

**UNIWERSYTET EKONOMICZNY W POZNANIU**  
WYDZIAŁ TOWAROZNAWSTWA  
KATEDRA TECHNOLOGII I ANALIZY INSTRUMENTALNEJ

**JUSTYNA KIEWLICZ**

PRACA DOKTORSKA

**DLUGOŁAŃCUCHOWE ESTRY KWASÓW FENOLOWYCH JAKO  
WIELOFUNKCYJNE SKŁADNIKI KSZTAŁTUJĄCE JAKOŚĆ  
WYROBÓW KOSMETYCZNYCH**

**PROMOTOR:**

dr hab. Henryk Szymusiak, prof. nadzw. UEP

**PROMOTOR POMOCNICZY:**

dr inż. Paulina Malinowska

**POZNAŃ 2013**

*Panu prof. Henrykowi Szymusiakowi  
za opiekę naukową, wsparcie i wszechstronną  
pomoc udzieloną w trakcie realizacji niniejszej  
pracy składam serdeczne podziękowania*

*Pani dr inż. Paulinie Malinowskiej  
serdecznie dziękuję za poświęcony czas, życzliwość  
i cenne rady udzielone w trakcie realizacji niniejszej pracy*

*Panu prof. Ryszardowi Zielińskiemu i Pani prof. Annie Gliszczyńskiej-Świągło  
serdecznie dziękuję za pomoc oraz cenne uwagi podczas  
realizacji pracy badawczej*

*Dziękuję również wszystkim pracownikom Katedry Technologii i Analizy Instrumentalnej  
za pomoc i wsparcie w realizacji niniejszej pracy*

*Pracę dedykuję Rodzicom*

## SPIS TREŚCI

|   |           |
|---|-----------|
| <b>SPIS TREŚCI</b>  | <b>4</b>  |
| <b>WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI</b>  | <b>8</b>  |
| <b>WSTĘP</b>  | <b>9</b>  |
| <b>CZĘŚĆ LITERATUROWA</b>   | <b>12</b> |
| <b>1. Ogólna charakterystyka kwasów fenolowych i ich pochodnych</b>   | <b>12</b> |
| 1.1. Klasyfikacja związków fenolowych   | 12        |
| 1.2. Biosynteza i występowanie kwasów fenolowych  | 15        |
| 1.3. Właściwości przeciwutleniające kwasów fenolowych   | 18        |
| 1.4. Bioaktywność kwasów fenolowych   | 21        |
| 1.5. Bioaktywność i właściwości przeciwutleniające<br>alkilowych estrów kwasów fenolowych   | 25        |
| 1.6. Zastosowanie kwasów fenolowych i ich pochodnych w preparatach kosmetycznych  | 28        |
| <b>2. Tłuszcze naturalne jako podstawowe surowce kosmetyczne</b>  | <b>32</b> |
| 2.1. Wpływ lipidów na funkcjonowanie organizmu i kondycję skóry   | 32        |
| 2.2. Charakterystyka naturalnych tłuszczów stosowanych w produkcji preparatów<br>kosmetycznych                                      | 36        |
| 2.3. Zmiany oksydacyjne zachodzące w tłuszczach podczas ich przechowywania  | 38        |
| <b>3. Przeciwutleniacze jako składniki przedłużające trwałość preparatów<br/>kosmetycznych</b>                                      | <b>46</b> |
| 3.1. Przeciwutleniacze stosowane w produkcji preparatów kosmetycznych   | 46        |
| 3.2. Mechanizm działania przeciwutleniaczy  | 47        |
| <b>4. Kontrowersje dotyczące stosowania BHT i innych syntetycznych<br/>przeciwutleniaczy w preparatach kosmetycznych i żywności</b> | <b>51</b> |
| 4.1. Charakterystyka i zastosowanie BHT   | 51        |
| 4.2. Absorpcja, dystrybucja, metabolizm i wydalanie BHT   | 53        |
| 4.3. Toksyczność  | 54        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| <b>5.</b> | <b>Jakość preparatów kosmetycznych</b>  | <b>58</b>  |
|           | <b>CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA</b>  | <b>63</b>  |
| <b>1.</b> | <b>Założenia i cele pracy</b>   | <b>63</b>  |
| 1.1.      | Cele pracy  | 63         |
| 1.2.      | Zakres badań  | 65         |
| 1.3.      | Hipotezy badawcze   | 66         |
| <b>2.</b> | <b>Wykaz odczynników, aparatury i sprzętu laboratoryjnego stosowanych w pracy</b>                                 | <b>67</b>  |
| <b>3.</b> | <b>Metodyka badań</b>   | <b>70</b>  |
| 3.1.      | Otrzymywanie długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych   | 70         |
| 3.2.      | Identyfikacja otrzymanych związków  | 72         |
| 3.3.      | Ocena właściwości fizykochemicznych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych                                    | 74         |
| 3.4.      | Ocena właściwości przeciwutleniających długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych w oleju z pestek winogron.      | 78         |
| 3.5.      | Parametry jakości emulsji kosmetycznych typu O/W zawierających dodatek długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych | 82         |
| 3.6.      | Analiza statystyczna  | 92         |
|           | <b>WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA</b>  | <b>93</b>  |
| <b>1.</b> | <b>Wydajności reakcji otrzymywania długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych</b>                                 | <b>93</b>  |
| <b>2.</b> | <b>Identyfikacja otrzymanych związków</b>   | <b>93</b>  |
| 2.1.      | Analiza widm jądrowego rezonansu magnetycznego  | 93         |
| 2.2.      | Analiza widm podczerwieni (IR)  | 103        |
| 2.3.      | Analiza elementarna   | 108        |
| <b>3.</b> | <b>Ocena właściwości fizykochemicznych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych</b>                             | <b>110</b> |
| 3.1.      | Badanie temperatury topnienia   | 110        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 3.2.      | Badanie stabilności termicznej   | 110        |
| 3.3.      | Badanie rozpuszczalności   | 116        |
| 3.4.      | Określenie równowagi hydrofilowo-lipofilowej   | 117        |
| 3.5.      | Wstępna ocena właściwości promieniochronnych na podstawie widm UV-VIS  | 119        |
| <b>4.</b> | <b>Analiza zmian oksydacyjnych i efektywności działania przeciwutleniającego dłuгоłańcuchowych estrów kwasów fenolowych w oleju z pestek winogron na podstawie badań przechowalniczych</b> | <b>126</b> |
| 4.1.      | Badania przechowalnicze oleju z pestek winogron z dodatkiem kwasu ferulowego   | 126        |
| 4.2.      | Badania przechowalnicze oleju z pestek winogron z dodatkiem estrów kwasu galusowego  | 129        |
| 4.3.      | Badania przechowalnicze oleju z pestek winogron z dodatkiem estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego  | 133        |
| 4.4.      | Ocena i porównanie aktywności przeciwutleniającej dłuгоłańcuchowych estrów kwasów fenolowych i BHT   | 136        |
| <b>5.</b> | <b>Parametry jakości emulsji kosmetycznych typu O/W zawierających dodatek dłuгоłańcuchowych estrów kwasów fenolowych</b>   | <b>139</b> |
| 5.1.      | Ocena sensoryczna emulsji kosmetycznych  | 139        |
| 5.2.      | Badanie stabilności fizycznej emulsji kosmetycznych  | 143        |
| 5.3.      | Ocena właściwości przeciwdrobnikowych dłuгоłańcuchowych estrów kwasów fenolowych w emulsjach kosmetycznych typu O/W  | 144        |
| 5.4.      | Korneometryczna ocena stopnia nawilżenia naskórka po jednorazowej aplikacji emulsji kosmetycznych  | 148        |
|           | <b>PODSUMOWANIE WYNIKÓW</b>  | <b>154</b> |
|           | <b>WNIOSKI</b>   | <b>159</b> |
|           | <b>SPIS RYSUNKÓW</b>   | <b>162</b> |
|           | <b>SPIS TABEL</b>  | <b>163</b> |
|           | <b>SPIS SCHEMATÓW</b>  | <b>166</b> |

|                      |            |
|----------------------|------------|
| <b>SPIS WYKRESÓW</b> | <b>167</b> |
| <b>LITERATURA</b>    | <b>170</b> |
| <b>ZAŁĄCZNIKI</b>    | <b>190</b> |

## WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

|                  |  |
|------------------|--|
| BHA              | butylohydroksyanizol   |
| BHT              | butylohydroksytoluen   |
| CTFA             | Personal Care Products Council   |
| DPPH*            | rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylo-hydrazylu  |
| 3,5-DT           | 3,5-dihydroksybenzoesan tetradecylu  |
| 3,5-DH           | 3,5-dihydroksybenzoesan heksadecylu  |
| 3,5-DO           | 3,5-dihydroksybenzoesan oktadecylu   |
| FT               | ferulan tetradecylu  |
| FH               | ferulan heksadecylu  |
| FO               | ferulan oktadecylu   |
| GT               | galusan tetradecylu  |
| GH               | galusan heksadecylu  |
| GO               | galusan oktadecylu   |
| IC <sub>50</sub> | stężenie przeciwutleniacza potrzebne do obniżenia początkowej zawartości DPPH* o 50%   |
| INCI             | międzynarodowe Nazewnictwo Składników Kosmetycznych (ang. International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)                                      |
| LN               | liczba nadtlenkowa   |
| WO               | współczynnik ochronny określający aktywność przeciwutleniającą długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych i BHT w próbkach oleju z pestek winogron |



## WSTĘP

Termin „jakość” wywodzi się od greckiego sformułowania „poiotes”. Według Platona „jakość konkretnych rzeczy to stopień osiągniętych przez nie doskonałości”. Pojęcie to charakteryzuje się dużą wielowymiarowością i interdyscyplinarnością oraz podlega ciągłej ewolucji wraz z rozwojem ludzkości i towarzyszącymi mu przemianami jakościowymi.

Poziom jakości determinowany jest przez wymagania klientów, a jej ocena w dużej mierze zależy od doświadczenia, wiedzy i zapotrzebowania na wyrób.

W kontekście określenia jakości preparatów kosmetycznych kluczową rolę stanowią ich bezpieczeństwo i właściwości użytkowe.

Za podstawową zasadę produkcji kosmetyków uznaje się zapewnienie właściwej jakości surowców, zgodnie z wymaganiami Dobrej Praktyki Produkcyjnej (GMP), które nie mogą być zaklasyfikowane według odpowiednich przepisów prawnych jako substancje rakotwórcze, mutagenne lub działające szkodliwie na rozrodczość. Odpowiedni dobór surowców kosmetycznych obejmuje także zapewnienie ich jakości mikrobiologicznej i czystości fizyko-chemicznej, co umożliwia uniknięcie zanieczyszczenia produktu finalnego.

Tłuszcze roślinne bogate w nienasycone kwasy tłuszczowe są podstawowymi składnikami żywności, suplementów do diety i wielu preparatów kosmetycznych. Związki te w istotny sposób wpływają na prawidłowe funkcjonowanie organizmu oraz pełnią pozytywną rolę w zapobieganiu wielu schorzeniom.

Niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe z rodzin n-3 i n-6 aplikowane na skórę jako składniki preparatów kosmetycznych poprawiają jej ogólną kondycję poprzez wzmacnianie bariery wodno-lipidowej naskórka, chroniąc ją tym samym przed nadmierną utratą wody i niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi. Dzięki strukturze i funkcjom zbliżonym do substancji budujących skórę, związki te mogą także wnikać w głąb jej warstw i bezpośrednio oddziaływać na procesy zachodzące w jej wnętrzu oraz wpływać na jej regenerację.

Niestety, tłuszcze roślinne bogate w jedno- i wielonienasycone kwasy tłuszczowe są substancjami nietrwałymi, które w trakcie przechowywania są szczególnie narażone na procesy utleniania, wskutek których może następować znaczne pogorszenie jakości produktów, przejawiające się negatywnymi zmianami cech organoleptycznych, utratą wartości odżywczych i pielęgnacyjnych oraz problemami związanymi z powstawaniem toksycznych produktów utleniania.

Proces utleniania tłuszczów może być kontrolowany na drodze różnych zabiegów technologicznych i dodatków funkcjonalnych, spośród których największą popularnością cieszy się stosowanie przeciwutleniaczy. Do najczęściej wykorzystywanych przeciwutleniaczy zalicza się ciągle tokoferole oraz przeciwutleniacze syntetyczne takie jak BHA, BHT i palmitynian askorbylu. Przeciwutleniacze syntetyczne charakteryzują się wysoką skutecznością działania, są stabilne termicznie i niedrogie. Nadmierna ekspozycja na te składniki może jednak wywierać niekorzystny wpływ na organizm człowieka. Tokoferole charakteryzują się natomiast zróżnicowaną aktywnością w zależności od zastosowanego stężenia i temperatury środowiska. Niewłaściwy dobór stężeń tych związków może skutkować utratą ich właściwości przeciwutleniających, a nawet ujawnieniem właściwości proutleniających. Dlatego nadal podejmowane są badania mające na celu opracowanie i wdrożenie nowych skutecznych przeciwutleniaczy, które mogłyby zastąpić budzące od wielu lat kontrowersje przeciwutleniacze syntetyczne.

Otrzymane i badane podczas przygotowywania rozprawy długołańcuchowe alkilowe estry kwasów fenolowych: ferulowego, galusowego i 3,5-dihydroksybenzoesowego wykazują mechanizm działania przeciwutleniającego charakterystyczny dla związków fenolowych. Z powodu obecności długiego łańcucha węglowodorowego w cząsteczkach związku te, w odróżnieniu od wolnych kwasów fenolowych, dobrze rozpuszczają się w tłuszczach, co zmienia ich charakter ochronny i otwiera perspektywy na poszukiwanie nowych możliwości zastosowań.

Z przeglądu czasopiśmiennictwa wynika, że z wyjątkiem kilku krótkołańcuchowych estrów kwasu galusowego wymienione wyżej estry kwasów fenolowych z alkoholami tłuszczowymi nie były jeszcze przedmiotem badań naukowych. Związki te wykazują ponadto dodatkowe właściwości, które mogą wywierać pozytywny wpływ na trwałość i cechy użytkowe preparatów kosmetycznych. Dotyczy to zwłaszcza zdolności do pochłaniania promieniowania UV, właściwości międzyfazowych czy nawilżających. Związki te charakteryzują się też wysoką stabilnością termiczną, co wskazuje na możliwość występowania w ich przypadku właściwości „carry through”.

Wielofunkcyjność otrzymanych estrów potencjalnie umożliwi również zredukowanie liczby komponentów wchodzących w skład złożonych preparatów kosmetycznych, powodując obniżenie kosztów ich wytworzenia, zmniejszenie ryzyka wystąpienia interakcji pomiędzy poszczególnymi składnikami i ewentualnych reakcji alergicznych.

Wszystkie rozpoznane dotychczas i opisane w niniejszej rozprawie właściwości długołańcuchowych alkilowych estrów kwasów fenolowych wskazują na możliwość ich zastosowania jako wielofunkcyjnych składników produktów kosmetycznych o działaniu przeciwutleniającym, międzyfazowym, nawilżającym oraz jako filtrów UV. Dzięki swoim właściwościom związki te mogą między innymi w bezpośredni sposób wpływać na zwiększenie trwałości produktów kosmetycznych i tym samym powodować poprawę ich jakości.

Celem niniejszej pracy było otrzymanie nowych, nie badanych i nie opisanych dotychczas w literaturze naukowej, długołańcuchowych estrów wybranych kwasów fenolowych oraz ocena ich właściwości jako wielofunkcyjnych składników determinujących jakość surowców i produktów kosmetycznych.

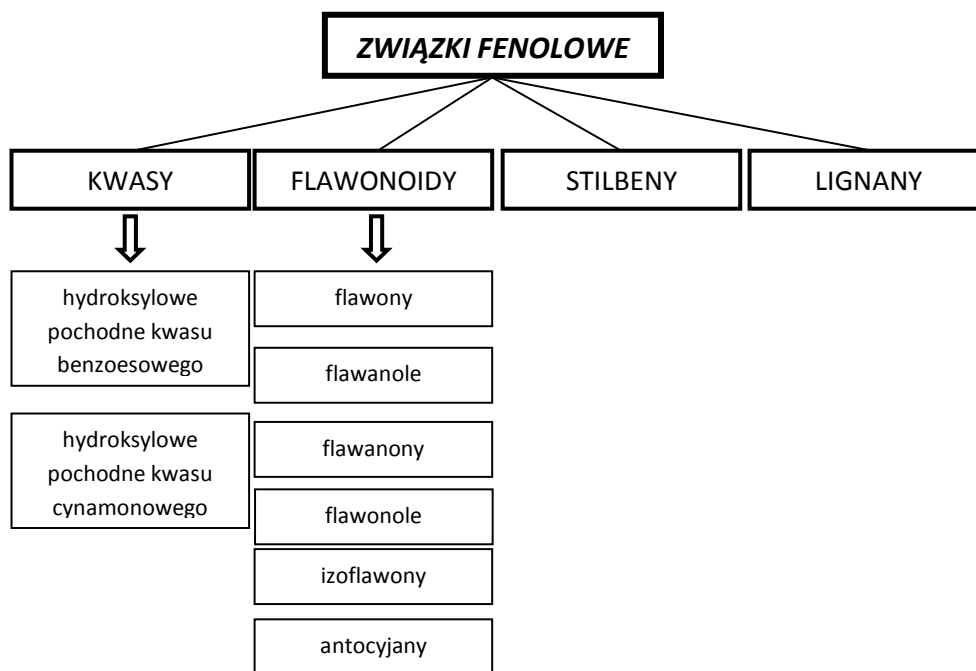
## CZEŚĆ LITERATUROWA

### 1. Ogólna charakterystyka kwasów fenolowych i ich pochodnych

#### 1.1. Klasyfikacja związków fenolowych

Polifenole stanowią grupę związków, będących produktami metabolizmu roślin wyższych, powstających w tzw. szlaku szikimowym. Charakteryzują się one zróżnicowaną budową, a ich wspólną cechą jest obecność co najmniej jednego pierścienia aromatycznego w cząsteczce z jedną bądź wieloma grupami hydroksylowymi [Han, Shen i Lou 2007; Manach i in. 2004].

Związki te klasyfikowane są na odrębne grupy w zależności od liczby pierścieni aromatycznych oraz rodzaju i ilości elementów strukturalnych do nich przyłączonych. Do najważniejszych klas związków fenolowych zalicza się: kwasy fenolowe, flawonoidy, stilbeny i lignany [Manach i in. 2004] (Schemat 1)

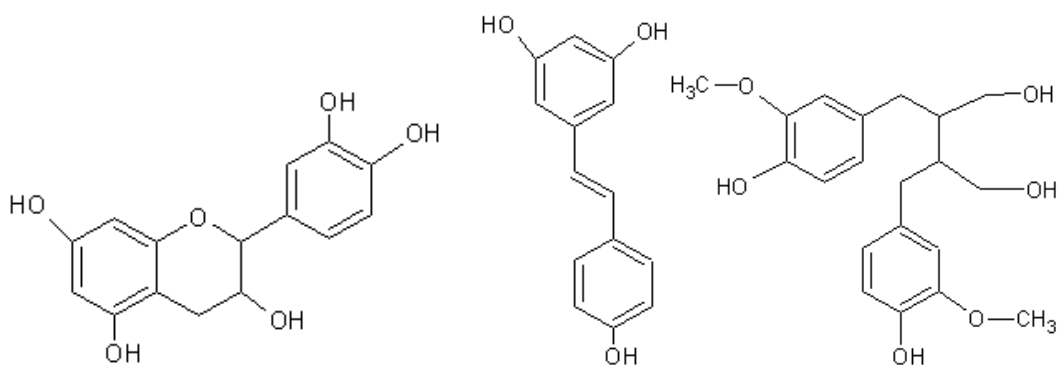


Schemat 1 Klasyfikacja związków fenolowych  
Źródło: [Han, Shen i Lou 2007]

Najliczniej występującą w przyrodzie grupą związków fenolowych są flawonoidy. Ich wspólną cechą jest obecność w cząsteczkach dwóch grup fenylowych, połączonych cyklicznym mostkiem z tlenem. W ten sposób centralny łańcuch trójwęglowy może tworzyć z udziałem jednego z pierścieni benzenowych zamknięty pierścień piranowy. Ze względu na rodzaj i położenie podstawników flawonoidy klasyfikowane są na sześć podgrup, do których zaliczamy: flawony, flawanole, flawanony, flawonole, izoflawony i antocjany. Przykładami tych związków są: kwercetyna, kemferol, chryzyna, katechina oraz genisteina [D'Archivio i in. 2007; Heim, Tagliaferro i Bobilya 2002].

Stilbeny stanowią niewielką grupę pochodnych fenylopropanoidowych cechujących się obecnością szkieletu 1,2 – difenyloetylenowego w cząsteczkach. Synteza tych związków zachodzi z udziałem pochodnych kwasu cynamonowego, a najpowszechniejszym przedstawicielem tej grupy jest trans-resweratrol [Chong, Poutaraud i Hugueneu 2009; Goodwin, Hsiang i Erickson 2000].

Lignany są natomiast produktem oksydacyjnej dimeryzacji jednostek fenylopropanowych. Do grupy tej zalicza się związki takie jak seikoizolaricirezynol, enterodiol, matairezynol, pinorezynol oraz mediorezynol [Landete 2012; D'Archivio i in. 2007].



katechina (flawonoidy)

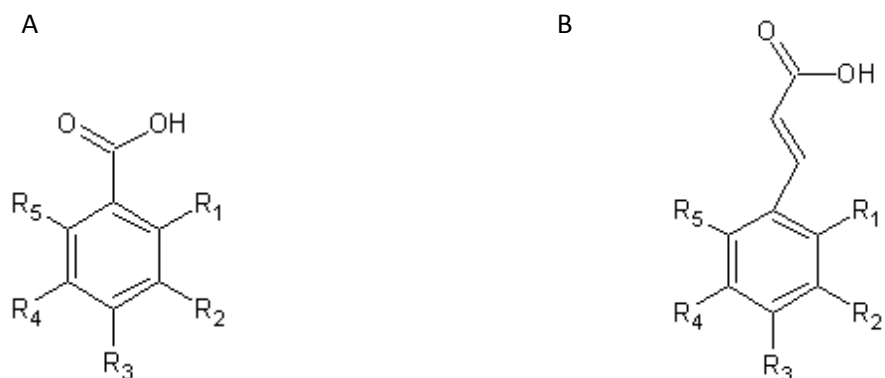
trans – resweratrol (stilbeny)

seikoizolaricirezynol (lignany)

Rysunek 1 Przykładowe struktury chemiczne wybranych związków fenolowych

W systematyce kwasów fenolowych rozróżnia się dwie podstawowe podklasy: hydroksylowe pochodne kwasu benzoowego oraz hydroksylowe pochodne kwasu cynamonowego. Poszczególne związki w obrębie określonych podklas różnią się od siebie

położeniem grup hydroksylowych (-OH) oraz metoksyowych (-OCH<sub>3</sub>) przy pierścieniu aromatycznym [Grajek 2007; Mattila i Hellstrom 2007]. Przykładowe struktury chemiczne kwasów fenolowych zostały przedstawione na rysunku 2.



| Nazwa zwyczajowa                                   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>    | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub>    | R <sub>5</sub> |
|--|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| <b>A. Hydroksylowe pochodne kwasu benzoowego</b>   |                |                   |                |                   |                |
| kwas protokatechowy                                | -H             | -H                | -OH            | -OH               | -H             |
| kwas galusowy                                      | -H             | -OH               | -OH            | -OH               | -H             |
| kwas rezorcynowy                                   | -H             | -OH               | -H             | -OH               | -H             |
| kwas salicylowy                                    | -OH            | -H                | -H             | -H                | -H             |
| kwas wanilinowy                                    | -H             | -OCH <sub>3</sub> | -OH            | -H                | -H             |
| kwas gentyzynowy                                   | -OH            | -H                | -H             | -OH               | -H             |
| <b>B. Hydroksylowe pochodne kwasu cynamonowego</b> |                |                   |                |                   |                |
| kwas p-kumarowy                                    | -H             | -H                | -OH            | -OH               | -H             |
| kwas ferulowy                                      | -H             | -H                | -OH            | -OCH <sub>3</sub> | -H             |
| kwas sinapowy                                      | -H             | -OCH <sub>3</sub> | -OH            | -OCH <sub>3</sub> | -H             |

Rysunek 2 Przykładowe struktury chemiczne wybranych kwasów fenolowych

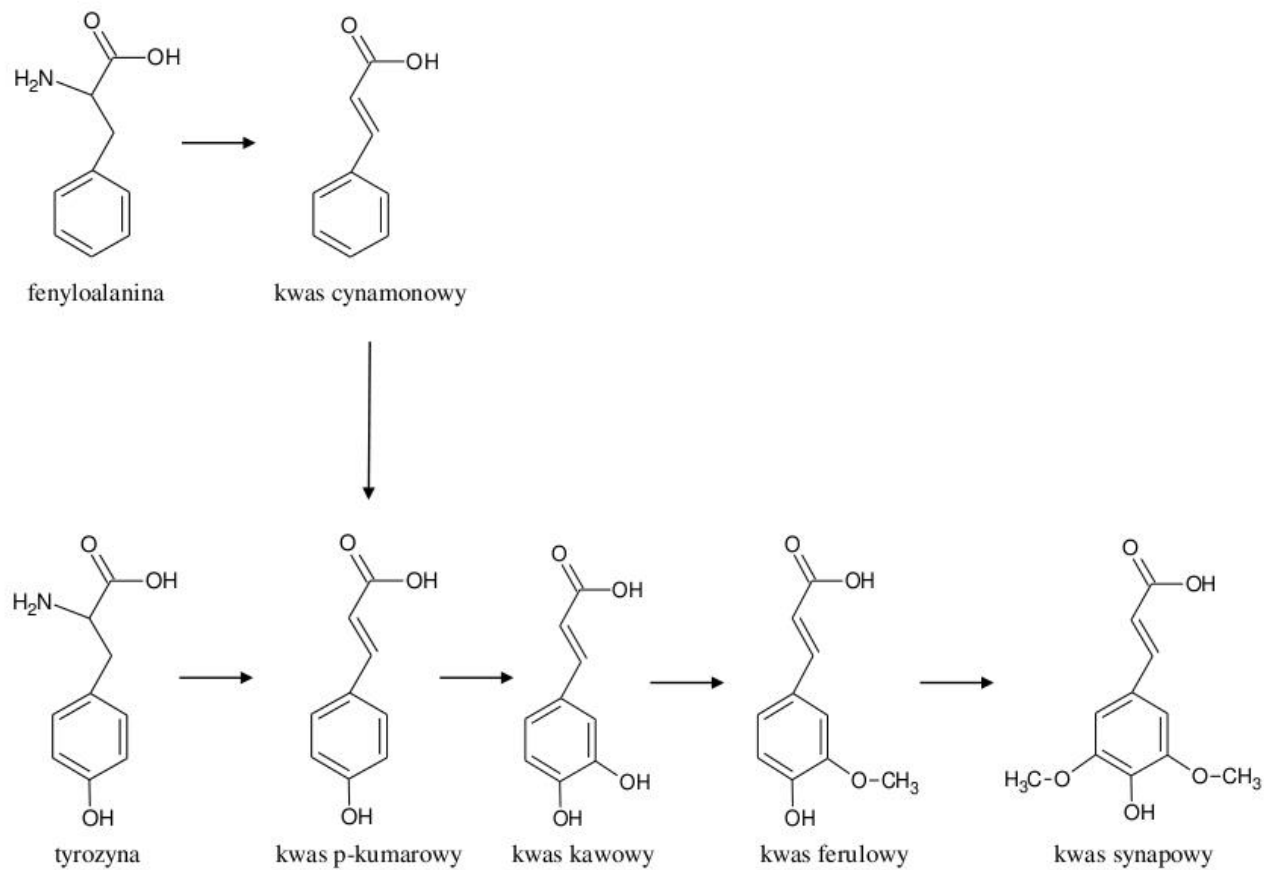
Związki fenolowe cechują się wysoką bioaktywnością. Ich wpływ na procesy zachodzące w komórkach przejawia się między innymi poprzez działanie ochronne skierowane przeciw niekorzystnym zmianom związanym z procesami utleniania. W ciągu ostatnich lat istotnie wzrosło zainteresowanie kwasami fenolowymi i ich pochodnymi jako potencjalnymi składnikami kosmetyków o działaniu przeciwutleniającym i pielęgnacyjnym. Związki te zostaną szerzej opisane w dalszej części pracy.

## 1.2. Biosynteza i występowanie kwasów fenolowych

Kwasy fenolowe są wtórnymi produktami metabolizmu roślin. Biosynteza hydroksylowych pochodnych kwasu cynamonowego następuje na drodze deaminacji fenyloalaniny lub tyrozyny, w wyniku czego powstają kwasy: cynamonowy i p-kumarowy, które ulegają dalszym przemianom do kolejnych hydroksypochodnych [Rice-Evans, Miller i Paganga 1997]. Z tych samych związków mogą powstawać pochodne kwasu benzoowego. Prekursorem kwasu galusowego może być fenyloalanina, która w wyniku procesów biochemicznych przekształca się w produkty pośrednie, takie jak kwas kawowy lub kwas trihydroksycynamonowy, a następnie ulega przemianom do kwasu galusowego. Związek ten może powstawać również z produktów pośrednich szlaku szikimowego, jakimi są kwas 5-dehydroszikimowy oraz kwas protokatechowy [Werner i in. 2004].

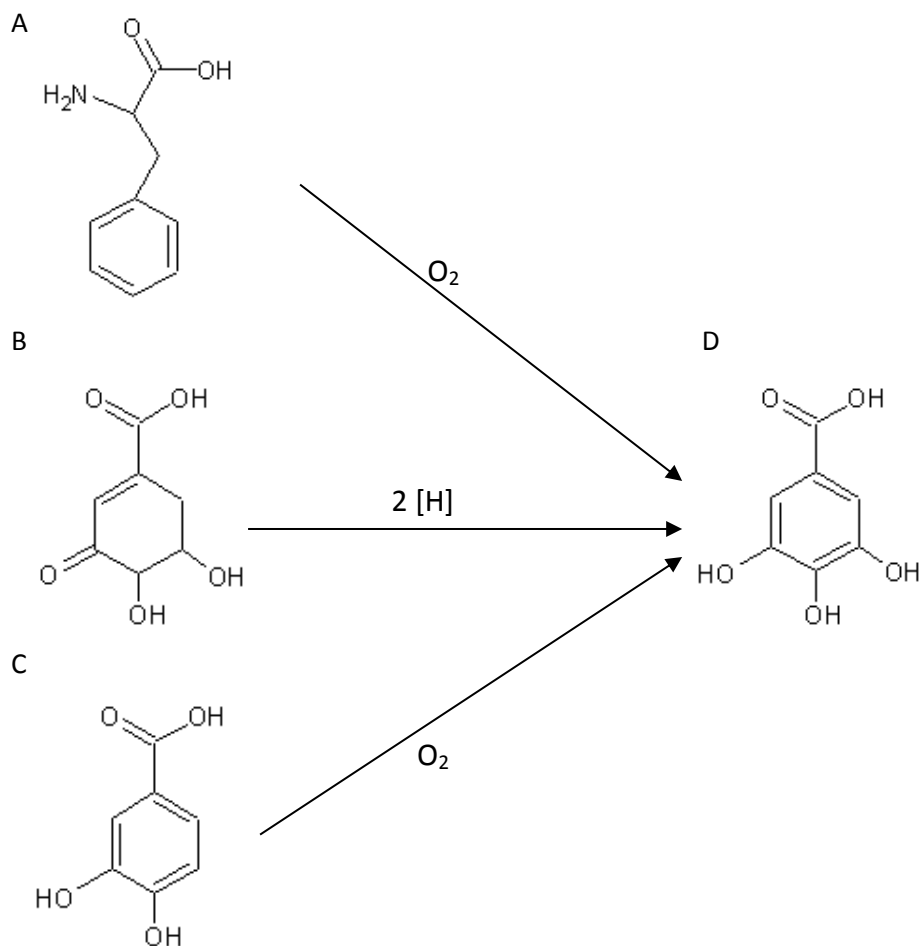
W przyrodzie kwasy fenolowe rzadko występują w formie wolnej. Najczęściej łączą się one z innymi związkami przy pomocy wiązań estrowych, glikozydowych oraz występują w postaci kompleksów. Wykazują one również zdolność do tworzenia depsydów, czyli związków złożonych z dwóch cząsteczek fenolokwasów. Przykładami depsydów są kwasy: elagowy, chlorogenowy i rozmarynowy. Depsydy powszechnie występują w owocach, kawie, tkankach roślin kwiatowych i porostach [Gawlik – Dziki 2004; Shahidi i Naczek 1995; Shukla, Joshi i Rawat 2010; Zagórka i Główniak 2001]

Najpopularniejsze spośród kwasów hydroksycynamonowych, czyli kwasy: kawowy, p-kumarowy, ferulowy i synapowy występują w naturze w formie pochodnych glikozydowych bądź estrów kwasów: chinowego, szikimowego i tartarowego. Kwas kawowy, tworzy z kwasem chinowym ester zwany kwasem chlorogenowym, który obecny jest w wielu owocach oraz kawie. Bogatym źródłem kwasu ferulowego są natomiast ziarna zbóż. Związek ten występuje głównie w warstwie aleuronowej i owocni pod postacią arabinoksylianów i hemiceluloz. Ziarno pszenicy zawiera 0,8 – 2,0 g kwasu ferulowego na kilogram suchej masy [Manach i in. 2004].



Schemat 2 Biosynteza hydroksylowych pochodnych kwasu cynamonowego  
 Źródło: [Rice – Evans, Miller i Paganga 2007]





A – fenyloalanina, B – kwas 5 – dehydroszikimowy, C – kwas protokatechowy, D – kwas galusowy

Schemat 3 Biosynteza kwasu galusowego

Źródło: [Werner i in. 2004]

Kwasy hydroksybenzoesowe są obecne w surowcach roślinnych głównie w formie glikozydów. Zawartość tych związków w roślinach jadalnych jest zazwyczaj bardzo niska z wyłączeniem ziół, czerwonych owoców, czarnej rzodkwi i cebuli, które zawierają kilka dziesiątych miligrama tych kwasów na kilogram świeżej masy. Ważnym źródłem kwasu galusowego są liście herbaty, które zawierają ponad 4,5 g tego związku na kilogram świeżej masy [Manach i in. 2004; Nardini i Ghiselli 2004; Shahidi i Naczek 1995].

Tabela 1 Występowanie kwasów fenolowych w wybranych surowcach zielarskich

| <b>Roślina</b>       | <b>Kwasy fenolowe</b>   |
|----------------------|---|
| Bazylija pospolita   | protokatechowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzynowy, kawowy, wanilinowy, rozmarynowy  |
| Cząber ogrodowy      | protokatechowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzynowy, syryngowy, kawowy, wanilinowy, p-kumarowy, rozmarynowy                         |
| Hyzop lekarski       | protokatechowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzynowy, chlorogenowy, syryngowy, kawowy, wanilinowy, p-kumarowy, ferulowy, rozmarynowy |
| Lawenda wąskolistna  | protokatechowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzynowy, chlorogenowy, kawowy, wanilinowy, p-kumarowy, ferulowy, rozmarynowy            |
| Lebiodka majeranek   | protokatechowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzynowy, kawowy, wanilinowy, ferulowy, rozmarynowy                                      |
| Macierzanka tymianek | protokatechowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzynowy, syryngowy, kawowy, wanilinowy, p-kumarowy, rozmarynowy                         |
| Melisa lekarska      | protokatechowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzynowy, kawowy, rozmarynowy  |
| Mięta pieprzowa      | protokatechowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzynowy, kawowy, wanilinowy, rozmarynowy  |
| Rozmaryn lekarski    | protokatechowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzynowy, syryngowy, kawowy, wanilinowy, p-kumarowy, ferulowy, rozmarynowy               |
| Szałwia lekarska     | protokatechowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzynowy, kawowy, wanilinowy, ferulowy, rozmarynowy                                      |

Źródło: opracowanie własne na podstawie: [Zagórka i Głowniak 2001]

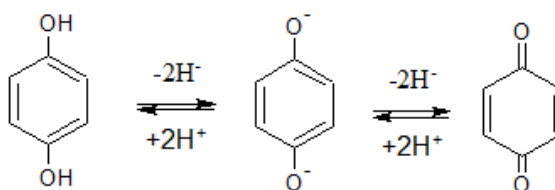
### 1.3. Właściwości przeciwutleniające kwasów fenolowych

Charakterystyczna budowa cząsteczkowa powoduje, że kwasy fenolowe i ich pochodne wykazują silną aktywność przeciwutleniającą, polegającą na zmiataniu wolnych rodników, wygaszaniu tlenu singletowego oraz chelatowaniu jonów metali przejściowych. Z praktycznego punktu widzenia jest to działanie pozytywne, prowadzące do zahamowania niekorzystnych przemian związanych z utlenianiem tłuszczów, witamin, białek oraz innych związków zawartych w kosmetykach i żywności, a także ograniczenia peroksydacji lipidów, będących integralną częścią błon plazmatycznych [Andjelkovic i in. 2006; Silva i in. 2000].

Dezaktywacja wolnych rodników może następować na drodze przejścia przez nie elektronów odłączonych od cząsteczek przeciwutleniacza lub na drodze połączenia cząsteczek

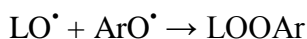
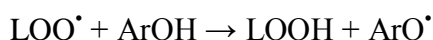
rodnika i przeciwutleniacza z wytworzeniem adduktu. W innym przypadku przeciwutleniacz może także pełnić rolę donora atomu wodoru. W takiej sytuacji związek fenolowy ulega utlenieniu do semichinonu, a następnie do orto- lub para- chinonu, natomiast produktem pośrednim reakcji jest stabilny rodnik fenoksyłowy, który ulega dezaktywacji w wyniku przemieszczania się niesparowanych elektronów w pierścieniu aromatycznym [Andjelkovic i in. 2006; Gawlik – Dziki 2004; Rice – Evans i in. 1997].

Zdolność kwasów fenolowych do chelatowania jonów metali przejściowych wpływa natomiast hamująco na przebieg reakcji Fentona oraz reakcji Habera-Weissa, które prowadzą do powstawania reaktywnych form tlenu.



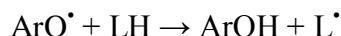
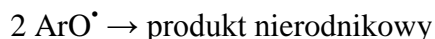
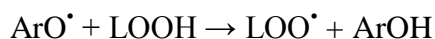
Rysunek 3 Mechanizm utleniania związków fenolowych  
Źródło: [Gawlik-Dziki 2004]

Działanie ochronne kwasów fenolowych w stosunku do nienasyconych kwasów tłuszczowych polega na wychwytywaniu wolnych rodników lipidowych powstających w trakcie procesów autooksydacji lub utleniania fotosensybilizowanego. Dezaktywacja rodników może zachodzić na dwa sposoby, zgodnie z następującymi równaniami:



Na skutek oddziaływania rodników nadtlenkowych ( $\text{LOO}^\bullet$ ) protony wchodzące w skład przeciwutleniaczy ( $\text{ArOH}$ ) mogą ulegać odczepieniu w wyniku czego powstają rodniki fenoksyłowe ( $\text{ArO}^\bullet$ ) i wodoronadtlenki ( $\text{LOOH}$ ). Według drugiego mechanizmu rodniki alkoksyłowe ( $\text{LO}^\bullet$ ) i rodniki fenoksyłowe ( $\text{ArO}^\bullet$ ) reagują ze sobą tworząc produkty nierodnikowe [Bravo 1998; Cuppett, Shnepf i Hall 1997].

Rodniki fenoksyłowe powstałe w wyniku utlenienia kwasów fenolowych mogą ulegać dalszym reakcjom, co w niektórych przypadkach może skutkować powstawaniem kolejnych wolnych rodników zgodnie z przedstawionymi równaniami:



W przypadku kwasów fenolowych z zawadą steryczną (przestrzenną) wydajność reakcji prowadzących do powstania produktów nierodnikowych jest wyższa niż wydajność reakcji prowadzących do powstania wolnych rodników, co skutkuje niemal całkowitym zahamowaniem procesów utleniania tłuszczów. Brak zawady sterycznej w znaczący sposób obniża aktywność przeciwutleniającą związku [Cuppert, Shnepf i Hall 1997].

Właściwości przeciwutleniające kwasów fenolowych i ich pochodnych w dużej mierze zależne są od liczby grup hydroksylowych w cząsteczce i ich położenia względem pierścienia aromatycznego.

Kwasy hydroksybenzoesowe posiadające jedną grupę hydroksylową położoną w pozycji orto lub para wykazują słabe właściwości przeciwutleniające, co wynika z elektronoakceptorowego charakteru grupy karboksylowej. W przypadku dihydroksylowych pochodnych położenie grup hydroksylowych względem pierścienia ma decydujący wpływ na ich aktywność przeciwutleniającą. Obecność trzech grup –OH w cząsteczkach kwasu galusowego wywiera wpływ na proces delokalizacji elektronowej w pierścieniu benzenowym, co może skutkować zwiększeniem stabilności rodników fenoksyloowych w porównaniu z innymi pochodnymi kwasu benzoowego. Nieco niższą aktywnością charakteryzuje się kwas rezorcynowy (3,5–dihydroksybenzoesowy). Najsłabsze właściwości przeciwutleniające spośród wymienionych kwasów wykazują kwasy: 2,3– i 3,4–dihydroksybenzoesowy. Obecność w cząsteczce kwasu grup metoksyloowych powoduje zwiększenie właściwości przeciwutleniających związku, natomiast estryfikacja grupy karboksylowej w niektórych przypadkach powoduje ich drastyczne obniżenie [Grajek 2007; Rice-Evans i in. 1996].

Pochodne kwasu cyjamonowego charakteryzują się większymi właściwościami przeciwutleniającymi niż pochodne kwasu benzoowego, co wynika z ograniczonego oddziaływania grupy karboksylowej na właściwości donorowe cząsteczki. Ponadto obecność grupy etylenowej pomiędzy pierścieniem fenylowym a grupą karboksylową powoduje zwiększenie zdolności do przekazywania elektronów oraz stabilizację powstającego rodnika [Grajek 2007; Kiewlicz, Malinowska i Szymusiak 2012].

#### 1.4. Bioaktywność kwasów fenolowych

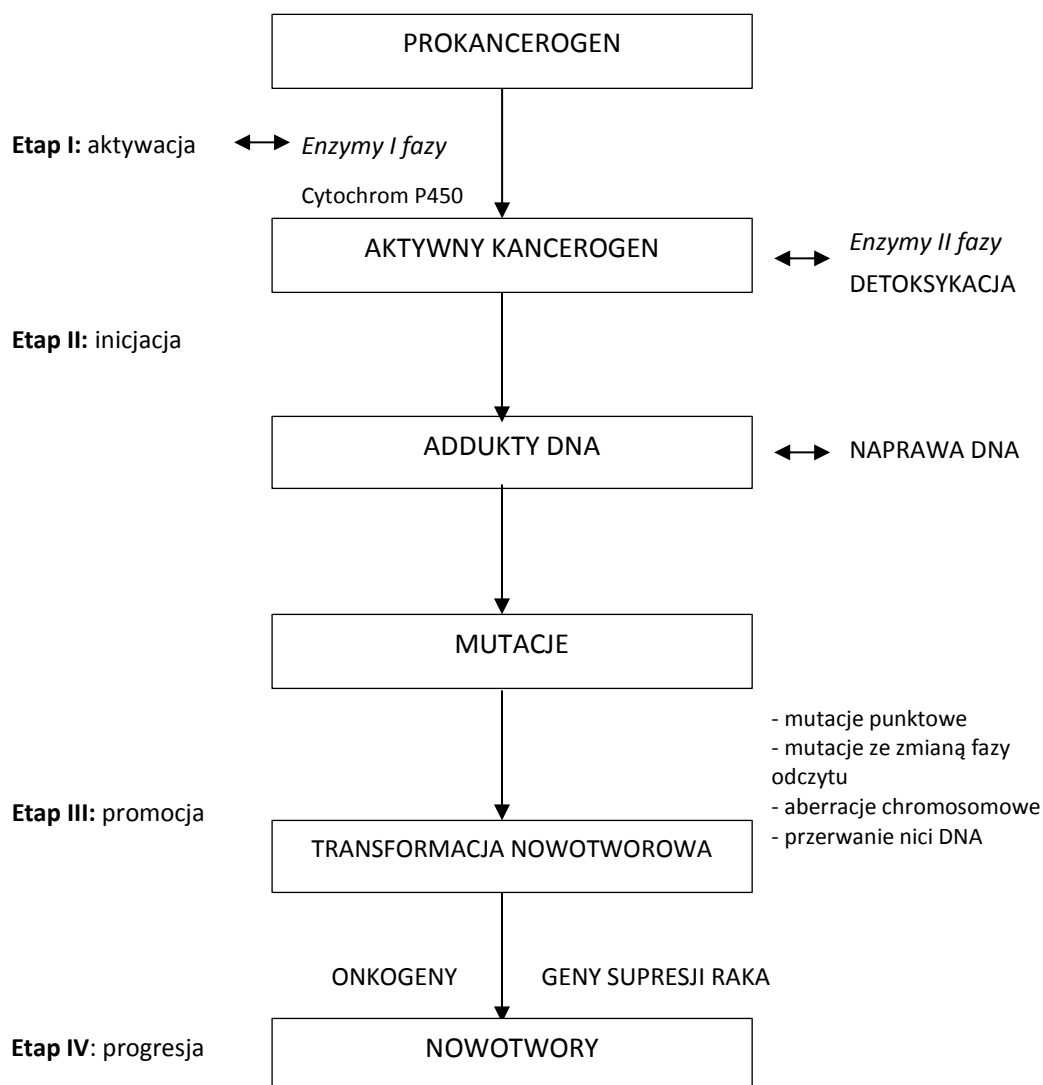
Właściwości przeciwutleniające kwasów fenolowych w znacznym stopniu wpływają na ich aktywność biologiczną. Poprzez dezaktywację wolnych rodników oraz zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych, związki te ograniczają zmiany związane z utlenianiem lipidów, białek oraz DNA wchodzących w skład struktur komórkowych [Andjelkovic i in. 2006; Welch, Davis i Aust 2002]. Oznacza to, że kwasy fenolowe mają istotny wpływ na zapobieganie wielu schorzeniom. Wykazują one działanie przeciwmutagenne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne oraz pełnią pozytywną rolę w zapobieganiu chorobom układu sercowo-naczyniowego i chorobom neurodegeneracyjnym [Proestos i in. 2006].

Według wyników badań klinicznych przyjęcie odpowiedniej dawki kwasów fenolowych skutkuje zwiększeniem aktywności przeciwutleniającej plazmy krwi. Wzrost aktywności przeciwutleniającej był systematycznie obserwowany po ponad godzinnych odstępach czasu od spożycia owoców, warzyw i napojów, takich jak: piwo, wino, szpinak czy truskawki, które są bogatym źródłem kwasów fenolowych. Dodatkowo w niektórych przypadkach zanotowano obniżenie stężenia produktów utleniania lipidów w plazmie krwi, co może świadczyć o udziale kwasów fenolowych w hamowaniu procesów związanych ze stresem oksydacyjnym [Scalbert i in. 2005]. Zachwianie równowagi ustrojowej w wyniku nadprodukcji reaktywnych form tlenu może prowadzić do stresu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA, przejawiających się powstawaniem mutacji, przerwaniem jedno- i dwuniciowego DNA, sieciowaniem, a także uszkodzeniem i rekombinacją chromosomów [Chu i in. 2002].

Istnieje kilka modeli tłumaczących mechanizm działania antykancerogenego związków fenolowych. Pierwszy z nich polega na blokowaniu czynników mutagennych przez polifenole na etapie inicjacji poprzez wpływ na ekspresję cytochromu 450, który może powodować aktywację prokancerogenów (Schemat 4).

Związki te mogą również determinować wydalanie szkodliwych substancji poprzez zwiększenie ekspresji enzymów II fazy. W wyniku oddziaływania wymienionych enzymów związki fenolowe mogą przekształcać się w potencjalnie toksyczne chinony, które stają się substratami dla enzymów II fazy. Wzrost stężenia polifenoli może zatem aktywować enzymy do detoksykacji produktów ich przemiany i w ten sposób zwiększać ogólną ochronę organizmu przed toksycznymi ksenobiotykami.

Polifenole mogą także ograniczać inicjację komórek poprzez stymulację naprawy DNA oraz działać jako czynniki tłumiące proliferację nowotworów z zainicjowanych komórek. Związki te hamują ekspresję onkogenów oraz inhibują aktywność dekarboksylazy ornitynowej, która jest kluczowym enzymem biorącym udział w syntezie poliamin, które z kolei są związkami wpływającymi na proliferację komórek [Scalbert i in. 2005].



Schemat 4 Schemat kancerogenezy

Źródło: Opracowanie własne na podstawie: [Szymańska 2008; Smart 2004]

Prawidłowości te zostały potwierdzone w badaniach z wykorzystaniem kwasu elagowego, który wykazuje działanie ochronne w stosunku do DNA w obecności czynników cytotoksycznych. Związek ten inhibuje powstawanie adduktów pomiędzy aktywnymi

węglowodorami policyklicznymi a DNA. Działanie przeciwmutagenne kwasu elagowego zostało potwierdzone w badaniach na bakteriach *Salmonella typhimurium*, poddanych wpływowi środków kancerogennych [Scalbert i in. 2005]. Udowodniony został również hamujący wpływ kwasu kawowego i niektórych jego estrów na inicjację komórek nowotworowych w obrębie jelita grubego [Olthof, Hollman i Katan 2001].

Kwasy: ferulowy, kawowy i chlorogenowy hamują aktywność dekarboksylazy ornitynowej oraz ograniczają namnażanie się komórek zainicjowanych w procesie kancerogenezy wywołanej działaniem promotora kancerogenezy na skórze myszy [Huang i in. 1988].

Istnieje niewiele publikacji potwierdzających bezpośredni wpływ kwasów fenolowych na profilaktykę chorób układu sercowo-naczyniowego. Udowodniono [Laranjinha i in. 1995], że pochodne kwasu cytrynowego, zwłaszcza kwasy: kawowy i kumarowy, wykazują synergizm w stosunku do kwasu askorbinowego, potęgując działanie ochronne wobec lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). Podobny efekt obserwowano z udziałem  $\alpha$ - tokoferolu. Kwas kawowy powodował regenerację  $\alpha$ - tokoferolu z rodnika  $\alpha$ - tokoferoksylogo, wpływając pośrednio na ochronę lipoprotein o niskiej gęstości przed niepożądanymi zmianami. Jest to działanie bardzo pozytywne, ponieważ zmiany oksydacyjne w obrębie lipoprotein o niskiej gęstości mogą powodować powstawanie zmodyfikowanych cząsteczek zawierających zarówno utlenione pochodne kwasów tłuszczowych jak i uszkodzone apoproteiny, które wzmacniają efekt śródbłonkowy. Powstawanie utlenionych form LDL (oxLDL) wywiera wpływ na przebieg wszystkich etapów miażdżycy naczyń krwionośnych, łącznie z uaktywnieniem procesów zapalnych, uszkodzeniami śródbłonka, rekrutacją makrofagów i deregulacją wchłaniania oxLDL przez te komórki do formowania komórek piankowatych, co jest wczesną oznaką powstawania zmian miażdżycowych [Morton i in. 2000].

Kwas galusowy wpływa natomiast hamująco na powstawanie procesów zapalnych w obrębie naczyń krwionośnych poprzez udział w przemianach selektyny P [Kuppan i in. 2010].

Badania prowadzone na szczurach wskazały ponadto na zdolność polifenoli pochodzących z zielonej herbaty do obniżania limfatycznej absorpcji cholesterolu, co skutkuje zmniejszonym transportem cholesterolu do wątroby przez chylomikrony reszkowe [Zern i Fernandez 2005].

Kwasy fenolowe są jednym z czynników pozytywnie wpływających na leczenie i profilaktykę cukrzycy. Potwierdza to fakt stosowania roślin bogatych w te związki w

tradycyjnych metodach leczenia. Zgodnie z wynikami badań epidemiologicznych spożywanie kawy, która jest bogatym źródłem kwasu chlorogenowego, obniża ryzyko wystąpienia cukrzycy typu II [van Dam i Feskens 2002]. Badania przeprowadzone na grupie zdrowych wolontariuszy wykazały ponadto, że kwas chlorogenowy obniża szybkość jelitowego wchłaniania glukozy i przeciwdziała efektowi hiperglikemicznemu powodowanemu przez kofeinę. Kwasy: kawowy i izoferulowy podawane dożylnie szczurom chorym na cukrzycę insulinozależną tłumili wzrost zawartości glukozy w surowicy krwi w teście dożylnego obciążenia glukozą. Efekt hipoglikemiczny był także obserwowany w przypadku kwasu 4-hydroksybenzoesowego, podawanego doustnie szczurom krótko przed spożyciem przez nie środka zawierającego glukozę [Scalbert i in. 2005].

Ryzyko zapadnięcia na choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera czy Parkinsona, w znacznym stopniu zależy od stresu oksydacyjnego, który w szczególności sposób odpowiedzialny jest za powstawanie uszkodzeń tkanki mózgowej. Z tego powodu kwasy fenolowe mogą odgrywać istotną rolę w zapobieganiu tego rodzaju dysfunkcjom. Poza tym badania przeprowadzone na myszach wskazują, że regularne przyjmowanie wolnego kwasu ferulowego indukuje odporność komórek mózgu na  $\beta$ -amyloid-42, który jest związkiem wywołującym apoptozę komórek mózgowych u osób cierpiących na chorobę Alzheimera [Kanski i in. 2002; Szwajgier i Jakubczyk 2011; Yan i in. 2001; Zhou i in. 2011].

Kwasy fenolowe są powszechnie znane ze swoich właściwości bakteriobójczych. Według wyników badań przeprowadzonych na *Azotobacter chroococcum* kwasy: wanilinowy, syringowy, kumarowy, kawowy i ferulowy wykazywały wyraźne działanie bakteriostatyczne [Juarez, Martinez-Toledo i Gonzalez-Lopez 2005]. Badania przeprowadzone na wybranych bakteriach z rodzaju *Lactobacillus* wykazały natomiast, że działanie przeciwbakteryjne pochodnych kwasu benzoowego maleje wraz ze wzrostem ilości grup hydroksylowych w ich cząsteczkach. W przypadku pochodnych kwasu cynamonowego, obecność podwójnego wiązania w łańcuchu bocznym cząsteczki obniża właściwości biobójcze tych związków [Sanchez – Maldonado, Schieber i Ganzle 2011]. Ponadto w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem kwasu galusowego, galusanu metylu i kwasu 4-metoksy-3,5-dihydroksybenzoesowego, udowodniono, że obecność grupy metoksyowej poprzez zmniejszenie polarności cząsteczki, zwiększa jej działanie bakteriobójcze w porównaniu do kwasu galusowego [Hall 2001]. Cueva i wsp. [2010] także potwierdzili wpływ struktury kwasów fenolowych na właściwości przeciwbakteryjne kwasów fenolowych. Badania prowadzone przez Puupponen i in. [2001] wskazały na aktywność



bakteriobójczą kwasów fenolowych przeciw wszystkim przebadanym bakteriom Gram-ujemnym. Do badań użyto kwasy: p-kumarowy, ferulowy, kawowy i chlorogenowy.

### **1.5. Bioaktywność i właściwości przeciwutleniające alkilowych estrów kwasów fenolowych**

Estry kwasów fenolowych, będące produktami kondensacji kwasów fenolowych i długołańcuchowych alkoholi, podobnie jak ich prekursorzy, występują głównie w surowcach pochodzenia roślinnego. Alkilowe pochodne kwasu ferulowego, zwłaszcza jego ester tetradecylowy, wchodzi w skład materiału biologicznego wyodrębnionego z roślin z rodzajów *Bauhinia*, *Euchresta* i *Erythrina*. Związki te wyizolowano również z tkanek roślin halofitowych, gdzie odpowiedzialne są za utrzymywanie wody w komórkach oraz za działanie ochronne przeciw roślinożercom i patogenom [El-Seedi 2007].

Długołańcuchowe estry kwasów fenolowych charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami przeciwutleniającymi. W przypadku pochodnych kwasu benzoowego estryfikacja grupy karboksylowej może powodować obniżenie lub zanik ich aktywności przeciwutleniającej. Inna sytuacja ma miejsce w przypadku pochodnych kwasu cynamonowego. Udowodniono, że modyfikacja grupy karboksylowej tych kwasów wpływa w różny sposób na aktywność przeciwutleniającą poszczególnych związków. Alkilowe pochodne kwasu kawowego wykazują wyższą aktywność antyoksydacyjną niż ich prekursor. Estryfikacja uwodornionej formy kwasu kawowego skutkuje natomiast radykalnym obniżeniem jego zdolności do zmiatania wolnych rodników. Badania przeprowadzone przez Silvę i współpracowników [2000] potwierdziły również brak związku pomiędzy długością łańcucha alkilowego, wartością  $pK_a$  związków a ich aktywnością przeciwutleniającą.

Według Anselmi i współpracowników [2004a] w układach jednofazowych ferulan n-oktylu, ferulan 2-etylo-1-heksylu i ferulan n-dodecyłu wykazują zdolność do zmiatania wolnych rodników porównywalną do tej, jaką charakteryzuje się kwas ferulowy. Różnice w budowie przestrzennej tych związków, takie jak długość czy rozgałęzienie łańcucha węglowego, nie mają wpływu na ich aktywność. Analiza za pomocą spektroskopii jądrowego efektu Overhausera (NOESY) estrów wskazała natomiast na zależność pomiędzy strukturą przestrzenną tych związków a ich aktywnością przeciwutleniającą w modelowych układach membranowych. Powyższe badania [Anselmi i in. 2004b] wykazały, że pofałdowanie

łańcucha bocznego ferulanu n-oktylu skutkuje zwiększeniem zdolności jego cząsteczki do zagnieżdżenia się za pomocą wiązań van der Waalsa w kieszonkach fosfolipidowych umiejscowionych na powierzchni błon biologicznych. Podobna sytuacja ma miejsce w odniesieniu do ferulanu n-dodecyłu, którego cząsteczki wykazują analogiczną konformację. Jednak ze względu na obecność bardziej rozległego i elastycznego łańcucha, wykazują one większą podatność na interakcje. Obecność grupy etylowej w formie rozgałęzionej ferulanu oktylu utrudnia dostęp cząsteczki do części lipidowej błony biologicznej, co uniemożliwia połączenie obu struktur [Anselmi i in. 2004b]. Zdolność integracji cząsteczek estrów z błonami biologicznymi może pozytywnie wpływać na ochronę struktur komórkowych przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego.

Właściwości biologiczne długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych w wysokim stopniu determinowane są zatem ich zdolnościami przeciwutleniającymi oraz strukturą przestrzenną. Związki te wykazują bioaktywność zbliżoną, do tej jaką charakteryzują się kwasy fenolowe, jednak w niektórych przypadkach jest to aktywność wielokrotnie wyższa.

Estry kwasu galusowego, zwłaszcza galusan n-dodecyłu oraz galusan n-oktylu wykazują wyraźne działanie przeciwbakteryjne, ukierunkowane w szczególności przeciw bakteriom Gram-dodatnim. Estry te zwalczają nawet niektóre metycylinooporne szczepy bakterii *Staphylococcus aureus*. Mechanizm działania tych związków polega na zaburzaniu transportu elektronów w łańcuchu oddechowym, który ma miejsce w mezosomach w procesie oddychania komórkowego. Lipofilowe cząsteczki galusanu n-dodecyłu przenikają do wnętrza błony komórkowej gdzie mogą ingerować w procesy biochemiczne oparte na reakcjach utleniania i redukcji [Kubo, Xiao i Fujita 2002; Kubo i in. 2003; Shibata i in. 2005].

Galusan n-oktylu charakteryzuje się nieco niższym działaniem przeciwbakteryjnym niż galusan n-dodecyłu, jednak w odróżnieniu od innych estrów charakteryzuje się wyraźną aktywnością grzybobójczą. Związek ten podobnie jak alkanole, znane ze swoich właściwości grzybobójczych, wykazuje aktywność właściwą dla niejonowych surfaktantów. Obecność tlenu w cząsteczkach galusanu n-oktylu czyni je potencjalnym akceptorem wiązań wodorowych, przez co zdolne są one do zakłócania oddziaływań determinujących konformację białek budujących błony komórkowe grzybów, powodując uszkodzenia w ich obrębie. Ponadto galusan oktylu w kombinacji z aldehydem cytrynowym wykazuje synergizm przeciwko grzybom powodującym deprecjację drewna [Hsu i in.2007; Hsu i in. 2009; Kubo, Xiao i Fujita 2001].

Alkilowe estry kwasu galusowego wykazują także właściwości ograniczania rozwoju wirusa HSV-1 w linii komórkowej HEp-2. Zdolności te zwiększają się wraz ze wzrostem liczby atomów wodoru w łańcuchu bocznym poszczególnych związków. Największą efektywnością charakteryzuje się galusan n-dodecyłu, jednak ze względu na wysoką cytotoksyczność jest on gorzej tolerowany niż galusan n-oktylu charakteryzujący się nieco niższym działaniem przeciwwirusowym [Uozaki i in. 2007].

Kwas galusowy i jego alkilowe pochodne znane są również jako inhibitory tyrozyminy – kluczowego enzymu biorącego udział w procesie melanogenezy. Melanina jest substancją odpowiedzialną za zabarwienie skóry i odgrywa ważną rolę w ochronie przed negatywnym wpływem promieniowania UV. Nadprodukcja i kumulacja melaniny skutkuje jednak powstawaniem różnych schorzeń dermatologicznych. Z tego powodu inhibitory melanogenezy stają się ważnymi składnikami leków i kosmetyków przeciwdziałających hiperpigmentacji [Kim 2007; Kubo i in. 2003; Muñoz-Muñoz i in. 2009].

Lu i in. [2006] udowodnili, że estry kwasu galusowego, dzięki właściwościom przeciwutleniającym oraz odpowiedniej hydrofobowości mogą stanowić ochronę przeciw chorobom neurodegeneracyjnym. Stres oksydacyjny prowadzi do uszkodzenia komórek nerwowych, co skutkuje ich obumieraniem. Jest to szczególnie widoczne w chorobie Parkinsona, która polega na selektywnej degeneracji neuronów w istocie czarnej śródmózgowia, co wiąże się ze spadkiem poziomu dopaminy w *striatum* i powstawaniem charakterystycznych objawów.

Estry kwasów: ferulowego, galusowego i kawowego wykazują zdolność do inhibicji cyklooksygenazy COX-1 i COX-2 oraz hamowania proliferacji komórek nowotworowych w różnych narządach organizmu [Fiuza i in. 2004; Jayaprakasam i in. 2006]. Według wyników badań prowadzonych przez Locatelli i współpracowników [2009] z wykorzystaniem komórek czerniaka złośliwego, kwas galusowy i jego alkilowe pochodne, wykazują selektywną cytotoksyczność ukierunkowaną przeciw komórkom nowotworowym. To specyficzne działanie łączy się ze zdolnością kwasu galusowego i jego estrów do interakcji z glutationem. Spadek stężenia glutationu wiąże się z nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu, co w konsekwencji prowadzi do apoptozy komórek [Locatelli i in. 2009].

## 1.6. Zastosowanie kwasów fenolowych i ich pochodnych w preparatach kosmetycznych

Ze względu na swoje właściwości niektóre z kwasów fenolowych i ich pochodnych znalazły zastosowanie jako składniki preparatów kosmetycznych. Mogą być one zawarte w kosmetykach pod naturalną postacią jako składniki roślinnych surowców leczniczych lub propolisu, a także jako czyste związki wyizolowane z materiału biologicznego bądź otrzymane na drodze syntezy chemicznej. Kwasy fenolowe i ich długołańcuchowe estry dopuszczone do stosowania w preparatach kosmetycznych zostały wymienione w Decyzji Komisji WE z dnia 9 lutego 2006 r. zmieniającej decyzję 96/335/WE ustanawiającą wykaz i powszechne nazewnictwo składników stosowanych w produktach kosmetycznych (Tabela 2).

Największe znaczenie w kosmetyce i lecznictwie mają kwasy takie jak: kwas salicylowy, migdałowy, rozmarynowy, kumarowy, kawowy, galusowy, cykoriowy, chlorogenowy, pferenowy, wanilinowy i synapowy. Związki te niejednokrotnie współdziałają z innymi składnikami terapeutycznymi pochodzenia roślinnego. Odpowiedzialne są one za aktywację procesu złuszczenia naskórka i opóźniają proces starzenia się. Do najpowszechniej wykorzystywanych surowców roślinnych zawierających kwasy fenolowe zalicza się [Jabłońska-Trypuć i Czerpak 2008]:

- Liść i ziele karczocha (*Folium Cynarae et Herba Cynarae*)
- Korzeń cykorii podróżnika (*Radix Cichorii*)
- Ziele i korzeń jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*)
- Ziele i korzeń jeżówki wąskolistnej (*E. angustifolia*)
- Ziele i korzeń jeżówki bladej (*E. pallida*)

Rośliny naczyniowe, głównie wierzbowate (*Salicaceae*), brzoźowate (*Betulaceae*), wrzosowate (*Ericaceae*) i złożone (*Compositae*) są bogatym źródłem pochodnych kwasu salicylowego, który jest znany ze swoich właściwości keratolitycznych, bakteriostatycznych, przeciwgrzybiczych, przeciwzapalnych i zdolności do pochłaniania promieniowania UV [Fiebich i Chrubasik 2004; Jabłońska-Trypuć i Czerpak 2008].

Kwas migdałowy, będący naturalnym składnikiem migdałów, wykazuje właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i złuszczące naskórek oraz stymuluje odbudowę skóry postarzałej i zniszczonej nadmiarem promieniowania UV [Esfahlan, Jamei i Esfahlan 2010; Jabłońska-Trypuć i Czerpak 2008; Moure i in. 2007]. Natomiast kwas rozmarynowy

obecny w wielu ziołach z rodziny wargowych (*Labiatae*) chroni skórę przed szkodliwym działaniem promieniowania UV i reaktywnych form tlenu. Wykazuje on także działanie przeciwzapalne, antyproliferacyjne, przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe [Erkan, Ayranci i Ayranci 2008; Jabłońska-Trypuć i Czerpak 2008].

Tabela 2 Kwasy fenolowe i ich alkilowe estry stosowane w preparatach kosmetycznych

| Nazwa zgodna z INCI   | Nazwa związku chemicznego/IUPAC       | Funkcja                         |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Ferulic acid          | kwask 4-hydroksy-3-metoksy cynamonowy | przeciwdrobnoustrojowa          |
| Gallic acid           | kwask 3,4,5-trihydroksybenzoesowy     | przeciwutleniająca              |
| Propyl gallate        | 3,4,5-trihydroksybenzoesan propylu    | przeciwutleniająca              |
| Dodecyl gallate       | 3,4,5-trihydroksybenzoesan dodecyłu   | przeciwutleniająca              |
| 4-hydroxybenzoic acid | kwask 4-hydroksybenzoesowy            | konserwująca                    |
| Methylparaben         | 4-hydroksybenzoesan metylu            | konserwująca                    |
| Ethylparaben          | 4-hydroksybenzoesan etylu             | konserwująca                    |
| Propylparaben         | 4-hydroksybenzoesan propylu           | konserwująca                    |
| Butylparaben          | 4-hydroksybenzoesan butylu            | konserwująca                    |
| Hydroxycinnamic acid  | kwask 4-hydroksy cynamonowy           | odżywiająca skórę               |
| Salicylic acid        | kwask 2-hydroksybenzoesowy            | konserwująca/keratolityczna     |
| Methyl salicylate     | 2-hydroksybenzoesan metylu            | dezynfekująca/kojąca            |
| Tridecyl salicylate   | 2-hydroksybenzoesan tridecyłu         | antystatyczna/odżywiająca skórę |
| Myristyl salicylate   | 2-hydroksybenzoesan tetradecylu       | odżywiająca skórę               |

Źródło: opracowanie własne na podstawie: [Decyzja Komisji WE z 9 lutego 2006]

Innym składnikiem bogatym w kwasy fenolowe stosowanym powszechnie w kosmetyce pielęgnacyjnej jest propolis pszczeli. Surowiec ten jest żywiczną mieszaniną wytwarzaną przez pszczoły z zebranych przez nie substancji pochodzenia roślinnego. Do głównych składników wchodzących w skład propolisu zalicza się aglikony flawonoidowe, kwasy fenolowe i ich estry, fenolowe aldehydy, alkohole i ketony, a także terpenoidy, steroidy, aminokwasy i związki nieorganiczne. W leczeniu chorób dermatologicznych propolis pszczeli od wielu lat stosowany jest jako środek o działaniu ściągającym, antyseptycznym, przeciwwgrzybiczym, bakteriostatycznym, przeciwwirusowym i fungistatycznym [Sforcin i Bankova 2011].

Substancja ta jest powszechnie stosowana w leczeniu [Sforcin i Bankova 2011]:

- oparzeń,
- kontaktowego zapalenia skóry,
- owrzodzenia podudzi,
- łuszczycy,
- twardziny zlokalizowanej,
- zgorzeli mięszonej,
- ran,
- regeneracji tkanek.

Propolis pszczeli jest składnikiem wielu produktów dostępnych na rynku, spośród których można wyróżnić pasty do zębów, preparaty do płukania ust, kremy do twarzy, maści, lotiony oraz roztwory [Burdock 1998; Marcucci 1994; Kartal i in. 2003; Sforcin i Bankova 2011].

Do kwasów fenolowych cieszących się aktualnie dużą popularnością zalicza się kwas ferulowy. Związek ten może być stosowany w preparatach kosmetycznych jako substancja przeciwdrobnoustrojowa. Obecnie wzrasta również zainteresowanie kwasem ferulowym jako potencjalnym filtrem UV. Badania prowadzone z wykorzystaniem tego związku potwierdziły jego właściwości ochronne przeciw uszkodzeniom wywołanym oddziaływaniem promieniowania UV [Oresajo i in. 2008; Prasad i in. 2007; Saija i in. 2000; Zhang i in. 2010].

Parabeny, czyli estry kwasu 4-hydroksybenzoesowego są jednymi z najszerzej wykorzystywanych środków konserwujących w światowym przemyśle kosmetycznym. Dotyczy to szczególnie parabenów metylu i propylu. Estry kwasu 4-hydroksybenzoesowego wykazują największą skuteczność w zwalczaniu drożdży i pleśni, a ich aktywność polega na

hamowaniu transportu przez błony biologiczne oraz inhibitowaniu procesów mitochondrialnych mikroorganizmów. Parabeny mają wiele zalet, takich jak [Soni i in. 2001]:

- odbarwiania w kontakcie z innymi składnikami,
- niska toksyczność,
- brak wyczuwalnego smaku i zapachu,
- brak efektu odbarwiania w kontakcie z innymi składnikami,
- obojętność chemiczna,
- szeroki zakres aktywności,
- stabilność chemiczna względem temperatury i pH,
- niski koszt,
- biodegradowalność.

Dzięki wymienionym wyżej właściwościom związki te stosowane są w prawie wszystkich typach kosmetyków. Niestety, ze względu na podejrzenia dotyczące kancerogennego działania parabenów, obecność tych składników w recepturach kosmetycznych budzi duże kontrowersje. Z tego powodu istnieje tendencja do ograniczenia stosowania parabenów w preparatach kosmetycznych [Darbre i in. 2004; Shanmugam 2010; Soni i in. 2001; Soni i in. 2002].

Szeroki zakres działania kwasów fenolowych i ich pochodnych wskazuje na duże możliwości ich zastosowania, co zachęca do prowadzenia dalszych badań z ich udziałem.

## **2. Tłuszcze naturalne jako podstawowe surowce kosmetyczne**

### **2.1. Wpływ lipidów na funkcjonowanie organizmu i kondycję skóry**

Lipidy są podstawowym składnikiem odżywczym, odgrywającym znaczącą rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu człowieka. Substancje te stanowią główne źródło energii (9 kcal/g) dla wszystkich tkanek i narządów organizmu, poza czerwonymi ciałkami krwi, nerkami i mózgiem. Między innymi z tego powodu lipidy pełnią rolę substancji zapasowej nagromadzonej w komórkach tłuszczowych tkanki łącznej oraz centrum endokrynnego oddziałującego na organizm [Ziemiański 2001]. Magazynowane w ten sposób lipidy są nie tylko nośnikiem energii, ale mogą także pełnić funkcję izolatora, który chroni organizm przed wychłodzeniem oraz ułatwia adaptację do niskich temperatur [Gertig i Przysławski 2006]. Tłuszcz okołonarządowy zapewnia natomiast odpowiednie położenie narządów wewnętrznych, np. nerek, chroniąc je przed przemieszczeniem oraz urazami mechanicznymi [Gertig i Przysławski 2006; Ziemiański 2001].

Lipidy znane są również z funkcji budulcowej. Wchodzą one w skład błon komórkowych i białej masy mózgu, a także biorą udział w powstawaniu niektórych substancji biologicznie czynnych. Na szczególną uwagę zasługują fosfolipidy, które ze względu na amfipatyczny charakter decydują o przepuszczalności błon biologicznych [Ziemiański 2000].

Tłuszcze naturalne są również znakomitym nośnikiem substancji towarzyszących, do których zalicza się witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, sterole, karotenoidy, kwasy tłuszczowe i inne składniki [Ziemiański 2001]. Spośród wymienionych substancji na szczególną uwagę zasługują kwasy tłuszczowe, które w znacznym stopniu determinują właściwości tłuszczów i ich wpływ na zdrowie człowieka. W tłuszczach naturalnych mogą one występować w formie wolnej bądź wchodzić w skład acylogliceroli [Gertig i Przysławski 2006; Ziemiański 2001].

Największą wartość biologiczną wykazują tłuszcze bogate w nienasycone kwasy tłuszczowe, które poza swoją podstawową funkcją, pełnią także pozytywną rolę w zapobieganiu wielu schorzeniom (Schemat 5). Aktywność biologiczna cząsteczek nienasyconych kwasów tłuszczowych wynika z ich konfiguracji cis oraz ilości i określonego położenia wiązań podwójnych. Największy wpływ na rozwój i funkcjonowanie organizmu człowieka wywierają wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Są to kwasy tłuszczowe zawierające co najmniej dwa wiązania podwójne w cząsteczce i co najmniej 18 atomów



węgla w łańcuchu węglowodorowym. Występują dwie podstawowe rodziny wielonienasyconych kwasów tłuszczowych:

- Kwasy tłuszczowe z rodziny n-3 – posiadające pierwsze wiązanie podwójne przy trzecim atomie węgla od strony grupy metylowej, np. kwasy:  $\alpha$ -linolenowy, eikozapentaenowy i dokozaheksaenowy,
- Kwasy tłuszczowe z rodziny n-6 – posiadające pierwsze wiązanie podwójne przy szóstym atomie węgla od strony grupy metylowej, np. kwasy:  $\alpha$ -linolowy,  $\gamma$ -linolenowy i arachidonowy.

Kwasy linolowy i  $\alpha$ -linolenowy określa się mianem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, ponieważ z powodu braku odpowiednich enzymów, organizm ludzki nie jest w stanie ich syntezować [Achramowicz i Szary - Swost 2005; Bojanowicz i Woźniak 2008; McCusker i Grant-Kels 2010].

Tłuszcze w istotny sposób wpływają na prawidłowe funkcjonowanie skóry. Wynika to przede wszystkim z roli budulcowej tych składników.

Warstwa rogowa naskórka jest głównym elementem ochronnym skóry, umożliwiającym utrzymanie równowagi między środowiskiem zewnętrznym a wewnętrznym organizmu. Wynika to z jej charakterystycznej struktury, w której keranocyty układają się na wzór ceglanego muru. Te uznawane za martwe, pozbawione jąder komórki połączone są spoiwem międzykomórkowym utworzonym z mieszaniny wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, cholesterolu i ceramidów (sfingolipidów). O efekcie barierowym skóry decydują keratyna, tłuszcze i budowa anatomiczna, które umożliwiają przenikanie przez skórę substancji zewnątrzpochoźnych oraz spowalniają dyfuzję wody pochodzącej z głębszych warstw skóry właściwej, regulując tym samym stopień nawilżenia skóry [Kendall i Nikolaou 2013; Martini 2009; Nicolaou, Pilkington i Rhodes 2011].

Faza tłuszczowa wchodząca w skład warstwy rogowej naskórka może stanowić nośnik dla substancji lipofilowych umożliwiając ich magazynowanie. Dotyczy to w szczególności ceramidów (sfingolipidy), które tworzą strukturę umożliwiającą wbudowywanie się innych cząsteczek. Dzięki temu substancje te mogą ulegać dyfuzji w kierunku głębszych warstw skóry [Martini 2009].

Niedobór wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, zwłaszcza linolowego i  $\gamma$ -linolenowego, a także zaburzenia ich metabolizmu mogą skutkować występowaniem wielu schorzeń takich jak łuszczyca i zapalenie atopowe skóry oraz nadmiernym wysuszeniem skóry, które objawia się [Bojanowicz i Woźniak 2008; Horrbin 2000]:

- odczuciem szorstkości i napięcia skóry,
- rogowaceniem naskórka,
- występowaniem złuszczeń, drobnych pęknięć i zmarszczek,
- zmniejszoną odpornością na szkodliwe czynniki zewnętrzne,
- trudnościami w gojeniu ran i uszkodzeń,
- powstawaniem zmian trądzikowych
- wzmożoną wrażliwością na alergeny i inne substancje drażniące.

Innym ważnym składnikiem budującym skórę są fosfolipidy, wchodzące w skład błon komórkowych. Substancje te, zwłaszcza lecytyna, regulują oddychanie skóry i wymianę materiału komórkowego. Ponadto w procesie keratynizacji naskórka związki te dostarczają wolnych kwasów tłuszczowych, przez co wpływają na utrzymanie prawidłowego pH skóry [Bojanowicz i Woźniak 2008].

Istotną rolę w zachowaniu odpowiedniego stanu skóry pełni także płaszcz wodno-lipidowy pokrywający warstwę rogową naskórka. Jest to emulsja wodno-tłuszczowa składająca się z wody pochodzącej z gruczołów potowych oraz substancji tłuszczowych, będących mieszaniną wydzieliny gruczołów łojowych i frakcji lipidów naskórkowych powstających w procesie keratynizacji. W skład wymienionej fazy lipidowej wchodzi: wolne kwasy tłuszczowe, triacyloglicerole, woski, cholesterol i jego estry, skwalen i węglowodory. Płaszcz wodno-lipidowy jest odpowiedzialny za utrzymywanie kwaśnego pH skóry i tworzenie bariery naskórkowej, a także nadaje skórze odpowiedni połysk [Marcinkiewicz - Salomonowiczowa 1995; Martini 2009].

Znaczne nagromadzenie substancji lipidowych występuje również w adipocytach (komórkach tłuszczowych) tkanki podskórnej, która pełni funkcję podporową oraz ochronną dla naczyń krwionośnych i nerwów, a także zawiera części wydzielnicze gruczołów potowych. Tłuszcz zawarty w komórkach tłuszczowych decyduje o właściwościach izolacyjnych tkanki podskórnej oraz stanowi zapas energii [Marcinkiewicz - Salomonowiczowa 1995; Martini 2009].

## ***NIENASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE***

### **JEDNONIENASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE**

#### **CIS**

- obniżanie poziomu cholesterolu całkowitego i cholesterolu w lipoproteinach małej gęstości LDL,
- ochrona przed oksydacyjną modyfikacją w lipoproteinach

#### **TRANS**

- podwyższanie poziomu cholesterolu całkowitego i cholesterolu w lipoproteinach małej gęstości LDL,
- wpływ na niską masę urodzeniową niemowląt,
- zwiększenie poziomu insuliny we krwi w odpowiedzi na obciążenie glukozą,
- zaburzenia procesów reprodukcyjnych,
- inhibicja  $\Delta$ -6-desturazy,
- zwiększenie aktywności oksydazy cytochromowej P-448/450 oraz aktywności peroksymalnej

### **WIELONIENASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE**

#### **NIENZĘDNE NIENASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE n – 3 i n – 6**

- budulec fosfolipidów, błon biologicznych, organelli wewnątrzkomórkowych i struktur receptorowych komórek nerwowych,
- uczestnictwo w syntezie enzymów i licznych neurotransmiterów (DHA – substrat w syntezie serotoniny i dopaminy),
- pozytywny wpływ na rozwój umysłowy i psychoruchowy dzieci i niemowląt,
- działanie hipocholesterolemiczne,
- regulacja agregacji płytek krwi poprzez wpływ na produkcję trombosanu  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) i prostacykliny (PGI<sub>2</sub>)
- działanie hipotensyjne,
- wspomaganie leczenia choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy poprzez udział w syntezie prostaglandyny PGE<sub>2</sub> o działaniu cytoprotekcyjnym

Schemat 5 Wpływ nienasyconych kwasów tłuszczowych na organizm człowieka

Źródło: opracowanie własne na podstawie: [Bartnikowska i in 1999; Bartnikowska 2007; Gertig i Przesławski 2005; Kuhnt i Jahreis 2006; List, Adlof i King. 2005; Tapiero i in. 2002; Seki, Tani i Arita 2009]

## **2.2.Charakterystyka naturalnych tłuszczów stosowanych w produkcji preparatów kosmetycznych**

Tłuszcze i preparaty tłuszczowe zalicza się do podstawowych składników stosowanych w kosmetyce i przemyśle kosmetycznym. Mogą być one wykorzystywane jako fazy tłuszczowe niezbędne do wytwarzania emulsji, bazy sztyftów, emulgatory i koemulgatory, czy też składniki konsystencjotwórcze.

Tłuszcze naturalne, których głównym składnikiem są triacyloglicerole wykazują większe powinowactwo do skóry niż oleje mineralne bądź silikon. Wynika to ze struktury i funkcji tych substancji, które są zbliżone do substancji budujących skórę. Z tego powodu tłuszcze naturalne zewnętrznie podawane na skórę wykazują aktywność dermatologiczną, umożliwiającą ochronę organizmu przed utratą wody oraz regenerują uszkodzoną barierę lipidową naskórka, wpływając odmładzająco na wygląd skóry. Dodatkowo, faza lipidowa pełni funkcję nośnika substancji aktywnych, które przenikając do głębszych warstw skóry, w określony sposób wpływają na jej kondycję [Marzec 2009].

Ze względu na pochodzenie rozróżnia się dwie kategorie tłuszczów naturalnych: roślinne i zwierzęce.

Tłuszcze roślinne są substancjami ciekłymi, będącymi mieszaniną estrów gliceryny i kwasów tłuszczowych spośród, których największy udział stanowią nienasycone kwasy tłuszczowe. W zależności od dominującego kwasu tłuszczowego wyróżnia się trzy typy olejów roślinnych: oleinowe, linolowe i linolenowe [Martini 2009].

Oleje roślinne typu oleinowego składają się głównie z triacylogliceroli zawierających reszty kwasu oleinowego. Najpopularniejsze oleje zaliczane do tej kategorii to olej migdałowy, arachidowy, z orzechów laskowych, z baobabu afrykańskiego i oliwa z oliwek [Martini 2009, McCusker i Grant-Kels 2010].

Oleje te mogą być wykorzystywane jako podstawa fazy tłuszczowej. Ze względu na trudności w zemulgowaniu, są one jednak często mieszane z olejami mineralnymi. Obecność reszt kwasu oleinowego w tych surowcach wzmacnia efekt wchłaniania przezskórnego substancji biologicznie aktywnych. Oleje te mogą być stosowane do leczenia ran, zabiegów natłuszczania skóry i masażu, a także do produkcji olejków do kąpieli, kremów, emulsji i mleczek kosmetycznych. [Aburjai i Natsheh 2003, Vermaak i in 2011].

Oleje roślinne typu linolowego są w dużej mierze złożone z triglicerydów bogatych w reszty kwasu linolowego. Większość z nich cieszy się dużą popularnością w przemyśle spożywczym. Dotyczy to oleju: słonecznikowego, sojowego, sezamowego, kukurydzianego, a

także oleju z pestek winogron. Natomiast oleje: arganowy, cajou, carthame czy *Passiflora incarnata*, przeznaczone są głównie do użytku zewnętrznego. Ten typ oleju wykazuje efekt przeciwzapalny i wspomaga leczenie trądziku pospolitego [Martini 2009; McCusker i Grant-Kels 2010]

Oleje roślinne typu linolenowego są źródłem triacylogliceroli zawierających znaczne ilości reszt kwasu  $\alpha$ -linolenowego i  $\gamma$ -linolenowego. Do najpopularniejszych zalicza się olej lniany, z ogórecznika i z wiesiołka oraz olej z pestek czarnej porzeczki. Ze względu na niską trwałość stosowane są one w niskich stężeniach (2-5%). Dzięki obecności wielonienasyconych kwasów tłuszczowych substancje te uczestniczą w odbudowie spoiwa lipidowego warstwy rogowej. Z tego powodu wykorzystuje się je do produkcji różnego rodzaju emulsji, sztyftów, lipokremów oraz dodatków spożywczych uczestniczących w leczeniu skóry [Martini 2009; McCusker i Grant-Kels 2010].

Oleje roślinne bardzo często poddawane są różnym modyfikacjom, mającym na celu zmianę ich właściwości fizykochemicznych. Typy najpowszechniej stosowanych przemian zostały przedstawione w tabeli 3.

Tłuszcze pochodzenia zwierzęcego są substancjami o konsystencji stałej lub płynnej, w których skład wchodzi triacyloglicerole bogate głównie w nasycone kwasy tłuszczowe. Z tego powodu ich zastosowanie w produkcji preparatów kosmetycznych jest dużo mniej popularne niż tłuszczów pochodzenia roślinnego [Marzec 2009].

Oleje zwierzęce są mieszaniną triacylogliceroli zawierających co najmniej jedną resztę kwasu tłuszczowego o nieparzystej liczbie atomów węgla. Zalicza się do nich przede wszystkim oleje skwalenowe, będące bogatym źródłem witamin A, D i E. Tłuszcze te pełnią funkcję środków gojących i przeciwrodnikowych [Martini 2009].

W preparatyce kosmetycznej stosowane są również olej z norki o działaniu natłuszczającym w emulsjach i szamponach, a także olej z gardłosza atlantyckiego (*Hoplosthetus atlanticus*) o właściwościach natłuszczających i nawilżających [Kececioglu Draelos 1995; Martini 2009]. Cennym surowcem kosmetycznym jest również tran, który po utwardzeniu wykorzystuje się do produkcji kredek do warg oraz drogich kosmetyków specjalnych. Pełni on także ważną funkcję dermatologiczną związaną z leczeniem oparzeń, odmrożeń, odleżyn, wrzodów i trudno gojących się ran.

Inną kategorię surowców tłuszczowych wykorzystywanych do produkcji kosmetyków stanowią masła. Substancje te dzięki obecności triacylogliceroli zawierających reszty nasyconych kwasów tłuszczowych przyjmują konsystencję papkowatą [Martini 2009].

Spośród masel stosowanych do produkcji kosmetyków warto wyróżnić masło kakaowe oraz masło karité. Pierwsze z nich stosowane jest do wytwarzania maści, kremów, emulsji, czopków oraz kredek i szminek do warg. Masło karité natomiast ze względu na właściwości natłuszczające i przeciwrodnikowe stosowane jest w mydlarstwie oraz do produkcji preparatów nawilżających, kremów i śmietanek kosmetycznych. Ze względu na niższą cenę masło karité jest częściej stosowane w przemyśle kosmetycznym niż masło kakaowe, które cieszy się dużą popularnością w przemyśle spożywczym [Bail i in. 2009].

Tabela 3 Modyfikacje olejów roślinnych stosowanych w produkcji preparatów kosmetycznych

| <b>Modyfikacja</b>             | <b>Charakter przemiany</b>   | <b>Produkty przemiany</b>  |
|--------------------------------|--|--|
| Utwardzanie                    | Addycja wodoru do wiązań podwójnych  | Tłuszcze stałe, zwiększające lepkość fazy tłuszczowej, o temperaturze topnienia powyżej 40°C                                       |
| Oksyetylenowanie               | Przyłączenie cząsteczek tlenu etylenu do cząsteczki triacyloglicerolu                            | Pochodne o charakterze amfifilowym, cechujące się lepszą rozpuszczalnością w wodzie niż poddane modyfikacji tłuszcze               |
| Interestryfikacja              | Pogrupowanie reszt w obrębie jednej cząsteczki lub pomiędzy dwoma cząsteczkami triacylogliceroli | Tłuszcze o zmienionych właściwościach fizykochemicznych takich, jak: lepkość, temperatura topnienia, napięcie powierzchniowe       |
| Alkoholiza (transestryfikacja) | Zmiana jednego z łańcuchów tłuszczowych estru na inny  | Tłuszcze o zmienionym profilu kwasów tłuszczowych, o innych właściwościach fizykochemicznych w porównaniu z tłuszczem wyjściowym   |
| Glikozylacja                   | Transestryfikacja naturalnych triacylogliceroli w obecności glicerolu i glikolu polietylenowego  | Produkty amfifilowe, rozpuszczalne w wodzie, wykazujące dobre powinowactwo do skóry i ułatwiające przenikanie czynników aktywnych. |

Źródło: opracowanie własne na podstawie: [Martini 2009]

## **2.3.Zmiany oksydacyjne zachodzące w tłuszczach podczas ich przechowywania**

### **2.3.1. Autooksydacja**

Tłuszcze roślinne, bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, są ważnymi składnikami kosmetyków i żywności, wywierającymi pozytywny wpływ na funkcjonowanie organizmu i kondycję skóry. Niestety w trakcie przechowywania substancje te są szczególnie podatne na procesy utleniania, które w istotny sposób mogą wpływać na

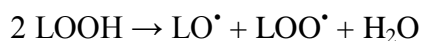
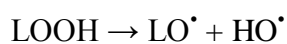
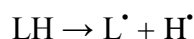
pogorszenie się cech organoleptycznych tłuszczów, powodować obniżenie ich wartości odżywczych oraz skutkują powstawaniem produktów utleniania o działaniu toksycznym.

Wyróżnia się dwa mechanizmy utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych: autooksydacja i utlenianie fotosensybilizowane.

W mechanizmie autooksydacji rozróżnia się trzy etapy:

- inicjację,
- propagację
- terminację.

Inicjacja procesu utleniania następuje poprzez formowanie się wolnych rodników tłuszczowych, powstających w wyniku kontaktu nienasyconych kwasów tłuszczowych z tlenem tripletowym ( $^3\text{O}_2$ ). Proces ten może zachodzić poprzez odłączenie rodnika wodorowego od grupy metylenowej kwasu tłuszczowego bądź na drodze addycji wolnego rodnika do wiązania podwójnego [Jadhav i in. 1996]. Reakcje inicjacji opisują następujące równania:



gdzie:

$\text{L}^\bullet$  - rodnik lipidowy,

$\text{LO}^\bullet$  - rodnik alkoksyłowy,

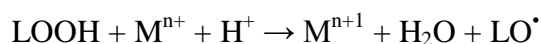
$\text{LOO}^\bullet$  - rodnik nadtlenkowy,

$\text{HO}^\bullet$  - rodnik wodorotlenowy

$\text{LOOH}$  – wodoronadtlenek lipidowy.

Rodnik wodorotlenowy jest najbardziej aktywnym rodnikiem w procesie inicjacji, który powoduje odłączenie atomu wodoru od cząsteczki kwasu. Autokataliza reakcji łańcuchowej może następować poprzez formowanie się rodników wodorotlenowych wskutek oddziaływania jonów metali przejściowych takich jak np.  $\text{Fe}^{2+}$  [Benedet i Shibamoto 2008].

Proces powstawania rodników alkoksyłowych z udziałem metali przejściowych obrazuje natomiast zmodyfikowane równanie reakcji Fentona:

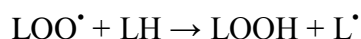
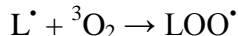


gdzie:

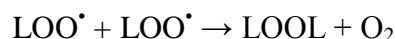
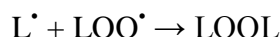
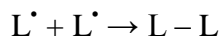
$\text{M}^{n+}$ ,  $\text{M}^{n+1}$  – jony metali przejściowych.

Wpływ na inicjację procesu utleniania tłuszczów wywierają również czynniki takie jak ogrzewanie i ekspozycja na promieniowanie [Benedet i Shibamoto 2008].

Podczas etapu propagacji wolne rodniki powstałe podczas inicjacji procesu utleniania wchodzi w reakcje z innymi cząsteczkami kwasów tłuszczowych. Przyczynia się to do zapoczątkowania reakcji łańcuchowej, która skutkuje powstawaniem rodników nadtlenkowych i lipidowych. Rodniki lipidowe mogą ulegać propagacji według dwóch mechanizmów: poprzez reakcję z tlenem trypletowym oraz na drodze odczepienia atomu wodoru. Ze względu na wysoką reaktywność poszczególnych rodników, reakcje podczas tego etapu powtarzają się do momentu wyczerpania substratów w układzie. Etap propagacji przebiega zgodnie z przedstawionymi równaniami reakcji:



Terminacja jest zakończeniem reakcji łańcuchowej. W trakcie tego etapu, na skutek rekombinacji wolnych rodników, powstają stabilne, nierodnikowe produkty. Reakcje etapu terminacji obrazują następujące równania:



### 2.3.2. Utlenianie fotosensybilizowane

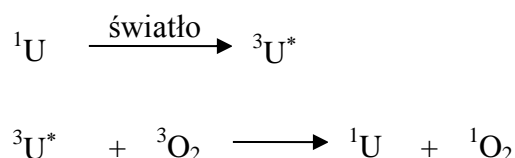
Tlen w stanie podstawowym, zwany tlenem trypletowym ( ${}^3\text{O}_2$ ), jest birodnikiem, czyli ma dwa niesparowane elektrony. Jest to najpowszechniejsza i najstabilniejsza forma tlenu



występująca w przyrodzie. Przekształcenie tlenu w stanie podstawowym do stanu wzbudzonego wymaga dostarczenia energii umożliwiającej przegrupowanie elektronów w cząsteczce w ten sposób, by zostały one sparowane. Może to nastąpić poprzez zaabsorbowanie kwantu promieniowania UV przez cząsteczkę tlenu trypletowego lub w wyniku niektórych reakcji chemicznych. Dotyczy to w szczególności reakcji pomiędzy tlenem trypletowym a tzw. fotosensybilizatorem (fotouczulaczem) [Bartosz 2006].

Fotosensybilizatorami są najczęściej związki zawierające w swoich cząsteczkach układy chromoforowe. Są to barwniki takie jak: błękit metylenowy, fluoresceina, ftalocyanina, bilirubina, flawiny, chlorofil itp. [Pospisil, Nespurek i Pilar 2008; Tejero i in. 2004].

W wyniku zaabsorbowania kwantu światła, cząsteczka fotosensybilizatora przechodzi w stan wzbudzony (najczęściej jest to stan trypletowy). W tej formie może ona wchodzić w reakcje z tlenem trypletowym, w trakcie których następuje przekazanie zaabsorbowanej energii cząsteczce tlenu. W rezultacie powstaje cząsteczka tlenu w stanie singletowym (stan wzbudzony) oraz cząsteczka fotosensybilizatora w stanie podstawowym [Bartosz 2006].



U - fotosensybilizator

Powstały w ten sposób tlen singletowy ( ${}^1\text{O}_2$ ) jest znacznie bardziej reaktywny niż tlen trypletowy i może ulegać addycji do wiązań podwójnych kwasów tłuszczowych. Transfer atomów wodoru z sąsiadującej grupy  $-\text{CH}_2-$  do przyłączonego tlenu powoduje powstawanie wodoronadtlenków lipidowych, ulegających dalszemu rozpadowi. Może to być przyczyną tworzenia się wolnych rodników alkoksyłowych, nadtlenkowych i hydroksyłowych, zdolnych do uczestniczenia w reakcjach łańcuchowych [Tajero i in. 2004].

### **2.3.3. Wpływ produktów utleniania tłuszczów na jakość produktów i fizjologię organizmu**

Procesy utleniania zachodzące we frakcji tłuszczowej preparatów kosmetycznych lub żywności mogą indukować szereg zmian ich właściwości, polegających na pogorszeniu ich

cech organoleptycznych oraz obniżeniu ich wartości odżywczej. Ponadto powstające wskutek zmian oksydacyjnych pierwotne i wtórne produkty utleniania mogą przyczyniać się do rozwoju wielu schorzeń oraz wpływać na procesy starzenia. Z tego powodu proces utleniania tłuszczów uznaje się za zjawisko niepożądane, prowadzące do znacznego pogorszenia jakości preparatów kosmetycznych i żywności.

Pierwotnymi produktami utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych są nadtlenki i wodoronadtlenki lipidowe. Związki te mogą być metabolizowane w przewodzie pokarmowym do nieszkodliwych hydroksykwasów [Cichosz 2008]. Niestety ze względu na wysoką reaktywność mogą one również ulegać dalszym przekształceniom prowadzącym do powstawania wolnych rodników i wtórnych produktów utleniania takich jak estry, etery, laktony, alkohole, aldehydy, ketony, kwasy, sprzężone dieny i związki cykliczne. Związki te zwykle charakteryzują się dużą lotnością, przez co mogą wywoływać niekorzystne zmiany w smaku i zapachu tłuszczów. Dotyczy to w szczególności ketonów winylowych i trans, cis-alkadienali, charakteryzujących się najniższym progiem wyczuwalności oraz heksanalu i nonanalu, które wykazują najwyższy stopień przyrostu stężenia w procesie utleniania tłuszczów bogatych w kwasy linolowy i linolenowy [Gromadzka i Wardnecki 2009, Jacobsen 2000; Panseri i in. 2011].

Innymi wyróżnikami sensorycznymi, na które mogą wpływać zmiany oksydacyjne frakcji tłuszczowej to jednorodność układów heterofazowych oraz barwa. W wyniku nagromadzenia produktów utleniania może nastąpić rozwarstwienie emulsji, natomiast utlenianie barwników skutkuje utratą pierwotnej barwy [Marcinkiewicz-Salomonowiczowa 1995].

Wtórne produkty utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych mogą również wchodzić w interakcje z innymi składnikami preparatów kosmetycznych i żywności, takimi jak białka, witaminy i sterole powodując ich degradację. W wyniku tworzenia się wiązań sieciujących w kompleksach białkowo-lipidowych oraz reakcji grup funkcyjnych aminokwasów z produktami utleniania tłuszczów następuje pogorszenie strawności i stopnia przyswajalności aminokwasów, co wpływa na obniżenie wartości odżywczej białek. Najbardziej podatne na przemiany są grupy aminowa, sulfhydrylowa i karboksylowa [Cuq i in. 2013; Rodríguez-Carpena, Morcuende i Estévez 2011; Korczak i Hęś 2007].

Produkty utleniania steroli wykazują natomiast niekorzystny wpływ na funkcjonowanie błon komórkowych, hamują syntezę DNA i cholesterolu oraz wykazują

działanie immunosupresyjne, angiotoksyczne, cytotoksyczne, mutagenne i kancerogenne [Cichosz 2008, Guardiola i in 1996].

Aldehydy, ketony, kwasy i węglowodory powstające z pierwotnych produktów utleniania wykazują wysoką aktywność biologiczną, co skutkuje zdolnością do uszkodzania błon komórkowych i struktur wewnątrzkomórkowych, inhibicji enzymów oraz działania aterogenego i cytotoksycznego [Cichosz 2008].

Pierwotne i wtórne produkty utleniania mogą ponadto zaburzać równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną organizmu obniżając skuteczność nieenzymatycznych i enzymatycznych, endogennych systemów, chroniących komórki przed niszczącym wpływem reaktywnych form tlenu. Prowadzi to do powstania stresu oksydacyjnego, w trakcie którego uwytatnieniu może ulegać proces peroksydacji lipidów. Peroksydacja lipidów jest procesem rodnikowym polegającym na utlenianiu lipidów komórkowych zawierających nienasycone kwasy tłuszczowe z udziałem reaktywnych form tlenu oraz rodników nadtlenkowych, alkoksyłowych i alkilowych. Podobnie jak w przypadku procesu autooksydacji w procesie peroksydacji wyróżnia się trzy etapy: inicjację, propagację i terminację [Bartosz 2006; Hopps i in. 2010, Onyango 2012].

Proces peroksydacji lipidów prowadzi do powstawania zmian w obrębie struktur komórkowych wywierając tym samym wpływ na ich funkcjonowanie. Produkty peroksydacji lipidów modyfikują właściwości fizyczne błon plazmatycznych. Poprzez wprowadzenie grup polarnych w obrębie cząsteczek fosfolipidów wnętrza błon biologicznych następuje obniżenie hydrofobowości lipidowej części membran i zmiana organizacji dwuwarstwy. W wyniku tych zmian zwiększa się przepuszczalność błony dla jonów  $H^+$  i innych substancji polarnych, których dyfuzja w obiektywnych warunkach jest ograniczona. Dodatkowym skutkiem peroksydacji lipidów jest depolaryzacja błony będąca następstwem zmniejszenia różnicy potencjałów po obu stronach membrany [Bartosz 2006; Pamplona 2008].

Za biologiczne konsekwencje zwiększenia zniszczeń molekularnych struktur komórkowych uznaje się: zmiany ekspresji genów, mutacje, zanik potencjału dzielenia się komórek, molekularną heterogenność, osłabienie komunikacji międzykomórkowej, dezorganizację tkanek, a także dysfunkcję organów i wzrost wrażliwości organizmu na stres [Rattan 2006; Karolkiewicz 2011].

Nadtlenki kwasów tłuszczowych i aldehydowe produkty peroksydacji osłabiają zależność pomiędzy transportem elektronów przez łańcuch oddechowy a syntezą ATP w mitochondriach, powodując spadek wydajności procesów oddychania komórkowego

[Cardoso, Pereira i Oliveira 1999]. Ponadto związki te wykazują szerokie działanie cytotoksyczne i genotoksyczne, co może być przyczyną powstawania mutacji oraz przyczyniać się do inicjacji procesu kancerogenezy [Hidalgo, Nogales i Zamora 2008].

Gromadzące się na skutek stresu oksydacyjnego w organizmie wolne rodniki i reaktywne formy tlenu i azotu mogą oddziaływać z kwasami nukleinowymi powodując ich uszkodzenie. Zmiany oksydacyjne DNA dotyczą w szczególności bezpośrednich reakcji rodnika hydroksylowego ( $\text{OH}^\bullet$ ) z nukleotydami DNA, wprowadzenia uszkodzonego nukleotydu do DNA w trakcie replikacji bądź poprzez tworzenie adduktów objętościowych DNA z utlenionymi białkami i lipidami. Według danych literaturowych więcej zniszczeń oksydacyjnych zachodzi z udziałem mitochondrialnego DNA niż jądrowego. Zmiany te są źródłem mutagenyzy w mitochondriach co jest jednym z podstawowych czynników dotyczących procesu starzenia [Hiona i Leeuwenburgh 2008, Valle 2011]. W wyniku wspomnianych uszkodzeń pojawia się postępujące wraz z wiekiem osłabienie układu odpornościowego, tkanki kostnej i skóry [Rattan 2006].

Wpływ wolnych rodników i reaktywnych form tlenu może przyczyniać się również do uszkodzeń w obrębie białek komórkowych oraz białek enzymatycznych. Najbardziej podatne na procesy utleniania są sulfoaminokwasy np. cysteina i metionina oraz aminokwasy aromatyczne np. fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan. Zmiany zachodzące z udziałem pierwszej wymienionej grupy aminokwasów mogą ulegać odwróceniu natomiast modyfikacje w obrębie pozostałych aminokwasów są ostateczne. Do chorób w trakcie których obserwowano podwyższony poziom oksydacyjnie zmienionych białek zalicza się: miażdżycę, cukrzycę, niewydolność nerek, mocznicę, zaćmę, posocznicę, dystrofię mięśniową, progerię, choroby neurodegeneracyjne i nowotwory [Berlett i Stadtman 1997; Choksi i Papaconstantinou 2008].

Innymi strukturami szczególnie podatnymi na zmiany oksydacyjne są lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL). Udowodniono, że oksydacyjna modyfikacja cholesterolu we frakcji LDL, odbywająca się w trakcie przechodzenia lipoprotein przez barierę śródbłonkową należy do głównych mechanizmów patogenezy miażdżycy. Oksysterole mogą indukować modyfikacje właściwości błon komórkowych zwiększając wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia, obniżając wydzielanie prostacyklin do komórek śródbłonkowych i pogarszając funkcje barierowe śródbłonka [Linesen i Wolfram 1998, Rosenfeldt i in. 2013].

Opisane zmiany zachodzące w obrębie struktur komórkowych pod wpływem stresu oksydacyjnego w szczególny sposób oddziałują na kondycję i fizjologię skóry, która ze

względu na rolę jaką pełni, jest szczególnie podatna na wpływ chemicznych i fizycznych czynników zewnętrznych wzmacniających oddziaływanie reaktywnych form tlenu.

Do substancji budujących skórę szczególnie podatnych na zmiany oksydacyjne zalicza się glicerofosfolipidy, sfingolipidy, nienasycone kwasy tłuszczowe i cholesterol [Lasch i in. 1997]. Wtórne produkty utleniania tych związków, takie jak 4-hydroksynonenal lub aldehyd dimalonowy mogą powodować denaturację białek, apoptozę komórek, uwalnianie mediatorów reakcji zapalnych a także reagować z DNA tworząc addukty, co przyczynia się do powstawania mutacji [Bickers i Athar 2010; Lasch i in. 1997; Trommer i in 2001]. Powstawanie zmian oksydacyjnych w obrębie białek przyczynia się natomiast do przedwczesnego starzenia skóry, a efekt ten wspomagany jest poprzez oddziaływanie promieniowania w zakresie UV [Bartosz 2006]. Dane literaturowe wskazują także na udział stresu oksydacyjnego w patogenezie wielu schorzeń dermatologicznych takich jak trądzik pospolity [Bowe i Logan 2010], łuszczyca [Choksi i Papaconstantinou 2008], bielactwo, zapalenie skóry oraz nowotwory [Bickers i Athar 2010].

### **3. Przeciwutleniacze jako składniki przedłużające trwałość preparatów kosmetycznych**

#### **3.1. Przeciwutleniacze stosowane w produkcji preparatów kosmetycznych**

Emulsje kosmetyczne są układami nietrwałymi, które w trakcie przechowywania mogą ulegać licznym przemianom powodującym trwałe pogorszenie ich jakości. Dotyczy to w szczególności procesów utleniania, mogących być przyczyną pogorszenia cech organoleptycznych preparatów kosmetycznych i utraty ich właściwości pielęgnacyjnych. Ponadto kontakt toksycznych produktów utleniania tłuszczów ze skórą może skutkować powstawaniem uczuleń, podrażnień i miejscowych stanów zapalnych skóry. Z tego powodu bardzo istotne jest stosowanie zabiegów mających na celu maksymalne ograniczenie procesów utleniania w tych produktach.

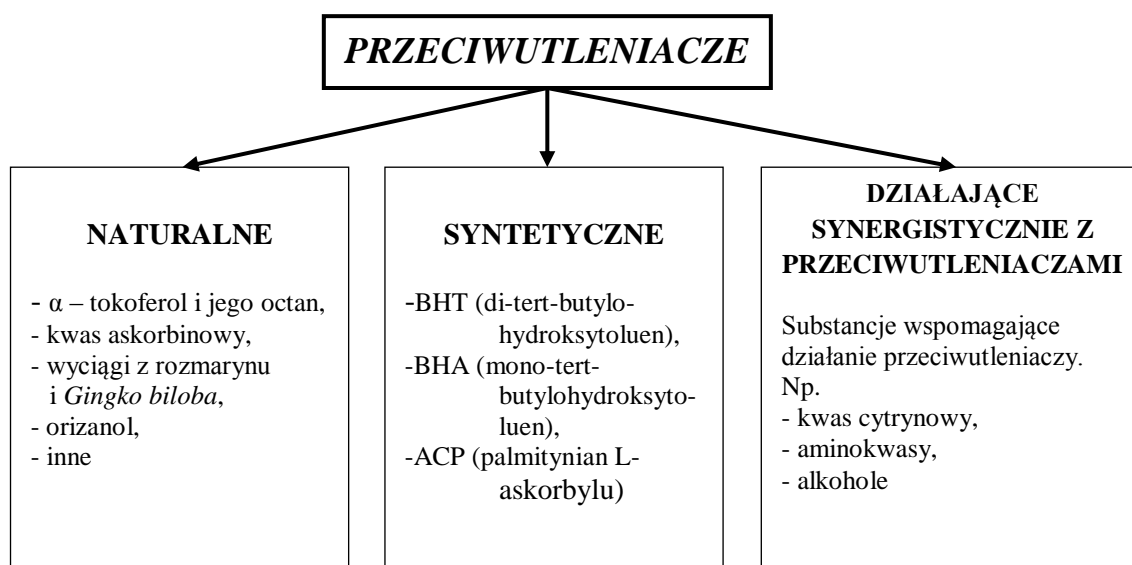
Problem niepożądanych skutków utleniania tłuszczów dotyczy zarówno etapu surowców jak i wyrobu gotowego. Proces rafinacji, któremu często poddawane są surowce tłuszczowe, zapewnia usunięcie substancji niepożądanych, ale jednocześnie może powodować całkowitą lub częściową degradację naturalnych substancji o działaniu przeciwutleniającym. Z tego powodu tłuszcze wprowadzane do preparatów kosmetycznych wymagają ochrony przed procesami autooksydacyjnymi [Marcinkiewicz-Salomonowiczowa 1995].

Proces utleniania tłuszczów może być kontrolowany poprzez różne zabiegi technologiczne, takie jak: kontrola stopnia utlenienia składników tłuszczowych, kontrola obecności proutleniaczy w układzie oraz poprzez stosowanie przeciwutleniaczy [Wilailuk, McClements i Decker 2005].

Przeciwutleniacze są substancjami wprowadzanymi do produktu w celu ograniczenia procesu autooksydacji. Ich charakterystyczną cechą jest to, że wykazują efektywne działanie w bardzo niskich stężeniach, rzędu 0,001 -0,1% [Marzec 2009]. Substancje stosowane jako przeciwutleniacze w produkcji preparatów kosmetycznych muszą spełniać szereg wymogów, spośród których największe znaczenie mają [Marcinkiewicz-Salomonowiczowa 1995; Marzec 2009]:

- całkowita nieszkodliwość dla zdrowia,
- brak oddziaływania na cechy organoleptyczne utrwalanego preparatu, takie jak: smak, zapach i wygląd,
- wysoka stabilność termiczna oraz odporność na działanie czynników fizycznych i chemicznych,
- dobra rozpuszczalność w stabilizowanej fazie,
- łatwa dostępność,
- niska cena,
- możliwość wykrycia w stabilizowanej substancji.

Przeciwutleniacze stosowane w produkcji preparatów kosmetycznych można podzielić na trzy podstawowe grupy, przedstawione na schemacie 6.



Schemat 6 Przeciwutleniacze stosowane do produkcji preparatów kosmetycznych  
 Źródło: [Bera, Lahiri i Nag 2006; Martini 2009; Marzec 2009]

### 3.2. Mechanizm działania przeciwutleniaczy

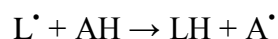
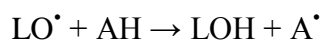
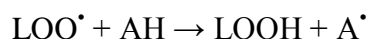
Zakres aktywności popularnie stosowanych przeciwutleniaczy jest bardzo szeroki, co wynika ze zróżnicowania czynników wpływających na inicjację procesu utleniania. Działanie to może polegać na hamowaniu niepożądanych procesów na drodze bezpośredniego udziału przeciwutleniaczy w reakcjach rodnikowych lub poprzez inne oddziaływania wpływające na ich przebieg. Skuteczność działania przeciwutleniaczy zależy od wielu czynników. Do najważniejszych z nich można zaliczyć [Chaiyasit, McClements i Decker 2005]:

- polarność przeciwutleniacza,

- rodzaj substratów lipidowych,
- pH środowiska,
- temperaturę,
- stężenie przeciwutleniaczy,
- właściwości fizyczne stabilizowanej substancji.

Ze względów praktycznych wprowadzono klasyfikację przeciwutleniaczy opartą na mechanizmie ich działania. Obejmuje ona podział przeciwutleniaczy na pierwotne i wtórne.

Przeciwutleniacze pierwotne (pierwszorzędowe), takie jak:  $\alpha$ -tokoferol, BHT i galusany, są potencjalnymi akceptorami wolnych rodników, dzięki czemu są one zdolne do przerywania procesu autooksydacji na etapie inicjacji i propagacji. Mechanizm ten został przedstawiony za pomocą poniższych równań reakcji:

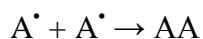
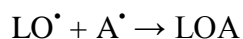
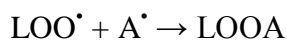


gdzie:

AH – cząsteczka przeciwutleniacza.

Substancje te wchodzi w reakcje z rodnikami lipidowymi i nadtlenkowymi, powodując ich przekształcenie w stabilne produkty o charakterze rodnikowym i/lub nierodnikowym. W trakcie tego procesu cząsteczki przeciwutleniaczy ulegają przemianie do rodników, które charakteryzują się niską reaktywnością i nie ujawniają zdolności do udziału w reakcjach łańcuchowych [McClements i Decker 2000; Rajalakshmi i Narazimhan 1996].

Przeciwutleniacze pierwotne wykazują również zdolność do dezaktywacji rodników nadtlenkowych, alkoksylowych i rodników pochodzących od przeciwutleniaczy, prowadząc do terminacji procesu utleniania [McClements i Decker 2000].





Skuteczność działania przeciwutleniaczy pierwotnych związana jest także z tzw. paradoksem polarności Portera. Zjawisko to dotyczy zdolności przeciwutleniaczy do podziału międzyfazowego i polega na tym, że przeciwutleniacze polarne wykazują wyższą aktywność w układach niepolarnych (bezwodnych), natomiast przeciwutleniacze niepolarne charakteryzują się większą skutecznością działania w układach heterofazowych.

Przeciwutleniacze polarne, takie jak troloks, kwas askorbinowy i kwas rozmarynowy, charakteryzują się większą skutecznością działania w tzw. oleju w masie, ponieważ mogą one gromadzić się na granicy faz olej – powietrze, gdzie występują wzmożone procesy utleniania i następuje akumulacja nadtlenków lipidowych odpowiedzialnych za inicjację autooksydacji tłuszczów [Schwarz i in. 2000; McClements i Decker 2000].

Przeciwutleniacze niepolarne, takie jak  $\alpha$ -tokoferol, palmitynian askorbylu i karnozol, są natomiast bardziej skuteczne w układach emulsyjnych, co wynika ze zdolności tych substancji do gromadzenia się wewnątrz fazy tłuszczowej i na granicy faz olej - woda, gdzie następują interakcje pomiędzy tłuszczami a nadtlenkami lipidowymi i proutleniaczami zawartymi w fazie wodnej. Z tego samego powodu skuteczność działania przeciwutleniaczy w emulsjach typu O/W zwiększa się wraz ze spadkiem polarności bądź wzrostem właściwości powierzchniowo-czynnych przeciwutleniaczy [Hunneche i in. 2008; Schwarz i in. 2000].

Wpływ stężenia przeciwutleniaczy na szybkość autooksydacji zależy również od wielu czynników, do których należą: struktura przeciwutleniacza, warunki utleniania i charakter utlenianej próbki. W niektórych przypadkach nadmierne stężenie przeciwutleniacza może powodować utratę jego właściwości, a nawet ujawnienie działania proutleniającego poprzez udział w procesie inicjacji [Shahidi i Naczka 2004].

Przeciwutleniacze wtórne nie uczestniczą bezpośrednio w procesach rodnikowych, mogą jednak opóźniać procesy utleniania w różny sposób. Związki te często wykazują działanie wielokierunkowe i przejawiają silne oddziaływanie synergistyczne w stosunku do przeciwutleniaczy pierwotnych. Ich działanie polega na [Laguerre, Lecomte i Villeneuve 2007; Szukalska 2003]:

- częściowej regeneracji przeciwutleniaczy pierwotnych, np.  $\alpha$ -tokoferol i (-)-epikatechina, kwas askorbinowy lub substancje tiolowe,
- wygaszaniu tlenu singletowego, np. karotenoidy,
- chelatowaniu jonów metali przejściowych, np. kwas cytrynowy, EDTA, kwasy fenolowe, flawonoidy,

- enzymatycznej dezaktywacji reaktywnych form tlenu, np. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD),
- pochłanianiu promieniowania w zakresie UV, np. kwas ferulowy,
- tworzeniu fizycznej bariery ochronnej pomiędzy olejem a powietrzem, np. fosfolipidy,
- tzw. „zmiataniu tlenu” – np. kwas askorbinowy i palmitynian askorbylu.

## 4. Kontrowersje dotyczące stosowania BHT i innych syntetycznych przeciwutleniaczy w preparatach kosmetycznych i żywności

### 4.1. Charakterystyka i zastosowanie BHT

Butylohydroksytoluen (BHT) jest jednym z najpopularniejszych przeciwutleniaczy syntetycznych. Substancja ta jest powszechnie wykorzystywana do stabilizowania olejów roślinnych, tłuszczów zwierzęcych, przypraw, orzechów, mięsa przetworzonego, chrupek, a także elastomerów, gumy estrowej i środków zmiękczejących, wchodzących w skład gumy do żucia [Leclercq, Arcella i Turrini 2000]. W przemyśle kosmetycznym stosuje się go natomiast jako dodatek do emulsji kosmetycznych, szminek, kredek do oczu i oliwek dla dzieci [Stratham 2006].

Tabela 4 Maksymalne dopuszczalne poziomy BHT w środkach spożywczych zgodnie z dyrektywą nr 95/2/WE i maksymalny poziom wykorzystania BHT w środkach spożywczych ujęty w sprawozdaniach dotyczących oceny stopnia narażenia

| Środek spożywczy   | Maksymalny Dopuszczalny Poziom (mg/kg) | Maksymalny poziom wykorzystania BHT w środkach spożywczych (mg/kg) |
|--|--|--|
| Tłuszcze i oleje do produkcji środków spożywczych poddawanych obróbce termicznej | 100                                    | 100  |
| Olej i tłuszcz do smażenia, z wyłączeniem oliwy z wyciśniętej z oliwek           | 100                                    | Brak danych  |
| Smalec, olej rybi, tłuszcz wołowy, drobiowy i owczy                              | 100                                    | 100  |
| Guma do żucia  | 400                                    | Brak danych  |
| Suplementy żywnościowe określone w dyrektywie 2002/46/EC10                       | 400                                    | Brak danych  |

Źródło: [Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 lutego 1995 r.; EFSA 2012]

W przemyśle spożywczym BHT został dopuszczony do stosowania jako pojedyncza substancja bądź składnik mieszaniny przeciwutleniaczy z galusanami, tert-butylohydrochinonem (TBHQ) i butylohydroksyanizolem (BHA) w ilości 100 mg/kg w przeliczeniu na tłuszcz. W gumie do żucia związek ten może być natomiast stosowany w

podobnych kombinacjach przy maksymalnym poziomie 400 mg/kg produktu [Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 lutego 1995 r].

W przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym BHT stosuje się natomiast w stężeniach 0,0002-0,5% [EFSA 2012].

Otrzymywanie butylohydroksytoluenu na skalę przemysłową jest procesem wieloetapowym, opartym na reakcji p-krezolu (4-metylofenol) z wysokiej czystości izobutylenem z wykorzystaniem katalizatora kwasowego. Mieszanina reakcyjna podlega następnie: zobojętnieniu pod wpływem węgla sodu, krystalizacji z izopropanolu, filtracji i przemyciu izopropanolem. Uzyskana substancja krystaliczna jest suszona i przesiewana w celu otrzymania produktu końcowego [EFSA 2012].

BHT jest substancją rozpuszczalną w tłuszczach, charakteryzującą się wysoką skutecznością działania nawet w niskich stężeniach. Jego zawartość w produktach waha się zwykle w granicach 0,001 – 0,01%. Przy stężeniu powyżej 0,02%, BHT wydziela charakterystyczny fenolowy zapach [Madhavi, Singhal i Kulkarni 1996].

Związek ten działa synergistycznie z BHA i TBHQ oraz chelatorami metali przejściowych, takimi jak np. kwas cytrynowy [Madhavi, Singhal i Kulkarni 1996]. Ze względu na wysoką temperaturę rozkładu, BHT wykazuje efekt carry-through, który polega na zdolności zachowania przez związek właściwości przeciwutleniających nawet pod wpływem oddziaływania wysokich temperatur, dzięki czemu może nastąpić przeniesienie jego właściwości ochronnych z surowców do wyrobu gotowego [Madhavi, Singhal i Kulkarni 1996; Santos i in. 2012].

BHT znany jest również z właściwości przeciwbakteryjnych, grzybostatycznych i przeciwwirusowych. Substancja ta hamuje rozwój bakterii: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* oraz drożdży: *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* już przy stężeniu 5000 µg/ml. Ekspozycja na BHT o stężeniu 50 µg/ml powodowała natomiast 92% inaktywację wirusa choroby Newcastle [Cosmetic Ingredient Review Expert Panel 2002].

Warner [1986] wykazał, że w trakcie ogrzewania w procesie głębokiego smażenia BHT ulega powolnej degradacji. Głównym produktem utleniania tego związku jest 2,6-di-tert-butylo-4-hydroperoxy-4-metylocykloheksa-2,5-dien-1-on (HBHT). Drugi szlak rozkładu prowadzi do powstawania rodników alkoksylowych, które z kolei ulegają reakcji z wytworzeniem 2,6-di-tert-butylo-4-hydroksy-4-metylocykloheksa-2,5-dionu (MHCD). BHT

jest ponadto związkiem wrażliwym na promieniowanie w zakresie światła widzialnego i obecność metali przejściowych.

#### 4.2. Absorpcja, dystrybucja, metabolizm i wydalanie BHT

BHT jest postrzegany jako substancja niewykazująca działania genotoksycznego i biologicznie nieaktywna. Z tego powodu związek ten posiada status substancji „ogólnie uznawanej za bezpieczną” [Tryphonas i in. 1999], której spożycie nie wywołuje niepożądanych efektów u ludzi w dziennej dawce niższej niż ADI (acceptable daily intake), które kształtuje się na poziomie 0,25 mg/kg masy ciała [EFSA 2012].

Nadmierna ekspozycja na BHT może jednak wywierać niekorzystny wpływ na funkcjonowanie organizmu. Składnik ten jest szeroko wykorzystywany w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym, co decyduje o tym, że wnika on do organizmu różnymi drogami. BHT może więc być absorbowany zarówno przez układ pokarmowy, skórę jak i wziewnie, w wyniku czego dociera on do większości narządów organizmu [Yamaki i in. 2007].

Tabela 5 Przewidywane narażenie na BHT dla trzech grup populacji na podstawie poziomu wykorzystania w środkach spożywczych ujętego w sprawozdaniach dotyczących oceny stopnia narażenia

| Szacowane narażenie na podstawie sprawozdań dotyczących oceny stopnia narażenia | Dzieci<br>(3 – 9 lat)<br>mg/kg mc/dzień | Młodzież<br>(10 - 17 lat)<br>mg/kg mc/dzień | Dorośli<br>(18 - 64 lat)<br>mg/kg mc/dzień |
|---|---|---|--|
| Średnia ekspozycja  | 0,007 – 0,087                           | 0,005 – 0,043                               | 0,003 – 0,022                              |
| Ekspozycja 95% populacji (percentyl 95%)  | 0,04 – 0,296                            | 0,029 – 0,125                               | 0,017 – 0,161                              |

Źródło: [EFSA 2012]

Wyniki badań przeprowadzonych przez Matsuo i współpracowników [1984] wykazały, że jednorazowe podanie BHT samicom i samcom myszy DDY/Slc w dawkach 20 lub 500 mg/ kg masy ciała skutkowało gwałtowną absorpcją i dystrybucją do tkanek, ze szczególnym uwzględnieniem żołądka, jelit, wątroby i nerek. Wydalanie tego składnika następowało głównie z kałem (41-65% dawki), moczem (26-50% dawki) oraz w mniejszych ilościach z wydychanym powietrzem (6-9% dawki).

Wyniki badań przeprowadzonych na myszach i szczurach wskazują na dwa główne procesy metaboliczne dotyczące przemiany BHT. Pierwszy z nich polega na hydroksylacji podstawników alkilowych natomiast drugi obejmuje reakcje utleniania układu aromatycznego [Oikawa i in. 1998]. Głównym metabolitem BHT jest kwas 3,5-di-tert-butylo-4-hydroksybenzoesowy (BHT-COOH), który może być pochodną alkoholu 3,5-di-tert-butylo-4-hydroksybenzoesowego i aldehydu 3,5-di-tert-butylo-4-hydroksybenzoesowego (BHT-COH). Związek ten może się następnie przekształcać do 2,6-di-tert-butylo-p-benzochinonu (BHT-Q). Utlenianie układu aromatycznego prowadzi natomiast do tworzenia się licznych, pomniejszych produktów, takich jak 2,6-di-tert-butylo-4-metylo-2,5-cykloheksadienon (BHT-OOH) i 2,6-di-tert-butylo-4-metyleno-2,5-cykloheksadienon (BHT-QM) [Fujisawa, Kadoma i Yoko 2004, Madhavi i Salunkhe 1996, Miller, Dwyer-Nield i Malkinson 1995, Oikawa i in. 1998].

W trakcie badań prowadzonych na ludziach [JECFA 1996], zaobserwowano natomiast obecność metabolitów BHT, czyli BHT-COOH i kwasu hipurowego, w moczu osób, które przyjęły dwie oddzielne doustne dawki 100 mg BHT. W innym badaniu, po podaniu doustnej dawki 1,0 g BHT zidentyfikowano obecność w moczu BHT-COOH i jego estru glukuronidowego [JECFA 1996].

### **4.3. Toksyczność**

Według wyników badań ogłoszonych przez JECFA [1996] BHT charakteryzuje się niską toksycznością ostrą. Zakres LD<sub>50</sub> drogą doustną wynosił 1700-1970 mg/kg mc u szczurów, 2100-3200 mg BHT/kg mc u królików, 940-2100 mg BHT/kg mc u kotów i 2000 mg BHT/kg masy ciała u myszy [Madhavi i Salunkhe 1996].

Dane literaturowe potwierdzają, że przyjmowanie wysokich dawek BHT wywiera toksyczny wpływ na wątrobę, płuca, nerki i mechanizm koagulacji krwi. Spożycie wysokich stężeń tego składnika powodowało marskość wątroby u szczurów. Zmiany martwicze były związane z proliferacją komórek w obrębie kanalików żółciowych, chronicznym zwłóknieniem i reakcjami zapalnymi komórek. Niektóre z wyników badań wskazały również na ostrą toksyczność płucną u myszy przyjmujących wysokie dawki BHT [Madhavi i Salunkhe 1996].

Przewlekłe spożywanie karmy zawierającej dodatek 0,75% BHT powodowało natomiast wzrost liczby przypadków występowania nowotworów płuc i torbieli wątrobowych u tych gryzoni [Madhavi i Salunkhe 1996].

Zaobserwowano także powstawanie zmian w nerkach myszy przyjmujących zróżnicowane dawki BHT przez okres 30 dni [Takahashi 1992]. Badania histopatologiczne tkanek wykazały zmiany martwicze występujące w obrębie kanalików nerkowych.

Według wyników badań prowadzonych na szczurach, podprzewlekłe przyjmowanie BHT, przyczyniało się do wzrostu masy tarczycy i nadnerczy [EFSA 2012]. Dodatkowo przyjmowanie karmy z dodatkiem BHT przez szczury powodowało inhibicję adsorpcji witaminy K w jelitach i jej wchłanianie w wątrobie. Nadmierna podaż tego składnika może również indukować wzrost aktywności reaktywnych form tlenu w tkankach zawierających znaczne ilości cytochromu P450, co prowadzi do wyczerpania zapasów  $\alpha$ -tokoferolu w wątrobie [Siman i Eriksson 1996]. Dane dotyczące genotoksyczności BHT wskazują na brak zdolności BHT do wywoływania mutacji punktowych, aberracji chromosomowych lub interakcji DNA [JECFA 1996; Bomhard i in. 1992; Williams i in. 1999]. Wyniki opublikowane przez TemaNord [2002] także potwierdziły, brak genotoksyczności in vivo u szczurów, którym podawano BHT w dawkach 500 mg/kg mc.

Metabolity BHT uznawane są natomiast za substancje o potencjalnie większej toksyczności niż ich związek wyjściowy.

BHT-QM może być metabolizowany z udziałem cytochromu P450 w wątrobie i płucach. Następnie związek ten ulega sprzężeniu i detoksykacji z udziałem glutationu. Nadprodukcja BHT-QM może skutkować jednak tworzeniem przez niego wiązań kowalencyjnych z białkami i DNA, co w konsekwencji prowadzi do ostrej hepatotoksyczności i pneumotoksyczności [Lin i in. 2007; Oikawa i in. 1998; Thompson i in. 2001]. Nadmiar BHT-QM może przyczyniać się także do wzmagania stresu oksydacyjnego i wyczerpania zasobów glutationu w tkankach. Może to prowadzić do apoptozy komórek, która jest istotnym czynnikiem w patogenezie licznych chorób i cechuje się wieloma zmianami biochemicznymi i morfologicznymi, takimi jak kondensacja i fragmentacja chromatyny, formowanie ciałek apoptycznych i fragmentacja DNA [Lin i in. 2007; Oikawa i in. 1998; Thompson i in. 2001]. Ponadto istnieją doniesienia o roli BHT-QM jako promotora wieloetapowej kancerogenezy w komórkach skóry i płuc u myszy [Desjardins i in. 1998; Guyton i in. 1991; Shearn, Fritz i Thompson 2011; Sun i in. 2003].

Liczne badania prowadzone nad wpływem BHT na proces kancerogenezy, wskazały, że zależy on od wielu czynników takich jak: typ kancerogenu, organ docelowy, gatunek zwierzęcia, stosowana dieta i czas podawania pokarmu [Madhavi i Salunkhe 1996]. Stwierdzono także, że po uprzednim podaniu inicjatora kancerogenezy, BHT pełnił rolę promotora kancerogenezy pęcherza moczowego, okrężnicy, tarczycy i płuc u zwierząt. Istnieje przypuszczenie, że efekt ten jest skutkiem stanów zapalnych wywoływanych przez ten składnik [Dwyer- Nield i in. 1998; Madhavi i Salunkhe 1996; Williams, Iatropoulos i Whysner 1999].

Myszy utrzymywane na diecie zawierającej BHT charakteryzowały się niższą masą ciała niż grupa kontrolna. U samców tych gryzoni zaobserwowano również wzmożony rozwój guzów wątroby. Na podstawie wyników badań histopatologicznych zidentyfikowano powstałe zmiany jako gruczolaki wątroby [EFSA 2012].

Badania histopatologiczne [JECFA 1996] wątroby szczurów przyjmujących przewlekłe karmę zawierającą dodatek BHT wykazały wzrost liczby nowotworów złośliwych i gruczolaków w zależności od zastosowanego stężenia. Wraz ze wzrostem zawartości BHT w karmie liczba przypadków zmian patologicznych ulegała zwiększeniu. W trakcie prowadzonych badań zaobserwowano także obecność zmian nowotworowych w innych organach, takich jak tarczyca, trzustka, jajniki, macica, grasicca i układ siateczkowo-śródbłonkowy, ale ich częstość występowania nie różniła się istotnie od próby kontrolnej [JECFA 1996].

Ohno i współpracownicy [1984] sugerują także negatywny wpływ przyjmowania BHT na proces embriogenezy zwierząt. Wyniki badań prowadzonych przez JECFA [1996] nie wykazały jednak wyraźnego działania embriotoksycznego tego składnika.

Chroniczne spożycie przez myszy w trakcie ciąży karmy zawierającej 0,5% BHT skutkowało powstawaniem zmian behawioralnych ich potomstwa [Johnson 1965].

Dodatki do żywności, takie jak BHT, mogą wpływać na enzymy regulujące metabolizm leków. Wiele naturalnych składników żywności wykazuje podobną aktywność. Dotyczy to w szczególności flawonoidów zawartych w soku grejpfrutowym, które w połączeniu z niektórymi lekami i substancjami chemicznymi zaburzają przebieg ich przemian biochemicznych. Sun i Fukuhara [1997] udowodnili, że jednoczesne podawanie BHT i flawonoidów powodowało wzmożone uaktywnienie aflatoksyny B<sub>1</sub> i B[a]P w wątrobie myszy. Aflatoksyny są powszechnie znane ze swoich właściwości mutagennych. Mechanizm



działania BHT w tym przypadku polegał na indukowaniu specyficznych izoenzymów cytochromu P450.

Istnieje niewiele badań opisujących wpływ BHT na funkcjonowanie organizmu człowieka. Badania takie nie mogą być prowadzone ze względów etycznych. Badania epidemiologiczne [EFSA 2012] wykazały możliwość występowania kontaktowego zapalenia skóry w wyniku skórno-kontaktowego z BHT oraz powstawania zmian alergicznych na skutek doustnego przyjmowania mieszaniny BHT i BHA.

Shilian i Godstone [1986] odnotowali przypadek zapalenia błony śluzowej żołądka po przyjęciu na czczo przez 22-letnią kobietę 4 g BHT. Tego samego dnia zaobserwowano u chorej silne skurcze w nadbrzuszu, ogólne osłabienie, nudności i wymioty, a następnie zawroty głowy, dezorientację i krótką utratę przytomności. Przyjęcie 80 g BHT w oleju z krokosza barwierskiego na czczo przez 24-letnią kobietę skutkowało natomiast pojawieniem się objawów neurologicznych takich jak, uczucie pustki w głowie, chwiejny chód i zaburzenia mowy [EFSA 2012].

Yamaki i współpracownicy [2007] udowodnili, że BHT może być przyczyną powstawania pokrzywki związanej z alergią typu I, alergicznego zapalenia śluzówki nosa a nawet astmy.

Brak wystarczających danych dotyczących wpływu BHT na organizm ludzki utrudnia jednoznaczne określenie stopnia bezpieczeństwa jego stosowania. Aktualne doniesienia dotyczące oddziaływania tego składnika na organizmy zwierzęce skłania jednak do podjęcia rozważań nad zasadnością tak powszechnego stosowania tej substancji w wielu gałęziach przemysłu.

## 5. Jakość preparatów kosmetycznych

Według normy PN-EN ISO 9001:2009, jakość definiowana jest jako „stopień, w jakim zbiór inherentnych właściwości spełnia wymagania”. Zgodnie z wymienionym dokumentem wyrażenie „właściwość” oznacza „cechę wyróżniającą”, natomiast „inherentny” to „przeciwny do „przypisany”, oznacza tkwiący w istocie czegoś, szczególnie jako stała właściwość” [PN-EN ISO 9001:2009].

W kontekście określenia jakości preparatów kosmetycznych kluczową rolę stanowią ich bezpieczeństwo i właściwości użytkowe [Urbanek-Karłowska i Karłowski 2005].

Od dnia 11 lipca 2013 r. podstawowym aktem prawnym określającym, wymagania dotyczące między innymi składu i oznakowania kosmetyków w Polsce jest Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 dotyczące produktów kosmetycznych.

Według tego rozporządzenia: „Produkty kosmetyczne powinny być bezpieczne w normalnych lub dających się racjonalnie przewidzieć warunkach stosowania. W szczególności analiza stosunku ryzyka i korzyści nie powinna uzasadniać występowania ryzyka dla zdrowia ludzi”. Z tego powodu wymieniony dokument zakłada, że wykorzystywanie do produkcji preparatów kosmetycznych substancji zaklasyfikowanych według odpowiednich przepisów prawnych jako rakotwórcze, mutagenne lub działające szkodliwie na rozrodczość powinno być zakazane. Rozporządzenie nr 1223/2009 wskazuje również na konieczność opracowania odpowiednich wytycznych dotyczących oceny bezpieczeństwa nanomateriałów przeznaczonych do produkcji kosmetyków.

Za podstawową zasadę produkcji kosmetyków uznaje się zapewnienie właściwej jakości surowców, zgodnie z wymaganiami Dobrej Praktyki Produkcyjnej (GMP). Wiąże się to między innymi z posiadaniem przez producenta określonych informacji na temat każdego składnika, oraz jego charakterystykę fizykochemiczną. Opis wymagany dla surowców wykorzystywanych do wyrobu kosmetyków powinien zawierać [Urbanek-Karłowska i Karłowski 2005]:

- nazwę producenta lub dostawcy,
- międzynarodowy kod,
- nazwę handlową,
- nazwę chemiczną oraz synonimy:
  - nazwę wg CTFA,

- nazwę wg INCI,
- numer CAS lub nazwy botaniczne roślin podane w języku łacińskim zgodnie z systematyką,
- określenie funkcji składnika,
- pochodzenie,
- numery wg CI dla barwników.

Dyrektywy UE 2003/15/CE i 93/35/EEC zawierają ujednolicone dla wszystkich krajów Unii Europejskiej wytyczne dotyczące wytwarzania i testowania preparatów kosmetycznych zgodnie z GMP [Obrębska, Szczygła i Matejczyk 2008, Abu Shaqra i Al-Groom 2012]. Wskazówki dotyczące postępowania zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Produkcyjnej zostały zawarte również w Normie PN-EN ISO 22716:2009 „Kosmetyki. Dobre Praktyki Produkcji (GMP). Przewodnik Dobrych Praktyk Produkcji”. Dokument ten zawiera wytyczne związane z produkcją, kontrolą, składowaniem i transportem produktów kosmetycznych. Dotyczy on aspektów jakościowych produktu, nie zawiera jednak informacji na temat wszystkich aspektów bezpieczeństwa personelu pracującego w zakładzie ani aspektów związanych z ochroną środowiska [PKN 2013].

Odpowiedni dobór surowców kosmetycznych obejmuje także zapewnienie ich jakości mikrobiologicznej, co umożliwi uniknięcie zanieczyszczenia produktu finalnego [Urbanek-Karłowska i Karłowski 2005]. Nadmierne namnożenie się niepożądanego mikroflory może powodować powstawanie niekorzystnych zmian organoleptycznych preparatów kosmetycznych w zakresie konsystencji, barwy i zapachu, a także metabolitów bakteryjnych i przetworzonych substancji aktywnych wpływających negatywnie na bezpieczeństwo i właściwości pielęgnacyjne produktów. Kontakt z tymi substancjami może skutkować powstawaniem reakcji alergicznych lub lokalnych stanów zapalnych. W wyniku kontaktu mikroflory chorobotwórczej ze skórą lub błonami śluzowymi mogą natomiast powstawać typowe stany chorobowe [Behravan, Bazzaz i Malaekheh 2005; Obrębska, Szczygła i Matejczyk 2008; Orus i Leranoz 2005].

Do mikroorganizmów, których obecność w preparatach kosmetycznych stanowi zagrożenie dla zdrowia człowieka zalicza się drobnoustroje takie, jak:

- *Staphylococcus aureus*,
- *Streptococcus pyogenes*,
- *Enterococcus sp.*,
- *Clostridium perfringens*,

- *Clostridium tetani*,
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Enterobacteriaceae*,
- *Candida*,
- *Aspergillus*,
- *Trichophyton*.

Z tego powodu uzasadnione jest sporządzanie specyfikacji mikrobiologicznych dla składników pochodzenia biologicznego oraz naturalnych zasobów mineralnych, np. krzemionki lub talku, które zawierają różnorodne mikroorganizmy charakterystyczne dla źródeł pozyskiwania surowców. Dokumentacja taka nie jest konieczna w przypadku składników, których środowisko nie sprzyja rozwojowi mikroflory [Obrębska, Szczygła i Matejczyk 2008].

Bardzo ważnym warunkiem jest także monitorowanie wody, której jakość ma znaczący wpływ na mikrobiologiczną stabilność produktu końcowego. Wymagania mikrobiologiczne dla wyrobu gotowego zostały przedstawione w tabeli 7.

Ze względu na możliwość zanieczyszczenia mikrobiologicznego produktu zarówno podczas procesu produkcyjnego jak i w trakcie stosowania kosmetyku, w celu zapewnienia jego trwałości wykorzystuje się środki konserwujące [Obrębska, Szczygła i Matejczyk 2008; Urbanek-Karłowska i Karłowski 2005].

Wyrób gotowy powinien spełniać określone wymagania pod kątem stabilności chemicznej, fizycznej, mikrobiologicznej oraz posiadać specyfikację fizykochemiczną i mikrobiologiczną.

Produkty pochodzące z każdej serii produkcyjnej, przed wprowadzeniem do obiegu powinny być kontrolowane w zakresie określonych parametrów fizykochemicznych, do których zalicza się [Urbanek-Karłowska i Karłowski 2005]:

- stan fizyczny,
- rodzaj preparatu (np. emulsja, zawiesina, lotion, puder, aerozol),
- właściwości organoleptyczne,
- pH – w przypadku preparatów wodnych,
- lepkość – w przypadku preparatów w formie płynnej.

Alergie kontaktowe wywołane obecnością różnorodnych składników w preparatach kosmetycznych są powszechnie znanym problemem. W przybliżeniu 6% całej populacji cierpi na te schorzenia, których przyczyną są głównie substancje konserwujące i zapachowe.

Rozwój alergii kontaktowych zależy w dużym stopniu od stężenia składnika uczulającego [Lundov i in. 2009]. Możliwość wystąpienia w kontakcie kosmetyku ze skórą niepożądanych reakcji miejscowych lub ogólnoustrojowych, wiąże się z koniecznością przeprowadzania testów na ochotnikach przed wprowadzeniem produktu na rynek. Badania te mogą być prowadzone jedynie przy znajomości oceny toksykologicznej składników i muszą być wykonywane zgodnie z Deklaracją Helsińską oraz zasadami Dobrej Praktyki Klinicznej [Urbanek-Karłowska i Karłowski 2005]. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 ponadto nakazuje: „aby doświadczenia na zwierzętach zastępować metodami alternatywnymi, jeśli istnieją i są zadowalające naukowo”. Obecnie najczęściej wykorzystywanymi metodami są [Urbanek-Karłowska i Karłowski 2005]:

- testy zgodności skóry z kosmetykami (kompatybilności) – wykonywane w celu potwierdzenia braku szkodliwego oddziaływania po pierwszej aplikacji na skórę lub błony śluzowe, np. test płatkowy Draize’a umożliwiający ocenę właściwości drażniących i uczulających kosmetyku,
- badania aplikacyjne – wykonywane w celu potwierdzenia oczekiwań i akceptacji przez użytkowników.

Tabela 6 Mikroorganizmy pojawiające się w wybranych preparatach kosmetycznych

| <b>Preparaty kosmetyczne</b> | <b>Mikroflora</b>  |
|------------------------------|--|
| Balsamy do ciała             | <i>Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus</i>  |
| Kremy do ciała               | <i>Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Aspergillus niger, Aspergillus funigatus, Penicillium sp.</i>             |
| Odżywki do włosów            | <i>Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Escherichia coli</i>   |
| Szampony do włosów           | <i>Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus warneri, Staphylococcus epidermidis, Serratia marcescens, Citrobacter freundii, Enterobacter sp., Klebsiella sp.</i> |
| Płyny do kąpieli             | <i>Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus warneri, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas putida</i>  |
| Tusze do rzęs                | <i>Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae</i>   |
| Cienie do powiek             | <i>Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Micrococcus sp., Corynebacterium sp., Acinetobacter, Moraxella sp., Neisseria sp.,</i>                        |
| Mydła                        | <i>Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus warneri, Staphylococcus epidermidis</i>  |

Źródło: Opracowanie własne na podstawie: [Obrębska, Szczygła i Matejczyk 2008]

Tabela 7 Wymagania mikrobiologiczne dla preparatów kosmetycznych

| <b>Wymagania mikrobiologiczne</b>                         | <b>Kosmetyki przeznaczone dla dzieci poniżej lat 3 i do stosowania w okolicy oczu i błon śluzowych</b> | <b>Pozostałe kosmetyki</b>   |
|---|--|--|
| Dopuszczalna ogólna liczba bakterii tlenowych mezofilnych | 10 <sup>2</sup> cfu/g lub ml   | 10 <sup>3</sup> cfu/g lub ml   |
| Niedopuszczalne bakterie chorobotwórcze                   | - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,<br>- <i>Staphylococcus aureus</i> ,<br>- <i>Candida albicans</i>     | - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,<br>- <i>Staphylococcus aureus</i> ,<br>- <i>Candida albicans</i> |

Źródło: Opracowanie własne na podstawie: [Urbanek-Karłowska i Karłowski 2005]

Podstawowym celem stosowania preparatów kosmetycznych jest utrzymywanie zewnętrznych części ciała lub zębów i błon śluzowych jamy ustnej w czystości, perfumowanie, zmiana wyglądu, ochrona, utrzymywanie w dobrej kondycji lub korygowanie zapachu ciała [Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 r]. Aby jednak produkty te mogły spełniać swoją funkcję, powinny się charakteryzować wysoką jakością. Zachowanie zasad i wskazówek dotyczących surowców, produkcji, kontroli, przechowywania i transportu kosmetyków określonych w odpowiednich wytycznych jest warunkiem zachowania przez nie odpowiedniego poziomu bezpieczeństwa i cech użytkowych, co w istotnym stopniu decyduje o ich atrakcyjności dla potencjalnych konsumentów.

## CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 1. Założenia i cele pracy

#### 1.1. Cele pracy

Tłuszcze naturalne, bogate w jedno- i wielonienasycone kwasy tłuszczowe, są podstawowymi składnikami żywności oraz cennymi substancjami bazowymi preparatów kosmetycznych. Substancje te pełnią kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu i utrzymaniu właściwej fizjologii skóry. Dotyczy to w szczególności olejów roślinnych zawierających znaczne ilości niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, które ze względu na swoją funkcję budulcową i biologiczną aktywność decydują o zachowaniu homeostazy organizmu. Substancje te odpowiadają także za strukturę warstwy rogowej naskórka oraz uczestniczą w tworzeniu płaszcza wodno-lipidowego skóry, dzięki czemu możliwe jest zachowanie odpowiedniego poziomu jej nawilżenia.

Niestety, oleje roślinne są substancjami nietrwałymi, w szczególności sposobem narażonymi na procesy utleniania. W wyniku tych niekorzystnych przemian może nastąpić trwałe pogorszenie jakości produktów o wysokiej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych. Oksydacyjna modyfikacja składników frakcji tłuszczowej emulsji kosmetycznych może przyczyniać się do pogorszenia ich cech organoleptycznych i właściwości pielęgnacyjnych. Dodatkowo, kontakt toksycznych produktów utlenienia tłuszczów ze skórą może nieść za sobą konsekwencje związane z powstawaniem uczuleń, podrażnień i miejscowych stanów zapalnych.

Stosuje się wiele zabiegów mających na celu przedłużenie trwałości preparatów kosmetycznych. Jedną z metod jest stosowanie przeciwutleniaczy zdolnych do bezpośredniego przerywania reakcji wolnorodnikowych. Najczęściej wykorzystywane do tego celu są przeciwutleniacze syntetyczne takie jak: butylohydroksytoluen (BHT), butylohydroksyanizol (BHA) i palmitinian askorbylu. Składniki te posiadają wiele zalet, spośród których najważniejsze to: wysoka skuteczność działania w niskich stężeniach, duża stabilność termiczna oraz niska cena. Niestety ciągła ekspozycja na te substancje, może wywierać niekorzystny wpływ na ogólny stan zdrowia i kondycję skóry. Dotyczy to

zwłaszcza butylohydroksytoluenu (BHT), który jest powszechnie stosowany w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym i spożywczym. Wyniki wielu badań omówione szerzej w rozdziale 4 niniejszej pracy dowodzą, że stosowanie tego składnika może być przyczyną pokrzywki towarzyszącej alergii typu I, alergicznego zapalenia śluzówki nosa a nawet astmy. Z tego powodu uzasadnione jest poszukiwanie nowych przeciwutleniaczy i zastępowanie przeciwutleniaczy syntetycznych mniej drażniącymi komponentami.

Kwasy fenolowe są składnikami pochodzenia roślinnego, powszechnie znanymi ze swoich właściwości przeciwutleniających i bioaktywności. Długołańcuchowe estry kwasów fenolowych wykazują analogiczny mechanizm działania przeciwutleniającego. Obecność długiego łańcucha węglowodorowego w ich cząsteczkach powoduje, że rozpuszczają się one w tłuszczach, co zmienia ich charakter ochronny i stwarza nowe możliwości zastosowań. Związki te wykazują również dodatkowe właściwości, które mogą wywierać pozytywny wpływ na trwałość i cechy użytkowe preparatów kosmetycznych. Dotyczy to zwłaszcza zdolności do pochłaniania promieniowania w zakresie UV oraz potencjalnych właściwości powierzchniowo-czynnych, dzięki którym związki te mogą pełnić rolę środków przeciwpieniących lub emulgatorów typu W/O.

Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie, w jakim stopniu rozpoznane właściwości umożliwiają zastosowanie długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych w roli wielofunkcyjnych składników produktów kosmetycznych oraz czy dzięki swoim właściwościom mogą one w bezpośredni sposób wpływać na zwiększenie trwałości produktów kosmetycznych, decydując tym samym o poprawie ich jakości.

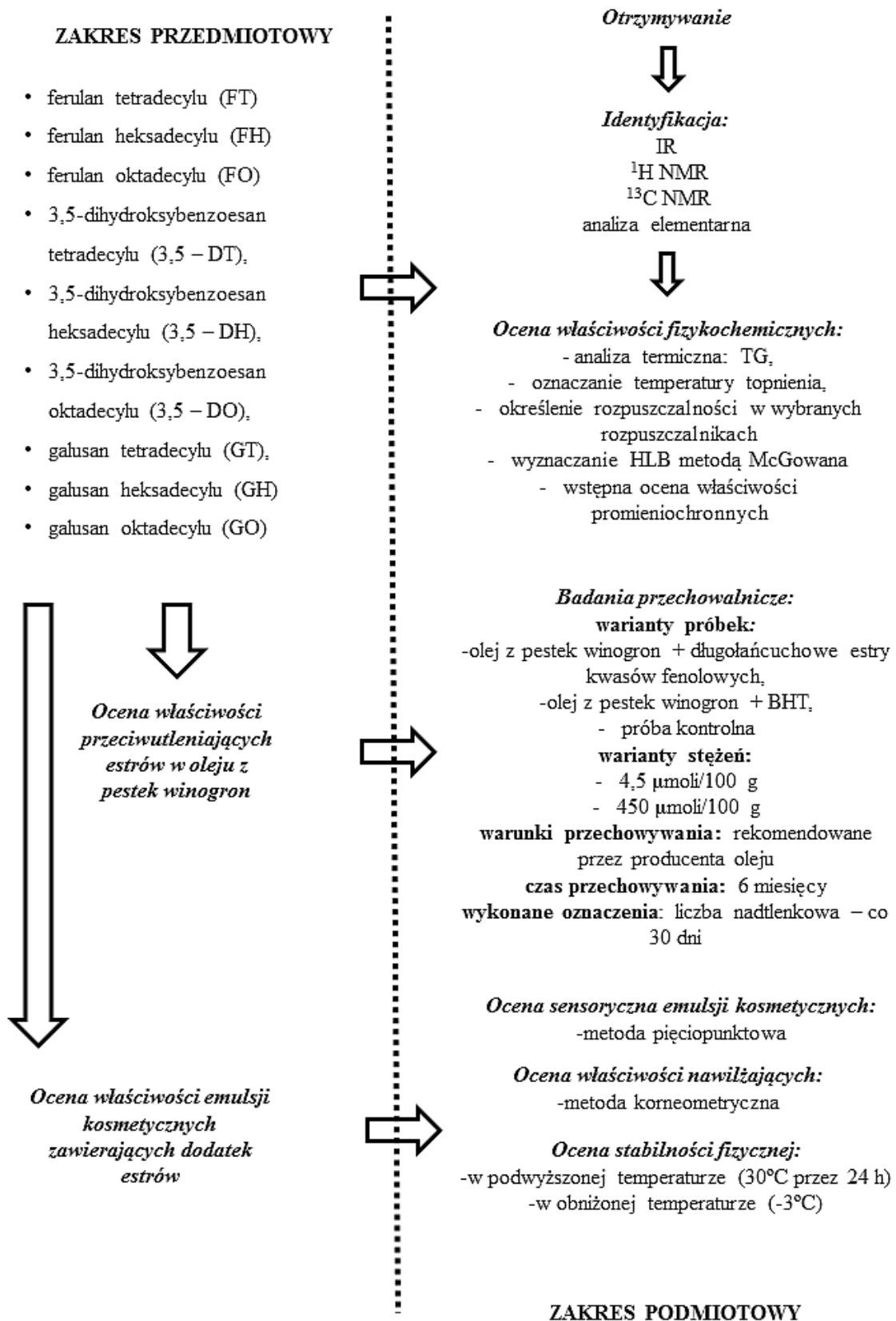
Celem pracy było otrzymanie nowych długołańcuchowych estrów wybranych kwasów fenolowych oraz ocena ich właściwości jako wielofunkcyjnych składników determinujących jakość surowców i produktów kosmetycznych.

Osiągnięcie celu głównego wymagało wykonania następujących zadań szczegółowych:

- otrzymanie estrów kwasów: ferulowego, galusowego i 3,5-dihydroksybenzoesowego i alkoholi: tetra-, hekso- i oktadecylowego,
- charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych estrów, w tym określenie ich stabilności termicznej,
- ocena aktywności przeciwutleniającej otrzymanych estrów w próbkach oleju z pestek winogron przechowywanych przez 6 miesięcy,
- ocena właściwości emulsji zawierających dodatek badanych estrów.



## 1.2. Zakres badań



### **1.3. Hipotezy badawcze**

- I. Długołańcuchowe estry kwasów fenolowych wykazują porównywalne z BHT właściwości ochronne w odniesieniu do surowców tłuszczowych.
- II. Ochronne działanie przeciwutleniające otrzymanych preparatów zależy od ich stężenia i od długości łańcucha węglowego w cząsteczkach.
- III. Długołańcuchowe alkilowe estry kwasów fenolowych wykazują zdolność pochłaniania promieniowania w zakresie UV i mogą pełnić dodatkową funkcję absorbera UV w preparatach kosmetycznych.
- IV. Długołańcuchowe alkilowe estry kwasów fenolowych wykazują wysoką stabilność termiczną porównywalną do powszechnie stosowanych obecnie przeciwutleniaczy syntetycznych.

## 2. Wykaz odczynników, aparatury i sprzętu laboratoryjnego stosowanych w pracy

W celu przeprowadzenia badań zastosowano następujące odczynniki:

- alkohol 1-heksadecylowy, 98%, Alfa Aesar, Karlsruhe, Niemcy,
- alkohol metylowy, cz.d.a, Chempur, Piekary Śląskie, Polska,
- alkohol 1-oktadecylowy, 97%, Alfa Aesar, Karlsruhe, Niemcy,
- alkohol 1- tetradecylowy, > 97%, Alfa Aesar, Karlsruhe, Niemcy,
- biobaza emulgująca, Ecospa, Polska
- butylohydroksytoluen (BHT), >99%, Aldrich, Niemcy,
- chloroform, cz.d.a, POCH S.A., Gliwice, Polska,
- DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl), Aldrich, Niemcy,
- gliceryna bezwodna, cz.d.a, POCH S.A., Gliwice, Polska,
- jodek potasu, cz.d.a, Aktyn, Suchy Las, Polska,
- kompozycja zapachowa,
- kwas 3,5-dihydroksybenzoesowy, 97%, Aldrich, Niemcy,
- kwas ferulowy, 99%, Aldrich, Niemcy,
- kwas galusowy, Sigma-Aldrich, Niemcy,
- kwas octowy, POCH S.A., Gliwice, Polska,
- kwas p-toluenosulfonowy, cz.d.a, Aktyn, Suchy Las, Polska,
- octan etylu, cz.d.a., Chempur, Piekary Śląskie, Polska,
- olej z pestek winogron, Ecospa, Polska,
- siarczan (VI) magnezu, bezwodny, cz.d.a, Chempur, Piekary Śląskie, Polska,
- skrobia, POCH S.A., Gliwice, Polska,
- tiosiarczan sodu, cz.d.a, Chempur, Piekary Śląskie, Polska,
- toluen, cz.d.a., POCH S.A., Gliwice, Polska,
- węgiel aktywny,
- woda destylowana,
- wodorowęglan sodu, cz.d.a., POCH S.A., Gliwice, Polska.

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem następującej aparatury i sprzętu laboratoryjnego:

- Aparat Boetiusa,

- Aparat do analizy elementarnej, model Vario EL III, Elemental
- Aparat do jednoczesnej analizy TGA-DSC, Jupiter STA 449F3, Netzsch GmbH, Niemcy,
- bibuła i sączi,
- biureta o pojemności 50 ml,
- butelki z ciemnego szkła o pojemności 20, 50, 150 ml,
- chłodnice zwrotne,
- cieplarka laboratoryjna, Termometal, Chorwacja,
- cylindry miarowe o pojemności 10, 25, 100 ml,
- eksykator,
- kolby miarowe o pojemności 10, 100, 500, 1000 ml,
- kolby okrągłodenne o pojemności 250 ml,
- kolby ssawkowe o pojemności 500 ml,
- kolby stożkowe o pojemności 20 ml, 250 ml,
- korki szklane,
- korneometr, Corneometer CM 825, Courage + Khazaka Electronic GmbH, Niemcy,
- kuwety kwarcowe o długości drogi optycznej 10 mm, Hellma Analytics, Polska,
- kuwety szklane o długości ścieżki optycznej 10 mm, Hellma Analytics, Polska,
- lejki szklane,
- lejki Schotta,
- łopatki metalowe,
- mieszadło magnetyczne typu ES – 21H, Wigg, Polska,
- pipety automatyczne o pojemności do 20, 200, 1000  $\mu$ l,
- pipety szklane o pojemności 1, 10, 25 ml,
- rozdzielacze o pojemności 250 ml,
- spektrofotometr UV-VIS, Genesis 2, Milton – Roy, USA,
- spektrofotometr UV-VIS Genesis 6, Milton – Roy, USA,
- spektrometr NMR Varian VNMR-S 400 MHz, USA,
- spektroskop FT-IR ATR, Spectrum 100, Perkin Elmer, USA,
- szalki Petriego,
- łapy i statywy laboratoryjne,

- waga analityczna z dokładnością do  $\pm 0,0001$  g, Santorius, Niemcy,
- wyparka rotacyjna, Rotavapor R-114, Buchi, Szwajcaria,
- wytrząsarka laboratoryjna typu 358 S, Elpan, Polska,
- zlewki o pojemności 20, 50, 100, 150, 500 ml.

### 3. Metodyka badań

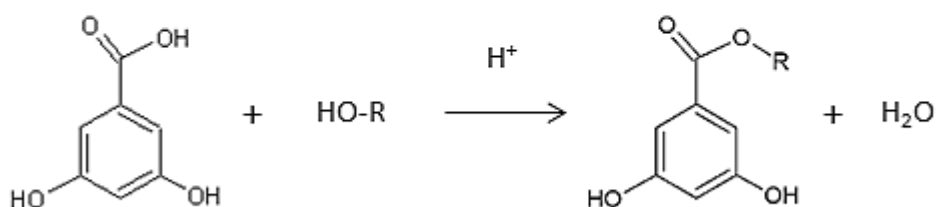
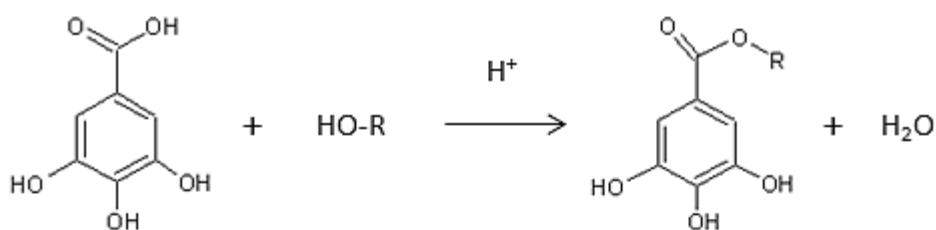
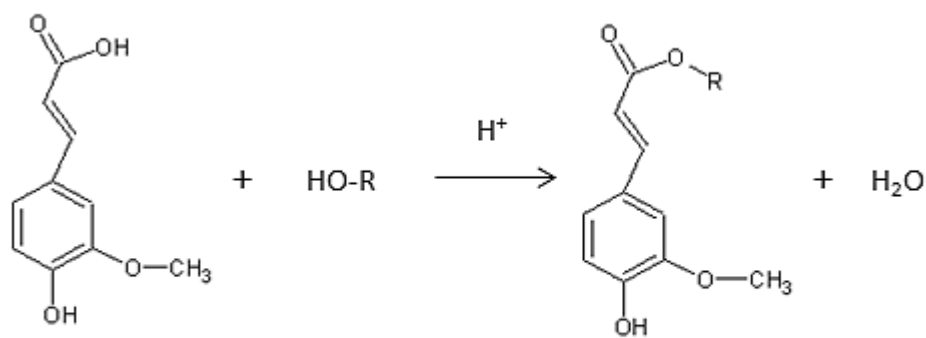
#### 3.1. Otrzymywanie długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych

Metoda otrzymywania długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych została oparta na estryfikacji Fishera [Kiewlicz i Szymusiak 2011], która jest reakcją substytucji nukleofilowej grupy acylowej w środowisku kwaśnym. Podczas estryfikacji katalizowanej kwasami następuje rozerwanie wiązania pomiędzy atomem węgla grupy karbonylowej a atomem tlenu grupy hydroksylowej w związku pośrednim, powstającym na skutek nukleofilowego ataku cząsteczki alkoholu na protonowaną grupę karboksylową kwasu. W wyniku odłączenia się cząsteczki wody od produktu pośredniego reakcji powstaje produkt końcowy, którym jest odpowiedni ester [McMurry 2003; Vogel 1984].

Do syntezy wykorzystano popularne, nietoksyczne kwasy fenolowe powszechnie występujące w przyrodzie, charakteryzujące się odpowiednią stabilnością w warunkach reakcji i relatywnie niską ceną. Wybrano następujące kwasy: ferulowy, galusowy i 3,5-dihydroksybenzoesowy.

Zastosowane długołańcuchowe alkohole: 1-tetradekanol, 1-heksadekanol i 1-oktadekanol, są nietoksycznymi związkami szeroko wykorzystywanymi w przemyśle kosmetycznym jako substancje zmiękczające, emulgujące, stabilizujące emulsje, regulujące lepkość, natłuszczające oraz jako środki zmętniające [Decyzja Komisji z dnia 9 lutego 2006 ].

Reakcja estryfikacji została przeprowadzona w toluenie, w obecności kwasu p-toluenosulfonowego jako katalizatora.



R:  
 $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$   
 $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$   
 $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$

Schemat 7 Reakcje otrzymywania długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych  
 Źródło: opracowanie własne na podstawie: [McMurry 2003]

Do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml odważono 0,015 mola odpowiedniego alkoholu i 0,001 mola (0,1959 g) kwasu p-toluenosulfonowego, które następnie ogrzewano w 30 ml toluenu do całkowitego rozpuszczenia. Do uzyskanej mieszaniny odważono 0,015 mola odpowiedniego kwasu fenolowego. Po dodaniu zarodników wrzenia, całość ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 110°C przez 36 – 50 godzin. Po zakończeniu reakcji, z mieszaniny poreakcyjnej odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydzielony olej ekstrahowano kilkakrotnie octanem etylu. Otrzymany ekstrakt przeniesiono do rozdzielacza i przemywano nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu. Fazę organiczną

osuszono nad bezwodnym siarczanem (VI) magnezu oraz odbarwiono węglem aktywnym. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując produkt w postaci oleju, który poddano dalszemu oczyszczaniu na drodze krystalizacji z rozpuszczalnika organicznego:

- estry kwasu ferulowego poddano krystalizacji z metanolu,
- estry kwasów galusowego i 3,5-dihydroksybenzoowego wymagały dwukrotnej krystalizacji. W pierwszej kolejności były one krystalizowane z chloroformu, a następnie z mieszaniny metanol-woda.

Oczyszczone produkty osuszono w eksykatorze a następnie przechowywano w obniżonej temperaturze, w butelkach z ciemnego szkła.

Otrzymano następujące długołańcuchowe estry kwasów fenolowych:

- ferulan tetradecylu (FT),
- ferulan heksadecylu (FH),
- ferulan oktadecylu (FO),
- galusan tetradecylu (GT),
- galusan heksadecylu (GH),
- galusan oktadecylu (GO),
- 3,5-dihydroksybenzoosan tetradecylu (3,5-DT),
- 3,5-dihydroksybenzoosan heksadecylu (3,5-DH),
- 3,5-dihydroksybenzoosan oktadecylu (3,5-DO).

## **3.2. Identyfikacja otrzymanych związków**

### **3.2.1. Analiza widm magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)**

Pomiar widm  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR dla próbek ferulanu tetradecylu, galusanu tetradecylu i 3,5-dihydroksybenzoosanu tetradecylu został przeprowadzony przez Środowiskowe Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej UAM w Poznaniu. Rejestracji widm dokonano z wykorzystaniem spektrometru Varian VNMR-S 400 MHz. Przed przeprowadzeniem pomiarów próbki przeznaczone do badań zostały rozpuszczone w odpowiednich rozpuszczalnikach deuterowanych. Próbki galusanu tetradecylu i 3,5-dihydroksybenzoosanu tetradecylu rozpuszczono w deuterowanym acetonie ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )



natomiast próbkę ferulanu tetradecylu w deuterowanym chloroformie ( $\text{CDCl}_3$ ). Przesunięcia chemiczne ( $\delta$ ) podano w odniesieniu do tetrametylosilanu (TMS).

### 3.2.2. Analiza widm podczerwieni (IR)

Analizę widm podczerwieni przeprowadzono dla próbek wszystkich otrzymanych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych. Pomiary zostały wykonane przy pomocy spektroskopu FT-IR (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) zaopatrzonego w przystawkę odbiciową ATR (ang. *Attenuated Total Reflectance*) Spectrum 100, firmy Perkin Elmer, z komputerową rejestracją widma.

W trakcie pomiaru, po uprzedniej kalibracji sprzętu, polegającej na skanowaniu tła, odpowiednią porcję próbki nanoszono na oczyszczony kryształ, po czym dociskano do kryształu z określoną siłą. Zakres liczb falowych promieniowania wynosił  $4000 - 380 \text{ cm}^{-1}$  i odpowiadał podstawowej podczerwieni. Rejestracji widm dokonano z rozdzielczością  $4 \text{ cm}^{-1}$  w 4 powtórzeniach.

### 3.2.3. Analiza elementarna

Analiza elementarna wybranych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych została wykonana przez Środowiskowe Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej UAM w Poznaniu na aparacie Elemental, model Vario EL III. Urządzenie to umożliwia oznaczenie zawartości pierwiastków takich jak: węgiel, wodór, tlen, azot i siarka. Zastosowana metoda polega na spalaniu próbki w temperaturze  $1200^\circ\text{C}$ , rozdzieleniu uzyskanych gazów na kolumnach adsorpcyjnych i detekcji na podstawie określenia różnicy przewodności cieplnej. Analizie poddano próbki następujących estrów:

- ferulanu tetradecylu,
- galusanu tetradecylu,
- 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu.

### **3.3. Ocena właściwości fizykochemicznych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych**

#### **3.3.1. Badanie temperatury topnienia**

Temperatura topnienia wszystkich otrzymanych estrów została zbadana metodą mikroskopową z wykorzystaniem aparatu Boetiusa. Przyrząd ten jest zbudowany z mikroskopu optycznego przytwierdzonego do stolika grzejnego, wyposażonego w termometr oraz opornik, który umożliwia sterowanie temperaturą stolika grzejnego.

Przed przystąpieniem do pomiarów temperatury topnienia włączono źródło światła mikroskopu. Na skali opornika ustawiono maksymalną temperaturę grzania, przewyższającą przewidywaną temperaturę topnienia badanych związków. Próbkę badanego związku rozdrobniono i w niewielkiej ilości przeniesiono na szkiełko podstawowe, a następnie nakryto szkiełkiem nakrywkowym. Przygotowany w ten sposób materiał badawczy umieszczono na stoliku grzejnym mikroskopu i dokonano regulacji ostrości, w ten sposób, by poddana badaniu próbka była dobrze widoczna w okularze. W następnej kolejności uruchomiono ogrzewanie próbki i nieprzerwanie prowadzono badanie mikroskopowe, do momentu zaobserwowania rozmycia ostrości brzegów próbki na obrazie mikroskopowym. Zakończenie badania było równoznaczne z dokonaniem odczytu temperatury. Badanie przeprowadzono w 3 powtórzeniach.

#### **3.3.2. Badanie stabilności termicznej**

Analiza termogravimetryczna próbek została wykonana w Instytucie Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Badania przeprowadzono na aparacie Jupiter STA 449F3 firmy Netzsch GmbH. Zastosowana metoda polegała na pomiarze zmian masy próbek ogrzewanych w kontrolowanej atmosferze azotu. W trakcie wykonywanych oznaczeń, przy pomocy wagi termogravimetrycznej, dokonano pomiaru zmian masy badanych substancji w zależności od zmian temperatury. Pomiar temperatury został przeprowadzony przy użyciu termopary umieszczonej bezpośrednio przy naczynku próby.

Próbki o masie 10 mg, w tyglach z  $Al_2O_3$ , umieszczano w piecu połączonym z termowagą. Badania zostały przeprowadzone w atmosferze azotu, przy jednoczesnej zmianie

temperatury w przedziale od 40 do 550°C, z szybkością przyrostu temperatury 10°C/min i objętościowym natężeniem przepływu gazu 40 ml/min.

Analizie termogravimetrycznej zostały poddane próbki wszystkich otrzymanych estrów oraz próbki wykorzystanych do ich syntezy kwasów fenolowych.

### **3.3.3. Badanie rozpuszczalności**

W trakcie przeprowadzonych badań dokonano oceny rozpuszczalności wszystkich otrzymanych estrów w wybranych rozpuszczalnikach. Do badań wykorzystano redestylowaną wodę oraz rozpuszczalniki organiczne o zróżnicowanej polarności, takie jak:

- olej,
- octan etylu,
- chloroform,
- metanol,
- aceton,
- 2-propanol.

Jako wskaźnik całkowitej rozpuszczalności próbki w określonym rozpuszczalniku uznano zdolność wytworzenia homogenicznej cieczy po wymieszaniu obu substancji. Do wykonania oznaczenia przyjęto umowne proporcje pomiędzy rozpuszczalnikiem a próbką badaną.

Do zlewki o pojemności 25 ml odważono około 0,003 g rozdrobnionego estru, do którego następnie dodano około 1 ml rozpuszczalnika. Całość energicznie wymieszano i dokonano wizualnej oceny stopnia jednorodności mieszaniny.

### **3.3.4. Określenie równowagi hydrofilowo-lipofilowej długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych**

Współczynnik HLB jest miarą stosunku między częścią hydrofilową cząsteczki a jej częścią hydrofobową. Znajomość wartości tego współczynnika umożliwia określenie, w jaki sposób budowa hydrofilowo-lipofilowa cząsteczek wpływa na możliwość praktycznego wykorzystania określonego związku [Przondo 2010; Zieliński 2006].

Wartość liczbowa HLB dla wszystkich otrzymanych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych wyznaczono na podstawie metody zaproponowanej przez McGowana

( $HLB_M$ ), która polega na prostym sumowaniu udziałów odpowiednich grup, atomów i wiązań. W przypadku, gdy brak odpowiednich danych liczbowych uniemożliwia obliczenie wartości wskaźnika  $HLB_M$ , do wyznaczenia jego wartości wykorzystuje się zastosowane w pracy wzory:

$$HLB_M = 7 - 0,0337 \cdot V_x + 1,5 \cdot n_h$$

gdzie:

$V_x$  – molowa objętość charakterystyczna cząsteczki surfaktantu [ $cm^3/mol$ ]

$n_h$  – liczba hydratacji części polarnej cząsteczki.

Tabela 8 Liczby hydratacji ( $n_h$ ) elementów strukturalnych uwzględnionych w przeprowadzonych obliczeniach

| Grupy hydrofilowe | $n_h$ |
|-------------------|-------|
| -COO- (ester)     | 2     |
| -OH               | 1     |
| -OCH <sub>3</sub> | 1     |

Wartość  $V_x$  obliczono jako sumę udziałów poszczególnych atomów (Tabela 9), według podanego wzoru:

$$V_x = \sum n_i \cdot V_{x_i} - 6,56 \cdot B$$

gdzie:

B – liczba wiązań obliczana według wzoru  $B=N+R-1$

N – całkowita liczba atomów cząsteczki surfaktantu (oprócz przeciwjonów),

R – liczba pierścieni w cząsteczce surfaktantu.

Tabela 9 Objętości charakterystyczne ( $V_x$ ) atomów uwzględnionych w przeprowadzonych obliczeniach

| Atom | $V_x$ [ $cm^3/mol$ ] |
|------|----------------------|
| O    | 12,43                |
| H    | 8,71                 |
| C    | 16,35                |

### 3.3.5. Wstępna ocena właściwości promieniochronnych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych na podstawie widm UV-VIS

W celu dokonania wstępnej oceny właściwości promieniochronnych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych sporządzono metanolowe roztwory badanych związków o stężeniu 2,25  $\mu\text{M}$ , a następnie dokonano pomiaru widm w zakresie UV-VIS (200 – 800 nm), wobec metanolu. Do pomiaru wykorzystano spektrofotometr UV-VIS Genesis 6 firmy Milton Roy.

Wstępna ocena właściwości promieniochronnych na podstawie widm UV-VIS otrzymanych związków polegała na wyznaczeniu następujących parametrów:

- maksimum absorpcji  $\lambda_{\text{max}}$  dla metanolowych roztworów długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych,
- pół powierzchni pod krzywą w zakresach: UVA I (340 – 400 nm), UVA II (320 - 340 nm) i UVB (290 – 320 nm), które zostały obliczone na drodze całkowania graficznego, metodą parabol Simpsona.

$$\text{AUC} = \int_{\lambda_{\text{min}}}^{\lambda_{\text{max}}} A(\lambda) d\lambda$$

gdzie:

AUC – pole powierzchni pod krzywą (Area Under Curve)

$\lambda_{\text{min}}$ ,  $\lambda_{\text{max}}$  – długości fali odpowiadające granicom przedziałów UVA I (340 – 400 nm), UVA II (320 - 340 nm) i UVB (290 – 320 nm),

- stosunek wartości pola powierzchni pod krzywą w zakresie UVA (AUC UVA I i AUC UVA II) do pola powierzchni pod krzywą UVB (AUC UVB) zgodnie z metodą BSRS (Boots Star Rating System) [Musiał 2010].
- krytyczną długości fali, według metody zaproponowanej przez Diffey'a i współpracowników [2000]. Wartość tego parametru odpowiada długości fali w zakresie 290 – 400 nm, ograniczającej strefę adekwatną do 90% pola powierzchni pod krzywą w zakresie UV. Wyznacza się ją na podstawie podanego wzoru:

$$\int_{290}^{\lambda_{\text{kr}}} A(\lambda) d\lambda = \int_{290}^{400} A(\lambda) d\lambda$$

### **3.4. Ocena właściwości przeciwutleniających długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych w oleju z pestek winogron.**

#### **3.4.1. Surowiec przeznaczony do badań i warianty próbek**

Oceny właściwości przeciwutleniających długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych dokonano na podstawie badań przechowalniczych próbek oleju z pestek winogron zawierających dodatek otrzymanych związków względem próby kontrolnej, niezawierającej dodatku przeciwutleniacza. Równolegle wykonano oznaczenia dla próbek oleju z pestek winogron zawierających dodatek BHT. Otrzymane wyniki porównano.

Do badań wykorzystano olej z pestek winogron (*Vitis vinifera L.*), który jest popularnym surowcem kosmetycznym i spożywczym. Olej ten jest bogatym źródłem jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych spośród, których największy udział stanowią kwasy:  $\alpha$ -linolowy i oleinowy (Tabela 10). Według danych literaturowych, wspomniany surowiec wykazuje szeroką aktywność biologiczną, przejawiającą się działaniem [Fernandes i in. 2013, Maier, Schieber i Kammerer 2009]:

- neuroprotekcijnym,
- przeciwnowotworowym,
- hipocholesterolemicznym,
- promieniochronnym,
- poprawiającym wrażliwość insulinową,
- prewencyjnym w chorobach układu sercowo-naczyniowego i katarakcie.

Olej z pestek winogron jest cenionym surowcem kosmetycznym, stosowanym w preparatach przeznaczonych dla skóry zniszczonej i wrażliwej. Jego właściwości regeneracyjne wynikają z obecności znacznych ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i substancji towarzyszących [Yu i Ahmedna 2013].

Przed rozpoczęciem badań przechowalniczych, dokonano doboru odpowiedniego oleju pod względem zaawansowania zmian oksydacyjnych. Parametrem decydującym o zakwalifikowaniu surowca do badań były wartości liczby nadtlenkowej. Zastosowany olej charakteryzował się najniższą wartością tego wyróżnika, spośród wszystkich przebadanych olejów.

Surowcem przeznaczonym do badań był olej z pestek winogron tłoczony na zimno, nierafinowany, zakupiony w punkcie sprzedaży detalicznej, o aktualnym terminie

przydatności (zadeklarowany okres trwałości: 6-12 miesięcy). Produkt podlegał dystrybucji w butelkach z ciemnego szkła o pojemności 500 ml.

Tabela 10 Skład kwasów tłuszczowych oleju z pestek winogron

| <b>Kwasy tłuszczowe</b> | <b>Zawartość [%]</b> |
|-------------------------|----------------------|
| C14:0                   | 0,0 - 0,3            |
| C16:0                   | 5,5 - 11,0           |
| C16:1                   | 0,0 - 1,2            |
| C17:0                   | 0,0 - 0,2            |
| C17:1                   | 0,0 - 0,1            |
| C18:0                   | 3,0 - 6,5            |
| <b>C18:1</b>            | <b>12,0 - 28,0</b>   |
| <b>C18:2</b>            | <b>58,0 - 78,0</b>   |
| C18:3                   | 0,0 - 1,0            |
| C20:0                   | 0,0 - 1,0            |
| C20:1                   | 0,0 - 0,3            |
| C22:0                   | 0,0 - 0,5            |
| C22:1                   | 0,0 - 0,3            |
| C24:0                   | 0,0 - 0,4            |

Źródło: [Codex Alimentarius 2001]

Materiał badawczy stanowiły próbki oleju z pestek winogron stabilizowane otrzymanymi estrami oraz BHT. Przed przeprowadzeniem badań przechowalniczych sporządzono następujące warianty próbek :

- olej z pestek winogron + FT,
- olej z pestek winogron + FH,
- olej z pestek winogron + FO,
- olej z pestek winogron + GT,
- olej z pestek winogron + GH,
- olej z pestek winogron + GO,
- olej z pestek winogron + 3,5-DT,
- olej z pestek winogron + 3,5-DH,
- olej z pestek winogron + 3,5-DO,
- olej z pestek winogron + BHT,
- próba kontrolna (bez dodatku przeciwutleniacza).

Zastosowano dwa warianty stężeń przeciwutleniaczy w próbkach: 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{g}$  lub 450  $\mu\text{moli}/100\text{g}$ . Odpowiadają one stechiometrycznie 0,001% w/w oraz 0,1% w/w BHT. Dobór tych wartości wynikał z zachowania proporcji zawartych w większości receptur kosmetycznych, gdzie przeciwutleniacze syntetyczne uwzględniane są w stężeniach mieszczących się w przedziale 0,001 – 0,1%. Składniki te charakteryzują się w wymienionych warunkach wysoką skutecznością działania. Zastosowana konfiguracja umożliwiła określenie zdolności otrzymanych związków do hamowania procesów utleniania przy stężeniach granicznych wspomnianego przedziału.

Sporządzone próbki przechowywano w temperaturze pokojowej przez okres 6 miesięcy, w butelkach z ciemnego szkła, na stanowisku pozbawionym światła i wilgoci. Dostosowanie warunków przechowywania do zaleceń producenta umożliwiło określenie wpływu otrzymanych związków na procesy utleniania zachodzące w warunkach jakie powinien stworzyć ostateczny użytkownik.

Stopień utlenienia tłuszczu określono na podstawie wartości liczby nadtlenkowej oznaczonej zgodnie z metodą określoną w normie PN-EN ISO 3960:2009 „Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej. Jodometryczne (wizualne) oznaczanie punktu końcowego”. Pomiary przeprowadzano w 30-dniowych odstępach czasu [Kiewlicz i Malinowska 2013].

Długołańcuchowe estry kwasów fenolowych mogą wykazywać właściwości przeciwutleniające zgodne z mechanizmem charakterystycznym dla przeciwutleniaczy pierwotnych, opisanym w rozdziale 3., których działanie opiera się na przerywaniu procesu autooksydacji na etapie inicjacji i propagacji. Związki te zapobiegają zatem powstawaniu nadtlenków, które wykazują zdolność do szybkiego przekształcania się we wtórne produkty utleniania. Przeciwutleniacze pierwotne mogą więc przeciwdziałać w sposób pośredni ich powstawaniu. Zastosowany do badań olej z pestek winogron charakteryzował się niską wartością liczby nadtlenkowej co umożliwiło określenie wpływu zastosowanych przeciwutleniaczy na stabilność oksydacyjną tłuszczu w początkowej fazie procesu utleniania. Z tego powodu zakres przeprowadzonych badań ograniczał się jedynie do oznaczenia zawartości pierwotnych produktów utleniania w próbkach.



### 3.4.2. Oznaczanie liczby nadtlenkowej

Liczba nadtlenkowa jest parametrem określającym stopień utlenienia tłuszczów, wyrażonym w milirównoważnikach aktywnego tlenu na kilogram, który odpowiada zawartości w próbce substancji utleniających jodek potasu w opisanych warunkach technologicznych [Rozporządzenie Komisji z dnia 24 stycznia 2011 r]. Wskaźnik ten opisuje w sposób ilościowy zawartość nadtlenków, powstających w trakcie procesu utleniania tłuszczów i jest powszechnie wykorzystywany do oceny ich świeżości.

Wykonane oznaczenie polegało na określeniu zawartości nadtlenków, które utleniały w środowisku kwaśnym jodek potasu. Wydzielony jod miareczkowano 0,002 N wodnym roztworem tiosiarczanu sodu w obecności roztworu skrobi jako wskaźnika. Do kolby stożkowej o pojemności 250 ml odważono około 2 g oleju z dokładnością 0,001 g. Wspomnianą naważkę oleju dokładnie wymieszano z 10 ml chloroformu. Do otrzymanej mieszaniny odmierzone 15 ml kwasu octowego i 1 ml nasyconego roztworu jodku potasu. Kolbę niezwłocznie zamknięto korkiem szklanym. Całość wytrząsano przez 1 minutę, a następnie pozostawiono w zaciemnionym miejscu, w temperaturze pokojowej. Po upływie 5 minut dodano 75 ml wody redestylowanej i dokładnie wymieszano. Wydzielony jod miareczkowano 0,002 N, wodnym roztworem tiosiarczanu sodu wobec roztworu skrobi jako wskaźnika, do całkowitego odbarwienia, utrzymującego się przez co najmniej 30 s. Równoległe z oznaczeniem sporządzono próbę ślepa, niezawierającą dodatku oleju. Każde oznaczenie powtórzono 3 razy.

Liczbę nadtlenkową (LN), wyrażoną w milirównoważnikach aktywnego tlenu w kilogramie próbki obliczono na podstawie podanego wzoru:

$$LN = \frac{(V_1 - V_2) \cdot T}{m} \cdot 1000 \text{ [mEqO}_2\text{/kg]}$$

gdzie:

$V_1$  – objętość wodnego roztworu tiosiarczanu sodu użytego do miareczkowania próby badanej [ml],

$V_0$  - objętość wodnego roztworu tiosiarczanu sodu użytego do miareczkowania próby ślepej [ml],

T- normalność roztworu wodnego tiosiarczanu sodu,

m – masa badanej próbki oleju [g].

### **3.4.3. Ocena aktywności przeciwutleniającej długolańcuchowych estrów kwasów fenolowych i BHT**

Jako miarę aktywności przeciwutleniaczy w próbkach oleju wykorzystano współczynnik ochronny WO. Wskaźnik ten umożliwia określenie wpływu przeciwutleniacza na stabilność oksydacyjną tłuszczu. Im wyższa jest wartość tego współczynnika, tym ochrona nienasyconych kwasów tłuszczowych przed procesami utleniania jest skuteczniejsza. Wartość współczynnika  $WO > 1$  oznacza, że określony związek wykazuje właściwości przeciwutleniające,  $WO = 1$  wskazuje na brak efektu ochronnego, natomiast  $WO < 1$  informuje o proutleniającym charakterze związku [Szukalska 2003].

Za wartość krytyczną liczby nadtlenkowej przyjęto 10 mEqO<sub>2</sub>/kg [Wroniak, Kwiatkowska i Krygier 2006]. Współczynnik ochronny wyznaczono na podstawie następującego wzoru:

$$WO = \frac{t_{\text{badana}}}{t_{\text{kontrolna}}}$$

gdzie:

$t_{\text{badana}}$  – czas, w którym liczba nadtlenkowa oznaczona dla próby zawierającej dodatek przeciwutleniacza osiągnęła wartość równą 10 mEqO<sub>2</sub>/kg,

$t_{\text{kontrolna}}$  – czas, w którym liczba nadtlenkowa oznaczona dla próby kontrolnej osiągnęła wartość równą 10 mEqO<sub>2</sub>/kg.

## **3.5. Parametry jakości emulsji kosmetycznych typu O/W zawierających dodatek długolańcuchowych estrów kwasów fenolowych**

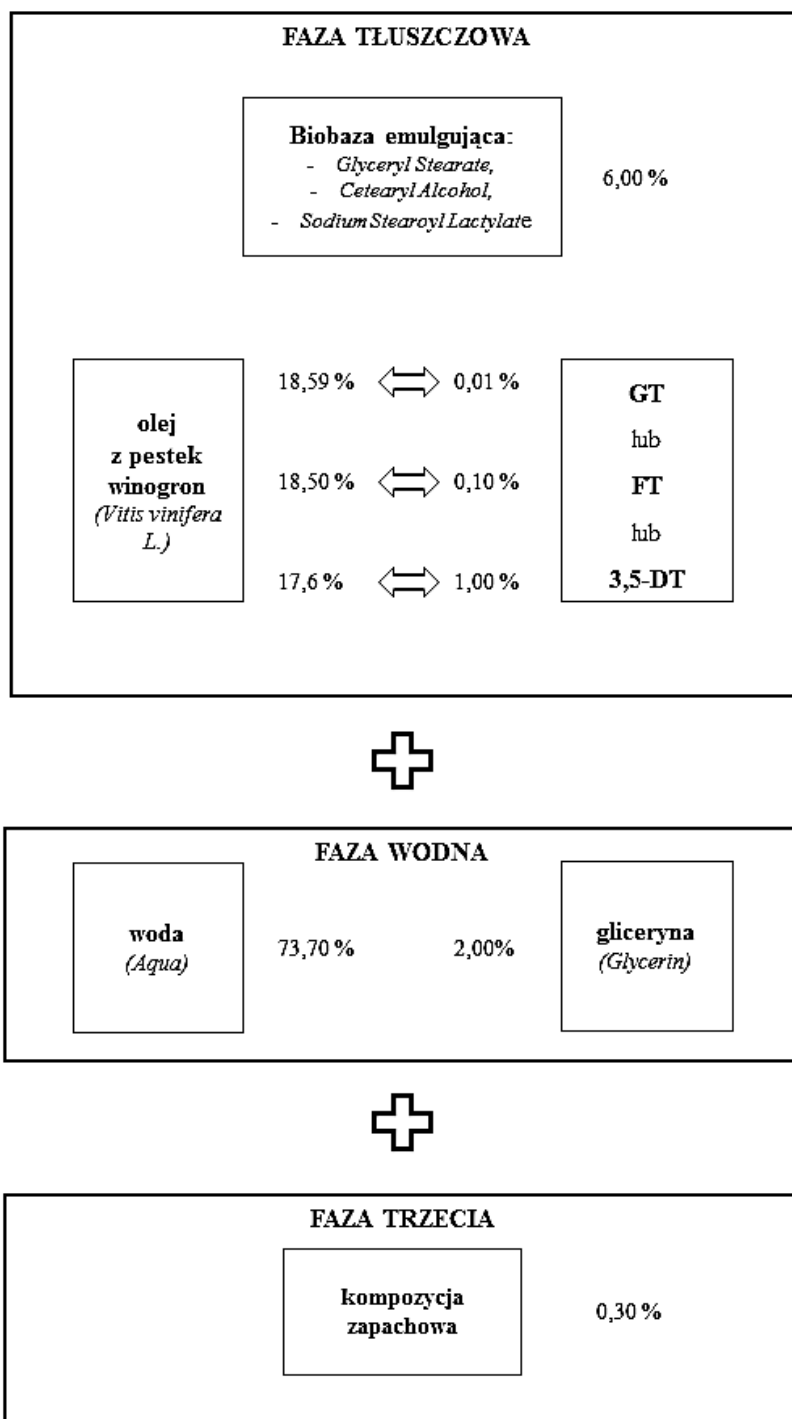
### **3.5.1. Sporządzanie emulsji kosmetycznych zawierających dodatek długolańcuchowych estrów kwasów fenolowych**

Emulsje kosmetyczne typu O/W sporządzono poprzez zmieszanie składników przedstawionych na schemacie 8.

W skład poszczególnych emulsji weszły następujące estry w stężeniach 0,01%, 0,10% i 1,00%:

- galusan tetradecylu (GT),
- ferulan tetradecylu (FT),

➤ 3,5-dihydroksybenzoesan tetrade cylu (3,5-DT).



Schemat 8 Składniki sporządzonych emulsji kosmetycznych typu O/W

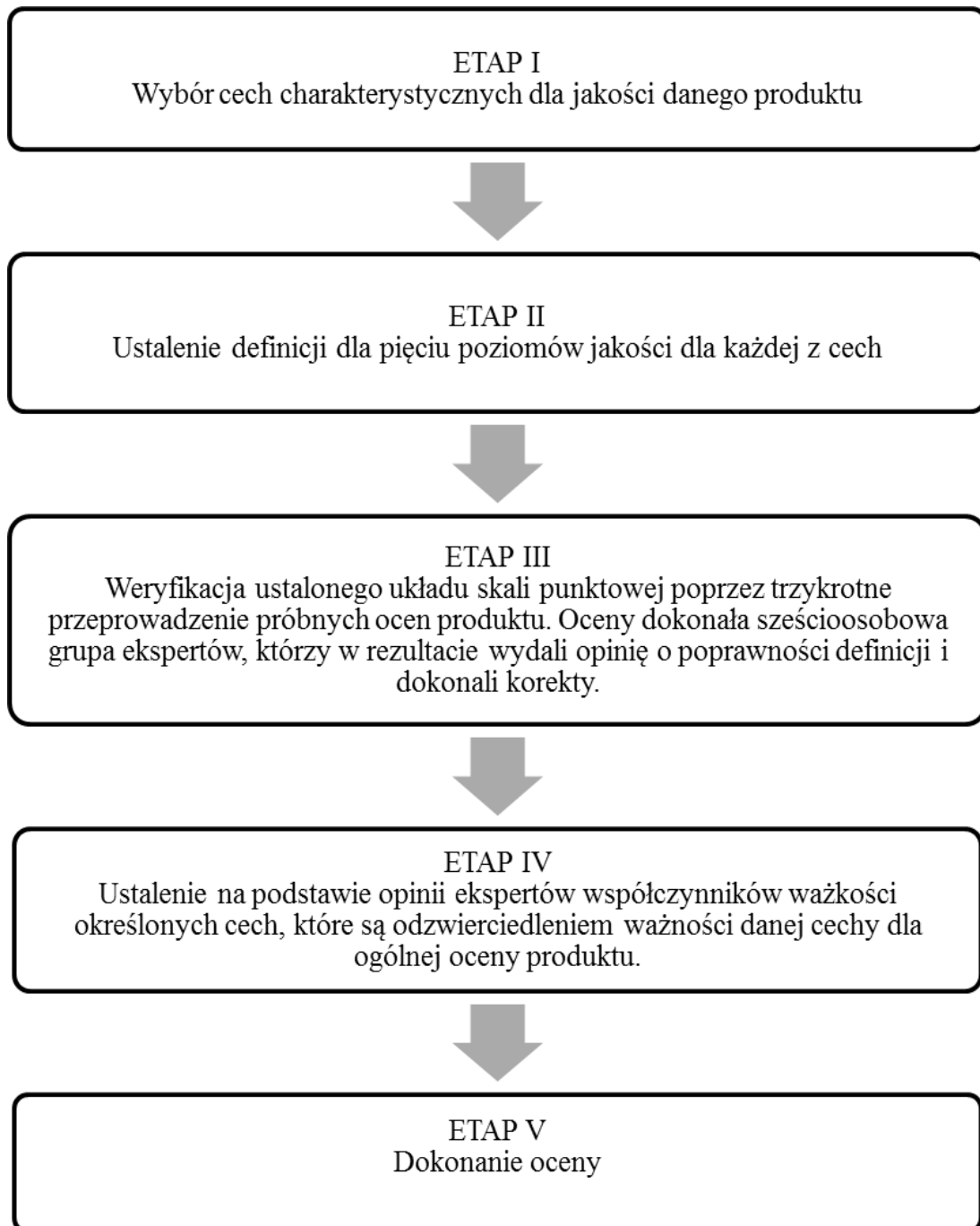
W zlewce o pojemności 100 ml, w zależności od docelowego stężenia estru w emulsji, umieszczono składniki fazy tłuszczowej: 3,00 g biobazy emulgującej, odpowiednią ilość estru (0,005 g lub 0,050 g lub 0,500 g) i oleju z pestek winogron (9,295 g lub 9,250 g lub 8,8 g). W zlewce o pojemności 150 ml odważono 36,35 g wody destylowanej i 1,00 g gliceryny - składniki fazy wodnej. Obie zlewki wraz z zawartością umieszczono na łaźni wodnej i podgrzewano do temperatury 60 - 70°C stale mieszając. Po osiągnięciu ustalonej temperatury obie fazy połączono, poprzez przeniesienie fazy tłuszczowej jednostajnym strumieniem do fazy wodnej przy jednoczesnym mieszaniu zawartości na mieszadle magnetycznym. Po obniżeniu temperatury do 30 - 40°C, nie przerywając mieszania, do emulsji dodano 0,15 g kompozycji zapachowej. Uzyskaną emulsję poddano dokładnemu mieszaniu do całkowitego ostygnięcia.

### **3.5.2. Ocena sensoryczna emulsji kosmetycznych zawierających dodatek długocząsteczkowych estrów kwasów fenolowych**

Ocena sensoryczna sporządzonych emulsji kosmetycznych została przeprowadzona metodą pięciopunktową, która obejmuje pięć klas jakości:

- 5 – jakość bardzo dobra,
- 4 – jakość dobra,
- 3 – jakość dostateczna,
- 2 – jakość niedostateczna,
- 1 – jakość zła.

Badanie zostało przeprowadzone przez zespół oceniający złożony z sześciu osób przeszkolonych w zakresie analizy sensorycznej. Procedura związana z konstruowaniem skali określającej poziom każdej cechy, została podzielona na pięć etapów, które zostały przedstawione na schemacie 9. Ocenę przeprowadzono na podstawie parametrów przedstawionych w tabeli 11.



Schemat 9 Etapy konstruowania skali oceniającej

Tabela 11 Kryteria oceny sensorycznej emulsji kosmetycznych zawierających długołańcuchowe estry kwasów fenolowych

| <b>Parametr</b>     | <b>Definicja</b>   | <b>Opis procedury badawczej</b>  | <b>Współczynnik ważkości</b> |
|---------------------|--|--|------------------------------|
| <b>Przyczepność</b> | Parametr określający stopień trudności pobierania preparatu za pomocą opuszka palca. Dobra przyczepność emulsji świadczy o łatwości wykonania tej czynności. | Na stole ustawiono zlewkę o pojemności 50 ml. Umieszczono w niej ok. 20 ml emulsji. Badanie polegało na swobodnym pobieraniu emulsji opuszkiem palca ze zlewki. Podczas obserwacji zwracano uwagę, na tendencje emulsji do spływania lub tworzenia na opuszku palca charakterystycznego stożka.  | 0,10                         |
| <b>Konsystencja</b> | Parametr określający gęstość oraz spójność emulsji.  | Na stole ustawiono zlewkę o pojemności 50 ml. Umieszczono w niej ok. 20 ml emulsji. Badanie polegało na umieszczeniu palca w emulsji pod kątem ok. 60° i jego energicznym wysunięciu. Oceniano gęstość i spójność emulsji pozostałej na palcu.   | 0,05                         |
| <b>Jednolitość</b>  | Parametr określający jednorodność emulsji. Uwzględnia on gładkość jej powierzchni oraz obecność pęcherzyków powietrza.                                       | Na stole ustawiono zlewkę o pojemności 50 ml. Umieszczono w niej ok. 20 ml emulsji. Dokonano wstępnej oceny gładkości i jednolitości emulsji znajdującej się w zlewce. W następnej kolejności na oczyszczonej skórze przedramienia naniesiono ok. 0,5 ml emulsji i rozprowadzono ruchem kolistym. Oceniano obecność grudek, pęcherzyków powietrza itp. | 0,03                         |

|                       |   |  |      |
|-----------------------|---|--|------|
| <b>Efekt poduszki</b> | Parametr określający stopień odczuwalności kremu między palcami podczas pocierania palców o siebie. | Na stole ustawiono zlewkę o pojemności 50 ml. Umieszczono w niej ok. 20 ml emulsji. Ze zlewki pobrano ok. 0,5 ml emulsji i umieszczono pomiędzy kciukiem a palcem wskazującym. Pocierając palcami o siebie określono wyczuwalną ilość kremu pomiędzy palcami.  | 0,02 |
| <b>Rozprowadzanie</b> | Parametr określający stopień trudności rozprowadzania emulsji na powierzchni skóry.                 | Na stole ustawiono zlewkę o pojemności 50 ml. Umieszczono w niej ok. 20 ml emulsji. Ze zlewki pobrano ok. 0,5 ml emulsji i naniesiono na oczyszczoną skórę lewego przedramienia. Emulsję rozprowadzono na skórze palcami prawej ręki. Oceniano opór jaki sprawia emulsja podczas rozprowadzania.   | 0,10 |
| <b>Wchłanianie</b>    | Parametr określający szybkość wchłaniania emulsji w naskórek.                                       | Na stole ustawiono zlewkę o pojemności 50 ml. Umieszczono w niej ok. 20 ml emulsji. Ze zlewki pobrano ok. 0,5 ml emulsji i naniesiono na oczyszczoną skórę lewego przedramienia. Emulsję rozprowadzono na skórze palcami prawej ręki. Po upływie kilku minut oceniano stopień wnikięcia preparatu w naskórek.  | 0,15 |
| <b>Kleistość</b>      | Parametr określający zdolność preparatu do pozostawiania po aplikacji lepkiej, kleistej warstwy     | Na stole ustawiono zlewkę o pojemności 50 ml. Umieszczono w niej ok. 20 ml emulsji. Ze zlewki pobrano ok. 0,5 ml emulsji i naniesiono na oczyszczoną skórę lewego przedramienia. Emulsję rozprowadzono na skórze palcami prawej ręki. Poprzez przyciśnięcie prawej ręki do obszaru, na który naniesiono krem, bezpośrednio po aplikacji oceniano obecność kleistej warstwy na powierzchni skóry. | 0,10 |

|                      |  |   |      |
|----------------------|--|---|------|
| <b>Tłustość</b>      | Parametr określający zdolność preparatu do pozostawiania po aplikacji tłustego filmu na powierzchni skóry bezpośrednio po aplikacji. | Na stole ustawiono zlewkę o pojemności 50 ml. Umieszczono w niej ok. 20 ml emulsji. Ze zlewki pobrano ok. 0,5 ml emulsji i naniesiono na oczyszczoną skórę lewego przedramienia. Emulsję rozprowadzono na skórze palcami prawej ręki. Bezpośrednio po aplikacji oceniano obecność tłustego filmu na powierzchni skóry.  | 0,10 |
| <b>Natluszczenie</b> | Parametr określający zdolność preparatu do pozostawiania po upływie 30 minut od aplikacji tłustego depozytu na powierzchni skóry.    | Na stole ustawiono zlewkę o pojemności 50 ml. Umieszczono w niej ok. 20 ml emulsji. Ze zlewki pobrano ok. 0,5 ml emulsji i naniesiono na oczyszczoną skórę lewego przedramienia. Emulsję rozprowadzono na skórze palcami prawej ręki. Po upływie pół godziny od aplikacji oceniano obecność tłustego depozytu na powierzchni skóry.                                 | 0,15 |
| <b>Wyglądzenie</b>   | Parametr określający stopień wygładzenia skóry po zastosowaniu preparatu.  | Na stole ustawiono zlewkę o pojemności 50 ml. Umieszczono w niej ok. 20 ml emulsji. Ze zlewki pobrano ok. 0,5 ml emulsji i naniesiono na oczyszczoną skórę lewego przedramienia. Emulsję rozprowadzono na skórze palcami prawej ręki. Po upływie godziny od aplikacji oceniano stopień wygładzenia skóry w porównaniu z obszarem, na którym nie dokonano aplikacji. | 0,20 |

Źródło: opracowane na podstawie: [Sulek, Małyśa i Pytłas 2006]



### **3.5.3. Ocena stabilności fizycznej emulsji kosmetycznych zawierających dodatek długłańcuchowych estrów kwasów fenolowych**

Ocena stabilności fizycznej sporządzonych emulsji kosmetycznych została przeprowadzona zgodnie z wytycznymi normy BN-64/6140-02 i obejmowała badanie stabilności fizycznej w podwyższonej temperaturze oraz badanie stabilności fizycznej w obniżonej temperaturze .

W celu określenia stabilności emulsji w podwyższonej temperaturze, próbki umieszczono w cieplarni laboratoryjnej Termometal i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 30°C. Po upływie tego czasu dokonano wizualnej oceny stabilności ogrzewanych próbek. Emulsja nie powinna ulec rozwarstwieniu.

Ocena stabilności emulsji w obniżonej temperaturze polegała na umieszczeniu próbek emulsji w chłodzarce i przetrzymywaniu ich w temperaturze -3°C przez 24 godziny. Po upływie tego czasu dokonano wizualnej oceny stabilności badanych próbek. Emulsja nie powinna ulec rozwarstwieniu.

### **3.5.4. Ocena właściwości przeciwrodnikowych długłańcuchowych estrów kwasów fenolowych w emulsjach kosmetycznych typu O/W**

Oceny właściwości przeciwrodnikowych długłańcuchowych estrów kwasów fenolowych w emulsjach kosmetycznych dokonano na podstawie metody z rodnikiem DPPH<sup>•</sup>, zaproponowanej przez Sanchez-Moreno i współpracowników [1998], z wprowadzonymi modyfikacjami.

Rodnik DPPH<sup>•</sup> w roztworach przybiera barwę purpurową z maksimum absorpcji przy długości fali 515 nm. W wyniku reakcji rodnika DPPH<sup>•</sup> z przeciwutleniaczem następuje zmiana barwy roztworu, która skutkuje spadkiem wartości absorbancji. Za miarę aktywności przeciwutleniającej przyjęto wartość parametru IC<sub>50</sub> (EC<sub>50</sub>), który określa stężenie przeciwutleniacza powodujące spadek początkowego stężenia rodnika o 50%.

Badaniu poddano emulsje sporządzone zgodnie z recepturą opisaną w punkcie 3.5.1., zawierające 1,00% dodatek:

- ferulanu tetradecylu,
- ferulanu heksadecylu,
- ferulanu oktadecylu,

- galusanu tetradecylu,
- glusanu heksadecylu,
- galusanu oktadecylu,
- 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu,
- 3,5-dihydroksybenzoesanu haksadecylu,
- 3,5-dihydroksybenzoesanu oktadecylu

oraz emulsję kontrolną nie zawierającą dodatku długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych.

Emulsję w ilości 0,4800 g rozpuszczono w 10 ml mieszaniny chloroform – metanol 1:1. Dla każdej emulsji sporządzono próbki w trzech naważkach. Otrzymany roztwór podstawowy poddano dalszym rozcieńczeniom. W kuwecie szklanej umieszczono określone objętości roztworu DPPH<sup>\*</sup> o stężeniu 100 μM w mieszaninie chloroform – metanol 1:1 oraz roztworu badanego, w ten sposób by stężenie finalne estru w mieszaninie reakcyjnej wynosiło:

- dla emulsji zawierających estry kwasu galusowego: 0,00 μg/ml (próba zerowa); 2,40 μg/ml, 4,80 μg/ml; 9,60 μg/ml,
- dla pozostałych emulsji: 0,00 μg/ml (próba zerowa); 7,50 μg/ml; 15,00 μg/ml; 22,50 μg/ml; 30,00 μg/ml.

Sporządzone w ten sposób próbki przetrzymywano na stanowisku pozbawionym dostępu światła, przez okres 30 min. Po upływie tego czasu dokonano pomiaru wartości absorbancji poszczególnych próbek przy długości fali 515 nm stosując mieszaninę chloroform – metanol 1:1 jako odnośnik.

Procent wygaszonego rodnika obliczono na podstawie wzoru:

$$Q=100\% \cdot \frac{A_0 - A_c}{A_0}$$

gdzie:

Q – procentowa wartość wygaszonego rodnika DPPH<sup>\*</sup>,

A<sub>0</sub> – wartość absorbancji próbki zerowej,

A<sub>c</sub> – wartość absorbancji próbek po upływie 30 min.

Wartości  $IC_{50}$  poszczególnych próbek określono na podstawie liniowej zależności procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH<sup>•</sup> od stężenia estru w próbce.

### **3.5.5. Korneometryczna ocena stopnia nawilżenia naskórka po jednorazowej aplikacji emulsji kosmetycznych**

Do korneometrycznej oceny stopnia nawilżenia naskórka po jednorazowej aplikacji emulsji kosmetycznych wykorzystano urządzenie Corneometer CM 825 firmy Courage+Khazaka electronic GmbH.

Zasada działania tego urządzenia opiera się na ocenie pojemności elektrycznej wierzchnich warstw naskórka (o grubości w granicach 10-20  $\mu\text{m}$ ), która ulega zwiększeniu wraz ze wzrostem stopnia nawilżenia. Uzyskiwane wyniki pomiaru są wyrażane w arbitralnych jednostkach i są zawarte w przedziale 0-130.

W celu wyeliminowania wpływu warunków zewnętrznych na uzyskane rezultaty, badanie stopnia nawilżenia naskórka wykonano każdorazowo w tym samym pomieszczeniu, przy zachowaniu jednakowych warunków pomiarowych. Pomiary zostały przeprowadzone w temperaturze pokojowej (około 20°C), przy stałej wilgotności (około 40 – 60%), z dala od bezpośredniego dostępu promieniowania słonecznego.

Przeprowadzone badania miały na celu wstępne określenie wpływu obecności długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych w próbkach emulsji na ich właściwości nawilżające. Badane emulsje nie zostały poddane testom dermatologicznym, dlatego zasięg badań został ograniczony do 5 osób.

Osoby poddane badaniu przed przeprowadzeniem oznaczeń zostały poddane aklimatyzacji, mającej na celu zniwelowanie wpływu procesów fizjologicznych na uzyskane wyniki.

W celu wykonania oznaczenia wtyczkę sondy korneometrycznej podłączono delikatnie do gniazda przyrządu. Główną część urządzenia podłączono do źródła zasilania oraz do komputera zaopatrzonego w oprogramowanie umożliwiające rejestrację i wstępne przetworzenie wyników. Przeprowadzenie pomiaru polegało na przykładaniu sondy pomiarowej do odpowiednio przygotowanej partii skóry i bezpośrednim odczycie wyniku. Badanie obejmowało przeprowadzenie pomiarów tuż przed aplikacją preparatu a następnie po 15 min, 30 min, 45 min, 60 min i 120 min od nałożenia emulsji na wyznaczonych

fragmentach skóry przedramion. W każdej serii pomiarowej dokonano 5 odczytów. Badanie przeprowadzono 3-krotnie.

### **3.6. Analiza statystyczna**

Obliczenia statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem programu STATISTICA 10. Każdy spośród przedstawionych w pracy wyników stanowi średnią arytmetyczną co najmniej trzech równoległych pomiarów.

Przeprowadzono nieparametryczny test normalności Kołomogorowa-Smirnowa oraz test na homogeniczność wariancji Levene'a. Następnie wykonano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) stosując test Tuckey'a HSD.

W celu określenia relacji pomiędzy poszczególnymi parametrami, wyznaczono współczynniki korelacji liniowej Pearsona. Przyjęty poziom istotności wynosił  $p < 0,05$ .

## WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

### 1. Wydajności reakcji otrzymywania długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych

Przybliżone wydajności reakcji otrzymywania poszczególnych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12 Wydajności reakcji otrzymywania długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych

| Związek | Masa molowa | Wydajność |
|---------|-------------|-----------|
|         | [g/mol]     | [%]       |
| GT      | 366,49      | 15,93     |
| GH      | 394,55      | 10,27     |
| GO      | 422,61      | 5,58      |
| FT      | 390,55      | 29,43     |
| FH      | 418,61      | 27,12     |
| FO      | 446,67      | 29,10     |
| 3,5-DT  | 349,49      | 34,77     |
| 3,5-DH  | 377,55      | 34,60     |
| 3,5-DO  | 405,61      | 28,14     |

Źródło: Badania własne

### 2. Identyfikacja otrzymanych związków

#### 2.1. Analiza widm jądrowego rezonansu magnetycznego

Metoda protonowego jądrowego rezonansu magnetycznego pozwala na obserwację atomów wodoru, które są najliczniej występującymi atomami w cząsteczkach związków organicznych. Analiza widm magnetycznego rezonansu węglowego umożliwia natomiast bezpośrednie badanie atomów węgla, które tworzą szkielet cząsteczki. Metody te są powszechnie wykorzystywane do identyfikacji i badania prostych cząsteczek organicznych. Służą one również do analizy i opisywania związków wielkocząsteczkowych.

Każdy z elementów widma NMR jest źródłem informacji pozwalającym na ustalenie pełnej struktury danego związku. Liczba grup sygnałów jest elementem wskazującym liczbę jąder równocennych chemicznie, czyli leżących w różnym otoczeniu chemicznym. Intensywność integralna grup sygnałów dostarcza natomiast wiadomości na temat wzajemnego stosunku liczby analizowanych jąder w poszczególnych grupach, co umożliwia określenie minimalnej liczby jąder wodoru lub węgla w cząsteczce, bądź liczby równocennych jąder w grupie. Przesunięcie chemiczne ( $\delta$ ) informuje zaś o otoczeniu chemicznym jądra dającego określony sygnał, czyli o: występowaniu ładunku na tym jądrze, wiązaniach chemicznych, w których dane jądro uczestniczy oraz rodzaju podstawnika związanego z tym jądrem lub znajdującego się w jego pobliżu. Innymi pomocnymi elementami wykorzystywanymi do interpretacji widm NMR są: stała ekranowania, wartość stałej sprzężenia, multipletowość i układ spinowy [Mazurkiewicz i in. 2000].

### **2.1.1. Analiza widm jądrowego rezonansu magnetycznego ferulanu tetradecylu (FT)**

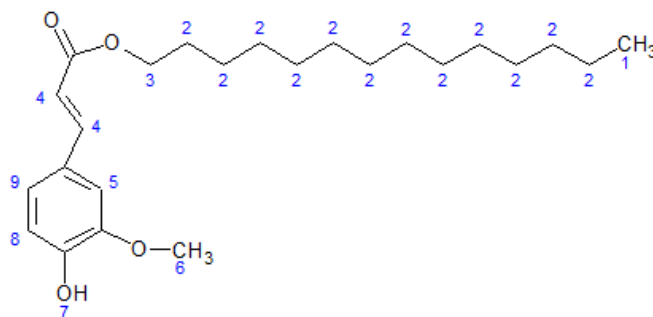
Rejestracji widm NMR ferulanu tetradecylu dokonano z wykorzystaniem spektrometru Varian VNMR-S 400 MHz. Jako rozpuszczalnik zastosowano  $\text{CDCl}_3$ , a wartości przesunięć chemicznych ( $\delta$ ) przedstawiono w odniesieniu do tetrametylosilanu (TMS).

W tabeli 13 i 14 przedstawiono wartości przesunięć chemicznych odczytanych z widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR ferulanu tetradecylu. Na wykresach 1. i 2. przedstawiono widma  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR ferulanu tetradecylu.

Na widmie  $^1\text{H}$  NMR wykonanym dla próbki ferulanu tetradecylu zaobserwowano 9 wyraźnych sygnałów, co świadczy o obecności 9 grup równocennych protonów w cząsteczce. Zgodnie z zakresami przesunięć chemicznych istnieje możliwość wyodrębnienia kilku układów charakterystycznych dla budowy badanego związku. Sygnały protonów zarejestrowane jako intensywny pik przy przesunięciu chemicznym 1,257 ppm, odpowiadają atomom wodoru wchodzącym w skład grup  $-\text{CH}_2-$ . Sygnały w zakresie 7 – 8 ppm świadczą natomiast o obecności układu aromatycznego w cząsteczce badanego związku. Pojedynczy pik pojawiający się przy przesunięciu chemicznym 6,274 ppm, pochodzi natomiast od sygnału atomu wodoru grupy  $-\text{OH}$  przy pierścieniu aromatycznym.

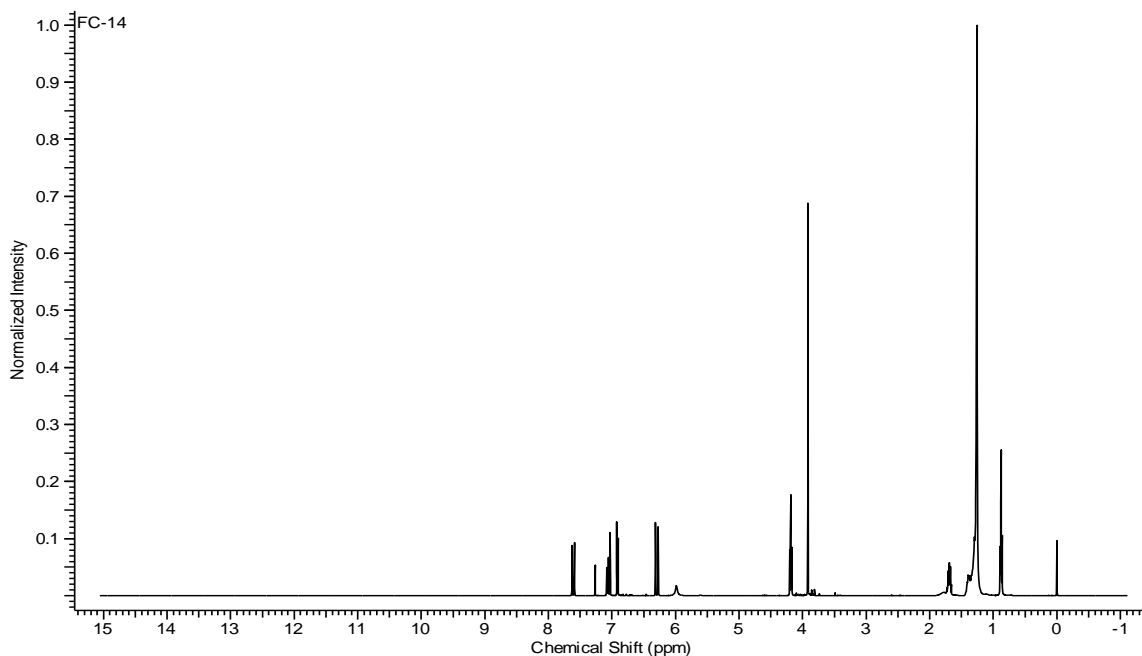
Przeprowadzona analiza widm  $^{13}\text{C}$  NMR umożliwiła uzupełnienie informacji uzyskanych na podstawie interpretacji widm  $^1\text{H}$  NMR. Obecność sygnałów w zakresie 14,084 – 32,635 ppm świadczy o obecności atomów węgla należących do łańcucha alifatycznego. Pik przy przesunięciu chemicznym 167,422 ppm odpowiada natomiast sygnałom karbonylowego atomu węgla grupy estrowej.

Tabela 13 Wartości przesunięć chemicznych w widmie  $^1\text{H}$  NMR ferulanu tetradecylu (FT) w odniesieniu do struktury związku



| Numer grupy | $\delta$ [ppm] | Liczba protonów |
|-------------|----------------|-----------------|
| 1           | 0,895          | 3 H             |
| 2           | 1,257          | 24 H            |
| 3           | 1,713          | 2 H             |
| 4           | 4,188          | 2 H             |
| 5           | 7,078          | 1 H             |
| 6           | 3,919          | 3 H             |
| 7           | 6,274          | 1 H             |
| 8           | 7,628          | 1 H             |
| 9           | 7,033          | 1 H             |

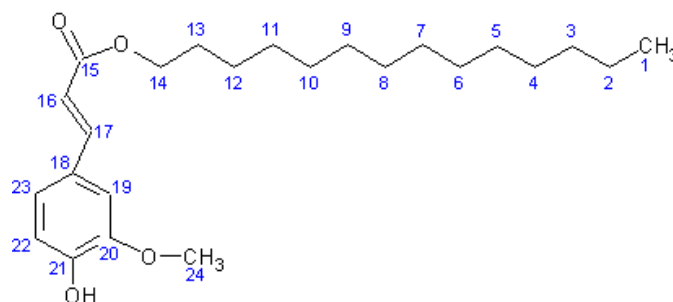
Źródło: badania własne



Wykres 1 Widmo  $^1\text{H}$ NMR ferulanu tetrade cylu (FT)

Źródło: badania własne

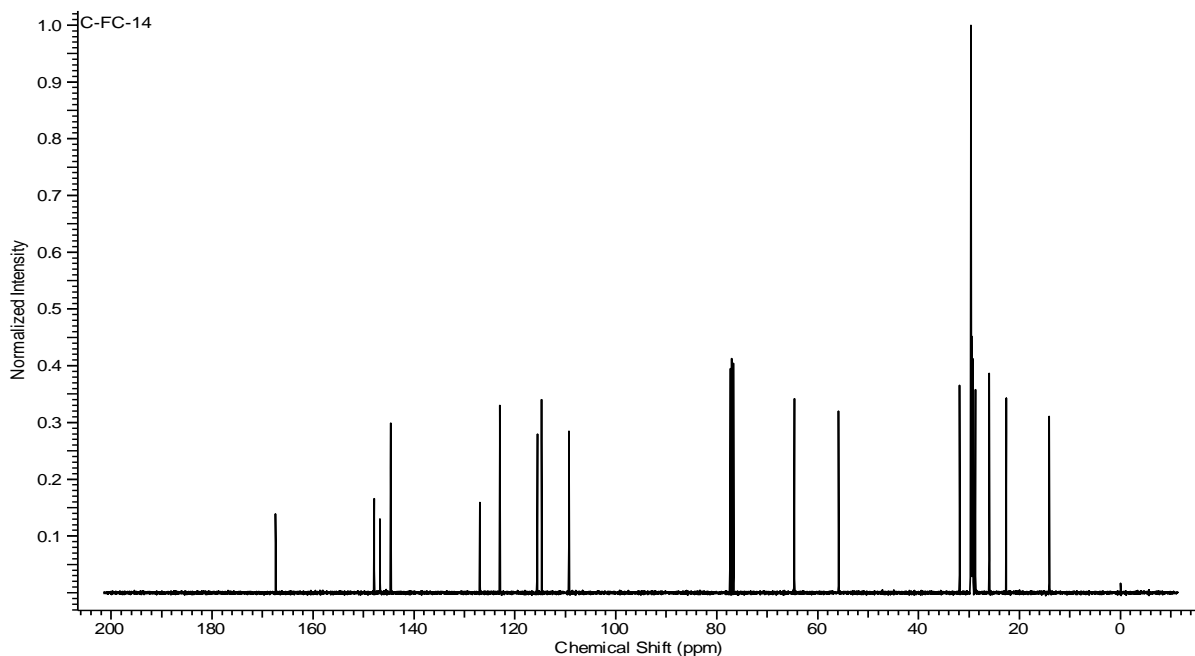
Tabela 14 Wartości przesunięć chemicznych w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR ferulanu tetrade cylu (FT) w odniesieniu do struktury związku



| Numer atomu C | $\delta$ [ppm] | Numer atomu C | $\delta$ [ppm] | Numer atomu C | $\delta$ [ppm] |
|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| 1             | 14,084         | 9             | 29,509         | 17            | 144,632        |
| 2             | 22,652         | 10            | 29,321         | 18            | 109,26         |
| 3             | 32,635         | 11            | 29,266         | 19            | 114,632        |
| 4             | 31,884         | 12            | 28,723         | 20            | 146,734        |
| 5             | 29,655         | 13            | 25,956         | 21            | 147,874        |
| 6             | 29,639         | 14            | 64,602         | 22            | 115,568        |
| 7             | 29,616         | 15            | 167,422        | 23            | 122,997        |
| 8             | 29,558         | 16            | 126,976        | 24            | 55,871         |

Źródło: badania własne





Wykres 2 Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR ferulanu tetradecylu (FT)  
 Źródło: badania własne

### 2.1.2. Analiza widm jądrowego rezonansu magnetycznego galusanu tetradecylu (GT)

Rejestracji widm NMR galusanu tetradecylu dokonano z wykorzystaniem spektrometru Varian VNMR-S 400 MHz. Jako rozpuszczalnik zastosowano  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , a wartości przesunięć chemicznych ( $\delta$ ) przedstawiono w odniesieniu do tetrametylosilanu (TMS).

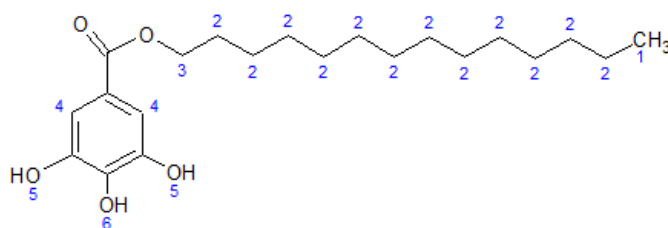
W tabeli 15 i 16 przedstawiono wartości przesunięć chemicznych obecnych na widmach  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR galusanu tetradecylu. Na wykresach 3 i 4 przedstawiono widma  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR badanego estru kwasu galusowego.

Na widmie  $^1\text{H}$  NMR zaobserwowano 7 wyraźnych sygnałów, co świadczy o obecności 7 grup równocennych protonów w badanej próbce. Sygnał protonów pojawiający się w zakresie 3 – 4 ppm odpowiada grupie  $-\text{OH}$ , wchodzącej w skład zanieczyszczeń wynikających z pozostałości alkoholu tetradecylowego. Związek ten oraz produkt reakcji wykazują zbliżoną rozpuszczalność w dostępnych rozpuszczalnikach, co czyni go substratem trudnym do usunięcia. Sygnał protonów zarejestrowany jako intensywny pik przy przesunięciu chemicznym 1,288 ppm, odpowiada atomom wodoru wchodzącym w skład grup

-CH<sub>2</sub>- długiego łańcucha węglowodorowego cząsteczki estru. Sygnał obserwowany przy 7,131 ppm świadczy natomiast o obecności aromatycznych atomów wodoru. Sygnały protonów zarejestrowane przy 2,037 ppm i 4,210 ppm pochodzą od trzech atomów wodoru grup -OH przy pierścieniu aromaticznym.

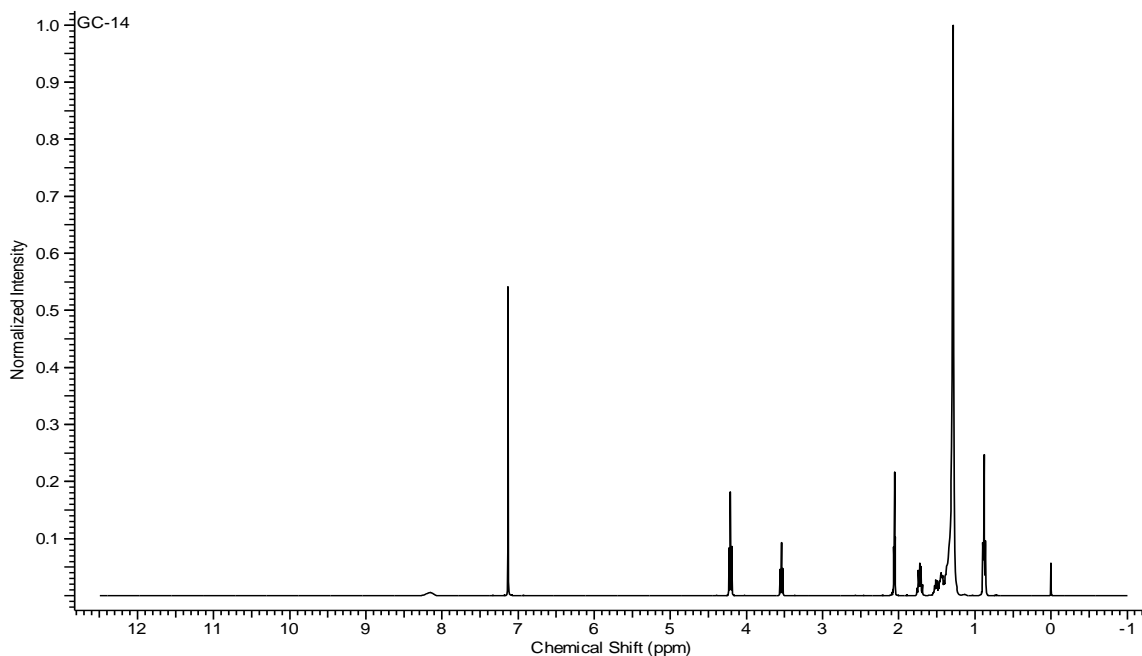
Przeprowadzona analiza widm <sup>13</sup>C NMR umożliwiła uzupełnienie informacji uzyskanych na podstawie interpretacji widm <sup>1</sup>H NMR. Obecność sygnałów w zakresie 14,325 – 32,587 ppm świadczy o obecności atomów węgla należących do łańcucha alifatycznego cząsteczki. Pik przy przesunięciu chemicznym 166,656 ppm odpowiada natomiast oczekivanym sygnałom karbonylowego atomu węgla grupy estrowej.

Tabela 15 Wartości przesunięć chemicznych w widmie <sup>1</sup>H NMR galusanu tetradecylu (GT) w odniesieniu do struktury związku



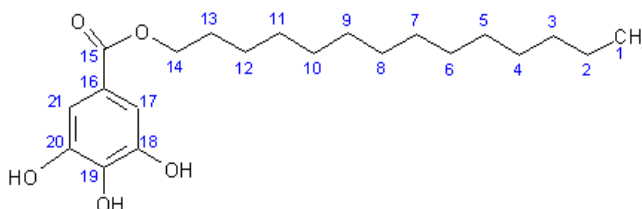
| Numer grupy | $\delta$ [ppm] | Liczba protonów |
|-------------|----------------|-----------------|
| 1           | 0,880          | 3 H             |
| 2           | 1,288          | 24 H            |
| 3           | 1,707          | 2 H             |
| 4           | 7,131          | 2 H             |
| 5           | 2,037          | 2 H             |
| 6           | 4,210          | 1 H             |

Źródło: badania własne



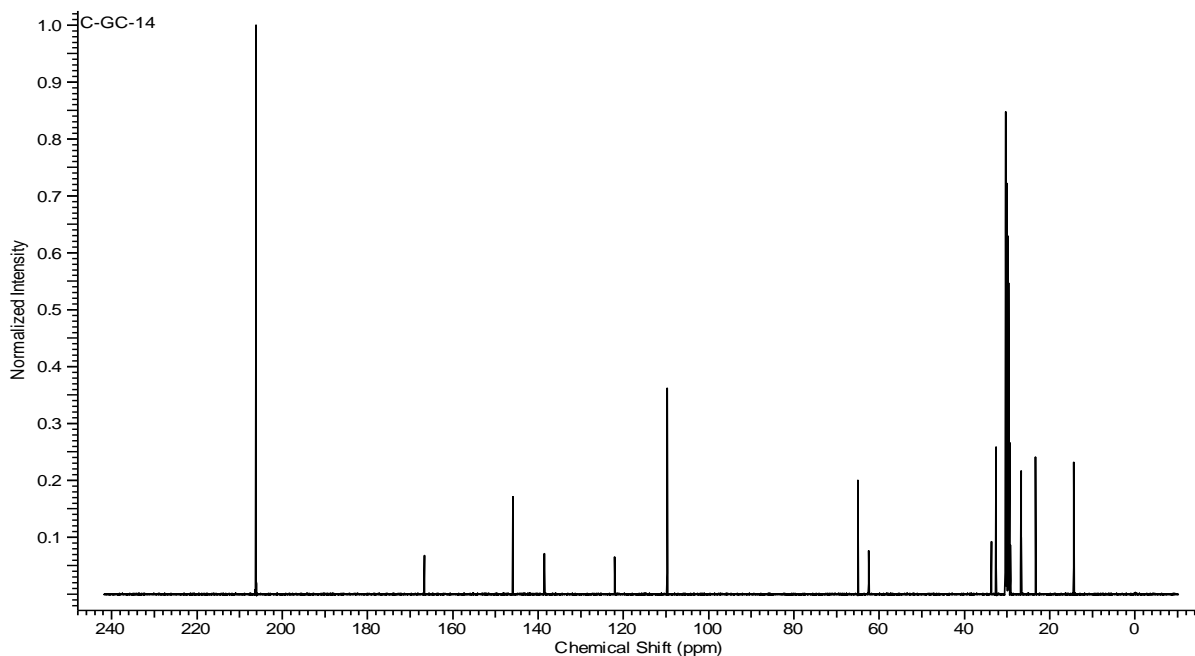
Wykres 3 Widmo  $^1\text{H}$ NMR galusanu tetrade cylu (GT)  
 Źródło: badania własne

Tabela 16 Wartości przesunięć chemicznych w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR galusanu tetrade cylu (GT) w odniesieniu do struktury związku



| Numer atomu C | $\delta$ [ppm] | Numer atomu C | $\delta$ [ppm] | Numer atomu C | $\delta$ [ppm] |
|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| 1             | 14,325         | 8             | 30,319         | 15            | 166,656        |
| 2             | 23,279         | 9             | 30,296         | 16            | 122,046        |
| 3             | 32,587         | 10            | 30,265         | 17            | 109,704        |
| 4             | 30,392         | 11            | 30,238         | 18            | 145,948        |
| 5             | 30,365         | 12            | 30,031         | 19            | 138,574        |
| 6             | 30,35          | 13            | 29,992         | 20            | 145,948        |
| 7             | 30,334         | 14            | 206,222        | 21            | 109,704        |

Źródło: badania własne



Wykres 4 Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR galusanu tetradecylu (GT)  
 Źródło: badania własne

### 2.1.3. Analiza widm jądrowego rezonansu magnetycznego 3,5-dihydroksybenzo- esanu tetradecylu (3,5-DT)

Rejestracji widm NMR 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu dokonano z wykorzystaniem spektrometru Varian VNMR-S 400 MHz. Jako rozpuszczalnik zastosowano  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , a wartości przesunięć chemicznych ( $\delta$ ) przedstawiono w odniesieniu do tetrametylosilanu (TMS).

W tabeli 17 i 18 przedstawiono dokładne wartości przesunięć chemicznych obecnych na widmach  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu. Na wykresach 5 i 6 przedstawiono widma  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR badanego estru.

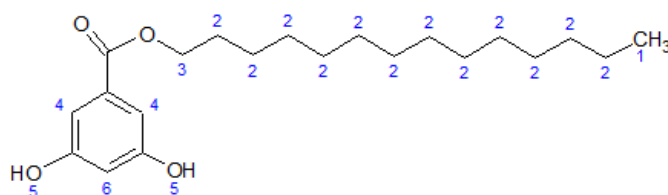
Analiza widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR próbki potwierdziła obecność grup charakterystycznych w cząsteczce estru.

Na widmie  $^1\text{H}$  NMR zaobserwowano 7 wyraźnych sygnałów, co świadczy o obecności 7 grup równocennych protonów w badanej próbce. Sygnał protonów przy 2,058 ppm jest sygnałem charakterystycznym dla zastosowanego rozpuszczalnika. Pik pojawiający się przy 1,281 ppm, odpowiada sygnałom atomów wodoru wchodzącym w skład grup  $-\text{CH}_2-$  długiego łańcucha węglowodorowego cząsteczki estru. Piki obecne przy przesunięciu chemicznym 7,025 ppm i 6,587 ppm odpowiadają sygnałom trzech protonów aromatycznych, natomiast

sygnał protonów przy 4,252 ppm, świadczy o obecności dwóch atomów wodoru grup –OH przy pierścieniu aromatycznym.

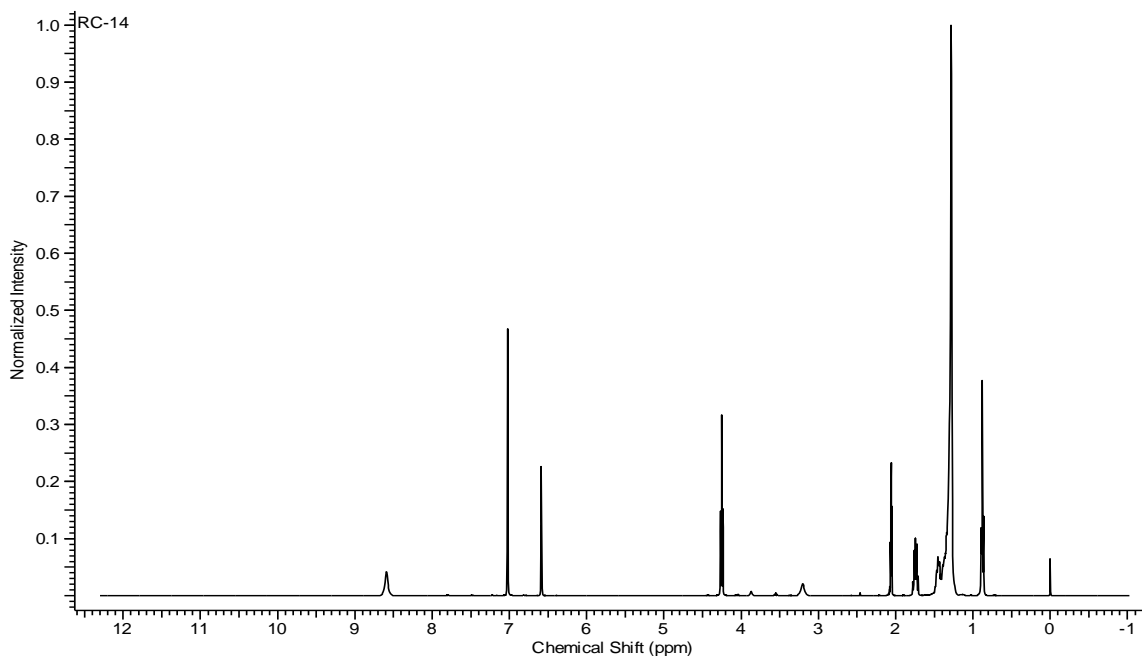
Przeprowadzona analiza widm  $^{13}\text{C}$  NMR umożliwiła uzupełnienie informacji uzyskanych na podstawie interpretacji widm  $^1\text{H}$  NMR. Obecność sygnałów w zakresie 14,325 – 30,350 ppm świadczy o obecności atomów węgla należących do łańcucha alifatycznego cząsteczki. Pik przy 166,656 ppm odpowiada natomiast oczekiwanym sygnałom karbonylowego atomu węgla grupy estrowej.

Tabela 17 Wartości przesunięć chemicznych w widmie  $^1\text{H}$  NMR 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT) w odniesieniu do struktury związku



| Numer grupy | $\delta$ [ppm] | Liczba protonów |
|-------------|----------------|-----------------|
| 1           | 0,878          | 3 H             |
| 2           | 1,281          | 24 H            |
| 3           | 1,745          | 2 H             |
| 4           | 7,025          | 2 H             |
| 5           | 4,252          | 2 H             |
| 6           | 6,587          | 1 H             |

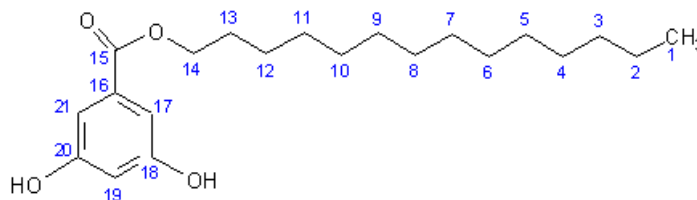
Źródło: badania własne



Wykres 5 Widmo  $^1\text{H}$ NMR 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT)

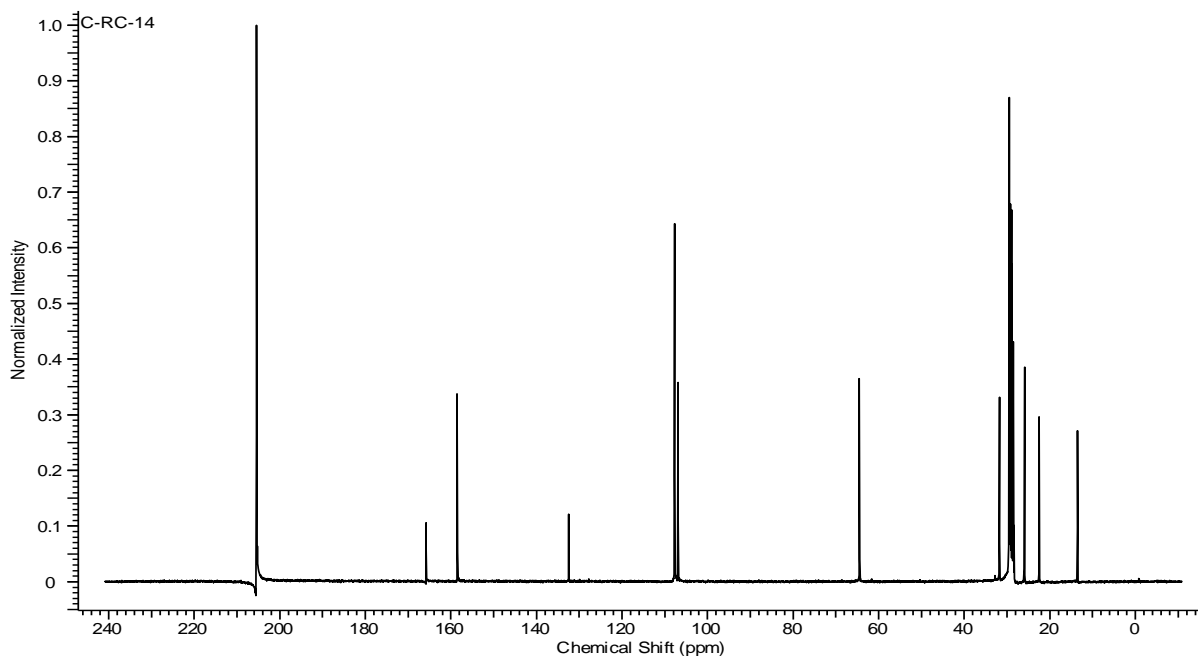
Źródło: badania własne

Tabela 18 Wartości przesunięć chemicznych w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT) w odniesieniu do struktury związku



| Numer atomu C | $\delta$ [ppm] | Numer atomu C | $\delta$ [ppm] | Numer atomu C | $\delta$ [ppm] |
|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| 1             | 14,325         | 8             | 30,027         | 15            | 166,610        |
| 2             | 23,272         | 9             | 29,992         | 16            | 133,319        |
| 3             | 26,632         | 10            | 29,961         | 17            | 108,524        |
| 4             | 30,350         | 11            | 29,858         | 18            | 159,370        |
| 5             | 30,319         | 12            | 29,492         | 19            | 107,786        |
| 6             | 30,281         | 13            | 29,223         | 20            | 159,370        |
| 7             | 30,242         | 14            | 206,326        | 21            | 108,524        |

Źródło: badania własne



Wykres 6 Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT)

Źródło: badania własne

## 2.2. Analiza widm podczerwieni (IR)

Zastosowana w pracy spektroskopia podczerwieni (IR) opiera się na zdolności cząsteczek związków organicznych do absorbowania i przekształcania w energię oscylacyjną promieniowania podczerwonego o częstości w zakresie  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ . Absorpcja ta jest kwantowana, a widma oscylacyjne występują w postaci pasm. Dzięki temu spektroskopia podczerwieni może być wykorzystywana do identyfikacji grup funkcyjnych i innych elementów w związku [Silverstein, Webster i Kiemle 2007].

Położenie pasm w widmie podczerwieni określa się liczbami falowymi, których jednostką jest odwrotność centymetra ( $\text{cm}^{-1}$ ). Intensywność pasm wyraża się natomiast jako transmitancję, czyli stosunek energii przepuszczonej do energii padającej na próbkę, wyrażoną w procentach.

Ze względu na obecność wielu grup funkcyjnych w strukturze otrzymanych związków, na widmach obserwuje się liczne pasma absorpcji. Niektóre z nich mogą ulegać nakładaniu co stanowi utrudnienie w ich interpretacji.

### 2.2.1. Analiza widm podczerwieni (IR) estrów kwasu ferulowego

Otrzymane estry kwasu ferulowego różnią się jedynie długością łańcucha węglowodorowego, natomiast grupy obecne w ich cząsteczkach nie ulegają zmianie, co skutkuje tym, że na widmach wszystkich otrzymanych estrów tego kwasu występują analogiczne pasma absorpcji.

Na wykresie 7 przedstawiono widmo podczerwieni ferulanu tetrade cylu (FT) oraz widmo alkoholu tetrade cylowego (AT), który jest jednym z substratów wykorzystanych do syntezy wymienionego estru.

Grupa estrowa daje dwa silne pasma absorpcji pochodzące od drgań rozciągających C=O oraz C-O. Pierwsze z nich pojawia się w zakresie  $1750 - 1735 \text{ cm}^{-1}$  natomiast drugie w zakresie  $1300 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ . Drgania rozciągające C-O są wypadkową dwóch asymetrycznych, sprzężonych drgań: C-C(C=O)-O i O-C-C.

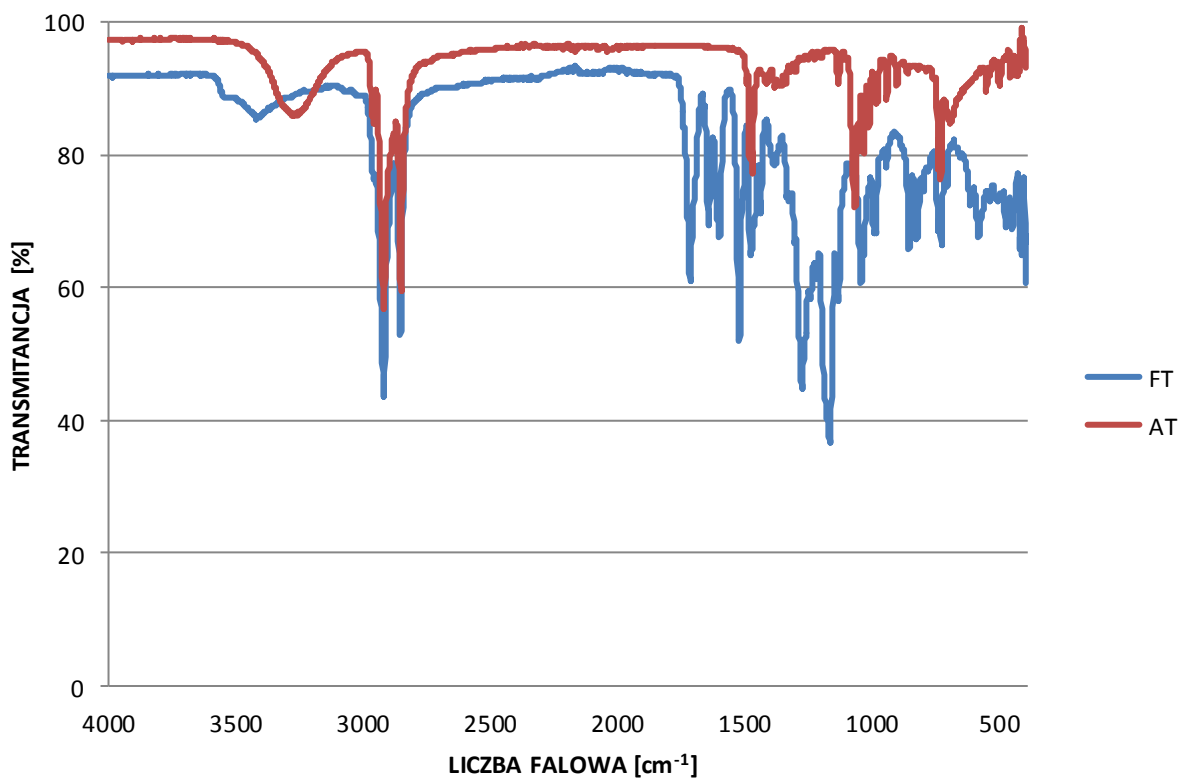
Na widmach zaobserwowano obecność dwóch intensywnych pasm absorpcji w zakresie  $3000 - 2840 \text{ cm}^{-1}$ , pochodzących od drgań rozciągających C-H, które są charakterystyczne dla alkanów i świadczą o obecności długiego łańcucha węglowodorowego w cząsteczkach estrów kwasu ferulowego.

Pojawienie się szerokiego, ostrego pasma absorpcji drgań rozciągających O-H w zakresie  $3550 - 3200 \text{ cm}^{-1}$  oraz silnego pasma absorpcji pochodzącego od drgań rozciągających C-O w zakresie  $1260 - 1000 \text{ cm}^{-1}$  dowodzi występowania grupy hydroksylowej w strukturze związku.

Pasma absorpcji o średniej intensywności pojawiające się w rejonie symetrycznych drgań rozciągających C-O-C ( $1075-1020 \text{ cm}^{-1}$ ) potwierdzają obecność grupy  $-\text{OCH}_3$  w cząsteczkach estrów.

Drgania zginające C-H poza płaszczyznę, zaobserwowane w postaci średnio intensywnych pasm w zakresie niskich częstości  $900 - 675 \text{ cm}^{-1}$  są charakterystyczne dla sąsiadujących atomów wodoru w pierścieniu aromatycznym.





Wykres 7 Widmo podczerwieni (IR) ferulanu tetradecylu (FT) i alkoholu tetradecylowego (AT)  
 Źródło: badania własne

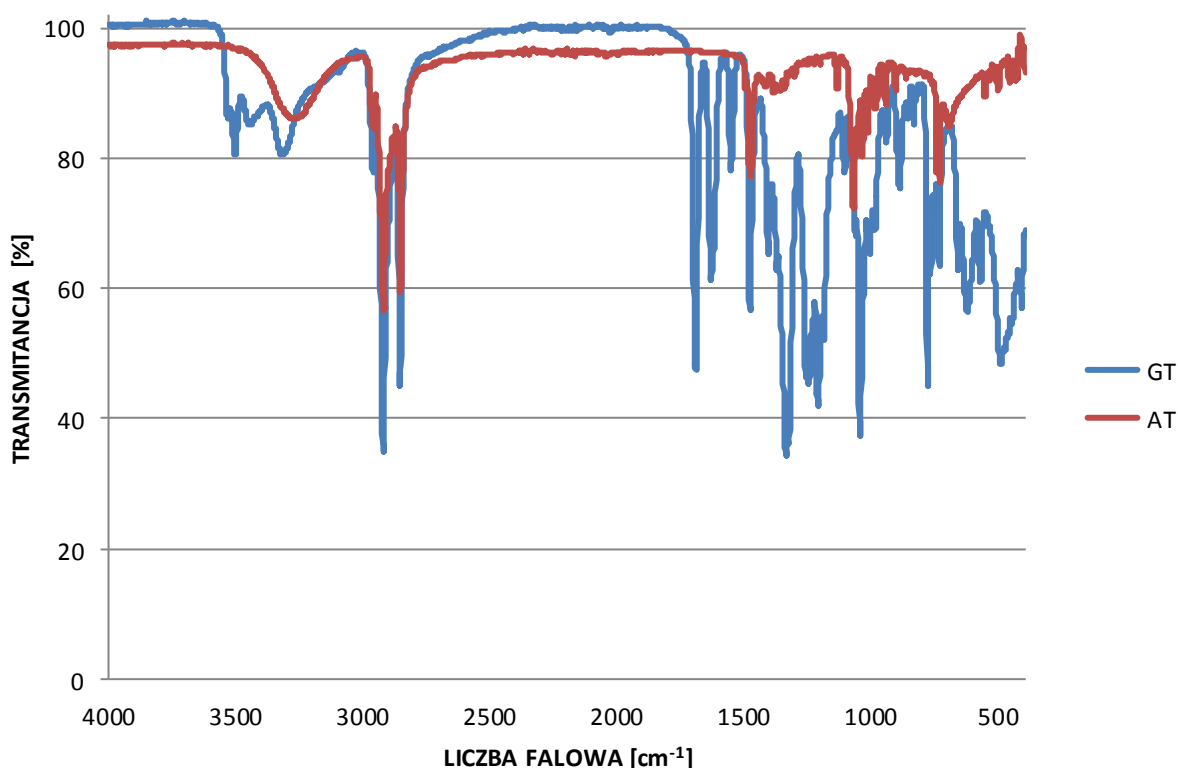
### 2.2.2. Analiza widm podczerwieni (IR) estrów kwasu galusowego

Na wykresie 8 przedstawiono widmo IR galusanu tetradecylu (GT) oraz widmo IR alkoholu tetradecylowego (AT), który jest jednym z substratów wykorzystanych do syntezy wymienionego estru.

Intensywne pojedyncze pasma absorpcji pojawiające się w zakresie  $1300 - 1000 \text{ cm}^{-1}$  odpowiadają drganiom rozciągającym C-O, charakterystycznym dla grupy estrowej. Pasma te sąsiadują z silnymi pasmami absorpcji w rejonie drgań rozciągających C-O  $1260 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ , typowymi dla grupy hydroksylowej. Pasma absorpcji drgań rozciągających C=O ( $1750 - 1735 \text{ cm}^{-1}$ ) potwierdzają obecność w strukturze związku grupy estrowej.

Na widmach zaobserwowano również obecność szerokich, rozdzielonych pasm absorpcji pojawiających się w rejonie drgań rozciągających O-H  $3550 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ , które świadczą o obecności grup hydroksylowych w cząsteczkach estrów.

Obecność dwóch intensywnych pasm absorpcji pojawiających się w zakresie 3000 – 2840  $\text{cm}^{-1}$ , pochodzących od drgań rozciągających C-H, świadczy o obecności długiego łańcucha węglowodorowego w cząsteczkach estrów kwasu galusowego, natomiast pasma drgań zginających C-H poza płaszczyznę, w zakresie niskich częstości 900 – 675  $\text{cm}^{-1}$  są charakterystyczne dla sąsiadujących atomów wodoru w pierścieniu aromatycznym.



Wykres 8 Widmo podczerwieni (IR) galusanu tetradecylu (GT) i alkoholu tetradecylowego (AT)  
Źródło: badania własne

### 2.2.3. Analiza widm podczerwieni (IR) estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego

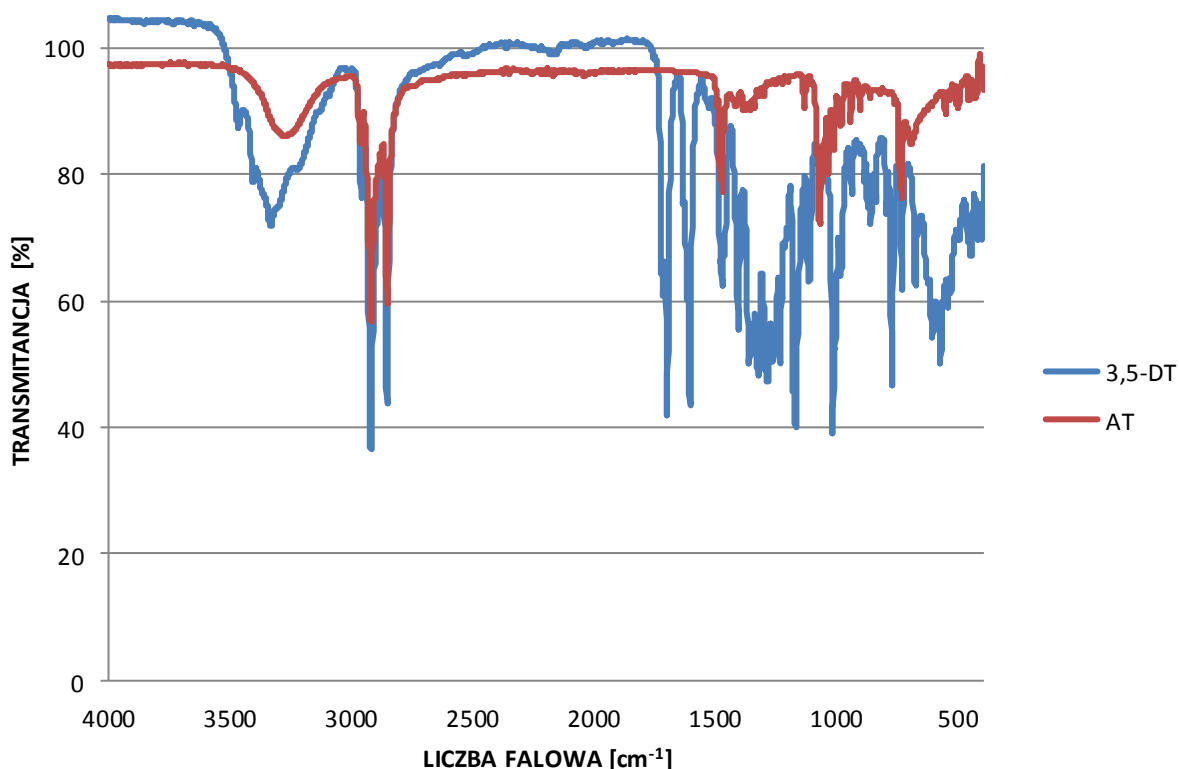
Na wykresie 9 przedstawiono widmo IR 3,5 - dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT) oraz widmo IR alkoholu tetradecylowego (AT), który jest jednym z substratów wykorzystanych do syntezy wymienionego estru.

Otrzymane estry kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego różnią się jedynie długością łańcucha węglowodorowego, natomiast grupy obecne w ich cząsteczkach nie ulegają zmianie, przez co położenie poszczególnych pasm absorpcji na widmach jest bardzo zbliżone.

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono obecność dwóch intensywnych pasm absorpcji w zakresie  $3000 - 2840 \text{ cm}^{-1}$ , pochodzących od drgań rozciągających C-H. Świadczy to o obecności łańcucha alkilowego w cząsteczkach estrów. Pierścień aromatyczny występujący w strukturze związków ujawnia natomiast drgania zginające C-H poza płaszczyznę pojawiające się jako pasma o średniej intensywności w zakresie  $900 - 675 \text{ cm}^{-1}$ .

Szerokie, ostre pasma o średniej intensywności pojawiające się w rejonie drgań rozciągających O-H w zakresie  $3550 - 3200 \text{ cm}^{-1}$  oraz silne pasma absorpcji w rejonie drgań rozciągających C-O w zakresie  $1260 - 1000 \text{ cm}^{-1}$  dowodzą obecności grup hydroksylowych w cząsteczkach estrów.

Obecność intensywnych pasm absorpcji pochodzących od drgań rozciągających C=O ( $1750-1735 \text{ cm}^{-1}$ ) oraz C-O ( $1300 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ ) potwierdza zaś występowanie grupy estrowej w cząsteczkach badanych związków.



Wykres 9 Widmo podczerwieni (IR) 3,5-dihydroksybenzoesu tetradecylu (3,5-DT) i alkoholu tetradecylowego (AT)  
Źródło: badania własne

## 2.3. Analiza elementarna

### 2.3.1. Analiza elementarna ferulanu tetradecylu (FT)

W tabeli 19 zestawiono wyniki analizy elementarnej wykonanej dla ferulanu tetradecylu (FT). Otrzymane wartości w znacznym stopniu odpowiadają wartościom teoretycznym, obliczonym na podstawie wzoru sumarycznego estru.

Tabela 19 Wyniki analizy elementarnej ferulanu tetradecylu

| Pierwiastek | Teoretyczne zawartości pierwiastków | Doświadczalne zawartości pierwiastków |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Węgiel      | 73,93%                              | 73,87%                                |
| Tlen        | 16,29%                              | 16,34%                                |
| Wodór       | 9,77%                               | 9,79%                                 |

Źródło: badania własne

### 2.3.2. Analiza elementarna galusanu tetradecylu (GT)

W tabeli 20 zestawiono wyniki analizy elementarnej wykonanej dla galusanu tetradecylu (GT). Otrzymane wartości różnią się nieznacznie od wartości teoretycznych, obliczonych na podstawie wzoru sumarycznego związku. Rozbieżności pomiędzy tymi wartościami mogą wynikać z obecności w próbce niewielkich ilości alkoholu tetradecylowego, będącego jednym z substratów reakcji. Zbliżona rozpuszczalność w dostępnych rozpuszczalnikach galusanu tetradecylu i alkoholu tetradecylowego uniemożliwia całkowite oczyszczenie produktu z pozostałości nieprzereagowanego alkoholu.

Tabela 20 Wyniki analizy elementarnej galusanu tetradecylu

| Pierwiastek | Teoretyczne zawartości pierwiastków | Doświadczalne zawartości pierwiastków |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Węgiel      | 68,97%                              | 69,98%                                |
| Tlen        | 21,71%                              | 20,51%                                |
| Wodór       | 9,32%                               | 9,51%                                 |

Źródło: badania własne

### 2.3.3. Analiza elementarna 3,5-dihydroksybenzoesu tetracylu (3,5-DT)

W tabeli 21 zestawiono wyniki analizy elementarnej wykonanej dla 3,5-dihydroksybenzoesu tetracylu (3,5-DT). Otrzymane wartości w znacznym stopniu odpowiadają wartościom teoretycznym, obliczonym na podstawie wzoru sumarycznego estru. Niewielkie rozbieżności pomiędzy oznaczoną a teoretyczną zawartością tlenu mogą wynikać z niewielkiego zawilgocenia badanego surowca.

Tabela 20 Wyniki analizy elementarnej 3,5-dihydroksybenzoesu tetracylu

| Pierwiastek | Teoretyczne zawartości pierwiastków | Doświadczalne zawartości pierwiastków |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Węgiel      | 71,95%                              | 71,13%                                |
| Tlen        | 18,26%                              | 19,29%                                |
| Wodór       | 9,80%                               | 9,58%                                 |

Źródło: badania własne

### 3. Ocena właściwości fizykochemicznych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych

#### 3.1. Badanie temperatury topnienia

W tabeli 21 przedstawiono temperatury topnienia otrzymanych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych.

Tabela 21 Temperatura topnienia otrzymanych pochodnych kwasów: ferulowego, galusowego i 3,5-dihydroksybenzoesowego

| Związek       | Temperatura topnienia [°C] |
|---------------|----------------------------|
| <b>FT</b>     | 41                         |
| <b>FH</b>     | 46                         |
| <b>FO</b>     | 50                         |
| <b>GT</b>     | 85                         |
| <b>GH</b>     | 89                         |
| <b>GO</b>     | 95                         |
| <b>3,5-DT</b> | 60                         |
| <b>3,5-DH</b> | 64                         |
| <b>3,5-DO</b> | 71                         |

Źródło: badania własne  
n=3

Pochodne poszczególnych kwasów fenolowych różnią się długością łańcucha węglowodorowego w cząsteczkach, co ma odzwierciedlenie w ich temperaturach topnienia. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego, temperatura topnienia estrów wzrasta, co jest zjawiskiem naturalnym dla związków występujących w tym samym szeregu homologicznym.

#### 3.2. Badanie stabilności termicznej

Stabilność termiczną otrzymanych estrów określono na podstawie analizy termograwimetrycznej (TG). Wszystkie oznaczenia zostały wykonane w atmosferze gazu obojętnego, dlatego uzyskane wyniki w szczególowy sposób obrazują zmiany właściwości

próbek w zależności od zmian temperatury. W celu ułatwienia interpretacji wyników wyznaczono pierwsze pochodne krzywych termogravimetrycznych względem temperatury (DTG).

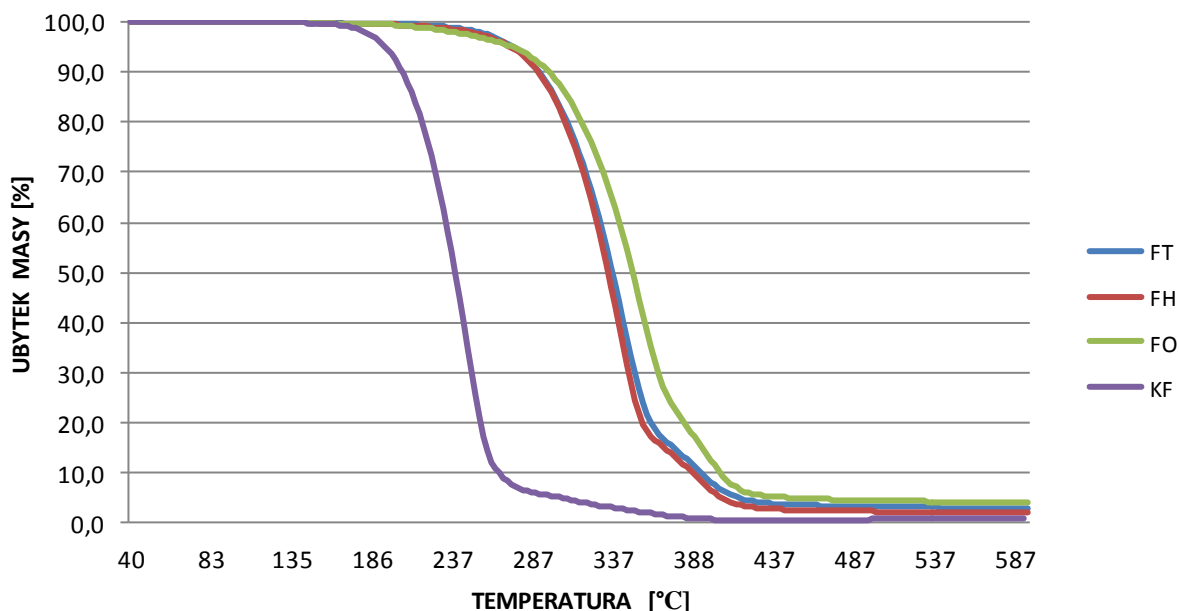
### **3.2.1. Badanie stabilności termicznej estrów kwasu ferulowego**

Przeprowadzona analiza termiczna wykazała, że najbardziej stabilnymi termicznie estrami kwasu ferulowego są ferulan tetradecylu (FT) i ferulan heksadecylu (FH). Początkowy i zarazem największy ubytek masy tych związków wynikający z ich termicznego rozkładu nastąpił powyżej 265°C i wynosił ok 83% dla ferulanu tetradecylu oraz ok 82% dla ferulanu heksadecylu. W przypadku ferulanu oktadecylu (FO) analogiczne przemiany wystąpiły po przekroczeniu 260°C. Termicznej degradacji uległo ok 77% masy tego estru.

Procesy prowadzące do termicznej dekompozycji próbek kwasu ferulowego wystąpiły po przekroczeniu 180°C. Jest to temperatura dużo niższa niż w przypadku jego pochodnych, co dowodzi, że utworzenie wiązania z udziałem grupy karboksylowej kwasu powoduje zwiększenie stabilności termicznej otrzymanego związku. W wyniku tych przemian zanotowano spadek masy próbki o 92%.

Należy podkreślić, że otrzymane estry kwasu ferulowego wykazują stabilność termiczną porównywalną z powszechnie wykorzystywanymi przeciwutleniaczami syntetycznymi BHA i BHT, które ulegają rozkładowi termicznemu po przekroczeniu 250°C [Santos i in. 2012]. Zakładając, że zarówno BHA jak i BHT wykazują efekt „carry through”, można domniemywać, że wymienione estry kwasu ferulowego będą ujawniały podobne właściwości w procesach termicznej obróbki żywności.

Przebieg krzywych TG kwasu ferulowego i jego pochodnych przedstawiono na wykresie 10.



Wykres 10 Krzywe termogravimetryczne ferulanu tetradecylu (FT), ferulanu heksadecylu (FH), ferulanu oktadecylu (FO) i kwasu ferulowego (KF)  
Źródło: badania własne

### 3.2.2. Badanie stabilności termicznej estrów kwasu galusowego

Analiza termogravimetryczna wykazała, że rozkład termiczny estrów kwasu galusowego w atmosferze gazu obojętnego przebiegał dwuetapowo.

Najbardziej stabilną termicznie pochodną kwasu galusowego był jego ester oktadecylowy (GO). Pierwszy, wyraźny ubytek masy tego związku pod wpływem temperatury, wynoszący ok. 19%, wystąpił po przekroczeniu 185°C i trwał do osiągnięcia przez próbkę 257°C. Kolejny znaczny spadek masy badanego materiału (ok. 63,1%) nastąpił powyżej 282°C.

Nieco niższą stabilnością termiczną charakteryzował się galusan heksadecylu (GH). Początkowy spadek masy tego estru nastąpił po przekroczeniu 163°C i wynosił ok. 10%. Powyżej 233°C przemiany prowadzące do termicznej dekompozycji próbki uległy zahamowaniu, natomiast po przekroczeniu 278°C procesy te przybrały na intensywności. W trakcie wspomnianego etapu termicznej degradacji uległo ok 65 % masy estru.

Najmniej stabilną termicznie pochodną kwasu galusowego był galusan tetradecylu (GT). Pierwsze przemiany prowadzące do znacznego ubytku masy próbki tego estru pojawiły się powyżej 153°C, a etap ten trwał do momentu osiągnięcia przez nią 220°C. We



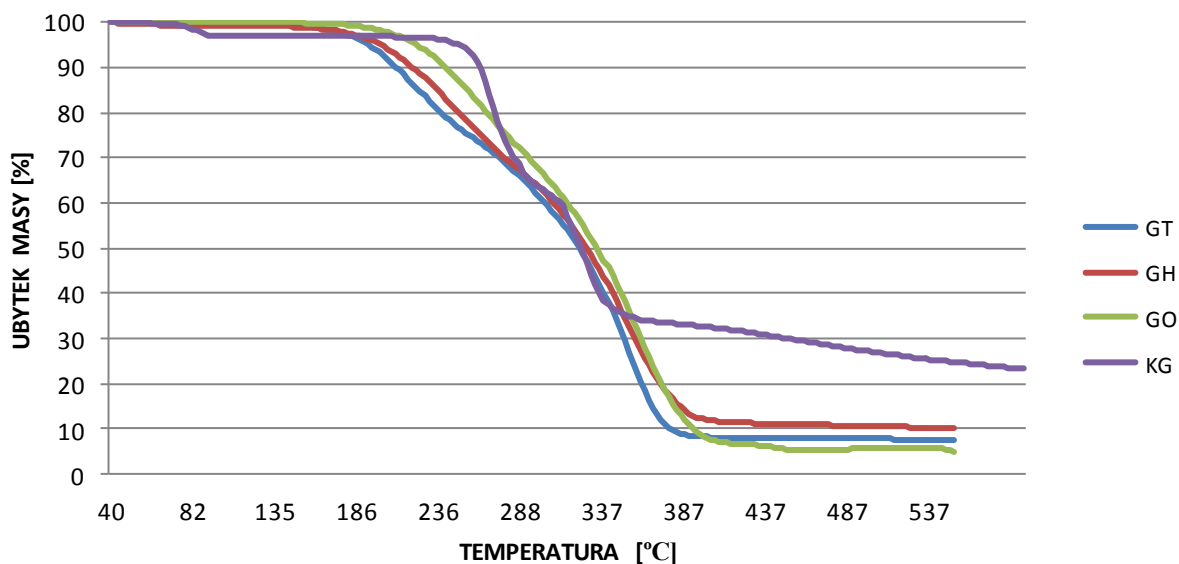
wspomnianym zakresie temperatur obserwowano ok. 15% ubytek masy. Kolejny wyraźny spadek masy próbki estru nastąpił powyżej 247°C i stanowił ok. 63% masy początkowej.

Podczas analizy termogravimetrycznej kwasu galusowego, pierwszy, wyraźny ubytek masy próbki nastąpił po przekroczeniu przez nią temperatury 71°C i najprawdopodobniej był związany z odparowaniem wody w niej zawartej. Po zakończeniu tego etapu masa próbki nie uległa wyraźnej zmianie do momentu osiągnięcia przez nią temperatury 237°C, powyżej której nastąpił kolejny gwałtowny spadek masy surowca o ok. 13% masy początkowej. Kolejny etap rozkładu termicznego badanego materiału rozpoczął się po przekroczeniu 305°C i trwał do momentu osiągnięcia 340°C. W trakcie tego etapu termicznej degradacji uległo ok. 24% masy początkowej. Po przekroczeniu tego punktu spadek masy próbki badanego surowca uległ znacznemu spowolnieniu. Próbka kwasu galusowego nie uległa całkowitej degradacji podczas ogrzewania do temperatury 550°C. Jej pozostałość stanowiła 25% masy początkowej.

Długołańcuchowe estry kwasu galusowego charakteryzowały się dużo niższą stabilnością termiczną niż pochodne kwasu ferulowego, a ich odporność na oddziaływanie wysokich temperatur zmieniała się w zależności od długości łańcucha węglowodorowego w cząsteczce związku. Wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w strukturze estrów, ich stabilność termiczna wzrastała. Podobna zależność została wcześniej zaobserwowana w przypadku galusanu propylu, galusanu oktylu i galusanu dodecyłu, które są powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym jako przeciwutleniacze [Madhavi, Singhal i Kulkarni 1996].

Badane związki są bardziej wrażliwe na działanie wysokich temperatur niż BHA i BHT. Zakres temperatur stosowanych w technologii wytwarzania emulsji kosmetycznych [Marcinkiewicz-Salomonowiczowa 1995] jest jednak niższy od temperatur, powyżej których następują pierwsze wyraźne zmiany wskazujące na termiczną degradację estrów kwasu galusowego, dzięki czemu istnieje znaczne prawdopodobieństwo zachowania właściwości przeciwutleniających tych związków w produkcie gotowym.

Przebieg krzywych TG kwasu galusowego i jego pochodnych przedstawiono na wykresie 11.



Wykres 11 Krzywe termograwimetryczne galusanu tetradecylu (GT), galusanu heksadecylu (GH), galusanu oktadecylu (GO) i kwasu galusowego (KG)

Źródło: badania własne

### 3.2.3. Badanie stabilności termicznej estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego

Analiza termograwimetryczna próbek kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego i jego estrów wykazała, że związki te charakteryzują się zróżnicowaną stabilnością termiczną.

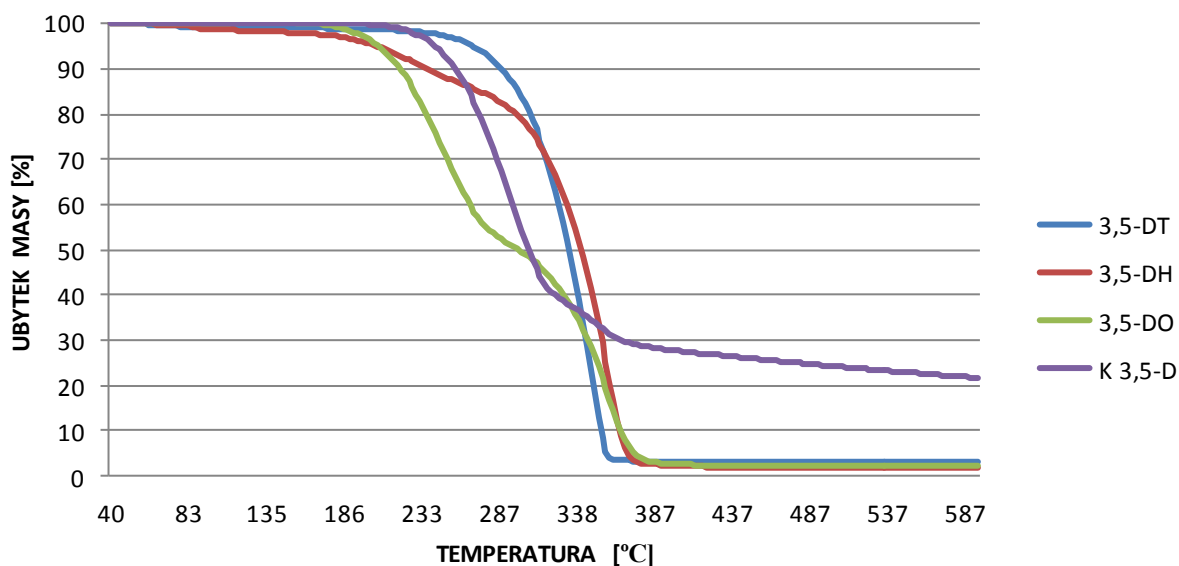
Najbardziej stabilną pochodną kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego był jego ester tetradecylowy (3,5-DT). Największy ubytek masy tego związku nastąpił powyżej 242°C i wynosił ok. 94% początkowej masy próbki.

Rozkład termiczny 3,5-dihydroksybenzoesanu heksadecylu (3,5-DH) przebiegał natomiast w trzech etapach. Pierwszy wyraźny ubytek masy nastąpił po przekroczeniu temperatury 82°C i najprawdopodobniej wynikał z odparowania wody w niej zawartej. Wilgotność próbki wynosiła ok. 0,2%. Kolejny etap rozkładu termicznego próbki rozpoczął się po przekroczeniu 182°C i trwał do osiągnięcia przez nią 262°C. Termicznej degradacji uległo wtedy ok. 10% masy tego estru. Po przekroczeniu tej temperatury procesy rozkładu termicznego badanego surowca przybrały na intensywności i doprowadziły do ok. 84% ubytku masy. Etap ten trwał do osiągnięcia temperatury 379°C.

Pierwszy etap rozkładu termicznego próbki 3,5-dihydroksybenzoesanu oktadecylu (3,5-DO) rozpoczął się natomiast po przekroczeniu 174°C i spowodował redukcję masy próbki o ok. 49%. Powyżej 293°C nastąpiło krótkotrwałe spowolnienie procesów

prowadzących do degradacji badanego surowca. Po przekroczeniu 318°C nastąpił kolejny, znaczny ubytek masy próbki, który trwał do momentu uzyskania temperatury 389°C. W trakcie tego etapu termicznej degradacji uległo ok. 41% masy estru.

Rozkład termiczny kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego przebiegał dwuetapowo. Pierwszy wyraźny spadek masy próbki kwasu nastąpił powyżej 215°C i wynosił 63% masy początkowej. Po przekroczeniu 338°C procesy prowadzące do termicznej degradacji badanego materiału przybrały na intensywności. W wyniku tych przemian zanotowano spadek masy próbki o ok. 2%. Etap ten trwał do momentu osiągnięcia przez próbkę 348°C. Powyżej tej temperatury procesy prowadzące do termicznej dekompozycji materiału uległy znacznemu spowolnieniu. Podobnie jak w przypadku kwasu galusowego, próbka kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego nie uległa całkowitej degradacji podczas ogrzewania do temperatury 550°C. Jej pozostałość stanowiła ok. 23% masy początkowej.



Wykres 12 Krzywe termogravimetryczne 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT), 3,5-dihydroksybenzoesanu heksadecylu (3,5-DH), 3,5-dihydroksybenzoesanu oktadecylu (3,5-DO) i kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego (K 3,5-D)

Źródło: badania własne

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że utworzenie wiązania z udziałem grupy karboksylowej kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego nie wpływa w istotny sposób na zwiększenie stabilności termicznej jego pochodnych. Długołańcuchowe estry kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego ulegają degradacji termicznej w temperaturach wyższych niż temperatury określone w większości receptur wytwarzania emulsji

kosmetycznych, co świadczy o braku przeciwwskazań do wykorzystania ich jako komponentów preparatów kosmetycznych.

Przebieg krzywych TG kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego i jego pochodnych przedstawiono na wykresie 12.

### 3.3. Badanie rozpuszczalności

Badanie rozpuszczalności otrzymanych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych polegało na połączeniu badanego surowca z określoną objętością rozpuszczalnika i obserwacji stopnia jednorodności uzyskanej mieszaniny. Związek uznawany był za rozpuszczalny w danym rozpuszczalniku w chwili utworzenia z nim homogenicznego układu.

Na podstawie poczynionych obserwacji można stwierdzić, że wszystkie badane estry są związkami nierozpuszczalnymi w wodzie. Wynika to z faktu, że w szeregu homologicznym estrów jedynie pierwsze człony zawierające nie więcej niż 4 atomy węgla wykazują rozpuszczalność w tym wysoce polarnym rozpuszczalniku [Vogel 1984]. Budowa cząsteczkowa estrów wskazuje natomiast na powinowactwo długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych do rozpuszczalników organicznych.

Każdy z badanych związków wykazywał dobrą rozpuszczalność w oleju roślinnym, co wynika ze zbliżonej budowy opisywanych związków i struktur triglicerydów wchodzących w skład oleju. Fakt, że otrzymane estry w łatwy sposób ulegają połączeniu ze wspomnianym rozpuszczalnikiem, sugeruje możliwość zastosowania ich jako substancji o działaniu przeciwutleniającym, przeznaczonych do stabilizowania tłuszczów bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe oraz faz tłuszczowych emulsji kosmetycznych.

Innym rozpuszczalnikiem tworzącym jednorodne roztwory z każdym z badanych surowców jest octan etylu. Otrzymane estry charakteryzowały się zróżnicowaną rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych o stosunkowo wysokiej polarności, takich jak aceton, metanol i izopropanol. Wszystkie poddane badaniu estry oktadecylowe były nierozpuszczalne w acetonie i metanolu. Spośród wymienionych związków jedynie galusan oktadecylu uległ rozpuszczeniu w izopropanolu, co wynika z obecności trzech polarnych grup –OH w strukturze tego związku.

Estry tetradecylowe i heksadecylowe kwasów: galusowego i 3,5-dihydroksybenzoesowego wykazały zdolność do wytworzenia jednorodnej mieszaniny z

metanolem, acetonem i izopropanolem. Spośród estrów kwasu ferulowego jedynie ferulan tetradecylu uległ rozpuszczeniu w acetonie. Wspomniane różnice wynikają z obecności większej liczby grup hydroksylowych w cząsteczkach pochodnych kwasu benzoowego.

Odwrotna sytuacja miała miejsce w przypadku zastosowania chloroformu jako rozpuszczalnika. Wszystkie estry kwasu ferulowego wykazały zdolność tworzenia roztworów z tym rozpuszczalnikiem. Spośród pozostałych estrów jedynie galusan oktadecylu i 3,5-dihydroksybenzoosan oktadecylu wykazały podobne właściwości.

Tabela 22 Rozpuszczalność długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych w wybranych rozpuszczalnikach

| Związek | Rozpuszczalnik |               |             |         |        |             |            |
|---------|----------------|---------------|-------------|---------|--------|-------------|------------|
|         | woda           | olej roślinny | octan etylu | metanol | aceton | izopropanol | chloroform |
| FT      | -              | +             | +           | -       | +      | -           | +          |
| FH      | -              | +             | +           | -       | -      | -           | +          |
| FO      | -              | +             | +           | -       | -      | -           | +          |
| GT      | -              | +             | +           | +       | +      | +           | -          |
| GH      | -              | +             | +           | +       | +      | +           | -          |
| GO      | -              | +             | +           | -       | -      | +           | +          |
| 3,5-DT  | -              | +             | +           | +       | +      | +           | -          |
| 3,5-DH  | -              | +             | +           | +       | +      | +           | -          |
| 3,5-DO  | -              | +             | +           | -       | -      | -           | +          |

„+” związek rozpuszcza się w danym rozpuszczalniku, „-” związek nie rozpuszcza się w danym rozpuszczalniku

Źródło: badania własne

### 3.4. Określenie równowagi hydrofilowo-lipofilowej

Współczynnik HLB jest wartością umożliwiającą powiązanie budowy hydrofilowo-lipofilowej cząsteczek surfaktantów z ich właściwościami użytkowymi. Klasyfikacja uwzględniająca wspomnianą relację została zaproponowana przez Griffina i opierała się na umownej skali liczbowej od 0 do 20, w której  $HLB = 0$  odpowiada związkowi o właściwościach wyłącznie hydrofobowych, natomiast  $HLB = 20$  związkowi o właściwościach wyłącznie hydrofilowych [Zieliński 2009]. Zależności pomiędzy właściwościami użytkowymi surfaktantów a wartością ich współczynnika HLB zostały przedstawione w tabeli 23.

Tabela 23 Zależność pomiędzy właściwościami użytkowymi surfaktantów a wartością współczynnika HLB

| Właściwości użytkowe            | Wartość HLB |
|---------------------------------|-------------|
| Środki antypieniące             | 1,5 – 3,0   |
| Emulgatory typu w/o             | 3,0 – 6,0   |
| Środki zwilżające i powlekające | 7,0 – 9,0   |
| Emulgatory typu o/w             | 8,0 – 18,0  |
| Środki piorące                  | 13,0 – 15,0 |
| Solubilizatory                  | 13,0 – 18,0 |

Źródło: [Zieliński 2009]

Wartości HLB otrzymanych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych zostały wyznaczone na podstawie metody opracowanej przez McGowana. Uzyskane wyniki mieszczą się w skali zaproponowanej przez Griffina i mogą być interpretowane zgodnie z jego klasyfikacją.

Wyznaczone wartości  $HLB_M$  wskazują, że ferulan heksadecylu (FH), ferulan oktadecylu (FO) i 3,5-dihydroksybenzoesan oktadecylu (3,5-DO) wykazują właściwości hydrofobowe ( $HLB_M < 1$ ).

Ferulan tetradecylu (FT), galusan oktadecylu (GO), 3,5-dihydroksybenzoesan tetradecylu (3,5-DT) i 3,5-dihydroksybenzoesan heksadecylu (3,5-DH) mogą natomiast pełnić funkcję środków antypieniących.

Zdolność do tworzenia piany przez wodne roztwory surfaktantów jest właściwością pożądaną w mechanizmie usuwania brudu. Niestety w wielu sytuacjach istnieje konieczność sterowania ich efektywnością pianotwórczą. Środki antypianotwórcze wykorzystuje się w celu tłumienia piany podczas produkcji preparatów kosmetycznych lub do zmniejszania tendencji wyrobów gotowych do tworzenia piany. Substancje o działaniu antypieniącym powinny charakteryzować się bardzo niską rozpuszczalnością, wysoką ruchliwością cząsteczek i odpowiednią aktywnością powierzchniową.

Wartości  $HLB_M$  wyznaczone dla galusanu tetradecylu (GT) i galusanu heksadecylu (GH) wskazują zaś, że związki te mogą być wykorzystywane jako emulgatory typu W/O.

Emulsje są nietrwałymi układami termodynamicznymi, które łatwo ulegają procesom takim jak koalescencja, śmietankowanie, sedymentacja, flokulacja, czy inwersja faz, które prowadzą do ich całkowitej destabilizacji. Emulgatory są substancjami odpowiedzialnymi za wspomaganie procesu emulgowania oraz poprzez obniżenie napięcia międzyfazowego decydują o utrzymaniu długotrwałej stabilności emulsji.

Tabela 24 Wyznaczone wartości  $HLB_M$  długolącuchowych estrów kwasów fenolowych

| Związek       | Wartość $HLB_M$ |
|---------------|-----------------|
| <b>FT</b>     | 1,54            |
| <b>FH</b>     | 0,59            |
| <b>FO</b>     | 0,00            |
| <b>GT</b>     | 4,12            |
| <b>GH</b>     | 3,17            |
| <b>GO</b>     | 2,22            |
| <b>3,5-DT</b> | 2,82            |
| <b>3,5-DH</b> | 1,87            |
| <b>3,5-DO</b> | 0,92            |

Źródło: badania własne

### 3.5. Wstępna ocena właściwości promieniochronnych na podstawie widm UV-VIS

Nadmierna ekspozycja skóry na promieniowanie w zakresie UV (200 – 400 nm) może prowadzić do niepożądanych efektów związanych z rozszerzaniem naczyń krwionośnych, powstawaniem rumienia oraz procesami odpowiedzialnymi za pojawianie się objawów przedwczesnego starzenia się i stanów przednowotworowych. Z tego powodu preparaty kosmetyczne zawierają składniki przeciwdziałające negatywnym skutkom promieniowania słonecznego.

Powszechnie stosowane filtry UV wykazują aktywność ochronną polegającą na absorpcji, rozpraszaniu lub całkowitym odbiciu promieniowania. Spośród wymienionych grup najważniejszą stanowią składniki przejawiające zdolność do absorpcji promieniowania. Substancje te stosuje się do produkcji różnego rodzaju preparatów kosmetycznych, do których należą kremy, olejki, pianki, aerozole i sztyfty.

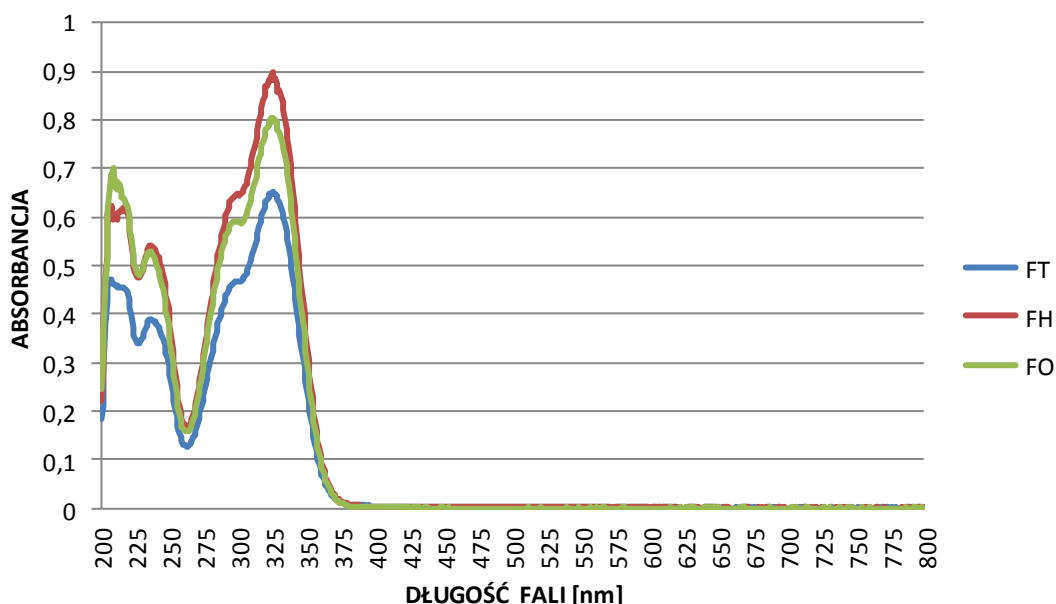
Większość metod opisujących zdolność substancji do pochłaniania promieniowania w zakresie UV (np. SPF), skupia się na promieniowaniu w zakresie UVB (290 – 320 nm) i UVA II (320 – 340 nm), których oddziaływanie na skórę skutkuje głównie powstawaniem rumienia. Nadmierna ekspozycja na promieniowanie w zakresie UVA I (340-400 nm) i UVA II wiąże się z poważniejszymi konsekwencjami dla zdrowia człowieka. Wpływa ona na zwiększenie produkcji reaktywnych form tlenu w komórkach, powodując indukcję procesów

kancerogenezy. Ponadto istnieją dowody na udział promieniowania w zakresie UVAI i UVAIL w procesie starzenia [Hojerová, Medovčíková i Mikula 2011].

Z tego powodu dokonano wstępnej oceny właściwości promieniochronnych wszystkich otrzymanych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych z uwzględnieniem promieniowania w zakresie UVB (290-320 nm), UVAIL (320-340 nm) i UVAI (340-400 nm).

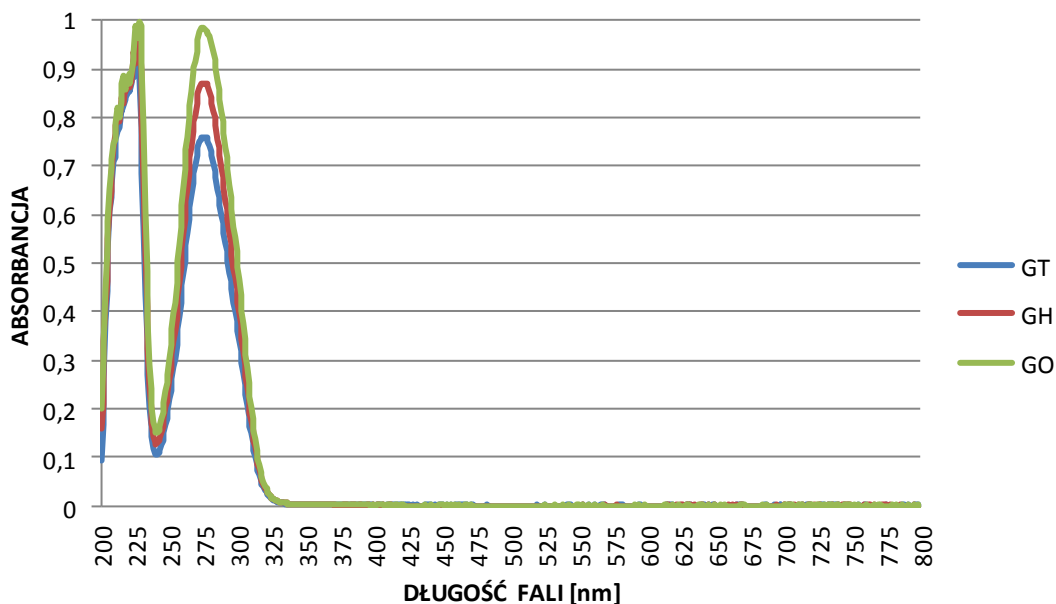
Do badań zastosowano kilka metod *in vitro*, odpowiednio zmodyfikowanych dla potrzeb pracy. Uzyskane wyniki zostały oparte na pomiarach wartości absorbancji w zakresie promieniowania UV-VIS, a wprowadzone modyfikacje polegały na zastosowaniu próbek o objętości 3,5 ml, umieszczonych w kuwetach kwarcowych o długości drogi optycznej 10 mm. Wykorzystane metody stosuje się powszechnie do opisywania właściwości promieniochronnych preparatów kosmetycznych. Przeprowadzone badania umożliwiły określenie właściwości promieniochronnych otrzymanych estrów jako pojedynczych składników pod kątem przyszłego zastosowania w roli filtrów UV.

Poddane badaniu długołańcuchowe estry kwasów fenolowych wykazują zdolność do pochłaniania promieniowania UV, a maksima absorpcji tych związków mieszczą się w zakresie 200 – 400 nm, co wstępnie potwierdza ich właściwości promieniochronne. Widma UV-VIS otrzymanych związków przedstawiono na wykresach 13, 14 i 15.

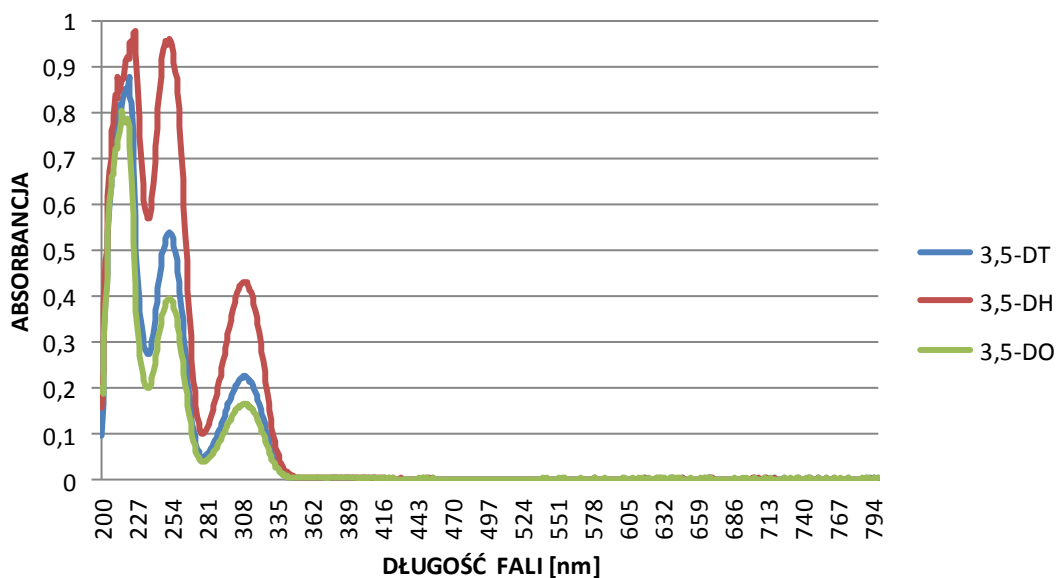


Wykres 13 Widma UV-VIS estrów kwasu ferulowego  
Źródło: badania własne





Wykres 14 Widma UV-VIS estrów kwasu galusowego  
Źródło: badania własne



Wykres 15 Widma UV-VIS estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego  
Źródło: badania własne

Metoda BSRS jest powszechnie wykorzystywana do opisywania właściwości promieniochronnych filtrów UV w Wielkiej Brytanii. Preparaty podlegają odpowiedniej klasyfikacji na podstawie relacji UVA/UVB wyznaczanej na podstawie widm UV-VIS. W zależności od uzyskanej wartości stosunku pola powierzchni pod krzywą w zakresie UVA do

pola powierzchni pod krzywą w zakresie UVB, filtrom UV przypisuje się odpowiednią liczbę gwiazdek (Tabela 25) [Hojerová, Medovčíková i Mikula 2011]. W metodzie tej dokonuje się pomiaru absorbancji przed i po ekspozycji próbek na promieniowanie UV. W pracy pominięto pomiar absorbancji próbek poddanych wpływowi promieniowania, dlatego badania nie uwzględniają oceny odporności badanych związków na promieniowanie.

Tabela 25 Klasyfikacja filtrów UV według metody BSRS

| <b>Liczba gwiazdek</b> | <b>Przedział wartości UVA/UVB</b> |
|------------------------|-----------------------------------|
| 0                      | <0,60                             |
| 3                      | 0,60 – 0,79                       |
| 4                      | 0,80 – 0,89                       |
| 5                      | >0,90                             |

Źródło: [Hojerová, Medovčíková i Mikula 2011]

W celu wyznaczenia relacji UVA/UVB każdego z otrzymanych estrów, wyznaczono wartości pól powierzchni pod krzywymi w zakresie UVA (AUC UVA I i AUC UVA II) i UVB (AUC UVB). Obliczone wartości przedstawiono w tabeli 26.

Spośród wszystkich badanych związków jedynie estry kwasu ferulowego spełniły warunki postawione substancjom promieniochronnym w klasyfikacji BSRS. Wyznaczone wartości relacji UVA/UVB przekraczały 0,9, co było podstawą do przyporządkowania im maksymalnej liczby 5 gwiazdek. Pozostałe długołańcuchowe estry kwasów fenolowych charakteryzowały się niskimi wartościami relacji UVA/UVB. Wartości relacji UVA/UVB zostały przedstawione w tabeli 27.

Według rekomendacji Komisji Europejskiej relacja zdolności preparatów kosmetycznych do pochłaniania promieniowania w zakresach UVA/UVB powinna kształtować się na poziomie co najmniej 1/3 [European Commission 2007]. Wyznaczony próg został przekroczony przez wszystkie badane estry kwasu ferulowego oraz 3,5-dihydroksybenzoesan heksadecylu (3,5-DH) i 3,5-dihydroksybenzoesan oktadecylu (3,5-DO).

W celu określenia właściwości promieniochronnych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych, wyznaczono również krytyczne długości fal dla każdego z otrzymanych związków zgodnie ze wzorem zaproponowanym przez Diffey'a. Jest to metoda rekomendowana przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA). Organizacja ta opracowała pięciostopniową skalę, określającą

spektrum działania w zakresie ochrony przeciw negatywnemu wpływowi promieniowania UV (Tabela 28).

Tabela 26 Wartości pól powierzchni pod krzywymi UV wyznaczone na podstawie widm UV-VIS

| Związek | AUC UVB<br>(290-320 nm) | AUC UVA I<br>(340-400 nm) | AUC UVAII<br>(320-340 nm) |
|---------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| FT      | 15,2                    | 5,8                       | 12,1                      |
| FH      | 20,9                    | 7,9                       | 16,5                      |
| FO      | 19,0                    | 7,0                       | 14,9                      |
| GT      | 8,0                     | 0,1                       | 0,2                       |
| GH      | 9,3                     | 0,1                       | 0,3                       |
| GO      | 10,9                    | 0,1                       | 0,3                       |
| 3,5-DT  | 5,6                     | 0,1                       | 1,7                       |
| 3,5-DH  | 10,8                    | 0,3                       | 3,3                       |
| 3,5-DO  | 4,1                     | 0,2                       | 1,3                       |

AUC – Area Under Curve

Źródło: badania własne

Tabela 27 Wartości ilorazu UVA/UVB wyznaczone na podstawie widm UV-VIS długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych

| Związek | Wyznaczone wartości<br>UVA/UVB | Liczba gwiazdek |
|---------|--------------------------------|-----------------|
| FT      | 1,18                           | 5               |
| FH      | 1,17                           | 5               |
| FO      | 1,15                           | 5               |
| GT      | 0,04                           | 0               |
| GH      | 0,04                           | 0               |
| GO      | 0,04                           | 0               |
| 3,5-DT  | 0,32                           | 0               |
| 3,5-DH  | 0,33                           | 0               |
| 3,5-DO  | 0,35                           | 0               |

Źródło: badania własne

Wyznaczone wartości krytycznej długości fali (Tabela 29) wskazują, że poddane badaniu estry kwasu galusowego nie zapewniają ochrony przed negatywnym wpływem promieniowania UVA. 3,5-dihydroksybenzoesan oktadecylu (3,5-DO) stanowi umiarkowaną barierę dla promieniowania w zakresie 320 – 400 nm. Wartość krytycznej długości fali wyznaczona dla 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu również wskazuje na umiarkowane właściwości ochronne tego estru, jednak zbyt niska wartość ilorazu UVA/UVB eliminuje ten

związek pod kątem potencjalnego zastosowania w roli filtra UV. Estry kwasu ferulowego cechują się natomiast wysokimi wartościami krytycznej długości fali dzięki czemu umożliwiają zapewnienie dobrej ochrony przed promieniowaniem w zakresie 320 – 400 nm.

Tabela 28 Klasyfikacja związków promieniochronnych na podstawie krytycznej długości fali

| Zakres krytycznej długości fali                  | Ocena | Stopień ochrony |
|--|-------|-----------------|
| $\lambda_{kr} < 325 \text{ nm}$                  | 0     | brak            |
| $325 \text{ nm} < \lambda_{kr} < 335 \text{ nm}$ | 1     | umiarkowana     |
| $335 \text{ nm} < \lambda_{kr} < 350 \text{ nm}$ | 2     | dobra           |
| $350 \text{ nm} < \lambda_{kr} < 370 \text{ nm}$ | 3     | wybitna         |
| $370 \text{ nm} < \lambda_{kr}$                  | 4     | maksymalna      |

Źródło: [FDA 2007]

Tabela 29 Maksymalna absorpcja i krytyczne długości fali wyznaczone na podstawie widm UV-VIS

| Związek | $\lambda_{max}$ | $\lambda_{kr}$ |
|---------|-----------------|----------------|
| FT      | 325 nm          | 347 nm         |
| FH      | 325 nm          | 346 nm         |
| FO      | 325 nm          | 346 nm         |
| GT      | 226 nm          | 313 nm         |
| GH      | 226 nm          | 313 nm         |
| GO      | 225 nm          | 312 nm         |
| 3,5-DT  | 221 nm          | 328 nm         |
| 3,5-DH  | 226 nm          | 324 nm         |
| 3,5-DO  | 220 nm          | 329 nm         |

Źródło: badania własne

W świetle powyższych informacji można stwierdzić, że wszystkie spośród badanych estrów wykazują zdolność do pochłaniania promieniowania w zakresie UVB, dzięki czemu mogą zapobiegać powstawaniu rumienia spowodowanego nadmierną ekspozycją na promieniowanie słoneczne.

Najbardziej kompleksową ochronę zapewniają estry kwasu ferulowego. Związki te w dobrym stopniu absorbują promieniowanie UVB oraz UVA, które jest odpowiedzialne za powstawanie nowotworów oraz przyspieszanie procesów starzenia.

Obecnie na mocy Decyzji Komisji WE z dnia 9 lutego 2006 r zmieniającej decyzję 96/335/WE ustanawiającą wykaz i powszechne nazewnictwo składników stosowanych w produktach kosmetycznych, do ogólnego stosowania w roli filtrów UV i środków pochłaniających promieniowanie UV dopuszczono nieliczne spośród pochodnych kwasu

cynamonowego. Zalicza się do nich 4-metoksycynamonian-2-etyloheksylu i p-metoksycynamonian izopentylu. W Europie oba związki mogą być stosowane w roli składników absorbujących promieniowanie UVB w stężeniach do 10%.

Według danych literaturowych p-metoksycynamonian izopentylu jest składnikiem nie wywołującym alergii. W przypadku 4-metoksycynamonianu-2-etyloheksylu zaobserwowano natomiast dwa przypadki nadwrażliwości na 370 przebadanych osób [Kilimowicz i in. 2007].

Zdolność estrów kwasu ferulowego do pochłaniania promieniowania w zakresie UVA i UVB oraz dobrą rozpuszczalność w olejach i fazach olejowych powoduje, że związki te w wysokim stopniu aspirują do roli filtrów UV i środków pochłaniających promieniowanie UV w preparatach kosmetycznych. Dodatkowo, mogą one również chronić oleje i fazy tłuszczowe przed utlenianiem fotosensybilizowanym omawianym szczegółowo w podrozdziale 2.3.2.

#### **4. Analiza zmian oksydacyjnych i efektywności działania przeciwutleniającego długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych w oleju z pestek winogron na podstawie badań przechowalniczych**

##### **4.1. Badania przechowalnicze oleju z pestek winogron z dodatkiem kwasu ferulowego**

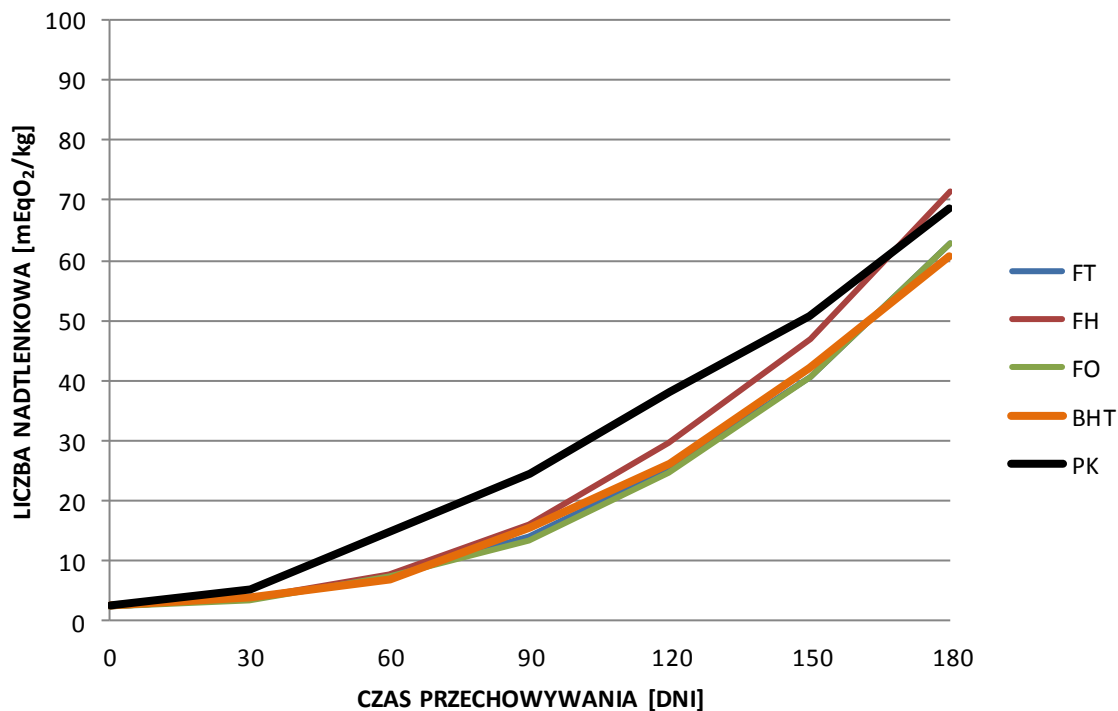
Przebieg procesu utleniania w próbkach oleju z pestek winogron stabilizowanych estrami kwasu ferulowego i BHT przedstawiono na wykresach 16 i 17.

Początkowa zawartość nadtlenków w przechowywanym oleju wynosiła 2,43 mEq O<sub>2</sub>/kg i spełniała warunki określone w oficjalnych standardach Codex Alimentarius, według których wartość liczby nadtlenkowej olejów jadalnych tłoczonych na zimno nie powinna przekraczać 15 mEqO<sub>2</sub>/kg. Niska zawartość nadtlenków w surowcach tłuszczowych przeznaczonych do badań przechowalniczych jest bardzo istotna, ponieważ przeciwutleniacze fenolowe wykazują wysoką skuteczność działania jedynie w tłuszczach o niewielkim stopniu zmian oksydacyjnych.

Wszystkie długołańcuchowe estry kwasu ferulowego zastosowane w stężeniu 4,5 μmola/100 g wykazywały podobne zdolności do hamowania procesów utleniania w oleju z pestek winogron. Wartości liczby nadtlenkowej wyznaczone w trakcie całego okresu przechowywania próbek stabilizowanych przez te związki były niższe niż w przypadku próby kontrolnej (bez dodatku przeciwutleniacza) co świadczy o występowaniu właściwości przeciwutleniających estrów.

Największe zdolności ochronne przejawiały ferulan tetrade cylu i ferulan oktadecylu. Zmiany oksydacyjne w próbkach zawierających te estry przebiegały podobnie jak w próbce stabilizowanej BHT.

Nieco niższe zdolności ochronne przejawiał ferulan heksadecylu. W początkowej fazie przechowywania (90 dni) wartości liczby nadtlenkowej oznaczone dla próbek zawierających dodatek tego estru pokrywały się z wartościami uzyskanymi dla próbek stabilizowanych pozostałymi przeciwutleniaczami. Po upływie tego czasu zawartość nadtlenków w wymienionej próbce zaczęła wzrastać w tempie wyższym niż w pozostałych próbkach, a w końcowej fazie przechowywania przekroczyła nawet wartość oznaczoną dla próby kontrolnej, co jest przejawem działania proutleniającego tego związku.



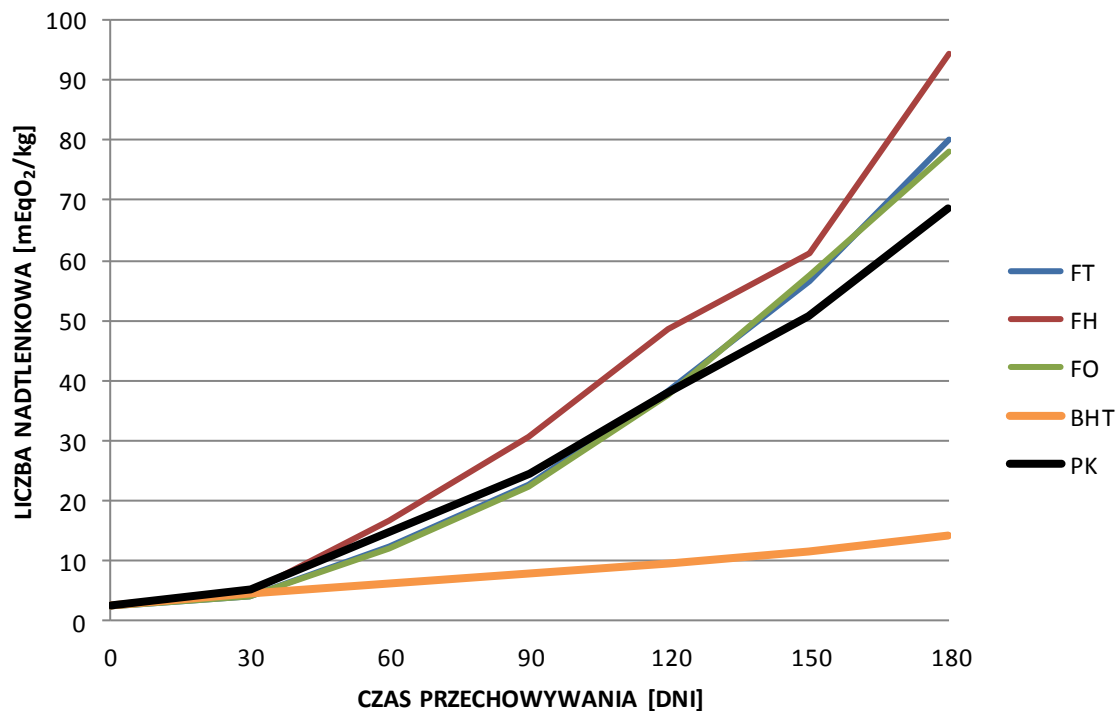
Wykres 16 Wpływ dodatku estrów kwasu ferulowego w stężeniu 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie,  $n=3$ )  
Źródło: badania własne

Przy 100-krotnie wyższym stężeniu przeciwutleniaczy zaobserwowano dużo większe rozbieżności w przebiegu zmian oksydacyjnych w przechowywanych próbkach oleju.

Największe zdolności do hamowania procesów utleniania wykazywał przeciwutleniacz syntetyczny BHT.

Ferulan tetradecylu i ferulan oktaedecylu obecne w stabilizowanym oleju wykazywały dużo niższe właściwości ochronne. W początkowej fazie przechowywania zawartość nadtlenków w próbkach zawierających dodatek wspomnianych estrów była niższa niż w próbie kontrolnej. Po upływie 90 dni przechowywania nastąpiło znaczne zwiększenie intensywności procesów utleniania w tych próbkach, natomiast po upływie 120 dni zawartość nadtlenków zaczęła przekraczać poziom wyznaczony dla próby kontrolnej, co świadczy o proutleniającym charakterze związków.

Najmniejsze zdolności do hamowania procesów utleniania wykazywał ferulan heksadecylu. Już po 60 dniach przechowywania zawartość nadtlenków w próbce stabilizowanej tym estrem wyraźnie przekroczyła wartość oznaczoną dla próby kontrolnej, co jest przejawem działania proutleniającego.



Wykres 17 Wpływ dodatku estrów kwasu ferulowego w stężeniu 450  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie,  $n=3$ )  
 Źródło: badania własne

Za właściwości przeciwutleniające długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych w największym stopniu odpowiada fragment cząsteczki pochodzący od kwasu.

Kwas ferulowy jest powszechnie znany ze swoich właściwości przeciwutleniających. Obecność grupy elektrono-donorowej w pozycji para wzmacnia jego aktywność przeciwutleniającą poprzez efekt indukcyjny [Jadhav i in. 1996]. Ponadto obecność podwójnego wiązania w cząsteczce kwasu wpływa pozytywnie na stabilność rodnika fenoksyłowego [Marinowa i Yanishlieva 2003].

Dane literaturowe wskazują jednak na możliwość występowania działania proutleniającego związków fenolowych, ze szczególnym uwzględnieniem cząsteczek zawierających dwie grupy hydroksylowe położone w pozycji orto lub grupy hydroksylowej w położeniu para i metoksyłowej w położeniu meta, co dotyczy kwasu ferulowego i jego estrów [Muriya i Devasagayam 2010; Zheng i in. 2008].

Działanie proutleniające tych związków może wynikać z powstawania interakcji pomiędzy zastosowanymi estrami a metalami przejściowymi występującymi w układzie. Jony  $\text{Cu}^{2+}$  wykazują zdolność utleniania związków fenolowych na drodze międzycząsteczkowego transferu elektronów w wyniku czego powstają rodniki fenoksyłowe oraz forma zredukowana



$\text{Cu}^{1+}$ , która może być w dalszej kolejności utleniana przez  $\text{O}_2$  do formy wyjściowej [Zheng i in. 2008].

Odpowiedni dobór stężenia przeciwutleniacza zależy od jego struktury, środowiska w którym działa oraz specyfiki stabilizowanego materiału. Zbyt wysokie stężenie przeciwutleniacza w próbce może skutkować utratą jego właściwości przeciwutleniających a nawet ujawnianiem właściwości proutleniających predysponujących te związki do udziału w inicjacji procesu utleniania [Jadhav i in. 1996]. Zjawisko to często występuje w przypadku przeciwutleniaczy, w których nie występuje zawada steryczna [Cuppett i in. 1997].

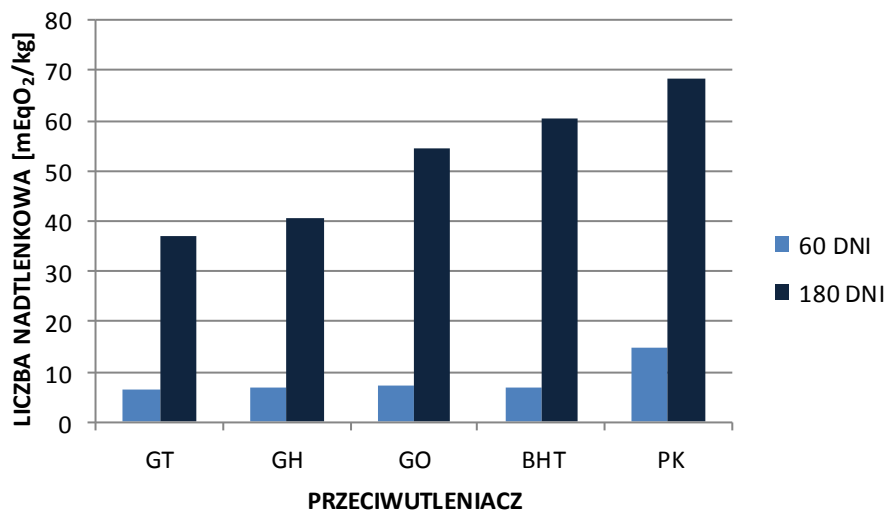
Uzyskane w tej pracy wyniki wskazują na znaczący wpływ stężenia estrów kwasu ferulowego na ich właściwości przeciwutleniające. Zwiększenie stężenia wspomnianych przeciwutleniaczy do 450  $\mu\text{moli}/100\text{ g}$  spowodowało obniżenie zdolności estrów do hamowania procesów utleniania a nawet doprowadziło do ujawnienia właściwości proutleniających.

Zaobserwowane różnice właściwości przeciwutleniających ferulanu heksadecylu i pozostałych estrów kwasu ferulowego mogą wynikać z budowy przestrzennej tego związku. Dane literaturowe wskazują, że wzrost liczby atomów węgla w łańcuchu alkilowym, może skutkować jego znacznym pofałdowaniem, w wyniku czego jego konformacja w roztworach może przyjmować postać nieliniową i tym samym wpływać na ogólne właściwości związku w roztworze [Fisk i in. 2009].

Uzyskane wyniki stanowią potwierdzenie hipotezy II, wskazującej na obecność zależności pomiędzy zastosowanym stężeniem estru a jego właściwościami przeciwutleniającymi. Warto również zwrócić uwagę na długość łańcucha alkilowego estrów, która może wywierać istotny wpływ na zachowanie przeciwutleniacza w roztworze i tym samym determinować jego zdolności ochronne.

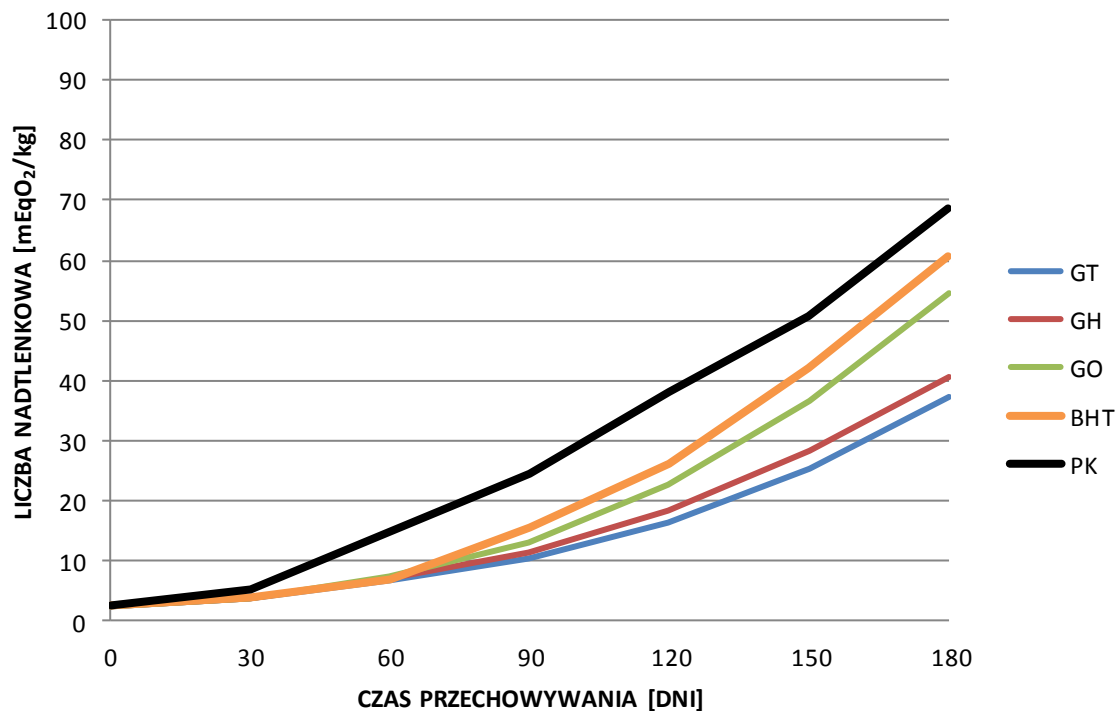
#### **4.2. Badania przechowalnicze oleju z pestek winogron z dodatkiem estrów kwasu galusowego**

Estry kwasu galusowego wykazały dobre właściwości przeciwutleniające w obu zastosowanych wariantach stężeń. Wartości liczby nadtlencowej wyznaczone dla próbek oleju stabilizowanych estrami kwasu galusowego i BHT, były znacznie niższe od wartości wyznaczonych dla próby kontrolnej w ciągu całego okresu przechowywania.



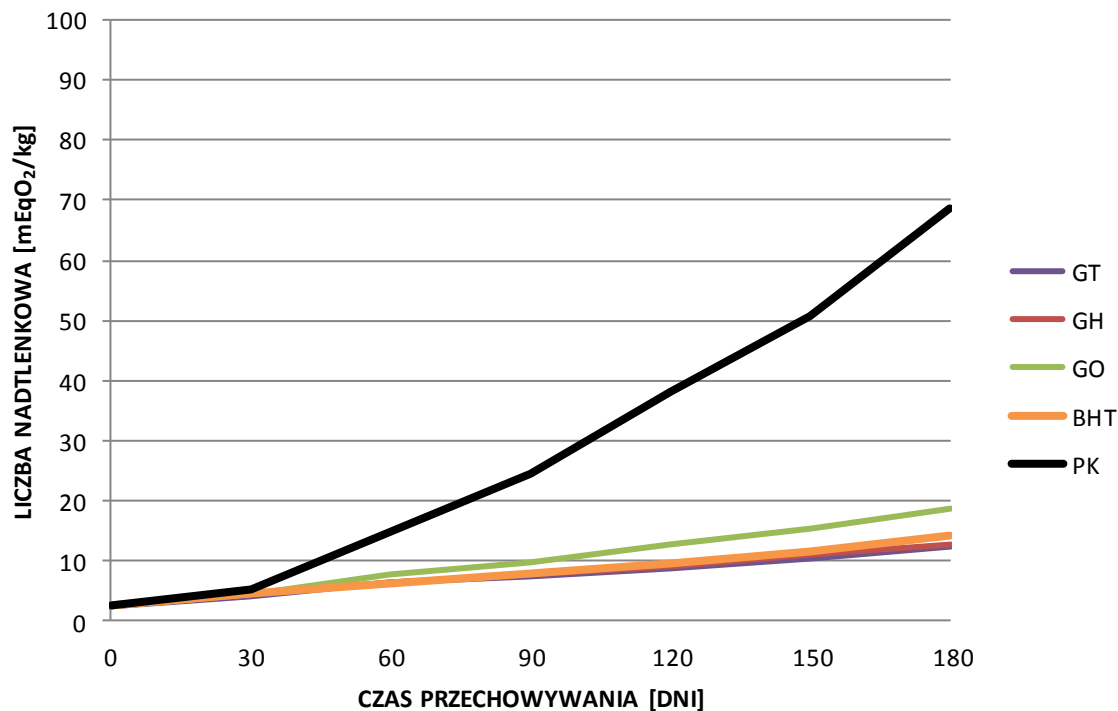
Wykres 18 Wartości liczby nadtlenkowej wyznaczone po 60 i 180 dniach przechowywania dla próbek zawierających 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  przeciwutleniacza i próby kontrolnej  
 Źródło: badania własne

Przy niższym stężeniu przeciwutleniaczy w próbkach wszystkie estry kwasu galusowego wykazały lepszą zdolność do hamowania procesów utleniania niż BHT. W początkowej fazie przechowywania zawartość nadtlenków we wszystkich stabilizowanych próbkach była zbliżona. Po upływie 60 dni nastąpiło zwiększenie szybkości przyrostu zawartości nadtlenków w poszczególnych próbkach oleju zgodnie z kolejnością: PK>BHT>GO>GH>GT, co w dobrym stopniu ilustrują wartości liczby nadtlenkowej wyznaczone po 60 i 180 dniach przechowywania dla próbek oleju stabilizowanych tymi przeciwutleniaczami, przedstawione na wykresie 18.



Wykres 19 Wpływ dodatku estrów kwasu galusowego w stężeniu  $4,5 \mu\text{mola}/100 \text{ g}$  na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie,  $n=3$ )  
 Źródło: badania własne

Zwiększenie stężenia estrów kwasu galusowego i BHT w próbkach oleju skutkowało wzrostem skuteczności ich działania przeciwutleniającego. Przyrost zawartości nadtlenków w oleju stabilizowanym tymi związkami przebiegał znacznie wolniej niż w przypadku próby kontrolnej. Wartości liczby nadtlenkowej oleju zawierającego dodatek galusanu tetradecylu i galusanu heksadecylu były porównywalne z wartościami oznaczonymi dla oleju stabilizowanego BHT w ciągu całego okresu przechowywania. Nieco gorszymi właściwościami ochronnymi charakteryzował się galusan oktaedecylu.



Wykres 20 Wpływ dodatku estrów kwasu galusowego w stężeniu 450  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie,  $n=3$ )  
 Źródło: badania własne

W trakcie przeprowadzonych badań zaobserwowano również wpływ długości łańcucha węglowodorowego na właściwości przeciwutleniające estrów kwasu galusowego. Wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego właściwości przeciwutleniające związków malały.

Wysokie zdolności estrów kwasu galusowego do hamowania procesów utleniania wynikają z obecności trzech grup hydroksylowych w cząsteczce, które wywierają wpływ na proces delokalizacji elektronowej w pierścieniu benzenowym. Przyczynia się to do zwiększenia stabilności rodników fenoksyłowych. Ponadto obecność grupy hydroksylowej w pozycji para zwiększa właściwości przeciwutleniające estrów poprzez efekt indukcyjny.

Innymi estrami kwasu galusowego, znanymi z właściwości przeciwutleniających są wykorzystywane w przemyśle spożywczym galusan propylu, galusan oktylu i galusan dodecyłu. Związki te z powodzeniem wykorzystuje się do stabilizowania tłuszczów zwierzęcych, takich jak smalec czy przetopiony tłuszcz drobiowy. Galusan propylu wykazuje dużą skuteczność działania w olejach: sojowym, z bawełny, palmowym i olejach uwodornionych. Związek ten charakteryzuje się jednak wyższą skutecznością działania w olejach surowych niż w olejach uprzednio poddanych rafinacji, odbarwianiu i dezodoracji.

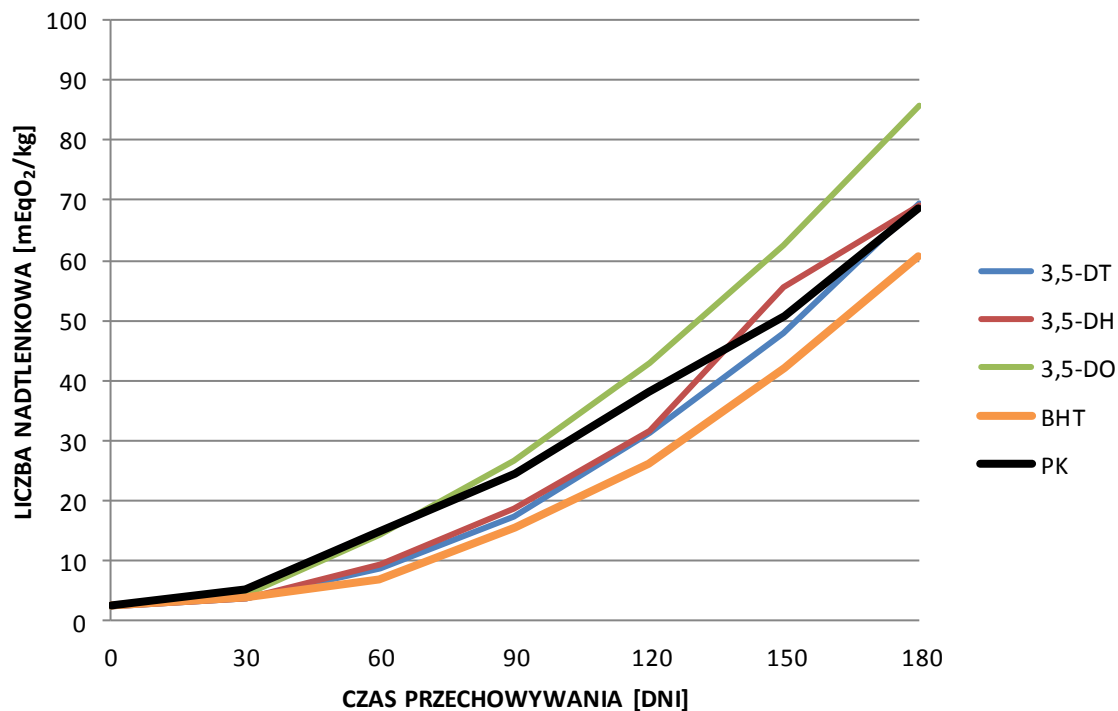
Zastosowanie mieszaniny galusanów wywiera korzystny wpływ na stabilność olejów o niższym stopniu nasycenia i odpowiednio niskiej zawartości tokoferoli, takich jak oleje: arachidowy, kokosowy, palmowy i oliwa z oliwek. Związki te charakteryzują się wysoką skutecznością działania zwłaszcza w układach bezwodnych, jednak charakteryzują się niższą stabilnością termiczną i gorszą rozpuszczalnością w tłuszczach niż BHT [Madhavi, Singhal i Kulkarni 1996]. Otrzymane estry ze względu na obecność długiego łańcucha alkilowego w cząsteczkach są związkami dobrze rozpuszczalnymi w tłuszczach. Charakteryzują się one również większą stabilnością termiczną, co jest ich dodatkową zaletą w porównaniu z estrami kwasu galusowego o krótszych łańcuchach alkilowych.

#### **4.3. Badania przechowalnicze oleju z pestek winogron z dodatkiem estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego**

Długłańcuchowe estry kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego charakteryzowały się niskimi zdolnościami do hamowania procesów utleniania próbek oleju z pestek winogron.

Przy stężeniu 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  stopień utlenienia oleju stabilizowanego przez 3,5-dihydroksybenzoesan tetradecylu był bardzo zbliżony do tego jakim charakteryzował się olej z dodatkiem 3,5-dihydroksybenzoesanu heksadecylu i przez cały okres przechowywania niższy niż w przypadku próby kontrolnej. Wartości liczby nadtlenkowej oznaczone dla tych próbek przewyższały natomiast wartości oznaczone dla próbki stabilizowanej BHT.

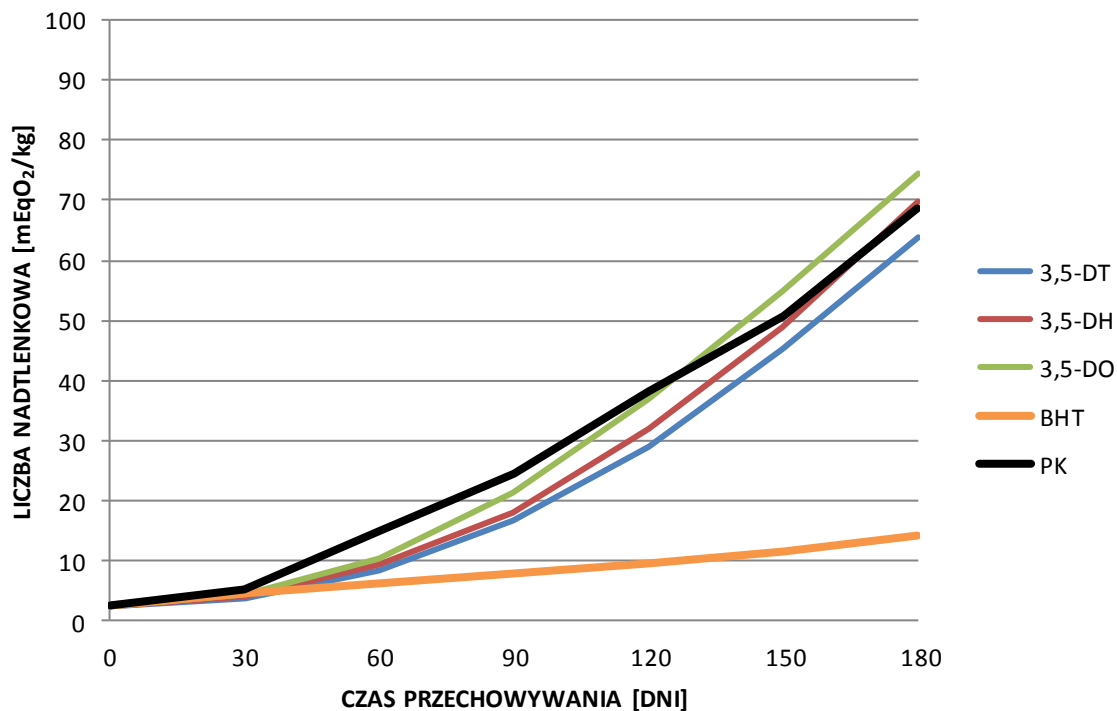
Najniższe właściwości ochronne wykazywał natomiast 3,5-dihydroksybenzoesan oktadecylu. Po upływie 60 dni przechowywania zawartość nadtlenków w próbce stabilizowanej tym estrem zaczęła gwałtownie wzrastać, a po 90 dniach przechowywania wartość liczby nadtlenkowej oznaczona dla tej próbki wyraźnie przewyższyła wartość oznaczoną dla próby kontrolnej, co świadczy o proutleniającym charakterze związku.



Wykres 21 Wpływ dodatku estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego w stężeniu 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie,  $n=3$ )  
Źródło: badania własne

Przy stężeniu 450  $\mu\text{moli}/100\text{ g}$  obserwowano niewielkie zwiększenie zdolności ochronnych estrów w porównaniu z wariantem uwzględniającym niższą zawartość przeciwutleniaczy w próbkach. Działanie to było jednak dużo niższe niż w przypadku BHT.

Najlepsze zdolności do hamowania procesów utleniania wykazał 3,5-dihydroksybenzoesan tetradecylu. Nieco niższe właściwości ochronne wykazywał 3,5-dihydroksybenzoesan heksadecylu, a 3,5-dihydroksybenzoesan oktadecylu po przekroczeniu 120 dni przechowywania zaczął ujawniać działanie proutleniające.



Wykres 22 Wpływ dodatku estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego w stężeniu 450  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie,  $n=3$ )  
 Źródło: badania własne

Niższe zdolności estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego do hamowania procesów utleniania w porównaniu z pochodnymi kwasu galusowego wynikają z obecności jedynie dwóch grup hydroksylowych w cząsteczce. Obecność grupy hydroksylowej w pozycji para w cząsteczkach estrów kwasu galusowego decyduje o ich większej skuteczności w porównaniu do 3,5-dihydroksybenzoesanów. Wspomniane czynniki w wysokim stopniu wpływają na stabilność rodników fenoksyłowych powstających w wyniku utlenienia przeciwutleniaczy fenolowych. Grupy hydroksylowe estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego pozbawione są obecności grup sąsiadujących, co decyduje o braku zawady sterycznej w ich cząsteczkach. Rodniki fenoksyłowe pozbawione zawady sterycznej są znacznie mniej stabilne (bardziej reaktywne) niż rodniki z zawadą steryczną, co może skutkować ich niekorzystnym udziałem w procesie autooksydacji.

#### **4.4. Ocena i porównanie aktywności przeciwutleniającej długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych i BHT**

Jako miarę aktywności przeciwutleniaczy w przechowywanych próbkach zastosowano współczynnik ochronny (WO). Obliczone wartości współczynnika ochronnego (Tabela 30) odpowiadają stosunkowi czasów indukcji, w których wyznaczone liczby nadtlenkowe dla próbki badanej i próbki kontrolnej osiągnęły wartość 10 mEqO<sub>2</sub>/kg [Wroniak 2006].

Czas indukcji jest to czas w którym zmiany zachodzące w oleju są niewykrywalne lub bardzo małe. Można go również określić jako czas niezbędny dla wzrostu stężenia wybranego wskaźnika od wartości początkowej do umownie ustalonego poziomu końcowego [Szukalska 2003].

Współczynnik ochronny umożliwia określenie wpływu przeciwutleniacza na stabilność oksydacyjną tłuszczu. Im wyższa jest wartość tego współczynnika, tym ochrona nienasyconych kwasów tłuszczowych przed procesami utleniania jest skuteczniejsza. Wartość współczynnika WO>1 oznacza, że określony związek wykazuje właściwości przeciwutleniające, WO=1 wskazuje na brak efektu ochronnego, natomiast WO<1 informuje o proutleniającym charakterze związku.

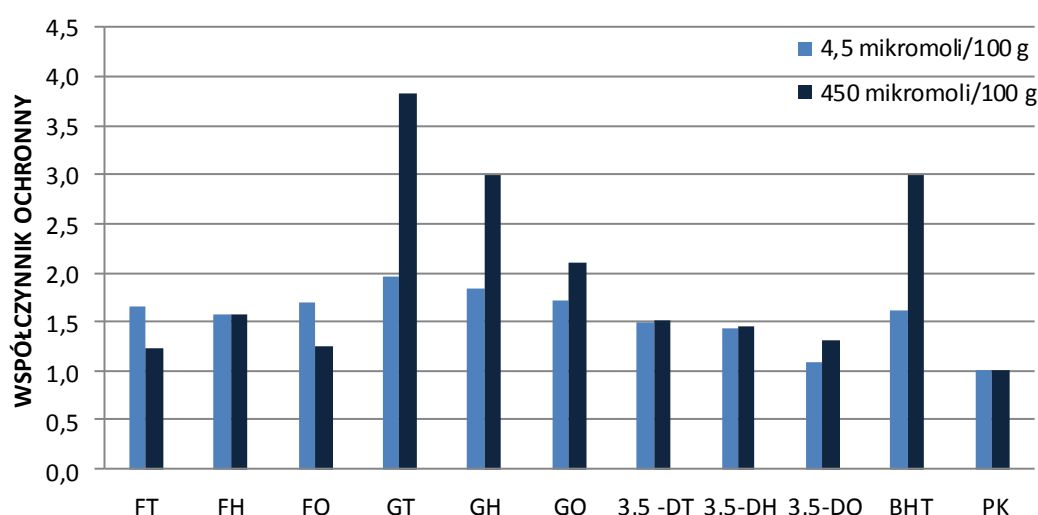
Uzyskane wartości współczynnika ochronnego wskazują, że wszystkie poddane badaniu długołańcuchowe estry kwasów fenolowych wykazują właściwości przeciwutleniające.

Estry kwasu galusowego ujawniły największe zdolności do hamowania procesów utleniania spośród wszystkich badanych związków. Przy niższym stężeniu przeciwutleniaczy w próbkach (4,5 μmola/100 g) wartości współczynnika ochronnego estrów kwasu galusowego wyraźnie przewyższały wartości wyznaczone dla BHT. Przy stężeniu 450 μmoli/100 g efekt ochronny działania galusanów był zróżnicowany, jednak ich wartości współczynnika ochronnego znacznie przewyższały wartości wyznaczone dla pozostałych estrów. Galusan tetradecylu wykazał najlepsze zdolności do hamowania procesów utleniania. Wartość współczynnika ochronnego tego estru wynosiła 3,8 i znacznie przekraczała wartość wyznaczoną dla BHT (WO=3,0), który ograniczał powstawanie zmian oksydacyjnych w stopniu zbliżonym do galusanu heksadecylu (WO=3,0). Najmniej aktywną pochodną kwasu galusowego był galusan oktadecylu, który charakteryzował się współczynnikiem ochronnym równym 2,1. Godnym uwagi jest fakt, że wzrost stężenia estrów kwasu galusowego wpływał



pozytywnie na skuteczność ich działania ochronnego wobec nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Estry kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego przy stężeniu 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  wykazały najniższe działanie przeciwutleniające spośród wszystkich przebadanych estrów. Nie zaobserwowano natomiast istotnego wpływu zastosowanego stężenia na ich skuteczność. Wyższe wartości współczynnika ochronnego tych związków na tle estrów kwasu ferulowego przy stężeniu 450  $\mu\text{moli}/100\text{ g}$  wynikała z ograniczenia właściwości przeciwutleniających ferulanów w tym wariacie stężeń. Najwyższą wartością tego parametru charakteryzował się 3,5-dihydroksybenzoesan tetradecylu ( $\text{WO}=1,5$ ).



Wykres 23 Wartości współczynnika ochronnego wyznaczone dla długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych  
Źródło: badania własne

Estry kwasu ferulowego wykazywały zmienną aktywność w zależności od zastosowanego stężenia. Wyjątek stanowił ferulan heksadecylu, który w obu wariantach stężeń charakteryzował się współczynnikiem ochronnym równym 1,6. Próbkę zawierającą niższe stężenie ferulanu tetradecylu i ferulanu oktadecylu były znacznie mniej podatne na procesy utleniania niż próbki zawierające 100-krotnie wyższe stężenie tych związków. Wartość współczynnika ochronnego ferulanu tetradecylu i ferulanu oktadecylu przy stężeniu 450  $\mu\text{moli}/100\text{g}$  wynosiła 1,2 i była najniższą spośród wszystkich uzyskanych wartości.

W trakcie przeprowadzonych badań zaobserwowano wpływ długości łańcucha węglowodorowego estrów kwasów galusowego i 3,5-dihydroksybenzoesowego na ich właściwości przeciwutleniające. Wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowodorowego w

cząsteczkach estrów, ich właściwości przeciwutleniające ulegały zmniejszeniu. Zjawisko to może wynikać z paradoksu polarności Portera, który zakłada, że przeciwutleniacze polarne wykazują wyższą aktywność w układach niepolarnych (bezwodnych), natomiast przeciwutleniacze niepolarne charakteryzują się większą skutecznością działania przeciwutleniającego w układach heterofazowych. Zwiększenie długości łańcucha węglowodorowego w cząsteczkach estrów powoduje zmniejszenie ich polarności i tym samym może przyczynić się do zmniejszenia ich właściwości przeciwutleniających w tzw. oleju w masie.

Tabela 30 Wartości współczynnika ochronnego wyznaczone dla długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych

| <b>Przeciwutleniacz</b> | <b>WO<sub>4,5μ</sub> mola/100 g</b> | <b>WO<sub>450μ</sub> mola/100g</b> |
|-------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| FT                      | 1,7                                 | 1,2                                |
| FH                      | 1,6                                 | 1,6                                |
| FO                      | 1,7                                 | 1,2                                |
| GT                      | 2,0                                 | 3,8                                |
| GH                      | 1,8                                 | 3,0                                |
| GO                      | 1,7                                 | 2,1                                |
| 3,5-DT                  | 1,5                                 | 1,5                                |
| 3,5-DH                  | 1,4                                 | 1,4                                |
| 3,5-DO                  | 1,1                                 | 1,3                                |
| BHT                     | 1,6                                 | 3,0                                |
| próba kontrolna         | 1,0                                 | 1,0                                |

Źródło: badania własne

## 5. Parametry jakości emulsji kosmetycznych typu O/W zawierających dodatek długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych

### 5.1. Ocena sensoryczna emulsji kosmetycznych

Ocenie sensorycznej poddano 9 emulsji kosmetycznych typu O/W, zawierających dodatek ferulanu tetradecylu, galusanu tetradecylu i 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu, w stężeniach:

- 0,01% w/w,
- 0,10% w/w,
- 1,00% w/w.

Sześciorosobowy zespół oceniający złożony z osób przeszkolonych w zakresie analizy sensorycznej dokonał oceny sporządzonych preparatów w zakresie: przyczepności, konsystencji, jednolitości, efektu poduszki, rozprowadzania, wchłaniania, kleistości, tłustości, natłuszczania i wygładzania. Oceniający dysponowali opisem, w którym sprecyzowano na co należy zwrócić szczególną uwagę w ocenie poszczególnych cech oraz charakterystyką wszystkich wyróżników dla każdej z przyznawanych ocen punktowych.

Przeprowadzona analiza wykazała, że wszystkie badane emulsje charakteryzowały się bardzo dobrą jakością. Poddane ocenie preparaty różniły się nieznacznie pod względem liczby przyznanych punktów, co świadczy o znikomym wpływie estrów na jakość sensoryczną preparatów kosmetycznych.

Emulsja zawierająca dodatek 1,00% ferulanu tetradecylu i emulsja wzbogacona o 0,01% 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu uzyskały najwyższą notę 4,83 pkt. Najgorzej sklasyfikowano natomiast emulsję zawierającą 0,01% ferulanu tetradecylu. Ocena jaką uzyskał ten preparat wynosiła 4,66 pkt.

Do najniżej ocenianych parametrów należały: kleistość, tłustość, efekt poduszki i jednolitość. Pozostałe wyróżniki uzyskały maksymalną ocenę 5 pkt.

Według członków zespołu oceniającego emulsje wzbogacone o ferulan tetradecylu, galusan tetradecylu i 3,5-dihydroksybenzoesan tetradecylu charakteryzowały się odpowiednią jednorodnością, jednak zaobserwowano w nich obecność pojedynczych pęcherzyków powietrza. Preparaty te wykazały umiarkowany efekt poduszki i odpowiednią kleistość oraz pozostawiały na skórze bezpośrednio po aplikacji tłusty film na skórze o odpowiedniej

wyczuwalności. Wyjątek stanowiła emulsja zawierająca 0,01% galusanu tetradecylu, która była jednorodna, o gładkiej powierzchni, bez widocznych grudek i pęcherzyków powietrza. Emulsja zawierająca 1,00% tej substancji charakteryzowała się natomiast bardzo odpowiednią kleistością.

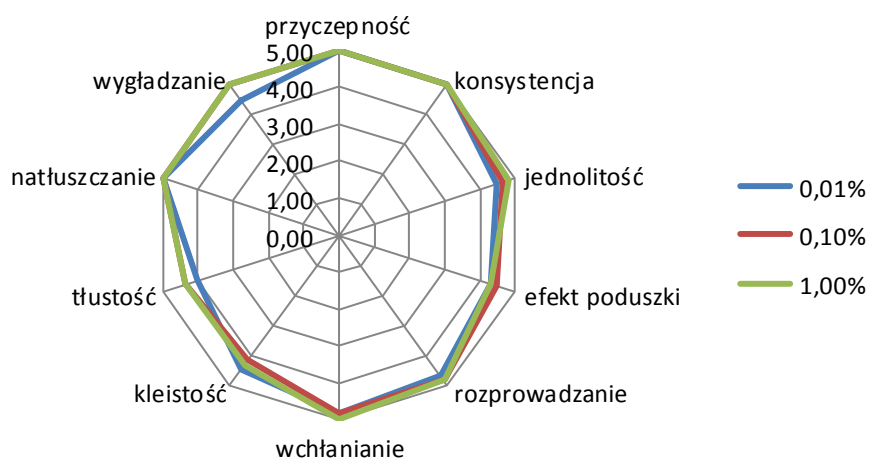
Eksperti uznali ponadto, że wszystkie badane emulsje:

- bardzo łatwo się nabierają, nie spływają i nie rozlewają się,
- są spójne, o bardzo właściwej gęstości,
- bardzo łatwo się rozprowadzają,
- bardzo szybko się wchłaniają,
- pozostawiają po upływie ½ h po aplikacji tłusty depozyt na skórze o bardzo odpowiedniej wyczuwalności,
- skóra po aplikacji preparatu jest bardzo wygładzona.

Tabela 31 Wyniki oceny sensorycznej emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem ferulanu tetradecylu w stężeniach 0,01%, 0,10% i 1,00% metodą pięciopunktową

| FT          | Wyróżniki jakości | Współczynnik<br>ważkości | 0,01%       | 0,10%       | 1,00% |
|-------------|-------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------|
|             | pryczepność       | 0,10                     | 0,50        | 0,50        | 0,50  |
|             | konsystencja      | 0,05                     | 0,25        | 0,25        | 0,25  |
|             | jednolitość       | 0,03                     | 0,14        | 0,14        | 0,15  |
|             | efekt poduszki    | 0,02                     | 0,09        | 0,09        | 0,09  |
|             | rozprowadzanie    | 0,10                     | 0,47        | 0,48        | 0,48  |
|             | wchłanianie       | 0,15                     | 0,73        | 0,73        | 0,75  |
|             | kleistość         | 0,10                     | 0,45        | 0,42        | 0,43  |
|             | tłustość          | 0,10                     | 0,40        | 0,43        | 0,43  |
|             | natłuszczanie     | 0,15                     | 0,75        | 0,75        | 0,75  |
|             | wygładzanie       | 0,20                     | 0,90        | 1,00        | 1,00  |
| <i>Suma</i> | <i>1,00</i>       | <i>4,66</i>              | <i>4,79</i> | <i>4,83</i> |       |

Zródło: badania własne, n=6

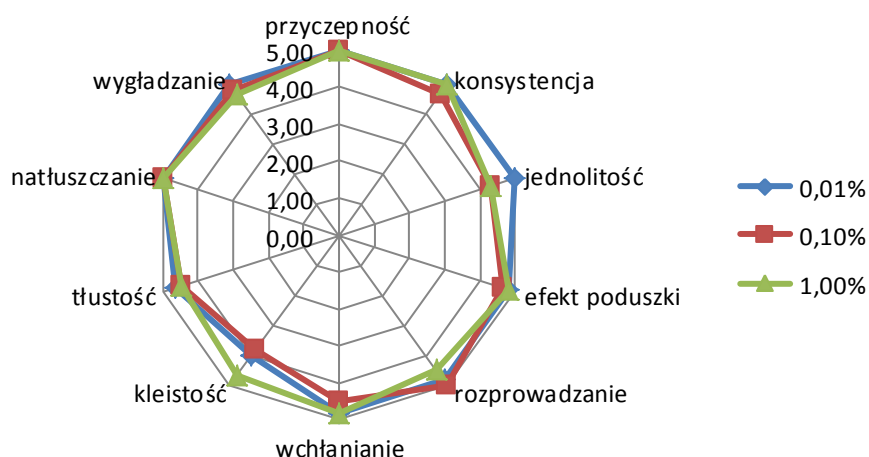


Wykres 24 Profil sensoryczny emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem ferulanu tetradecylu w stężeniach: 0,01%, 0,10% i 1,00%  
Źródło: badania własne

Tabela 32 Wyniki oceny sensorycznej emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem galusanu tetradecylu w stężeniach 0,01%, 0,10% i 1,00% metodą pięciopunktową

| GT | Wyróżniki jakości | Współczynnik ważkości | 0,01%       | 0,10%       | 1,00%       |
|----|-------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
|    | przyczepność      | 0,10                  | 0,50        | 0,50        | 0,50        |
|    | konsystencja      | 0,05                  | 0,25        | 0,23        | 0,25        |
|    | jednolitość       | 0,03                  | 0,15        | 0,13        | 0,13        |
|    | efekt poduszki    | 0,02                  | 0,10        | 0,09        | 0,10        |
|    | rozprowadzanie    | 0,10                  | 0,48        | 0,50        | 0,45        |
|    | wchłanianie       | 0,15                  | 0,73        | 0,68        | 0,73        |
|    | kleistość         | 0,10                  | 0,40        | 0,38        | 0,47        |
|    | tłustość          | 0,10                  | 0,47        | 0,45        | 0,45        |
|    | natłuszczenie     | 0,15                  | 0,75        | 0,75        | 0,75        |
|    | wygładzanie       | 0,20                  | 1,00        | 0,97        | 0,93        |
|    | <i>Suma</i>       | <i>1,00</i>           | <i>4,82</i> | <i>4,68</i> | <i>4,75</i> |

Źródło: badania własne, n=6

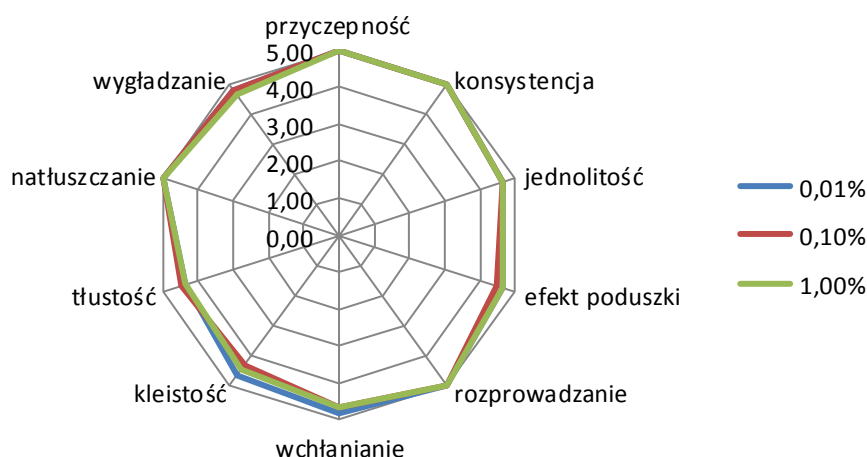


Wykres 25 Profil sensoryczny emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem galusanu tetrade cylu w stężeniach 0,01%, 0,10% i 1,00%  
Źródło: badania własne

Tabela 33 Wyniki oceny sensorycznej emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem 3,5-dihydroksybenzoesanu tetrade cylu w stężeniach: 0,01%, 0,10% i 1,00% metodą pięciopunktową

| 3,5-DT      | Wyróżniki jakości | Współczynnik wagi | 0,01%       | 0,10%       | 1,00% |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------|-------------|-------|
|             | przyczepność      | 0,10              | 0,50        | 0,50        | 0,50  |
|             | konsystencja      | 0,05              | 0,25        | 0,25        | 0,25  |
|             | jednolitość       | 0,03              | 0,14        | 0,14        | 0,14  |
|             | efekt poduszki    | 0,02              | 0,09        | 0,09        | 0,09  |
|             | rozprowadzanie    | 0,10              | 0,50        | 0,50        | 0,50  |
|             | wchłanianie       | 0,15              | 0,73        | 0,70        | 0,70  |
|             | kleistość         | 0,10              | 0,47        | 0,43        | 0,45  |
|             | tłustość          | 0,10              | 0,43        | 0,45        | 0,43  |
|             | natłuszczenie     | 0,15              | 0,75        | 0,75        | 0,75  |
|             | wygładzanie       | 0,20              | 0,97        | 0,97        | 0,93  |
| <i>Suma</i> | <i>1,00</i>       | <i>4,83</i>       | <i>4,78</i> | <i>4,75</i> |       |

Źródło: badania własne, n=6



Wykres 26 Profil sensoryczny emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem 3,5-dihydroksybenzoesu tetradecylu w stężeniach: 0,01%, 0,10% i 1,00%  
Źródło: badania własne

## 5.2. Badanie stabilności fizycznej emulsji kosmetycznych

Emulsje kosmetyczne zawierające dodatek: ferulanu tetradecylu, galusanu tetradecylu i 3,5-dihydroksybenzoesu tetradecylu w stężeniach: 1,00%, 0,10% i 0,01% zostały poddane testom na stabilność fizyczną w podwyższonej i obniżonej temperaturze.

Wszystkie preparaty poddane wpływowi obniżonej temperatury zachowały niezmienną strukturę w porównaniu z emulsjami przechowywanymi w temperaturze pokojowej. Ocena organoleptyczna wykazała, że po 24-godzinnym chłodzeniu emulsje te charakteryzowały się odpowiednią jednorodnością, gładką i jednolitą masą oraz brakiem grudek.

Podobne obserwacje poczyniono w przypadku emulsji inkubowanych przez 24 godz. w temperaturze 30°C. Każdy z badanych preparatów charakteryzował się odpowiednią jednorodnością. Emulsje były gładkie, o jednolitej masie i pozbawione grudek. Emulsja zawierająca dodatek galusanu tetradecylu o stężeniu 1,00% charakteryzowała się jednak nieco większą spójnością i gęstością w porównaniu z pozostałymi preparatami.

### 5.3. Ocena właściwości przeciwrodnikowych długłańcuchowych estrów kwasów fenolowych w emulsjach kosmetycznych typu O/W

Aktywność przeciwrodnikową długłańcuchowych estrów kwasów fenolowych w emulsjach kosmetycznych oznaczono w teście z rodnikiem DPPH<sup>•</sup>.

Zdolność otrzymanych estrów do wygaszania rodnika DPPH<sup>•</sup> wyrażono jako parametr IC<sub>50</sub>, czyli stężenie przeciwutleniacza potrzebne do obniżenia początkowego stężenia DPPH<sup>•</sup> o 50%. Im niższe wartości przyjmuje ten parametr tym wyższą aktywność przeciwutleniającą wykazuje dana substancja.

Przeprowadzone obserwacje wykazały brak wyraźnej zdolności estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego i emulsji kontrolnej (bez dodatku estru) do wygaszania rodnika DPPH<sup>•</sup>. Najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazały estry kwasu galusowego. Wyznaczone wartości parametru IC<sub>50</sub> tych związków nie różniły się od siebie istotnie. Wyniki testu z rodnikiem DPPH<sup>•</sup> częściowo potwierdziły zatem rezultaty badań przechowalniczych, w trakcie których estry kwasu galusowego wykazały największe zdolności do hamowania procesu utleniania oleju z pestek winogron. Nie zaobserwowano natomiast wpływu długości łańcucha węglowodorowego na właściwości przeciwrodnikowe galusanów, co mogło wynikać z odmiennego charakteru oddziaływań występujących w wymienionych układach. Uzyskane wyniki wskazują na to, że wystąpienie wspomnianej zależności w trakcie badań przechowalniczych mogło wynikać z paradoksu polarności Portera.

Dużo niższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się estry kwasu ferulowego. Największymi zdolnościami do wygaszania rodnika DPPH<sup>•</sup> spośród nich charakteryzował się ferulan tetradecylu. Wartość parametru IC<sub>50</sub> tego estru wynosiła 19,33 µg/ml. Stężenie ferulanu heksadecylu niezbędne do wygaszenia 50% rodników DPPH<sup>•</sup> wynosiło natomiast 29,80 µg/ml. Najniższe właściwości przeciwutleniające wykazał ferulan oktadecylu (IC<sub>50</sub> = 32,30 µg/ml).

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że długłańcuchowe estry kwasów ferulowego i galusowego są składnikami zachowującymi trwałość w układach emulsyjnych. Związki te prawdopodobnie nie ulegają reakcjom i interakcjom z innymi składnikami emulsji, dzięki czemu mogą zachowywać swoją aktywność przeciwrodnikową. Uzyskane w teście z rodnikiem DPPH<sup>•</sup> wyniki dodatkowo wskazują zatem na możliwość zastosowania badanych estrów w roli przeciwutleniaczy stabilizujących emulsje kosmetyczne.



Wyniki testu z rodnikiem DPPH<sup>•</sup> są porównywalne z rezultatami badań przechowalniczych.

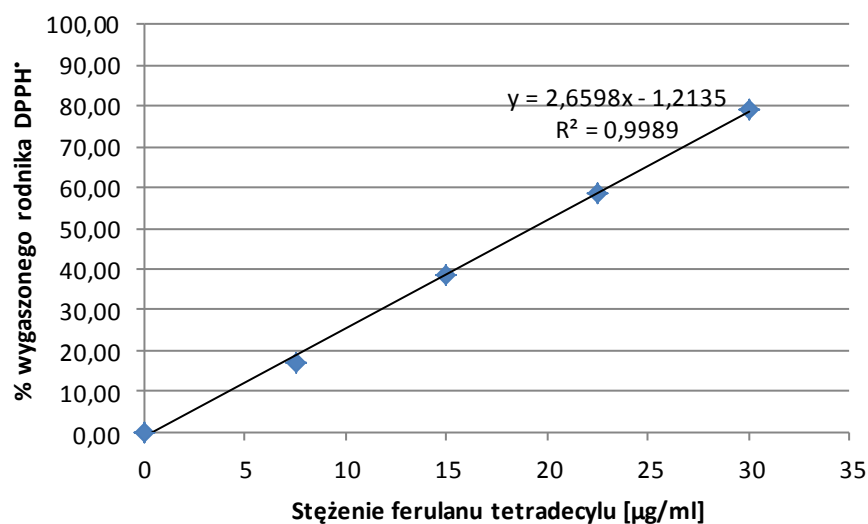
Tabela 34 Aktywność przeciwutleniająca długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych wyrażona wartością IC<sub>50</sub>

| Związek | IC <sub>50</sub><br>[μg/ml] |
|---------|-----------------------------|
| FT      | 19,33 <sub>a</sub> ± 0,15   |
| FH      | 29,80 <sub>b</sub> ± 0,14   |
| FO      | 32,30 <sub>c</sub> ± 0,95   |
| GT      | 6,23 <sub>d</sub> ± 0,23    |
| GH      | 6,40 <sub>d</sub> ± 0,20    |
| GO      | 6,63 <sub>d</sub> ± 0,21    |

n=3

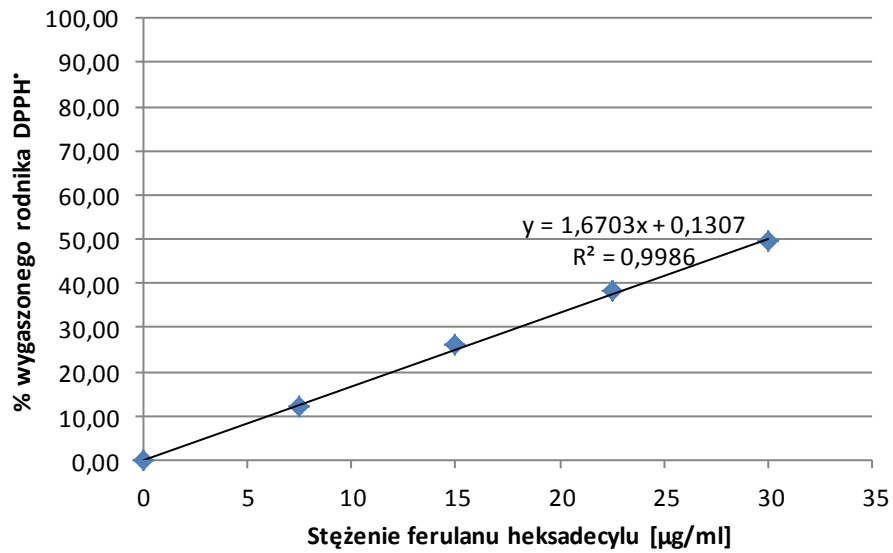
a, b, c... - średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie między wierszami (p<0,05)

Źródło: badania własne

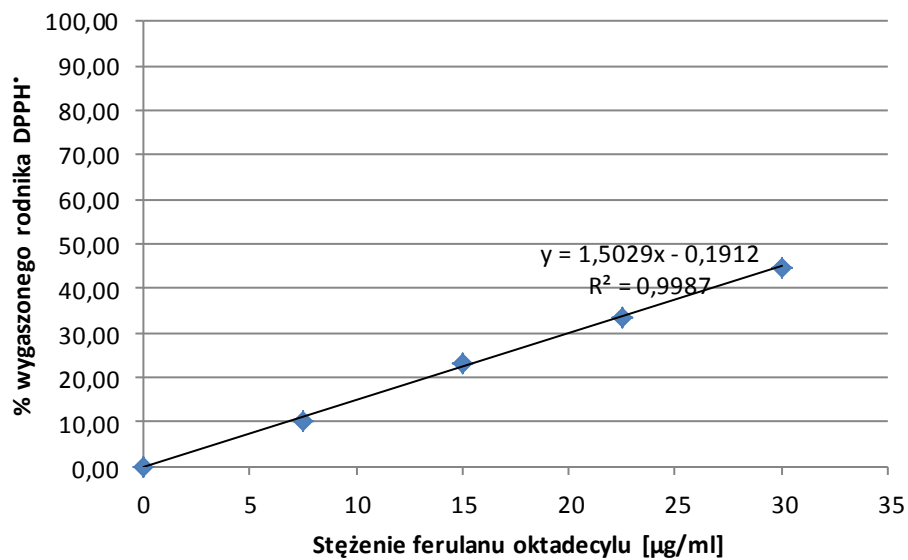


Wykres 27 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH<sup>•</sup> od stężenia ferulanu tetradecylu

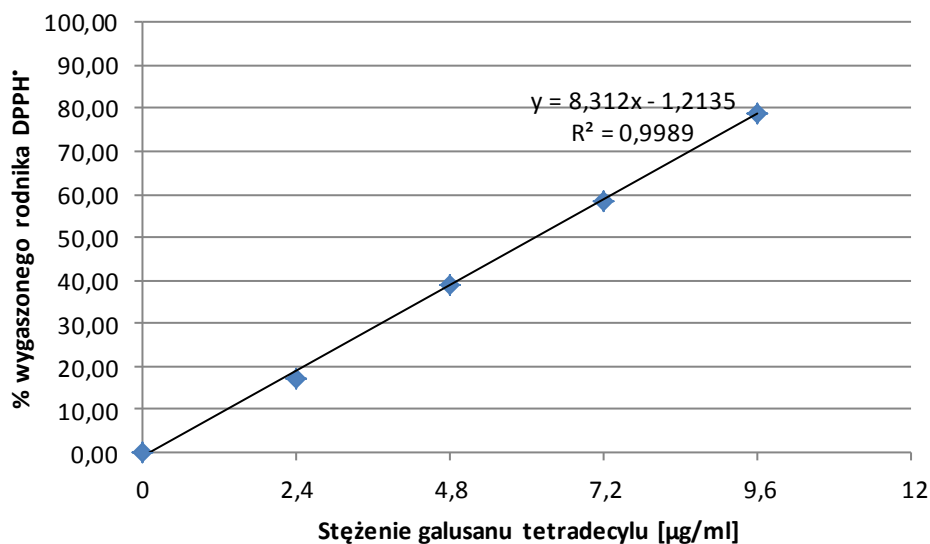
Źródło: badania własne



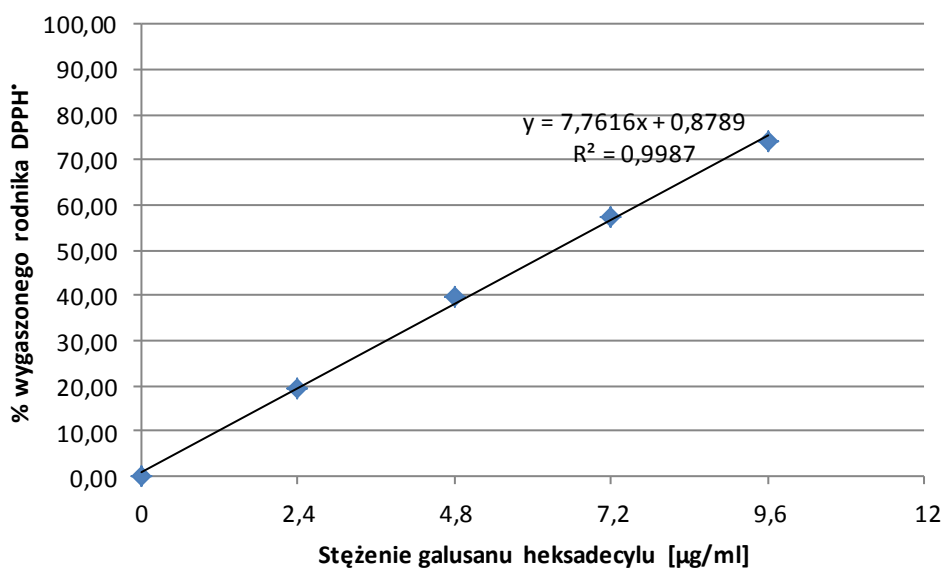
Wykres 28 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH\* od stężenia ferulanu heksadecylu  
Źródło: badania własne



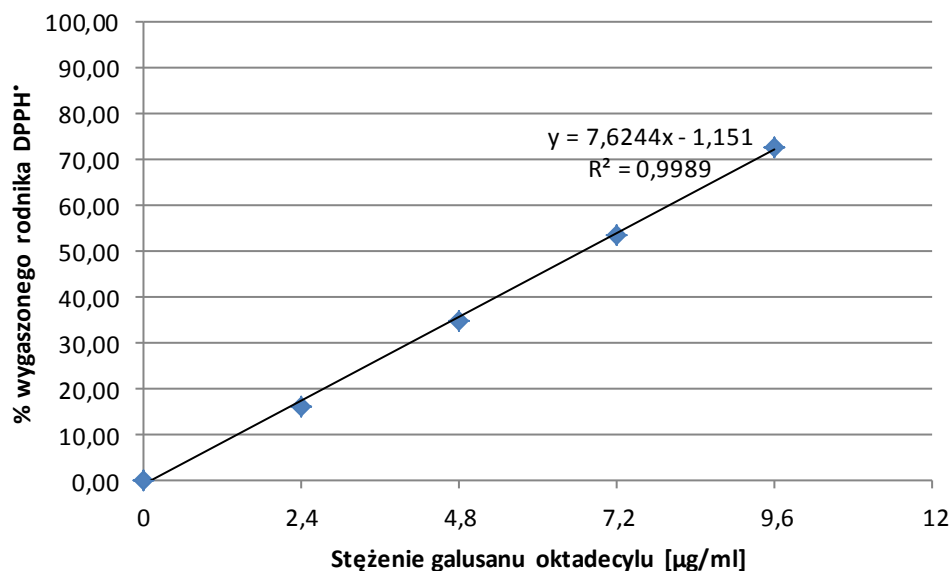
Wykres 29 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH\* od stężenia ferulanu oktadecylu  
Źródło: badania własne



Wykres 30 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH' od stężenia galusanu tetradecylu  
Źródło: badania własne



Wykres 31 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH' od stężenia galusanu heksadecylu  
Źródło: badania własne



Wykres 32 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH\* od stężenia galusanu oktadecylu  
Źródło: badania własne

#### 5.4. Korneometryczna ocena stopnia nawilżenia naskórka po jednorazowej aplikacji emulsji kosmetycznych

Skóra jest podstawową barierą pomiędzy środowiskiem zewnętrznym i wewnętrznym organizmu. Ze względu na unikalną strukturę, stanowi ona ochronę przed przenikaniem szkodliwych substancji i patogenów do jej wnętrza. Niestety, w wyniku oddziaływania różnych czynników egzo- i endogennych skład chemiczny skóry i płaszcz wodno-lipidowy może ulegać modyfikacjom, prowadzącym do utraty jej właściwości ochronnych oraz zwiększenia przesnaskórkowej utraty wody.

Woda zawarta w skórze może przyjmować dwa stany. Pierwszy z nich to woda ulegająca migracji, czyli przemieszczająca się w obrębie warstwy rogowej (*Stratum corneum*), natomiast druga, nieulegająca migracji jest silnie związana z cząsteczkami biologicznymi. Poziom nawilżenia skóry zależy od wielu czynników, spośród których najważniejsze to [Martyna i in. 2011]:

- równowaga między dyfuzją a wyparowaniem,
- wartość przepływu,
- zdolność zatrzymania wody przez warstwę rogową.

W wyniku zaburzenia równowagi pomiędzy dyfuzją wody a jej wyparowaniem następuje wysuszenie skóry. Suchość skóry objawia się zmniejszoną elastycznością, szorstkością, łuszczeniem oraz zwiększoną podatnością na pęknięcia i podrażnienia, którym towarzyszy uczucie pieczenia i nasilonego świądu. Z tego powodu bardzo istotną kwestią jest stosowanie preparatów o działaniu nawilżającym.

Rolą powszechnie stosowanych składników o działaniu nawilżającym jest stworzenie na skórze hydrofilowego filmu dostarczającego wodę do głębszych warstw naskórka. Inne składniki preparatów kosmetycznych o działaniu nawilżającym są odpowiedzialne za zapobieganie utracie wody przez skórę. Rozróżnia się trzy grupy składników nawilżających [Martyna i in. 2011]:

- składniki hydrofilowe wiążące wodę – działające na powierzchni naskórka i/lub w wierzchnich warstwach naskórka,
- składniki hydrofobowe o działaniu okluzyjnym,
- składniki działające modyfikująco na barierę ochronną skóry (cholesterol, ceramidy, kwasy tłuszczowe)

Według innego podziału substancje nawilżające, są klasyfikowane na substancje:

- błonotwórcze hydrofobowe,
- błonotwórcze hydrofilowe,
- higroskopijne,
- składniki cementu międzykomórkowego.

Przeprowadzone badania umożliwiły określenie wpływu obecności długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych w próbkach emulsji na ich właściwości nawilżające. Do badań wykorzystano emulsje kosmetyczne zawierające dodatek ferulanu tetradecylu, galusanu tetradecylu i 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu w stężeniach:

- 0,01%,
- 0,10%,
- 1,00%

#### **5.4.1. Korneometryczna ocena stopnia nawilżenia naskórka po jednorazowej aplikacji emulsji kosmetycznych zawierających dodatek ferulanu tetradecylu**

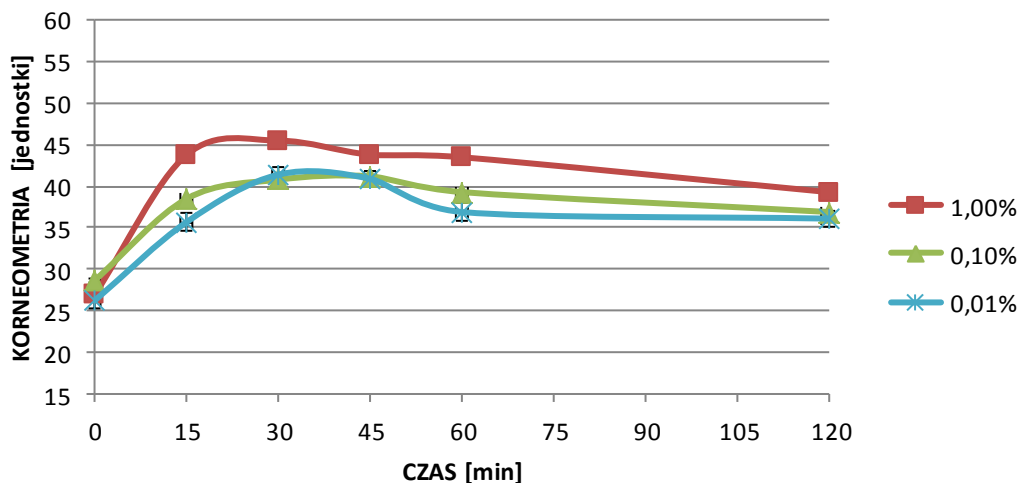
Pomiar korneometryczny stopnia nawilżenia warstwy rogowej naskórka przed aplikacją poszczególnych emulsji kształtował się w zakresie od  $26,3 \pm 0,30$  jednostek korneometrycznych (j.k.) do  $28,7 \pm 0,20$  j. k. Były to wartości charakterystyczne dla skóry suchej.

Zależność stopnia nawilżenia skóry od czasu dla emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem ferulanu tetradecylu została przedstawiona na wykresie 33.

Po jednorazowym zastosowaniu emulsji zawierających dodatek ferulanu tetradecylu już po 15 minutach po aplikacji wartości korneometrii gwałtownie wzrosły w porównaniu ze stanem wyjściowym. Największym nawilżeniem charakteryzowała się warstwa rogowa naskórka, na którą naniesiono emulsję wzbogaconą o 1,00% ferulanu tetradecylu ( $43,8 \pm 0,5$  j. k.), natomiast najniższym warstwa potraktowana preparatem zawierającym 0,01% tego estru ( $35,7 \pm 0,23$  j. k.). Maksymalne nawilżenie po zastosowaniu wymienionych emulsji zaobserwowano po 30 minutach po aplikacji. Wartość korneometrii w pierwszym przypadku (1,00% FT) wynosiła  $45,5 \pm 0,05$  j. k., natomiast w drugim (0,01% FT)  $41,4 \pm 0,26$  j. k. W następnych godzinach zanotowano powolny spadek nawilżenia wspomnianych fragmentów skóry przedramienia. Maksimum nawilżenia naskórka poddanego wpływowi emulsji zawierającej 0,10% ferulanu tetradecylu nastąpił po upływie 45 min od aplikacji, a wartość korneometrii wynosiła w tym przypadku  $41,2 \pm 0,34$  j. k.

Uzyskane wyniki wskazują na wyraźny korzystny wpływ dodatku ferulanu tetradecylu na właściwości nawilżające badanych emulsji. Ester ten jest substancją rozpuszczalną w tłuszczach, co stanowi podstawę do stwierdzenia, że mogą one pełnić rolę hydrofobowej substancji błonotwórczej. Składniki te zmniejszają odparowywanie wody przez efekt okluzyjny, tworząc cienką warstewkę na powierzchni skóry. Do tej grupy składników zalicza się również węglowodory, woski, alkohole tłuszczowe i estry kwasów tłuszczowych.

Zastosowanie ferulanu tetradecylu w dobrym stopniu uzupełniało działanie gliceryny, będącej niskocząsteczkowym składnikiem nawilżającym, wykazującym zdolność do wiązania wody na powierzchni skóry i w warstwie rogowej naskórka.



Wykres 33 Zależność stopnia nawilżenia skóry od czasu dla emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem ferulanu tetradecylu  
Źródło: badania własne, n=5

#### 5.4.2. Korneometryczna ocena stopnia nawilżenia naskórka po jednorazowej aplikacji emulsji kosmetycznych zawierających dodatek galusanu tetradecylu

W celu sprawdzenia wpływu obecności galusanu tetradecylu na właściwości nawilżające emulsji kosmetycznych typu O/W dokonano korneometrycznego pomiaru stopnia nawilżenia warstwy rogowej naskórka przed i po aplikacji preparatów zawierających dodatek 0,01%, 0,10% i 1,00% tego składnika.

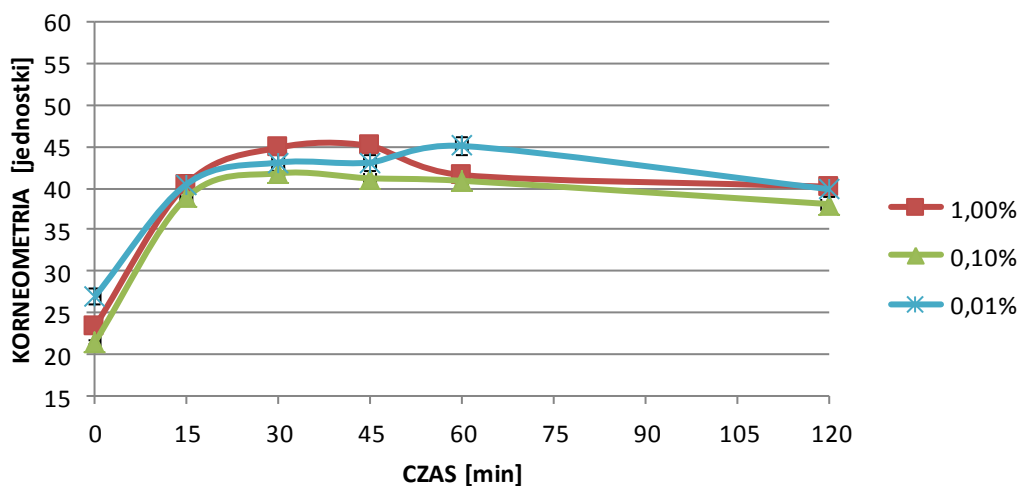
Zależność stopnia nawilżenia skóry od czasu dla emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem galusanu tetradecylu została przedstawiona na wykresie 34.

Pomiar korneometryczny stopnia nawilżenia warstwy rogowej naskórka przed aplikacją poszczególnych emulsji kształtował się w zakresie od  $23,4 \pm 0,20$  jednostek korneometrycznych (j. k.) do  $27,0 \pm 0,17$  j. k.

Po jednorazowym zastosowaniu emulsji zawierających dodatek galusanu tetradecylu już po 15 minutach po aplikacji wartości korneometrii gwałtownie wzrosły w porównaniu ze stanem wyjściowym osiągając maksimum nawilżenia po 30 min w przypadku emulsji wzbogaconych o 0,1% i 1,0% estru i po 60 min w przypadku emulsji zawierających 0,01% tego składnika. Największym nawilżeniem charakteryzowały się fragmenty skóry przedramienia, na które naniesiono emulsje wzbogacone o 1,00% i 0,01% galusanu tetradecylu ( $45,1 \pm 0,4$  j. k.), natomiast najniższym warstwa potraktowana preparatem

zawierającym 0,10% tego estru ( $41,8 \pm 0,55$  j.k.). W następnych godzinach zanotowano powolny spadek nawilżenia badanych partii naskórka.

Uzyskane wyniki wskazują na brak wyraźnego wpływu dodatku galusanu tetradecylu na właściwości nawilżające zastosowanych emulsji kosmetycznych typu O/W.



Wykres 34 Zależność stopnia nawilżenia skóry od czasu dla emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem galusanu tetradecylu  
Źródło: badania własne, n=5

#### 5.4.3. Korneometryczna ocena stopnia nawilżenia naskórka po jednorazowej aplikacji emulsji kosmetycznych zawierających dodatek 3,5-dihydroksybenzoesu tetradecylu

Pomiar korneometryczny stopnia nawilżenia warstwy rogowej naskórka przed aplikacją emulsji zawierających 1,00%, 0,10% i 0,01% 3,5-dihydroksybenzoesu tetradecylu kształtował się w zakresie od  $31,3 \pm 0,46$  jednostek korneometrycznych (j. k.) do  $34,8 \pm 0,17$  j. k.

Zależność stopnia nawilżenia skóry od czasu dla emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem galusanu tetradecylu została przedstawiona na wykresie 35.

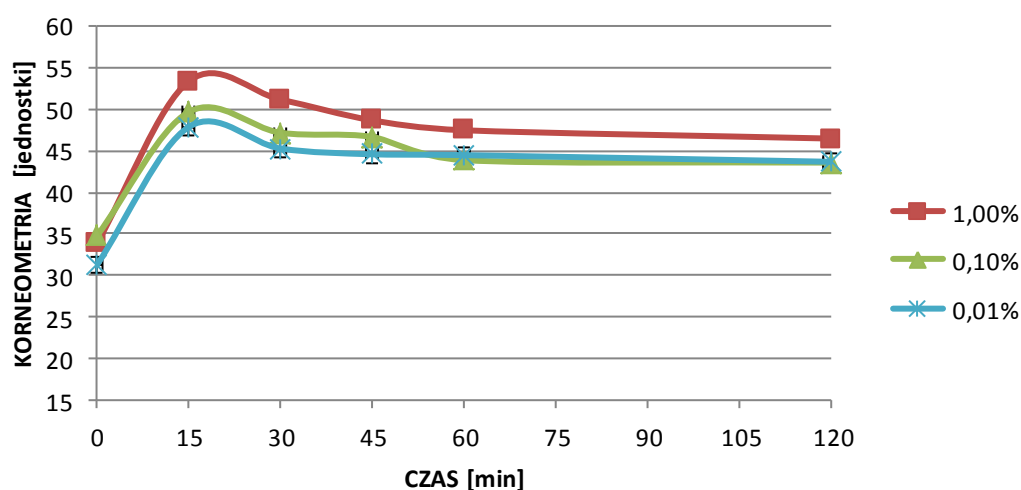
Po jednorazowym zastosowaniu emulsji zawierających dodatek 3,5-dihydroksybenzoesu tetradecylu już po 15 minutach po aplikacji wartości korneometrii gwałtownie wzrosły w porównaniu ze stanem wyjściowym osiągając tym samym maksimum nawilżenia. Największym nawilżeniem charakteryzowała się warstwa rogowa naskórka, na



którą naniesiono emulsję wzbogaconą o 1,00% 3,5-dihydroksybenzoesu tetradecylu ( $53,4 \pm 0,15$  j. k.), natomiast najniższym warstwa potraktowana preparatem zawierającym 0,01% tego estru ( $47,9 \pm 0,72$  j. k.). W następnych godzinach zaobserwowano powolny spadek nawilżenia badanych partii naskórka.

Podobnie jak w przypadku ferulanu tetradecylu, dodatek 3,5-dihydroksybenzoesu tetradecylu do fazy tłuszczowej emulsji kosmetycznych wpływał pozytywnie na funkcjonowanie bariery lipidowej powstającej na skórze po aplikacji preparatu, powodując tym samym zatrzymanie wody wewnątrz warstwy rogowej naskórka.

Warto również zwrócić uwagę, że podczas przeprowadzonych badań nie zaobserwowano pojawienia się żadnych objawów alergii bądź nietolerancji po aplikacji wszystkich sporządzonych emulsji.



Wykres 35 Zależność stopnia nawilżenia skóry od czasu dla emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem 3,5-dihydroksybenzoesu tetradecylu  
Źródło: badania własne, n=5

## PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Celem przedstawionej rozprawy było otrzymanie nowych długołańcuchowych estrów wybranych kwasów fenolowych oraz ocena ich właściwości jako wielofunkcyjnych składników determinujących jakość surowców i produktów kosmetycznych.

W części literaturowej pracy zawarto informacje dotyczące kwasów fenolowych i ich dotychczas poznanych pochodnych. W następnej kolejności opisano tłuszcze jako podstawowe surowce kosmetyczne. Nawiązano również do niekorzystnych przemian zachodzących z ich udziałem, powodujących znaczne obniżenie jakości surowców i produktów bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe. Dalsze fragmenty stanowią towaroznawczą charakterystykę powszechnie stosowanych przeciwutleniaczy oraz przedstawiają kontrowersje związane ze stosowaniem przeciwutleniaczy syntetycznych. Przegląd dostępnej literatury obejmował również aktualne zagadnienia dotyczące wymagań jakościowych stawianych preparatom kosmetycznym.

W trakcie przeprowadzonych badań otrzymano dziewięć estrów kwasów fenolowych. Były to estry kwasów: ferulowego, galusowego i 3,5-dihydroksybenzoesowego i alkoholi: tetra-, heksa- i oktadecylowego. Struktury otrzymanych związków potwierdzono podstawie badań spektroskopowych i analizy elementarnej. Przeprowadzono również badania podstawowych właściwości fizyko-chemicznych otrzymanych estrów.

Wykazano także, że otrzymane związki wykazują właściwości przeciwutleniające. W teście z rodnikiem DPPH<sup>•</sup> potwierdzono zdolność estrów kwasu ferulowego i galusowego do zmiatania wolnych rodników, dzięki czemu związkom tym można przypisać rolę przeciwutleniaczy pierwotnych w ochronie surowców tłuszczowych i emulsji kosmetycznych przed zmianami oksydacyjnymi.

Wartości współczynnika ochronnego, wyznaczone na podstawie badań przechowalniczych próbek oleju z pestek winogron zawierających dodatek otrzymanych estrów wskazują, że wszystkie poddane badaniu długołańcuchowe estry kwasów fenolowych wykazują właściwości przeciwutleniające.

Estry kwasu galusowego ujawniły największe zdolności do hamowania procesów utleniania spośród wszystkich badanych związków. Przy niższym stężeniu przeciwutleniaczy w próbkach (4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$ ) wartości współczynnika ochronnego estrów kwasu galusowego wyraźnie przewyższały wartości wyznaczone dla BHT.

Przy stężeniu 450  $\mu\text{moli}/100\text{ g}$  efekt ochronny działania galusanów był zróżnicowany, jednak ich wartości współczynnika ochronnego znacznie przewyższały wartości wyznaczone dla pozostałych estrów. Galusan tetradecylu okazał się najskuteczniejszym przeciwutleniaczem spośród wszystkich badanych związków.

Długołańcuchowe estry kwasu ferulowego zastosowane w stężeniu 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  wykazywały umiarkowane właściwości przeciwutleniające. Zmiany oksydacyjne w próbkach zawierających te związki przebiegały jednak podobnie jak w próbce stabilizowanej BHT.

Wyniki te umożliwiły zatem pozytywne zweryfikowanie hipotezy I, która zakładała, że długołańcuchowe estry kwasów fenolowych wykazują porównywalne z BHT właściwości ochronne w odniesieniu do surowców tłuszczowych. Na tej podstawie można wnioskować, że estry kwasów ferulowego i galusowego mogłyby z powodzeniem zastąpić kontrowersyjny przeciwutleniacz BHT w surowcach i wyrobach kosmetycznych.

W trakcie badań przechowalniczych zaobserwowano również wpływ stężenia na ochronne działanie przeciwutleniające otrzymanych surowców. Zwiększenie stężenia estrów kwasu ferulowego do 450  $\mu\text{moli}/100\text{ g}$  powodowało obniżenie ich zdolności do hamowania procesów utleniania a nawet doprowadziło do ujawnienia właściwości proutleniających. Wzrost zawartości estrów kwasu galusowego w badanych próbkach oleju wpływał natomiast pozytywnie na skuteczność ich działania ochronnego wobec nienasyconych kwasów tłuszczowych. Wspomniana zależność stanowi potwierdzenie hipotezy II.

Analiza termogravimetryczna związków wykazała natomiast, że wszystkie spośród badanych estrów charakteryzowały się wysoką stabilnością termiczną, co wskazuje na możliwość przypisania im właściwości „carry through”.

Największą odpornością na oddziaływanie wysokich temperatur charakteryzowały się ferulan tetradecylu (FT) i ferulan heksadecylu (FH). Początkowy i zarazem największy ubytek masy tych związków wynikający z ich termicznego rozkładu nastąpił powyżej 265°C. W przypadku ferulanu oktadecylu temperatura ta wynosiła 260°C. Związki te wykazują zatem stabilność termiczną porównywalną z powszechnie wykorzystywanymi przeciwutleniaczami syntetycznymi BHA i BHT (hipoteza IV), które ulegają rozkładowi termicznemu po przekroczeniu 250°C [Santos i in. 2012].

Nieco niższą temperaturą, przy której następował proces termicznego rozkładu charakteryzowały się estry kwasu galusowego i 3,5-dihydroksybenzoesowego. Temperatury te były jednak na tyle wysokie, że istnieje prawdopodobieństwo przeniesienia ich właściwości przeciwutleniających do produktów gotowych.

Przeprowadzone w pracy badania wskazują również na występowanie dodatkowych właściwości otrzymanych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych, które mogą wywierać pozytywny wpływ na trwałość i cechy użytkowe preparatów kosmetycznych.

Wartości HLB otrzymanych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych, wyznaczone na podstawie metody opracowanej przez McGowana, umożliwiły powiązanie budowy hydrofilowo-lipofilowej cząsteczek surfaktantów z ich właściwościami użytkowymi. Uzyskane wyniki wskazują, że ferulan heksadecylu (FH), ferulan oktadecylu (FO) i 3,5-dihydroksybenzoesan oktadecylu (3,5-DO) wykazują wyłącznie właściwości hydrofobowe ( $HLB_M < 1$ ). Ferulan tetradecylu (FT), galusan oktadecylu (GO), 3,5-dihydroksybenzoesan tetradecylu (3,5-DT) i 3,5-dihydroksybenzoesan heksadecylu (3,5-DH) mogą pełnić funkcję środków antypieniących, natomiast galusan tetradecylu (GT) i galusan heksadecylu (GH) mogą być wykorzystywane jako emulgatory typu W/O.

Badanie stabilności fizycznej emulsji typu O/W zawierających dodatek wybranych estrów również potwierdziło wpływ galusanu tetradecylu na spójność i jednorodność emulsji poddanych wpływowi wysokich i niskich temperatur. Uzyskane informacje są bardzo istotne, ponieważ wskazują na możliwość zastosowania tego surowca zarówno w roli przeciwutleniacza oraz emulgatora typu W/O.

Wstępna ocena właściwości promieniochronnych ujawniła, że wszystkie spośród badanych estrów wykazują zdolność do pochłaniania promieniowania w zakresie UVB, dzięki czemu mogą zapobiegać powstawaniu rumienia spowodowanego nadmierną ekspozycją na promieniowanie słoneczne (hipoteza III).

Najbardziej kompleksową ochronę skóry mogą zapewnić estry kwasu ferulowego. Związki te w dobrym stopniu absorbują promieniowanie UVA, odpowiedzialne za powstawanie nowotworów oraz przyspieszanie procesów starzenia (hipoteza III). Połączenie stwierdzonych właściwości przeciwutleniających z właściwościami promienioochronnymi może być wykorzystane do ochrony tłuszczów roślinnych i faz olejowych w emulsjach, zawsze zawierających śladowe ilości pigmentów, przed utlenianiem fotosensybilizowanym.

Na podstawie wyników oceny stopnia nawilżenia naskórka po jednorazowej aplikacji emulsji kosmetycznych zawierających dodatek ferulanu tetradecylu, galusanu tetradecylu i 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu stwierdzono również pozytywny wpływ ferulanu tetradecylu i 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu na właściwości nawilżające preparatów kosmetycznych. Wspomniane estry w wyraźnym stopniu poprawiały stopień nawilżenia warstwy rogowej naskórka.

Na tej podstawie można stwierdzić, że szczególnie estry kwasu ferulowego mogą być rekomendowane do stosowania w preparatach kosmetycznych jako substancje o jednoczesnym działaniu przeciwutleniającym, promieniochronnym oraz nawilżającym. Surowce te nie powinny być jednak stosowane w preparatach przeznaczonych do mycia ze względu na właściwości anty-pieniące. Ważny jest również odpowiedni dobór stężenia estrów kwasu ferulowego w zależności od specyfiki stabilizowanego surowca lub produktu. Zbyt wysokie stężenie tych przeciwutleniaczy w surowcach bogatych w wielonienasycone kwasy tłuszczowe może skutkować utratą ich właściwości a nawet ujawnieniem właściwości proutleniających. Z kolei estry kwasu galusowego mogą być brane pod uwagę przy próbach zastąpienia BHT i innych syntetycznych przeciwutleniaczy w recepturach kosmetycznych. Ponadto, badane galusany mogą dodatkowo pełnić funkcję emulgatora W/O i korzystnie wpływać na stabilność emulsji w warunkach wysokich i niskich temperatur.

Estry kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego wykazują stosunkowo niewielkie właściwości przeciwutleniające. Mogą być jednak brane pod uwagę jako środki anty-pieniące i nawilżające.

Obecnie na mocy Decyzji Komisji z dn. 9. lutego 2006 r ustanawiającej wykaz i powszechne nazewnictwo składników stosowanych w wyrobach kosmetycznych, do ogólnego stosowania dopuszczone są nieliczne estry kwasów fenolowych. Zalicza się do nich salicylan metylu, salicylan tridecyłu, salicylan mirystylu, galusan propylu, galusan laurylu oraz parabeny. Wyniki podjętych i opisanych w niniejszej pracy badań zachęcają do zaproponowania długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych jako nowych, bezpiecznych i wielofunkcyjnych składników kształujących jakość produktów kosmetycznych. Najważniejsze użyteczne informacje o badanych estrach zostały zestawione w Tabeli 35.

Tabela 35 Wybrane właściwości otrzymanych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych

| Związek | Właściwości przeciwutleniające          |   |  | Właściwości użytkowe<br>na podstawie $HLB_M$ | Właściwości<br>promieniochronne | Stabilność<br>termiczna*<br>[°C] |
|---------|---|---|--|--|---------------------------------|----------------------------------|
|         | $WO_{4,5 \mu\text{mola}/100 \text{ g}}$ | $WO_{450 \mu\text{moli}/100 \text{ g}}$ | $IC_{50}$<br>[ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] |  |                                 |                                  |
| FT      | 1,7                                     | 1,2                                     | 19,33                                    | Środek anty-pieniący                         | UVB/UVA                         | 265                              |
| FH      | 1,6                                     | 1,6                                     | 29,8                                     | Właściwości hydrofobowe                      | UVB/UVA                         | 265                              |
| FO      | 1,7                                     | 1,2                                     | 32,3                                     | Właściwości hydrofobowe                      | UVB/UVA                         | 260                              |
| GT      | 2,0                                     | 3,8                                     | 6,23                                     | Emulgator typu W/O                           | UVB                             | 153                              |
| GH      | 1,8                                     | 3,0                                     | 6,40                                     | Emulgator typu W/O                           | UVB                             | 163                              |
| GO      | 1,7                                     | 2,1                                     | 6,63                                     | Środek anty-pieniący                         | UVB                             | 185                              |
| 3,5-DT  | 1,5                                     | 1,5                                     | -  | Środek anty-pieniący                         | UVB                             | 242                              |
| 3,5-DH  | 1,4                                     | 1,4                                     | -  | Środek anty-pieniący                         | UVB                             | 174                              |
| 3,5-DO  | 1,1                                     | 1,3                                     | -  | Właściwości hydrofobowe                      | UVB                             | 215                              |

\*wyrażona jako temperatura powyżej, której zaobserwowano pierwszy wyraźny ubytek masy próbki

Źródło: badania własne

## WNIOSKI

1. Wszystkie badane długołańcuchowe estry kwasów: ferulowego, galusowego i 3,5-dihydroksybenzoesowego charakteryzują się znacznie wyższą stabilnością termiczną niż wolne kwasy fenolowe. Związki te wykazują stabilność termiczną porównywalną z powszechnie wykorzystywanymi przeciwutleniaczami syntetycznymi BHA i BHT.
  - a) Najbardziej stabilnymi termicznie estrami kwasu ferulowego są ferulan tetradecylu i ferulan heksadecylu. Początkowy i zarazem największy ubytek masy tych związków wynikający z ich termicznego rozkładu występuje powyżej 265 °C.
  - b) Estry kwasu galusowego charakteryzują się nieco niższą stabilnością termiczną niż ferulany i BHT (250°C). Ich stabilność zwiększa się wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej. Galusan tetradecylu rozkłada się powyżej 153°C a galusan oktadecylu po przekroczeniu 185°C.
2. Wszystkie badane estry są związkami nierozpuszczalnymi w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczają się w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych i w olejach roślinnych.
3. Na podstawie wyników badań przechowalniczych stwierdzono, że stężenie zastosowanych długołańcuchowych estrów kwasów ferulowego i galusowego miało znaczny wpływ na ich właściwości przeciwutleniające w oleju z pestek winogron. Próbki oleju stabilizowane ferulanem tetradecylu i ferulanem oktadecylu w stężeniu 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  okazały się znacznie mniej podatne na procesy utleniania niż próbki zawierające 100-krotnie wyższe stężenie tych związków. Wyższe stężenie estrów kwasu galusowego wpływało natomiast pozytywnie na skuteczność ich działania ochronnego. Nie zaobserwowano jednak istotnego wpływu stężenia estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego na ich właściwości przeciwutleniające.
4. Zaobserwowano wpływ długości łańcucha węglowodorowego estrów kwasów galusowego i 3,5-dihydroksybenzoesowego na ich właściwości przeciwutleniające w oleju z pestek winogron. Wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowodorowego w cząsteczkach estrów, ich właściwości przeciwutleniające ulegały zmniejszeniu.
5. Estry kwasu ferulowego zastosowane w stężeniu 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  oraz estry kwasu galusowego zastosowane w stężeniach: 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  lub 450  $\mu\text{moli}/100\text{ g}$  mogą stanowić alternatywę dla kontrowersyjnego przeciwutleniacza syntetycznego BHT.

Wartości współczynników ochronnych wyznaczonych dla wymienionych estrów na podstawie badań przechowalniczych oleju z pestek winogron wzbogaconych o te związki były równe lub wyższe niż wartość tego parametru wyznaczona dla BHT (WO = 1,6 przy stężeniu 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  i WO=3,0 przy stężeniu 450  $\mu\text{moli}/100\text{ g}$ ). Jedynym estrem kwasu galusowego charakteryzującym się niższą wartością współczynnika ochronnego niż BHT przy stężeniu 450  $\mu\text{moli}/100\text{ g}$  był ferulan oktadecylu (WO=2,2)

6. Wartości HLB otrzymanych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych, wyznaczone na podstawie metody McGowana wskazują, że:
  - ferulan heksadecylu (FH), ferulan oktadecylu (FO) i 3,5-dihydroksybenzoesan oktadecylu (3,5-DO) wykazują właściwości hydrofobowe ( $\text{HLB}_M < 1$ ),
  - ferulan tetradecylu (FT), galusan oktadecylu (GO), 3,5-dihydroksybenzoesan tetradecylu (3,5-DT) i 3,5-dihydroksybenzoesan heksadecylu (3,5-DH) mogą pełnić funkcję środków anty-pieniących,
  - galusan tetradecylu (GT) i galusan heksadecylu (GH) mogą być wykorzystywane jako emulgatory typu W/O.
7. Wszystkie spośród badanych estrów wykazują zdolność do pochłaniania promieniowania w zakresie UVB. dzięki czemu jako składniki emulsji mogą częściowo zapobiegać powstawaniu rumienia spowodowanego nadmierną ekspozycją na promieniowanie słoneczne. Estry kwasu ferulowego absorbują promieniowanie UVA, którym przypisuje się odpowiedzialność za powstawanie nowotworów oraz przyspieszanie procesów starzenia, w stopniu porównywalnym ze stosowanymi obecnie w kosmetykach estrami kwasu cytrynowego.
8. Na podstawie wyników analizy sensorycznej stwierdzono, że emulsje kosmetyczne wzbogacone o 0,01%, 0,10% i 1,00% ferulanu tetradecylu, galusanu tetradecylu i 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu charakteryzowały się bardzo dobrą jakością. Oceny eksperckie preparatów różniły się tylko nieznacznie między sobą, co wskazuje na znikomy wpływ dodatku estrów na jakość sensoryczną preparatów kosmetycznych. Tym samym badane estry spełniają jedno z podstawowych wymagań stawianych przeciwutleniaczom stosowanym w kosmetykach i żywności.
9. Dodanie ferulanu tetradecylu i 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu do emulsji kosmetycznych typu O/W zwiększało ich właściwości nawilżające. W przeprowadzonych



badaniach nie zaobserwowano u probantów żadnych objawów nietolerancji tych składników.

## **SPIS RYSUNKÓW**

|  |    |
|--|----|
| Rysunek 1 Przykładowe struktury chemiczne wybranych związków fenolowych..... | 13 |
| Rysunek 2 Przykładowe struktury chemiczne wybranych kwasów fenolowych.....   | 14 |
| Rysunek 3 Mechanizm utleniania związków fenolowych .....                     | 19 |

## SPIS TABEL

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 Występowanie kwasów fenolowych w wybranych surowcach zielarskich .....  | 18 |
| Tabela 2 Kwasy fenolowe i ich alkilowe estry stosowane w preparatach kosmetycznych.....  | 29 |
| Tabela 3 Modyfikacje olejów roślinnych stosowanych w produkcji preparatów kosmetycznych .....  | 38 |
| Tabela 4 Maksymalne dopuszczalne poziomy BHT w środkach spożywczych zgodnie z dyrektywą nr 95/2/WE i maksymalny poziom wykorzystania BHT w środkach spożywczych ujęty w sprawozdaniach dotyczących oceny stopnia narażenia ..... | 51 |
| Tabela 5 Przewidywane narażenie na BHT dla trzech grup populacji na podstawie poziomu wykorzystania w środkach spożywczych ujętego w sprawozdaniach dotyczących oceny stopnia narażenia.....                                     | 53 |
| Tabela 6 Mikroorganizmy pojawiające się w wybranych preparatach kosmetycznych .....  | 61 |
| Tabela 7 Wymagania mikrobiologiczne dla preparatów kosmetycznych .....   | 62 |
| Tabela 8 Liczby hydratacji ( $n_h$ ) elementów strukturalnych uwzględnionych w przeprowadzonych obliczeniach .....   | 76 |
| Tabela 9 Objętości charakterystyczne ( $V_x$ ) atomów uwzględnionych w przeprowadzonych obliczeniach.....  | 76 |
| Tabela 10 Skład kwasów tłuszczowych oleju z pestek winogron .....  | 79 |
| Tabela 11 Kryteria oceny sensorycznej emulsji kosmetycznych zawierających długołańcuchowe estry kwasów fenolowych.....   | 86 |
| Tabela 12 Wydajności reakcji otrzymywania długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych .....   | 93 |
| Tabela 13 Wartości przesunięć chemicznych w widmie $^1\text{H}$ NMR ferulanu tetradecylu (FT) w odniesieniu do struktury związku.....  | 95 |
| Tabela 14 Wartości przesunięć chemicznych w widmie $^{13}\text{C}$ NMR ferulanu tetradecylu (FT) w odniesieniu do struktury związku.....   | 96 |
| Tabela 15 Wartości przesunięć chemicznych w widmie $^1\text{H}$ NMR galusanu tetradecylu (GT) w odniesieniu do struktury związku.....  | 98 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 16 Wartości przesunięć chemicznych w widmie $^{13}\text{C}$ NMR galusanu tetradecylu (GT) w odniesieniu do struktury związku.....                         | 99  |
| Tabela 17 Wartości przesunięć chemicznych w widmie $^1\text{H}$ NMR 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT) w odniesieniu do struktury związku.....        | 101 |
| Tabela 18 Wartości przesunięć chemicznych w widmie $^{13}\text{C}$ NMR 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT) w odniesieniu do struktury związku.....     | 102 |
| Tabela 19 Wyniki analizy elementarnej ferulanu tetradecylu .....   | 108 |
| Tabela 20 Wyniki analizy elementarnej 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu .....   | 109 |
| Tabela 21 Temperatura topnienia otrzymanych pochodnych kwasów: ferulowego, galusowego i 3,5-dihydroksybenzoesowego.....  | 110 |
| Tabela 22 Rozpuszczalność długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych w wybranych rozpuszczalnikach .....   | 117 |
| Tabela 23 Zależność pomiędzy właściwościami użytkowymi surfaktantów a wartością współczynnika HLB.....   | 118 |
| Tabela 24 Wyznaczone wartości $\text{HLB}_M$ długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych..  | 119 |
| Tabela 25 Klasyfikacja filtrów UV według metody BSRS.....  | 122 |
| Tabela 26 Wartości pól powierzchni pod krzywymi UV wyznaczone na podstawie widm UV-VIS .....   | 123 |
| Tabela 27 Wartości ilorazu UVA/UVB wyznaczone na podstawie widm UV-VIS długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych .....  | 123 |
| Tabela 28 Klasyfikacja związków promieniochronnych na podstawie krytycznej długości fali .....   | 124 |
| Tabela 29 Maksima absorpcji i krytyczne długości fali wyznaczone na podstawie widm UV-VIS .....  | 124 |
| Tabela 30 Wartości współczynnika ochronnego wyznaczone dla długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych.....   | 138 |
| Tabela 31 Wyniki oceny sensorycznej emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem ferulanu tetradecylu w stężeniach 0,01%, 0,10% i 1,00% metodą pięciopunktową..... | 140 |
| Tabela 32 Wyniki oceny sensorycznej emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem galusanu tetradecylu w stężeniach 0,01%, 0,10% i 1,00% metodą pięciopunktową..... | 141 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 33 Wyniki oceny sensorycznej emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem 3,5-dihydroksybenzoesu tetradecylu w stężeniach: 0,01%, 0,10% i 1,00% metodą pięciopunktową .....  | 142 |
| Tabela 34 Aktywność przeciwutleniająca długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych wyrażona wartością $IC_{50}$ .....  | 145 |
| Tabela 35 Wybrane właściwości otrzymanych długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych.....   | 158 |
| Tabela 36 Wpływ dodatku długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych i BHT w stężeniu 4,5 $\mu\text{mola}/100\text{ g}$ na zmiany zawartości nadtlenków w oleju z pestek winogron wyrażone jako $\text{mEqO}_2/\text{kg}$ (wartości średnie, $n=3$ )..... | 190 |
| Tabela 37 Wpływ dodatku długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych i BHT w stężeniu 450 $\mu\text{moli}/100\text{ g}$ na zmiany zawartości nadtlenków w oleju z pestek winogron wyrażone jako $\text{mEqO}_2/\text{kg}$ (wartości średnie, $n=3$ )..... | 191 |

## SPIS SCHEMATÓW

|  |    |
|--|----|
| Schemat 1 Klasyfikacja związków fenolowych .....                                 | 12 |
| Schemat 2 Biosynteza hydroksylowych pochodnych kwasu cynamonowego .....          | 16 |
| Schemat 3 Biosynteza kwasu galusowego .....                                      | 17 |
| Schemat 4 Schemat kancerogenezy .....  | 22 |
| Schemat 5 Wpływ nienasyconych kwasów tłuszczowych na organizm człowieka .....    | 35 |
| Schemat 6 Przeciwtleniacze stosowane do produkcji preparatów kosmetycznych ..... | 47 |
| Schemat 7 Reakcje otrzymywania długołańcuchowych kwasów tłuszczowych .....       | 71 |
| Schemat 8 Składniki sporządzonych emulsji kosmetycznych typu O/W .....           | 83 |
| Schemat 9 Etapy konstruowania skali oceniającej .....                            | 85 |

## SPIS WYKRESÓW

|  |     |
|--|-----|
| Wykres 1 Widmo $^1\text{H}$ NMR ferulanu tetradecylu (FT) .....  | 96  |
| Wykres 2 Widmo $^{13}\text{C}$ NMR ferulanu tetradecylu (FT) .....   | 97  |
| Wykres 3 Widmo $^1\text{H}$ NMR galusanu tetradecylu (GT) .....  | 99  |
| Wykres 4 Widmo $^{13}\text{C}$ NMR galusanu tetradecylu (GT) .....   | 100 |
| Wykres 5 Widmo $^1\text{H}$ NMR 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT) .....  | 102 |
| Wykres 6 Widmo $^{13}\text{C}$ NMR 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT) .....   | 103 |
| Wykres 7 Widmo podczerwieni (IR) ferulanu tetradecylu (FT) i alkoholu tetradecylowego<br>(AT).....   | 105 |
| Wykres 8 Widmo podczerwieni (IR) galusanu tetradecylu (GT) i alkoholu tetradecylowego<br>(AT).....   | 106 |
| Wykres 9 Widmo podczerwieni (IR) 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT) i<br>alkoholu tetradecylowego (AT) .....  | 107 |
| Wykres 10 Krzywe termograwimetryczne ferulanu tetradecylu (FT), ferulanu heksadecylu<br>(FH), ferulanu oktadecylu (FO) i kwasu ferulowego (KF) .....   | 112 |
| Wykres 11 Krzywe termograwimetryczne galusanu tetradecylu (GT),<br>galusanu heksadecylu (GH), galusanu oktadecylu (GO) i kwasu galusowego (KG) ....  | 114 |
| Wykres 12 Krzywe termograwimetryczne 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu (3,5-DT),<br>3,5-dihydroksybenzoesanu heksadecylu (3,5-DH), 3,5-dihydroksybenzoesanu oktadecylu<br>(3,5-DO) i kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego (K 3,5-D) ..... | 115 |
| Wykres 13 Widma UV-VIS estrów kwasu ferulowego .....   | 120 |
| Wykres 14 Widma UV-VIS estrów kwasu galusowego .....   | 121 |
| Wykres 15 Widma UV-VIS estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego.....  | 121 |
| Wykres 16 Wpływ dodatku estrów kwasu ferulowego w stężeniu 4,5 $\mu\text{mola}/100\text{ g}$<br>na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie, $n=3$ ) .....  | 127 |
| Wykres 17 Wpływ dodatku estrów kwasu ferulowego w stężeniu 450 $\mu\text{mola}/100\text{ g}$<br>na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie, $n=3$ ).....   | 128 |
| Wykres 18 Wartości liczby nadtlenkowej wyznaczone po 60 i 180 dniach przechowywania<br>dla próbek zawierających 4,5 $\mu\text{mola}/100\text{ g}$ przeciwutleniacza i próby kontrolnej .....   | 130 |

|   |     |
|---|-----|
| Wykres 19 Wpływ dodatku estrów kwasu galusowego w stężeniu 4,5 $\mu\text{mola}/100\text{ g}$ na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie, $n=3$ ).....               | 131 |
| Wykres 20 Wpływ dodatku estrów kwasu galusowego w stężeniu 450 $\mu\text{mola}/100\text{ g}$ na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie, $n=3$ ).....               | 132 |
| Wykres 21 Wpływ dodatku estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego w stężeniu 4,5 $\mu\text{mola}/100\text{ g}$ na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie, $n=3$ )... | 134 |
| Wykres 22 Wpływ dodatku estrów kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego w stężeniu 450 $\mu\text{mola}/100\text{ g}$ na przebieg utleniania oleju z pestek winogron (wartości średnie, $n=3$ )... | 135 |
| Wykres 23 Wartości współczynnika ochronnego wyznaczone dla długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych.....  | 137 |
| Wykres 24 Profil sensoryczny emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem ferulanu tetradecylu w stężeniach: 0,01%, 0,10% i 1,00% .....   | 141 |
| Wykres 25 Profil sensoryczny emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem galusanu tetradecylu w stężeniach 0,01%, 0,10% i 1,00% .....  | 142 |
| Wykres 26 Profil sensoryczny emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem 3,5-dihydroksybenzoesanu tetradecylu w stężeniach: 0,01%, 0,10% i 1,00%.....                                      | 143 |
| Wykres 27 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH <sup>*</sup> od stężenia ferulanu tetradecylu.....  | 145 |
| Wykres 28 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH <sup>*</sup> od stężenia ferulanu heksadecylu.....  | 146 |
| Wykres 29 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH <sup>*</sup> od stężenia ferulanu oktadecylu .....  | 146 |
| Wykres 30 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH <sup>*</sup> od stężenia galusanu tetradecylu .....   | 147 |
| Wykres 31 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH <sup>*</sup> od stężenia galusanu heksadecylu .....   | 147 |
| Wykres 32 Zależność procentowej wartości wygaszonego rodnika DPPH <sup>*</sup> od stężenia galusanu oktadecylu .....  | 148 |
| Wykres 33 Zależność stopnia nawilżenia skóry od czasu dla emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem ferulanu tetradecylu .....   | 151 |
| Wykres 34 Zależność stopnia nawilżenia skóry od czasu dla emulsji kosmetycznych typu O/W z dodatkiem galusanu tetradecylu .....   | 152 |



|   |     |
|---|-----|
| Wykres 35 Zależność stopnia nawilżenia skóry od czasu dla emulsji kosmetycznych typu o/w z dodatkiem 3,5-dihydroksybenzoesu tetradecylu ..... | 153 |
| Wykres 36 Widmo podczerwieni (IR) galusanu heksadecylu .....  | 192 |
| Wykres 37 Widmo podczerwieni (IR) galusanu oktadecylu.....  | 192 |
| Wykres 38 Widmo podczerwieni (IR) 3,5-dihydroksybenzoesu heksadecylu.....   | 193 |
| Wykres 39 Widmo podczerwieni (IR) 3,5-dihydroksybenzoesu oktadecylu .....   | 193 |

## LITERATURA

1. Abu Shaqra Q. M., Al-Groom R. M., 2012, *Microbiological quality of hair and skin care cosmetics manufactured in Jordan*, International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 69, s. 69-72
2. Aburjai T., Natsheh F. M., 2003, *Plants used in cosmetics*, Phytotherapy Research, Vol. 17, Iss. 9, s. 987–1000
3. Achramowicz K., Szary – Swost K., 2005, *Wielonienasycone kwasy tłuszczowe czynnikiem poprawy stanu zdrowia człowieka*, Żywność. Nauka. Technologia . Jakość, Vol. 44, No.3, s. 23 - 35
4. Andjelkovic M., Van Camp J., De Meulenaer B., Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo M., Verhe R., 2006, *Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups*. Food Chemistry Vol. 98, No. 1, s. 23–31
5. Anselmi C., Centini M., Andreassi M., Buonocore A, La Rosa C., Maffei Facino R., Segal A., Tsuno F., 2004, *Conformational analysis: a tool for the elucidation of the antioxidant properties of ferulic acid derivatives in membrane models*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Vol. 35, No. 5, s. 1241–1249
6. Anselmi C., Centini M., Granata P., Segal A, Buonocore A, Bernini A., Maffei Facino R., 2004, *Antioxidant activity of ferulic acid alkyl esters in a heterophasic system: a mechanistic insight.*, Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol. 52, No.21, s. 6425-6432
7. Bail S., Krist S., Masters E., Unterweger H., Buchbauer G., 2009, *Volatile compounds of shea butter samples made under different production conditions in western, central and eastern Africa*, Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 22, Iss. 7–8, s. 738-744
8. Bartnikowska E., Obiedziński M. W., Grześkiewicz S., 1999, *Rola i znaczenie żywieniowe sprzężonych dienów kwasu linolowego.*, Przemysł Spożywczy, Vol 7., s. 16 - 20
9. Bartnikowska E., 2007, *Rola oksysteroli w procesie miażdżycowym*, Żywnienie Człowieka i Metabolizm, XXXIV, Nr. ½, s.
10. Bartosz G., 2006, *Druga twarz tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, s. 62 – 64.

11. Bauer A. K., Dwyer-Nield L. D., Hankin J. A., Murphy R. C., Malkinson A. M., 2001, *The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice*, Toxicology Vol. 169, Iss. 1, s. 1–15
12. Behravan J., Bazzaz F. B. S., Malaekheh P., 2005, *Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran*, International Journal of Dermatology, Vol. 44, Iss. 6, s. 482–485
13. Benedet J. A., Shibamoto T., 2008, *Role of transition metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II) and Cd(II) in lipid peroxidation*, Food Chemistry Vol. 107, Iss. 1, s. 165–168
14. Bera D., Lahiri D., Nag A., 2006, *Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants*. Journal of Food Engineering Vol. 74, s. 542–545
15. Berlett B. S., Stadtman E. R., 1997, *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress*, The Journal Of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 33, s. 20313–20316
16. Bickers D. R., Athar M., 2010, *Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease*, Journal of Investigative Dermatology, Vol. 126, s. 2565 – 2575.
17. Bojanowicz H., Woźniak B., 2008, *Wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz ich wpływ na skórę*, Problemy Higieny i Epidemiologii vol. 89, no. 4, s. 471-475
18. Bomhard E. M., Bremmer J. N., Herbold B. A., 1992, *Review of the mutagenicity/genotoxicity of butylated hydroxytoluene*, Mutation Research Vol. 277, s. 187-200
19. Borusiakowski Z., Kostrzewa A., 1969, *Jakość produkcji jako problem ekonomiczny*, Ekonomista, Nr. 3, s. 757
20. Bove W. P., Logan A. C., 2010, *Clinical implications of lipid peroxidation in acne vulgaris: old wine in new bottles*, Lipids in Health and Disease, Vol. 141, No. 9
21. Bravo L., 1998, *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*, Nutrition Reviews, Vol. 56, No. 11, s. 317 - 333
22. Burdock G. A., 1998, *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis)*, Food and Chemical Toxicology Vol. 36, No. 4, s. 347-363
23. Cardoso S. M., Pereira C., Oliveira C. R., 1999, *Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress*, Free Radical Biology & Medicine, Vol. 26, No. 1/2, s. 3–13,

24. Cichosz G., 2008, *Oleje roślinne a zagrożenie nowotworami*, Przegląd Mleczarski, Vol. 6, s. 4-12
25. Chaiyasit W., McClements D. J., Decker E. A., 2005, *The relationship between the physico-chemical properties of antioxidants and their ability to inhibit lipid oxidation in bulk oil and oil-in-water emulsions*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 53, No. 12, s. 4982–4988
26. Choksi K. B., Papaconstantinou J. 2008, *Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse heart mitochondrial electron transport chain complexes*, Free Radical Biology & Medicine, Vol. 44, Iss. 10, s. 1795–1805
27. Chong J., Poutaraud A., Huguency P., 2009, *Metabolism and roles of stilbenes in plants*, Plant Science, Vol. 177, No. 3, s. 143–155
28. Chu Y-F. , Sun J. , Wu X. , Liu R.H., 2002, *Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 50, No. 23, s. 6910–6916
29. Codex Alimentarius, 2001, *Codex standard for named vegetable oils CX-STAN 210 – 1999*, Vol. 8
30. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2002, *Final Report on the Safety Assessment of BHT*, International Journal of Toxicology, Vol. 21, No. 2, s. 19 – 94
31. Cuq J-L., Besancon P., Chartier L., Cheftel C., 2013, *Oxidation of methionine residues of food proteins and nutritional availability of protein-bound methionine sulphoxide*, Food Chemistry, Vol. 3, Iss. 2, s. 85-102
32. Cueva C, Moreno-Arribas M. V., Martin-Alvarez P.J., Bills G., Vicente M. F., Basilio A., Lopez Rivas C., Requena T., Rodriguez J. M., Bartolome B., 2010, *Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria*, Research in Microbiology, Vol. 161, No. 5, s. 372-382
33. Cuppett S, Schnepf M., Hall C., 1997, *Natural antioxidants – are they reality?*, w: F.Shahidi (ed.), *Natural Antioxidants, Chemistry, Health effects, and Applications*, AOCS Press, s. 12-25
34. Darbre P. D., Aljarrah A., Miller W. R., Coldham N. G., Sauer M. J., Pope G. S., 2004, *Concentrations of parabens in human breast tumours*, Journal of Applied Toxicology. Vol. 24, No. 1, 5–13

35. D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R., 2007, *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*, Ann Ist Super Sanita, Vol 43, No. 4, s. 348 - 361
36. Decyzja Komisji z dnia 9 lutego 2006 r zmieniająca decyzję 96/335/WE ustanawiającą wykaz i powszechne nazewnictwo składników stosowanych w produktach kosmetycznych, Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej 5.4.2006
37. Desjardins J. P., Beard S. E., Mapoles J. E., Gee P., Thompson J. A., 1998, *Transcriptional activity of quinone methides derived from the tumor promoter butylated hydroxytoluene in HepG2 cells*, Cancer Letters Vol. 131, No. 2, s. 201–207
38. Diffey B. L., Tanner P. R., Matts P. J., Nash J. F., 2000, *In vitro assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products*, Journal of American Academy of Dermatology, Vol. 43, No. 6, s. 1024 – 1035
39. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady nr 95/2/WE z dnia 20 lutego 1995 r. w sprawie dodatków do żywności innych niż barwniki i substancje słodzące
40. Dwyer-Nield L. D., Thompson J. A., Peljak G., Squier M. T., Barker T D., Parkinson A., Cohen J., Dinsdale D., Malkinson A. M., 1998, *Selective induction of apoptosis in mouse and human lung epithelial cell lines by the tert-butyl hydroxylated metabolite of butylated hydroxytoluene: a proposed role in tumor promotion*, Toxicology, Vol. 130, s. 115–127
41. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2012, *Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive*, EFSA Journal, Vol. 10, No. 3,
42. El-Seedi H. R., 2007, *New long-chained feruloyl ester from the bark of Cedrelinga catenaeformis.*, Chemistry of Natural Compounds, Vol. 43, No. 3, s. 256 – 258
43. Erkan N., Ayranci G., Ayranci E., 2008, *Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol*, Food Chemistry Vol. 110, Iss. 1, s. 76–82
44. Esfahlan A. J., Jamei R., Esfahlan R. J., 2010, *The importance of almond (Prunus amygdalus L.) and its by-products*, Food Chemistry Vol. 120, No. Iss. 2, s. 349–360
45. European Commission, Enterprise and Industry Directorate General, 2007, *Synthesis Document – Outcome of Public Consultation on the Draft Commission Recommendation on the Efficacy of Sunscreen Products and Claims Related Thereto*

46. Faine L. A., Rodrigues H. G., Galhardib C. M., Ebaida G. M., Diniza Y. S., Fernandes A. A. H., Novelli E. L. B., 2006, *Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress: Effects on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats*, *Experimental and Toxicologic Pathology* Vol. 57, Iss. 3, s. 221–226
47. FDA Department of Health and Human Service. Food and Drug Administration, 21 CFR Parts 347 and 352. *Sunscreen Drug Products for Over-the Counter Human Use, Proposed Amendment of Final Monograph, Proposed Rule, 2007*
48. Fernandes L., Casal S., Cruz R., Pereira J. A., Ramalhosa E., 2013, *Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties*, *Food Research International* Vol. 50, Iss. 1, s. 161–166
49. Fiebich B. L., Chrubasik S., 2004, *Effects of an ethanolic Salix extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro*, *Phytomedicine* Vol. 11, Iss. 2-3, s. 135–138
50. Fisk P. R., Wildey R. J., Girling A. E., Sanderson H., Belanger S. E., Veenstra G., Nielsen A., Kasai Y., Willing A., Dyer S. D., Stanton K., 2009, *Environmental properties of long chain alcohols. Part 1: Physicochemical, environmental fate and acute aquatic toxicity properties*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* Vol. 72, Iss. 4, s. 980–995
51. Fiuza S. M., Gomes C., Teixeira L. J., Girao da Cruz M. T., Cordeiro M. N. D. Milhazes S.N., Borges F., Marques M. P. M., 2004, *Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties— a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* Vol. 12, s. 3581–3589
52. Fujisawa S., Kadoma Y., Yoko I., 2004, *Radical-scavenging activity of butylated hydroxytoluene (BHT) and its metabolites*, *Chemistry and Physics of Lipids* Vol. 130, Iss. 2, s. 189–195
53. Gawlik – Dziki U., 2004, *Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności*. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, Vol. 4, No. 41, s. 29 – 40
54. Gertig H., Przysławski J., 2006, *Bromatologia. Zarys nauki o żywności i żywieniu*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, str. 65 – 106

55. Goodwin P. H., Hsiang T., Erickson L., 2000, *A comparison of stilbene and chalcone synthases including a new stilbene synthase gene from Vitis riparia cv. Gloire de Montpellier* Plant Science Vol. 151, No. 1, s. 1–8
56. Grajek W., 2007, *Przeciwutleniacze w żywności – aspekty zdrowotne , technologiczne, molekularne i analityczne*. Wydawnictwo Naukowo – Techniczne, Warszawa
57. Gromadzka J., Wardencki W., 2009, *Opracowanie procedury oznaczania lotnych produktów utlenienia olejów roślinnych techniką statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej*, Rośliny Oleiste, Tom XXX, s. 103 – 118
58. Guardiola F., Codony R., Addis P. B., Rafecas M, Boatella J., 1996, *Biological effects of oxysterols: Current status*, Food and Chemical Toxicology, Vol. 34, Iss. 2, s. 193-211
59. Guyton K. Z., Bhan P., Kuppusamy P., Zweier J. L., Trush M. A., Kensler T. W., 1991, *Free radical-derived quinone methide mediates skin tumor promotion by butylated hydroxytoluene hydroperoxide: Expanded role for electrophiles in multistage carcinogenesis*, Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America, Vol. 88, s. 946-950
60. Hall C., 2001, *Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources.*, in: *Antioxidants in food*, ed. Pokorny J, Yanishliewa H., Gordon M., CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D. C.
61. Han X., Shen T., Lou H., 2007, *Dietary polyphenols and their biological significance*. International Journal Of Molecular Sciences, Vol. 8, No. 9, s. 950-988
62. Heim K., Tagliaferro R., Bobilya D., 2002 *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*, Journal of Nutritional Biochemistry Vol. 13, No. 10, s. 572–584
63. Heś M., Korczak J., 2007, *Wpływ produktów utleniania lipidów na wartość odżywczą białka*, Nauka Przyroda Technologie, Vol. 1, No. 1, s. 1 – 15
64. Hidalgo F. J., Nogales F., Zamora R., 2008, *The role of amino phospholipids in the removal of the cito- and geno-toxic aldehydes produced during lipid oxidation*, Food and Chemical Toxicology Vol. 46, Iss. 1, s. 43–48

65. Hiona A., Leeuwenburgh C., 2008, *The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: Implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging*, Experimental Gerontology, Vol. 43, No. 1, s. 24–33.
66. Hojerová J., Medovčíková A., Mikula M., 2011, *Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight*, International Journal of Pharmaceutics Vol. 408, Iss. 1-2, s. 27–38
67. Hopps E., Noto D., Caimi G., Averna M. R., 2010, *A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress*, Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases, Vol. 20, Iss. 1, s. 72-77.
68. Horrobin D. F., 2000, *Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 71, No. 3, s. 367 - 372
69. Hsu F-L., Chen P-S., Chang H-T, Chang S-T., 2007, *Evaluation of antifungal properties of octyl gallate and its synergy with cinnamaldehyde*, Bioresource Technology Vol. 98, s. 734–738
70. Hsu F-L., Chen P-S., Chang H-T, Chang S-T., 2009, *Effects of alkyl chain length of gallates on their antifungal property and potency as an environmentally benign preservative against wood-decay fungi*. International Biodeterioration & Biodegradation Vol. 63, s. 543–547
71. Huang M - T., Smart R. C., Wong C-Q, Conney A. H., 1988, *Inhibitory Effect of Curcumin, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Ferulic Acid on Tumor Promotion in Mouse Skin by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate*. Cancer Research Vol. 48, No.1, s. 5941-5946
72. Hunneche C. S., Lund M. N., Skibsted L. H., Nielsen J., 2008, *Antioxidant activity of a combinatorial library of emulsifier – antioxidant bioconjugates*, Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol. 56, No 19, s. 9258 - 9268
73. Jabłońska-Trypuć A., Czerpak R., 2008, *Surowce kosmetyczne i ich składniki. Część teoretyczna i ćwiczenia laboratoryjne*. MedPharm Polska, Wrocław
74. Jacobsen C., 2000, *Sensory impact of lipid oxidation in complex food systems*, Lipid/Fett Vol. 101, Iss. 12, s. 484 - 495
75. Jadhav S. J., Nimbalkar S. S., Kulkarni A. D., Madhavi D. L., 1996, *Lipid oxidation in biological and food systems*, in: *Food antioxidants. Technological, toxicological and*



- health perspectives*, ed. Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K., Marcel Dekker Inc, s. 5 - 65
76. Jayaprakasam B., Vanisree M., Zhang Y., Dewitt D. L., Nair M. G., 2006, *Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 54, No. 15, s. 5375-5381
  77. JECFA, 1996, 833. *Butylated hydroxytoluene. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food*. Prepared by the forty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 35.
  78. Johnson A. R., 1965, *A re-examination of the possible teratogenic effects of butylated hydroxytoluene (BHT) and its effect on the reproductive capacity of the mouse*, Food and Cosmetics Toxicology Vol. 3, s. 371-375
  79. Juarez B., Martinez-Toledo M. V., Gonzalez-Lopez J., 2005, *Growth of Azotobacter chroococcum in chemically defined media containing p-hydroxybenzoic acid and protocatechuic acid*, Chemosphere Vol. 59, No. 9, s. 1361–1365
  80. Kanski J., Aksenova M., Stoyanova A., Butterfield A. D., 2002, *Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure–activity studies.*, Journal of Nutritional Biochemistry, Vol. 13, No. 5, s. 273–281
  81. Karolkiewicz J., 2011, *Wpływ stresu oksydacyjnego na strukturę i funkcję komórek oraz konsekwencje wynikające z uszkodzeń wolnorodnikowych — związek z procesami starzenia*. Gerontologia Polska, Vol. 19, No. 2, s. 59 - 67
  82. Kartal M, Yıldız S., Kaya S., Kurucu S., Topçu G., 2003, *Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia*, Journal of Ethnopharmacology, Vol. 86, No. 1, s. 69–73
  83. Kececioglu Draelos Z., 1995, *Cosmetics: An overview*, Current Problems in Dermatology, Vol. 7, Iss. 2, s. 45-64
  84. Kendall C. A., Nicolaou A., 2013, *Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity*, Progress in Lipid Research, Vol. 52, Iss. 1, s. 141-164
  85. Kiewlicz J., Szymusiak H., 2011, *Long-chain esters of phenolic acids as multifunctional components of cosmetic products*, w: *Current Trends In Commodity*

*Science: Packaging and Product Quality* - Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu (UEP), s. 119-132

86. Kilimowicz A., Bielecka-Grzela S., Czuba E., Żejmo M., 2007, *Środki światłochronne – budowa i zastosowanie*, Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, Vol 53., No. 1, s. 11 – 15
87. Kim Y-J., 2007, *Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, Vol. 30, No. 6, s. 1052–1055
88. Kubo I, Fujita K, Nihei K., Masuoka N., 2003, *Non-antibiotic antibacterial activity of dodecyl gallate*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Vol. 11, No. 4, s. 573–580
89. Kubo I, Xiao P., Fujita K., 2001, *Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Vol. 11, No. 3, s. 347-350
90. Kubo I, Xiao P., Fujita K., 2002, *Anti-MRSA activity of alkyl gallates*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Vol. 12, No. 2, s. 113–116
91. Kuhnt K., Jahreis G., 2007, *Trans fatty acids in human nutrition*, Żywnienie Człowieka I Metabolizm, Vol. XXXIV, No. 1/2
92. Kuppan G., Balasubramanyam J., Monickaraj F., Srinivasan G, Mohan V, Balasubramanyam M., 2010, *Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes.*, Cytokine Vol. 49, No. 2, s. 229–234
93. Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P., 2007, *Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges*, Progress in Lipid Research, Vol. 46, No. 5, s. 244–282
94. Landete J. M., 2012, *Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health*, Food Research International Vol. 46, s. 410–424.
95. Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L., 1995, *Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: Consumption vs regeneration*. Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 10, No. 2, s. 373–81.
96. Lasch J., Schonfelder U., Walke M., Zellmer S., Beckert D., 1997, *Oxidative damage of human skin lipids. Dependence of lipid peroxidation on sterol concentration*, Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1349, Iss. 2, s. 171–181

97. Leclercq C., Arcella D., Turrini A, 2000, *Estimates of the theoretical maximum daily intake of erythorbic acid, gallates, butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in Italy: a stepwise approach*, Food and Chemical Toxicology, Vol. 38, Iss.12, s. 1075-1084
98. Lin H. M., Yen F. L., Ng L. T., Lin C. C., 2007, *Protective effects of Ligustrum lucidum fruit extract on acute butylated hydroxytoluene-induced oxidative stress in rats*, Journal of Ethnopharmacology, Vol. 111, No. 1, s. 129–136
99. Linseisen J., Wolfram G., 1998, *Origin, metabolism, and adverse health effects of cholesterol oxidation products*, Fett/Lipid, Vol. 100, No. 6, s. 211-218
100. List G. R., Adlof L. O., King J. W., 2005, *Trans fatty acids in specialty lipids*, in: *Nutraceutical and specialty lipids and their co – products*, ed: Fereidoon Shahidi, CRC Tailor and Francis
101. Locatelli C., Leal P. C., Yunes R. A., Nunes R. J., Creczynski – Pasa T., 2009, *Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cel death*. Chemicco – Biological Interactions, Vol. 181, s. 175-184
102. Lu Z, Nie G, Belton P. S., Tang H, Zhao B., 2006, *Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives*, Neurochemistry International Vol. 48, Iss. 4, s. 263–274
103. Lundov M. D., Moesby L., Zachariae C., Johansen J. D., 2009, *Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy*, Contact Dermatitis, Vol. 60, Iss. 2, s. 70–78
104. Lupu M. P. 2010, *Antioxidants and vitamins in cosmetics*, Clinics in Dermatology, Vol.19, Iss. 4., s. 467–473
105. Madhavi D. L., Singhal R. S., Kulkarni P. R., 1996, *Technological aspects of food antioxidants* in: *Food antioxidants. Technological, toxicological and health perspectives*, ed. Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K., Marcel Dekker Inc, s. 159 – 197.
106. Madhavi D. L., Salunkhe D. K., 1996, *Toxicological aspects of food antioxidants*, in: *Food antioxidants. Technological, toxicological and health perspectives*, ed. Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K., Marcel Dekker Inc, s. 159 – 197.

107. Maier T., Schieber A., Kammerer D. R., Carle R., 2009, *Residues of grape (Vitis vinifera L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants*, Food Chemistry Vol. 112, Iss. 3, s. 551–559
108. Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., 2004, *Polyphenols: food sources and bioavailability*. American Journal of Clinical Nutrition, Vol.79, No. 5, s. 727 – 747
109. Marcinkiewicz – Salomonowiczowa J., 1995, *Zarys chemii I technologii kosmetyków*. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, s. 6 - 16
110. Marcucci M. C., 1995, *Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity*, Apidologie Vol. 26, s. 83-99
111. Marinova E. M., Yanishlieva V. N., 2003, *Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures*, Food Chemistry Vol. 81, Iss. 2, s. 189–197
112. Martini M.-C., 2009, *Kosmetologia i farmakologia skóry*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, s. 37 – 52
113. Martyna A., Bartkowiak G., Schroeder G., 2011, *Kosmetyki nawilżające, w: Kosmetyki – chemia dla ciała*, red. Schroeder G., Wydawnictwo Cursiva, Inowrocław
114. Marzec A., 2009, *Chemia kosmetyków*, Towarzystwo Naukowe Organizacji I Kierownictwa Stowarzyszenie Wyższej Użyteczności “Dom Organizatora”, Toruń, s. 43-47
115. Matsuo M, Mihara K, Okuno M, Ohkawa H and Miyamoto J, 1984, *Comparative metabolism of 3,5 di-tert-butyl-4hydroxytoluene (BHT) in mice and rats*, Food and Chemical Toxicology Vol. 22, No. 5, s. 345- 354.
116. Mattila P., Hellström J., 2007, *Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products*. Journal of Food Composition and Analysis Vol. 20, Iss. 5, s. 152–160
117. Mazurkiewicz R., Rajca A., Salwińska E., Skibiński A., Suwiński J., Zieliński W., 2000, *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*, Wydawnictwa Naukowo – Techniczne, Warszawa

118. McClements D. J., Decker E. A., 2000, *Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems*, Journal of Food Science, Vol. 65, No. 8, s. 542 – 545.
119. McCusker M. M., Grant-Kels J. M., 2010, *Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 fatty acids*, Clinics in Dermatology, Vol. 28, Iss. 4, s. 440–451
120. McMurry J., 2003, *Chemia organiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
121. Miller A. C. K., Dwyer-Nield L. D., Malkinson A. M., 1995, *Very early changes in pulmonary protein kinase C- $\alpha$  and calpain II contents following injection of butylated hydroxytoluene (BHT) into mice*, Toxicology Vol. 97, No., s. 141 - 149
122. Morton L. W, Caccetta R. A. –A., Puddy I. B, Croft K. D., 2000, *Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance of cardiovascular disease.*, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology Vol, 27, Iss. 3, s. 152–159
123. Moure A., Pazos M., Medina I., Dominguez H., Pajaro J. C., 2007, *Antioxidant activity of extracts produced by solvent extraction of almond shells acid hydrolysates*, Food Chemistry Vol. 101, Iss. 3, s. 193–201
124. Muñoz-Muñoz J. L., García-Molina F., García-Ruiz P. A., Arribas E., Tudela J., García-Cánovas F., Rodríguez-López J. N., 2009, *Enzymatic and chemical oxidation of trihydroxylated phenols*, Food Chemistry, Vol. 113, No 2, s. 435–444
125. Muriya D. K., Devasagayam T. P. A., 2010, *Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids*, Food and Chemical Toxicology, Vol 48, s. 3369 – 3373
126. Musiał W., Kokol V., Voncina B., 2010, *Wpływ długości łańcucha czynnika sieciującego w termowrażliwych mikrosferach na ich potencjalne właściwości fotoochronne*, Polimery w Medycynie, Vol. 40, No. 2, s. 47-55
127. Nardini M., Ghiselli A., 2004, *Determination of free and bound phenolic acids in beer*. Food Chemistry Vol. 84, No. 1, s. 137–143
128. Nicolaou A., Pilkington S. M., Rhodes L. E., 2011, *Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids*, Chemistry and Physics of Lipids, Vol. 164, Iss. 6, s. 535–543

129. Niki E, Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N., 2005, *Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects*, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 338, No.1, s. 668–676
130. Obrębska K., Szczygła A., Matejczyk M., 2008, *Skazenia mikrobiologiczne surowców i produktów kosmetycznych*, Postępy Mikrobiologii, Vol. 47, No. 1, s. 65-71.
131. Ohno Y., Takuma T., Asahi K., Isono K., 1984, *Differentiation induction of murine erythroleukemia cells by butylated hydroxytoluene*, FEBS Letters Vol. 156, No. 2, s. 277-279
132. Olthof M.R., Hollman P.C.H., Katan M., 2001, *Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans*, The journal of Nutrition, Vol. 131, No.1, s. 66-71
133. Onyango A. N., 2012, *Small reactive carbonyl compounds as tissue lipid oxidation products ; and the mechanisms of their formation thereby*, Chemistry and Physics of Lipids Vol. 165, Iss. 5, s. 777–786
134. Oikawa S., Nishino K., Oikawa S., Inoue S., Mizutani T., Kawanishi S., 1998, *Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene*, Biochemical Pharmacology, Vol. 56, No. 3, s. 361–370
135. Oresajo C, Stephens T., Hino P. D., Law R. M., Yatskayer M., Foltis P., Pillai S., Pinnell S. R., 2008, *Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin*, Journal of Cosmetic Dermatology, Vol. 7, No. 4, s. 290–297, Wiley Periodicals, Inc
136. Orus P., Leranoz S., 2005, *Current trends in cosmetic microbiology*, International Microbiology, Vol. 8, s. 77-79
137. Pamplona R., 2008, *Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity*, Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1777, Iss. 10, s. 1249–1262
138. Panseri S., Soncin S., Chiesa L. M., Biondi P. A., 2011, *A headspace solid-phase microextraction gas-chromatographic mass-spectrometric method (HS-SPME–GC/MS) to quantify hexanal in butter during storage as marker of lipid oxidation*, Food Chemistry Vol. 127, No. 2, s. 886–889
139. PN-EN ISO 9001:2009 *Systemy Zarządzania Jakością - Wymagania*

140. Pospisil J., Nespurek S, Pilar J., 2008, *Impact of photosensitized oxidation and singlet oxygen on degradation of stabilized polymers*, Polymer Degradation and Stability, Vol. 93, s. 1681–1688
141. Prasad R., Ramachandran S., Pugalendi K. V., Menon V. P., 2007, *Ferulic acid inhibits UV-B-induced oxidative stress in human lymphocytes*, Nutrition Research, Vol. 27, No.9, s. 559–564
142. Proestos C., Boziaris I. S., Nychas G-J.E., Komaitis M., 2006, *Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity*, Food Chemistry Vol. 95, Iss. 4, s. 664–671
143. Przondo J., 2010, *Związki powierzchniowo czynne i ich zastosowanie w produktach chemii gospodarczej*, Wydawnictwo Politechniki Radomskiej, Radom
144. Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Meier C., Kahkonen M., Heinonen M., Hopia M., Oksman-Caldentey K-M., 2001, *Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries*, Journal of Applied Microbiology, Vol. 90, No. 4, s. 494-507
145. Rajalakshmi D., Narazimhan S., 1996, *Food antioxidants: sources and methods of evaluation*, in: *Food antioxidants. Technological, toxicological and health perspectives*, ed. Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K., Marcel Dekker Inc, s. 65 - 69
146. Rattan S. I. S., 2006, *Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals*, Free Radical Research, Vol. 40, No. 12, s. 1230–1238
147. Rice – Evans C., Miller N. J., Paganga G., 1996, *Structure - antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids*, Free Radical Biology and Medicine, Vol 20, No 7, s. 933-956.
148. Rice – Evans C., Miller N. J., Paganga G., 1997, *Antioxidant properties of phenolic compounds*, Trends in Plant Science, Vol. 2, No. 4, s. 152-159
149. Rodríguez-Carpena J. G., Morcuende D., Estévez M., 2011, *Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage*, Meat Science, Vol. 89, Iss. 2, s. 166-173

150. Rosenfeldt F., Wilson M., Lee G., Kure C., Ou R., Braun L., Haa J. D., 2013, *Oxidative stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy*, Experimental Gerontology, Vol. 48, Iss. 1, s. 45-54
151. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 61/2011, z dnia 24 stycznia 2011 r, *zmieniające rozporządzenie (EWG) nr 2568/91 w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wycłoczn oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy*,
152. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 *dotyczące produktów kosmetycznych*.
153. Saija A, Tomaino A., Trombetta D., De Pasquale A., Uccella N., Barbuzzi T., Paolino D., Bonina F., 2000, *In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents*, International Journal of Pharmaceutics Vol. 199, No. 1, s. 39–47
154. Sanchez-Maldonado A. F., Schieber A, Ganzle M. G., 2011, *Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria*, Journal of Applied Microbiology Vol. 111, Iss. 5, s. 1176–1184
155. Sanchez-Moreno C., Larrauri J. A., Saura-Calixto F., 1998, *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols*, Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 76, No. 2, s. 270 – 276.
156. Santos A. N., Cordeiro A. M. T. M., Damasceno S. S., Aguiar R. T., Rosenhaim R., Filho J. R. C., Santos I. M. G., Maia A. S., Souza A. G., 2012, *Commercial antioxidants and thermal stability evaluations*, Fuel Vol. 97, s. 638 – 643
157. Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jimenez L., 2005, *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 45, s. 287–306
158. Schwarz K., Huang S.-W., German J. B., Tiersch B., Hartmann J., Frankel N. E., 2000, *Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 48, No.10, s. 4874–4882
159. Seki T., Tani Y., Arita M., 2009, *Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvins E1*, Prostaglandins & Other Lipid Mediators, Vol. 89, Iss. 3–4, s. 126-130



160. Sforcin J. M., Bankova V., 2011, *Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?*, Journal of Ethnopharmacology Vol. 133, Iss., s. 253–260
161. Shahidi, F.; Naczki, M., 1995, *Food phenolics: Sources, Chemistry, Effects, and Application*, Technomic Publishing Company, Inc.: Lancaster, PA,
162. Shanmugam G, Ramaswamy B. R., Radhakrishnan V., Tao H., 2010, *GC–MS method for the determination of paraben preservatives in the human breast cancerous tissue*, Microchemical Journal Vol. 96, Iss. 2, s. 391–396
163. Shearn C. T., Fritz K. S., Thompson J. A., 2011, *Protein damage from electrophiles and oxidants in lungs of mice chronically exposed to the tumor promoter butylated hydroxytoluene*, Chemico-Biological Interactions Vol. 192, Iss. 3, s. 278–286
164. Shilian D. M., Goldstone J, 1986, *Toxicity of butylated hydroxytoluene*, The New England Journal of Medicine Vol. 314, No. 10, s. 648-649.
165. Shibata H., Kondo K., Katsuyama R., Kawazoe K., Sato Y., Murakami K., Takaishi Y., Arakaki N., Higuti T., 2005, *Alkyl gallates, intensifiers of  $\beta$ -lactam susceptibility in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Vol 49, s. 549 – 555
166. Shukla V., Joshi G. P., Rawat M. S. M., 2010, *Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review.*, Phytochemistry Reviews., Vol. 9, No 2, s. 303–314
167. Silva F. A. M., Borgias F., Guimaraes C., Lima J. L. F. C., Matos C., Reis S., 2000, *Phenolic acid and derivatives: studies on relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 48, No. 6, s. 2122 – 2126
168. Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemle D. J., 2007, *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*, Wydawnictwo Naukowe PWN
169. Siman C. M., Eriksson U. J., 1996, *Effect of butylated hydroxytoluene on  $\alpha$ -tocopherol content in liver and adipose tissue of rats*, Toxicology Letters Vol. 87, s. 103-108
170. Smart R. C., 2004, *Chemical carcinogenesis.*, in: Hodgson E. (ed.), *A textbook of modern toxicology*, John Wiley & Sons

171. Soni M. G., Burdock G. A., Taylor S. L., Greenberg N. A., 2001, *Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature*, Food and Chemical Toxicology, Vol. 39, No. 6, s. 513-532
172. Soni M. G., Taylor S. L., Greenberg N. A., Burdock G. A., 2002, *Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature*, Food and Chemical Toxicology Vol. 40, No. 10, s.1335–1373
173. Statham B., 2006, *Tabele dodatków i składników chemicznych , czyli co jesz i czym się smarujesz*. Wydawnictwo RM, Warszawa
174. Sułek M. W., Małyś A., Pytlas K., 2006, *Ocena jakościowa kremów zawierających oleje roślinne: sojowy, z pestek winogron i kukurydziany*, Towaroznawcze Problemy Jakości, Vol. 9, No. 4, s. 75 – 89.
175. Sun B., Fukuhara M., 1997, *Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug-metabolizing enzymes in mice*, Toxicology Vol. 122, Iss. 1-2, s. 61–72
176. Sun Y., Dwyer-Nield L. D., Malkinson A. M., Zhang J. L., Thompson J. A., 2003, *Responses of tumorigenic and non-tumorigenic mouse lung epithelial cell lines to electrophilic metabolites of the tumor promoter butylated hydroxytoluene*, Chemico-Biological Interactions, Vol. 145, s. 41 - 51
177. Szukalska E., 2003, *Wybrane zagadnienia utleniania tłuszczów*. Tłuszcze Jadalne, Vol. 38, No. 1 – 2, s. 42 - 61
178. Szwajgier D., Jakubczyk A., 2011, *Production of extracellular ferulic acid esterases by Lactobacillus strains using natural and synthetic carbon sources*, Acta Scientiarum. Polonorum, Technologia Alimentaria, Vol.10, No. 3, s. 287-302
179. Szymańska J., 2008, *Mechanizmy działania toksycznego*, w: Piotrowski J. (red), *Podstawy toksykologii.*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa
180. Takahashi O, 1992, *Haemorrhages due to defective blood coagulation do not occur in mice and guinea-pigs fed butylated hydroxytoluene, but nephrotoxicity is found in mice*. Food and Chemical Toxicology Vol. 30, s. 89-97
181. Tapiero H., Nguyen Ba G., Couvreur P., Tew K. D., 2002, *Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies*, Biomed Pharmacother Vol. 56, Iss. 5, s. 215–222

182. Tejero I., Gonzalez-Lafont A., Lluch J. M., Eriksson L. A., 2004, *Photo-oxidation of lipids by singlet oxygen: a theoretical study*, Chemical Physics Letters, Vol. 398, Iss. 4-6, s. 336–342
183. TemaNord, 2002, *Food Additives in Europe 2000. Status of safety assessments of food additives presently permitted in the EU*. TemaNord, 2002:560
184. Thompson J. A., Carlson T. J., Sun Y., Dwyer-Nield L. D., Malkinson A. M., 2001, *Studies using structural analogs and inbred strain differences to support a role for quinone methide metabolites of butylated hydroxytoluene (BHT) in mouse lung tumor promotion*, Toxicology Vol. 160, No 1-3, s. 197-205
185. Trommer H., Wagner J., Graener H., Neubert R. H. H., 2001, *The examination of skin lipid model systems stressed by ultraviolet irradiation in the presence of transition metal ions*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol. 51, Iss. 3, s.207 - 214
186. Tryphonas H., Lacroix F., Lok E., Jee P., Clayson D. B., Hayward S., Miller D., Mehta R., 1999, *The effect of butylated hydroxytoluene on selected immune surveillance parameters in rats bearing enzyme-altered hepatic preneoplastic lesions*, Food and Chemical Toxicology, Vol. 37, Iss. 7, s. 671-681
187. Uozaki M, Yamasaki H, Katsuyama Y, Higuchi M., Higuti T., A., Koyamaa H., 2007, *Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses* Antiviral Research, Vol. 73, No, 2, s. 85–91
188. Urbanek-Karłowska B., Karłowski K., 2005, *Bezpieczeństwo wyrobów kosmetycznych*, w: *Toksykologia współczesna*, red. Seńczuk W., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, s. 620-636
189. Vermaak I., Kamatou G. P.P., Komane-Mofokeng B., Viljoen A. M., Beckett K., 2011, *African seed oils of commercial importance – Cosmetic applications*, South African Journal of Botany, Vol. 70, Iss. 4, s. 920 - 933
190. van Dam R.M., Feskens E.J., 2002, *Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus*. Lancet, Vol. 360, s. 1477–1478
191. Valle L. G., 2011, *Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans*, Biomedicine & Aging Pathology, Vol. 1, Iss. 1, s. 1-7
192. Vogel A. I., 1984, *Preparatyka organiczna*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa

193. Warner C R., 1986, *Reactions of antioxidants in foods*, Food and Chemical Toxicology, Vol. 24, s. 1015-1019
194. Welch K. D., Davis T. Z., Aust S. D., 2002, *Iron autooxidation and free radical generation: effects of buffer, ligands, and chelators*, Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 397, No. 2, s. 360 – 369
195. Werner R. A., Rossmann A, Schwarz C., Bacher A., Schmidt H.-L., Eisenreich W., 2004, *Biosynthesis of gallic acid in Rhus typhina: discrimination between alternative pathways from natural oxygen isotope abundance*, Phytochemistry, Vol. 65, s. 2809–2813
196. Wilailuk C., McClements D. J., Decker E. A., 2005, *The relationship between the physicochemical properties of antioxidants and their ability to inhibit lipid oxidation in bulk oil and oil-in-water emulsions*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 53, No. 12, s. 4982–4988
197. Williams G. M., Iatropoulos M. J., Whysner J., 1999, *Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives*, Food and Chemical Toxicology, Vol. 37, Iss. 9-10, s. 1027-1038
198. Yamaki K, Taneda S., Yanagisawa R., Inoue K., Takano H., Yoshino S., 2007, *Enhancement of allergic responses in vivo and in vitro by butylated hydroxytoluene*, Toxicology and Applied Pharmacology Vol. 223, No. 2, s. 164–172
199. Yan J.J., Cho J.Y., Kim H.S., Kim K.L., Jung J.S., Huh S.O., Suh H.W., Kim Y.H., Song D.K., 2001, *Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid*. British. Journal of Pharmacology, Vol. 133, No. 1, s. 89–96.
200. Yu J., Ahmedna M., 2013, *Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications*, International Journal of Food Science and Technology Vol. 48, Iss. 2, s. 221–237
201. Zagórka G., Głowniak K, 2001, *Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Vol. 26, s. 79–87
202. Zern T. L., Fernandez M. L., 2005, *Cardioprotective effects of dietary polyphenols*, Journal of Nutrition, Vol. 135, No.10, s. 2291 – 2294

203. Zhang L-W., Al-Suwayeh S. A., Hsieh P-W, Fang J-Y., 2010, *A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: Evaluation of their efficacy and safety*, International Journal of Pharmaceutics Vol. 399, Iss. 1-2, s. 44–51
204. Zheng L.-F., Dai F., Zhou B., Yang L., Liu Z.-L., 2008, *Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure–activity relationship*, Food and Chemical Toxicology Vol. 46, s. 149–156
205. Zhou Y., Li W., Xu L., Chen L., 2011, *In Salvia miltiorrhiza, phenolic acids possess protective properties against amyloid  $\beta$ -induced cytotoxicity, and tanshinones act as acetylcholinesterase inhibitors*. Environmental Toxicology and Pharmacology Vol. 31, No. 3, s. 443–452
206. Zieliński R., 2009, *Surfaktanty. Budowa, właściwości, zastosowanie*. Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, Poznań
207. Ziemiański Ś., 2000, *Składniki żywności. Tłuszcze*, w: *Żywnienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*, red. Gawęcki J., Hryniewiecki L., Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa, s. 152 - 169
208. Ziemiański Ś., 2001, *Zapotrzebowanie człowieka na tłuszcze*, w: *Normy żywienia człowieka. Fizjologiczne podstawy*, red. Ziemiański Ś., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa

## ZAŁĄCZNIKI

Tabela 36 Wpływ dodatku długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych i BHT w stężeniu 4,5  $\mu\text{mola}/100\text{ g}$  na zmiany zawartości nadtlenków w oleju z pestek winogron wyrażone jako  $\text{mEqO}_2/\text{kg}$  (wartości średnie,  $n=3$ )

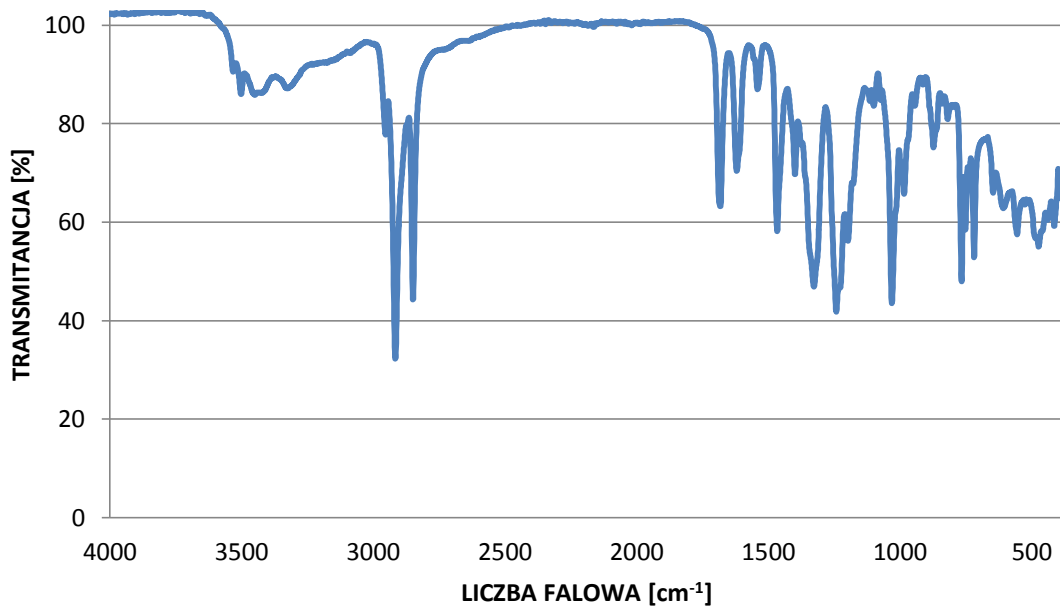
| Związek       | 0 dni      | 30 dni     | 60 dni     | 90 dni     | 120 dni    | 150 dni    | 180 dni    |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>FT</b>     | 2,43       | 3,59       | 7,18       | 13,92      | 25,25      | 40,41      | 62,69      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,00$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ |
| <b>FH</b>     | 2,43       | 3,60       | 7,59       | 15,81      | 29,40      | 46,85      | 71,47      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,03$ |
| <b>FO</b>     | 2,43       | 3,39       | 7,18       | 13,14      | 24,70      | 40,49      | 62,85      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ |
| <b>GT</b>     | 2,43       | 3,54       | 6,50       | 10,22      | 16,41      | 25,25      | 37,09      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,06$ |
| <b>GH</b>     | 2,43       | 3,71       | 6,90       | 11,16      | 18,39      | 28,14      | 40,55      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,00$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,00$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ |
| <b>GO</b>     | 2,43       | 3,55       | 7,18       | 12,76      | 22,72      | 36,53      | 54,47      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ |
| <b>3,5-DT</b> | 2,43       | 3,67       | 8,63       | 17,38      | 31,37      | 48,00      | 69,65      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,04$ |
| <b>3,5-DH</b> | 2,43       | 3,70       | 9,17       | 18,50      | 31,70      | 55,64      | 69,25      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,04$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,04$ | $\pm 0,03$ |
| <b>3,5-DO</b> | 2,43       | 4,25       | 14,22      | 26,67      | 42,76      | 62,55      | 85,93      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,00$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,07$ |
| <b>BHT</b>    | 2,43       | 3,85       | 6,77       | 15,54      | 25,93      | 42,09      | 60,62      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ |
| <b>PK</b>     | 2,43       | 5,05       | 14,77      | 24,42      | 37,91      | 50,79      | 68,57      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ |

Źródło: badania własne

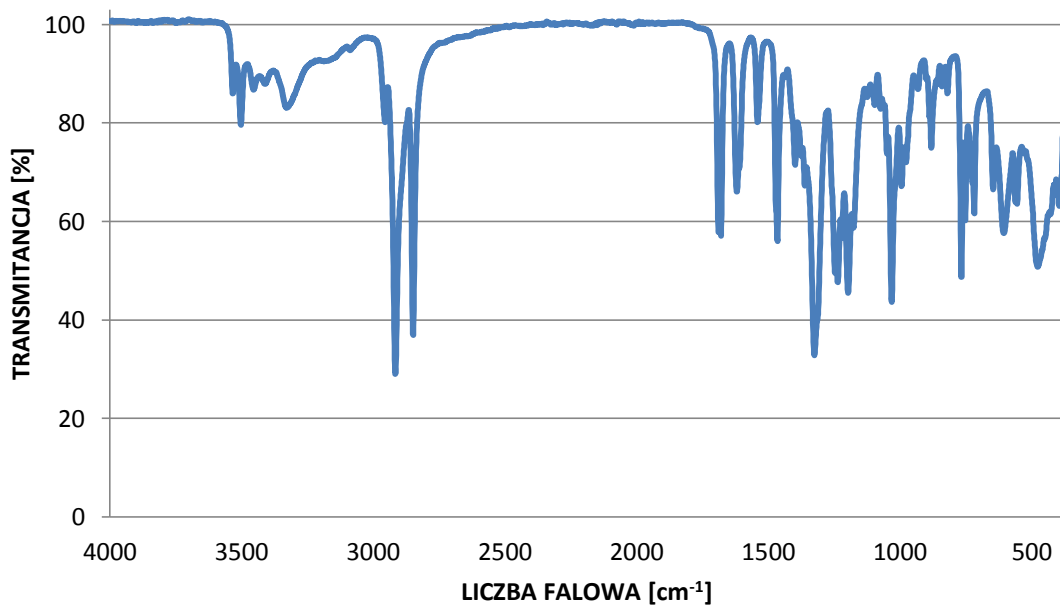
Tabela 37 Wpływ dodatku długołańcuchowych estrów kwasów fenolowych i BHT w stężeniu 450  $\mu\text{moli}/100\text{ g}$  na zmiany zawartości nadtlenków w oleju z pestek winogron wyrażone jako  $\text{mEqO}_2/\text{kg}$  (wartości średnie,  $n=3$ )

| Związek       | 0 dni      | 30 dni     | 60 dni     | 90 dni     | 120 dni    | 150 dni    | 180 dni    |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>FT</b>     | 2,43       | 3,81       | 12,25      | 22,69      | 38,19      | 56,59      | 80,00      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ |
| <b>FH</b>     | 2,43       | 4,66       | 16,45      | 30,57      | 48,48      | 61,10      | 94,37      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,02$ |
| <b>FO</b>     | 2,43       | 3,97       | 11,85      | 22,19      | 37,40      | 57,34      | 78,25      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ |
| <b>GT</b>     | 2,43       | 3,99       | 6,26       | 7,18       | 8,58       | 10,42      | 12,27      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,00$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,03$ |
| <b>GH</b>     | 2,43       | 4,26       | 6,29       | 7,46       | 9,03       | 10,97      | 12,54      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,00$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,03$ |
| <b>GO</b>     | 2,43       | 4,12       | 7,44       | 9,70       | 12,45      | 15,38      | 18,56      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,00$ |
| <b>3,5-DT</b> | 2,43       | 3,73       | 8,26       | 16,48      | 29,00      | 45,23      | 63,74      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,13$ |
| <b>3,5-DH</b> | 2,43       | 3,82       | 9,17       | 17,93      | 31,87      | 48,84      | 69,94      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,00$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,13$ |
| <b>3,5-DO</b> | 2,43       | 4,33       | 10,39      | 21,17      | 36,77      | 54,85      | 74,61      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,04$ |
| <b>BHT</b>    | 2,43       | 4,38       | 6,24       | 7,72       | 9,41       | 11,42      | 13,99      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,00$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,00$ |
| <b>PK</b>     | 2,43       | 5,05       | 14,77      | 24,42      | 37,91      | 50,79      | 68,57      |
|               | $\pm 0,08$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ | $\pm 0,01$ |

Źródło: badania własne

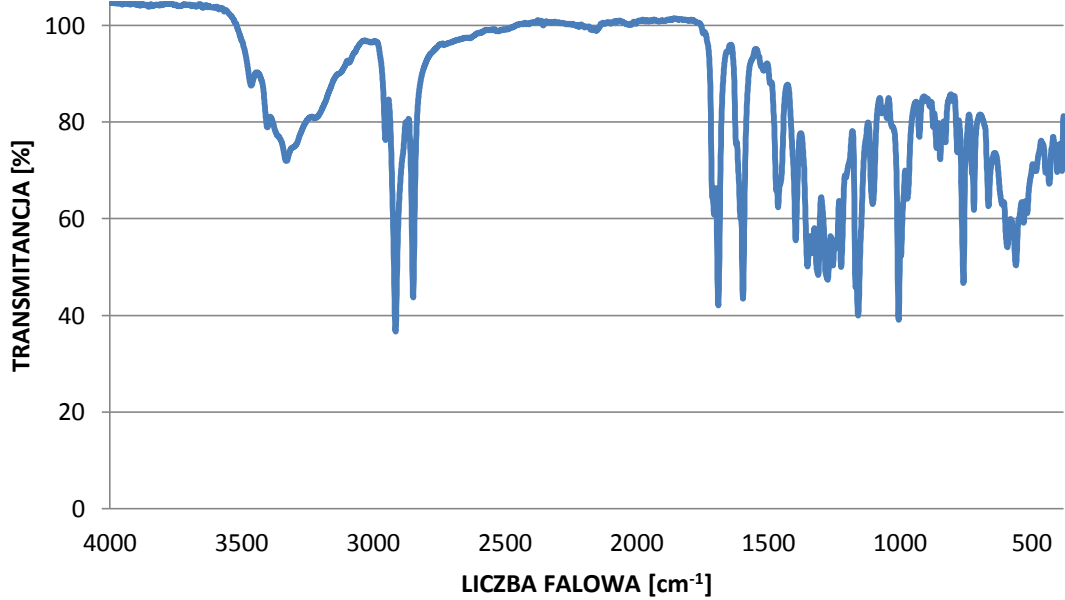


Wykres 36 Widmo podczerwieni (IR) galusanu heksadecylu  
Źródło: badania własne

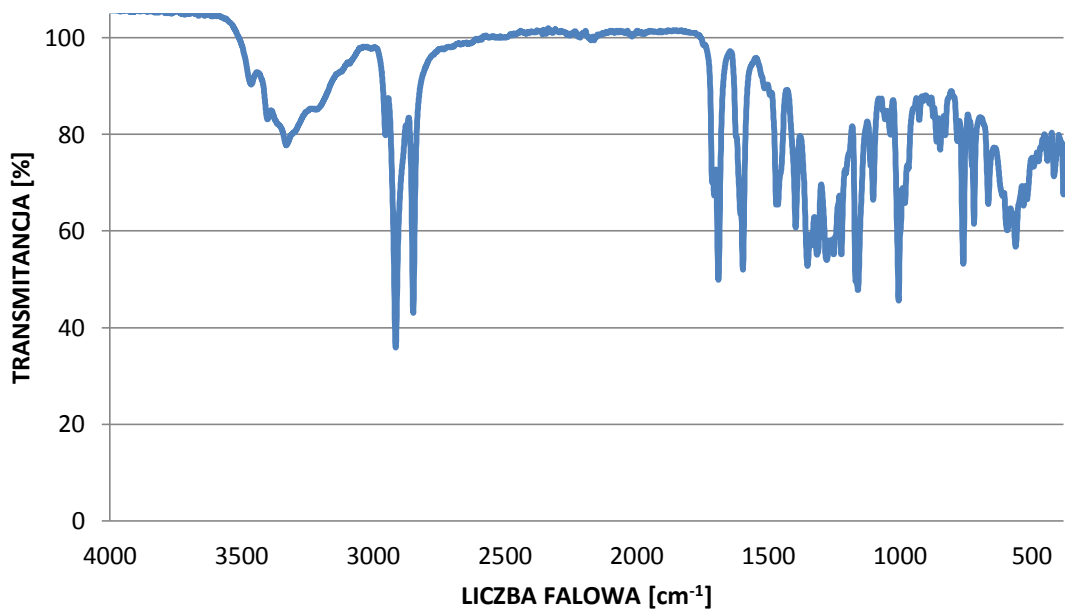


Wykres 37 Widmo podczerwieni (IR) galusanu oktadecylu  
Źródło: badania własne

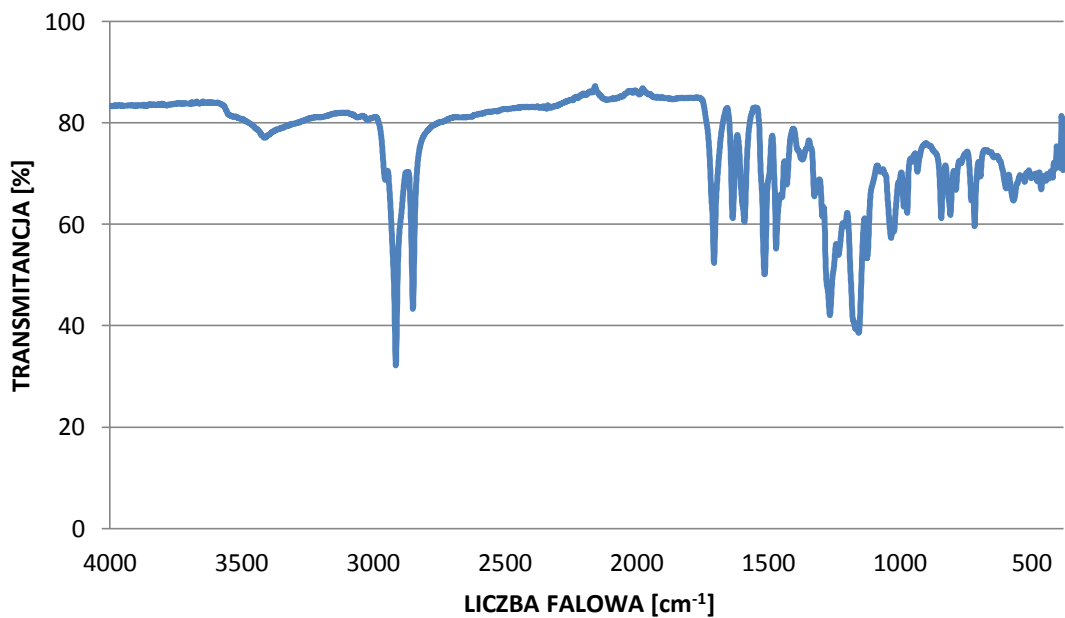




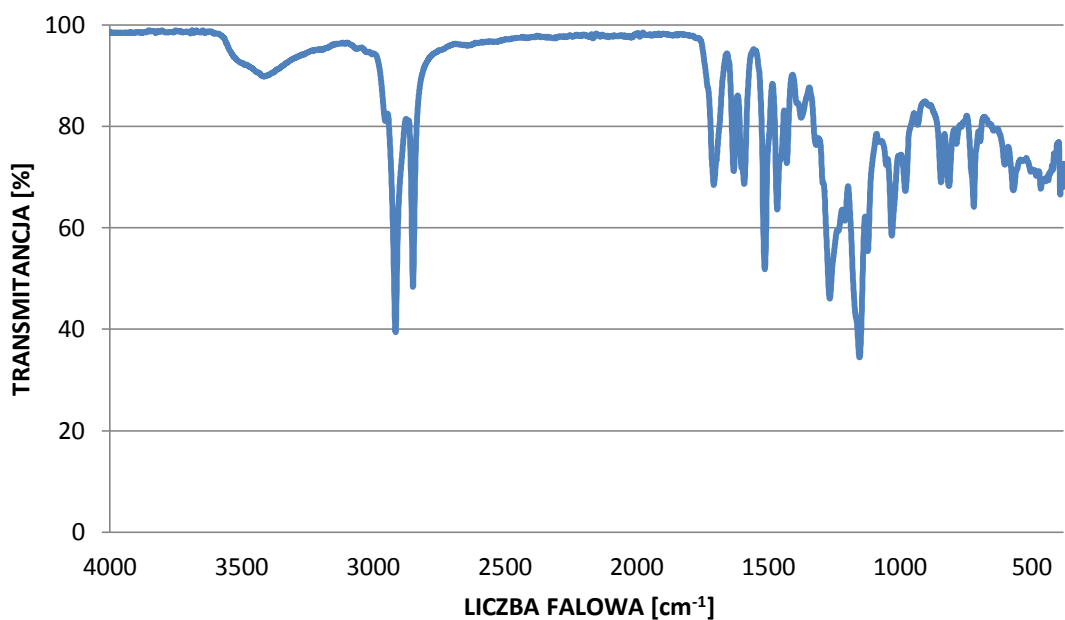
Wykres 38 Widmo podczerwieni (IR) 3,5-dihydroksybenzoesanu heksadecylu  
 Źródło: badania własne



Wykres 39 Widmo podczerwieni (IR) 3,5-dihydroksybenzoesanu oktadecylu  
 Źródło: badania własne



Wykres 40 Widmo podczerwieni (IR) ferulanu heksadecylu  
Źródło: badania własne



Wykres 41 Widmo podczerwieni (IR) ferulanu oktadecylu  
Źródło: badania własne