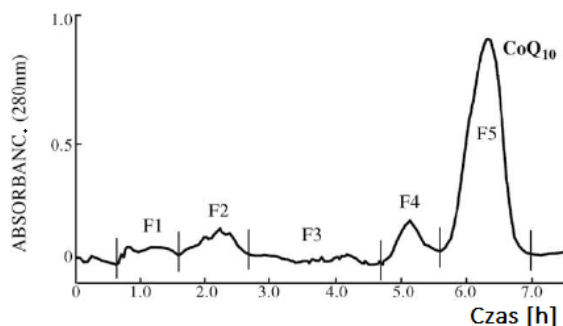
chromatography) Metoda ta – w porównaniu z HPLC – pozwala efektywniej oczyścić badany związek nawet o 14% [19].



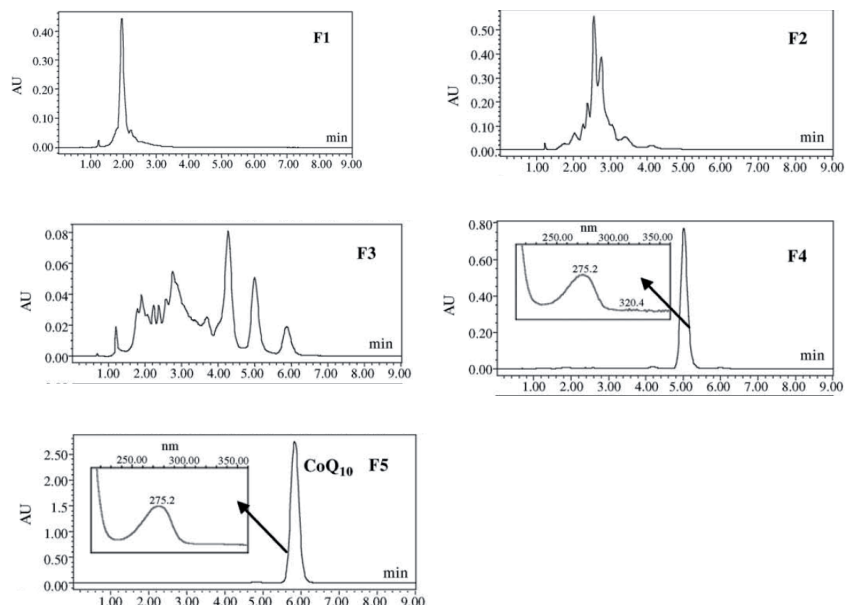
Rysunek 13. Zależność „czynnika ogonowania” (Tailing factor) od temperatury kolumny dla związków ** [34].

Tabela 7. Wyniki oczyszczania ekstraktu zawierającego ubichinon za pomocą HPLC i HSCCC.[19]

	Ekstrakt zawierający Q_{10}	Chromatografia HPLC	Metoda HSCCC
HPLC czystość (%)	89,2	96,0	99,2
Absolutna czystość (%)	29,4	93,3	97,8
Odzysk(%)	-	74,3	88,0
Ilość oczyszczonego produktu (%)	-	23,4	26,4



Rysunek 14. Efekt oczyszczania Q_{10} za pomocą metody HSCCC: Model aparatu: GS10A3, system rozpuszczalników: heptan-acetonitryl-dichlorometan (12:7:3,5, v:v:v)[19].



Rysunek 15. Efekt oczyszczania ekstraktu zawierającego Q₁₀ za pomocą chromatografii kolumnowej HPLC: faza: metanol-etanol (5:95,v:v), długość fali 275nm.[19].

Spektrometria mas w analizie koenzymu Q₁₀

Analiza widm masowych mieszanin, zawierających koenzym Q₁₀, uzyskanych po rozdziale chromatograficznym NARP-HPLC [34] przy zastosowaniu jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) w trybie jonów dodatnich, pozwoliła na nie budzącą wątpliwości identyfikację ubichinonu (V) i jego zanieczyszczeń (I-IV). Na rysunku 16 przedstawiono widma APCI-MS związków, zestawionych w tabeli 8:

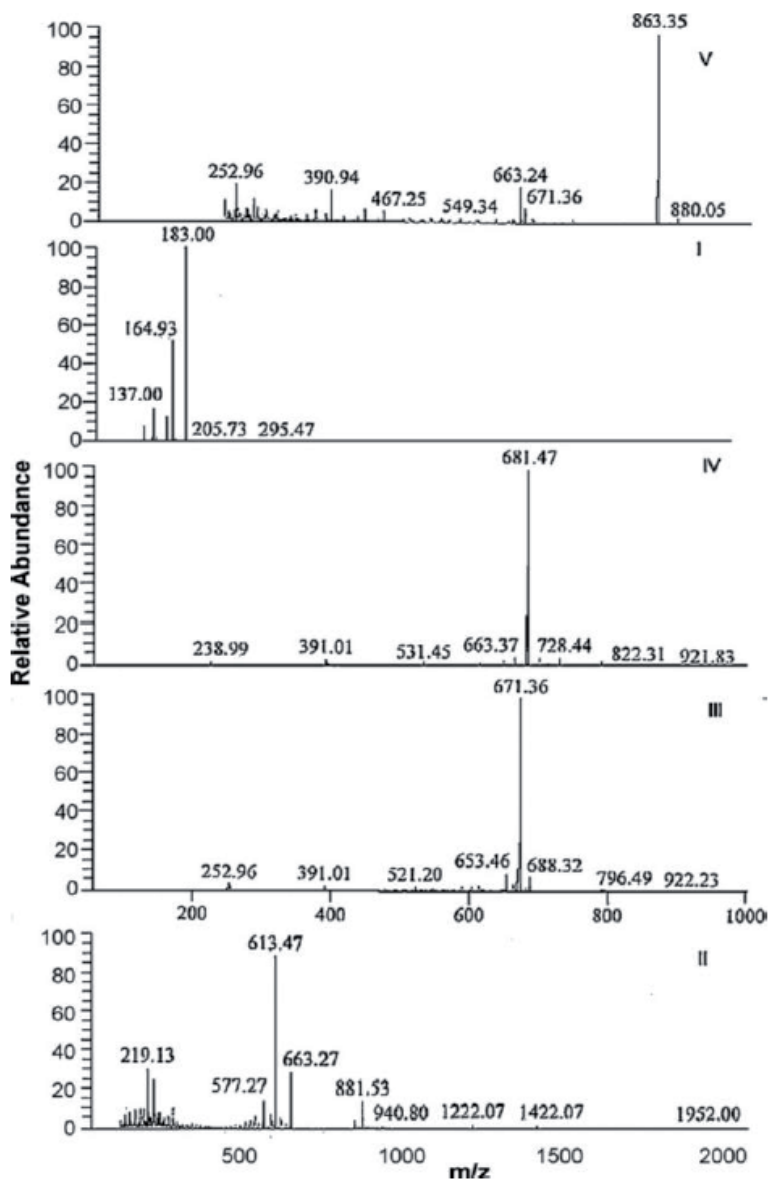
I – 2,3-dimetoksy-5-metylo-*p*-benzochinon – C₉H₁₀O₄, MW = 182, [M+H]⁺ *m/z* 183;

II – solanesol – C₄₅H₇₄O, MW = 630, [M+H-H₂O]⁺ *m/z* 613;

III – solanesyloaceton – C₄₈H₇₈O, MW = 670, [M+H]⁺ *m/z* 671;

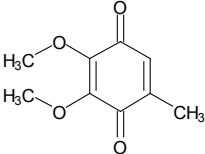
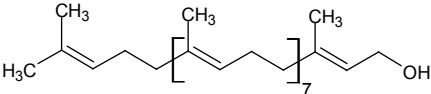
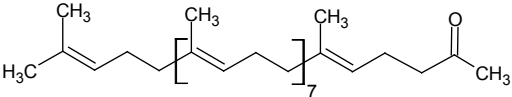
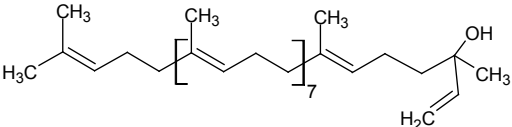
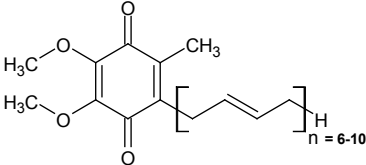
IV – izodekapienol – C₅₀H₈₂O, MW = 698, [M+H-H₂O]⁺ *m/z* 681;

V – koenzym Q₁₀ (ubichinon) – C₅₉H₉₀O₄, MW = 862, [M+H]⁺ *m/z* 863.



Rysunek 16. Widma masowe związków (I-V) *(Tabela 8), otrzymane techniką spektrometrii APCI-MS w trybie jonów dodatnich [34].

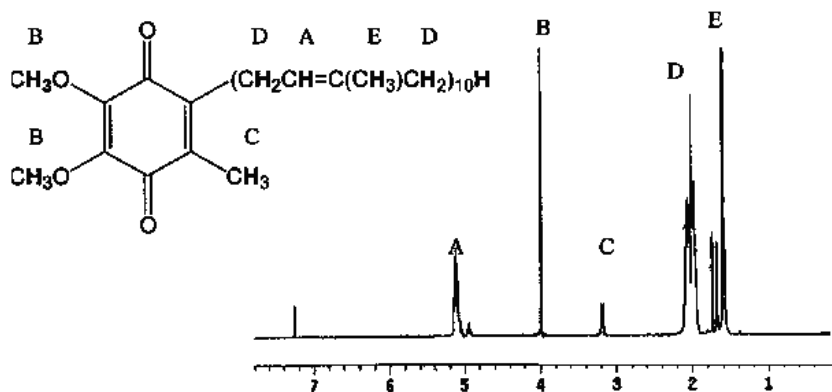
Tabela 8. Zestawienie związków, towarzyszących koenzymowi Q₁₀ w formulacjach komercyjnych, rozdzielonych metodą NARP-HPLC i zidentyfikowanych przy użyciu techniki APCI-MS [34].

**	Nazwa związku	Wzór strukturalny
I	2,3-dimetoksy-5-metylo- <i>p</i> -benzochinon	
II	solanesol	
III	solanesyloaceton	
IV	izodekapienol	
V	koenzym Q ₁₀	

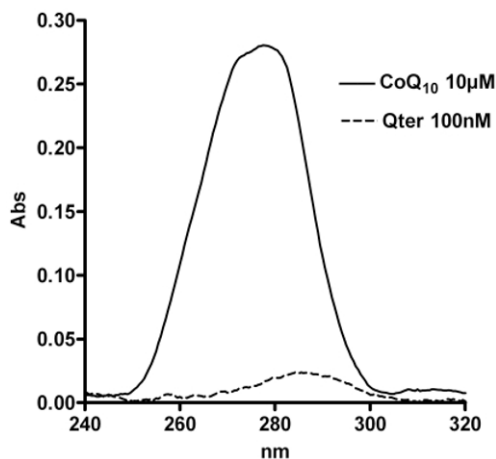
S. S. Kwon [35] i współpracownicy wytwarzali nanocząsteczki polimeru PMMA (poli(metakrylanu metylu)), zawierające koenzym Q₁₀. Używali oni magnetycznego rezonansu jądrowego ¹H do oceny stopnia napełnienia cząstek polimeru ubichinonem, uzyskali też wzorcowe widmo ¹H NMR czystego koenzymu Q₁₀ jako odnośnika (Rysunek 17). Pomiary prowadzono na aparacie Gemini-300BB NMR przy częstotliwości 300 MHz, stosując jako rozpuszczalnik chloroform. Przesunięcia chemiczne mierzono w częściach na milion (ppm) wobec chloroformu jako standardu wewnętrznego ($\delta = 7,26$ ppm).

Podczas rozdzielu produktów syntezy koenzymu Q₁₀ lub analizy komercyjnie dostępnych kapsułek lub tabletek, zawierających ten związek, często stosuje się jako detektory spektrofotometrii UV, dlatego też zarejestrowano wiele widm

wzorcowych ubichinonu w różnych zakresach promieniowania ultrafioletowego [36, 37]. W zakresie długości fal 240-320 nm koenzym Q_{10} w formie chinonowej (utlenionej) posiada maksimum absorpcji dla $\lambda_{\max} = 275$ nm (Rysunek 18), a w formie zredukowanej absorpcja jest znacznie niższa, a $\lambda_{\max}$ przesunęła się w stronę fal dłuższych, do 290 nm.



Rysunek 17. Widmo 1H NMR czystego koenzymu Q_{10} [35]. Rozpuszczalnik $CHCl_3$, aparat Gemini-300BB NMR.



Rysunek 18. Widmo UV koenzymu Q_{10} w formie utlenionej (linia ciągła) i zredukowanej (linia przerywana) w zakresie 240-320 nm. [36].

Podsumowanie

Koenzym Q₁₀ jest związkiem o dużym znaczeniu biologicznym, działającym jako przekaźnik elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym i jako czynnik stabilizujący błony komórkowe. Od czasu jego odkrycia i izolacji przez Crane'a [1] rola tego czynnika w organizmie, a zwłaszcza w szlakach metabolicznych była szczegółowo badana, co doprowadziło do lepszego poznania i zrozumienia mechanizmu działania tego interesującego związku. Wiadomo obecnie, że jest on silnym antyoksydantem, zapobiega uszkodzeniom komórek i chroni je przed zbyt szybkim starzeniem. Koenzym Q₁₀ jest naturalnie syntetyzowany przez organizm i występuje we wszystkich komórkach ludzkich, lecz jego produkcja zmniejsza się z wiekiem. Ubichinon znajdujemy także w żywności, zwłaszcza w mięsie i rybach (tabela 3), ale ulega on znacznej destrukcji podczas obróbki termicznej. Znane jest obecnie zapobiegawcze działanie Q₁₀ w stosunku do wielu chorób i dolegliwości, jak nowotwory, choroby serca i naczyń krwionośnych, choroba Parkinsona i schorzenia układu nerwowego, dlatego też zapotrzebowanie na ten związek jako suplement diety, nutraceutyk i kosmeceutyk stale rośnie. Spowodowało to rozwój metod syntezy i biosyntezy tego związku, a także metod analitycznych, umożliwiających wykrywanie i oznaczanie ilościowe koenzymu Q₁₀ i substancji pochodnych w źródłach naturalnych, produktach syntezy oraz formulacjach farmaceutycznych i kosmetycznych.

Literatura

1. F. L. Crane, Y. Hatefi, R. L. Lester, C. Winder; Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1957; 25; 220–221.
2. D. E. Wolf, C. H. Hoffman, N. R. Trenner, B. H. Arison, C. H. Shunk, B. O. Linn, J. F. McPherson, K. Folkers; Coenzyme Q. I. Structure studies on the coenzyme Q group, *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 4751–4752.
3. P. H. Langsjoen; Introduction to Coenzyme Q10; <http://faculty.washington.edu/ely/coenzq10.html>, dostęp 7.12.2012.
4. A. Mellors, A. L. Tappel; Quinones and quinols as inhibitors of lipid peroxidation; *Lipids*, 1966, 1, 282–284.
5. A. Mellors, A. L. Tappel; The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol; *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 4353–4356.
6. P. Mitchell; The vital protonmotive role of coenzyme Q; W: K. Folkers, G. P. Littarru, T. Yamagami (eds); *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q*, 1991, 6, 3–10, Elsevier, Amsterdam.
7. G. Lenaz, R. Fato, S. Di Bernardo, D. Jarreta, A. Cost, M. L. Genova,

- G. Parenti Castelli; Localization and mobility of coenzyme Q10 in lipid bilayers and membranes; *BioFactors* 1999, 9, 87-93.
8. Z.-R. Huang, Y.-K. Lin, J.-Y. Fang; Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds. Potential uses in cosmetic dermatology; *Molecules* 2009, 14, 540-554.
9. E. Siemieniuk, E. Skrzydlewska; Koenzym Q10- biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmie zwierząt i człowieka; *Postępy Hig. Med. Dośw.* (online), 2005; 59, 150-159.
10. U. Hoppe, J. Bergemann, W. Diembeck, J. Ennen, S. Gohla, I. Harris, J. Jacob, J. Kielholz, W. Mei, D. Pollet, D. Schachtschabel, G. Sauermann, V. Schreiner, F. Stäb, F. Steckel; Coenzyme Q10, a cutaneous antioxidant and energizer; *BioFactors* 1999, 9, 371-378.
11. F. L. Crane; Biochemical functions of coenzyme Q10; *J. Am. Coll. Nutr.*, 2001, 20, 6, 591-598.
12. F.L. Rosenfeldt, S. Pepe, R. Ou, J. A. Mariani, M. A. Rowland, P. Nagley, A.W. Linnane; Coenzyme Q10 improves the tolerance of the senescent myocardium to aerobic and ischemic stress; *Biofactors* 1999, 9, 291-300.
13. R. Willis, M. Anthony, L. Sun, Y. House, G. Qiao; Clinical implications of the correlation between coenzyme Q₁₀ and vitamin B₆ status; *Biofactors* 1999, 9, 359-363.
14. S. Hodges, N. Hertz, K. Lockwood, R. Lister; CoQ10: could it have a role in cancer management, *Biofactors* 1999, 9, 365-370.
15. R. K. Murray, D. K. Granner, V. W. Rodwell; Biochemia Harpera ilustrowana, 2006, 125-134, PZWL.
16. W. Judy, K. Folkers; 8th International Symposium in the Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q10. Stockholm 1993.
17. A. Kumar, H. Kaur, P. Devi, V. Mohan; Role of coenzyme Q10(CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere- like syndrome; *Pharm. Therap.* 2009, 124, 259-268.
18. J. Carper; Cudowne kuracje, Wydawnictwo Vesper, Poznań 2009, 37-48.
19. X.-L. Cao, Y. T. Xu, G.-M. Zhang, S.-M. Xie, Y.-M. Dong, Y. Ito; Purification of coenzyme Q₁₀ from fermentation extract: High-speed counter chromatography versus silica gel column chromatography; *J. Chromatogr. A*, 2006, 1127, 92-96.
20. N. Ba Kien, I.-S. Kong, M.-G. Lee, J. K. Kim; Coenzyme Q10 production in a 150-l reactor by a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides*; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 37, 521-529.

21. J. M. Berg, J. I Tymoczko, J. Stryer; Biochemia, PWN, Warszawa 2009.
22. S. Greenberg, W. Frishman; Co-enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease; *J. Clin. Pharmacol.*, 1990, 30, 596-608.
23. T. Kristian, J. Gertsch., T. E. Bates, B. K. Siesjo; Characteristics of the calcium - triggered mitochondrial permeability transition in nonsynaptic brain mitochondria: effect of cyclosporine A and ubiquinone; *J. Neurochem.*, 2000, 74, 1999-2000.
24. A. M. James, R. A. Smith, M. P. Murphy; Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial coenzyme Q; *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, 423, 47-56.
25. J. Kulbacka, J. Saczko, A Chwilkowska; Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek; *Pol. Merk. Lek.*, 2009, XXVII, 157, 44-47.
26. L. Ernster, G. Dallner; Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function; *Biochem. Biophys. Acta.*, 1995, 1271, 195-204.
27. R. B. Singh, G. S. Wander, A. Rastogi, P. K. Shukla, A. Mittal, J. P. Sharma, S. K. Mehrotra, R. Kapoor, R. K. Chopra; Randomized, double-blind placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in patients with acute myocardial infraction; *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 1998, 12, 347-353.
28. J. Kaikkonen, K. Nyyssonen, E. Porkkala - Sarataho, H. E. Poulsen, T. Metsa- Ketela, M. Hayn, R. Salonen, J. T. Salonen; Effect of oral coenzyme Q10 supplementation on the oxidation resistance of human VLDL + LDL fraction: absorption and antioxidative properties of oil and granule- based preparations, *Free Rad. Biol. Med.*, 1997, 22, 1195-1202.
29. R. B. Singh, M. A. Niaz; Serum concentration of lipoprotein(a) decreases on treatment with hydrosoluble coenzyme Q10 in patients with coronary artery disease: discovery of a new role; *Int. J. Card.*, 1999, 68, 23-29.
30. K. Folkers, M. Morita, J. McRee Jr; The activities of coenzyme Q10 and vitamin B6 for immune responses; *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 88-92.
31. M. F. Beal; Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment; *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2004, 36, 381-386.
32. G.T. Chew, G.F. Watts; Coenzyme Q10 diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the "recoupling" hypothesis; *Q. J. Med.*, 2004; 537-548.
33. F. de Bustos, F. J. Jimenez – Jimenez, J. A. Molina, C. Gomez-

- Escalonilla, C. de Andres, P. del Hoyo, M. Zurdo, A. Tallon- Barranco, A. Berbel, J. Porta- Etessam, G. Parrilla, J. Arenas; Serum levels of coenzyme Q10 in patients with multiple sclerosis; *Acta Neurol. Scand.*, 2000, 101, 209-211.
34. K. Mahendra, Y. L. N. Murthy, C. V. Narasimha Rao, K. Bala Murali Krishna; Determination of ubiquinone Q₁₀ (Coenzyme Q₁₀) and its synthesis related impurities by high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS); *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2011, 3, 3, 1467-1477.
35. S. S. Kwon, Y. S. Nam, J. S. Lee, B. S. Ku, S. H. Han, J. Y. Lee, I. S. Chang; Preparation and characterization of coenzyme Q₁₀-loaded PMMA nanoparticles by a new emulsification process based on microfluidization; *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engin. Aspects* 2002, 210, 95-104.
36. C. Bergamini, N. Moruzzi, A. Sblendido, G. Lenaz, R. Fato; A Water Soluble CoQ₁₀ Formulation Improves Intracellular Distribution and Promotes Mitochondrial Respiration in Cultured Cells; *PLoS ONE* (2012); dostęp online 9.12.2012 na stronie internetowej: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3303850_pone.0033712.g008&query=the&fields=all &favor=none&it=none&sub=none&uniq=0&sp=none&req=4&simCollection=2386514_AHC08008f03&npos=20&ppt=3.
37. J. Karpińska, B. Mikołuc, J. Piotrowska-Jastrzębska; Application of derivative spectrophotometry for determination of coenzyme Q10 in pharmaceuticals and plasma; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 17, 1345-1350.

Rozdział 6

Przeciwutleniacze stosowane w kosmetykach

Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak
*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii,
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań*

1. Rola przeciwutleniaczy w preparatach kosmetycznych

Związkami powszechnie stosowanymi w preparatach kosmetycznych są tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. W postaci czystej lipidy są substancjami bezbarwnymi i bezwonnymi, jednak obecność w ich strukturze wiązań nienasyconych powoduje, że cechuje je dość niska odporność na utleniające działanie czynników biologicznych i fizykochemicznych. W celu zabezpieczenia kosmetyków, jak i surowców tłuszczowych stosowanych do ich produkcji przechowuje się je w niskich temperaturach, bez dostępu tlenu i światła. W preparatach kosmetycznych, szczególnie tych na bazie emulsji, procesy oksydacyjne mogą przebiegać na granicy faz olej/woda. Zapobieganie takim zmianom jest niezwykle istotne gdyż stabilizacja częściowo zjelczalej emulsji nie jest już możliwa. Nie można jej też w żaden sposób zabezpieczyć przed dalszym jęlczeniem [1, 2].

Zmiany w konsystencji, barwie a także w zapachu preparatów kosmetycznych zawierających fazę tłuszczową mogą być inicjowane zarówno przez mikroorganizmy, enzymy jak i podwyższoną temperaturę oraz dostęp tlenu i światła. Działanie mikroorganizmów prowadzi do uwalniania się kwasów tłuszczowych, aldehydów oraz ketonów powodujących powstawanie nieprzyjemnej woni. Szczególnie duży problem stanowią metyloketony, gdyż to właśnie ta grupa związków jest odpowiedzialna za powstawanie nieprzyjemnego zapachu zjelczalego tłuszczu. Łatwość z jaką tłuszcze ulegają działaniu mikroorganizmów sprawia, że kluczowe staje się zastosowanie w preparatach kosmetycznych odpowiednich substancji, które zapobiegać będą temu niekorzystnemu zjawisku [3]. Z kolei obecność enzymów z grupy lipaz prowadzi do rozszczepiania wiązań estrowych w lipidach, czyli do tzw. procesu lipolizy. Można temu zapobiec m.in. poprzez termiczną inaktywację enzymów w temperaturze nie przekraczającej 70°C. Również czynniki fizykochemiczne

takie jak: powietrze, światło czy podwyższona temperatura mogą powodować degradację tłuszczów. Ochronę przed działaniem ww. czynników na tłuszcze zawarte w preparatach kosmetycznych zapewniają substancje nazywane przeciwutleniaczami.

Przeciwutleniacze (inaczej antyutleniacze lub antyoksydanty) to związki chemiczne, których działanie opiera się na spowolnieniu procesów oksydacyjnych tłuszczów zachodzących pod wpływem zewnętrznych czynników fizykochemicznych lub na skutek obecności mikroorganizmów. Antyutleniacze opóźniają procesy starzenia wyrobów kosmetycznych zarówno podczas ich używania, jak i przechowywania. W praktyce już niewielkie ilości antyutleniacza (0,001-0,01% wag.) mogą dezaktywować wolne rodniki, a tym samym zatrzymać łańcuchowy proces utleniania węglowodorowych łańcuchów tłuszczowych [4].

Stosowane w kosmetykach antyoksydanty powinny cechować się wysoką skutecznością i trwałością, a co za tym idzie, powinny być aktywne już w niewielkich stężeniach i przez długi okres czasu. Niezwykle istotne jest aby były nietoksyczne i bardzo dobrze tolerowane przez skórę. Związki te nie mogą wykazywać reaktywności w stosunku do innych składników, a ponadto muszą dobrze rozpuszczać się w podłożu preparatu [1, 4].

Spośród dość szerokiej gamy antyoksydantów stosowanych we współczesnych produktach kosmetycznych wyróżnić można trzy podstawowe grupy [1]:

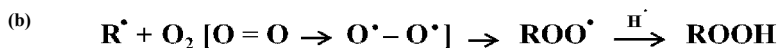
1. Antyoksydanty wylapujące już powstałe rodniki. Na skutek ich działania tworzone są nie reagujące z tlenem rodniki o wyraźnie mniejszej aktywności. Do tej grupy przeciwutleniaczy zalicza się m.in.:
 - tokoferole,
 - karoteny,
 - kwas nordihydrogwasjeretowy (NDGA),
 - estry kwasu galusowego, np. galusan propylu oraz dodecylu,
 - *tert*-butylofenole.
2. Antyoksydanty o charakterze reduktorów. Dzięki łatwości z jaką mogą oddawać elektrony, ich reakcja z tlenem jest zdecydowanie bardziej preferowana aniżeli utlenianie składników lipidowych z podłoża preparatu. Tego typu przeciwutleniaczem jest m.in. kwas askorbinowy i jego pochodne.
3. Substancje działające synergistycznie. Pomimo tego, że synergenty same nie wykazują działania antyoksydacyjnego, wspomagają funkcje klasycznych przeciwutleniaczy, kompleksując jony metali ciężkich, które działają jako katalizatory w procesach utleniania. Do tej grupy

przeciwutleniaczy zalicza się np.:

- kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) i jego sole,
- niektóre hydroksykwasy (kwas cytrynowy i winowy) oraz ich sole,
- kwas fosfonowy.

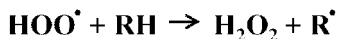
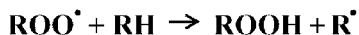
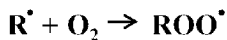
Jak już wspomniano, lipidy obecne w preparatach kosmetycznych narażone są na jęłczenie. Utlenianie tłuszczów odbywa się na drodze autooksydacji, czyli powolnych, samorzutnych reakcji rodnikowych z udziałem tlenu, które mogą przebiegać już w temperaturze pokojowej. Proces ten inicjowany jest przez światło i może być dodatkowo katalizowany nawet przez śladowe ilości jonów metali ciężkich (miedzi, żelaza, kobaltu, manganu, chromu), zdolnych do przemian oksydacyjno-redukcyjnych z przeniesieniem elektronu [5].

Autooksydacja cząsteczki związku organicznego rozpoczyna się od wytworzenia pod wpływem kwantu promieniowania ($h\nu$) odpowiedniego rodnika (rys. 1a), który w dalszym etapie inicjuje powstawanie alkilowodoronadtlenków (rys. 1b).



Rysunek 1. Powstawanie alkilowodoronadtlenków na drodze autooksydacji

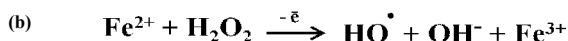
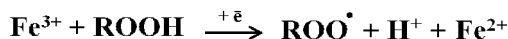
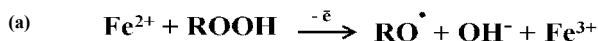
Utworzone alkilowodoronadtlenki ROOH są związkami nietrwałymi, a ich rozpad zapoczątkowuje łańcuchową reakcję z ponownym udziałem substratu (RH) i tlenu (rys. 2). Reakcje łańcuchowe będą aż do wyczerpania się któregoś z substratów.



Rysunek 2. Reakcje łańcuchowe zapoczątkowane przez alkilowodoronadtlenki

Łańcuch przemian autooksydacyjnych może być dodatkowo wspomagany przez działanie katalityczne kationów metali ciężkich, które wykazują zdolność

do przemian redoks. Przykładem takiego metalu jest żelazo, którego jony Fe^{2+} oraz Fe^{3+} dość łatwo mogą oddawać i przyjmować jeden elektron, podtrzymując proces autooksydacji zarówno poprzez reakcję z alkilowodronadtlenkiem (rys. 3a), jak i przez rozkład powstającego nadtlenu wodoru (rys. 3b).



Rysunek 3. Działanie katalityczne jonów żelaza w procesie autooksydacji

Utworzone w wyniku tych procesów wolne rodniki ($\text{RO}^\bullet$, $\text{ROO}^\bullet$, $\text{HO}^\bullet$) ulegają włączeniu do zainicjowanego już wcześniej przez $h\nu$, RH i O_2 łańcucha przemian autooksydacyjnych [5].

Autooksydacja to zjawisko wyjątkowo niekorzystne, zwłaszcza w odniesieniu do leków, środków spożywczych, czy też preparatów kosmetycznych, w których odpowiednie parametry fizykochemiczne mają kluczowe znaczenie. Szczególnie narażone na utlenianie są substancje zawierające reszty nienasyconych kwasów tłuszczowych. Ze względu na to, że wiele preparatów kosmetycznych zawiera w swoim składzie związki nienasycone, stają się one wyjątkowo wrażliwe na procesy autooksydacyjne inicjowane wolnymi rodnikami. Kosmetyki zawierające zjełczałe podłoże tłuszczowe mogą wywoływać uczulenia, podrażnienia skóry lub miejscowe stany zapalne [1].

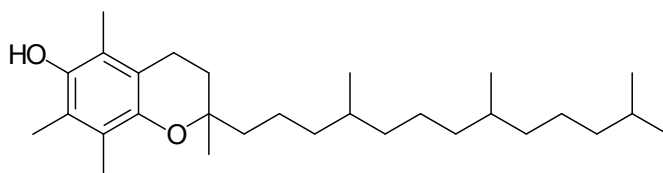
Na działanie wolnych rodników narażone są również lipidy oraz kwasy nukleinowe obecne w organizmie człowieka. Na atak wolnych rodników szczególnie podatne są fosfolipidy (składniki błon komórkowych), które przekształcają się w odpowiednie wodoronadtlenki fosfolipidowe, będące z kolei źródłem rodników alkoksylowych lub szczególnie reaktywnych rodników hydroksylowych. Mechanizmem obronnym organizmu przeciwko endogennym wolnym rodnikom są odpowiednie układy enzymatyczne, zawierające m.in. dysmutazę nadtlenuową. Ponadto, funkcję wewnątrzustrojowych przeciwutleniaczy spełniać może rozpuszczalna w tłuszczach witamina E (tokoferol) oraz rozpuszczalna w wodzie witamina C. Zdolność do dezaktywacji wolnych rodników przypisuje się również β -karotenowi, glutationowi, cysteinie, genisteinie, kwasowi α -liponowemu, oraz koenzymowi Q o budowie zbliżonej do tokoferolu [2, 5]. Niedobór antyoksydantów w organizmie stymuluje

powstawanie i gromadzenie się wolnych rodników, które przyspieszają procesy starzenia się. Zaburzenia równowagi organizmu w kierunku stanu prooksydacyjnego, określane mianem stresu oksydacyjnego, powodują nagromadzenie wolnych rodników. Dermatolodzy mają dzisiaj możliwość zapobiegania uszkodzeniom skóry przez używanie kosmeceutyków (stosowanie miejscowo antyoksydantów w formie kosmeceutyków, tj. kosmetyków o działaniu leczniczym), a w szczególności nutriceutyków (suplementów diety, które dają możliwość doustnego podawania antyoksydantów).

2. Wybrane przeciwutleniacze stosowane w kosmetykach

Witamina E

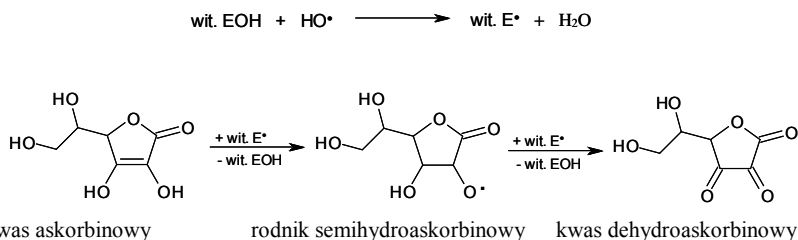
Witamina E jest głównym przeciwutleniaczem występującym w komórkach. Pod pojęciem witaminy E mieści się grupa organicznych związków chemicznych wywodzących się z dwupierścieniowego szkieletu (6-chromanolu) z przyłączonym łańcuchem bocznym, który tworzą trzy jednostki izoprenowe. W skład tej grupy wchodzi tokoferole o nasyconym łańcuchu bocznym oraz tokotrienole, które posiadają łańcuch boczny z trzema wiązaniami podwójnymi. Zarówno wśród tokoferoli jak i tokotrienoli wyróżnia się 4 formy: α (stosowana także w przemyśle spożywczym pod nazwą E307), β , γ (w przemyśle spożywczym jako E308) i δ (E309), różniące się liczbą podstawników metylowych w pierścieniu fenylowym [1, 6]. Najczęściej spotykaną w przyrodzie i jednocześnie najbardziej czynną biologicznie formą witaminy E jest α -tokoferol (rys. 4).



Rysunek 4. Wzór chemiczny α -tokoferolu

Aktywność biologiczna tokoferoli związana jest przede wszystkim z łatwością reagowania z wolnymi rodnikami. Oddziaływania te zachodzą dzięki obecności w pierścieniu chromanolowym grupy hydroksylowej, która pozwala cząsteczce tokoferolu przekształcić się w formę rodnikową, z jednoczesnym wytworzeniem cząsteczki wody. Powstająca forma rodnikowa witaminy E jest następnie regenerowana do postaci wyjściowej przez kwas askorbinowy (rys. 5) lub ulega utlenieniu do formy łatwo usuwalnego metabolitu. Mechanizm

ten bardzo wydajnie chroni cząsteczki organiczne przed atakiem np. niezwykle reaktywnego rodnika hydroksylowego [1, 5].



Rysunek 5. Schemat regeneracji formy rodnikowej witaminy E zachodzącej w obecności kwasu askorbinowego

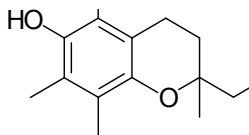
Tokoferole są substancjami oleistymi, mieszającymi się dobrze z rozpuszczalnikami organicznymi i tłuszczami, co dodatkowo predestynuje je do zastosowań w preparatach kosmetycznych, a szczególnie w tych, które zawierają reszty nienasyconych kwasów tłuszczowych, związki karotenowe lub witaminę A. Przykładem może być stosowany w kosmetykach do pielęgnacji skóry i włosów olej sojowy, który charakteryzuje się znaczną zawartością trójglicerydów bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe (51% kwasu linolowego oraz 25% linolenowego) i jednocześnie jest doskonałym rozpuszczalnikiem witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Stabilizacja oleju sojowego następuje już poprzez dodanie 0,4% wag. tokoferolu [5, 7].

Witamina C

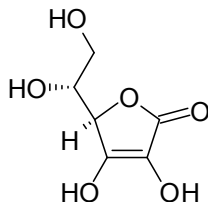
Witamina C (kwas askorbinowy, stosowany także w przemyśle spożywczym pod nazwą E300, rys. 6) należy do grupy witamin rozpuszczalnych w wodzie. Pełni zasadnicze funkcje w procesach redoks zachodzących w ludzkim organizmie, a jednocześnie jest często stosowanym stabilizatorem preparatów kosmetycznych, których składniki mogą ulegać utlenieniu. Związek ten w obecności czynników utleniających bardzo łatwo przekształca się w kwas dehydroaskorbinowy (rys. 5), nie dopuszczając do utleniania innych substancji. Proces ten jest odwracalny, ale pod warunkiem, że nie nastąpi otwarcie pierścienia laktonowego. W preparatach kosmetycznych stężenie witaminy C w roli przeciwutleniacza zazwyczaj zamyka się na poziomie 0,05% wag. [1].

Witamina C nie może być bezpośrednio stosowana do stabilizacji fazy olejowej wyrobów kosmetycznych, gdyż nie rozpuszcza się w tłuszczach.

Możliwe jest jednak przeprowadzenie estryfikacji kwasem palmitynowym, a otrzymany palmitynian askorbylu (ACP) nadaje się doskonale do zastosowania w roli przeciwutleniacza, zarówno w produktach kosmetycznych, jak i w przemyśle spożywczym.



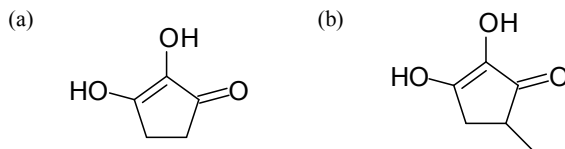
Rysunek 6. Wzór chemiczny kwasu askorbinowego



Rysunek 7. Wzór chemiczny kwasu izoaskorbinowego

Również inne produkty chemicznej modyfikacji cząsteczki kwasu askorbinowego cechują się działaniem antyoksydacyjnym, aczkolwiek substancje tego typu nie wykazują już aktywności biologicznej charakterystycznej dla witaminy C. Związkiem takim jest kwas izoaskorbinowy (rys. 7), stosowany jako przeciwutleniacz w środkach spożywczych (E315). Jednakże jego aktywność biologiczna osiąga poziom zaledwie 8% aktywności niemodyfikowanej witaminy C [5-7].

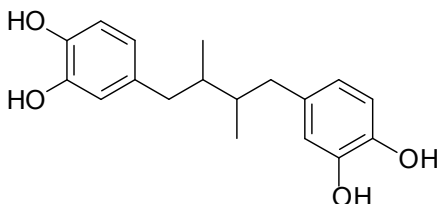
Podobnymi właściwościami i zastosowaniem cechuje się kwas reduktowy (rys. 8a), pozbawiony już zupełnie aktywności witaminowej oraz kwas 5-metyloreduktowy o jeszcze silniejszych właściwościach redukujących (rys. 8b).



Rysunek 8. Wzór chemiczny kwasu reduktowego (a) oraz 5-metyloreduktowego (b)

Kwas nordihydrogwajeretowy

Kwas nordihydrogwajeretowy (NDGA) jest to związek wywodzący się z pirokatechiny, będący naturalnym przeciwutleniaczem (rys. 9). Pozyskiwany jest z dziko rosnącej w pustynnych rejonach USA i Meksyku rośliny *Larrea divaricata*.

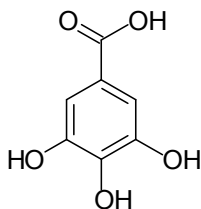


Rysunek 9. Wzór chemiczny kwasu nordihydrogwajeretowego

Mechanizm działania przeciwutleniającego kwasu nordihydrogwajeretowego różni się nieco od tego jaki wykazuje np. tokoferol. Nie jest on typowym „zmiataczem” wolnych rodników, ponieważ jego właściwości wiążą się z blokowaniem lipooksygenazy, czyli enzymu odpowiedzialnego za przekształcanie nienasyconych łańcuchów alkilowych w odpowiednie alkilohydroperoksyd [8]. NDGA jako antyoksydant stosowany jest nie tylko w preparatach kosmetycznych, ale również w produktach spożywczych. Najczęściej spotykany jest pod nazwą handlową masoprocól, CHX-100 lub Actinex [5].

Estry kwasu galusowego

Estry kwasu galusowego (3,4,5-trihydroksybenzoesowego) są powszechnie stosowanym przeciwutleniaczem fazy olejowej preparatów kosmetycznych. Do stabilizacji tłuszczów, olejów i emulsji kosmetycznych wykorzystuje się zarówno estry z alkoholami niskocząsteczkowymi (C_1 - C_3 , np. galusan propylu stosowany także w przemyśle spożywczym pod nazwą E310), jak i tłuszczowymi (np. galusan oktylu, w przemyśle spożywczym oznaczany jako E311 oraz galusan dodecyli – E312). Rozpuszczalność galusanów w tłuszczach rośnie wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu. Warto również wspomnieć, że estry kwasu galusowego z alkoholami długłańcuchowymi wykazują obok działania antyoksydacyjnego również znaczną aktywność przeciwgrzybiczną. Wadą tej grupy przeciwutleniaczy jest powodowanie nieestetycznego żółtego zabarwienia preparatów kosmetycznych, zwłaszcza w obecności kationów metali ciężkich.

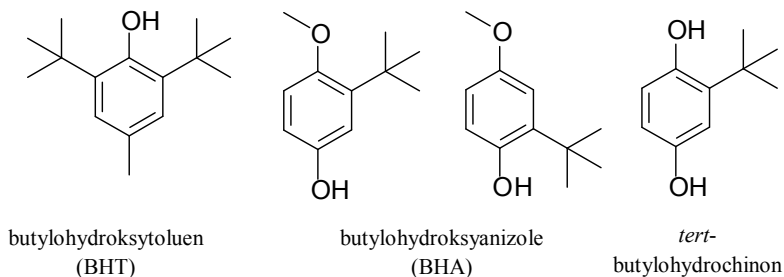


Rysunek 10. Wzór chemiczny kwasu galusowego

Antyoksydanty na bazie kwasu galusowego w wyrobach kosmetycznych dopuszczalne są w stężeniach wagowych od 0,005 do 0,01%. Dostępne są pod nazwami handlowymi Progalline, Nipagalline, Tenox, zawierającymi odpowiednie rozszerzenie, które odnosi się do grupy estrowej, np. ester propylowy kwasu galusowego znany jest jako Progalline P lub Tenox PG [5].

Tert-butylofenole

Tert-butylofenole należą do grupy syntetycznych antyutleniaczy, z których najczęściej stosowanymi w preparatach kosmetycznych są: butylohydroksytoluen (BHT), butylohydroksyanizol (BHA) oraz tert-butylohydrochinon (rys. 11).



Rysunek 11. Wzory chemiczne przeciwutleniaczy z grupy tert-butylofenoli

Butylohydroksytoluen, czyli 2,6-di-tert-butylo-4-metylofenol, należy do antyoksydantów rozpuszczalnych w tłuszczach, ale nie mieszających się z wodą i gliceryną. Może być wykorzystywany do stabilizacji substancji tłuszczowych zarówno pochodzenia zwierzęcego, jak i roślinnego. Jego skuteczność w kosmetykach gwarantują już stężenia na poziomie 0,005-0,01% wag. Butylohydroksytoluen, stosowany także w przemyśle spożywczym pod nazwą E321, dostępny jest pod wieloma nazwami handlowymi, np. jako BHT, Butylated Hydroxytoluene, Impruvol, Tenox BHT. Może występować także

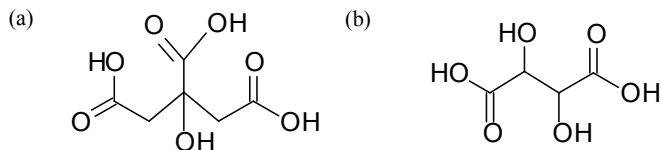
jako składnik przeciwutleniaczy złożonych, gdzie obok związków z grupy *tert*-butylofenoli stosuje się związki kompleksujące kationy metali ciężkich.

Butylohydroksyanizol (2- lub 3-*tert*-butylo-4-metoksyfenol, w przemyśle spożywczym pod nazwą E320) to związek nierozpuszczalny w wodzie, który za to doskonale rozpuszcza się w alkoholach, olejach i tłuszczach. W artykułach kosmetycznych może być stosowany samodzielnie (dopuszczalne stężenie to 0,01-0,02% wag.), a także w połączeniu z estrami kwasu galusowego lub związkami kompleksującymi kationy metali ciężkich. Butylohydroksyanizol dostępny jest w handlu m.in. jako BHA, Butylated Hydroxyanisole, Embanox, Tenox BHA. Stosowany jako konserwant i przeciwutleniacz w kosmetykach od 1947 roku. Należy jednak podkreślić, że w ostatnim czasie pojawiły się doniesienia sugerujące, iż BHA może wykazywać właściwości kancerogenne [5].

Kolejnym antyoksydantem z grupy *tert*-butylofenoli stosowanym w kosmetykach jest *tert*-butylohydrochinon. Jego stężenia w produktach kosmetycznych zazwyczaj nie przekraczają 0,01-0,05% wag. Warto wspomnieć również o tym, iż sam hydrochinon wykazuje bardzo dobre działanie przeciwutleniające, jednak nie jest on dopuszczony do stosowania w kosmetykach ze względu na swoją toksyczność [5].

Związki kompleksujące

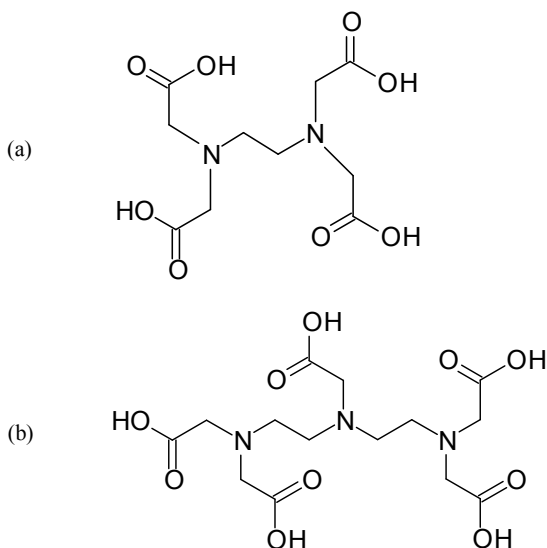
Działanie przeciwutleniające związków kompleksujących opiera się na wiązaniu kationów metali ciężkich w niedysocjujące kompleksy, przez co niweluje się aktywność katalityczną metali w procesie autooksydacji tłuszczów. Działanie tego typu wykazują niektóre hydroksykwy, np. kwas cytrynowy (stosowany także w przemyśle spożywczym pod nazwą E330, rys. 12a) lub winowy (rys. 12b), jak również kwasy poliaminooctowe, czy też pochodne kwasu fosfonowego.



Rysunek 12. Wzór chemiczny kwasu cytrynowego (a) oraz winowego (b)

Szczególnie efektywnym działaniem chelatującym charakteryzują się pochodne kwasów etylenodiaminopoliocetowych. Związki te zawierają w swojej

strukturze atomy tlenu i azotu, które mogą wiązać koordynacyjnie kationy metali, tworząc w ten sposób bardzo trwałe połączenia. Wśród związków tego rodzaju w kosmetykach najczęściej stosowane są: kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA, kwas wersenowy, Havidote), kwas hydrosketyloetylenodiaminotrioctowy oraz kwas dietylenotriaminopentaoctowy (DTPA, kwas pentatowy). Wzory chemiczne wybranych kwasów etylenodiaminopoliocetowych zostały przedstawione na rysunku 13.



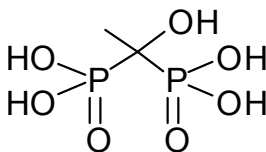
Rysunek 13. Wzór chemiczny kwasu etylenodiaminotetraoctowego (a) oraz kwasu dietylenotriaminopentaoctowego (b)

Kwasy etylenodiaminopoliocetowe jako antyoksydanty stosuje się zazwyczaj w postaci soli sodowych. Przykładowo, kwas wersenowy może być wykorzystywany zarówno w formie soli trisodowej (Limclair, Versene-9, Sequestrene Na₃), jak i tetrasodowej (Trilon B, Questex, Versene, Sequestrene, Komplexon, Calsol). Ze względu na swoje właściwości chelatujące EDTA dodawany jest także do mydeł, ponieważ kompleksując kationy Ca²⁺ oraz Mg²⁺ zmiękcza wodę [5].

Przedstawicielem chelatujących kwasów aminopoliocetowych jest kwas aminotrioctowy, czyli tri(karboksymetylo)amina, który to związek jako antyoksydant spotykany jest w przemyśle kosmetycznym w postaci soli

trisodowej, o nazwie handlowej Trilon A lub NTANa_3 . Związek ten dodawany jest również do środków piorących jako biodegradowalny zamiennik fosforanów. Należy jednak zaznaczyć, że pojawiły się doniesienia o możliwych właściwościach nowotworowych tego związku [5].

Zdolność do kompleksowania kationów metali ciężkich wykazują także niektóre pochodne kwasu fosfonowego $[\text{HPO}(\text{OH})_2]$, który może być rozpatrywany jako forma tautomeryczna kwasu fosforowego(III) (rys. 14). Z tej grupy związków w produktach kosmetycznych najczęściej stosuje się formy sodowe tris(fosfonometylo)aminy oraz kwasu 1-hydroksyetano-1,1-difosfonowego (EHDP). Substancje te wykorzystywane są nie tylko jako środki wspomagające działanie antyoksydantów, ale również jako regulatory twardości wapiowej wody [5, 9].



Rysunek 14. Wzór chemiczny kwasu 1-hydroksyetano-1,1-difosfonowego

Spośród skutecznych antyoksydantów wymieniany jest także kwas chlorogenowy, obecny w ekstrakcie z zielonych, niefermentowanych ziaren kawy (*Coffea Robusta L.*) [10]. Związek ten wiąże jony żelaza, dzięki czemu tracą one zdolność generowania rodnika hydroksylowego, co prowadzi do ograniczenia procesu peroksydacji lipidów i protein. Zapobiega on także uszkodzeniom DNA zachodzącym pod wpływem światła słonecznego. Na uwagę zasługuje także ekstrakt z owoców *Phyllanthus emblica* o silnych właściwościach antyoksydacyjnych. Głównymi składnikami tego układu są taniny Emblicana A i B, które podobnie jak kwas chlorogenowy, są doskonałymi środkami chelatującymi jony żelaza i miedzi [11].

Inne przykłady

Obok omówionych powyżej grup związków, w ostatnim czasie pojawiły się także doniesienia literaturowe o antyoksydacyjnym działaniu olejków eterycznych. Wśród nich udowodnioną aktywnością cechowały się olejki lawendowe, miętowe oraz olejek z tymianku [12-14]. Badania wykazały, że olejki eteryczne mogą odgrywać ważną rolę w zmniejszaniu uszkodzeń oksydacyjnych, a co za tym idzie, mogą stanowić potencjalne przeciwutleniacze

w produktach kosmetycznych.

Do nowoczesnych antyoksydantów zalicza się także flawonoidy (sylibina, syldianina, sylichrystyna, genisteina, daidzeina), karotenoidy (α - i β -karoten, likopen, luteina), katechiny oraz polifenole (kwasy fenolowe), a w grupie tych ostatnich zwłaszcza OPC – oligomeryczne proantocyjanidyny. Oligomeryczne proantocyjanidyny wykazują mocniejsze działanie wobec niektórych rodników, np. są 50 razy silniejsze od witaminy E i 20 razy od witaminy C. OPC nie są pojedynczym związkiem roślinnym, ale stanowią połączenie około 40 różnych bioflawonoidów. Działają synergistycznie i kompleksowo, mimo że każda z substancji wchodzących w skład grupy OPC ma nieco inne zadanie i właściwości. Najczęstszym źródłem OPC są: kora sosny śródziemnomorskiej, pestki winogron, zielona herbata, borówka, miłorząd japoński i czerwone wino [15].

3. Podsumowanie

Antyoksydanty chronią sam preparat kosmetyczny przed degradacją spowodowaną czynnikami fizycznymi (światło, podwyższona temperatura) oraz chemicznymi (tlen z powietrza, wolne rodniki). Tłuszcze roślinne i zwierzęce, które wchodzą w skład kosmetyków, reagują z tlenem już w temperaturze pokojowej – reakcję inicjuje światło oraz śladowe ilości metali ciężkich. Zadaniem antyutleniaczy jest opóźnienie procesu jęlczenia (oksydacji) fazy tłuszczowej kosmetyku podczas jego przechowywania i użytkowania. Dodatkowo antyoksydanty, przeciwdziałając wolnym rodnikom, zajmują bardzo ważne miejsce wśród wielu substancji aktywnych stosowanych przez przemysł kosmetyczny, a mających na celu zapobieganie uszkodzeniom skóry i opóźnianie procesów jej starzenia. Stosowane miejscowo przeciwutleniacze stanowią ważne zagadnienie w badaniach nad kosmeceutykami, jednak będzie ono przedmiotem odrębnego opracowania.

Literatura

1. A. Marzec „Chemia Kosmetyków”, Wydawnictwo Dom Organizatora, Toruń, 2009
2. H. Puznanowska-Tarasiewicz, A.Z. Wilczewska „Podstawy chemii kosmetycznej”, Wyższa Szkoła Kosmetologii i Ochrony Zdrowia w Białymstoku, Białystok 2006
3. M. Mrukot „Kosmetologia. Receptariusz”, Kraków 2006
4. J. Dylewska-Grzelakowska „Kosmetyka stosowana”, WSiP, Warszawa 1999

5. W. Malinka „Zarys chemii kosmetycznej”, Volumed, Wrocław 1999
6. S. Bender „Pielęgnacja ciała”, MedPharm Polska, Wrocław 2011
7. E. Fink „Przewodnik po substancjach czynnych i pomocniczych”, MedPharm Polska, Wrocław 2007
8. S. Pillai, B. Costello, S. Bell „Nordihydroguaiaretic acid (NDGA): A powerful antioxidant and anti-inflammatory ingredient for skin care applications”, *Fragr. J.* 34 (7), 61-64 (2006)
9. W.S. Brud, R. Glinka „Technologia kosmetyków”, MA Oficyna Wydawnicza, Łódź 2001
10. W. Mullen, B. Nemzer, B. Ou, A. Stalmach, J. Hunter, M. N. Clifford, E. Combet “The Antioxidant and Chlorogenic Acid Profiles of Whole Coffee Fruits Are Influenced by the Extraction Procedures”, *J. Agric. Food Chem.* 59 (8), 3754–3762 (2011)
11. X. Liu, M. Zhao, J. Wang, B. Yang, Y. Jiang „Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China”, *J. Food Composition and Analysis* 21, 219–228 (2008)
12. I. Bouchra „Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the essential oil of *Lavendula dentate*”, *World J. Chem.* 5 (2), 103-110 (2010)
13. M. Grzeszczuk, D. Jadczak „Estimation of biological value of some species of mint (*Mentha* L.)” *Herba Pol.* 3, 195-199 (2009)
14. I. Ghomi, M. Ebrahimabadi „GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oils and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jasas and its main constituent carvacrol” *Food Chem.* 115 (4), 1524-1528 (2009)
15. Z.D. Draelos, „Kosmeceutyki”, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2011.

Rozdział 7

Konserwanty w kosmetykach

Katarzyna Jagodzińska, Agnieszka Feliczak-Guzik, Izabela Nowak
*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii,
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań*

Wśród surowców kosmetycznych hamujących rozwój mikroorganizmów wyróżnia się dwie podstawowe grupy. Pierwszą z nich stanowią składniki kosmetyków, które oprócz swoich podstawowych własności wykazują mniejszą lub większą aktywność antydrobnoustrojową. Do drugiego segmentu zaliczamy natomiast związki chemiczne dodawane specjalnie w celu zapewnienia stabilności mikrobiologicznej preparatu. I to właśnie one stanowią właściwe środki konserwujące. Ich nazwa wywodzi się od łacińskiego słowa *conservo* czyli zachowuję. Stosowanie konserwantów ma na celu zachowanie kosmetyku w stanie pozbawionym zanieczyszczeń zarówno podczas ich wytwarzania i pakowania, jak również podczas całego okresu użytkowania.

Bezpieczeństwo mikrobiologiczne produktów kosmetycznych należy do fundamentalnych zainteresowań przemysłu kosmetycznego. Konserwanty w preparatach do pielęgnacji skóry używa się w celu zapobiegnięcia ich skażenia przez drobnoustroje patogenne, takie jak bakterie (np. pałeczki) lub grzyby (np. drożdże, pleśnie). Po opuszczeniu linii produkcyjnej preparaty zamknięte w opakowaniu są odpowiednio zakonserwowane dzięki odpowiedniej sterylizacji, jednak już przy pierwszym otwarciu do ich wnętrza dostają się drobnoustroje. Rozwiązaniem tego problemu jest m.in. zastosowanie pojemników jednorazowego użycia, takich jak na przykład ampułki. Jednak w większości przypadków kosmetyki sprzedawane są w pojemnikach wielokrotnego użytku, gdzie niezbędna staje się konserwacja przy pomocy odpowiednich substancji chemicznych.

Dodawanie związków konserwujących nie może zastępować Zasad Dobrej Praktyki Wytwarzania (GMP – ang. *Good Manufacturing Practice*) [1]. Rozwój drobnoustrojów może zależeć od wielu czynników związanych z składem i właściwościami preparatu kosmetycznego, np. pochodzenia biologicznego, właściwościami hydrofobowymi. Środki konserwujące muszą odpowiadać

ściśle określonym wymaganiom, które zostały z góry ustalone z punktu widzenia bezpieczeństwa konsumenta, jak i zachowania odpowiedniej jakości kosmetyku [2, 3]. Należy w tym miejscu podkreślić, że związki konserwujące to jedne z najbardziej kontrowersyjnych składników kosmetycznych, gdyż mogą wywoływać alergie u użytkowników. W związku z tym konieczne jest ograniczenie ich zawartości do minimum, a w szczególności w preparatach dla dzieci.

Wymagania, które muszą spełniać konserwanty kosmetyczne są duże. Przede wszystkim związki te powinny [4]:

- wykazywać nietoksyczność;
- być dobrze tolerowane oraz nie wchłaniane przez skórę i błony śluzowe;
- nie wywoływać podrażnień oraz alergii;
- posiadać szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej;
- nie zakłócać naturalnej równowagi w składzie mikroflory bakteryjnej, występującej saprofitycznie na powierzchni skóry;
- wykazywać stabilność chemiczną oraz dostatecznie dobrą rozpuszczalność w wodzie;
- uwidaczniać skuteczność ich działania konserwującego w możliwie małym stężeniu, zwykle znacznie poniżej 1% wag.

Mechanizm biologicznego działania środków konserwujących polega przede wszystkim na ich denaturującym wpływie na białko drobnoustrojów, bądź związane jest z inaktywacją układów enzymatycznych mikroorganizmów.

Podczas wyboru środka konserwującego dla potrzeb określonego produktu kosmetycznego uwzględnia się przede wszystkim jego przeznaczenie, odczyn pH oraz możliwości synergistycznego lub antagonistycznego współdziałania konserwantu z innymi składnikami preparatu. W celu uzyskania efektu względnie szerokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej stosuje się często kombinację dwóch lub więcej związków o różnych własnościach konserwujących.

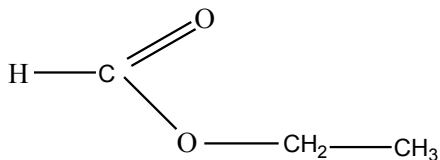
Stosowane w środkach kosmetycznych konserwanty wywodzą się z różnorodnych związków chemicznych. Mając na względzie obecność charakterystycznych grup funkcyjnych w budowie tychże substancji omawiane w tejże monografii konserwanty podzielono na pochodne: kwasów organicznych, aldehydów, alkoholi, fenoli, guanidyny, soli amoniowych oraz związki rtęci [5]. Z kolei inne, w zależności od ich budowy chemicznej, zakwalifikowano np. do związków nieorganicznych, heterocyklicznych itp. Dopuszczalna zawartość w preparacie kosmetycznym omawianych konserwantów kosmetycznych jest cytowana na podstawie danych literaturowych [6-7]. Które z nich wolno stosować, regulują przepisy prawne. W załączniku do obowiązującego rozporządzenia Ministra Zdrowia (Dz. U. z 12.07.2002 Nr 105 poz. 934) znajduje się 55 substancji konserwujących, które można stosować. Są też

substancje, które można dodawać tylko wtedy, gdy po zastosowaniu kosmetyk nie pozostanie na skórze. Pomimo wielu ograniczeń, które powiązane są ze stosowaniem środków konserwujących, nadal powszechny wśród konsumentów jest pogląd o ich szkodliwości. Z tego właśnie powodu, szeroko stosowanym przez producentów chwytem marketingowym, jest podkreślanie braku konserwantów w produkowanych przez nich kosmetykach. Pamiętać jednak należy również o tym, że unikanie środków konserwujących może powodować szybsze psucie się preparatów kosmetycznych, a wtedy ich używanie niesie za sobą ryzyko zakażeń i podrażnień skóry, które to nie ma miejsca w przypadku „tradycyjnych” kosmetyków zawierających konserwanty.

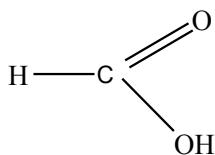
Pochodne kwasów organicznych [4, 8]

Działanie przeciwdrobnoustrojowe powszechnie stosowanych kwasów organicznych związane jest z obniżaniem odczynu pH środowiska preparatu do wartości, które nie sprzyjają rozwojowi drobnoustrojów. Optymalny zakres pH, dla tych związków, mieści się w przedziale od 4,5 do 9,0. Liczba użytecznych konserwantów z grupy kwasów organicznych dla celów kosmetycznych jest bogata, ponieważ związki obniżające wartość pH środowiska mogą wpływać drażniąco bądź żrąco na organizm ludzki. Ze związków takich stosuje się zarówno pochodne kwasów alifatycznych, jak i aromatycznych, zaś w preparatach kosmetycznych konserwanty kwasowe najczęściej występują w roli czynników przeciwgrzybiczych.

Wśród kwasów alifatycznych należy wymienić kwasy: propionowy, 10-undecylenowy, sorbinowy oraz kwas mrówkowy. Pierwsze dwa z ww. oraz ich sole wykazują właściwości bakteriostatyczne oraz przeciwgrzybiczne. Jako konserwanty środków kosmetycznych, kwas propionowy (rys. 1) oraz jego sole, stosowane są w 2% stężeniu. Z kolei kwas 10-undecylenowy i sole tego kwasu używane są w stężeniu 0,2% wag. Kwas 10-undecylenowy oraz jego amidy mogą być w szczególności składnikami przeciwgrzybicznymi artykułów higieny osobistej oraz preparatów przeciwłupieżowych.



Rysunek 1. Wzór strukturalny kwasu propionowego

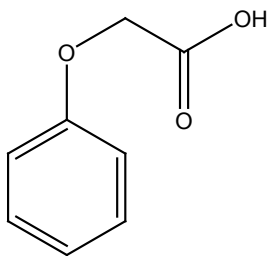


Rysunek 2. Wzór strukturalny kwasu mrówkowego

Również, jako konserwant stosuje się dwunienasycony kwas 2,4-heksadienowy, zwany zwyczajowo kwasem sorbinowym. Kwas ten jest stosunkowo mało toksyczny i oprócz kosmetyki stosowany jest także do konserwacji środków przemysłu spożywczego. Kwas ten wykazuje skuteczność głównie wobec drożdży, jak i pleśni. Do konserwacji preparatów w środowisku alkalicznym zastosowanie znajdują przede wszystkim estry kwasu sorbinowego (etylowy, propylowy, izopropylowy). Niestety kwas sorbinowy jest słabo rozpuszczalny w wodzie, lepiej rozpuszcza się w alkoholu. Dopuszczalne jego stężenie w preparatach kosmetycznych wynosi 0,6% wag.

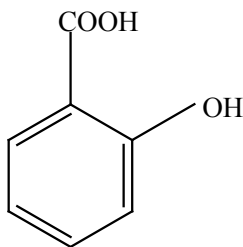
Dopuszczalne stężenie kwasu mrówkowego (rys. 2) stosowanego jako konserwant kosmetyczny, wynosi maksymalnie 0,5% wag. Równocześnie kwas mrówkowy wykazuje właściwości drażniące, co powoduje przekrwienie skóry wykorzystywane w niektórych preparatach kosmetycznych, np. w wodach do włosów stosowanych w celu „odżywienia” i wzmocnienia włosów, jak również do zmniejszenia łojotoku i łupieżu.

Do konserwantów z grupy pochodnych kwasów aryloalifatycznych zalicza się mało toksyczny kwas fenoksyoctowy (rys. 3) posiadający właściwości antyseptyczne i przeciwgrzybiczne. W kosmetyce kwas ten jest składnikiem wód do włosów, twarzy, jak też kwaśnych kremów.



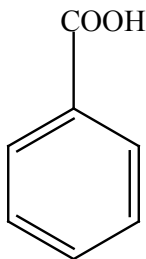
Rysunek 3. Wzór strukturalny kwasu fenoksyoctowego

Kwas salicylowy (rys. 4) jest konserwantem stosowanym w maksymalnym stężeniu 0,5% wag. Nie zalecany jest dla preparatów do pielęgnacji dzieci poniżej trzeciego roku życia. Kwas salicylowy, jako środek antyseptyczny, jest stosowany także w różnych środkach kosmetycznych, np. pudrach, mydlach, spirytusie salicylowym, wodach do twarzy, a także w szamponach przeciwłupieżowych, gdzie równocześnie jest czynnikiem keratolitycznym, tj. rozpuszczającym substancje naturalnie cementujące warstwy martwych komórek. W większym stężeniu od 5 do 20% wag. jest stosowany do usuwania zrogowaceń skóry.



Rysunek 4. Wzór strukturalny kwasu salicylowego

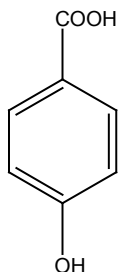
Z kolei do konserwantów kosmetycznych wywodzących się z kwasów aromatycznych należą kwas benzoesowy (rys. 5) oraz jego hydroksypochodne. Kwas benzoesowy wykazuje nie tylko właściwości przeciwbakteryjne, ale także przeciwgrzybiczne. Związek ten już w stężeniu 0,1% wag. jest skutecznym czynnikiem przeciwdrobnoustrojowym w środowisku kwaśnym, zaś w stężeniu około 1% wag. kwas benzoesowy może występować jako łagodny czynnik dezynfekujący, np. w maściach, czy w wodach do ust.



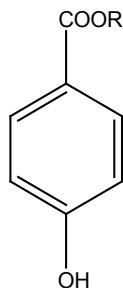
Rysunek 5. Wzór strukturalny kwasu benzoesowego

Kwas 4-hydroksybenzoesowy (PHB, rys. 6) oraz jego sole działają konserwująco już w stężeniu 0,4% wag. Do celów konserwujących stosowane są także estrowe pochodne PHB. Estrы kwasu 4-hydroksybenzoesowego (rys. 7) w środowisku słabo kwaśnym działają przede wszystkim przeciw drożdżom i pleśniam, natomiast są mało skuteczne przeciw bakteriom. Z tego też powodu w preparatach kosmetycznych konserwanty z grupy estrów kwasu PHB występują często w kombinacji z czynnikami o właściwościach przeciwbakteryjnych z grupy fenoksyetanolu, bądź Germallu. Istotną wadą estrów kwasu 4-hydroksybenzoesowych jest również wywoływanie uczuleń, a ponadto są one słabo rozpuszczalne w wodzie. Największe powinowactwo do wody wykazuje ester metylowy, natomiast najslabsze – ester benzylowy.

Dopuszczalne stężenie konserwantów kosmetycznych z grupy estrów kwasu 4-hydroksybenzoesowego wynosi 0,4% wag., a jedynie dla estru benzylowego ono może być wyższe (0,8% wag.). Estrowe pochodne PHB występują także pod innymi komercyjnymi nazwami: Paraben, Aseptiny, Nipaginy.



Rysunek 6. Wzór strukturalny kwasu 4-hydroksybenzoesowego



Rysunek 7. Wzór strukturalny estru kwasu 4-hydroksybenzoesowego

Antybakteryjne działanie parabenów zwiększa się wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego: metyloparaben < etyloparaben < propyloparaben < butyloparaben. Badano przenikalność i zatrzymywanie w skórze trzech popularnych konserwantów (metylo-, etylo-, i propyloparabenu). Stwierdzono, że stopień ich przenikania w małym stopniu zależy od podłoża produktu, głównie natomiast od rozpuszczalności i lipofilności (a więc bezpośrednio od rodzaju konserwantu). Po ośmiu godzinach od aplikacji kremów zawierających każdy z wymienionych parabenów, w skórze obecne było 80%, 40% i 20% danego konserwantu (kolejno metyloparabenu, etyloparabenu i propyloparabenu). Podłoże kosmetyku odpowiedzialne było za zatrzymanie parabenu, nie wpływając na jego przenikającą ilość [9].

Aldehydy [10]

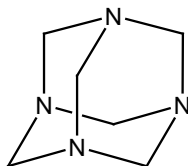
Działanie bakteriobójcze aldehydów jest efektem ich dużej reaktywności chemicznej, albowiem łatwo reagują z wolnymi grupami aminowymi i amidowymi białek (w sposób typowy dla czynników alkilujących) tworząc – poprzez mostki metylenowe – połączenia pomiędzy łańcuchami peptydowymi. defektem takiego zjawiska jest kurczenie się błon komórkowych, wzrost ciśnienia wewnątrzkomórkowego oraz inne nieodwracalne zmiany, które

prowadzą do obumierania komórki. Oprócz tego przyjmuje się, że aldehydy inaktywują enzymy, reagują z kwasami nukleinowymi i działają mutagennie oraz rakotwórczo. Reakcje takie nie są niestety charakterystyczne dla mikroorganizmu i przebiegają również w organizmie człowieka (makroorganizmie). Aldehydy w zetknięciu z materiałem biologicznym, np. białkami czy też surowicą krwi, szybko tracą swą aktywność.

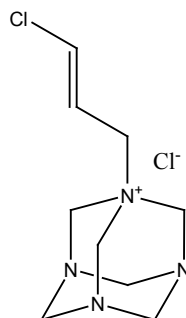
Najczęściej stosowanym konserwantem produktów kosmetycznych z grupy aldehydów jest formaldehyd – aldehyd mrówkowy, HCHO , wykazujący aktywność wobec bakterii i wirusów. Niestety, w związku z barwieniem naskórka, do celów konserwujących nie może być używany aldehyd glutarowy $[\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}]$, który w porównaniu do formaldehydu, jest bezpieczniejszy oraz posiada korzystniejsze właściwości dezynfekujące. Ze względu na fakt iż aldehyd mrówkowy jest gazem o ostrej woni, jest on stosowany jako czynnik konserwujący głównie w szamponach, płynach do kąpieli (w ilościach do 0,2% wag), oraz w artykułach higieny jamy ustnej (maksymalnie 0,1-0,2% wag). Istnieje obowiązek informowania o obecności tego konserwantu jeżeli zawartość w preparacie wynosi ponad 0,05% wag, ponieważ istnieje możliwość wywołania reakcji alergicznych, drażniącego wpływu na skórę i błony śluzowe dróg oddechowych oraz spojówki oczu. Równocześnie formaldehyd hamuje sekrecję gruczołów potowych, co wykorzystuje się w kosmetycznych środkach deodorujących.

W produktach kosmetycznych formaldehyd występuje również w postaci związanej, co jest znacznie wygodniejsze oraz bezpieczniejsze, ze względu na fakt, iż połączenia takie stopniowo uwalniają go. Do związków tego typu należy produkt polimeryzacji formaldehydu – paraformaldehyd (poliformaldehyd, paraform), który jest nie tylko czynnikiem konserwującym, ale również przeciwpotnym i deodorującym. Innym połączeniem formaldehydu jest Metenamina (rys. 8), znana również jako Urotropina. Związek ten ma postać bezbarwnych, drobnych kryształków o słodkawym smaku, rozpuszczającym się dobrze w wodzie oraz w alkoholach. W środowisku wodnym łatwo rozkłada się na amoniak i formaldehyd, stąd też stosuje się ją jako czynnik konserwujący w ilości maksymalnej 0,15% wag. Z kolei pochodną Urotropiny o budowie soli amoniowej jest Dowicil 200 (rys. 9), należący do związków przeciwbakteryjnych, często występujących w artykułach kosmetycznych. Dopuszczalne stężenie Dowicilu 200 w preparatach kosmetycznych wynosi 0,2% wag.

Inne konserwanty kosmetyczne, posiadające właściwości stopniowego uwalniania formaldehydu, zostaną scharakteryzowane podczas omawiania związków heterocyklicznych wywodzących się z imidazolu.



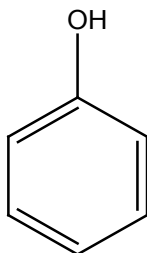
Rysunek 8. Wzór strukturalny Metenaminy



Rysunek 9. Wzór strukturalny Dowicilu
200

Fenole [4, 8]

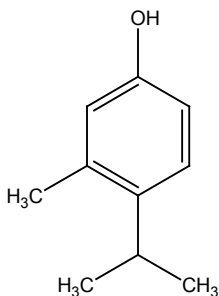
Szczególną pozycję wśród kosmetycznych środków konserwujących zajmują fenole i ich pochodne. Skuteczność działania przeciwdrobnoustrojowego samego fenolu jest punktem odniesienia dla porównywania siły działania innych związków na mikroorganizmy chorobotwórcze. Bakteriobójcze działanie fenolu (rys. 10) oraz jego pochodnych wiąże się z ich zdolnością denaturacji białka bakteryjnego (błony komórkowej). Sam fenol jest używany jako czynnik dezynfekujący w kosmetykach typu mydło i szampony w stężeniu do 1% wag. Pomimo silnych właściwości grzybo- i bakteriobójczych, wykorzystanie fenolu w artykułach kosmetycznych jest mocno ograniczone. Działa on bowiem drażniąco na skórę i błony śluzowe. Ponieważ fenol wchłania się łatwo nawet przez nieuszkodzone powłoki ciała, stąd też bardziej stężone roztwory fenolu mogą wywoływać nekrozę skóry i głębiej położonych tkanek. Z tych właśnie powodów obecność fenolu w artykule kosmetycznym musi być wyraźnie zaznaczona na etykiecie opakowania.



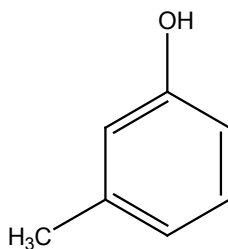
Rysunek 10. Wzór strukturalny fenolu

Obecnie, jako konserwanty kosmetyczne, stosowane są głównie produkty chemicznej modyfikacji cząsteczki fenolu. Nawet alkilofenole są od niego mniej toksyczne, a jednocześnie wykazują bardziej skuteczniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe. Przykładowym konserwantem kosmetycznym z grupy alkilofenoli jest izomer tymolu, 4-izopropylo-3-metylofenol (rys. 11), stosowany optymalnie przy stężeniu 0,1% wag.

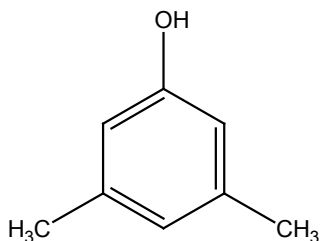
Podstawowe znaczenie, jako czynniki konserwujące i dezynfekujące z grupy związków fenolu, wykazują halogenoalkilofenole oraz pochodne fenolu z podstawnikiem aromatycznym w położeniu orto. Przykładowymi przedstawicielami ostatniej grupy są m-metylofenol (m-krezol, rys. 12) oraz m-dimetylofenol (m-ksylenol, rys. 13). Szczególnie skutecznymi czynnikami konserwującymi i dezynfekującymi są chlorokrezole, które jednak wykazują słabsze działanie drażniące na skórę i błony śluzowe niż sam m-krezol. Kosmetycznymi konserwantami z grupy chlorokrezoli są m.in. PCMC (4-chloro-m-krezol) oraz 4-chloro-6-izopropylo-m-krezol. Związki te są nie rozpuszczalne w wodzie, podczas gdy dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. PCMC, jako konserwant artykułów kosmetycznych, występuje w stężeniu do 0,2% wag, zaś dodatkowo może być również składnikiem dezynfekującym mydeł i preparatów deodorujących. Z kolei 4-chloro-6-izopropylo-m-krezol, czyli 4-chlorotymol, jest głównie stosowany jako silny środek dezynfekujący w pastach do zębów i innych preparatach kosmetycznych adresowanych do higieny jamy ustnej.



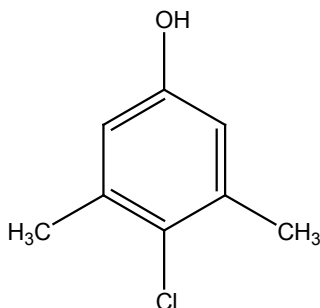
Rysunek 11. Wzór strukturalny 4-izopropylo-3-metylofenolu



Rysunek 12. Wzór strukturalny m-krezolu



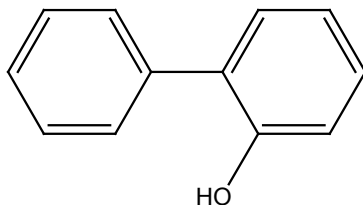
Rysunek 13. Wzór strukturalny
m-ksylenolu



Rysunek 14. Wzór strukturalny
m-dimetylofenolu

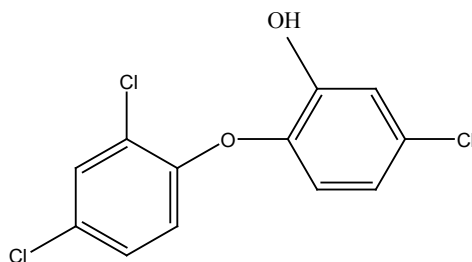
W szczególności z pochodnych m-dimetylofenolu (m-ksylenolu, rys. 14), w kosmetyce wykorzystywane są właściwości przeciwdrobnoustrojowe 4-chloro-3,5-dimetylofenolu. Sam m-dimetylofenol jest substancją rozpuszczalną w olejach i tłuszczach, zaś jego właściwości przeciwdrobnoustrojowe są silniejsze od właściwości fenolu czy krezolu. W preparatach kosmetycznych m-dimetylofenol występuje w stężeniu do 0,5% wag i stosowany jest do konserwowania preparatów zawierających zarówno białka, jak i węglowodany (skrobię). Dodatkowo może być także składnikiem czynnym w dezodorantach, ponieważ jest aktywny wobec bakterii rozkładających wydzielinę potną.

Kolejny środek, o-fenylfenol (Dowicide 1, rys. 15) jest niskotopliwym ciałem stałym, który wprawdzie nie rozpuszcza się w wodzie, ale łatwo rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych. W wodzie natomiast dobrze rozpuszczają się sole tego związku. o-Fenylfenol, w formie wolnej, jak i w postaci soli sodowej (tetrahydrat soli sodowej: Dowicide A, Natriphene) zaliczany jest do konserwantów o właściwościach przeciugrzybiczych, stosowanych przede wszystkim w mydłach, wodach do włosów oraz wodach do ust, gdzie dopuszczalne stężenie wynosi 0,2% wag.



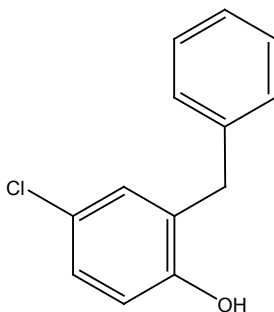
Rysunek 15. Wzór strukturalny o-fenylfenolu

Triclosan, czyli eter 2,4,4'-trichloro-2'-hydroksydifenylowy (rys. 16), występuje pod bardzo wieloma nazwami handlowymi, np. Aquasept, Gamophen, Irgasan DP 300, Sapoderm. Jest to niskotopliwe ciało stałe, które praktycznie nie rozpuszcza się w wodzie, natomiast łatwo rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, olejach roślinnych oraz roztworach alkalicznych. Triclosan wykazuje przede wszystkim właściwości przeciwbakteryjne, ale jest mniej aktywny wobec drożdży i pleśni. Dopuszczalne stężenie Triclosanu w preparatach kosmetycznych wynosi 0,3% wag, przy czym może być on stosowany w artykułach przeznaczonych do pielęgnacji niemowląt i dzieci.

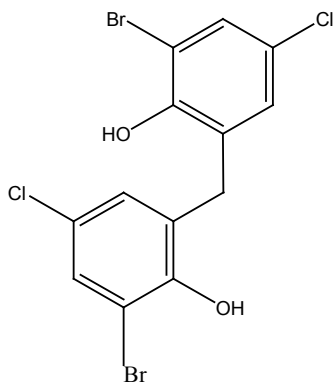


Rysunek 16. Wzór strukturalny triclosanu

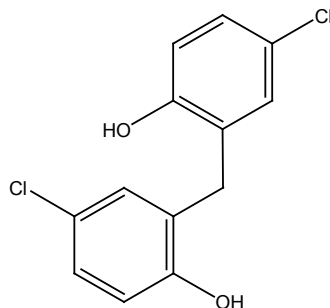
Do kosmetycznych konserwantów wywodzących się z difenylometanu należą także: heksachlorofen, chlorofen (rys. 17), bromochlorofen (rys. 18) oraz dichlorofen (rys. 19).



Rysunek 17. Wzór strukturalny chlorofenu



Rysunek 18. Wzór strukturalny bromochlorofenu



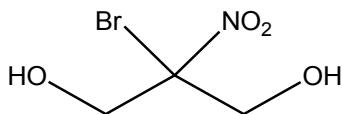
Rysunek 19. Wzór strukturalny dichlorofenu

Heksachlorofen (rys. 17) w produktach kosmetycznych używany jest w dopuszczalnym stężeniu 0,1% wag, z kolei chlorofen-(5-chloro-2-hydroksydifenylometan), jest konserwantem artykułów kosmetycznych, dopuszczonym do stosowania w stężeniu 0,2% wag. Bromochlorofen (rys. 18), czyli 3,3'-dibromo-5,5'-dichloro-2,2'-dihydroksydifenylometan należy do bardzo łagodnych czynników konserwujących oraz dezynfekujących (<0,1%). Bromochlorofen stosuje się w dezodorantach przeznaczonych do higieny osobistej oraz w preparatach do pielęgnacji jamy ustnej i zębów, gdyż jest on dobrze tolerowany przez skórę i błony śluzowe. Dichlorofen (rys. 19), czyli 5,5'-dichloro-2,2'-dihydroksydifenylometan znany jest także jako: G-4, Anthiphen, Dicestal, Didroxane, Diphenthane-70, Parabis, Preventol. Dichlorofen w stężeniu do 0,2% wag jest czynnikiem konserwującym o własnościach przeciugrzybiczych, aktywnym także wobec form

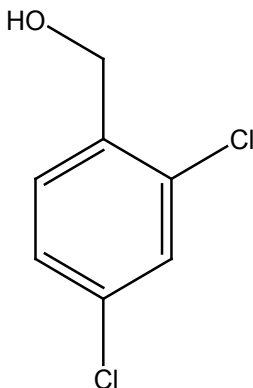
przetrwaliowych, stosowanym w szamponach, mydłach dezodorujących, a także w preparatach przeznaczonych do pielęgnacji stóp.

Alkohole [4]

Właściwości niszczenia drobnoustrojów wykazują głównie alkohole jednowodorotlenowe. Mechanizm biologicznego działania alkoholi związany jest z procesem dehydratacji protein, w efekcie czego dochodzi do zmiany II-rzędowej struktury białek oraz upośledzenia ich funkcji. Alkohole posiadają zdolność niszczenia wegetatywnych form drobnoustrojów oraz znacznej części wirusów. Niestety nie działają na ich formy przetrwalnikowe. Warto podkreślić, że w obrębie rany w przypadkach skaleczeń zauważa się strącanie protein, które tworzą następnie warstwę ochronną przeciw mikroorganizmom. Zwiększa to dodatkowo skuteczność przeciwbakteryjnego działania alkoholi.



Rysunek 20. Wzór strukturalny Bronopolu



Rysunek 21. Wzór strukturalny 2,4-dichlorofenylometanolu

Alkohol etylowy (etanol) w kosmetyce występuje głównie w roli czynnika dezynfekującego, odświeżającego oraz rozpuszczalnika perfumeryjnych olejków eterycznych. Jako związek dezynfekujący stosuje się 50-70% roztwory alkoholu etylowego. Działanie drażniące na błony śluzowe obserwuje się nawet

w przypadku roztworów 30%. Ze względu na wysoką cenę etanolu, do celów kosmetycznych coraz częściej wykorzystuje się izopropanol (2-propanol). Jednakże w porównaniu z etanolem jego właściwości dezynfekujące, toksyczne oraz narkotyczne są znacznie silniejsze. W kosmetyce alkohol ten występuje przede wszystkim w wodach do włosów oraz w preparatach do golenia, należy jednak pamiętać iż powinien charakteryzować się wysoką czystością i nie zawierać izomerycznego 1-propanolu, mającego specyficzną woń. W preparatach kosmetycznych nie jest dozwolone stosowanie alkoholu metylowego (metanolu). Jako konserwanty kosmetyczne stosuje się jedynie pochodne metanolu, etanolu, bądź propanolu. Substancje takie zawierają w łańcuchu węglowym atomy chlorowca lub pierścień aromatyczny. Do kosmetycznych konserwantów typu halogeno alkoholi należą chlorobutanol oraz Bronopol (rys. 20). W szczególności dobrze tolerowanym (w stężeniu do 0,5% wag) przez skórę i błony śluzowe, także oczu, jest chlorobutanol (1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanol), który jest ciałem stałym o kamforowym zapachu. W środowisku słabo kwaśnym chlorobutanol wykazuje aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich oraz pleśni.

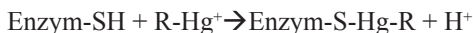
Alkohol aromatyczny – fenylometanol, zwany także alkoholem benzylovym – wpływa hamująco na rozwój drożdży i pleśni oraz ma właściwości przeciwbakteryjne. Jako konserwant produktów kosmetycznych alkohol benzylovym występuje w stężeniu do 1% wag. Halogenopochodną fenylometanolu, o podobnych właściwościach i zastosowaniu w kosmetyce, jest 2,4-dichlorofenylometanol (alkohol dichlorobenzylovym, Dybenal, rys. 21), stosowany w dopuszczalnym stężeniu do 0,15% wag.

2-Fenylotanol czyli alkohol fenetylovym jest konserwantem szczególnie skutecznym przeciw bakteriom Gram-ujemnym. Z kolei fenoksyetanol jest kosmetycznym konserwantem, występującym w wodach do twarzy, w kremach i w szamponach. Alkohol ten jest także stosowany w kombinacji z innymi związkami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (np. solami amoniowymi) w konserwantach złożonych, a także jako repelent. Oba w/w konserwanty fenoksy alkoholowe są stosowane w dopuszczalnym stężeniu do 1% wag.

Związki rtęci [4, 8]

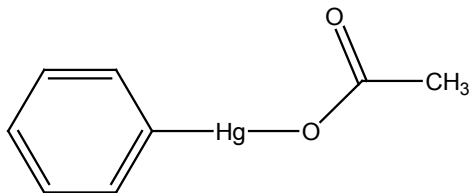
Ze względu na mniejszą tendencję do kumulowania się w organizmie związki organiczne rtęci, w porównaniu z solami nieorganicznymi tegoż pierwiastka, są bezpieczniejsze i dlatego znajdują one zastosowanie w artykułach kosmetycznych. Pełnią one w nich funkcję konserwanta o właściwościach bakterio- i grzybobójczych. W formułacjach kosmetycznych stosuje się połączenia, w których rtęć jest związana z rodnikiem alkilowym lub arylovym. W roztworach wodnych związki te jonizują wytwarzając reaktywny kation

alkilo(arylo)rtęciowy (R-Hg^+), który posiada właściwości blokowania grup tiolowych enzymów i białek drobnoustrojów (rys. 22).



Rysunek 22. Mechanizm blokowania grup tiolowych enzymów przez związki rtęci

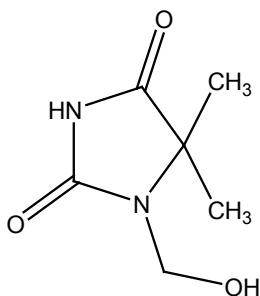
W przemyśle kosmetycznym stosowane są następujące organiczne związki rtęci: tiomersal (Merthiolate, Vitaseptol, Merzonin, Thiomersal)-metalorganiczny związek rtęci, a dokładniej rzecz biorąc sól sodowa kwasu 2-etylortęciotiosalicylowego, octan fenylortęciowy (rys. 23), znany pod nazwami: wolpar (Volpar), Phenylmer-curicAcetate, PMA, PMAC, oraz PMAS. Zaletą organicznych połączeń rtęci jest brak działania drażniącego, nawet w stosunku do błon śluzowych. Dlatego też związki te występują w kosmetykach dekoracyjnych do oczu. Zarówno tiomersal i wolpar stosowane są w dopuszczalnym stężeniu do 0,007% wag, w przeliczeniu na rtęć.



Rysunek 23. Wzór strukturalny wolparu

Związki heterocykliczne [4]

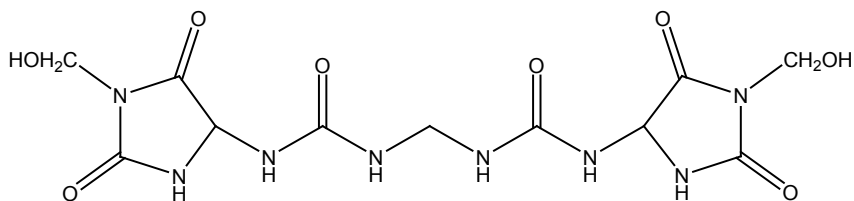
W grupie konserwantów wykorzystywanych w kosmetyce, wywodzących się z połączeń heterocyklicznych, znajdują się przede wszystkim pochodne pięcioczłonowego układu imidazolu, oksazolu oraz tiazolu. Znajdują się tu także połączenia zawierające sześcioczłonowy pierścień dioksanu-1,3, piranu, pirydyny i pirymidyny. Z pochodnych imidazolu używane są 1-hydroksymetylo-5,5-dimetyloimidazolidyno-2,4-dion (MDMH, methyloldimethylhydantoin) (rys. 24) oraz 1,3-bis(hydroksymetylo)-5,5-dimetyloimidazolidyno-2,4-dion.



Rysunek 24. Wzór strukturalny 1-hydroksymetylo-5,5-dimetyloimidazolidyno-2,4-dionu MDMH

Wytlumaczeniem działania przeciwdrobnoustrojowego tych związków jest to, że związki te powoli odszczepiają z grup hydroksymetylowych formaldehyd. W produktach kosmetycznych połączenia te są stosowane w stężeniu do 0,2% wag, w przeliczeniu na aldehyd mrówkowy.

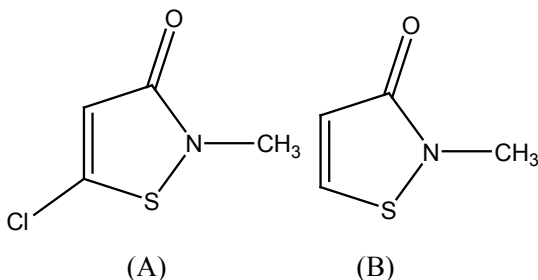
Do grupy substancji konserwujących używanych w przemyśle kosmetycznym, wywodzących się z imidazolu zaliczamy także Germall 115 (1,1-metyleno-bis[3-(3-hydroksymetylo-2,4-dioksimidazolidyn-5-ilo)mocznik]) (rys. 25). Inne komercyjne nazwy tego związku to: Euxyl K 200, Biopure 100, Hydroconserv COS.



Rysunek 25. Wzór strukturalny 1,1-metyleno-bis[3-(3-hydroksymetylo-2,4-dioksimidazolidyn-5-ilo)mocznika] – Germallu 115

Germall 115, ze względu na fakt, iż wykazuje on działanie przeciw bakteriom zarówno Gram-dodatnim jak i Gram-ujemnym w szerokim zakresie pH, jest dość często stosowanym konserwantem. Dodatkowym atutem tego preparatu jest to, że jest on dobrze tolerowany przez skórę i błony śluzowe, w tym również oczu. W preparatach kosmetycznych stosuje się połączenie germallu z kwasem 4-hydroksybenzoesowym (PHB, rys. 6), jako, że posiada on właściwości przeciwgrzybicze.

Kathon CG jest konserwantem zawierającym pięcioczłonowy pierścień izotiazolinowy, jednak związek ten nie jest chemicznie jednorodny, składa on się z 5-chloro-2-metyloizotiazolin-3-onu (wzór A, rys. 26) oraz z 2-metyloizotiazolin-3-onu (wzór B, rys.26), w stosunku 3:1.



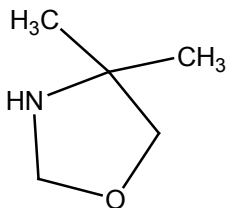
Rysunek 26. Wzory strukturalne wchodzące w skład konserwantu – Kathonu CG (5-chloro-2-metyloizotiazolin-3-onu (wzór A) oraz 2-metyloizotiazolin-3-onu (wzór B))

Kathon CG jest substancją mało toksyczną, dobrze tolerowaną przez skórę i wykazującą szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego w dużym zakresie pH.

Preparat ten stosuje się jako konserwant w produktach takich jak: szampony, kremy oraz płyny i żele do kąpieli. W formulacjach kosmetycznych dopuszczalne stężenie Kathonu CG wynosi 0,003% wag.

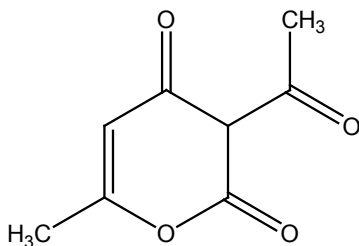
Pod nazwą Kathon (Octhilinone, RH-893) występuje także 2H-2-oktyloizotiazolin-3-on, który jest kosmetycznym środkiem przeciwgrzybiczym, stosowanym m.in. w szamponach.

Skutecznym konserwantem kosmetycznym, w środowisku o pH>6, jest 4,4-dimetylo-1,3-oksazolidyna (rys. 27). Jest to pochodna 1,3-oksazolidyny, której dopuszczalne stężenie wynosi 0,1% wag.



Rysunek 27. Wzór strukturalny 4,4-dimetylo-1,3-oksazolidyny

Kolejną grupą związków heterocyklicznych stosowanych jako konserwanty są połączenia zawierające sześciocłonowe pierścienie z wbudowanymi heteroatomami tlenu. Wyróżniamy w tej grupie związek z jednym wbudowanym atomem tlenu – pierścień piranu, oraz pierścień z dwoma atomami tlenu – pierścień 1,3-dioksanu. 3H-3-acetylo-6-metylo-2,4-piranodion (rys. 28), zwany kwasem dehydrooctowym, jest pochodną piranu, która w artykułach kosmetycznych występuje także pod nazwami handlowymi: DHA, DHS, methylacetopyronone.



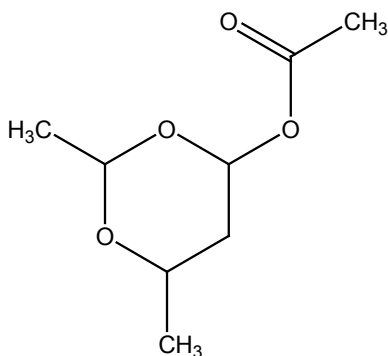
Rysunek 28. Wzór strukturalny 3H-3-acetylo-6-metylo-2,4-piranodionu

DHA łatwo rozpuszcza się w alkoholach, glikolach i olejach roślinnych, słabo zaś w wodzie. Natomiast sól sodowa tego kwasu, mająca formę hydratu (DHA-S), łatwiej rozpuszcza się w wodzie. DHA jest skutecznym środkiem konserwującym zabezpieczającym preparaty kosmetyczne przed pleśniami i drożdżami, przy $\text{pH} < 6$, natomiast posiada on małą aktywność w stosunku do bakterii. W produktach kosmetycznych stosuje się go w stężeniu do 0,6% wag.

Konserwantami zaliczanymi do grupy pochodnych 1,3-dioksanu są także związki występujące pod handlowymi nazwami Dioxin (dioksin) (rys. 29) oraz Bronidox (bronidoks). Inne nazwy dioksinu to: 6-acetoksy-2,4-dimetylo-1,3-dioksan, Dimefhoxane, Giv-Gard DXN oraz acetomethoxane. Dioxin dobrze rozpuszcza się w wodzie (1:15), a także w tłuszczach i olejach. Jest on skutecznym środkiem przeciw bakteriom i pleśniam w stężeniu 0,03-0,1% wag., jednak posiada on potencjalne właściwości nowotworowe, dlatego też jest on tymczasowo dopuszczany do stosowania w produktach kosmetycznych. O właściwości nowotworowe jest również podejrzewany kaptan (Merlan, Captan) czyli N-(trichloro-metylotio)-4-cyklohekseno-1,2-dikarboksymid. Związek ten wykazuje znaczną aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwwgrzybiczą i znajduje zastosowanie w mydłach.

Bronidoks jest substancją krystaliczną, słabo rozpuszczalną w wodzie, dobrze natomiast w etanolu i glikolach. Jest on skutecznym konserwantem (przeciw bakteriom, grzybom i pleśniam) w zakresie pH 5-9 i stężeniu do 0,1%

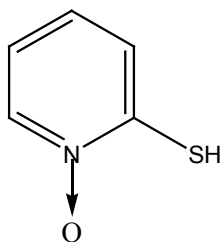
wag. Bronidoks znajduje zastosowanie w płynach do kąpieli oraz szamponach.



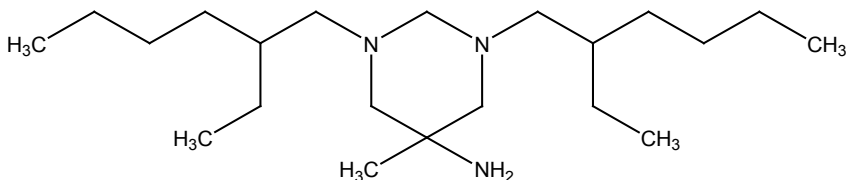
Rysunek 29. Wzór strukturalny 6-acetoksy-2,4-dimetylo-1,3-dioksanu(Dioksinu)

Połączenia wywodzące się z pirydyny i pirymidyny stanowią kolejną grupę środków konserwujących z heterocyklicznym pierścieniem sześciocłonowym. Z grupy połączeń pirydyny są wykorzystywane właściwości przeciwbakteryjne pochodnych N-tlenku 2-hydroksy- lub 2-merkaptopirydyny (rys. 30). N-tlenki pirydyny występują w równowadze tautomerycznej z 1-hydroksy-2-okso(tio)so dihydropirydyną. Powyższe związki wykazują właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Są one stosowane zarówno w formie wolnej, jak i w postaci soli (sodowej, cynkowej, trietanolamoniowej). Dozwolone stężenie soli cynkowej N-tlenku 2-merkaptopirydyny to 0,5% wag., przy czym należy zaznaczyć, iż sól ta nie może być używana do konserwacji preparatów przeznaczonych do pielęgnacji jamy ustnej. W formulacjach kosmetycznych N-tlenek 2-merkaptopirydyny występuje pod nazwami handlowymi: Pyrithione (pyrithion), PTO, Omadine. Porównywalne właściwości i zastosowanie w kosmetyce ma także izoalkilowa pochodna N-tlenku 2-hydroksypirydyny o handlowej nazwie Piroctone (pirokton). Pirokton, czyli N-tlenek 4-metylo-6-(2',4',4'-trimetylopentylo)-2-hydroksypirydyny, używany jest zarówno w formie wolnej (R = H) jak i w postaci soli z monoetanolaminą (Oktopioks). Dopuszczalne stężenie tego związku wynosi odpowiednio 1% dla substancji wolnej oraz 0,5% wag dla soli. Oktopioks stosowany jest również w preparatach przeciwłupieżowych gdyż wykazuje on właściwości przeciwłojotokowe.

Kolejnym konserwantem jest heksetydyna (Hexetidinum), czyli 5-amino-1,3-bis(2'-etyloheksylo)-5-metyloheksahydropirymidyna (rys. 31). Wywodzi on się z pirymidyny i jest znany również pod nazwami: Glypesin, Hexocil, Hextril, Sterisil.



Rysunek 30. Wzór strukturalny N-tlenku 2-merkaptopirydyny

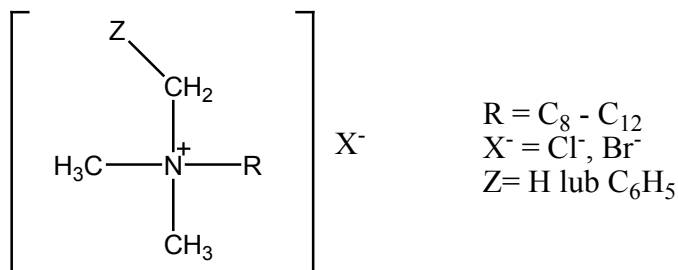


Rysunek 31. Wzór strukturalny heksetydyny

Związek ten występuje w postaci bezbarwnego oleju, praktycznie nie miesza się z wodą, jednak rozpuszcza się w alkoholu oraz eterze naftowym. Wykazuje on właściwości przeciwwgrzybicze i jest stosowany w stężeniu 0,1% wag. Heksetydyna nie jest stabilna chemicznie, ulega ona m.in. hydrolizie.

Sole amoniowe [10]

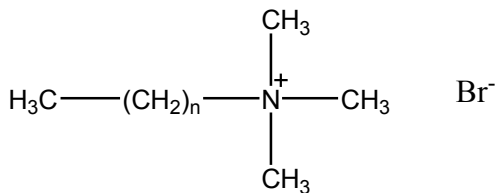
Znaczna część konserwantów z grupy soli amoniowych wywodzi się z IV-rzędowych N,N-dimetyloamin z podstawnikami alkilowymi o różnej długości łańcucha i opisywana jest ogólnym wzorem przedstawionym na rys. 32. IV-rzędowe metyloaminy w praktyce występują w postaci mieszaniny związków, których R jest reprezentowana przez łańcuchy węglowodorowe od C_8H_{17} do $C_{22}H_{45}$. Obecność IV-rzędowego atomu azotu oraz alkilowego podstawnika (R) warunkuje mechanizm działania antydrobnoustrojowego. Dzieje się to dlatego, że kationy amoniowe mogą łatwo łączyć się z ujemnymi grupami fosfolipidów błony komórkowej, co umożliwia wnikanie do błony komórkowej fragmentów tłuszczowych R. Powoduje to wzrost przepuszczalności i zaburzenia w funkcjonowaniu błony komórkowej drobnoustrojów. Dodatkowo zakłada się, że kationy amoniowe mogą również hamować procesy enzymatyczne bakterii oraz tworzyć trudno rozpuszczalne połączenia z białkami ich komórek.



Rysunek 32. Ogólny wzór soli amoniowych

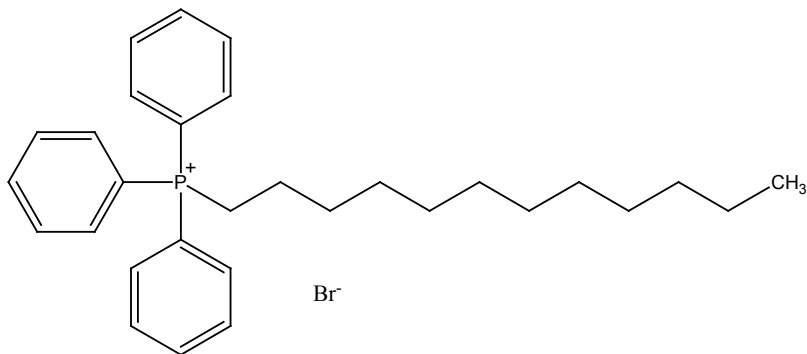
Znanym konserwantem należącym do grupy soli amoniowych jest Cetrimid, czyli bromek N,N,N-trimetylotetradecylamoniowy (rys. 33). Produkt ten posiada działanie przeciw bakteriom Gram-dodatnim oraz słabe działanie przeciw pleśniam oraz formom przetrwalnikowym drobnoustrojów. Konserwant ten nie jest jednak związkiem chemicznie jednorodnym, zawiera on domieszkę jego dodecylowego ($n=11$) oraz heksadecylowego ($n=15$) homologu.

Solą amoniową gdzie $\text{Z}=\text{C}_6\text{H}_5$ (rys. 32) jest często używany sacharynian benzalkoniowy (Rewoquat QA 100), zawierający w swej strukturze – wspólny dla wielu kosmetycznych środków konserwujących i dezynfekujących – kation benzalkoniowy. Konserwant ten łączy zarówno właściwości przeciwbakteryjne oraz słodki smak. Z tego powodu związek ten znajduje zastosowanie jako konserwant w preparatach do pielęgnacji jamy ustnej oraz w szamponach. W preparatach kosmetycznych używane są także inne sole benzalkoniowe, w stężeniu do 0,25% wag, m.in.: Benirol, BTC, Ceąquaryl, Germitol, Germinol, Osvan, Rodalon, Zephirol. Dozwolone stężenie konserwantów o budowie IV-rzędowych soli amoniowych (rys. 32; $\text{Z}=\text{H}$) wynosi 0,1% wag. Należy podkreślić fakt, iż sole amoniowe dają niezgodności z mydlami i innymi detergentami anionowymi.



Rysunek 33. Wzór strukturalny bromku N,N,N-trimetylotetradecylamoniowego – Cetrimidu ($n=13$)

Przy omawianiu soli amoniowych warto wspomnieć o bromku dodecylotryfenylofosfoniowym (rys. 34), który można rozpatrywać jako fosforowy analog soli amoniowych. Sól ta jest rozpuszczalna zarówno w alkoholach jak i glikolach i ze względu na swoje przeciwgrzybicze właściwości jest stosowana w preparatach do pielęgnacji stóp.



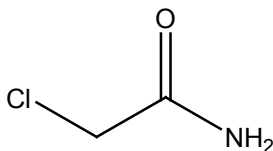
Rysunek 34. Wzór strukturalny bromku dodecylotryfenylofosfoniowego

Pochodne guanidyny [4]

Skuteczność antyseptycznego działania związków zawierających w swej budowie fragment guanidynowy gwarantuje uszkodzenie przez nie błon cytoplazmatycznych bakterii. Zaliczanymi do tej grupy związków kosmetycznymi konserwantami są chlorheksydyna (Chlorhexidine) oraz poli(heksametylenobiguanid). Oba te związki stosowane są w formie soli (np. chlorowodoru, glukonianu czy octanu), a ich dopuszczalne stężenie wynosi 0,3% wag.

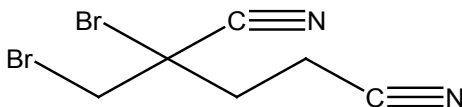
Związki różne [10]

Substancjami konserwującymi, używanymi w wyrobach kosmetycznych, a nie zaliczanymi do żadnej z powyżej omówionej grupy są: chloroacetamid (rys. 35), 1,2-dibromo-2,4-dicyjanobutan (Tektamer 38; rys. 36), dibromoheksamidyna oraz dibromopropamidyna. Chloroacetamid (rys. 35) jest skutecznym preparatem przeciw bakteriom zarówno Gram-ujemnym, jak i Gram-dodatnim w szerokim zakresie pH. Występuje on w szamponach (0,3% wag) oraz bywa używany jako konserwant kosmetycznych wyciągów roślinnych, jednakże może on wywoływać alergie.



Rysunek 35. Wzór strukturalny chloroacetamidu

Dibromodicyjanobutan (rys. 36) jest środkiem konserwującym, występującym w formułacjach kosmetycznych w 0,1% stężeniu. Nie powinien on jednak być stosowanym w preparatach światłochronnych.



Rysunek 36. Wzór strukturalny 1,2-dibromo-2,4-dicyjanobutanu

Związki bromoalkilamidynowe są konserwantami stosowanymi zarówno w formie zasad, jak i soli, a ich dopuszczalne stężenie w preparacie wynosi 0,1% wag., np. dibromopropamidyna, czyli 1,3-bis(4amidyno-2-bromofenoksy)propan (Brolene, Ointment, Brulidine) jest substancją łatwo rozpuszczalną w wodzie i alkoholach.

Kolejnym konserwantem używanym w artykułach kosmetycznych jest pochodna mocznika o komercyjnej nazwie triklokarban (Triclocarban). Triklokarban posiada właściwości antybakteryjne i jest używany w stężeniu do 0,2% wag. Nie powinien on jednak być stosowanym w preparatach światłochronnych.

Związki nieorganiczne [4]

Do konserwantów formułacji kosmetycznych z grupy połączeń nieorganicznych zaliczamy: kwas borowy, siarczyny sodu oraz jodan sodu.

Kwas borowy (H_3BO_3 kwas ortoborowy, Borofax), często występujący pod nieprawidłową nazwą „kwas borny”, posiada postać połyskliwych płytek lub drobnokrystalicznego proszku. Związki boru mają działanie toksyczne, jednakże mechanizm tego toksycznego działania nie jest do końca wyjaśniony. Przyjmuje się, że związki te, działając odwadniająco na protoplazmę komórek, zaburzają przemianę materii, zakłócają ich gospodarkę elektrolitową, oraz równowagę kwasowo-zasadową. Kwas borowy wykazuje również u zwierząt działanie teratogenne. Związki boru wykazują tendencję do kumulowania się

w organizmie, w szczególności w mózgu, tkance tłuszczowej i wątrobie. Zarówno kwas borowy jak i boraks wykazują słabe działanie przeciwdrobnoustrojowe i przeciwrzybicze. Nie należy stosować związków tych w preparatach do pielęgnacji niemowląt i dzieci do lat 3. Dozwolone stężenie kwasu borowego w środkach do pielęgnacji jamy ustnej wynosi 0,5%, w innych preparatach do 3%, a w pudrach nawet do 5% wag.

Drugą z wymienionych soli nieorganicznych stosowaną do konserwacji wyrobów kosmetycznych jest siarczyn sodu ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sodiumsulfite). Używa się go jako konserwantu w środowisku alkalicznym. W wyniku obniżenia pH środowiska artykułu związek ten odszczepia cząsteczkę ditlenku siarki o właściwościach dezynfekujących (rys. 37).



Rysunek 37. Mechanizm odszczepiania ditlenku siarki w obniżonym pH

Generowanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych związane jest z denaturującym wpływem na białko drobnoustrojów ditlenku siarki. Siarczyn sodu w formułacjach kosmetycznych używany jest w stężeniu do 0,2% wag. w przeliczeniu na SO_2 .

Jodan sodu (NaIO_3), jako ostatni z omawianych nieorganicznych środków konserwujących, stosowany jest w stężeniu do 0,1% wag. Jego działanie konserwujące związane jest z jego właściwościami utleniającymi.

W celu polepszenia zakresu działania przeciwdrobnoustrojowego stosuje się mieszaniny konserwantów, różniących aktywnością przeciwbakteryjną. Przykładem może tu być preparat o nazwie Lipoconserv COS, stanowiący kombinację estrów PHB (rys. 7) z fenoksyetanolem. Środek ten wskazany jest dokonserwacji fazy olejowej w emulsjach. Neo-Dragocid jest także przykładem konserwantu mieszanego złożonego z kwasu sorbinowego, estrów PHB oraz DHA (rys. 28) oraz Germallu 115 (rys. 25).

Reasumując należy podkreślić, że spośród wszystkich omówionych, w tej pracy, konserwantów stosowanych w formułacjach kosmetycznych podstawowe znaczenie mają: estry kwasu PHB (rys. 7), Germall 115 (rys. 25), Dowicil 200 (rys. 9), formaldehyd, kwas sorbinowy, Bronopol (rys. 20), DHA (rys. 28) oraz fenylometanol. Właściwości bakterio- i grzybobójcze wymienionych związków są bardzo zróżnicowane.

Olejki eteryczne jako naturalne środki konserwujące

W chwili obecnej istnieje zainteresowanie produkcją kosmetyków

pozbawionych syntetycznych konserwantów. Poprzez rosnący sceptycyzm konsumentów w stosunku do bezpieczeństwa używania chemicznych środków konserwujących, przemysł kosmetyczny został zmuszony do poszukiwania alternatywnych związków konserwujących produkty kosmetyczne. W ciągu ostatnich lat wzrosło zainteresowanie stosowaniem naturalnych środków konserwujących. Są to substancje pochodzenia roślinnego zapobiegające rozkładowi gotowego produktu kosmetycznego. Działanie substancji naturalnych polega na zahamowaniu wzrostu mikroorganizmów, utleniania oraz pewnych reakcji enzymatycznych występujących w produktach kosmetycznych [2]. Do środków konserwujących pochodzenia naturalnego zalicza się olejki eteryczne [11], które nie są wprowadzone ustawowo zgodnie z VI aneksem Dyrektywy 76/768/EEC o dozwolonych chemicznych środkach konserwujących.

Badania dotyczące właściwości przeciwbakteryjnych oraz przeciugrzybiczych olejków eterycznych prowadzono od dawna. Do olejków, charakteryzujących się takimi cechami zalicza się między innymi olejki z:

- rozmarynu lekarskiego;
- lawendy lekarskiej;
- tymianku pospolitego;
- szalwi lekarskiej;
- eukaliptusa;
- drzewa herbacianego.

Olejek z drzewa herbacianego wykazuje znaczące działanie na szczepy bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Z kolei olejek lawendowy charakteryzuje się aktywnością przeciwbakteryjną nawet przy stężeniu 5% wag w stosunku do bakterii *E.coli* oraz *S.aureus*. W czystej postaci oraz przy stężeniu 10% wag działa bakteriobójczo na *L.innocua* [12]. Olejek z lebidki pospolitej również wykazuje działanie konserwujące. Wykazuje on działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [13]. Badania wykazały, że ma on silne działanie m.in. wobec *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*.

Chemiczne kompozycje zapachowe mogą odgrywać znaczącą rolę w przeciwdrobnoustrojowej aktywności olejków eterycznych, które są pozyskiwane ze źródeł naturalnych. Do związków wykazujących najwyższą aktywność należą aldehydy, alkohole, kwasy organiczne oraz terpeny. Już w 1990 roku, jako alternatywne środki konserwujące, w celu zmniejszenia ilości parabenów stosowanych w produktach kosmetycznych, zastosowano linalol, alkohol fenyletylowy oraz octan benzylu [14]. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że na wzorcowe szczepy bakterii i grzybów najsilniejsze działanie wywierają cytral, p-cymen, α -terpineol oraz borneol.

Oprócz związków należących do monoterpenów, aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą wykazują także seskwiterpeny, alkohole oraz dicykliczne etery.

Literatura

1. M. Aleksandrowicz, Higiena produkcji. Monitorowanie warunków środowiska. Materiały konferencyjne – Bezpieczeństwo mikrobiologiczne preparatów kosmetycznych. Nowoczesne konserwanty, Warszawa, 2011
2. M.R. Meena, V.Sethi, Role of Spice and their Essentials oils as preservatives and antimicrobial agents, Indian Food Packer, 2007, 25, 38-45
3. M. Sikora, Konserwanty-konieczność stosowania, kosmetyki tradycyjne, kosmetyki naturalne, Materiały Konferencyjne - Bezpieczeństwo mikrobiologiczne preparatów kosmetycznych. Nowoczesne konserwanty, Warszawa, 2011
4. W. Malinka, Zarys Chemii Kosmetycznej, Volumes, Wrocław, 1999
5. E. Pawełczyk, Chemia leków, PZWL, Warszawa, 1986
6. H. Fey, L. Otte, Wörterbuch der Kosmetik, Wiss. Verl, Stuttgart, 1985
7. The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 12th Edition, Merck & CO., Inc. Whitehouse Station, New York, 1996
8. A. Marzec, Chemia kosmetyków, Dom Organizatora, Toruń, 2005
9. S. Pedersen, F. Marra, S. Nicoli, P.Santi, In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations, Int. J. Cosmet. Sci., 2007, 29, 361-367
10. E. Fink, Przewodnik po substancjach czynnych i pomocniczych, MedPharm Polska, Wrocław, 2007
11. A.M. Maccioni, C. Anchisi, A. Sanna, C. Sardu, S.Dessi, Preservative systems containing essential oils in cosmetic products, Int. J. Cosmet. Sci., 2002, 24, 53-59
12. V.R. Flora, Antimicrobial effect of some essential oils. J. Essent. Oil Res., 2008, 20, 373-379
13. M. Kivanc, A. Akgul, A. Dogan, Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oil on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*, Int. J. Food Microbiol. 1991, 13, 81-85
14. J.M. Blakeway, Fragrances and preservatives, SOFW J. 1990, 116, 357-359

ISBN 978-83-62108-17-6



9 788362 108176