

IZVLEČEK BRAZILSKE KREŠE (*ACMELLA OLERACEA*) V POMLAJEVALNI KOZMETIKI: SENZORIČNO VREDNOTENJE TESTNE IN PLACEBO EMULZIJE EXTRACT OF BRAZILIAN CRESS (*ACMELLA OLERACEA*) IN REJUVENATING COSMETICS: SENSORY EVALUATION OF TEST AND PLACEBO EMULSION

AVTORICI / AUTHORS:

asist. Katja Schoss, mag. ind. farm.

izr. prof. dr. Nina Kočevar Glavač, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko biologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: katja.schoss@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Izrazite spremembe videza kože, vključno z nastankom gub kot najbolj očitnega znaka staranja kože, pomembno vplivajo na posameznikovo samozavest. Danes imamo zato na voljo pester izbor kozmetičnih izdelkov in posegov, ki izboljšajo videz zrele kože, kozmetološka znanost pa se intenzivno ukvarja tudi s kozmetično aktivnimi sestavinami rastlinskega izvora na tem področju. V raziskavi smo izdelali placebo in testno emulzijo z izvlečkom brazilske kreše (*Acmella oleracea*). Njuno delovanje smo ovrednotili na prostovoljcih z metodo hedonskega senzoričnega vrednotenja z učinkovitim testiranjem, pri čemer smo se osredotočili na vidne učinke zmanjšanja očesnih gub. Po dvomesečni uporabi emulzije z izvlečkom brazilske kreše se je stanje gub izboljšalo, vendar učinek ni bil statistično značilen.

KLJUČNE BESEDE:

Acmella oleracea, anti-age učinek, brazilska kreša, kozmetika

ABSTRACT

Distinct changes in the appearance of the skin, including the appearance of wrinkles as the most obvious sign of skin ageing, have a significant impact on an individual's self-esteem. Thus, we have a wide selection of cosmetic products and procedures on the market today that improve the appearance of mature skin or wrinkles, and cosmetic science also deals intensively with cosmetically active ingredients of plant origin in this area. In the research, we produced a placebo and a test emulsion with an extract of para cress (*Acmella oleracea*). We evaluated their performance on volunteers using the method of hedonic sensory evaluation with effective testing, focusing on the visible effects of reducing eye wrinkles. The emulsion with para cress extract showed an improved wrinkle condition after two months of use, however, the effect was not statistically significant.

KEY WORDS:

Acmella oleracea, anti-age effect, cosmetics, para cress



1 UVOD

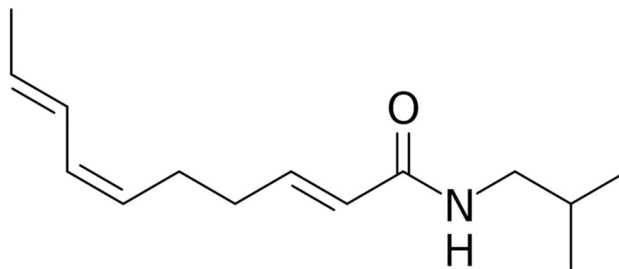
Koža je naš največji organ, ki opravlja barierno funkcijo zaščite pred zunanjimi dejavniki (fizikalna bariera med telesom in okoljem, preprečevanje izgube vode in elektrolitov, zaščita pred vdorom kemikalij in mikroorganizmov), termoregulacijsko in čutilno (vsebuje senzorične in avtonomne živce ter senzorične receptorje za zaznavanje dražljajev dotika, vibracij, pritiska, temperature, bolečine in srbenja) ter imunsko funkcijo. Po približno 25. letu se na koži začnejo pojavljati prvi znaki staranja, ki so posledica intrinzičnih (genetika, bolezni, hormoni, presnovni procesi itd.) ali ekstrinzičnih (UV-žarki, kajenje, temperaturne spremembe, nezdrava prehrana, prekomerno uživanje alkohola itd.) dejavnikov. S staranjem se procesi v koži upočasnijo. Koža se prične tanjšati, nagubanost bazalne membrane med usnjico (dermis) in povrhnjico (epidermis) se zmanjša, kar povzroči manjšo izmenjavo snovi iz usnjice v celice povrhnjice. Prve vidne spremembe zaradi staranja kože se pojavijo kot drobne linije oz. gube, navadno okoli oči, zlasti na lateralnem periorbitalnem delu očesa (1).

Za izboljšanje videza zrele kože ter za upočasnitev nadaljnega staranja kože pogosto uporabljamo kozmetične izdelke z vgrajenimi kozmetično aktivnimi sestavinami, kot so alfa-hidroksi kisline, antioksidanti, vlažila, retinoidi in UV-filtri. Možna je tudi uporaba bolj invazivnih lepotnih posegov, kot so injekcije toksina botulina in polnil (elastina, kolagena, hialuronske kisline) ter kemični, mehanski ali laserski pilingi. Čeprav so ti posegi učinkoviti, pa lahko povzročijo neželene

kožne reakcije, kot so draženje in rdečina kože, kontaktni dermatitis, podplutbe na mestu injiciranja, težave pri izgovorjavi, okužbe in otekline tretiranih predelov kože. V kozmetološki znanosti je zato raziskovanje usmerjeno v iskanje in vrednotenje sestavin za aktivno nego zrele kože, ki izkazujejo visoko učinkovitost, hkrati pa ne povzročajo neželenih kožnih reakcij (2).

Ena izmed aktualnih sestavin za uporabo v kozmetičnih izdelkih proti staranju je izvleček brazilske kreše z INCI-imenom *Acmella Oleracea Extract* ali *Spilanthes Acmella Extract*. Brazilska kreša, *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen syn. *Spilanthes oleracea* L. (slika 1), spada v družino nebinovk (Asteraceae) in uspeva v vlažnih in toplih območjih tropskega in subtropskega pasu ter je pogosta rastlina tropskih gozdov južne Amerike. Liste in cvetove tradicionalno v prehrani uporabljajo kot začimbo, saj je zaradi ostrega okusa dober nadomestek pekočih vrst paprike. V tradicionalni medicini zunanje dele rastline uporabljajo kot anestetik za zdravljenje zobobola in bolečega grla, prav tako pa se pripravkov poslužujejo pri celjenju ran in revmatizmu zaradi protivnetnega delovanja (3). V znanstvenih raziskavah so podrobneje raziskali antipiretično (4), lokalno anestetično (4), protivnetno (5), antioksidativno (6, 7), vazorelaksantno (6), diuretično (8), imunostimulativno (9) in protimikrobno (10) delovanje izvlečkov brazilske kreše.

Učinkovine oz. kozmetično aktivne spojine, prisotne v rastlini, so lipofilni alkilamidi, natančneje amidi srednjeverzičnih polinenasičenih maščobnih kislin, ki so značilni tako za vrsto *A. oleracea* kot tudi za rod *Acmella*. Gre za v naravi redko prisotne derivate izobutilamina in maščobnih kislin z dvojnimi in trojnimi vezmi, identificirali pa so tudi derivate,



Slika 1: *Acmella oleracea* (levo; vir slike: iStock by Getty Images) in spilanthol (desno).

Figure 1: *Acmella oleracea* (left; photo: iStock by Getty Images) and spilanthol (right).

ki imajo modificiran tako aaminski (npr. prisotnost aromatskega obroča) kot maščobni (npr. prisotnost epoksidnega obroča) strukturni del (10). Glavni alkilamid je spilantol (slika 1), ki je odgovoren za lokalne anestetične in protivnetne učinke rastline (3, 11, 12), deluje pa tudi kot pospeševalec penetracije (13) in skozi kožo dokazano prehaja tudi sam (14).

V okviru raziskave smo izdelali emulzijo za kozmetično uporabo z izvlečkom brazilske kreše ter z metodo hedonskega senzoričnega vrednotenja z učinkovitim testiranjem ovrednotili vidne pomlajevalne učinke (izboljššan videz gub) na lateralnem periorbitalnem delu očesa prostovoljcev v primerjavi s placebo emulzijo brez vgrajenega izvlečka.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 SESTAVINE ZA IZDELAVO EMULZIJ

Demineralizirana voda (INCI: Aqua), Fakulteta za farmacijo; mandljevo olje (INCI: Prunus Amygdalus Dulcis Oil), Bacara Rose, Nemčija; karitejevo maslo (INCI: Butyrospermum Parkii Butter), Afrikahandel CSR Projekt, Nemčija; samoemulgirajoči glicerilstearat ali glicerilstearat SE (INCI: Glyceryl Stearate SE), Caesar & Lorentz, Nemčija; glicerol (INCI: Glycerin), Farmalabor, Italija; transparentni ksantan (INCI: Xanthan Gum), Alexmo Cosmetics, Nemčija; vitamin E (INCI: Tocopherol), Dragonspice, Nemčija; glicerilkaprilat (INCI: Glyceryl Caprylate), suhi izvleček brazilske kreše

(INCI: Acmella Oleracea Extract), Aliacura, Nemčija; 90 % mlečna kislina (INCI: Lactic Acid), Sigma-Aldrich, Nemčija; eterično olje sivke (INCI: Lavandula Angustifolia Oil), Behawie, Nemčija.

2.2 IZDELAVA EMULZIJE

Razvoj emulzije (količina posameznega vzorca je znašala 50 g) je obsegal optimizacijo količin glicerilstearata SE (1–1,3 %), ksantana (0,2–0,4 %) in suhega izvlečka brazilske kreše (0–2 %), pri čemer smo osnovno fizikalno stabilnost preverjali s centrifugiranjem 30 min pri 3000 rpm/min. Končna sestava je podana v preglednici 1. Končno emulzijo smo izdelali po tehnološkem postopku metode v enem koraku ali *one-pot* metode, v količini 1,5 kg. V posodo vakuumskega homogenizatorja (Stephan UMC5; Stephan-machinery, Nemčija) smo dodali mandljevo olje, karitejevo maslo, glicerilstearat SE, glicerol, ksantan in predhodno pripravljen 2-odstotni vodni izvleček vodne kreše v primeru testne oz. demineralizirano vodo v primeru placebo emulzije. Zmes v homogenizatorju smo med mešanjem na srednjih obratih (1500 rpm/min) segreli na 70 °C, da so se lipofilne sestavine stalile, mešali 5 min pri največjih obratih (3000 rpm/min) ter nato ohladili na sobno temperaturo. Na koncu smo dodali vitamin E, eterično olje sivke in mlečno kislino (do pH 5,5) ter ponovno homogenizirali 5 min. Fizikalno stabilnost smo preverili s testom centrifugiranja (30 min, 3000 rpm), pri čemer ni smelo priti do razslojitve ali drugih vidnih sprememb testirane emulzije. Mikrobiološke kakovosti končne emulzije nismo ovrednotili, saj smo na podlagi rezultatov predhodnih protimikrobnih testiranj glicerilkaprilata (15) predpostavili, da bo za namene izvedbe

Preglednica 1: Sestava testne in placebo emulzije.

Table 1: Composition of test and placebo emulsions.

	Testna emulzija (% , m/m)	Placebo emulzija (% , m/m)
Mandljevo olje	10	10
Karitejevo maslo	5	5
Glicerilstearat	1,3	1,3
Glicerol	5	5
Ksantan	0,4	0,4
Vitamin E	1	1
Glicerilkaprilat	0,5	0,5
2-odstotna (m/m) vodna raztopina izvlečka brazilske kreše	76,8	/
Demineralizirana voda	/	76,8
Mlečna kislina	q.s.	
Eterično olje sivke	q.s.	

raziskave mikrobiološka stabilnost v dveh mesecih uporabe emulzije zadostna. Testno in placebo emulzijo smo napolnili v plastične vsebnike z volumnom 50 mL.

2.3 PROTOKOL RAZISKAVE IN VREDNOTENJE REZULTATOV

Raziskava je bila zasnovana kot kontrolirana raziskava senzoričnega vrednotenja s hedonsko metodo z učinkovitim testiranjem testne in placebo emulzije, pri čemer so bili prostovoljci seznanjeni s tem, kateri izdelek je testna in kateri placebo emulzija. Dvojnoplega načrta raziskave z izdelanimi emulzijama nismo mogli izvesti, saj je izvleček brazilske kreše testno emulzijo obarval rahlo rjavkasto. V raziskavo je bilo vključenih 20 prostovoljcev (4 moški in 16 žensk), starih od 33 do 55 let, ki so bili seznanjeni s sestavo in navodili za uporabo emulzij, prav tako s pravicami in dolžnostmi, ki jih imajo kot prostovoljci, ter so podpisali informirani pristanek. Prostovoljci med uporabo emulzij niso smeli uporabljati drugih izdelkov za nego obraza, menjati dovoljenih vsakodnevni kozmetičnih izdelkov (ličila, izdelki za čiščenje) ter obiskovati tretmajev nege obraza v kozmetičnem salonu.

Dva meseca so si prostovoljci dvakrat dnevno (zjutraj in zvečer) na levo polovico obraza nanašali testno emulzijo z izvlečkom brazilske kreše, na desno polovico pa placebo emulzijo. Vsakemu prostovoljcu smo pred začetkom raziskave, po enem mesecu ter po dveh mesecih testiranja fotografirali desno in levo polovico ter frontalni del obraza. Vrednotili smo gube v predelu oči, in sicer na lateralnem periorbitalnem delu levega in desnega očesa.

Po končanem testiranju smo s pomočjo 68 neodvisnih ocenjevalcev, ki smo jih izbrali naključno in niso vedeli za praktično izvedbo raziskave, ovrednotili rezultate. Z opazovanjem fotografij prostovoljcev so ocenili, ali so se gube v predelu oči po enem oz. po dveh mesecih spremenile.

Fotografije smo naključno podali v parih: začetno stanje in stanje po enem mesecu ter začetno stanje in stanje po dveh mesecih, za levo in za desno stran obraza. Ocenjevalci so morali določiti, na kateri od dveh fotografij prepoznajo bolj izrazite gube; primer je podan na sliki 2. Rezultate ocenjevalcev smo statistično obdelali s programom Excel. Poleg opisanega neodvisnega ocenjevanja smo učinek emulzije ovrednotili tudi preko samoocenitvenih vprašalnikov po enem in dveh mesecih testiranja, kjer so prostovoljci podali lastno oceno o stanju vlažnosti, čvrstosti in gladkosti kože ter gub na levi in desni strani obraza z opisno petstopenjsko lestvico (zelo izboljšano, izboljšano, brez sprememb, poslabšano, zelo poslabšano). Prostovoljci so ocenili tudi lasten tip kože, kjer so imeli podanih šest različnih možnosti (suha, mastna, mešana, občutljiva, normalna, zrela) ter ovrednotili učinkovitost emulzije (štiristopenjska lestvica; zelo zadovoljen, zadovoljen, nezadovoljen, zelo nezadovoljen), vonj emulzije (petstopenjska lestvica; zelo dober, dober, sprejemljiv, slab, zelo slab) in konsistenco emulzije (petstopenjska lestvica; zelo dobra, dobra, sprejemljiva, slaba, zelo slaba).

3 REZULTATI

Rezultati senzoričnega vrednotenja vključujejo podatke 17 prostovoljcev (od 20, vključenih v raziskavo). Tri prostovoljke testiranja niso zaključile; dvema prostovoljkama emulzija ni ustrezala, eno prostovoljko pa smo izključili, saj emulzij deset dni ni uporabljala.

Prostovoljci so v sklopu samoocenitvenega vprašalnika podali lastno oceno o stanju vlažnosti, čvrstosti in gladkosti kože ter gub na levi in desni strani obraza po enem in po dveh mesecih uporabe emulzij. Navedli so tudi svoj tip kože

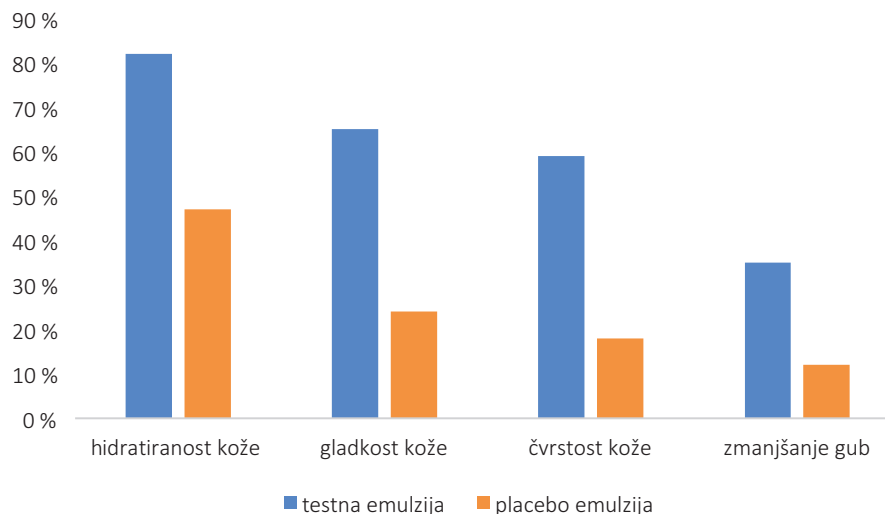


večje gube



Slika 2: Primer vrednotenja fotografij. Pod sliko je podano mnenje ocenjevalca, da so na levi sliki vidne večje gube.

Figure 2: Example of photo evaluation. Below the image, the evaluator's opinion is given that larger wrinkles are visible on the left photo.



Graf 1: Rezultati samoocenjevanja prostovoljcev testne in placebo emulzije po dveh mesecih uporabe.
Graph 1: Self-assessment results of volunteers of test and placebo emulsion after two months of use.

ter se opredelili do splošnih lastnosti proučevanih emulzij. Tako je 24 % prostovoljcev ocenilo, da sta emulziji premalo mastni, večinoma tisti s suho kožo. Prostovoljecem z mešano, normalno in mastno kožo sta emulziji ustrezali; 18 % jih je menilo, da se hitro vpijata v kožo, 71 % sta se zdeli ustrezno viskozni. Vonj je ustrezal 47 % prostovoljcev.

Po dveh mesecih uporabe testne emulzije je 82 % prostovoljcev ocenilo, da se jim je izboljšala hidratiranost kože, 65 % gladkost kože, 59 % čvrstost kože in 35 % prostovoljcev je opazilo zmanjšanje gub (graf 1). Pri placebo emulziji so bili deleži precej nižji, in sicer je 47 % prostovoljcev menilo, da se je izboljšala hidratiranost kože, 24 % se je izboljšala gladkost kože, 18 % se je izboljšala čvrstost in 12 % jih je opazilo zmanjšanje gub (graf 1).

Statistična obdelava podatkov, pridobljenih s pomočjo zunanjih ocenjevalcev, je pokazala ugoden učinek emulzije z vgrajenim izvlečkom brazilske kreše na izrazitost gub. Stanje gub po enem mesecu je 65 % ocenjevalcev ($p = 0,44$) ocenilo kot boljše, po dveh mesecih pa 73 % ocenjevalcev ($p = 0,15$), toda rezultat ni bil statistično značilen.

4 DISKUSIJA

Rezultati samoocenjevanja po dveh mesecih uporabe testne emulzije so pokazali pomembno izboljšanje vrednotenih parametrov za testno emulzijo v primerjavi s placebo emulzijo. Za testno emulzijo je približno trikrat več prostovoljcev

navedlo izboljšanje gladkosti in čvrstosti kože ter izrazitosti gub kot za placebo emulzijo, izboljšanje hidratiranosti kože pa je opazilo približno dvakrat več prostovoljcev. Poudariti moramo, da so prostovoljci vedeli, katera emulzija je testna in katera placebo, saj je bila testna emulzija zaradi izvlečka brazilske kreše drugačne barve. Dejavniki placebo je torej najverjetneje močno vplival na subjektivnost zaznavanja, kar je pričakovano (16).

Ugodne rezultate subjektivnega samoocenjevanja smo potrdili v drugem delu raziskave, kjer smo večjo objektivnost vrednotenja sprememb stanja kože zagotovili z neodvisnim ocenjevanjem s pomočjo zunanjih ocenjevalcev. Ti so potrdili izboljšanje stanja gub v predelu oči, vendar statistična obdelava ni pokazala statistične značilnosti rezultata.

Na podlagi rezultatov sklepamo, da je k videzu napete kože z manj izrazitimi gubami ključno prispevala povečana hidratiranost, kar se sklada z rezultati Choi in sod., ki so ugotovili, da je premalo hidrirana koža videti bolj nagubana (17).

Statistično značilnega učinka emulzije z vgrajenim izvlečkom brazilske kreše na stanje gub nismo uspeli dokazati, vendar bi to lahko bila tudi posledica omejitev raziskave, in sicer majhnega števila prostovoljcev (17 od 20 jih je zaključilo raziskavo), heterogenosti skupine prostovoljcev (velik razpon starosti, od 33 do 55 let, večje število žensk kot moških), nenadzorovanih dejavnikov med fotografiranjem prostovoljcev (osvetljenost, sproščenost obraza) ter razlik v količini emulzije, ki so jo posamezni prostovoljci porabili med testiranjem, ki jih nismo beležili.

Objavljene raziskave namreč dokazujejo značilne učinke izvlečka brazilske kreše na človeško in živalsko kožo. Savic



in sod. (11) so proučevali vpliv testne emulzije (seruma), ki je vsebovala 2 % vodno-propandiolnega izvlečka brazilske kreše (z deklarirano vsebnostjo vsaj 50 mg/L spilantola v izvlečku). Učinke so vrednotili s silikonskimi odlitki periorbitalnih in perioralnih regij obraza na osmih prostovoljcih. Preverjali so učinek seruma na globino gub, nato pa so učinke seruma primerjali z učinki kontrolne emulzije (kreme), ki je prav tako vsebovala 2 % izvlečka brazilske kreše. Na eno stran obraza so prostovoljci nanašali serum, na drugo stran obraza pa kremo. Ugotovili so statistično značilno razliko med osnovnim stanjem kože in globino gub po 14-dnevni uporabi seruma, statistične razlike med delovanjem seruma in kreme pa ni bilo. V raziskavi niso uporabili placeba.

V še dveh raziskavah so proučevali vpliv izvlečka brazilske kreše na stanje kože, niso pa bile izvedene na človeški, temveč na podganji koži. Moro in sod. (18) so proučevali celjenje rane po dermalnem nanosu mazila z 20 % suhega etanolnega izvlečka brazilske kreše. Z mikroskopsko preiskavo tkiv in kvantificiranjem hidroksiprolina so ugotovili večjo količino in boljše razporeditev kolagena na ranjenih področjih, tretiranih s testnim mazilom, kot na področjih, tretiranih s placebo mazilom. Yamane in sod. (19) so proučevali učinke izvlečka brazilske kreše in eteričnega olja macele (*Achyrocline satureioides*), vgrajenih v obliže za celjenje ran na podganah. S proučevanjem slik kožnih lezij in tkiv povrhnjice, usnjice in podkožja so ugotovili, da so se rane celile hitreje, obnovljena povrhnjica je bila debelejša, kolagen pa je bil v novem tkivu bolj enakomerno razporejen. Ker je podobno kot v primeru rane pri zreli koži povrhnjica tanjša in količina kolagena zmanjšana, hkrati pa je kolagen neenakomerno razporejen (2), je smiselna povezava z ugodnimi učinki izvlečka brazilske kreše tudi pri zreli koži. Izvleček brazilske kreše je tudi predmet patenta US 7,531,193 B2, kjer ga glede dermalnih učinkov primerjajo z učinki uporabe botoksa (20). V patentu je izpostavljen vpliv zmanjšanja gub preko zaviranja kontraktilne aktivnosti v mišicah obraza, vendar neposredne raziskave o takem učinku spilantola ali izvlečka brazilske kreše niso na voljo.

5 SKLEP

V okviru kozmetološke raziskave smo proučevali pomlajevalno delovanje testne emulzije z izvlečkom brazilske kreše, oglaševanim kot naravni botoks. Osredotočili smo se na vidne učinke zmanjšanja očesnih gub v primerjavi s placebo

emulzijo brez izvlečka. Rezultati samoocenjevanja prostovoljcev so pokazali izboljšanje hidratiranosti, gladkosti in čvrstosti kože ter izrazitosti gub, ki je bilo bolj izraženo pri testni emulziji. Rezultati neodvisnega ocenjevanja s pomočjo zunanjih ocenjevalcev so prav tako pokazali večje izboljšanje stanja gub pri emulziji z izvlečkom, ki pa ni bilo statistično značilno.

Na končne rezultate so lahko vplivale naslednje omejitve in pomanjkljivosti raziskave: nenadzorovani dejavniki med fotografiranjem prostovoljcev, kot sta osvetljenost in sproščenost obraza, razlike v količini emulzije, ki so jo posamezni prostovoljci porabili med testiranjem, heterogenost skupine in majhno število prostovoljcev.

Kakovost raziskave bi lahko nadgradili z uporabo instrumentalnih metod, kot so meritve hidracije in reliefa kože, ki so za razliko od metodologije subjektivnega ocenjevanja, na kateri je temeljila naša raziskava, znanstveno relevantnejše. Menimo pa, da je za načrtovanje tovrstnih kozmetoloških raziskav ključnega pomena opredelitev končnega cilja oz. namena. Če želimo primarno vrednotiti tiste kozmetične učinke, ki so pomembni z vidika končnega uporabnika, sta osredotočenost na vizualno opazne učinke in izvedba hedonskega senzoričnega vrednotenja z efektivnimi testi ustrezni izbiri.

6 ZAHVALA

Raziskovalno delo je bilo izvedeno v sklopu projekta Mladi raziskovalci za razvoj šaleške doline. Avtorici se zahvaljujeta Katarini Grazer, Evi Hudournik in Lari Goršek za izvedbo laboratorijskega dela, fotografiranja prostovoljcev in zbiranja podatkov, mag. kem. teh. Karmen Grabant za mentorsko delo ter prof. dr. Samu Kreftu za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

7 LITERATURA

1. Khavkin J, Ellis DAF. *Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology*. Vol. 19, *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. Elsevier; 2011. p. 229–34.
2. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. *Skin anti-aging strategies*. Vol. 4, *Dermato-Endocrinology*. Taylor & Francis; 2012. p. 308.

3. Stein R, Berger M, Santana de Cecco B, Mallmann LP, Terraciano PB, Driemeier D, et al. Chymase inhibition: A key factor in the anti-inflammatory activity of ethanolic extracts and spilanthol isolated from *Acmella oleracea*. *J Ethnopharmacol*. 2021 Apr 24;270.
4. Rahim RA, Jayusman PA, Muhammad N, Mohamed N, Lim V, Ahmad NH, et al. Potential antioxidant and anti-inflammatory effects of *spilanthos acmella* and its health beneficial effects: A review. Vol. 18, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG; 2021.
5. Chakraborty A, Devi RKB, Rita S, Sharatchandra K, Singh TI. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthos acmella* in experimental animal models. *Indian J Pharmacol*. 2004;36(3):148–50.
6. Wongsawatkul O, Prachayasittikul S, Isarankura-Na-Ayudhya C, Satayavivad J, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthos acmella* Murr. *Int J Mol Sci*. 2008 Dec;9(12):2724–44.
7. Prachayasittikul S, Suphamong S, Worachartcheewan A, Lawung R, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. Bioactive metabolites from *Spilanthos acmella* Murr. *Molecules*. 2009 Feb;14(2):850–67.
8. Ratnasooriya WD, Pieris KPP, Samaratunga U, Jayakody JRAC. Diuretic activity of *Spilanthos acmella* flowers in rats. *J Ethnopharmacol*. 2004 Apr;91(2–3):317–20.
9. Savadi R V, Yadav R, Yadav N. Study on immunomodulatory activity of ethanolic extract of *Spilanthos acmella* Murr. leaves. *Indian J Nat Prod Resour*. 2010;1(2):204–7.
10. Savic S, Petrovic S, Savic S, Cekic N. Identification and photostability of N-alkylamides from *Acmella oleracea* extract. *J Pharm Biomed Anal*. 2021 Feb 20;195:113819.
11. Savic SM, Cekic ND, Savic SR, Ilic TM, Savic SD. 'All-natural' anti-wrinkle emulsion serum with *Acmella oleracea* extract: A design of experiments (DoE) formulation approach, rheology and in vivo skin performance/efficacy evaluation. *Int J Cosmet Sci*. 2021 Oct 1;43(5):530–46.
12. Dallazen JL, Maria-Ferreira D, da Luz BB, Nascimento AM, Cipriani TR, de Souza LM, et al. Pharmacological potential of alkylamides from *Acmella oleracea* flowers and synthetic isobutylalkyl amide to treat inflammatory pain. *Inflammopharmacology*. 2020 Feb 1;28(1):175–86.
13. De Spiegeleer B, Boonen J, Malysheva S V., Mavungu JD Di, De Saeger S, Roche N, et al. Skin penetration enhancing properties of the plant N-alkylamide spilanthol. *J Ethnopharmacol*. 2013 Jun 21;148(1):117–25.
14. Boonen J, Baert B, Roche N, Burvenich C, De Spiegeleer B. Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthos acmella* (Compositae) extracts. *J Ethnopharmacol*. 2010 Jan 8;127(1):77–84.
15. Kočevr Glavač N, Lunder M. Preservative efficacy of selected antimicrobials of natural origin in a cosmetic emulsion. *Int J Cosmet Sci*. 2018 Jun 1;40(3):276–84.
16. Anderson S, Stebbins GT. Determinants of placebo effects. In: *International Review of Neurobiology*. *Int Rev Neurobiol*; 2020. p. 27–47.
17. Choi JW, Kwon SH, Huh CH, Park KC, Youn SW. The influences of skin visco-elasticity, hydration level and aging on the formation of wrinkles: A comprehensive and objective approach. *Ski Res Technol*. 2013 Feb;19(1).
18. Moro SD de S, de Oliveira Fujii L, Teodoro LFR, Frauz K, Mazoni AF, Esquisatto MAM, et al. *Acmella oleracea* extract increases collagen content and organization in partially transected tendons. *Microsc Res Tech*. 2021 Nov 1;84(11):2588–97.
19. Yamane LT, De Paula E, Jorge MP, De Freitas-Blanco VS, Junior ÍM, Figueira GM, et al. *Acmella oleracea* and *Achyrocline satureioides* as Sources of Natural Products in Topical Wound Care. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2016;2016.
20. Dermane F, Passaro G. Use of an *Acmella oleracea* extract for the botulinum toxin-like effect thereof in an anti-wrinkle cosmetic composition. Vol. 2, *Google Patents*. 2009. p. 1–6.

