

Univerzitet u Beogradu
Farmaceutski fakultet

Milica Ž. Lukić

DOKTORSKA DISERTACIJA

Formulaciona istraživanja
dermokozmetičkih emulzija za vlaženje kože:
koncept uporedne reološke, teksturne i
senzorne procene

Beograd, 2014.

Univerzitet u Beogradu
Farmaceutski fakultet



Milica Ž. Lukić

DOKTORSKA DISERTACIJA

Formulaciona istraživanja
dermokozmetičkih emulzija za vlaženje kože:
koncept uporedne reološke, teksturne i
senzorne procene

Beograd, 2014.

University of Belgrade
Faculty of Pharmacy



Milica Ž. Lukić

DOCTORAL DISSERTATION

Formulation development of moisturizing
dermocosmetic emulsions: combined
rheological, textural and sensory analysis
approach

Belgrade, 2014.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta; deo rada urađen je na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Univerziteta u Tübingen-u i u Zavodu za farmaciju Univerziteta u Novom Sadu – Medicinskog fakulteta.

Mentor

Dr Snežana Savić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

1. _____
Dr Gordana Vuleta, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. _____
Dr Slobodanka Tamburić, redovni profesor,
University of the Arts London – London College of Fashion

3. _____
Dr Nebojša Cekić, docent,
Univerzitet u Nišu – Tehnološki fakultet

4. _____
Dr Veljko Krstonošić, docent,
Univerzitet u Novom Sadu – Medicinski fakultet

Datum odbrane _____

Posebno se zahvaljujem *prof. dr Snežani Savić*, svom mentoru i učitelju, pod čijim je izuzetnim vođstvom nastao ovaj rad. Njen entuzijazam, kreativnost, znanje i stručnost, kao i nesebična podrška i pomoć koje mi pruža od početka mog bavljenja naučno-istraživačkim radom omogućili su mi da uspešno prebrodim sve etape u izradi ove disertacije.

Prof. dr Gordana Vuleta je svojim velikim iskustvom i znanjem pomogla, ne samo konačnom uobličavanju ove doktorske disertacije, već mom potpunom profesionalnom radu, zbog čega sam joj izuzetno zahvalna.

Doc. dr Veljku Krstonošiću sam veoma zahvalna na pomoći pri eksperimentalnom radu, tumačenju i prezentaciji dobijenih rezultata, čime je značajno doprineo stvaranju ovog rada.

Prof. dr Slobodanki Tamburić i doc. dr Nebojši Cekiću se zahvaljujem na pomoći pri oceni ove disertacije i saradnji tokom njene izrade.

Iskreno se zahvaljujem mojim kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju jer su na različite načine imali udela u ovom radu. Posebno se zahvaljujem kolegini *asist. Ivani Pantelić* čija pomoć, podrška i prijateljstvo su značajno doprineli celom toku i izradi ovog doktorata.

Mojim roditeljima, sestrama, kumi i mom jednodančiću hvala, što su uvek bili uz mene u različitim situacijama i burnim trenucima koji su se preplitali sa radom na doktorskoj disertaciji. Posebno hvala mom *Lukiću* na beskrajnoj ljubavi i razumevanju koji su utkani u srž mog naučnog i stručnog rada.

Formulaciona istraživanja dermokozmetičkih emulzija za vlaženje kože: koncept uporedne reološke, teksturne i senzorne procene

SAŽETAK

Uvod Savremeni trendovi nameću obavezu formulisanja bezbednih i efikasnih kozmetičkih proizvoda zadovoljavajućih senzornih karakteristika. Obzirom na dužinu trajanja i cenu senzornih studija, uz činjenicu da se subjektivna ocena od strane ispitanika ne može isključiti, značajno je ispitati mogućnost upotrebe instrumentalnih metoda u optimizaciji željenih senzornih osobina. Kozmetologija kao savremena nauka fokusira svoju pažnju na razvoj novih, usavršavanje poznatih, kao i ispitivanje mogućnosti kombinovanja postojećih metoda i tehnika koje bi postupak formulacije proizvoda i karakterizacije novih sirovina pojednostavile, uz istovremeno obezbeđivanje odgovarajućeg kvaliteta, bezbednosti i efikasnosti kozmetičkih proizvoda. Ispitivanja novih alkil poliglukozidnih (APG) emulgatora, odnosno podaci koji se odnose na rasvetljavanje strukture nosača sa ovim emulgatorom, kao i njihovu bezbednost i efikasnost, značajno doprinose ispunjavanju prethodnih zahteva.

Cilj istraživanja Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje mogućnosti upotrebe instrumentalnih tehnika (reološka i teksturna merenja) u optimizaciji senzornih karakteristika dermokozmetičkih emulzija za vlaženje kože. U tom smislu je bilo neophodno razviti odgovarajući senzorni panel koji će sa instrumentalnim merenjima predstavljati standardizovani set ispitivanja, a koristio bi se u formulaciji i optimizaciji emulzija. Dodatno, cilj istraživanja bio je i rasvetljavanje mezomorfno ponašanja dugolančanog C₂₀/C₂₂ APG emulgatora kao i razvoj nosača sa ovim emulgatorom primenom standardizovanog seta instrumentalnih i senzornih testova. Da bi se utvrdio kiselostabilni potencijal APG emulgatora ispitana je mogućnost inkorporiranja glikolne i salicilne kiseline u razvijene nosače.

Metode Eksperimentalni rad bio je podeljen u tri faze: 1) Formulirane su 4 model emulzije V/U tipa za vlaženje kože kod kojih je variran jedan emolijens, a koje su poslužile standardizaciji instrumentalnih i senzornih testova, odnosno postavljanju

modifikovane senzorne studije i uspostavljanju korelacija između ovih ispitivanja. Na model kremovima sprovedena je detaljna reološka, teksturna i senzorna analiza, a dodatno je osmišljena i sprovedena senzorna studija na upotrebljenim emolijensima. Ispitivanje efikasnosti uzoraka bilo je sprovedeno primenom tehnika bioinženjeringa kože. 2) Da bi se bolje upoznao jedan od novijih APG emulgatora Montanov™202 sa njim su izrađene serije binarnih i ternarnih sistema na kojima je sprovedena obimna fizičko-hemijska karakterizacija (mikroskopska analiza, difrakcija X-zraka pod malim i velikim uglom, reološka i termalna analiza). Njihov iritacioni potencijal, u sklopu "skrininiga" bezbednosnog profila, ispitan je *in vitro* metodom ispitivanja citotoksičnosti. Na osnovu dobijenih rezultata formulisane su dermokokozmetičke emulzije U/V tipa koje su ispitane prethodno navedenim metodama i razvijenim setom instrumentalnih i senzornih testova, kao i tehnikama bioinženjeringa kože. 3) Primenom uporednog koncepta reološke, teksturne i senzorne analize formulisani su dermokokozmetički emulzionski sistemi U/V tipa, a ispitivanjem mogućnosti inkorporiranja dve model supstance: salicilne i glikolne kiseline u pomenuti nosač bio je procenjen kiselostabilni potencijal APG emulgatora. Ispitivanje i) fizičko-hemijske stabilnosti uzoraka sa aktivnim supstancama sprovedeno je primenom mikroskopske analize, merenjem pH vrednosti i električne provodljivosti, reološkom i termalnom analizom; ii) senzorne osobine ispitane su setom standardizovanih instrumentalnih i senzornih testova; a iii) kratkotrajni vlažeći efekat ispitan je primenom tehnika bioinženjeringa kože.

Rezultati Izrađene dermokokozmetičke emulzije V/U tipa namenjene vlaženju kože pokazale su zadovoljavajuću fizičku stabilnost i efikasnost. Promena sastava masne faze dovela je do razlika u rezultatima kontinualnih i oscilatornih reoloških merenja, a na osnovu dobijenih reoloških parametara uzorke je bilo moguće diferencirati u dve grupe. Poredak dobijen za sve teksturne attribute bio je isti i u skladu sa redosledom utvrđenim kod reoloških parametara, a potvrđen je visok stepen korelacije između određenih reoloških i teksturnih vrednosti. Neke senzorne karakteristike kao što su sjaj, masnoća i rezidualni film model kremova

bile su slične, dok su između drugih atributa dobijene manje ili više značajne razlike. Distribucija ocena za senzorne attribute emulzija odgovara distribuciji rezultata za iste osobine emolijenasa. Poređenjem vrednosti koje su dobijene instrumentalnim merenjem i senzornom procenom pokazalo se da između njih, u određenim slučajevima, postoje direktne i značajne korelacije. Ispitivanjima binarnih i ternarnih sistema (sa različitim udelom iste masne faze) sa dugolančanim APG emulgatorom utvrđeno je da on ima veliki potencijal za formiranje lamelarne faze i da postoji sinergizam između dva njena glavna tipa: tečno-kristalne i gel-kristalne faze. Razlike u strukturi dermokozmetičkih emulzija U/V tipa (ternarni sistemi sa različitim masnim fazama) koje su se manifestovale različitim izgledom polarizacionih mikrografija, različitim termalnim i reološkim ponašanjem pokazale su da je u prisustvu nepolarnog parafinskog ulja smanjena sposobnost formiranja lamelarnih faza. Dobijeni rezultati ispitivanja bezbednosti *in vitro*, odnosno efikasnosti *in vivo* metodama ukazuju na zadovoljavajući bezbednosni profil i visok hidratišući potencijal sistema stabilizovanih ispitivanim emulgatorom. Konačno ispitivanja sprovedena na kremovima sa aktivnim supstancama pokazala su zadovoljavajuću fizičko-hemijsku stabilnost ovih uzoraka. Senzornom studijom nisu utvrđene značajne razlike između uzoraka sa različitim aktivnim supstancama, a *in vivo* studijom je potvrđen vlažeći efekat i preliminarno bezbednost aktivnih model kremova.

Zaključak Senzorni atributi emulzije mogu se donekle predvideti instrumentalnim (reološkim i teksturnim) merenjima, a vremenski i novčano zahtevne senzorne studije mogu biti pojednostavljene upotrebom instrumentalnih tehnika. Efikasnost i senzorni atributi kozmetičkih proizvoda nisu povezani. Podaci dobijeni senzornom karakterizacijom emolijenasa mogu biti iskorišćeni pri (pre)formulisanju kozmetičkog proizvoda željenih karakteristika. Reološka merenja čija je svrha predviđanje ponašanja emulzija prilikom aplikacije mogu se izvoditi na sobnoj temperaturi bez potrebe simuliranja realnih uslova kao što je temperatura kože. Teksturna analiza može da se koristi kao dovoljno osetljiva metoda u karakterizaciji i poređenju polučvrstih sistema, i ova jednostavna tehnika

može se izvoditi kao zamena za neka reološka merenja. APG mešani emulgator Montanov™ 202 pokazao je veliki potencijal u formiranju lamelarne (tečno- i gel-kristalne) faze. Pri radu sa njim treba voditi računa o izboru masnih komponenti, jer je ovaj potencijal smanjen u prisustvu nepolarnih ulja. Emulzioni nosači stabilizovani ovim emulgatorom (bez aktivnih supstanci) mogu obezbediti značajan produženi hidratišući efekat, a termogravimetrijska analiza može se sa visokim stepenom tačnosti koristiti za predviđanje vlažećeg efekta sistema u kojima nisu prisutne aktivne supstance iz grupe vlažećih agenasa. Emulzije stabilizovane Montanov-om™ 202 mogu se zbog zadovoljavajućeg kiselostabilnog potencijala koristiti kao nosači za kisele aktivne supstance, a dodatno je pokazano da podnose i veće količine alkohola u svom sastavu. Zbog povoljnog uticaja na stanje kožne barijere, vlažećeg efekta, povoljnog bezbednosnog profila i mogućnosti inkorporiranja različitih supstanci nosači na bazi ispitivanog emulgatora predstavljaju dobar izbor nosača pri formulisanju dermokozmetičkih preparata. Razvoj odgovarajućeg senzornog panela, a zatim upotreba standardizovanog seta instrumentalnih i senzornih testova, odnosno koncept uporedne reološke, teksturne i senzorne procene koji je korišćen u razvoju dermokozmetičkih emulzija može imati značajnu primenu u formulaciji i optimizaciji kozmetičkog proizvoda željenih/zadovoljavajućih karakteristika.

Ključne reči Senzorne osobine, reološka i teksturna merenja, dermokozmetički proizvodi/kozmetoaceutici, alkil poliglukozidni emulgatori, lamelarni tečni kristali, bioinženjering kože

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Kozmetologija

UDK broj: 57.085 : [687.55.2 : 615.451.2] (043.3)

544.016.2 : 543.572.3 (043.3)

Formulation development of moisturizing dermocosmetic emulsions: combined
rheological, textural and sensory analysis approach

ABSTRACT

Introduction A modern cosmetic product has to be formulated as a product with adequate safety and efficacy requirements and proper sensory characteristics. Taking into consideration the time and cost of performing a sensory analysis on one hand, and volunteers' subjective evaluation on the other, potential use of instrumental measurements in order to develop a product with desired sensory profile becomes a very interesting research field. As a contemporary science, cosmetology is focused on development of novel and improvement of the existing methods and techniques which could make products' formulation and raw materials' characterization easier. At the same time, suitable quality, safety and efficacy of a cosmetic product are imperative. Investigation of a novel alkyl polyglucoside (APG) emulsifier, along with consideration of the inherent structure, safety and efficacy of vehicles stabilized with this emulsifier considerably contribute to the mentioned requirements.

Aim The aim of this work was to investigate the potential use of instrumental techniques (rheological and textural measurements) in development of moisturizing dermocosmetic emulsions with appropriate sensory characteristics. For that purpose it was necessary to create a proper sensory panel. This panel altogether with certain instrumental measurements will present a standardised instrumentation kit which would be used in the process of formulation and optimization of emulsions' characteristics. Additionally, the aim of investigation was to elucidate mesomorphic behaviour of the long-chain C₂₀/C₂₂ APG emulsifier, as well as to develop a vehicle stabilized via this emulsifier with the employment of the standardised kit. In order to establish the possibility for this emulsifier to be used with acidic substances, potential use of glycolic and salicylic acid was investigated.

Methods Experimental work was organized in III phases: 1) Four W/O moisturizing emulsions were formulated with the variation in one component of the oil phase (one emollient was varied), and they were used to make standard instrumental and sensory tests and correlations between them. Rheological, textural and sensory analysis of the investigated cream samples were conducted in detail; additionally, sensory study for the used emollients was created and performed. 2) In order to better understand the stabilization mechanisms and behaviour of a novel APG emulsifier Montanov™ 202, series of binary and ternary systems were prepared and comprehensive physicochemical characterization was subsequently performed (microscopic analysis, X-ray diffraction under small and wide angle, rheological and textural analysis). Safety assessment was conducted in order to investigate samples irritation potential with the employment of *in vitro* citotoxicity assay. Based on the obtained results dermocosmetic O/W emulsions were formulated and investigated with both the previously mentioned techniques and the standardised set of instrumental and sensory tests, alongside with the selected bioengineering techniques. 3) With the use of a combined rheological, textural and sensory approach final dermocosmetic O/W emulsion was formulated, and the investigation of possibility to incorporate two model substances: salicylic and glycolic acids in the prepared vehicle was carried out in order to explore the emulsifier's acid stability. Creams with active substances were subjected to further research: (i) investigation of physicochemical stability with the use of microscopic analysis, pH and electrical conductance measurements, rheological and thermal analysis; ii) sensory characteristics were investigated with developed standardised kit; and iii) short-term hydrating effect was investigated with the use of bioengineering techniques.

Results The prepared moisturizing dermocosmetic W/O emulsions showed satisfying physical stability and efficacy. The change in the oil phase composition induced alterations in continual and oscillatory rheological results, and based on the obtained rheological results samples could be differentiated in two groups. The rank order obtained for all textural attributes was in agreement with the rank

determined within rheological parameters, along with a high level of correspondence between certain rheological and textural values. Certain sensory characteristics, like shine, oiliness and residual coating for the investigated cream samples were very much alike, while for the other sensory attributes more or less significant differences were found. Score distribution for certain emulsion characteristics matches corresponding results of emollients' sensory analysis. Based on the obtained data it was observed that among instrumental and sensory results, in several cases, direct and important correlations exist. Binary and ternary systems based on the investigated APG emulsifier revealed that this emulsifier has a great potential in lamellar phase formation, and that there is a synergism between the two main types of lamellar phases in such systems: the liquid crystalline and the gel crystalline one. Differences in the structure of ternary systems which were manifested with different polarization micrographs, thermal and rheological behaviour, have shown that the presence of paraffin oil in the system decreases the amount of lamellar phase formation. Results obtained by *in vitro* and *in vivo*, safety and efficacy evaluation, respectively, indicate a satisfying safety profile and high hydrating potential for vehicles stabilized with the investigated emulsifier. Finally, investigation of the active samples (with active substances) confirmed their satisfying physicochemical stability. Sensory evaluation study excluded differences between the samples differing in active substances, while the *in vivo* study confirmed the moisturization effect and preliminary safety of the investigated samples.

Conclusion Sensory attributes of an emulsion could be predicted by instrumental (rheological and textural) measurements to some extent, hence, time and money consuming sensory studies could be simplified with such use of instrumental techniques. Efficacy and sensory characteristics of a product are not related. Recognition of emollient sensory attributes could be very useful in formulation, particularly reformulation of cosmetic products, in order for certain sensory characteristics to be achieved. Rheological measurements conducted with the aim to predict emulsions application behaviour could be performed at room

temperature, i.e. there is no need for simulation of in-use conditions like skin temperature. Textural analysis, as a fairly simple measurement, can be used as a surrogate for rheological measurements, in order to characterize or compare semisolid systems regarding their mechanical and structural properties. The investigated mixed APG emulsifier proved to possess high potential in lamellar (the liquid crystalline and the gel crystalline) phase formation. When about to formulate products with the investigated emulsifier the importance of the oil phase selection is apparent, since it was demonstrated that in the presence of a non-polar oil, the stability of the obtained mesophases appears to be compromised. Emulsion vehicles stabilized with this emulsifier could provide significant hydrating effect, and thermogravimetric analysis could be used with the high level of convenience to predict the moisturizing effect of an emulsion without active conditioning agents. Regarding the acid stability of systems stabilized with Montanov™ 202, these vehicles could be successfully used for acidic active substances; moreover, a certain amount of isopropyl alcohol can also be incorporated into these vehicles. Emulsions based on the investigated emulsifier did not alter skin barrier, had satisfying moisturizing effect and safety profile and therefore present a good choice for dermocosmetic products formulations. Developed sensory panel and standardized instrumental and sensory tests, in other words a concept which combines rheological, textural and sensory evaluation used in this work to develop the final dermocosmetic emulsion could have considerable application when formulating a cosmetic product with desirable/applicable characteristic.

Keywords Sensory characteristics, rheological and textural measurements, dermocosmetic products, alkyl polyglucoside emulsifiers, lamellar liquid crystal, bioengineering techniques

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Cosmetology

UDK No: 57.085 : [687.55.2 : 615.451.2] (043.3)

544.016.2 : 543.572.3 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1. 1. Senzorna procena kozmetičkih proizvoda	2
1. 1. 1. Senzorne osobine	2
1. 1. 2. Kozmetički proizvodi i pet čula	4
1. 1. 3. Vrste senzornih studija/testova.....	5
1. 1. 3. 1. Diskriminativni test.....	6
1. 1. 3. 2. Test deskriptivne analize	6
1. 1. 3. 3. Afektivni test/test potrošača	8
1. 1. 3. 4. Zahtevi za senzorne studije	9
1. 2. Reološka procena kozmetičkih proizvoda.....	11
1. 2. 1. Reologija kozmetičkih emulzija.....	11
1. 2. 2. Značaj reoloških osobina emulzionih sistema	18
1. 3. Primena teksturne analize	19
1. 4. Dermokozmetičke emulzije sa vlažećim efektom.....	21
1. 4. 1. Vlažnost/hidratisanost kože.....	21
1. 4. 2. Suva koža.....	23
1. 4. 3. Ovlaživači kože ili hidratantni proizvodi.....	24
1. 4. 4. Kondicionirajuća sredstva	26
1. 4. 5. Hidroksi kiseline.....	28
1. 4. 6. Alkil poliglukozidni emulgatori	30
1. 5. Efekti kozmetičkih proizvoda na koži	32
1. 5. 1. Ispitivanje vlažećeg efekta kozmetičkih proizvoda	33
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	38

3. EKSPERIMENTALNI DEO	42
3. 1. Materijali i metode	42
3. 1. 1. Materijali	42
3. 1. 2. Metode i oprema.....	45
3. 1. 2. 1. Formulacija, ispitivanje fizičke stabilnosti, procena uticaja promene sastojka masne faze na senzorne, reološke i teksturne osobine i ispitivanje efikasnosti voda u ulju (V/U) emulzija namenjenih vlaženju kože	45
3. 1. 2. 1. 1. Izrada V/U emulzija namenjenih vlaženju kože	46
3. 1. 2. 1. 2. Procena fizičke stabilnosti V/U emulzija.....	47
3. 1. 2. 1. 3. Procena uticaja promene sastojka masne faze na senzorne, reološke i teksturne osobine V/U emulzija.....	48
3. 1. 2. 1. 4. Ispitivanje efikasnosti V/U emulzija	53
3. 1. 2. 2. Ispitivanje mehanizama stabilizacije, koloidne strukture i bezbednosti emulzionih sistema sa APG emulgatorom – Montanov™ 202	56
3. 1. 2. 2. 1. Izrada binarnih i ternarnih sistema.....	57
3. 1. 2. 2. 2. Fizičko-hemijska karakterizacija binarnih i ternarnih sistema	58
3. 1. 2. 2. 3. In vitro ispitivanje bezbednosti (iritacionog potencijala) izrađenih ternarnih sistema.....	61
3. 1. 2. 3. Procena uticaja različitih sastojaka masne faze na stabilnost, strukturu, teksturne i senzorne osobine i efikasnost model kremova sa emulgatorom Montanov™ 202	62
3. 1. 2. 3. 1. Izrada model kremova tipa ulje u vodi (U/V) sa različitim sastavom masnih faza.....	62
3. 1. 2. 3. 2. Fizičko-hemijska karakterizacija model kremova.....	63
3. 1. 2. 3. 3. Procena uticaja promene sastava masne faze model kremova na teksturne i senzorne osobine	63

3. 1. 2. 3. 4. Ispitivanje vlažećeg efekta model kremova	64
3. 1. 2. 4. Razvoj formulacije dermokokozmetičkih emulzionih nosača tipa U/V sa vlažećim efektom uz emulgator Montanov™ 202	66
3. 1. 2. 4. 1. Izrada formulisanih dermokokozmetičkih emulzija tipa U/V	67
3. 1. 2. 4. 2. Ispitivanje uticaja kiselih kozmetički aktivnih supstanci i izopropil alkohola na koloidnu strukturu, stabilnost i teksturne i senzorne karakteristike dermokokozmetičkog model nosača.....	68
3. 1. 2. 4. 3. Ispitivanje efikasnosti dermokokozmetičkih emulzija U/V tipa.....	69
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	71
4. 1. Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog rada.....	71
4. 1. 1. Formulacija i procena fizičke stabilnosti V/U emulzija namenjenih vlaženju kože	71
4. 1. 2. Procena uticaja promene sastojka masne faze na senzorne, reološke i teksturne osobine V/U emulzija.....	76
4. 1. 2. 1. Reološka merenja.....	76
4. 1. 2. 2. Teksturna analiza.....	86
4. 1. 2. 3. Senzorna procena ispitivanih uzoraka V/U emulzija i emolijenasa u njihovom sastavu	90
4. 1. 3. Efikasnost V/U emulzija.....	97
4. 2. Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada	102
4. 2. 1. Ispitivanje mehanizama stabilizacije, koloidne strukture i bezbednosti emulzija sa APG emulgatorom – Montanov™ 202.....	102
4. 2. 1. 1. Mikroskopska analiza binarnih i ternarnih sistema.....	102
4. 2. 1. 2. Rezultati WAXD i SAXD merenja binarnih i ternarnih sistema	105
4. 2. 1. 3. Termalna analiza binarnih i ternarnih sistema	108
4. 2. 1. 4. Rezultati reoloških merenja binarnih i ternarnih sistema.....	114

4. 2. 1. 5. In vitro procena bezbednosti ternarnih sistema sa ispitivanim APG emulgatorom.....	118
4. 2. 2. Procena uticaja različitih masnih faza na stabilnost, strukturu, senzorne osobine i vlažeći efekat model kremova uz Montanov™ 202.....	119
4. 2. 2. 1. Uticaj različitih masnih faza na fizičkohemijske karakteristike model kremova.....	119
4. 2. 2. 2. Uticaj različitih masnih faza na senzorne osobine model kremova.....	129
4. 2. 2. 3. Uticaj različitih masnih faza na vlažeći efekat model kremova.....	132
4. 3. Rezultati i diskusija III faze eksperimentalnog rada.....	135
4. 3. 1. Ispitivanje uticaja kiselih aktivnih supstanci i izopropil alkohola na koloidnu strukturu, stabilnost i karakteristike model krem nosača uz emulgator Montanov™ 202.....	135
4. 3. 2. Ispitivanje efikasnosti dermokozmetičkih emulzija U/V tipa.....	150
5. ZAKLJUČAK.....	155
6. LITERATURA.....	159
7. PRILOZI.....	172

1. UVOD

Savremeni kozmetički proizvod treba da ispuni niz zahteva koje, sa jedne strane, postavljaju važeći propisi, kakva je Uredba EU 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima (Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products), a sa druge strane, sami korisnici/potrošači. Efikasnost i bezbednost kozmetičkog proizvoda treba da bude potvrđena i dokazana da bi se našao na tržištu. Ipak, treba naglasiti da su sa stanovišta prihvatljivosti od strane korisnika daleko važnije senzorne karakteristike, štaviše one sa aspekta prodaje proizvoda, imaju najveći značaj (Wortel i Wiechers, 2000). Ispunjavanje očekivanja potrošača, koja se pre svega odnose na senzorne karakteristike, postalo je imperativ kako u kozmetičkoj, tako i u prehrambenoj industriji, a ovome je sve veća pažnja posvećena i u razvoju farmaceutskih preparata. Istraživanja vezana za ljudsku percepciju danas privlače veliku pažnju kako zbog naučnih tako i iz praktičnih razloga (Rossi and Berglund, 2011).

Poznato je da su primena i prihvatljivost polučvrstih proizvoda u velikoj meri zavisne od osobina koje proizvod pokazuje pri proticanju i ovo je razlog što se sve veća pažnja posvećuje mogućnosti upotrebe klasičnih metoda, kao što je reologija, u razvoju završnog proizvoda prihvatljivog za potrošača (Trapp, 2007; Park i Song, 2010). Pored reoloških merenja, teksturna analiza je još jedna klasična metoda koja bi mogla imati veći značaj u razvoju proizvoda „po meri“ korisnika (Masmoudi i sar., 2009; Lemaitre-Aghazarian i sar., 2004).

Kada se govori o zahtevima potrošača, neophodno je naglasiti i to da su oni, kao i regulatorna tela (novi propisi), sve više fokusirani na dobrobit kozmetičkih proizvoda u odnosu na korisnike i njihov uticaj na humano zdravlje i životnu sredinu. Ovo je dovelo do razvoja i istraživanja u oblasti novih prirodnih sirovina,

funkcionalnih sastojaka i savremenih nosača. Među novijim kozmetičkim sirovinama od značaja za formulaciju brojnih kozmetičkih emulzija, posebno se ističe grupa alkil poliglukozidnih (APG) emulgatora (Patravale i Mandawgade, 2008). Premda su predmet brojnih istraživanja, interesovanje za ovu grupu supstanci se ne smanjuje jer svaki novi APG emulgator zahteva detaljno ispitivanje, kako u smislu rasvetljavanja mehanizama stabilizacije, tako i ispitivanja karakteristika sistema sa tim APG emulgatorom (Savic i sar., 2009; Mehling i Hensen, 2004; Stubenrauch, 2001).

Mogućnost upotrebe instrumentalnih metoda (reološka i teksturna merenja) u optimizaciji senzornih karakteristika, predstavlja u tom smislu veliki izazov. Dodatno, razvoj novih nosača sa APG emulgatorom na kojima će biti primenjen kombinovani koncept formulisanja da bi se obezbedili odgovarajući zahtevi u pogledu stabilnosti, efikasnosti, bezbednosti i estetske prihvatljivosti kozmetičkih proizvoda, mogao bi da doprinese savremenim istraživanjima u polju kozmetologije.

1. 1. Senzorna procena kozmetičkih proizvoda

1. 1. 1. Senzorne osobine

Miris kafe, ukus sladoleda, zvuk koji se čuje pri otvaranju šampona, tekstura džempera, miris kondicionera za kosu, osećaj na koži koji ostaje nakon utrljavanja losiona za telo, sve ovo, kao i još mnogo toga aktivira naša čula. Senzorna procena se najbolje može opisati kao naučni metod koji se koristi za izazivanje, merenje, analizu i tumačenje onih odgovora na proizvod koji se registruju čulima vida, mirisa, dodira, ukusa i sluha (Anonimni 1975). Dakle, senzorne osobine/karakteristike proizvoda su sve one osobine koje stimulišu neko od naših čula (Slika 1).

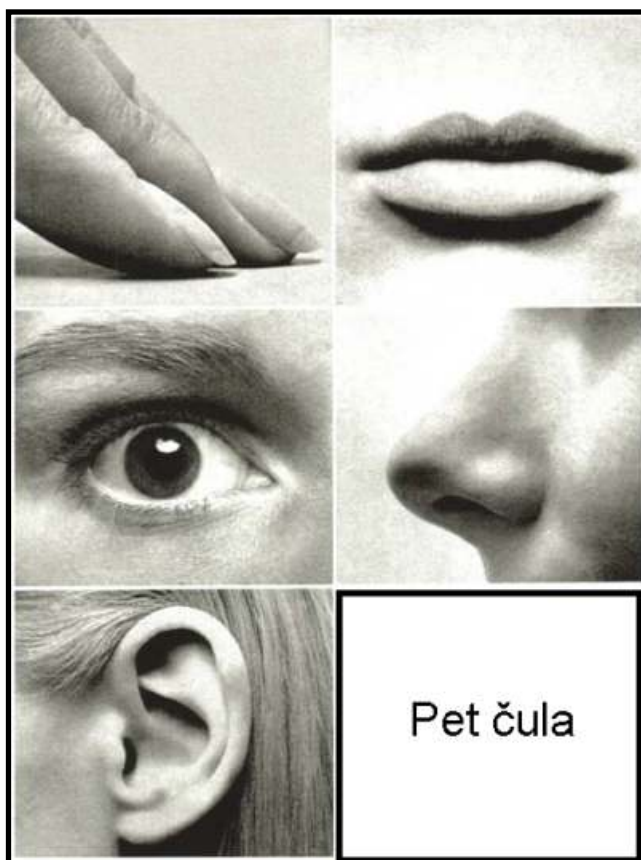
Premda se pojavila tek četrdesetih godina prošlog veka, senzorna procena je postala interesantna disciplina koja se konstantno razvija. Danas je prepoznata

kao naučna oblast koja zahteva znanja i veštine iz različitih oblasti, kao što su biološke nauke, psihologija, eksperimentalni dizajn i statistika.

Kompletna senzorna karakterizacija kojom se dobija tzv. senzorni otisak (profil) proizvoda podrazumeva sprovođenje dobro pripremljenih i organizovanih studija koje mogu obuhvatati izvođenje i subjektivnih i objektivnih testova. Uspešna senzorna procena postiže se postavljanjem jasnih ciljeva, razvojem odgovarajuće eksperimentalne strategije i dizajna, kao i primenom odgovarajućih statističkih tehnika uz oslanjanje na dobru etičku praksu (Kemp i sar., 2009).

Bez obzira na obim studije ili primenjene testove konačni cilj senzorne studije je da dovede u vezu senzorne karakteristike proizvoda sa njegovim hemijskim, fizičkim, formulacionim ili procesnim osobinama i na taj način omogući razvoj proizvoda koji odgovara, odnosno ispunjava zahteve potrošača. Danas, u saradnji sa istraživanjem i razvojem, odnosno sa marketinškim odeljenjem senzorne studije su osnov razvoja i komercijalnih strategija proizvoda.

Stručnjaci iz oblasti senzorne procene mogu biti pozvani kao važni savetodavci u bilo kojoj fazi životnog ciklusa proizvoda, kako u fazi njegovog inicijalnog osmišljavanja, tako i u fazi kada se on već uveliko nalazi na tržištu. Tako u ranim fazama razvoja proizvoda senzorne studije omogućavaju identifikaciju važnih senzornih karakteristika koje su osnov prihvatljivosti u određenoj kategoriji proizvoda.



Slika 1. Pet čula

1. 1. 2. Kozmetički proizvodi i pet čula

Značaj senzornih karakteristika kozmetičkih proizvoda je neosporan. Bilo da smo toga svesni ili ne, svako naše čulo može biti pokrenuto kozmetičkim proizvodom.

Čulo vida je svakako „najbrže“ čulo i najznačajnije s obzirom da pokreće sva druga opažanja i instinktivne reakcije. Osobine kozmetičkog proizvoda koje su od značaja kada je reč o čulu vida jesu **izgled ambalaže i pakovanja**, i oni često u izboru potrošača između brojnih kozmetičkih proizvoda iste namene imaju presudan značaj.

Čulo sluha ima glavnu ulogu u oralnoj komunikaciji, esencijalnoj ljudskoj aktivnosti, zbog čega i čulo sluha spada u jedno od najvažnijih čula. Ono što se možemo zapitati jeste, da li ono ima značaja kada su u pitanju senzorne osobine kozmetičkih proizvoda? Najvažnija akustična osobina kozmetičkih proizvoda odnosi se na ambalažu, odnosno **zvuk koji se čuje pri njenom otvaranju i zatvaranju**. Kada je sam proizvod u pitanju od značaja je zvuk koji može da se čuje pri interakciji proizvoda sa kožom ili kosom. Premda nisu od presudnog značaja pri izboru (posebno ne pri inicijalnom izboru) proizvoda akustične osobine doprinose konačnoj odluci da li nam se neki proizvod dopada tj. da li ćemo ga ponovo koristiti.

Olfaktorno čulo, odnosno čulo mirisa je distalno čulo čije prisustvo potrošači svesno jedva prepoznaju, ali je ono prisutno i nesvesno uvek upamćeno. Ovo čulo je veoma povezano sa emocijama, pri čemu utiče na raspoloženje i konačno individualnu ocenu svakog proizvoda. **Miris kozmetičkih proizvoda** ima izuzetno veliku ulogu, pri čemu se u ovom kontekstu uopšte ne diskutuje miris proizvoda čija je uloga parfemisanje tela. Kao i čulo vida ovo čulo može imati presudnu ulogu u tome da li se neki proizvod ili brend potrošaču dopada ili ne.

Čulo ukusa za čiju je senzaciju neophodan kontakt proizvoda sa ustima i posredno sa jezikom, od značaja je za ruževe i proizvode za negu usana, kao i za kozmetičke proizvode namenjene oralnoj nezi.

Čulo dodira je proksimalno čulo za koje je neophodan kontakt. Za kozmetičke proizvode ovo je najznačajnije čulo, osećaji koji se javljaju **u kontaktu sa proizvodom**; neposredno pre njegove aplikacije u fazi uzimanja (*pick up* faza), utrljavanja (*rub in* faza) i nakon nanošenja (*after feel* faza) čine osnov senzornog profila kozmetičkih proizvoda namenjenih nezi i zaštiti kože.

Činjenica je da se potrošači emotivno vezuju za kozmetičke proizvode, a senzorne karakteristike mogu da stvore tu emotivnu vezu odnosno mogu pozitivno da stimulišu jedno ili više čula. S toga ne čudi da veliki broj istraživača radi na razvoju i usavršavanju senzornih studija (Wortel i Wiechers, 2000; Almeida i sar., 2008; Husson i sar., 2007; Parente i sar., 2010). Pored usavršavanja postojećih i razvoja novih tehnika značajno mesto u senzornim studijama zauzimaju i matematičko tj. kompjutersko modelovanje (Koehl i sar., 2008; Nakano i sar., 2010; Zeng i sar., 2008).

1. 1. 3. Vrste senzornih studija/testova

Senzorne studije sprovode se sa ciljem: (i) razumevanja očekivanja ciljne grupe potrošača, (ii) poređenja sa konkurentskim proizvodima i vodećim brendovima i (iii) pronalaženja prednosti i nedostataka postojećeg proizvoda da bi se dobile sugestije za njegovo poboljšanje.

U senzornim procenama postoje dve osnovne kategorije testiranja: objektivni i subjektivni testovi. U objektivnim testovima senzorne karakteristike/atribute proizvoda procenjuju odabrani i/ili trenirani panelisti (Kemp i sar., 2009). Dve osnovne grupe objektivnih testova su: *diskriminativni testovi* kojima se utvrđuje postojanje razlika u senzornim atributima i *deskriptivni testovi ili testovi deskriptivne analize* kojima se identifikuje priroda senzornih razlika i/ili obim razlike.

Subjektivni testovi poznati su kao *afektivni ili potrošački testovi* koji se sprovode na neobučanim ispitanicima. Ovi testovi mere reakciju potrošača na senzorne karakteristike proizvoda i na ovaj način se sakupljaju podaci o prihvatljivosti, željama i očekivanjima potrošača.

1. 1. 3. 1. Diskriminativni test

Kada je potrebno utvrditi postojanje razlike (ili sličnosti) između dva ili više uzoraka izvode se ovi testovi. Predstavljaju brzu tehniku koju mogu sprovoditi i neiskusni i iskusni ispitanici i uglavnom se koriste za: odabir i treniranje ispitanika, ispitivanje kvarljivosti, utvrđivanje praga osetljivosti, obezbeđenje kvaliteta/kontrolu kvaliteta, ispitivanje uticaja promene sastojka/proizvodnog procesa i preliminarnu procenu.

Diskriminativni testovi mogu biti testovi ukupne razlike (gde ispitanici mogu koristiti sve dostupne informacije za donošenje konačnog suda o proizvodu) i atribut specifični testovi (u kojima se ispitanici fokusiraju na jedan specifičan atribut).

1. 1. 3. 2. Test deskriptivne analize

Deskriptivnom analizom karakterišu se senzorne osobine proizvoda. Na ovaj način senzorne osobine proizvoda mogu biti precizno opisane, a senzorne razlike između proizvoda mogu biti i opisane i kvantifikovane. Dobijeni kvantitativni deskriptivni podaci mogu se tumačiti u kombinaciji sa rezultatima potrošačkih studija, čime se dobijaju informacije značajne za razumevanje onoga što pokreće čula i što dovodi do toga da nam se nešto dopada. Takođe, ovi podaci povezani sa formulacijom proizvoda i instrumentalnim merenjem, mogu objasniti na koji način hemijske i fizičke komponente proizvoda mogu uticati na senzorne karakteristike (Kemp i sar., 2009).

Ključni koraci u izvođenju deskriptivne analize su:

1. Odabir i obuka panelista – mali broj dobro obučanih panelista.
2. Formiranje atributa i referenci – upoznavanje sa svim atributima i terminologijom koja će biti korišćena, korigovanje liste atributa i terminologije i konačno dogovor oko tzv. senzornog leksikona jasno definisanih termina (ovo uključuje naziv atributa, definiciju i metod procene).

2. Utvrđivanje protokola procene – uključuje način na koji je neophodno ispitati proizvod da bi se proučio svaki atribut, dužinu ispitivanja svakog atributa, redosled procene, kao i način na koji se vrši resetovanje čula, odnosno njihovo vraćanje u neutralno stanje između ispitivanja dva uzorka.
3. Intenzitet ocenjivanja – da bi proizvod bio adekvatno procenjen, svaki atribut mora biti evaluiran ocenjivanjem njegovog intenziteta na skali. Ovaj proces se sastoji od nekoliko etapa koje se razlikuju u zavisnosti od metode i tipa upotrebene skale: dizajniranje skale (apsolutna i relativna skala), određivanje opsega intenziteta skale, označavanje skale (brojevi ili slova) i obučavanje panelista u savladavanju intenziteta ocenjivanja.
4. Provera učinka – odnosi se na sprovođenje kompletnog protokola studije i obradu dobijenih rezultata na reprezentativnim uzorcima.
5. Sakupljanje podataka.
6. Analiziranje podataka i pisanje izveštaja.

Da bi se postigli željeni rezultati, odnosno dobile odgovarajuće informacije, u deskriptivnoj analizi se koriste različite metode (*ASTM Committee E 18. Manual on Descriptive Analysis Testing for Sensory Evaluation*, 1992). Mnoge laboratorije u kojima se sprovode senzorne studije koriste modifikovane verzije postojećih metoda (modifikovane studije) koje su prilagođene njihovim specifičnim potrebama. Među brojnim metodologijama posebno se ističu: koncenzusno profajliranje, mirisno profajliranje®, teksturno profajliranje®, kvantitativna deskriptivna analiza®, spektrum™ metod, profajliranje po slobodnom nahođenju, blic profajliranje i dr.

Kada je reč o senzornim ispitivanjima kozmetičkih proizvoda namenjenih nezi i zaštiti kože (tipa krema i losiona) među navedenim metodologijama **kvantitativna deskriptivna analiza** ima najveći značaj. Kvantitativna deskriptivna analiza je razvijena sa ciljem dobijanja deskriptivnih podataka koji se mogu statistički obrađivati i na ovaj način se može dobiti kompletan kvantitativni i kvalitativni senzorni opis proizvoda (Stone i Sidel, 2004).

1. 1. 3. 3. Afektivni test/test potrošača

Testiranjem potrošača procenjuje se subjektivni odgovor na proizvod. Upotrebom i kvalitativnih i kvantitativnih metodologija, istraživači mogu dobiti uvid u potrošačke želje, gledišta, mišljenje, ponašanje i opažanja koja se tiču proizvoda. Zbog toga su ovi testovi ključni deo razvoja proizvoda, a veoma su korisni pri pozicioniranju brenda, komunikaciji i reklamiranju.

Pre izvođenja potrošačkog testa veoma je važno razmotriti broj i tip ispitanika. Za kvantitativne testove neophodan je veliki broj ispitanika (najmanje 100), a faktori koji su od značaja pri izboru potrošača su: geografski region, demografija, psihografija, životni stil/stanje, upotrebljavanje/neupotrebljavanje proizvoda. Nesumnjivo, najznačajnija stvar pri izvođenju ove vrste testova su upitnici, jer istraživanje među potrošačima uvek uključuje popunjavanje neke vrste upitnika (Brace, 2004). Zbog toga je dizajniranje upitnika veoma važna faza u ispitivanju i pri tome je neophodno razmotriti sledeće:

- Cilj istraživanja koji definiše tip upitnika kao i mesto njegovog primenjivanja. Trebalo bi postavljati samo pitanja koja su vezana za cilj istraživanja.
- Tip upitnika odnosno definisanje strukture (strukturirani ili polustrukturirani upitnik) i načina popunjavanja upitnika (samopopunjavanje ili ispitivanje tipa intervjua licem-u-lice sa istraživačem).
- Izgled/forma upitnika koja treba da prati logičan sled i da daje osnov za intervju licem-u-lice, a posebnu pažnju treba obratiti na redosled pitanja (npr. ranija pitanja, odnosno odgovori na njih ne smeju da utiču na kasnije postavljena pitanja; osetljiviji podaci treba da budu ispitani pri kraju kada je ispitanik opušteniji itd).
- Tip pitanja koja će se naći u upitniku su uslovljena ciljem ispitivanja, i sva pitanja se mogu podeliti u tri osnovne kategorije: bihevioralna, pitanja stava ispitanika (atitudionalna) i klasifikaciona pitanja.

1. 1. 3. 4. Zahtevi za senzorne studije

1. Profesionalno izvođenje senzornih studija sa posebnim osvrtom na zdravlje, bezbednost, etička i zakonska pitanja ispitanika je od izuzetnog značaja s obzirom na činjenicu da u zavisnosti od toga šta se ispituje u senzornim studijama može doći do ozbiljnih povreda pa čak i smrti (npr. u slučaju trovanja hranom ili ingestije toksičnih sastojaka). Zbog ovoga je neophodno razmotriti sve aspekte opisima. Zakoni i propisi koji se mogu primenjivati u senzornim studijama, u zavisnosti od ispitivanog proizvoda su: Nirnberški kodeks (1949) za etiku u medicinskim istraživanjima, Helsinška deklaracija (Svetska zdravstvena asocijacija 2004) i Evropska uredba 2001/20/EC (EU 2001) i 2005/28/EU (EU 2005) za dobru kliničku praksu u kliničkim ispitivanjima.

2. Poseban aspekt u senzornim studijama čine dobra radna i laboratorijska praksa. Generalno, očekuje se da svaki rad u laboratoriji bude u skladu sa gore pomenutim smernicama i treba da predstavlja deo lokalne regulative svake laboratorije, ali se ovome posvećuje posebna pažnja u studijama gde se ispituje hrana.

3. Osnovno što je neophodno definisati jesu tip i obim očekivanih ispitivanja da bi se procenila neophodna sredstva, koja uključuju novčana sredstva, osoblje, objekte i opremu. Jasno je da u zavisnosti od tipa i obima studije zahtevi za svako od sredstava mogu varirati. Tako, npr. klasičan senzorni tim čine: menadžer, senzorni analitičar, vođa panela, tehničar, ispitivač potrošača, statističar i ispitanici. Članovi tima mogu obavljati više uloga pa tako ovaj tim mogu činiti samo jedan istraživač i ispitanici. Ono što je bitno to je da svi članovi tima imaju neophodna znanja i obuku za ispunjavanje svojih zadataka.

4. U senzornim studijama posebna pažnja je posvećena zahtevima za uzorke koji se ispituju. Da uzorci ne bi bili dodatni izvor varijabilnosti u studiji veoma su značajni aspekti pripreme (materijali koji se koriste pri izradi uzorka, oprema i posuđe, kao i metode izrade) i prezentacije uzoraka (količina i temperatura uzorka, posuda za uzorak, kodiranje/označavanje uzoraka, broj i redosled uzoraka).

5. Konačno, najznačajniju grupu zahteva predstavljaju oni koji se odnose na ispitanike, jer oni predstavljaju najvažniji faktor u senzornoj studiji. Rekrutovanje ispitanika zavisiće od tipa i broja neophodnih ispitanika. Reklamiranje predstavlja efikasan način za okupljanje velike ciljne grupe, a svakako je korisno prilikom bilo kog oblika regrutacije. Direktno regrutovanje može se vršiti direktnim obraćanjem ljudima, bilo licem u lice ili telefonski, a preporuka je veoma korisna prilikom proširivanja treniranog panela ispitanika. Nezavisno od daljeg toka ispitivanja inicijalno je neophodno doneti odluku o tome da li će se koristiti interni ili eksterni ispitanici. Premda korišćenje bilo koje grupe ima svoje prednosti i nedostatke, treba znati na koji način bilo koja od pomenutih grupa utiče na dobijene rezultate.

Svi potencijalni učesnici, bez obzira na način regrutovanja, moraju biti provereni („filtrirani“) pre finalnog odabira. Kriterijumi na kojima se zasniva selekcija zavise od tipa testa i mogu biti i veoma prosti i zasnivati se na ličnim sposobnostima. Kao što je već bilo pomenuto panel mogu činiti naivni (neobučeni senzorni panel ili potrošači) ili trenirani ispitanici (obučeni panel).

Neobučeni/netrenirani senzorni panel se koristi u veoma jednostavnim senzornim studijama zbog čega su i kriterijumi za selekciju ovih ispitanika veoma niski. Za razliku od njih učesnici obučenog/treniranog panela moraju pokazati odgovarajuće karakterne osobine i stavove. Generalno, učesnici ovih panela bi trebalo da pokazuju dobar timski rad, imaju široka shvatanja, da su pozitivni, imaju dobre komunikativne osobine, da su posvećeni i fleksibilni. Takođe, neophodno je da imaju bar normalnu senzornu osetljivost sa aspekta opažanja stimulusa, uočavanja razlike između stimulusa i prepoznavanja i opisivanja stimulusa. Sama obuka/trening ispitanika, njen obim i dužina trajanja zavisiće od metode koja se koristi u studiji. Kod nekih metoda (potrošački testovi) obuku predstavlja samo jasan opis samog metoda ili, u slučaju korišćenja upitnika, obuka potpuno izostaje. Za razliku od ovih studija u deskriptivnim testovima obuka može potrajati i više nedelja.

6. Poslednji, ali svakako neophodni zahtevi odnose se na sakupljanje podataka. Senzornim profesionalcima su dostupni različiti metodi sakupljanja

podataka (u papirnom obliku, kompjuterski sistemi, portabl i internet sistemi i kvalitativna istraživanja) u zavisnosti od cilja projekta i finansijske konstrukcije.

1. 2. Reološka procena kozmetičkih proizvoda

Kremovi zajedno sa mastima spadaju u grupu najstarijih farmaceutskih oblika, ali i procentualno najzastupljeniji oblik kozmetičkih proizvoda različite namene (Junginger, 1984). Premda se primenjuju vekovima, rasvetljavanje njihove koloidne (mikro)strukture počelo je tek osamdesetih godina prošlog veka. Ovome su doprinele različite fizičko-hemijske metode, kao što je difrakcija X zraka pod malim uglom (Junginger i sar., 1979; Junginger, 1984), diferencijalna skenirajuća kalorimetrija i termogravimetrija (Junginger, 1984), transmisiona elektronska mikroskopija (Junginger, 1984; Patel i sar., 1985) i laserska Raman spektroskopija (Louden i sar., 1985). Ipak, najveći značaj sa aspekta karakterizacije strukture polučvrstih sistema, kao i kozmetičkih proizvoda, imaju reološke karakteristike, odnosno reološko ponašanje kozmetičkih kremova.

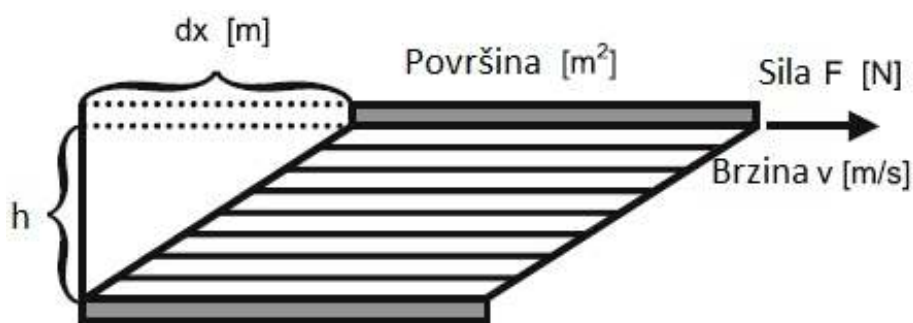
1. 2. 1. Reologija kozmetičkih emulzija

Reologija je nauka o deformaciji ili proticanju materijala pod dejstvom stresa pri kontrolisanim uslovima. Reologija se uglavnom bavi tečnostima, odnosno čvrstim telima koja će pre proticati nego se elastično deformisati (Laba, 1993). Realni materijali, koji su najčešće kozmetičku proizvodi, pokazuju reološko ponašanje koje ih svrstava u grupu između tečnosti i čvrstih tela i zato što ispoljavaju i elastične i viskozne osobine nazivaju se **viskoelastičnim** telima (Brummer, 2006).

Pod dejstvom stresa odnosno spoljašnje sile dolazi do promene položaja čestica materijala, i ove promene definišu se kao **napon**. Vrsta i obim napona predstavljaju karakteristične osobine datog materijala. Najjednostavniji model

kojim se ilustruju reološke osobine i koji može da posluži u upoznavanju sa osnovnim definicijama je model paralelnih ploča (Slika 2).

Posmatraju se dve paralelne ploče između kojih se nalazi materijal debljine h (m) (Laba, 1993). Gornja ploča površine A (m²) kreće se pod dejstvom sile F (N), brzinom v (m/s) i izaziva laminarno (slojevito) pomeranje.



Slika 2. Model paralelnih ploča (preuzeto iz Brummer, 2006)

Odnos sile i površine predstavlja **prinosni napon** (eng. *shear stress*):

$$\tau = F / A \text{ (N/m}^2 \text{ = Pa)}$$

Odnos brzine v i debljine h je **brzina smicanja** (eng. *shear rate*):

$$\dot{\gamma} = v / h \text{ (1/s)}$$

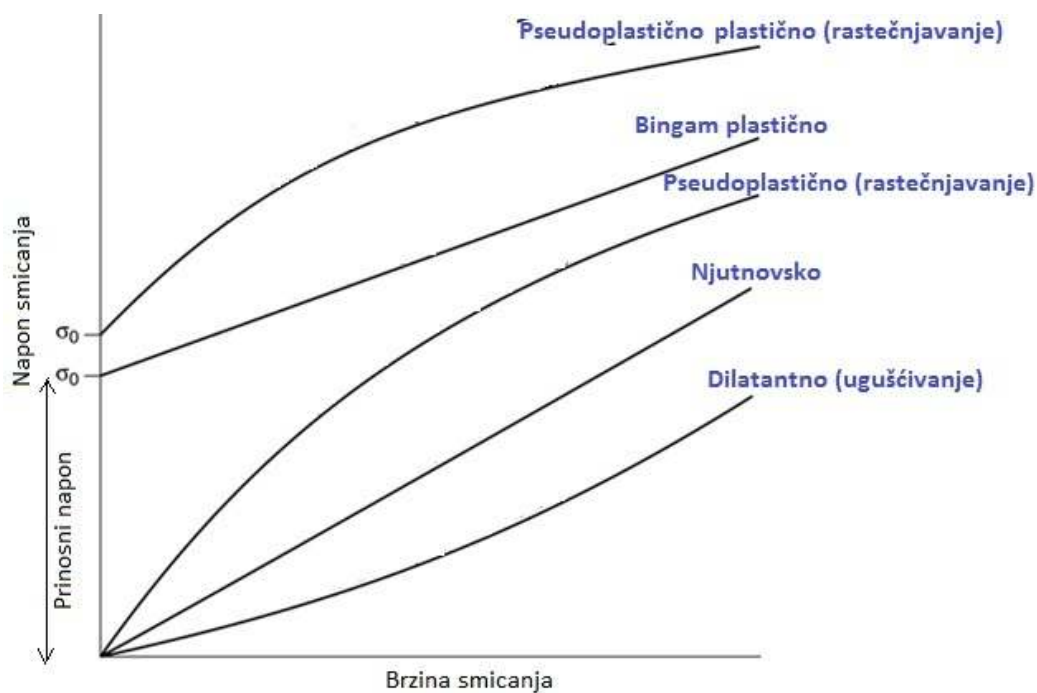
Nastala **deformacija (napon)** je:

$$\gamma = dx / h \text{ (bezdimezionalan)}$$

Odnos prinosnog napona i brzine smicanja predstavlja **viskozitet**:

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \text{ (Pa}\cdot\text{s)}$$

Korelacija između napona i brzine smicanja definiše način, odnosno ponašanje prilikom proticanja (eng. *flow behaviour*) sistema. Grafički se reološko ponašanje prikazuje reogramom ili krivom proticanja kao zavisnost napona (ordinata) od brzine proticanja (apscisa). Za svaku definisanu brzinu smicanja meri se rezultujući napon smicanja koji se koristi za preračunavanje viskoziteta. Slika 3 prikazuje izgled reograma osnovnih tipova proticanja.



Slika 3. Različiti tipovi proticanja, napon smicanja u funkciji brzine smicanja

Idealni viskozni sistemi, prave (Njutnovske) tečnosti pokazuju tzv. **Njutnovsko ponašanje** prilikom proticanja, odnosno za različite brzine proticanja dobijaju se konstantne vrednosti viskoziteta. Odnos između napona i brzine smicanja koji se dobija predstavlja Njutnov zakon viskoziteta:

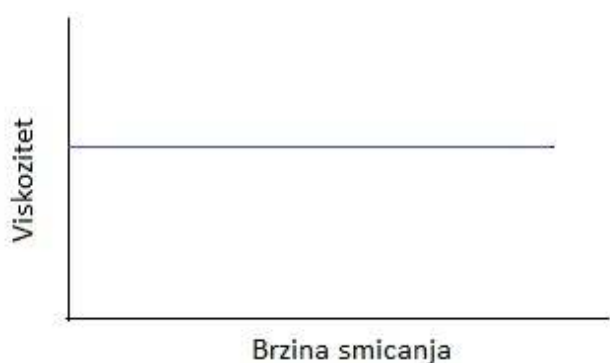
$$\eta = \tau / \dot{\gamma} = const.$$

Kada se kriva viskoziteta grafički prikaže (zavisnost viskoziteta od brzine smicanja pri konstantnoj temperaturi) dobija se prava linija (Slika 4). Kod ovih sistema viskozitet ne zavisi od promene brzine već od sastava sistema, temperature i pritiska (Barnes, 1997).

Nenjutnovski sistemi, kao što samo ime kaže, su oni kod kojih postoji odstupanje od Njutnovskog odnosa između brzine i napona smicanja. Viskoзитet ovih sistema menja se sa promenom brzine smicanja, dakle nije konstantan. U zavisnosti od načina na koji se viskoзитet sistema menja sa promenom brzine

smicanja razlikuju se tri osnovna tipa proticanja: pseudoplastično, plastično i dilatantno (Lee i sar., 2009).

Kod sistema koji pokazuju **pseudoplastično ponašanje** povećanje napona izaziva disproporcionalno povećanje brzine smicanja i sa povećanjem gradijenta brzine dolazi do sledstvenog smanjenja viskoziteta.



Slika 4. Efekat brzine smicanja na Njutnovske tečnosti

Ovakvo ponašanje prilikom proticanja naziva se i **rastečnjavanje** (eng. *shear thinning*). Ipak, ponašanje ovih sistema pri veoma malim brzinama smicanja je slično Njutnovskom jer je viskozitet konstantan, nezavistan od brzine i često se naziva nulti viskozitet smicanja (eng. *zero shear viscosity*). Kada se brzina poveća do nivoa da izaziva promene u strukturi (promene u orijentaciji molekula ili čestica koje prevazilaze nasumično Braunovo kretanje), viskozitet drastično opada (Durairaj i sar., 2004). Pri veoma visokim brzinama smicanja vrednost viskoziteta dostiže asimptomatsku – konačnu vrednost i dalje povećanje brzine ne može povećati nivo rastečnjavanja.

Sistemi koji pokazuju **dilatantno ponašanje** ugušćuju (eng. *shear thickening*) se sa primenom napona smicanja; kao rezultat toga brzina smicanja se sporije povećava od napona smicanja. Kod ovih sistema sa povećanjem brzine smicanja dolazi do povećanja viskoziteta (IUPAC, Compendium of Chemical Terminology). Dilatantno ponašanje je retko kod viskoelastičnih sistema i uglavnom nije poželjno.

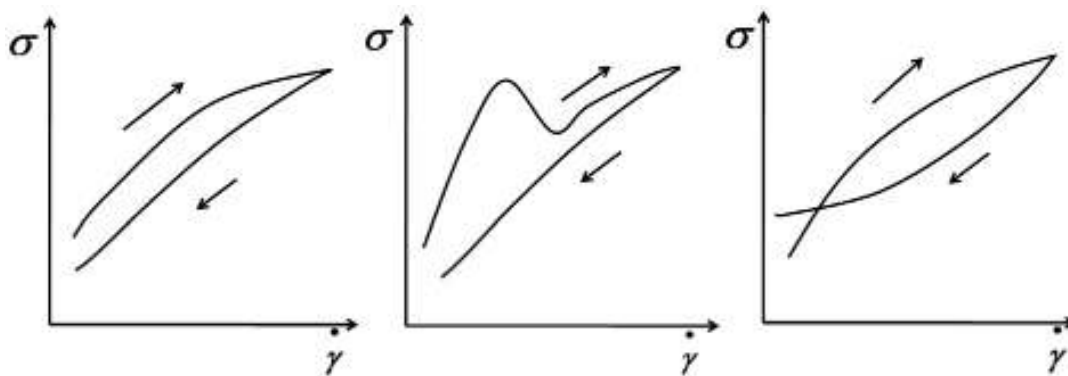
Plastični tip proticanja karakteriše postojanje prinosnog napona (τ_0 , eng. *yield stress*), što znači da se primenjeni napon može povećavati do specifične vrednosti pri čemu neće izazvati deformaciju. Kada se dostigne maksimalna vrednost napona – prinosni napon; sistem počinje da teče. Kod ovih sistema nakon postizanja maksimalnog napona dolazi do oštrog smanjenja viskoziteta. Ovakvo ponašanje se može opisati različitim matematičkim modelima od kojih su najčešće korišćeni Bingham-ov model koji opisuje tzv. **Bingam plastični** tip proticanja. Njega karakteriše linearna zavisnost napona i brzine proticanja (Goldsmith, 1950). Kod tzv. **pseudoplastično plastičnog** proticanja koje se opisuje Casson-ovim modelom odnos između napona i brzine proticanja nakon prinosnog napona nije linearan (Slika 3).

Tiksotropija je veoma značajan reološki fenomen koji privlači pažnju velikog broja istraživača, ali promene u mikrostrukturi koje dovode do **tiksotropnog ponašanja** još uvek su slabo razjašnjene (Mewis i Wagner, 2009). Tiksotropija se definiše kao kontinualno smanjenje viskoziteta sistema koji protiče u toku vremena (a koji je prethodno bio u mirovanju), a zatim postepeni oporavak viskoziteta tokom vremena kada proticanje prestane. Kompleksno reološko ponašanje tiksotropnih materijala se objašnjava njihovom mikrostrukturom, koja takođe zavisi od istorije smicanja. Ovo specifično, vremenski zavisno ponašanje viskoziteta često je veoma značajno u karakterizaciji emulzionih sistema.

Za definisanje stepena i obima tiksotropnog ponašanja najčešće se koristi histerezna površina. Histereznu tehniku predstavili su Green i Weltmann (Green i Weltmann, 1943) pri čemu se na ovaj način meri površina između gornje i donje reološke krive, a dobijena histerezna površina se koristi da definiše tiksotropno ponašanje. Površina i oblik histerezne krive mogu značajno da se razlikuju u zavisnosti od ispitivanog materijala (Slika 5). S druge strane, histerezna površina za dati materijal zavisiće od uslova merenja, kao što su: istorija smicanja pre početka eksperimenta, maksimalna brzina smicanja i stepen ubrzanja.

U zavisnosti od namene proizvoda tiksotropno ponašanje je više ili manje poželjno. Sa aspekta upotrebe kozmetičkih i dermatoloških preparata tiksotropno

ponašanje, odnosno smanjenje viskoziteta kada je sistem pod dejstvom spoljne sile (tzv. rastečnjavanje) koje omogućava jednostavnu upotrebu (nanošenje i razmazivanje) proizvoda je više nego poželjno.



Slika 5. Mogući oblici histereznih kriva

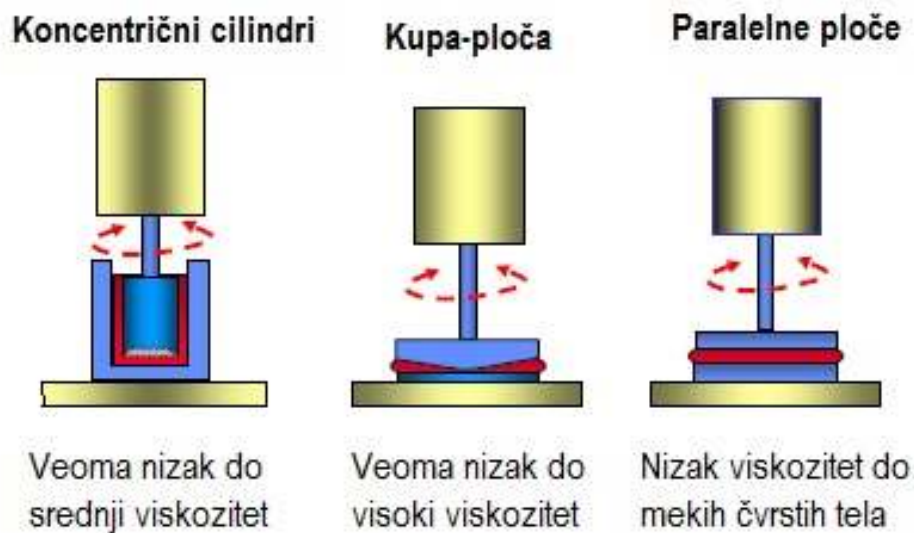
Reopeksija je reološki fenomen suprotan tiksotropiji gde sa povećanjem brzine smicanja dolazi do povećanja viskoziteta. Javlja se kod dilatantnog tipa proticanja i veoma je retko kod realnih sistema.

Merenje osobina koje sistem pokazuje prilikom proticanja podeljeno je na merenje njegovog linearnog i nelinearnog ponašanja. Za prvo, linearno ponašanje, merenja se sprovode u opsegu napona, stresa i brzina u kojima su merene osobine zavisne od spomenutih promenljivih. Kod nelinearnih merenja mereni parametri nisu u funkciji ovih varijabli već samo frekvence i vremena (naravno i temperature, kao i pritiska u određenoj meri) (Barnes, 1994). Esencijalna razlika između linearnih i nelinearnih merenja jeste ta, što su linearna merenja nedestruktivna, dok su nelinearna destruktivna. Narušavanje viskoelastične strukture pri tome može biti reverzibilno ili ireverzibilno (Davis, 1971a).

Godinama je uobičajen pristup u reološkim merenjima polučvrstih sistema podrazumevao sprovođenje samo kontinualnih (tzv. merenja u mirnom stanju, eng. *steady-state*) reoloških merenja, koja imaju ograničenu primenu. Za dobijanje kompletnog reološkog profila i svih značajnih reoloških parametara

viskoelastičnih materijala neophodno je sprovođenje i oscilatornih (tzv. dinamičkih, eng. *dynamic*) merenja (Davis, 1971b).

Savremeni uređaji kojima se ispituje reološko ponašanje jesu reometri. Oni danas omogućavaju postavljanje najraznovrsnijih eksperimentalnih uslova, što uz veoma sofisticirane softverske pakete, omogućava dobijanje svih reoloških parametara i kompletnu karakterizaciju reoloških osobina. U ispitivanju polučvrstih preparata za primenu na koži koriste se reometri koji u zavisnosti od viskoziteta ispitivanih sistema mogu biti opremljeni drugačijim mernim sistemima (Slika 6).



Slika 6. Merni sistemi reometra

1. 2. 2. Značaj reoloških osobina emulzionih sistema

Reološke osobine emulzija od velikog su značaja kako sa aspekta fundamentalnih ispitivanja tako i sa praktične tačke gledišta. Na fundamentalnom nivou, reologija emulzija direktna je manifestacija brojnih interakcionih sila koje se javljaju unutar emulzionih sistema (Tadros, 1994). Stoga se osobine koje emulzije pokazuju pri proticanju i parametri koji se dobijaju kontinualnim i/ili reološkim merenjima koriste u tumačenju koloidne strukture sistema i njegovih fizičkih karakteristika (Barnes, 1994).

Kada je reč o praktičnoj primeni, proučavanje reologije emulzionih sistema, ima vitalan značaj u mnogim industrijskim granama od kojih svakako treba pomenuti: prehrambenu, kozmetičku, agrohemijsku, farmaceutsku industriju, kao i industriju boja, papira, adheziva i mnogih proizvoda kućne hemije (Tadros, 1994). Za dermokozmetičke emulzije poznavanje reološkog ponašanja neophodno je u mnogim oblastima, koje uključuju (Davis, 1971b): kontrolu kvaliteta polučvrstih proizvoda, stabilnosti tokom skladištenja, rok upotrebe, poređenje fizičkih parametara sa senzornom procenom i očekivanjima potrošača, uticaj konzistencije na perkutanu apsorpciju aktivnih supstanci, uticaj formulacije na konzistenciju, predviđanje ponašanja proizvoda u toku procesa proizvodnje (npr. mešanje, pumpanje i pakovanje).

Veliki broj senzornih osobina emulzija zavisi od njihove koloidne strukture, zbog čega one mogu biti povezane sa određenim fizičkim, npr. reološkim merenjima. Činjenica je da aplikacija i prihvatanje kozmetičkog proizvoda od strane potrošača u velikoj meri zavise od osobina koje proizvod pokazuje prilikom proticanja (Trapp, 2007). Treba naglasiti da se uglavnom kontinualna reološka merenja sprovode u cilju predviđanja ponašanja proizvoda u realnim uslovima, tokom njegove proizvodnje i primene (Brummer i Godersky, 1999; Park i Song, 2010). **S obzirom na to, da su senzorne studije (kao što je prethodno opisano) vremenski i novčano veoma zahtevne, mogućnost upotrebe klasičnih metoda, kao što je reologija u razvoju proizvoda koji odgovara zahtevima potrošača može biti od velike koristi. Kako u smislu smanjenja troškova,**

tako i pojednostavljenja i skraćenja postupka formulisanja i preformulisanja kozmetičkih proizvoda.

1. 3. Primena teksturne analize

Teksturna analiza je tehnika koja se razvila sa ciljem proučavanja mehaničkih karakteristika hrane zbog čega se uobičajeno i koristi u toj oblasti istraživanja (Vazquez-Araujo i sar., 2006). Primarni zadatak teksturne analize je razmatranje mehaničkih karakteristika materijala koji je podvrgnut kontrolisanoj sili, pri čemu materijal pod tim uslovima generiše deformacionu krivu. Grafici koji se generišu, a prikazuju ponašanje sile u vremenu, predstavljaju teksturni profil.

Najjednostavnije rečeno, instrumentima se meri ponašanje proizvoda pod uslovima koji imitiraju procese kojima je on podvrgnut u toku procesa proizvodnje i manipulacije od strane korisnika. Da bi ovo bilo moguće, instrumenti moraju imati kapacitet da mere određene karakteristike na način i intenzitetom koji odgovara stvarnim uslovima. Ovo se postiže primenom različitih instrumentalnih tehnika koje mogu biti fundamentalni, empirijski i imitirajući testovi (Szczeniak, 1963).

Fundamentalni testovi utvrđuju fizičke konstante koje precizno opisuju osobinu materijala u smislu jasno definisanih reoloških parametara. Empirijski testovi uglavnom mere parametre koji su slabo definisani u reološkom smislu, ali je praksa pokazala da su blisko povezani sa osobinom od značaja. Imitirajući testovi teže reprodukovanju mehaničkih operacija koje se primenjuju u ljudskoj proceni, odnosno trude se da imitiraju naša čula. Sve ove metode imaju za cilj dovođenje u vezu instrumentalnih i senzornih merenja (Engelen i Van Der Bilt, 2008).

Teksturna profilska analiza (TPA) je danas najčešće korišćen metod karakterizacije strukture hrane, odnosno najpopularnija metoda teksturne analize. TPA je objektivni metod procene mehaničkih karakteristika koje se dovode u vezu

sa senzornim osobinama. Pionir teksturne analize je Szczesniak, koji je 1963. definisao termine koji dobro koreliraju sa rezultatima senzorne procene (Szczesniak, 1963; Szczesniak i sar., 1963). Ovu metodu je kasnije modifikovao Breene prilagodivši je imitaciji žvakanja hrane u vilici dva puta uz pomoć Instron uređaja (Breene, 1975).

Savremeni uređaji, kakav je Teksturometar (Slika 7), omogućavaju, uz upotrebu različitih sondi i modova merenja, ispitivanje najrazličitijih grupa polučvrstih preparata (Slika 8). Za ispitivanje specifičnih grupa kozmetičkih proizvoda, kao što su olovke i ruževi za usta, proizvodi za kosu, i dr. postoji posebna oprema koju nude proizvođači ovih uređaja.



Teksturna analiza se u stručnoj literaturi uglavnom koristi u karakterizaciji lokalnih preparata jer se smatra klasičnom metodom za procenu stabilnosti emulzija. Ipak, ova tehnika bi mogla, kao i reološka merenja, da bude od većeg značaja u ispitivanju senzornih osobina kozmetičkih proizvoda (Masmoudi i sar., 2009; Lemaitre-Aghazarian i sar., 2004).

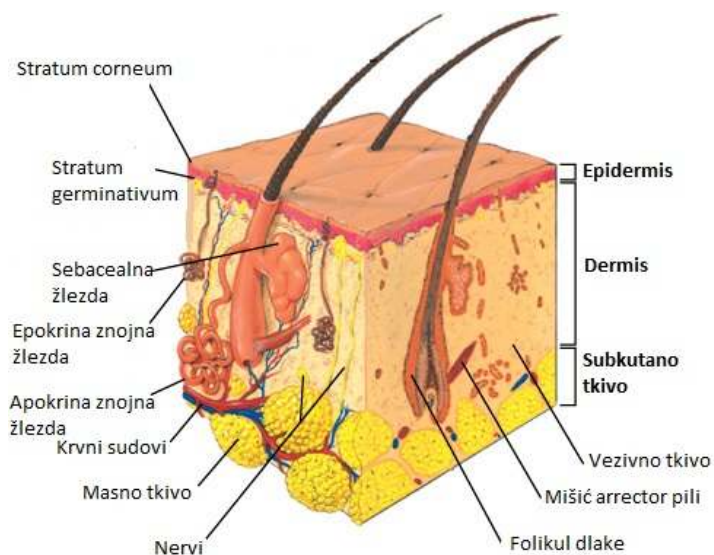
Slika 7. Teksturometar



Slika 8. Različite sonde teksturometra

1. 4. Dermokozmetičke emulzije sa vlažećim efektom

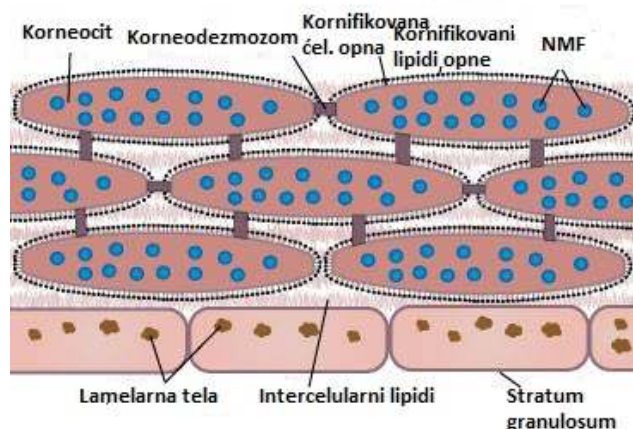
1. 4. 1. Vlažnost/hidratisanost kože



Glavna funkcija kože je zaštitna, pri čemu koža predstavlja barijeru za spoljašnja, fizička i hemijska sredstva, ali sprečava i gubitak vode i elektrolita iz organizma. Koža ima i brojne druge funkcije kao što su regulisanje telesne temperature i oslobađanja vode, imunološka i endokrina funkcija.

Slika 9. Shematski prikaz strukture kože

Stratum corneum (SC) je spoljašnji sloj epidermisa, a ujedno i sloj sa najvećom vodootpornošću. On sprečava odavanje vode iz donjih slojeva kože i prezasićenje kože vodom iz spoljašnje sredine, uz to da, istovremeno omogućava razmenu vode između ovih sredina (Harding, 2004). Sposobnost obavljanja ove funkcije posledica je specifične strukture SC-a, koja se opisuje modelom "zida od cigle" (Slika 10), a čine je keratinociti uronjeni u intercelularni lipidni matriks (Elias, 1981). Lipidni cement ima veoma heterogen sastav, čine ga u najvećem procentu ceramidi (47%), holesterol (24%), masne kiseline (11%) i estri holesterola (18%) (Rawlings, 2003). Zaštitna uloga SC-a zavisi kako od intercelularnog lipidnog matriksa tako i od hidrolipidnog filma (koji se formira od sekreta znojnih žlezda i sebuma) na površini kože.



Slika 10. Kornealni sloj–model “zida od cigle” od cigle”

Kornealni sloj formira se u kontinuiranom procesu diferencijacije keratinocita (keratinizacija), koji započinje njihovom migracijom iz bazalnog sloja kroz granularni sloj, do

konačnog formiranja keratinocita. Inicijalno povezani jakim dezmozomskim vezama korneociti počinju da se razdvajaju do konačnog ljušpanja sa površine kože u procesu koji se naziva deskvamacija. Za očuvanje homeostaze kornealnog sloja ovaj dvosmerni proces keratinizacije i deskvamacije mora biti dobro izbalansiran (Pons-Guiraud, 2007). Sadržaj vode SC-a ključni je faktor koji reguliše zdravlje kože (Rawlings i Matts, 2005). Normalan sadržaj vode u SC-u je oko $30 \pm 5\%$ (Caspers i sar., 2001) i on određuje permeabilnost i fleksibilnost SC-a, kao i aktivnost enzima koji su uključeni u procese formiranja barijere i deskvamaciju (Mak i sar., 1991).

Brojne studije koje ispituju vlažnost SC-a pokazale su da on ima sposobnost primanja vode mehanizmom bubrenja, tzv. “oticanje” SC-a (eng. *SC swelling*) čiji je limit u intervalu 22-33% (Kasting i Barai, 2003; Imokawa i sar., 1991; Inoue i sar., 1986; Anderson i sar., 1976).

Da bi koža bila meka i održala svoju elastičnost sadržaj vode u SC-u mora biti najmanje 10-15%, pri čemu se kod normalne kože nivo vlažnosti postepeno smanjuje od dubljih ka površinskim slojevima kože. Mehanizmi regulacije vlažnosti su dvosmerni, a voda prisutna u SC-u može biti statična, ili vezana i dinamična, ili transepidermalna voda (Marty, 2002). Osnovni faktori koji regulišu vlažnost kože, a odgovorni su za prisustvo statične vode, su intercelularni lipidi i higroskopne supstance u intercelularnim konstituensima, koje su predstavljene zajedničkim nazivom - prirodni vlažeći faktor (NMF – eng. *natural moisturizing factor*).

Drugi, dinamički aspekt čini voda koja se kreće iz dubljih slojeva dermisa ka površini i za čiju mobilnost su odgovorni hidrofobni keratinociti, kvalitet celularnih membrana i intercelularni lipidni matriks. Transepidermalni protok je kontrolisan količinom vode koja isparava sa površine kože i predstavlja tzv. transepidermalni gubitak vode (TEGV) koji nije zanemarljiv i iznosi 100-150 ml vode/danu/m² kože u normalnim uslovima (intaktna zdrava humana koža) (Marks, 2004). U slučaju niske atmosferske vlažnosti i visokih temperatura koža gubi mnogo veće količine vode.

Razumevanje distribucije vode i poznavanje sadržaja vode u SC-u od značaja je za brojne primene u oblasti medicine, kozmetologije i farmacije, a najbolje je proučeno kroz ispitivanja stanja suve kože (Rawlings i Harding 2004; Rawlings, 2003; Loden, 2003; Naik i sar., 1999).

1. 4. 2. Suva koža

Suva koža (kseroza) je čest dermokozmetički problem, koji varira od fiziološki suve (zdrave kože) do patološki suve (dermatološki obolele) kože, a čiji izgled u zavisnosti od stanja u kome se koža nalazi može značajno da se razlikuje (Pons-Guiraud, 2007; Caussin i sar., 2007). Nekoliko fiziološko-patoloških faktora koji menjaju integritet kožne barijere uzrokuje ova stanja: promene kornealnog sloja usled keratinizacionih abnormalnosti SC-a, promene unutar intercelularnih lipida i hidrolipidnog filma, narušavanje transepidermalnog metabolizma vode i promene pH vrednosti kože.

Fiziološki suva koža može da se pojavi kod male dece (čija je koža nežna i osetljiva), kao i kod odraslih, gde je posledica promena nastalih usled starenja kože i to pre svega smanjenja debljine epidermisa i intenziteta normalnog ćelijskog tranzitnog vremena (eng. *turnover*) kao i smanjenja sposobnosti vezivanja vode u SC-u. Kod određenih osoba isušivanje kože može biti pokrenuto ili često pogoršano egzogenim ili endogenim faktorima. U egzogene faktore ubrajaju se klimatski uslovi (suv i hladan vetar, toplota, izloženost suncu), različiti životni uslovi (npr.

centralno grejanje i klimatizacija) i lične navike (najznačajnije su često pranje, upotreba proizvoda za održavanje lične higijene i različitih kozmetičkih proizvoda) (ElGammal i sar., 1996). Endogeni faktori uključuju lekove i hormonske disbalanse, dok je patološki suva koža pokazatelj dermatoze (Pons-Guiraud, 2007).

Premda su mehanizmi nastanka stanja suve kože brojni, još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Veliki interes za ovom tematikom, kao i razvoj tehničkih mogućnosti doveli su do značajnih otkrića i napretka u našem razumevanju ne samo strukture, sastava i funkcije SC-a već i njegovog nastanka (Rawlings, 2003). Poznavanje i razumevanje ovih procesa neophodno je za razvoj proizvoda za hidrataciju kože, odnosno hidratantnih proizvoda ili ovlaživača kože.

1. 4. 3. Ovlaživači kože ili hidratantni proizvodi

Dakle, stanje suve kože ne predstavlja obavezno dermatološki problem i za negu ovakve, kao i za negu normalne kože, preporučuje se upotreba kozmetičkih proizvoda sa vlažećim/hidratišućim efektom/ovlaživača. Kozmetički proizvodi imaju za cilj održavanje kože u dobrom stanju i tradicionalno se ne dovode u vezu sa bolestima i tretmanom obolele kože (Wallach, 2002). Ipak, ova grupa kozmetičkih proizvoda ima izuzetno veliki značaj u prevenciji i tretmanu kože zahvaćene dermatozama (Trapp, 2007). Pored ovlaživača i mnogi drugi preparati kao što su proizvodi za zaštitu od sunca, *anti-age* proizvodi (koji se koriste u prevenciji i tretmanu fotostarenja), antibakterijska sredstva za pranje kože, šamponi za smanjenje peruti, antiperspiransi i preparati za tretman akni ostvaruju efekte na koži, a nalaze se na granici dermatološki lek – kozmetički proizvod (Millikan, 2001).

Početak devedesetih godina prošlog veka američki dermatolog Albert Kligman prvi put je upotrebio termin kozmetoaceutici, kojim je definisao treću grupu preparata, pored lekova i kozmetičkih proizvoda (Kligman, 1993). Premda ni danas nije priznata od strane regulatornih tela, ova kategorija kozmetičkih proizvoda i neophodnost njihovog poznavanja prepoznata je od strane

dermatologa (Wallach, 2002). U Evropi je termin "dermokozmetika" (dermokozmetički preparati) češće u upotrebi i predstavlja sinonim kozmetoceuticima.

Ovlaživači su dermokozmetički proizvodi koji se najšire primenjuju (Draelos, 2009). Ipak, sam termin ovlaživači je pogrešan, jer iako je voda najčešće glavni sastojak ovih proizvoda, ona ne predstavlja osnov njihovog vlažećeg efekta. Voda koja je deo formulacije, nakon primene preparata izaziva samo prolazno povećanje sadržaja vlage i isparava sa površine kože (Draelos, 2009; Rawlings i sar., 2006). Kod određenih stanja suve kože primena proizvoda sa visokim sadržajem vode može i da pogorša postojeće stanje. Ovlaživači svoj efekat ostvaruju uglavnom dvojako, tako što na površini kože formiraju zaštitni film (okludiraju kožu) koji sprečava isparavanje vode i/ili sadrže supstance koje povećavaju sadržaj vode u SC-u (Lynde, 2001; Loden i sar., 2001). Sve kozmetičke sirovine koje ostvaruju vlažeći efekat Internacionalni rečnik i priručnik kozmetičkih sastojaka svrstava u široku grupu kondicionirajućih sredstava (eng. *conditioning agents*) ili kondicionera kože (Wenninger i sar., 2000).

Najznačajniji sistemi za isporuku, ili nosači kondicionera kože su dermokozmetičke emulzije, koje u zavisnosti od konzistencije mogu biti kremovi ili losioni (Rawlings i sar., 2006). Nekada su jednofazni sistemi tipa masti, zbog izrazitog okluzivnog efekta imali veliki značaj u tretmanu suve kože (Trapp, 2007). Međutim, danas zbog neprihvatljivih senzornih osobina (teške aplikacije i izrazito masnog filma koji ostavljaju na koži) njihova upotreba potisnuta je upotrebom emulzionih sistema.

Emulzije su višefazni (uglavnom dvofazni) sistemi koje čine najmanje dve tečnosti koje se ne mešaju, gde je jedna faza dispergovana u vidu kapljica u drugoj. Dva osnovna tipa emulzionih sistema su (i) emulzije tipa voda u ulju (V/U) kod kojih je vodena faza unutrašnja i dispergovana u masnoj i (ii) emulzije tipa ulje u vodi (U/V) kod kojih je vodena faza spoljašnja, a masna unutrašnja. Njihovo stvaranje i dugotrajnu stabilnost omogućava prisustvo emulgatora. Za tretman ili

negu različitih stanja kože neophodan je pažljiv izbor tipa formulacije, odnosno poznavanje fizičko-hemijskih karakteristika proizvoda.

Emulzije tipa U/V nalaze mnogo veću primenu u odnosu na emulzije V/U tipa (Loden, 2005). Sadržaj masnih komponenti u U/V sistemima iznosi, najčešće 15-30% (iako može biti i veći) zbog čega imaju izrazit hidratišući efekat i na koži mogu i ne moraju ostavljati manje ili više mastan ili lepljiv film. Premda imaju izražen trenutni hidratišući efekat, nemaju znatan uticaj na obnavljanje lipida, zbog čega se njihova upotreba preporučuje osobama sa masnom nego sa suvom kožom (Trapp, 2007). Emulzije tipa V/U zbog okluzivnog filma koji stvaraju na površini kože preporučljivije su za negu i tretman suve kože, a njihova ređa upotreba posledica je nezadovoljavajućih estetskih osobina. Upotreba savremenih emulgatora omogućila je izradu V/U emulzija sa nižim sadržajem masne faze i prihvatljivijim senzornim osobinama (Loden, 2005).

1. 4. 4. Kondicionirajuća sredstva

Na tržištu postoji velik broj hidratantnih proizvoda, ali svi imaju za cilj povećanje količine vode SC-u. Idealni ovlaživač kože bio bi proizvod koji: (i) poboljšava stanje kožne barijere, (ii) održava integritet kože i njen dobar izgled, (iii) smanjuje TEGV i (iv) obnavlja lipidnu barijeru, sposobnost privlačenja, zadržavanja i distribucije vode (Loden i Maibach, 1999).

U kozmetologiji i kozmetičkoj dermatologiji kozmetičke sirovine koje imaju vlažeći efekat na koži često se nazivaju hidratantnim sredstvima. CTFA (eng. *Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association*) međutim, ne prepoznaje ovaj, već je u upotrebi termin kondicionirajuće sredstvo. Kondicionirajući agensi predstavljaju kozmetičke sirovine iz različitih grupa i prema teorijskom mehanizmu kojim ostvaruju vlažeći efekat najznačajniji su: okluzivi, emolijensi i humektansi.

Okluzivi svoj efekat ostvaruju formiranjem hidrofobnog sloja na površini kože, koji gradeći egzogenu barijeru sprečava gubitak vode (Draelos, 2010). Iako zbog masnog i lepljivog filma na površini okluzivi nisu privlačni potrošačima, ova

grupa kozmetičkih sirovina veoma je efikasna u tretmanu suve kože. Vazelin je najefikasniji okluzivni ovlaživač, a Ghadially i sar. (1992) su pokazali da on pored okludiranja kože može biti apsorbovan u delipidizovani SC i ubrzati oporavak kožne barijere. U grupi starijih okluziva su: parafinsko (mineralno) ulje, parafin, skvalen, sojino ulje, lanolin, pčelinji vosak, dok su noviji, dimetikon, iz grupe silikona/silikonskih ulja. Oni su nekomedogeni, hipoalergijski i uglavnom bez jakog mirisa, a na koži ostavljaju masni film koji nije lepljiv, zbog čega su formulacije sa silikonima stekle veliku prihvatljivost od strane potrošača (Flynn i sar., 2001).

Emolijensi su ulja i lipidi koji se lako rasprostiru i razmazuju po koži, obezbeđujući delimičnu okluziju koja hidrira i poboljšava izgled SC-a (Rawlings i sar., 2006). Kožu čine mekom i glatkom, tako što pored povećanja sadržaja vode u gornjim slojevima SC-a povećavaju i elastičnost kože (Wigger-Alberti i sar., 2000). Nakon nanošenja na kožu, emolijentni lipidi koji podsećaju na lipide koji se nalaze u koži, kao što su holesterol, slobodne masne kiseline i ceramidi, poboljšavaju stepen oporavka kožne barijere (Mao-Qiang i sar., 1995).

Humektansi privlače i zadržavaju vodu u koži, delujući iz unutrašnje ka spoljašnjoj sredini privlačenjem vode iz dermisa ka epidermisu/SC-u. Iako se navodi da humektansi mogu ostvariti svoj efekat i iz spoljašnje ka unutrašnjoj sredini (povlačenjem vode sa površine u SC) treba reći da je ovo moguće samo u uslovima visoke relativne vlažnosti spoljašnje sredine od 70 do 80% (Lazar i sar., 1991).

Najveći broj humektanasa su niskomolekularne higroskopne supstance, čiji efekat je posledica prisustva hidrofilnih grupa. Primeri najčešće korišćenih humektanasa uključuju polihidroksilne alkohole (glicerol, propilen- i butilenglikol), ureu, soli mlečne i pirolidon karboksilne kiseline, šećere (sorbitol), pantenol i α -hidroksi kiseline.

1. 4. 5. Hidroksi kiseline

Hidroksi kiseline se danas mogu naći u velikom broju kozmetičkih proizvoda na svetskom tržištu, a zapravo su familija hemijskih supstanci koju čini više grupa: α -hidroksi kiseline (AHK-e), β -hidroksi kiseline (BHK-e) i polihidroksi kiseline (PHK-e).

AHK-e su karboksilne kiseline koje karakteriše prisustvo hidroksilne grupe na α položaju (alfa-C atomu). Prvi put su predstavljene sredinom osamdesetih godina prošlog veka, kao veoma efikasne supstance u tretmanu hiperkeratoza i ihtioza (Van Scott i Yu, 1974). Od tada do danas našle su primenu u tretmanu suve kože, grube kože, peruti, kalusa, akni, keratoza, ožiljaka, bora i foto-ostarele kože (Yu i Van Scott, 2004). Jedna od najčešće korišćenih i najbolje proučenih AHK-a je glikolna kiselina. Brojne studije pokazale su i potvrdile efikasnost ove molekule, najmanje među hidroksi kiselinama (Van Scott i Yu, 1989; Matarasso i sar., 1990; Bergfeld i sar., 1997; Bernstein i sar., 2001). Pored vlažećeg efekta, ima i ekfolijantni efekat, stimuliše germinativni sloj i proliferaciju fibroblasta.

BHK-e imaju hidroksilnu grupu na β položaju i premda neke AHK-e mogu zbog prisustva sekundarne -OH grupe biti svrstane u grupu BHK-a, pravi i najznačajniji predstavnik ove grupe je salicilna kiselina. Za razliku od AHK-a koje su alifatične, linearne, hidrofilne molekule, salicilna kiselina je fenolna i lipofilna molekula koja u hemijskom smislu nema sličnosti sa AHK-ama. Zbog lipofilnosti salicilna kiselina može da penetrira u sebacealnu jedinicu i da tako ostvari ekfolijantni efekat u masnim regijama lica (Draelos, 2000). Takođe je i veoma efikasan keratolitik, što se koristi u lekovima.

Polihidroksi kiseline su karboksilne kiseline sa više hidroksilnih grupa vezanih za alifatične ugljenikove atome (Yu i Van Scott, 1996). PHK-e su hemijski slične AHK-ama, ali su PHK veće molekule koje ne penetriraju u kožu, te vrše ekfolijaciju samo na površini kože. Ograničavanjem penetracije smanjuju se neželjeni efekti poput peckanja, zatezanja i iritacije kože, pa se njihova upotreba preporučuje osobama sa osetljivijom kožom (Draelos, 2000).

Efekti hidroksi kiselina su brojni i produžena primena kozmetičkih proizvoda koji ih sadrže dovodi do poboljšanja izgleda zdrave kože koja deluje svežije i svetlije usled povećanja vlažnosti u SC-u i smanjenja intenziteta hiperpigmentacija i hiperkeratotičnih lezija. Takođe, kao posledica smanjenja dubine bora i ujednačavanja teksture kože, ona deluje glatko i zategnuto (Yu i Van Scott, 2005). Sve je ovo posledica hidratišućeg efekta, ubrzanja deskvamacije, sinteze glikozaminoglikana, regulacije pH vrednosti, plastifikacije (bubrenja) i ubrzanja ćelijskog *turnover*-a odnosno remodelovanja epidermisa. Pored primene na zdravu kožu, hidroksi kiseline se često koriste u tretmanu patoloških stanja kože, kao što su akne, fotostarenje, ihtioze, hiperkeratoze, čak i psorijaza (Green i sar., 2009, Fluhr i sar., 2008). Upravo zbog ovako široke primene, preparati koji sadrže hidroksi kiseline prepoznati su kao jedna od najznačajnijih grupa dermokozmetičkih proizvoda (Harold, 2005). Najznačajniji faktori koji utiču na stepen efikasnosti proizvoda sa hidroksi kiselinama su koncentracija kiseline i pH vrednost nosača. Ovo se objašnjava činjenicom da je za ostvarivanje njihovih efekata neophodno da budu u nedisosovanom obliku da bi stigle do mesta delovanja (Al-Bawab i Friberg, 2004). Kako bi AHK-e bile u nedisosovanom obliku pH vrednost preparata treba da bude što bliža pKa vrednosti kiseline. Ostali faktori su: vrsta AHK, nosač, vreme izloženosti kože delovanju hidroksi kiselina i tip kože na koju se primenjuje (Ramos-E-Silva, 2001).

Uprkos brojnim pozitivnim efektima i višedecenijskoj primeni preparata sa hidroksi kiselinama, još uvek se javljaju problemi pri njihovoj upotrebi, kao i pri formulisanju stabilnih preparata sa ovim aktivnim supstancama. Neželjeni efekti koji se mogu javiti najčešće se manifestuju kao crvenilo, peckanje, zatezanje i perutanje kože, a nekada su moguća i ozbiljnija stanja (Yu i Van Scott, 2004). Ovakva reakcija posledica je kiselosti, odnosno niske pH vrednosti preparata i ubrzane penetracije kroz kožu koja je uslovljena malom veličinom aktivnih molekula (Yu i Van Scott, 1996). **Zbog ovoga hidroksi kiseline i dalje predstavljaju veliki izazov sa aspekta formulisanja stabilnih, bezbednih i efikasnih proizvoda.**

1. 4. 6. Alkil poliglukozidni emulgatori

Uprkos tome što je pažnja naučnika koji se bave razvojem formulacija preparata koji se primenjuju na koži, danas, u velikoj meri fokusirana na razvoj nosača nano veličina, konvencionalni emulzioni sistemi ostaju interesantno polje istraživanja. Najvećim delom ovo je posledica konstantnog napretka u razvoju novih sirovina koje se koriste u razvoju kozmetičkih emulzija.

Prethodno je rečeno da je osnovni preduslov nastanka emulzije, pored vodene i masne faze, i prisustvo emulgatora. Mešani emulgatori i emulgujući voskovi, koji se sastoje od masnih alkohola i nejonskih površinski aktivnih materija (PAM), dugo su predstavljali prvi izbor u formulisanju dermokozmetičkih emulzija, kako zbog dobre fizičke stabilnosti i kompatibilnosti sa većinom aktivnih supstanci, tako i zbog umanjenog iritacionog potencijala u poređenju sa jonskim emulgujućim voskovima, posebno onim sa natrijum lauril sulfatom (Bárány, 2000; Savić, 2004). U grupi nejonskih PAM veliku i često korišćenu grupu činili su molekuli koji u svom hidrofилnom delu sadrže veliki broj polioksietilenskih (POE) grupa. Lanci POE, zbog jake hidrofилnosti i vezivanja vode i u toku skladištenja krema, izazivaju naknadnu strukturaciju (Ecclestone, 1997) što uglavnom rezultuje lošim senzornim osobinama emulzija. Emulzije stabilisane ovakvim emulgatorima mogu takođe iritirati kožu i povećati TEGV (Bárány i sar., 2000).

Da bi se ispunili strogi zakonski propisi, ali i sve brojniji zahtevi potrošača u pogledu bezbednosti kozmetičkih proizvoda, veliku pažnju u okviru razvoja novih sirovina privlače tzv. prirodni emulgatori. Poslednjih desetak godina raste interes za grupom alkil poliglukozidnih (APG) emulgatora, tzv. „šećernih“ surfaktanata. Njihov značaj i prednosti u odnosu na tradicionalno korišćene POE derivate ogledaju se pre svega u njihovoj kompatibilnosti sa kožom i sa životnom okolinom (Stubenrauch, 2001; Savic i sar., 2010). APG emulgatori su prirodnog porekla i uglavnom se pokazalo da su netoksični i da ne izazivaju alergijske reakcije (Savic i sar., 2011; Tadros, 2005; Mehling i Hensen, 2004). Ovi šećerni emulgatori su u obliku mešanih emulgatora (emulgujućih voskova) i sastoje se od alkil glukozidnog dela i najmanje jednog masnog alkohola. Njihove šećerne glave sadrže slobodne

hidroksilne grupe koje omogućavaju kompleksno vezivanje vode koja obezbeđuje dodatnu vlažnost, a time može uticati i na permeabilnost i penetraciju aktivnih supstanci (Loden, 2005).

Kompatibilnost kože sa emulzionim nosačem izrađenim sa APG emulgatorom, posledica je njihove sličnosti sa strukturom kože. Iako se SC uobičajeno predstavlja modelom zida od cigli (Slika 10), korneociti u SC-u su, u stvari, uronjeni u lipidnu lamelarnu strukturu (Wang i sar., 2010). Nadalje, pokazano je da nosači sa APG emulgatorom usled formiranja liotropnih kristalnih struktura, imitiraju organizaciju SC-a (Savic i sar., 2005; Makai i sar., 2003). Tečne kristale karakteriše veoma organizovana mikrostruktura, koja je dalje sposobna da formira multilamelarne strukture, koje mogu da se ponašaju kao specifični modulatori zadržavanja vode u SC-u. U zavisnosti od njegove koloidne strukture nosač može uticati na vlažnost kože kontrolisanjem načina distribucije vode unutar sistema.

U tom smislu je neophodno ispitivanje mezomorfnog ponašanja APG emulgatora, odnosno načina na koji oni stabilizuju konvencionalne emulzije nosače koji bi se koristili u kozmetičkim proizvodima. Dodatno, kako je pri formulisanju dermokozmetičkih proizvoda veoma važan izbor nosača, istraživanja u oblasti: efikasnosti, bezbednosti, fizičko-hemijskih karakteristika i kompatibilnosti sa različitim aktivnim supstancama novih nosača sa APG emulgatorima spadaju u značajna savremena ispitivanja.

1. 5. Efekti kozmetičkih proizvoda na koži

Stupanjem na snagu 6. Amandmana na Kozmetičku direktivu 76/768/EEC, 1993. godine (93/35/EEC) dokazivanje efikasnosti kozmetičkih proizvoda, odnosno onih efekata za koje proizvođač tvrdi, i na pakovanju navodi, da ih njegov proizvod ostvaruje, postalo je i zakonska obaveza (Cosmetics Directive 76/768, Regulation (EC) No 1223/2009). Da bi proizvođači mogli da promovišu i reklamiraju svoj proizvod, odnosno da tvrde da njihov proizvod ima određene karakteristike i performanse, neophodno je da to bude potvrđeno dozvoljenim i priznatim naučnim metodama. Zabranom puštanja u promet na tržište EU kozmetičkih proizvoda koji su testirani na životinjama (7. Amandmana na Kozmetičku direktivu 76/768/EEC), došlo je do intenzivnog razvoja alternativnih metoda ispitivanja bezbednosti i efikasnosti finalnog kozmetičkog proizvoda.

Danas postoji veliki broj različitih tipova eksperimentalnih studija koje se mogu sprovoditi u cilju ispitivanja efekata kozmetičkih proizvoda, a svakako treba imati na umu i kontinuirano razvijanje novih (*Colipa report on the 8 World Congress on Alternatives*, 2011; *Colipa Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products*, 2008). Da bi ova ispitivanja bila u skladu sa zahtevima regulatornih tela sprovode se uz primenu velikog broja vodiča i rezultata naučnih publikacija (*Colipa Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products*, 2008; Rogiers, 2001; Berardesca, 1997; Piérard, 1998; De Groot i sar., 1987; Adams i Maibach, 1985).

Kozmetički proizvodi mogu ostvariti veliki broj efekata, među kojima su poboljšanje vlažnosti – stepena hidratisanosti SC-a, poboljšanje/promena barijernih funkcija kože, revitalizacija mehaničkih svojstava kože, glatkiji mikroreljef kože, smanjenje ljuspanja kože i drugi (Vasiljević i sar., 2009).

Najveći značaj u ispitivanju efekata kozmetičkih proizvoda koji su namenjeni nezi i zaštiti kože imaju neinvazivne tehnike bioinženjeringa kože koje se sprovode na ispitanicima pod strogo kontrolisanim uslovima. Pomoću ovih *in vivo* tehnika (upotrebom odgovarajućih uređaja) prate se promene biofizičkih

svojstava kože pre, u toku i nakon upotrebe ispitivanog proizvoda. Promene stanja kože do kojih dovodi primena ispitivanog proizvoda predstavljaju efekte proizvoda. Ovako utvrđeni efekti predstavljaju osnov budućih kozmetičkih izjava/tvrđnji proizvođača (Distante i Berardesca, 1995).

1. 5. 1. Ispitivanje vlažećeg efekta kozmetičkih proizvoda

Brojne neinvazivne metode razvijene su da bi se procenile različite fiziološke, patološke i adaptivne promene stanja kože (Heinrich i sar., 2003). U cilju sprovođenja odgovarajućeg ispitivanja, pored neophodnog poznavanja načina rada, funkcionisanja, kao i ispravnog rukovanja sa uređajima koji se u ovu svrhu koriste, od najveće je važnosti obezbediti odgovarajuće uslove za merenje parametara stanja kože (Berardesca, 1997; Fischer i sar., 2001; Heinrich i sar., 2003). Među brojnim merenjima kojima se određuje stanje kože, odnosno procenjuje vlažeći efekat, mogu se izdvojiti tri najznačajnija:

1. Merenje vlažnosti ili hidratisanosti kože/stratum corneuma (SCH – *stratum corneum* hidratacija) odnosno procena stepena SCH ima važnu ulogu u karakterizaciji stanja kože (Kligman, 1995). Pošto je suva koža stanje koje se najčešće primećuje, ne čudi što je vlažeći efekat bio jedan od prvih, detaljno proučenih aspekata delovanja kozmetičkih proizvoda. Tradicionalno, suva koža se ispitivala vizuelnom procenom koja je danas uglavnom potisnuta ili se koristi u kombinaciji sa nekom od tehnika bioinženjeringa (Byrne, 2010).

Komercijalno se koriste tri metode za procenu SCH, od kojih je prva zasnovana na merenju kapacitivnosti (*Corneometer*), druga impedance (*Nova Derm Phase Meter*), a treća provodljivosti kože (*Skicon*) (Heinrich i sar., 2003). Posebno se ističe metoda merenja kapacitivnosti i upotreba korneometra. Razlog za ovo su visoka reproduktivnost dobijenih rezultata, lako rukovanje, kratko vreme merenja i ekonomičnost (Distante i Berardesca, 1995; Loden i Lindberg, 1994).

Ova metoda se zasniva na merenju dielektrične konstante vode pomoću sonde u površinskim slojevima SC-a koja iznosi 81, dok je za većinu drugih supstanci prisutnih u ovom sloju ova vrednost manja od 7. Dubina na kojoj se vrši

merenje je 10-20 μ m, a vrednosti se izražavaju u arbitrarnim jedinicama (tzv. relativne korneometarske jedinice, eng. *relative corneometric units, rcu*).

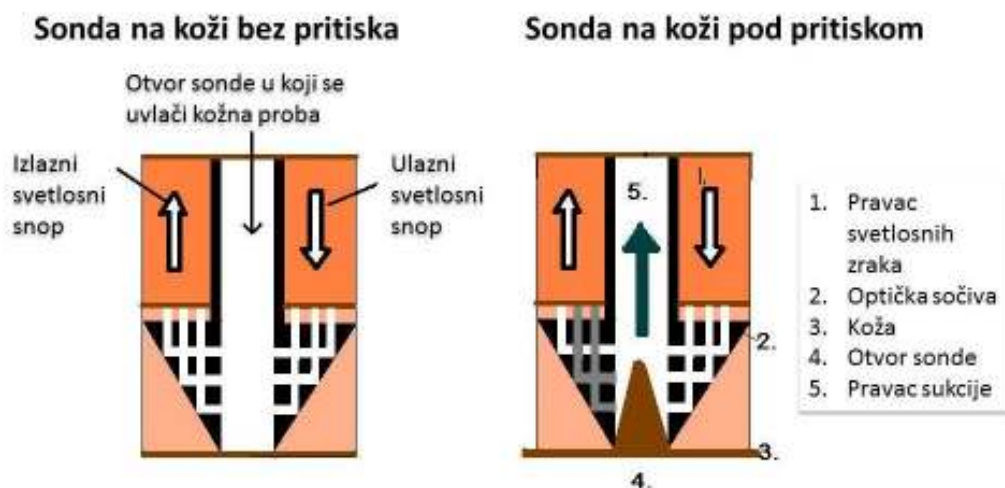
2. Pored merenja SCH i merenje transepidermalnog gubitka vode (TEGV) ima značaja u proceni hidratišućeg efekta (Hildebrandt i sar., 1998). TEGV predstavlja pasivnu difuziju vode iz hidratiranih slojeva dermisa i epidermisa prema slojevima sa nižim sadržajem vode, superficijelnim slojevima SC-a (Fluhr i sar., 2005; Verdier-Sevrain i Bonte, 2007). Generalno, između SCH i TEGV vrednosti postoji korelacija jer niske TEGV vrednosti (koje ukazuju na intaktnu epidermalnu barijernu funkciju) odgovaraju normalnom stanju vlažnosti gornjih slojeva kože (Fluhr i sar., 2001). Ipak, merenje TEGV je pre svega dobro poznata i priznata metoda bioinženjeringa za procenu propustljivosti/permeabilnosti kožne barijere i na taj način njenog funkcionalnog stanja (Kuss i Diepgen, 1998; Darlenski i sar., 2009). U slučaju oštećenja kožne barijere, koža je manje efikasna u zadržavanju vode, zbog čega se javlja povećanje vrednosti TEGV. Zbog činjenice da postoji direktna korelacija između TEGV i stepena narušavanja kožne barijere, merenje TEGV se smatra moćnom neinvazivnom tehnikom za utvrđivanje efekata kozmetičkih i farmaceutskih preparata, hemikalija i spoljašnjih uslova na epidermalnu barijernu funkciju (Sotoodian i Maibach, 2012). Danas je za merenje TEGV dominantna primena metode sa tzv. otvorenom komorom uz upotrebu uređaja kakvi su evaporimetar, tevametar i slični koji su zasnovani na istom principu rada (Imhof i sar., 2009). Sonda ovih uređaja ima dva para senzora koji mere temperaturu i vlažnost u dve tačke.

Automatskim preračunom uz primenu Fikovog zakona difuzije, koji pokazuje količinu koja se transportuje kroz definisanu površinu u jedinici vremena, mikroprocesor na osnovu gradijenata temperature i vlažnosti daje TEGV vrednost, koja se uglavnom izražava u g/m²/h (Darlenski i sar., 2009). Osnovni nedostatak ovog merenja jeste činjenica da na njega mogu jako uticati mikroklimatski faktori (temperatura i vlažnost) na površini kože. Zbog toga merenja moraju biti sprovedena u klimatizovanim prostorijama sa kontrolisanom temperaturom vazduha i relativnom vlažnošću, bez direktnog protoka vazduha na

samom mestu ispitivanja (Rogiers, 2001). TEGV merenje nalazi značajnu primenu i u ispitivanju stepena iritacije kože (ispitivanju bezbednosti). Procena TEGV vrednosti u bazalnim uslovima je dobar pokazatelj iritacionog potencijala i osetljiv metod u proučavanju kompleksnog sindroma osetljive kože (Smith i sar., 2004; Wu i sar., 2003; Seidenari i sar. 1998).

3. Step en hidratacije SC-a utiče ne samo na električne već i mehaničke osobine SC-a (De Rigal i Leveque; 1985). Postoje brojne studije u kojima se tehnike bioinženjeringa kože koriste za ispitivanje veze između mehaničkih osobina i sadržaja vode u epidermisu (Jemec i Serup, 1990; Murray i Wickett, 1996; Jemec i Wulf, 1998; Bettinger i sar., 1999; Pedersen i Jemec; 1999). Ipak, merenje elastičnosti, odnosno mehaničkih svojstava kože nalazi najveću primenu u proceni efekata kozmetičkih proizvoda namenjenih nezi zrele kože, koja se sa starenjem opušta jer gubi elastičnost (Ahn i sar., 2007). Mehaničke osobine od značaja su ne samo pri upotrebi kozmetičkih proizvoda, već i u kliničkoj praksi: plastičnoj hirurgiji, dermatologiji i u etiologiji površinskih rana (Hendriks, 2001).

Mehaničke osobine kože u prošlosti su procenjivane palpacijom koja nije davala kvantitativne rezultate, što je dovelo do razvoja instrumentalnih metoda kojima se procenjuje elastičnost kože. Uređaji koji se u tu svrhu koriste izazivaju merljive deformacije kože pomoću torzije, sukcije i pritiska (Andreassi; 1995). Primena sukcije je najčešće korišćena tehnika za procenu mehaničkih osobina kože u kozmetičkim i dermatološkim ispitivanjima (Schlangen i sar. 2003). U eksperimentima sukcije, koža biva uvučena u kružnu sondu pomoću pritiska i tokom eksperimenta povlačenje kože se konstantno meri upotrebom optičkog sistema aparata. Uređaj koji radi na ovom principu je kutometar (Slika 11) sa kojim se sukcioni eksperimenti izvode relativno jednostavno i brzo (Rogrigues, 2001). Sukcija kože se uglavnom izvodi u tzv. „vreme-uvlačenje“ modu gde se sukcija ponavlja određeni broj puta i uvlačenje se meri kao funkcija vremena. Ovakav pristup omogućava merenje viskoelastičnih osobina kože. Na ovaj način dobijaju se krive zavisnosti deformacije kože u vremenu (Slika 12).

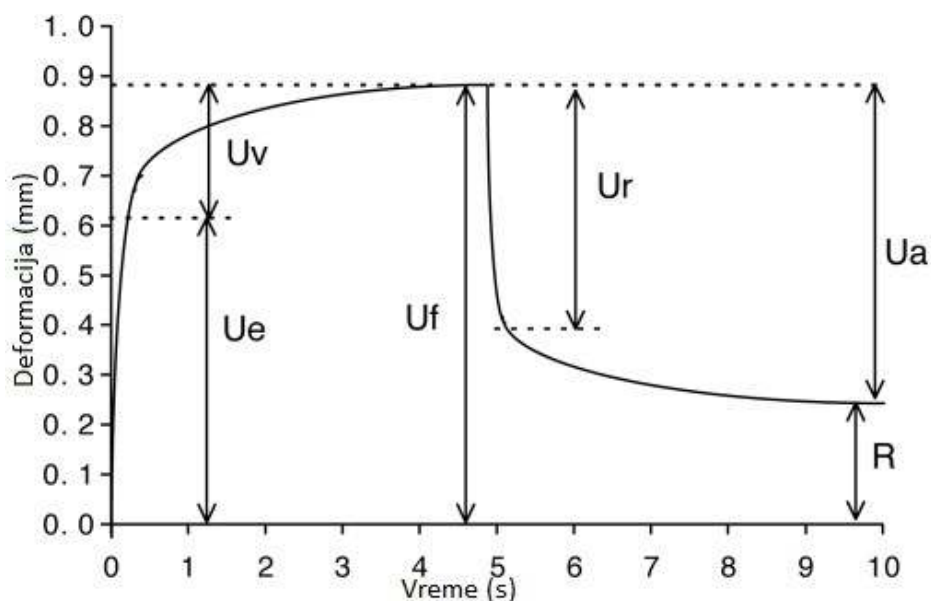


Slika 11. Princip rada kutometra

Prikazani parametri predstavljaju tzv. “klasične” apsolutne ili direktno merene parametre koji se dobijaju u jednom ciklusu pod pritiskom:

- U_e predstavlja elastičnu deformaciju kože usled stresa koji primenjuje uređaj i predstavlja trenutno elastično rastezanje.
- U_v je viskoelastični odgovor koji se javlja posle elastične deformacije i predstavlja odloženo viskoelastično rastezanje.
- U_f je ukupna rastegljivost kože.
- U_r predstavlja trenutno skupljanje (povlačenje) kože, odnosno oporavak elastične deformacije posle uklanjanja stresa.
- U_a je oporavak ukupne deformacije na kraju perioda bez stresa, dok je
- R količina deformacije kože koja se nije oporavila do kraja perioda bez stresa.

Pored apsolutnih postoje i relativni ili preračunati parametri kao što su U_a/U_f (ukupna elastičnost kože), U_r/U_e (isključivo elastičnost uz ignorisanje viskoelastičnog rastezanja), U_v/U_e (odnos viskoelastične i elastične ekstenzije) i U_r/U_f (odnos elastičnog oporavka i totalne deformacije). U zavisnosti od primenjenog moda merenja i broja ponavljanja sukucija moguće je dobiti i druge parametre (noviji softveri preračunavaju R parametre, nakon više sukucija).



Slika 12. Deformacija kože u vremenu

Veoma je važno naglasiti da je kod ove metode, pored adekvatnog rukovanja uređajem od posebnog značaja postavljanje eksperimentalnih uslova (vreme uvlačenja kože, primenjeni pritisak, vreme između dve sukcije, ukupan broj ponavljanja) i poznavanje parametara koji se mogu dobiti.

Značaj dobrog poznavanja dobijenih parametara i interpretacije rezultata može lepo biti objašnjeno na primeru uticaja stepena hidratacije SC-a na mehaničke osobine kože. Ispitivanje odnosa SCH i mehaničkih osobina pokazalo je da korelacija postoji i da sa stepenom hidratacije direktno koreliraju samo određeni parametri, a najosetljiviji na epidermalnu hidrataciju su parametri U_v , U_v/U_e i R_8 (Dobrev, 2000). Preporuka je da se u proceni hidratišućeg efekta kozmetičkih proizvoda upotrebom kutometra prate prethodno pomenuti parametri.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Trendovi koje diktiraju kozmetička industrij i sami korisnici/potrošači, ali i sve strožiji propisi za kozmetičke proizvode, nameću obavezu formulisanja kvalitetnih, bezbednih i efikasnih proizvoda, zadovoljavajućih senzornih karakteristika. Zbog dužine trajanja i cene senzornih studija, uz činjenicu da se subjektivna ocena od strane ispitanika ne može isključiti, značajno je ispitati mogućnost upotrebe instrumentalnih metoda čiji bi se rezultati mogli dovesti u vezu sa senzornim osobinama kozmetičkog proizvoda.

Kozmetologija kao nauka koja se veoma brzo razvija, fokusira svoju pažnju na razvoj novih, usavršavanje poznatih, kao i ispitivanje mogućnosti kombinovanja postojećih metoda i tehnika koje bi pojednostavile postupak formulacije proizvoda i karakterizacije novih sirovina, uz istovremeno obezbeđivanje odgovarajućeg kvaliteta, bezbednosti i efikasnosti kozmetičkih proizvoda. Ispitivanja primene novih APG emulgatora, odnosno podaci koji se odnose na rasvetljavanje koloidne strukture nosača sa ovim emulgatorima, kao i njihove bezbednosti i efikasnosti, značajno doprinose ispunjavanju prethodnih zahteva.

U skladu sa prethodnim navodima, ova doktorska disertacija imala je za cilj da ispita mogućnost upotrebe instrumentalnih metoda (reološka i teksturna merenja) u optimizaciji senzornih karakteristika dermokozmetičkih emulzija za vlaženje kože. Dodatno, cilj ovog istraživanja bio je razvoj odgovarajućeg senzornog panela koji bi u kombinaciji sa instrumentalnim merenjima predstavljao standardizovani set ispitivanja koji bi se koristio u razvoju formulacija i optimizaciji karakteristika kozmetičkih emulzija. Cilj ove doktorske disertacije je bio i rasvetljavanje mezomorfno ponašanja C₂₀/C₂₂ APG emulgatora dugog lanca koji bi se koristio u razvoju novih emulzionih nosača, koji bi ispunjavali zahteve u pogledu stabilnosti, efikasnosti, bezbednosti i estetske prihvatljivosti kozmetičkih proizvoda za vlaženje kože. Takođe, imala je za cilj ispitivanje tzv. kisleostabilnog potencijala APG emulgatora, odnosno, mogućnosti formulisanja emulzija tipa U/V

kao potencijalnih nosača za kiselele aktivne supstance, kao što su glikolna i salicilna kiselina, sa kojima je problem formulirati stabilan emulzioni sistem.

Da bi ostvarili ove ciljeve, eksperimentalni rad u okviru doktorske disertacije bio je podjeljen u tri faze:

Ciljevi prve faze eksperimentalnog rada:

- formuliranje model emulzija tipa V/U, sa odabranim emulgatorom (INCI: diizostearil poliglicerol-3 dimer dilinoleat), za vlaženje kože koje bi poslužile standardizaciji instrumentalnih i senzornih testova, odnosno postavljanju modifikovane senzorne studije i uspostavljanju korelacija između različitih parametara instrumentalnih i senzornih ispitivanja. U tu svrhu, formulirane su 4 uzorka V/U emulzija, uz variranje jedne komponente masne faze (emolijensa), a sa kojima je sprovedena detaljna reološka, teksturna i senzorna analiza. U cilju boljeg razumevanja uticaja promene emolijensa na senzorne osobine emulzije, sprovedena je i senzorna studija na upotrebljenim komponentama masne faze, odnosno variranim emolijensima.
- da se potvrdi uspešnost formuliranja efikasnih vlažećih kremova V/U tipa, primenom metoda bioinženjeringa kože, sprovedeno je ispitivanje efekata izrađenih uzoraka. Dodatno, na ovaj način dobijeni rezultati (rezultati efikasnosti) biće upoređeni za rezultatima senzorne studije, sa ciljem ispitivanja njihove eventualne zavisnosti.

Ciljevi druge faze eksperimentalnog rada:

- da se bolje ispituju svojstva jednog od novijih APG emulgatora Montanov™202 (INCI: Arahidil i behenil alkohol i arahidil-glukozid), specifičnog po najvećoj dužini alkil lanca od trenutno prisutnih na tržištu, kao potencijalnog stabilizatora U/V dermokozmetičkih emulzija i njihov efekat vlaženja kože. U cilju ispitivanja potencijala Montanov™-a 202 za građenje lamelarnih mezofaza, kao i da bi se dobio dublji uvid u koloidnu strukturu, na serijama binarnih i ternarnih sistema sa APG emulgatorom, sprovedena je obimna fizičko-hemijska karakterizacija (mikroskopska analiza, difrakcija X-zraka pod malim i velikim

uglom, reološka analiza, termalne metode). Dodatno, ispitan je bezbednosni profil izrađenih emulzionih sistema *in vitro* metodom ispitivanja citotoksičnosti, upotrebom modela rekonstruisanog humanog epiderma.

- da se na osnovu dobijenih rezultata odaberu optimalne koncentracije ispitivanog emulgatora i emolijensa u masnoj fazi i formulišu dermokozmetičke emulzije U/V tipa (ternarni sistemi sa različitim masnim fazama), koje bi se pored ostalog ispitale i prethodnim setom standardizovanih instrumentalnih i senzornih testova. Takođe, sa ovim uzorcima će biti sprovedeno ispitivanje njihovog vlažećeg efekta (petočasovna kratkotrajna studija) primenom tehnika bioinženjeringa kože, nakon čega će ovi rezultati biti upoređeni sa rezultatima dobijenim pomoću termalnih metoda. Na ovaj način će se proceniti mogućnost upotrebe termalnih metoda u predviđanju vlažećeg efekta emulzionih sistema.

Ciljevi treće faze eksperimentalnog rada:

- da se nakon druge faze, kroz koju bi se pokazala eventualna zadovoljavajuća stabilnost, bezbednost i efekat vlaženja kože ispitivanih emulzija, formuliše pogodna dermokozmetička emulzija tipa U/V. Ovaj emulzioni nosač biće formulisan na osnovu prethodno dobijenih rezultata, uz primenu uporednog koncepta reološke, teksturne i senzorne analize.
- s obzirom na to da proizvođač ispitivanog emulgatora ne navodi podatke o opsegu pH u kom je moguća upotreba njihove sirovine, kao i da nema objavljenih ili saopštenih rezultata o upotrebi Montanov™-a 202 sa kiselim aktivnim supstancama u ovom delu izvršena je procena kiselostabilnog potencijala i kompatibilnosti sa kiselim kozmetički aktivnim supstancama ovog APG emulgatora. Navedena ispitivanja biće sprovedena praćenjem kompatibilnosti dve model supstance: salicilne kiseline – 2% (koja je suspendovana u izrađenom nosaču ili rastvorena u izopropil alkoholu pa inkorporirana u krem) i glikolne kiseline (2% i 10% m/m) sa prethodno formulisanim kremom, kroz ispitivanje fizičko-hemijske stabilnosti izrađenih uzoraka. Kremovi, koji će se međusobno razlikovati samo u aktivnim

supstancama (vrsti, koncentraciji ili načinu inkorporiranja) biće procenjeni prethodnim setom standardizovanih instrumentalnih i senzornih testova, čime će pre svega biti ispitan uticaj aktivne supstance na senzorne osobine. Dodatno, primenom tehnika bioinženjeringa kože biće ispitan kratkotrajni vlažeći efekat uzoraka kremova sa aktivnim supstancama; to će omogućiti međusobno poređenje efekata ispitivanih dermokozmetičkih emulzija, a takođe će ovi rezultati dobijeni *in vivo* metodama biti upoređeni sa rezultatima termalnih metoda kojima je procenjen način distribucije vode u ispitivanim sistemima. Na ovaj način će se proceniti mogućnost upotrebe termalnih metoda u predviđanju vlažećeg efekta na koži kozmetičkih emulzija sa odabranim kozmetički aktivnim supstancama (glikolna i salicilna kiselina).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3. 1. Materijali i metode

3. 1. 1. Materijali

Za izradu model uzoraka V/U emulzija namenjenih vlaženju kože korišćene su sirovine prikazane u Tabeli 1.

U Tabeli 2, dat je pregled sirovina korišćenih za izradu binarnih i ternarnih sistema, kao i model U/V kremova, koji su izrađeni kao potencijalni nosači aktivnih supstanci: glikolne kiseline (2% i 10% (m/m), Merck, Nemačka) i salicilne kiseline (2% (m/m), Merck, Nemačka).

In vitro određivanje citotoksičnosti sprovedeno je korišćenjem rekonstruisanih ekvivalenata humane kože (eng. *skin construct, artificial skin*), koji su dobijeni od humanih dermalnih fibroblasta (Cascade Biologics, Mansfield, Velika Britanija), spontano transformisanih humanih epidermalnih ćelija poreklom od keratinocita odrasle osobe, u uslovima niskog sadržaja kalcijuma pri povišenoj temperaturi (eng. *Human adult, low Calcium, elevated Temperature – HaCaT-cell line*) gajenih u kulturi prema modifikovanoj metodi (Winkler i Muller-Goymann, 2002; Hoffmann i Muller-Goyman, 2005). U studiji citotoksičnosti korišćeni su i 3-(4,5)-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid (MTT, Sigma, Steinheim, Nemačka), natrijum dodecilsulfat (Acros, B-Geel, Belgija), izopropanol (RiedeldeHaën, Seelze, Nemačka) i prečišćena voda (Ph. Eur. 7.0).

Tabela 1. Pregled supstanci korišćenih za izradu V/U emulzija

INCI naziv supstance srpski/engleski	Funkcija u kozmetičkom proizvodu	Trgovački naziv, proizvođač	Kvalitet
Diizostearil poliglicerol-3 dimer dilinoleat /Diisostearoyl polyglyceryl-3 dimer dilinoleate	Primarni emulgator	Isolan® PDI, Evonik Goldschmidt, Nemačka	Specifikacija proizvođača
Pčelinji vosak/Bees wax	Emolijens, Regulator konzistencije	Spica, Italija	Specifikacija proizvođača
Dimetikon/Dimethicone	Emolijens	Abil®100, Goldschmidt, Nemačka i Dow Corning® 200 Fluid, 350 CST, Dow Corning, SAD	Specifikacija proizvođača
Izopropil miristat/Isopropyl Myristate	Emolijens	Isopropyl Myristate Unichemcom, Austrija	NF XVII
Kaprilno/kaprinški trigliceridi /Capric/caprylic triglycerides	Emolijens	Saboderm TCC, Sabo S.P.A, Italija	Specifikacija proizvođača
Parafinsko ulje/Paraffinum liquidum	Emolijens	Paraffinum liquidum, BASF, Nemačka	Ph. Eur. 7.0
Izocetil palmitat/Isocetyl palmitate	Emolijens	Tegosoft HP, Evonik Goldschmidt GmbH, Nemačka	Specifikacija proizvođača
Specijalno Maslinovo ulje/Special Olive butter	Emolijens	Oliphyl MP 5058, Biophil, Italija	Specifikacija proizvođača
Glicerol/Glycerol	Humektans	BASF, Nemačka	Ph. Eur. 7.0
Fenoksi etanol, metil paraben, etil paraben, propil paraben, butil paraben, izobutil paraben /Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, isobutylparaben	Tečna mešavina konzervanasa	Euxyl® K 300/Schülke Mayr, Nemačka	Specifikacija proizvođača
Magnezijum sulfat heptahidrat, Magnesium sulphate heptahydrate	Stabilizator	Centrohema, Srbija	Specifikacija proizvođača
Prečišćena voda/Purified water	Vodena faza		Ph. Eur. 7.0

Tabela 2. Pregled supstanci korišćenih za izradu binarnih i ternarnih sistema i model U/V kremova

INCI naziv supstance srpski/engleski	Funkcija u kozmetičkom proizvodu	Trgovački naziv, proizvođač	Kvalitet
Arahidil glukozid i Arahidil i behenil alkohol/ Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol	Primarni emulgator	Montanov™202, Seppic, Francuska	Specifikacija proizvođača
C14-22 alkoholi i C12-20 alkil glukozid/C14-22 Alcohols & C12-20 Alkyl glucoside	Primarni emulgator	Montanov™L, Seppic, Francuska	Specifikacija proizvođača
Kaprilno/kaprinski trigliceridi /Capric/caprylic triglycerides	Emolijens	Saboderm TCC, Sabo S.P.A, Italija	Specifikacija proizvođača
Avokadovo ulje/Avocado oil	Emolijens	Textron, Španija	Specifikacija proizvođača
Parafinsko ulje/ Paraffinum liquidum	Emolijens	Paraffinum liquidum, BASF, Nemačka	Ph. Eur. 7.0
Beli pčelinji vosak/Bees wax	Emolijens, Regulator konzistencije	Spica, Italija	Specifikacija proizvođača
Dimetikon/Dimethicone	Emolijens	Dow Corning® 200 Fluid, 350 CST, Dow Corning, SAD	Specifikacija proizvođača
Izopropil miristat/ Isopropyl Myristate	Emolijens	Isopropyl Myristate Unichemcom, Austrija	NF XVII
Glicerol/Glycerol	Humektans	BASF, Nemačka	Ph. Eur. 7.0
Izopropil alkohol/Isopropyl alcohole	Rastvarač	Brenntag, Austrija	Ph. Eur. 7.0
Fenoksi etanol, metil paraben, etil paraben, propil paraben, butil paraben, izobutil paraben /Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, isobutylparaben	Tečna mešavina konzervanasa	Euxyl® K 300/Schülke Mayr, Nemačka	Specifikacija proizvođača
Trietanolamin/Triethanolamine	Sredstvo za neutralizaciju	TEA, Sigma, SAD	USP 23
Prečišćena voda/Purified water	Vodena faza		Ph. Eur. 7.0

3. 1. 2. Metode i oprema

I faza eksperimentalnog rada

3. 1. 2. 1. Formulacija, ispitivanje fizičke stabilnosti, procena uticaja promene sastojka masne faze na senzorne, reološke i teksturne osobine i ispitivanje efikasnosti voda u ulju (V/U) emulzija namenjenih vlaženju kože

Nakon pretraživanja literature i na osnovu dostupnih podataka proizvođača kozmetičkih sirovina, formulisane su i izrađene četiri V/U emulzije sa emulgatorom Isolan® PDI (INCI: Diizostearil poliglicerol-3 dimer dilinoleat), čiji su sastavi i oznake prikazani u Tabeli 3.

U cilju procene njihove fizičke stabilnosti model uzoraka V/U emulzija, sprovedena su sledeća merenja: mikroskopska analiza (merenje veličine kapi), praćenje pH vrednosti, električne provodljivosti i reoloških parametara u funkciji vremena (3 meseca).

Uticaj promene sastojka masne faze (emolijensa) na strukturu emulzija ispitan je reološkim (kontinualnim i oscilatornim) merenjima, teksturnom analizom i senzornom procenom. Dodatno je u cilju što boljeg tumačenja dobijenih rezultata i procene uticaja emolijensa na senzorne karakteristike emulzija sprovedena i senzorna studija na variranim emolijensima.

Da bi se prethodno dobijeni rezultati uporedili i eventualno doveli u vezu sa efikasnošću uzoraka, efekti izrađenih emulzija na koži bili su ispitani tehnikama bioinženjeringa kože: merenjem stepena hidratisanosti SC-a, TEGV, sadržaja površinskih lipida kože i viskoelastičnosti kože, u kratkotrajnoj jednočasovnoj i dugotrajnoj sedmodnevnoj studiji.

Tabela 3. Sastav ispitivanih V/U emulzija (% m/m)

Komponente	Cm	Ci	Co	Cd
Diizostearil poliglicerol-3 dimer dilinoleat	3,0	3,0	3,0	3,0
Pčelinji vosak	2,0	2,0	2,0	2,0
Dimetikon 100	1,0	1,0	1,0	1,0
Izopropil miristat	5,0	5,0	5,0	5,0
Kaprilno/kaprinski trigliceridi	6,0	6,0	6,0	6,0
Parafinsko ulje	6,0	-	-	-
Izocetil palmitat	-	6,0	-	-
Specijalno maslinovo ulje	-	-	6,0	-
Dimetikon 200/350	-	-	-	6,0
Glicerol	3,0	3,0	3,0	3,0
MgSO ₄ x7H ₂ O	2,0	2,0	2,0	2,0
Voda, prečišćena do	100,0	100,0	100,0	100,0

Cm uzorak sa parafinskim uljem, Ci sa izocetil palmitatom, Co sa specijalnim maslinovim uljem i Cd sa dimetikonom

3. 1. 2. 1. 1. Izrada V/U emulzija namenjenih vlaženju kože

Oprema: Rotaciona mešalica (Heidolph RZR 2020, Nemačka)

Svi uzorci pripremljeni su toplo-hladnim postupkom, kojim je nakon rastvaranja glicerola, magnezijum-heptahidrata i konzervansa u prečišćenoj vodi, ova vodena faza dodavana u zagrejanu masnu fazu (zagrejana na 60°C) uz mešanje propelerskom rotacionom mešalicom (1000 obrtaja (o)/min) do postizanja sobne temperature.

Po izradi svi uzorci su odlagani na sobnoj temperaturi (20±1°C), u toku nedelju dana, pre fizičko-hemijske karakterizacije.

3. 1. 2. 1. 2. Procena fizičke stabilnosti V/U emulzija

Mikroskopska analiza

Oprema: Mikroskop Olympus_ BX 50, Olympus Optical Co., Ltd (Japan) sa integrisanom DXC-151 SC Sony CCD kamerom

Uzorci su bili posmatrani mikroskopski, pod odgovarajućim uveličanjem (400 ili 1000 puta) u svetlosnom polju. Veličina kapi merena je upotrebom softvera Microimage version 4.0 (Olympus).

Merenje pH vrednosti

Oprema: pH metar, Hanna instruments HI 9321, Portugalija

Merenje je izvedeno indirektno potenciometrijskom metodom prema Pravilniku (Pravilnik o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljati u promet, Službeni list SFRJ br. 26/83, 61/84, 56/86, 50/89 i 18/91) u vodenom ekstraktu preparata (V/U emulzije). Ekstrakt je pripremljen tako što se 5g uzorka zagrevalo sa 25 ml prečišćene vode na temperaturi od 60°C u toku 10 min. Nakon hlađenja vodeni sloj je dekantovan ili filtriran i u njemu izmerena pH vrednost. Pre početka rada aparat je kalibrisan na propisan način kalibracijom u dve tačke (upotrebom standardnih pufera pH 4,0 odnosno 7,0).

Merenje električne provodljivosti

Oprema: Konduktometar CDM230 Meter Lab, Radiometer, Danska

U cilju određivanja tipa emulzije i praćenja eventualnih promena fizičke stabilnosti sprovedeno je merenje električne provodljivosti direktnim uranjanjem elektrode konduktometra u uzorke. Uređaj je pre početka rada kalibrisan 0,01M rastvorom KCl.

Reološka merenja

Oprema: HAAKE Rheostress RS600 ,Thermo Electron Corporation, Nemačka

U cilju procene fizičke stabilnosti na uzorcima su sprovedena kontinualna reološka merenja primenom rotacionog reometra, uz korišćenje kupa-ploča mernog sistema C60/1Ti (prečnika 40 mm) na $20\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (u triplikatu). Primenjena je procedura kontrolisane brzine smicanja, brzina je kontinuirano rasla od 0 do 40 s^{-1} – uzlazna kriva, bila konstantna na 40 s^{-1} i smanjivala se do 0 s^{-1} – silazna kriva, svaki korak trajao je 60 s.

Iz dobijenih reograma i upotrebom matematičkih modela, određivane su vrednosti minimalnog (η_{\min}) i maksimalnog (η_{\max}) prividnog viskoziteta kao i histerezne površine, kao mere tiksotropije preparata (Korhonen i sar., 2005). Analiza dobijenih rezultata obavljena je integrisanim softverskim paketom.

Rezultati su prikazani grafički i tabelarno.

3. 1. 2. 1. 3. Procena uticaja promene sastojka masne faze na senzorne, reološke i teksturne osobine V/U emulzija

Reološka merenja

Oprema: HAAKE Rheostress RS600 ,Thermo Electron Corporation, Nemačka

U cilju reološke karakterizacije na uzorcima su sprovedena kontinualna i oscilatorna reološka merenja primenom rotacionog reometra, uz korišćenje kupa-ploča mernog sistema C60/1Ti (prečnika 40 mm) na sobnoj temperaturi od $20\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (u triplikatu). Da bi se ispitale mogućnosti primene reoloških – instrumentalnih merenja u proceni aplikativnih karakteristika uzoraka ona su sprovedena, pored uobičajenih merenja na sobnoj temperaturi i na temperaturi koja odgovara temperaturi površine kože ($32\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) (Siewert i sar., 2003).

Kontinualna reološka merenja sprovedena su primenom kontrolisane brzine smicanja, sledeće procedure: brzina je kontinuirano rasla od 0 do 40 s^{-1} – uzlazna kriva, bila konstantna na 40 s^{-1} i smanjivala se do 0 s^{-1} – silazna kriva, svaki korak trajao je 60 s. Kod uzorka sa specijalnim maslinovim uljem pri brzinama

smicanja većim od 45 s^{-1} javio se Weissenberg-ov efekat, a kod uzorka sa dimetikonom iznad 80 s^{-1} , što je onemogućilo merenje pri većim brzinama smicanja za ove uzorke. Iz tog razloga, da bi svi uzorci bili mereni pod istim uslovima brzina merenja nije prelazila 40 s^{-1} . Cross-ov model korišćen je u matematičkoj analizi dobijenih reograma, a sa ciljem dobijanja odgovarajućih reoloških parametara.

Oscilatornim merenjima ispitano je viskoelastično ponašanje uzoraka. Sa ciljem određivanja linearnog viskoelastičnog regiona i prinosnog napona sprovedena su tzv. amplitudna oscilatorna merenja (eng. *amplitude sweep*), na konstantnoj frekvenci od 1Hz u opsegu napona smicanja 0,01-100 Pa. Dodatno, prinosni napon je određen kao tačka u kojoj kriva zavisnosti faznog ugla od napona smicanja menja nagib. Nakon što je utvrđen linearni viskoelastični region u kojem reološki parametri (elastični modul G' , eng. *storage modulus*; viskozni modul G'' , eng. *loss modulus*; fazni ugao δ) pokazuju konstantne vrednosti sproveden je frekvencioni oscilatorni test (eng. *frequency sweep*) pri konstantnom naponu od 1 Pa i frekvencom u opsegu od 0 do 10 Hz.

Iz dobijenih reograma upotrebom matematičkih modela određene su sledeće vrednosti: minimalni i maksimalni prividni viskozitet, histerezna površina, elastični i viskozni modul, kao i tangens faznog ugla ($\tan\delta$). Analiza dobijenih rezultata sprovedena je korišćenjem integrisanog softverskog paketa Haake Rheowin Software.

Rezultati su prikazani grafički i tabelarno.

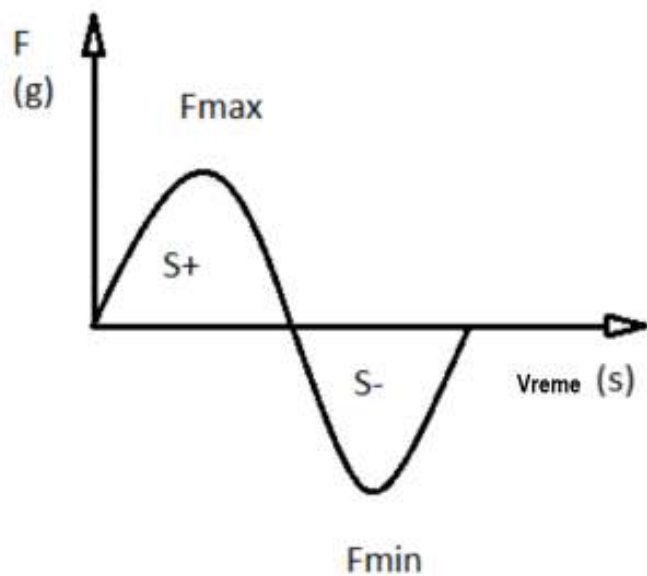
Teksturna analiza

Oprema: Teksturni analizer TE32, Stable Micro Systems Ltd., Velika Britanija

Teksturna analiza sprovedena je teksturnim analizerom uz korišćenje adekvatne metode i sonde (A/BE zadnji ekstruzioni prsten koga čine: nosač, kontejner prečnika 50 mm i kompresioni disk prečnika 45 mm) koju preporučuje

proizvođač. Da bi se odredili teksturni parametri sonda penetrira u uzorak do dubine od 25 mm brzinom od 2 mm/s. Da bi se ispitala mogućnost primene teksturnih merenja u proceni aplikativnih karakteristika uzoraka ona su sprovedena, kao i prethodno opisana reološka merenja, na sobnoj i na temperaturi koja odgovara temperaturi površine kože ($20\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ i $32\pm 0,1^{\circ}\text{C}$). Svaki uzorak analiziran je u triplikatu i za svaki parametar preračunate su srednje vrednosti. Na osnovu rezultata dobijenih iz krive zavisnosti sile od vremena, karakteristične za teksturnu analizu (Slika 13), određivane su dve grupe parametara:

- parametri povezani sa tvrdoćom (eng. *hardness*): čvrstina (eng. *firmness*) kao F_{max} (pozitivni pik) i konzistencija (eng. *consistency*) kao $S+$ (površina ispod pozitivnog dela krive) i
- parametri povezani sa adhezivnošću: kohezivnost (eng. *cohesiveness*) kao F_{min} (negativni pik) i indeks viskoziteta (eng. *index of viscosity*) kao $S-$ (površina ispod negativne krive).



Slika 13. Kriva zavisnosti sile od vremena

Dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički, a svi parametri izraženi su kao pozitivne vrednosti.

Senzorna procena

Trideset ženskih ispitanika/panelista (22-35 god) učestvovalo je u senzornoj studiji, koja je osmišljena sa ciljem procene određenih senzornih karakteristika ispitivanih uzoraka. Učesnice su regrutovane iz grupe od 120 potrošača kozmetičkih proizvoda. Kandidati su izabrani na osnovu ličnih interesovanja i sposobnosti da učestvuju u ovakvoj vrsti studije. Preciznije, odabir je izvršen na osnovu upitnika kojim je ocenjena sposobnost ispitanika da koriste skalu odnosa i da interpretiraju i verbalizuju osećaje opisnim terminima. Korišćeni upitnici i isključujući kriterijumi predloženi su od strane ASTM – eng. *American Society for Testing and Materials*, internacionalne organizacije koja postavlja standarde u oblasti senzornih studija (ASTM Committee E 1490-03. Standard, 2003). Panelisti su najpre upoznati sa generalnim konceptom studije, a zatim im je detaljno objašnjena procedura testiranja, način izvođenja studije i senzorni deskriptori/atributi. Tačnije, za svaki senzorni atribut demonstrirana je procedura određivanja uz detaljno objašnjenje datih definicije i skala/deskriptivnih termina. Sve to je urađeno uz upotrebu standardnih materijala koji predstavljaju ekstreme datih senzornih atributa.

Modifikovana senzorna studija sprovedena je sa ciljem ispitivanja odabranih senzornih atributa četiri ispitivana uzorka Cm, Ci, Co i Cd. Studija je sprovedena u laboratoriji sa odgovarajućom temperaturom, relativnom vlažnošću vazduha i adekvatnim osvetljenjem. Svaka grupa panelista procenjivala je karakteristike uzoraka pre utrljavanja i tokom uzimanja, zatim tokom utrljavanja, kao i osećaj nakon nanošenja. Procenjivači su ocenjivali karakteristike upotrebom unapred definisanih opisnih termina (DT – deskriptivni termini) ili strukturane (0-10) skale (S). Detaljan opis procenjivanih atributa dat je u Tabeli 4. Učesnicima je objašnjeno kako treba da manipulišu uzorcima da bi u potpunosti procenili svaki od atributa. Panelisti su procenjivali 4 uzorka smeštena u identične plastične kutijice obeležene trocifrenim brojevima. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Tabela 4. Opis atributa korišćenih u senzornoj studiji

Faza primene	Senzorni atribut	Opis
Pre utrljavanja i tokom uzimanja	Konzistencija	Tečan/polučvrst (DT)
	Sjaj	Stepen sjaja proizvoda u kutijici – mat / biserno sjajan / blago sjajan / sjajan / veoma sjajan (DT)
	Adhezija	Količina uzorka koja ostaje na kažiprstu posle kratkog kontakta (2 sec) sa uzorkom u kutiji (S)
	Elastičnost	Stepen u kom se uzorak razvlači između palca i kažiprsta – blago elastičan / elastičan / veoma elastičan (DT)
Tokom utrljavanja	Tekstura	Utišak punoće (debljine) uzorka kada se protrlja između palca i kažiprsta (S)
	Rasprostiranje	Površina koju uzorak prekrije tokom utrljavanja 8 puta kružnim pokretima na nadlanici (S)
	Razmazivost	Stepen razmazivosti/klizavosti i topljenja uzorka tokom utrljavanja 2 puta kružnim pokretima na nadlanici (S)
	Lepljivost	Stepen lepljivosti uzorka tokom nanošenja – sila potrebna da se odvoji prst od kože – nije lepljiv / blago lepljiv / lepljiv / veoma lepljiv (DT)
	Gustina	Stepen gustine uzorka tokom utrljavanja – redak / blago gust / gust / veoma gust (DT)
	Masnoća	Stepen masnoće uzorka tokom utrljavanja – nije mastan / blago mastan / mastan / veoma mastan (DT)
	Sjaj	Stepen u kom uzorak sija tokom utrljavanja – nije sjajan / blago sjajan / sjajan / veoma sjajan (DT)
Osećaj nakon nanošenja	Upijanje	Utišak o brzini apsorpcije uzorka u kožu – sporo / umereno / brzo (DT)
	Rezidualni film	Količina rezidualnog filma koju ostavlja uzorak na koži 10 minuta nakon aplikacije – nema filma / umeren film / izražen film (DT)
	Lepljivost	Stepen lepljivosti kože 10 minuta nakon nanošenja uzorka – nije lepljiva / blago lepljiva / lepljiva / veoma lepljiva (DT)
	Masnoća	Stepen masnoće kože 10 minuta nakon nanošenja uzorka – nije masna / blago masna / masna / veoma masna (DT)
	Sjaj	Stepen sjaja kože nakon utrljavanja uzorka – nije sjajna / blago sjajna / sjajna / veoma sjajna (DT)

DT - deskriptivni termin; S - skala

Senzorna procena emolijensa

Četiri emolijensa koja su varirana u ispitivanim formulacijama: parafinsko ulje, izocetil palmitat, specijalno maslinovo ulje i dimetikon 200/350, procenjena

su od strane 30 prethodno izabranih ispitanika. Procenjivana su sledeća četiri atributa emolijenas (odgovarajuća 0-10 skala je strukturana):

- rasprostiranje – predstavlja površinu koju emolijens prekrije tokom utrljavanja 8 puta kružnim pokretima na podlaktici,
- tekstura – utisak punoće emolijensa kada se protrlja između palca i kažiprsta,
- razmazivost – stepen razmazivosti/klizavosti i topljenja uzorka tokom utrljavanja 2 puta kružnim pokretima na nadlanici.

Rezultati su prikazani grafički i predstavljaju srednje vrednosti dobijenih ocena za svaki atribut.

3. 1. 2. 1. 4. Ispitivanje efikasnosti V/U emulzija

In vivo ispitivanje efikasnosti

Oprema: Cutometer® MPA580 (sa integrisanim Corneometer® CM825 i Sebumeter® SM815) i Tewameter® TM210 (Courage+Khazaka, Nemačka)

Da bi se ispitala efikasnost izrađenih uzoraka sprovedene su kratkotrajna i dugotrajna *in vivo* studija u kojima su, primenom tehnika bioinženjeringa kože, praćeni sledeći biofizički parametri: TEGV, SCH, sadržaj površinskih lipida (SL) i elastičnost kože.

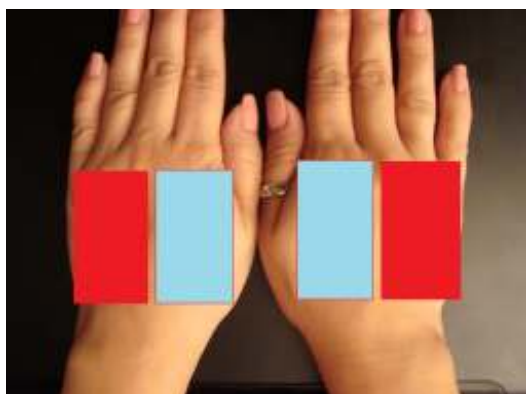
Protokol ispitivanja

Panel od 80 zdravih dobrovoljaca (prosečne starosti 26±3,1), bez istorije dermatoloških oboljenja, sa normalnom do umereno suvom kožom (kod najmanje 50% dobrovoljaca inicijalna vrednost TEGV ≥ 12 g/m²/h) učestvovalo je u studiji koja je bila organizovana u dva dela. Kratkotrajna (1 h) i dugotrajna (7 dana) studija sprovedene su sa uzorcima Cm, Ci, Co i Cd pod kontrolisanim uslovima temperature (22±1°C) i relativne vlažnosti (35±5%), nakon 30-ominutnog perioda aklimatizacije. Tokom trajanja studije dobrovoljci nisu koristili druge kozmetiče

proizvode za negu na površinama kože na kojima je sprovedeno ispitivanje (nadlanica nedominantne šake). Ispitanici su nasumično podeljeni u četiri grupe, svaka grupa je ispitivala jednu kremu, a ispitivanje je sprovedeno u januaru. Svi ispitanici zamoljeni su da sedam dana pre početka studije ne koriste bilo kakve proizvode za negu na ispitivanim površinama kože. Na ovaj način je dobijena normalna do umereno suva koža.

Dizajn studije

Nakon inicijalnih merenja bazalnih (početnih) vrednosti TEGV, SCH, PL i elastičnosti netretirane kože na ispitivanu površinu kože nanet je uzorak V/U emulzije. Ispitivana površina bila je medijalna strana nadlanica nedominantne šake



(Slika 14), na slici označena crvenom bojom, dok je lateralna strana nadlanice (na slici označena plavom bojom) ostavljena kao netretirana kontrola.

Slika 14. Shematski prikaz ispitivane površine: mesto nanošenja uzorka (crveno označeno polje) i netretirana kontrola (plavo označeno polje) na nadlanici.

Za potrebe kratkotrajne studije nakon jednog časa ponovo su izmereni parametri TEGV SCH i PL koji su praćeni u ovoj studiji. Dok su za potrebe dugotrajne studije ispitanici bili u obavezi da nakon ove aplikacije sami nastave nanošenje uzorka dva puta dnevno, ujutro i uveče, na definisanu površinu nadlanice. Završna merenja svih parametara koji su inicijalno mereni (TEGV, SCH, PL i elastičnost kože) u dugotrajnoj studiji sprovedena su nakon sedam dana, uz napomenu da je izostavljena jutarnja aplikacija uzorka.

Merenja TEGV, SCH i PL sprovedena su u skladu sa načinom rada sa korneometrom, sebumetrom i tevametrom, odnosno načinom rukovanja sa odgovarajućim sondama. Merenje viskoelastičnosti kože je pored adekvatnog rukovanja sondom sprovedeno u Modu 1 softvera kutometra, primenom sledećih vrednosti relevantnih parametara: pritisak tokom sukucije – 400 mbar, vreme

sukcije – 2 s, vreme relaksacije – 2 s, sa 3 ponavljanja. S obzirom na činjenicu da direktno mereni parametri zavise od debljine kože i eksperimentalnih uslova i da se preračunati parametri koriste u cilju smanjivanja ovih efekata dva parametra koja se smatraju najkorisnijim u komparativnim studijama R2 i R5 su odabrana za dalju analizu (Moddaresi i sar., 2009).

Statistika

Svi dobijeni podaci prikazani su kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija. Konačni rezultati *in vivo* merenja prikazani su ili kao procentne razlike u vrednostima parametara u različitim vremenskim tačkama u odnosu na početne vrednosti ili kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija.

Poređenju svih rezultata prethodili su testovi ispitivanja normalnosti i varijanse i kad god je to bilo moguće sprovedena je jednofaktorska ANOVA sa *post-hoc* Tukey testom ukoliko je bilo potrebno. U slučaju da rezultati nisu pokazivali normalnu distribuciju izvođen je neparametrijski Kruskal-Wallis-ov test.

Sve statističke analize sprovedene su primenom SigmaStat 3.1 softverskog paketa (Virginia, SAD), a nivo značajnosti bio je $p < 0,05$.

II faza eksperimentalnog rada

3. 1. 2. 2. Ispitivanje mehanizama stabilizacije, koloidne strukture i bezbednosti emulzionih sistema sa APG emulgatorom – Montanov™ 202

Da bi se ispitala sposobnost Montanov-a™ 202 da stupa u liotropnu interakciju sa vodom i uljanom fazom, kao i mehanizam stabilizacije i koloidna struktura sistema na bazi ovog emulgatora, sprovedena je fizičko-hemijska karakterizacija serije binarnih i ternarnih sistema sa njim.

Obimna fizičko-hemijska karakterizacija koja je bila sprovedena na binarnim i ternarnim sistemima podrazumevala je: mikroskopsku analizu (svetlosna i polarizaciona), difrakciju X-zraka pod malim (SAXD) i velikim (WAXD) uglom, reološku analizu (kontinualna i oscilatorna reologija), termalne metode (diferencijalna skenirajuća kalorimetrija – DSC i termogravimetrijska analiza – TGA). Dodatno je ispitan bezbednosni profil izrađenih emulzionih sistema *in vitro* metodom ispitivanja citotoksičnosti, upotrebom modela rekonstruisanog humanog epiderma.

Da bi se procenio uticaj masnih faza, različitih fizičko-hemijskih karakteristika na specifičnu strukturu, kao i uticaj istih na distribuciju vode unutar sistema, na osnovu prethodnih ispitivanja formulisane su dermokožmetičke emulzije U/V tipa, ternarni sistemi sa istim udelom različitih masnih faza. Formulirani model kremovi sa različitim masnim fazama, pored ostalih metoda bili su ispitani i prethodno standardizovanim setom instrumentalnih i senzornih testova. Dodatno je sa ovim uzorcima sprovedena studija ispitivanja njihovog vlažećeg efekta (petočasovna kratkotrajna studija) primenom tehnika bioinženjeringa kože. Ovo ispitivanje imalo je za cilj procenu mogućnosti upotrebe nekih nestandardnih tehnika, kao što je TGA, u predviđanju vlažećeg efekta emulzionih sistema.

3. 1. 2. 2. 1. Izrada binarnih i ternarnih sistema

Oprema: Magnetna mešalica IKA MAG (IKA, Nemačka); Rotaciona mešalica (Heidolph RZR 2020, Nemačka)

Izrađeni su binarni sistemi (B) emulgator/voda sa rastućim udelom emulgatora i ternarni sistemi (T) sa rastućim udelom masne faze – trigliceridi kaprilno-kaprinske kiseline, uz uporednu standardizaciju postupka izrade. U Tabeli 5 dat je sastav i oznake ispitivanih binarnih, a u Tabeli 6 ternarnih sistema.

Tabela 5. Sastav i oznake ispitivanih binarnih sistema (% m/m)

Sastojci	Oznaka uzoraka					
	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Emulgator	7,5	11,5	15	20	30	40
Voda	92,5	88,5	85	80	70	60

Binarni sistemi su pripremljeni zagrevanjem konzervisane vode i emulgatora u zatvorenom staklenom sudu na 80°C, uz mešanje na konstantnoj temperaturi (termostat grejna ploča magnetne mešalice i propelerska rotaciona mešalica) u toku 1 min brzinom od 1000 o/min, a zatim još 3 min na 500 o/min. Zatim je uklonjena grejna ploča, a mešanje je nastavljeno brzinom od 400 o/min do postizanja sobne temperature.

Ternarni sistemi izrađeni su sa fiksnim odnosom emulgator/voda (11,5 : 88,5 tj. 1 : 7,7) i rastućim udelom kaprilno-kaprinskih triglicerida od 5 do 30% (m/m), zbog čega su označeni T5mc, T10mc, T20mc i T30mc.

Ternarni sistemi su izrađeni korišćenjem iste opreme, uz to da je masna faza zagrejana na temperaturu od 80°C dodavana smeši konzervisana voda/emulgator na istoj temperaturi. Nakon čega je sprovedena napred opisana procedura mešanja.

Tabela 6. Sastav i oznake ispitivanih ternarnih sistema (% m/m)

Sastojci	Oznaka		uzoraka	
	T5 mc	T10 mc	T20 mc	T30 mc
Emulgator	10,92	10,23	9,19	8,05
Masna faza	5,0	10,0	20,0	30,0
Voda	84,08	79,77	70,81	61,95

Postupak izrade je u procesu razvoja binarnih i ternarnih sistema standardizovan jer sam proizvođač nije davao preciznija uputstva za izradu kremova sa ovim emulgatorom. Po izradi, svi uzorci su odlagani na sobnu temperaturu ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$) u toku nedelju dana pre fizičko-hemijske karakterizacije.

3. 1. 2. 2. 2. Fizičko-hemijska karakterizacija binarnih i ternarnih sistema

Mikroskopska analiza

Oprema: Mikroskop Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 (Zeiss, Nemačka) sa integrisanom digitalnom kamerom AxioCam ICc1 i AxioVision 4.6 kompjuterskim softverom istog proizvođača

Polarizaciona i svetlosna mikroskopija na uzorcima sprovedena je posmatranjem pod uveličanjem 100, 200 i 400 puta u svetlosnom polju, kao i između ukrštenih polarizatora i analizatora uz primenu λ -pločice.

Difrakcija X-zračenja pod malim uglom (SAXD)

Oprema: Poziciono-osetljiv detektor (Braun, Nemačka) sa generatorom X-zraka PW-1730 (Philips, Nemačka) koji proizvodi X-zrake pomoću bakarne anode (struja 25mA, $\lambda=0,154$ nm, napon 40kV)

Da bi se potvrdilo eventualno prisustvo lamelarnih tečno-kristalnih faza na uzorcima su sprovedena SAXD merenja. Uzorci polučvrste konzistencije

pripremljeni su pritiskanjem između dva sloja Capton folije (Krempel, Nemačka) na debljinu od 1 mm uz istiskivanje mehurića vazduha. Vreme izlaganja bilo je 300 s na sobnoj temperaturi. Iz difrakcionog ugla θ izračunavano je rastojanje između dva sloja lamelarne faze d , u skladu sa Brag-ovim zakonom:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Pri čemu je λ talasna dužina X-zraka (0,154 nm), d je lamelarno rastojanje, a θ ugao refleksije ili Brag-ov ugao.

Difrakcija X-zračenja pod velikim uglom (WAXD)

Oprema: Goniometar za sakupljanje X-zraka PW-1050/25 (Philips, Nemačka), u kombinaciji sa linearnim brojačem punjenim ksenonom (Fuji, Japan) i sa generatorom X-zraka PW-1730 (Philips, Nemačka) koji proizvodi X-zrake pomoću bakarne anode (struja 25 mA, $\lambda=0,154$ nm, napon 40 kV)

Da bi se dobile kompletne informacije o strukturi uzoraka, odnosno o tipu uređenja kratkog opsega na odabranim uzorcima sprovedena su WAXD merenja. Uz upotrebu prethodno navedene opreme dobijene su vrednosti difrakcionog ugla θ , iz kog je upotrebom Brag-ovog zakona preračunato intermolekularno rastojanje d .

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Oprema: Diferencijalni skenirajući kalorimetar Mettler DSC 820 (Mettler Toledo, Nemačka); Analitička vaga XP205 DeltaRange® (Mettler Toledo, Nemačka)

Da bi se procenili fazni tranzicioni fenomeni unutar uzoraka, kao i da bi se dobili podaci o mezomorfnom ponašanju i mehanizmima stabilizacije ispitivanog emulgatora na izrađenim binarnim i ternarnim sistemima sprovedena su DSC merenja. Mala količina uzorka (između 10 i 12 mg) precizno je odmerena u aluminijski lončić koji je hermetički zatvoren. Kao referentni uzorak korišćen je prazan aluminijski lončić. Uzorci su zagrevani u temperaturnom opsegu od 25°C do 120°C i brzinom promene od 2°C/min. Sva merenja su sprovedena u duplikatu, a rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Termogravimetrijska analiza (TGA)

Oprema: TGA uređaj Netzsch STA 409PG (Netzsch, Nemačka)

Da bi se ispitao način distribucije vode u ispitivanim uzorcima na njima je sprovedena termogravimetrijska analiza. Merenja su sprovedena na taj način što se mala količina uzorka smeštena u otvoren aluminijumski lončić zagrevala u TG uređaju, u temperaturnom opsegu od 30-110°C, sa brzinom zagrevanja 5°C/min (sva merenja ponovljena su dva puta). Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Reološka merenja

Oprema: Reometar Rheolab MC 120, Paar Physica, Nemačka

Kontinualna reološka merenja sprovedena su na binarnim i ternarnim uzorcima primenom rotacionog reometra, uz korišćenje kupa-ploča mernog sistema pod sledećim uslovima: prečnik kupe 50 mm, ugao 1°, debljina mernog uzorka 0,05 mm na temperaturi 20±1°C. Primenjena je procedura kontrolisane brzine smicanja (brzina je rasla u opsegu 0–200 s⁻¹, uzlazna kriva, i zatim nazad na početnu vrednost, silazna kriva pri čemu je svaki stupanj trajao 120 s). Iz ovako dobijenih reograma određivane su vrednosti minimalnog (η_{\min}) i maksimalnog (η_{\max}) prividnog viskoziteta kao i histerezne površine. Analiza dobijenih rezultata obavljena je integrisanim softverskim paketom. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Viskoelastično ponašanje ternarnih sistema proučavano je primenom dinamičkih (oscilatornih) merenja, upotrebom kupa-ploča mernog sistema (prečnik kupe 75 mm, ugao 1°, debljina mernog uzorka 0,05 mm, na temperaturi 20±0,1°C). Da bi se utvrdio linearni viskoelastični region sproveden je amplitudni test, pri konstantnoj frekvenci od 1 Hz i naponu smicanja od 0,5-100 Pa. Nakon određivanja ovog regiona sproveden je frekvencioni test u okviru linearnog regiona od 0,1-10 Hz i pri konstantnom naponu (1 Pa). Na ovaj način dobijeni su elastični (G') i viskozni (G'') moduli koji su od značaja za tumačenje strukture ispitivanih sistema.

3. 1. 2. 2. 3. *In vitro* ispitivanje bezbednosti (iritacionog potencijala) izrađenih ternarnih sistema

In vitro metod ispitivanja citotoksičnosti – model rekonstruisanog humanog epiderma.

U cilju *in vitro* određivanja iritacionog potencijala sprovedeno je ispitivanje citotoksičnosti primenom modela rekonstruisane veštačke kože, prema 42-bis protokolu (ECVAM, 2009), dobijenog na prethodno opisan način. Kao parametar za određivanje potencijala za iritaciju kože nakon lokalne aplikacije supstanci i preparata koristi se vijabilnost ćelija (tj. citotoksičnost). U studiji je korišćen modifikovan Mosman-ov metod, tzv. MTT test u kom se ćelijska vijabilnost određuje kao funkcija njihovog redoks potencijala, a kao marker koristi se MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) (Mosmann, 1983; Faller i sar., 2002). Test se zasniva na bojenoj reakciji, preciznije, ćelije kod kojih postoji respiratorna mitohondrijalna aktivnost konvertuju žuto obojen vodeni rastvor markera u nerastvornu formazan so ljubičaste boje. Njen intenzitet se kvantifikuje nakon ekstrakcije iz tretiranog rekonstruisanog tkiva i upravno je srazmeran vijabilnosti ćelija tj. obrnuto srazmeran toksičnosti i iritacionom potencijalu agensa koji se ispituje.

Modeli veštačke kože (MVK) uronjeni su u disperzije odabranih ternarnih sistema (T5mc i T20mc) različitih koncentracija: 0,25%, 2,5% i 25% (m/m). Kao medijum za dispergovanje ispitivanih podloga korišćen je Krebs-Ringerov (KR) pufer. Veštačke kože uronjene u čist KR pufer (vijabilnost ćelija 100%), odnosno KR pufer sa 1% natrijum-laurilsulfata (NaLS) (vijabilnost ćelija 0%), korišćene su kao kontrola. Nakon 2 h inkubacije pod navedenim uslovima, MVK su isprani KR puferom, a zatim im je dodato 900 µl minimalno suplementovanog bazalnog medijuma (MSBM) i 100µl vodenog rastvora boje MTT (0,5%), pa inkubirano pri 37°C i 5% CO₂ još 2 sata. Supernatant je zatim dekantovan, a obojeni MVK obezbojeni dodatkom 500µl lizirajućeg rastvora koji sadrži NaLS, hlorovodoničnu kiselinu, vodu i izopropanol. Po 150µl ovako dobijenih rastvora prenošeno je u pojedinačne otvore pločice za očitavanje ELISA testa (aparatus Multiskan Ascent

No354 ThermoLabsystems, Finska) i na 570 nm je određivana apsorbanca čiji je intenzitet u srazmeri sa vijabilnošću ćelija rekonstruisane humane kože. Rezultati su prikazni kao srednja vrednost tri merenja.

Kvantitativna vijabilnost određena je kao procenat negativne kontrole i može se koristiti u cilju predviđanja iritacionog potencijala. Ukoliko je srednja vijabilnost ćelija manja ili jednaka 50%, supstanca odnosno, preparat se definiše kao lokalni iritans, u suprotnom se njen bezbednosni profil na koži može okarakteristi kao povoljan (ECVAM, 2008).

3. 1. 2. 3. Procena uticaja različitih sastojaka masne faze na stabilnost, strukturu, teksturne i senzorne osobine i efikasnost model kremova sa emulgatorom Montanov™ 202

3. 1. 2. 3. 1. Izrada model kremova tipa ulje u vodi (U/V) sa različitim sastavom masnih faza

Oprema: Magnetna mešalica IKA MAG (IKA, Nemačka); Rotaciona mešalica (Heidolph RZR 2020, Nemačka)

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem binarnih, a zatim i ternarnih sistema za dalju analizu odabrana su 3 model krema sa različitim masnim fazama čiji su sastav i oznake prikazani u Tabeli 7. U ovim formulacijama sadržaj emulgatora bio je 10,92%, a masne faze 20%. Jednokomponentna masna faza varirana je u ovim formulacijama pri čemu je pored sintetskog ulja, umerene polarnosti – triglicerida kaprilno-kaprinske kiseline, korišćeno ulje umerene polarnosti prirodnog porekla – avokadovo ulje i sintetsko nepolaro parafinsko ulje.

Tabela 7. Sastav i oznake ispitivanih model kremova (% m/m)

Sastojci	Oznaka	uzorka	
	T20 mc	T20 ao	T20 lp
Emulgator	10,92	10,92	10,929
Kaprilno-kaprinski trigliceridi	20	-	-
Avokadovo ulje	-	20	-
Parafinsko ulje	-	-	20
Voda	84,08	84,08	84,08

Model kremovi izrađeni su prema prethodno opisanom, standardnom postupku izrade ternarnih sistema.

3. 1. 2. 3. 2. Fizičko-hemijska karakterizacija model kremova

Fizičko-hemijska karakterizacija model kremova sprovedena je primenom polarizacione mikroskopije, praćenjem pH vrednosti i električne provodljivosti, reološkim merenjima i termalnom analizom. Sva merenja sprovedena su na isti način i primenom istih metoda, opreme i uslova kao i u slučaju prethodno opisanih sistema.

3. 1. 2. 3. 3. Procena uticaja promene sastava masne faze model kremova na teksturne i senzorne osobine

Ispitivanja su sprovedena u skladu sa postupkom i metodama opisanim u odeljku 3. 1. 2. 1. 3.

3. 1. 2. 3. 4. Ispitivanje vlažećeg efekta model kremova

Oprema: Cutometer® MPA580 (sa integrisanim Corneometer® CM825) i Tewameter® TM210 (Courage+Khazaka, Nemačka)

Da bi se ispitao vlažeći efekat kremova sa različitim masnim fazama u toku određenog vremenskog perioda sprovedena je kratkotrajna petočasovna *in vivo* studija u kojoj je primenom tehnika bioinženjeringa kože praćen stepen hidratisanosti SC-a (SCH) i TEGV.

Protokol studije

Panel od 25 zdravih dobrovoljaca (prosečne starosti $26 \pm 3,1$), bez istorije dermatoloških oboljenja, sa normalnom kožom učestvovalo je u 5-očasovnoj kratkotrajnoj studiji. Studija je sprovedena sa uzorcima T20mc, T20ao i T20lp pod kontrolisanim uslovima temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) i relativne vlažnosti ($35 \pm 5\%$), nakon 30-ominutnog perioda aklimatizacije. Svi ispitanici zamoljeni su da dva dana pre početka studije ne koriste bilo kakve proizvode za negu na volarnim stranama podlaktice – ispitivanim površinama kože.

Dizajn studije



Upotrebom kartonskih šablona sa otvorima definisane površine – 9 cm^2 sprovedena su inicijalna merenja bazalnih (početnih) vrednosti SCH i TEGV netretiranih površina kože. Ispitivana površina bila je volarna strana podlaktica (Slika 15), na kojoj su primenom kartonskih šablona označena 4 mesta ispitivanja (3 za aplikaciju proizvoda i 1 kao netretirana kontrola). Na 3 mesta predviđena za aplikaciju **Slika 15**. Volarne strane podlaktica. uzoraka naneto je po $0,016\text{g}/\text{cm}^2$ uzorka.

Merenja su ponovljena nakon 1, 2, 3 i 5 časova.

Rezultati su prikazani grafički.

Statistika

Svi podaci dobijeni su kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija, a na isti način su prikazani i dobijeni rezultati studije.

Poređenju svih rezultata prethodili su testovi ispitivanja normalnosti i varijanse. U cilju poređenja sa rezultatima merenja u različitim vremenskim tačkama sprovedena je jednofaktorska ANOVA sa *post-hoc* Tukey testom ukoliko je bilo potrebno.

Sve statističke analize sprovedene su primenom SigmaStat 3.1 softverskog paketa (Virginia, SAD), a nivo značajnosti bio je $p < 0,05$.

III faza eksperimentalnog rada

3. 1. 2. 4. Razvoj formulacije dermokozmetičkih emulzionih nosača tipa U/V sa vlažećim efektom uz emulgator Montanov™ 202

Nakon druge faze koja je pokazala da ispitivane emulzije imaju zadovoljavajuću stabilnost, bezbednost i efikasnost formulisan je dermokozmetički emulzioni nosač U/V tipa. U okviru ove faze ispitana je mogućnost inkorporiranja dve model supstance: salicilne kiseline – 2% (suspendovane u izrađenom nosaču i prethodnim rastvaranjem u izopropil alkoholu pa inkorporiranjem u model podlogu) i glikolne kiseline (u koncentraciji od 2 i 10%), kao i IPA, u prethodno formulisan nosač. Ispitivanja su sprovedena procenom fizičko-hemijske stabilnosti uzoraka (praćenjem reoloških parametara, promena pH vrednosti i električne provodljivosti uzoraka, mikroskopskom i termalnom analizom). Na ovaj način ispitan je tzv. kiselostabilni potencijal mešanog APG emulgatora. Takođe je ispitana mogućnost inkorporiranja IPA, kao rastvarača nekih kozmetički aktivnih supstanci (ovde salicilne kiseline), što je obezbedilo dobijanje novih podataka o ponašanju podloga sa ispitivanim emulgatorom pri dodatku IPA, odnosno njegovom uticaju na koloidnu strukturu model podloge.

Dodatno, set standardizovanih instrumentalnih (reoloških i teksturnih) i senzornih testova primenjen je u ispitivanju izrađenih dermokozmetičkih emulzija namenjenih vlaženju kože sa aktivnim supstancama, čime je pre svega bio ispitan uticaj aktivne supstance na senzorne osobine. U ovom delu rada izvršena je *in vivo* procena efikasnosti odabranih emulzija sa ciljem poređenja efikasnosti uzoraka sa aktivnim supstancama. Ovako dobijeni podaci o vlažećem efektu (*in vivo* metodom) biće iskorišćeni za poređenje sa rezultatima načina distribucije vode unutar ispitivanih sistema koji su dobijeni pomoću TGA. Eventualne korelacije između dobijenih rezultata mogle bi da ukazuju na mogućnost primene termalnih metoda u predviđanju *in vivo* vlažećeg efekta emulzionih sistema sa aktivnim supstancama.

3. 1. 2. 4. 1. Izrada formulisanih dermokozmetičkih emulzija tipa U/V

Oprema: Magnetna mešalica IKA MAG (IKA, Nemačka); Rotaciona mešalica (Heidolph RZR 2020, Nemačka)

Inicijalno je izrađeno sedam formulacija sa emulgatorom Montanov™ 202, u kojima su varirani koemulgatori i komponente masne faze, među kojima se na osnovu polarizacionih mikrografija i organoleptičkih osobina izdvojila formulacija označena sa K sa kojim su nastavljena dalja ispitivanja. U Tabeli 8 je dat sastav i oznake konačno formulisanih dermokozmetičkih emulzionih sistema.

Tabela 8. Sastav i oznake ispitivanih emulzija (% , m/m)

Sastojci	Oznaka uzorka					
	K	Ki	KG2%	KG10%	KSA	KiSA
Arahidil glukozid i arahidil i behenil alkohol	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
C14-22 alkoholi i C12-20 alkil glukozid	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Kaprilno-kaprinski trigliceridi	20	20	20	20	20	20
Pčelinji vosak	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Izopropil alkohol	-	10,0	-	-	-	10,0
Glikolna kiselina	-	-	2,0	10,0	-	-
Salicilna kiselina	-	-	-	-	2,0	2,0
Voda do	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
TEA			q.s.	q.s.	q.s.	q.s

Emulzije su pripremljene na taj način što je prečišćenoj vodi zagrejanom do 80°C dodata zagrejana smeša emulgatora, koemulgatora i masne faze (temperatura

80°C) u zatvorenom staklenom sudu, uz mešanje na konstantnoj temperaturi (termostat grejna ploča magnetne mešalice i propelerska rotaciona mešalice) u toku 1 min brzinom od 1000 o/min, a zatim još 3 min na 500 o/min. Zatim je uklonjena grejna ploča, a mešanje je nastavljeno brzinom od 400 o/min do postizanja sobne temperature. Na temperaturi nižoj od 40°C u formulaciju Ki dodat je izopropil alkohol (IPA), a u formulaciju KiSA rastvor salicilne kiseline u IPA.

Formulacije sa glikolnom kiselinom izrađene su u odnosu na osnovnu formulaciju (K) sa tom modifikacijom što je 70% rastvor glikolne kiseline dodavan na temperaturi nižoj od 40°C. Uzorak po formulaciji KSA, izrađen je kao i K sa naknadnim ručnim suspendovanjem salicilne kiseline u podlogu. Rastvor konzervansa je dodat u sve formulacije na temperaturi nižoj od 40°C.

3. 1. 2. 4. 2. Ispitivanje uticaja kiselih kozmetički aktivnih supstanci i izopropil alkohola na koloidnu strukturu, stabilnost i teksturne i senzorne karakteristike dermokozmetičkog model nosača

Da bi se procenio uticaj kiselih aktivnih supstanci: glikolne i salicilne kiseline, kao i rastvarača nekih kozmetički aktivnih supstanci IPA, sprovedena je fizičko-hemijska karakterizacija formulacija K, KG2%, KG10%, Ki, KSA i KiSA praćenjem pH vrednosti, električne provodljivosti i kontinualnih reoloških parametara. Pored ovih parametara koji su praćeni u periodu od 60 dana sprovedena je i mikroskopska analiza, DSC i TG merenja. Sve metode sprovedene su na isti način i primenom iste opreme i uslova koji su prethodno opisani.

Teksturna i senzorna analiza sprovedene su na isti način kao i u slučaju ternarnih sistema.

3. 1. 2. 4. 3. Ispitivanje efikasnosti dermokozmetičkih emulzija U/V tipa

Oprema: Cutometer® MPA580 (sa integrisanim Corneometer® CM825), Tewameter® TM210, Mexameter®MX18, Skin-pH-meter®PH900 (Courage+Khazaka, Nemačka)

Da bi se ispitaio vlažeći efekat dermokozmetičkih emulzija u toku određenog vremenskog perioda sprovedena je kratkotrajna petočasovna *in vivo* studija u kojoj je primenom tehnika bioinženjeringa kože praćen stepen hidratisanosti SC-a (SCH) i TEGV. Da bi se procenila bezbednost, odnosno eventualna pojava mogućih neželjenih efekata, kao i uticaj kremova sa kiselim supstancama na pH kože dodatno su praćeni parametri eritema indeks (EI) i pH kože (pH).

Protokol studije

Panel od 20 zdravih dobrovoljaca (prosečne starosti $23\pm 2,4$), bez istorije dermatoloških oboljenja, sa normalnom kožom je učestvovao u 5-očasovnoj kratkotrajnoj studiji. Studija je sprovedena sa uzorcima K, Ki, KG2, KG10, KSA i KiSA pod kontrolisanim uslovima temperature ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) i relativne vlažnosti ($35\pm 5\%$), nakon 30-ominutnog perioda aklimatizacije. Svi ispitanici zamoljeni su da dva dana pre početka studije ne koriste bilo kakve proizvode za negu na volarnim stranama podlaktice – ispitivanim površinama kože.

Dizajn studije

Upotrebom kartonskih šablona sa otvorima definisane površine – 9 cm^2 sprovedena su inicijalna merenja bazalnih (početnih) vrednosti SCH, TEGV, EI i pH netretiranih površina kože. Ispitivana površina bila je volarna strana podlaktica (Slika 15), na kojoj su primenom kartonskih šablona označena 4 mesta ispitivanja (3 za aplikaciju proizvoda i 1 kao netretirana kontrola). Na 3 mesta predviđena za aplikaciju uzoraka naneto je po $0,016\text{ g/cm}^2$ uzorka. Merenja su ponovljena nakon 1, 2, 3 i 5 časova. Rezultati su prikazani grafički.

Statistika

Svi dobijeni podaci prikazani su kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija, dok su rezultati *in vivo* studije prikazani kao procentne razlike u vrednostima parametara u različitim vremenskim tačkama u odnosu na početne vrednosti ili kao srednje vrednosti sa odgovarajućim standarnim devijacijama.

Poređenju svih rezultata prethodili su testovi ispitivanja normalnosti i varijanse i kad god je to bilo moguće sprovedena je jednofaktorska ANOVA sa *post-hoc* Tukey testom ukoliko je bilo potrebno. U slučaju da rezultati nisu pokazivali normalnu distribuciju izvođen je neparametrijski Kruskal-Wallis-ov test.

Sve statističke analize sprovedene su primenom SigmaStat 3.1 softverskog paketa (Virginia, SAD), a nivo značajnosti bio je $p < 0,05$ i $p < 0,001$.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4. 1. Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog rada

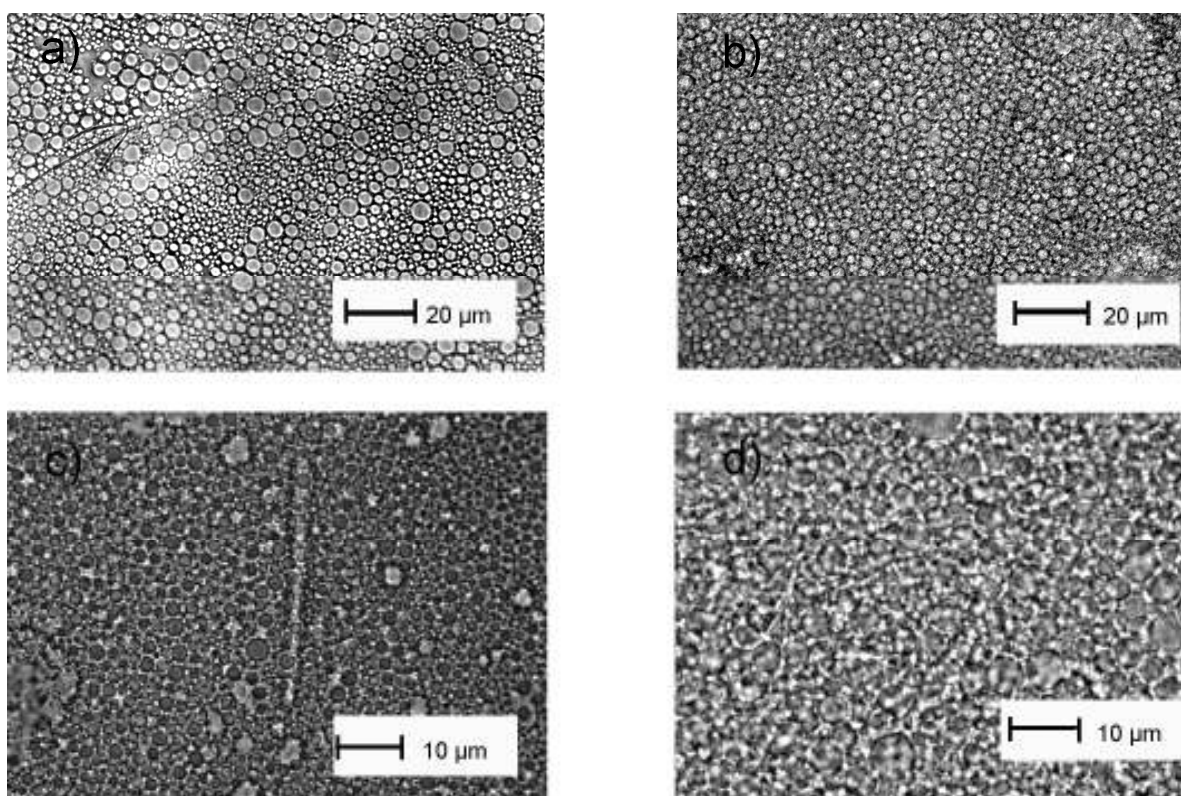
4. 1. 1. Formulacija i procena fizičke stabilnosti V/U emulzija namenjenih vlaženju kože

Nakon literaturnih pretraživanja i izrade preliminarnih emulzija sa različitim koncentracijama emulgatora i različitim lipofilnim koemulgatorima, izabrane su formulacije sa 3% (m/m) V/U emulgatora (diizostearil poliglicerol-3 dimer dilinoleat) i 2% (m/m) pčelinjeg voska. Izrađena su četiri model uzorka krema (Tabela 6) u kojima je variran jedan sastojak masne faze u koncentraciji od 6% (m/m). Konzistencija svih uzoraka nakon izrade bila je polučvrsta, a uzorci sa specijalnim maslinovim uljem (Co) i dimetikonom (Cd) bili primetno gušće konzistencije i viskozni od uzoraka sa parafinskim uljem (Cm) i izocetil palmitatom (Ci).

Da bi se izvršila procena fizičke stabilnosti izrađenih emulzionih sistema, poželjno je izvoditi studije prirodnog starenja na kontrolisanoj sobnoj temperaturi, u trajanju od tri meseca. Fizičko-hemijski parametri čije se promene u toku vremena skladištenja uzoraka mogu uzeti kao relevantni pokazatelji fizičke stabilnosti su: pH vrednost, električna provodljivost, veličina kapi, distribucija veličine kapi, reološki parametri (minimalni i maksimalni prividni viskozitet, histerezna površina, elastični i viskozni modul i dr), kao i eventualne promene u uzorcima tokom centrifugiranja (Vuleta i sar., 2012; Rieger, 1991). Procena fizičke stabilnosti ispitivanih emulzija V/U tipa sprovedena je kroz reološku karakterizaciju (kontinualna reološka merenja), mikroskopsku analizu i praćenjem pH vrednosti i vrednosti električne provodljivosti uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi ($20 \pm 0,1^\circ\text{C}$), izmerenih nakon 7 kao i nakon 90 dana od izrade.

Na Slici 16 prikazane su svetlosne mikrografije ispitivanih uzoraka 7 dana nakon izrade, dok mikrografije uzoraka nakon 90 dana zbog odusustva bilo kakvih

promena nisu prikazane. Sprovedena mikroskopska analiza ukazuje na sličnost mikrostrukture svih ispitivanih uzoraka, što je i potvrđeno merenjem veličine kapi. U Tabeli 9 je dat prikaz veličine kapi (srednja vrednost prečnika kapi \pm standardna devijacija) nakon 7 i nakon 90 dana čuvanja uzoraka. Sa aspekta procene fizičke stabilnosti, odsustvo značajnih promena u veličini kapi svih ispitivanih uzoraka, kao i u izgledu mikrografija jedan je od pokazatelja preliminarne stabilnosti ispitivanih emulzija.



Slika 16. Svetlosne mikrografije uzoraka 7 dana nakon izrade: a) Cm i b) Ci (400x uvećanje – bar 20 μ m) i c) Cd i Co (1000x uvećanje – bar 10 μ m)

Sa druge strane, mikrografije koje daju uvid u koloidnu strukturu ispitivanih sistema, kao što je već spomenuto, ukazuju na sličnost mikrostrukture uzoraka, što će biti od značaja u daljoj diskusiji rezultata dobijenih reološkim, teksturnim i senzornim merenjima.

Rezultati merenja pH vrednosti kao i električne provodljivosti prikazani su u Tabeli 10. Merenja električne provodljivosti potvrdila su da su izrađeni uzorci emulzije V/U tipa. Odsustvo promena u vrednostima pH i električne provodljivosti ukazuje na zadovoljavajuću preliminarnu stabilnost ispitivanih emulzija. Treba dodati da su izmerene pH vrednosti svih ispitivanih uzoraka bile u skladu sa preporučenim vrednostima za dermokozmetičke proizvode, dakle, bliske fiziološkim vrednostima pH kože (Loden, 2003; Pravilnik o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljati u promet, Službeni list SFRJ br. 26/83, 61/84, 56/86, 50/89 i 18/91).

Tabela 9. Veličina kapi ispitivanih uzoraka V/U emulzija

Uzorak	Veličina kapi (μm) nakon 7 dana	Veličina kapi (μm) nakon 90 dana
Cm	2,5 \pm 1,3	2,7 \pm 1,5
Ci	3,5 \pm 0,7	3,9 \pm 0,6
Co	1,6 \pm 0,6	1,6 \pm 0,9
Cd	2,8 \pm 1,3	3,1 \pm 1,2

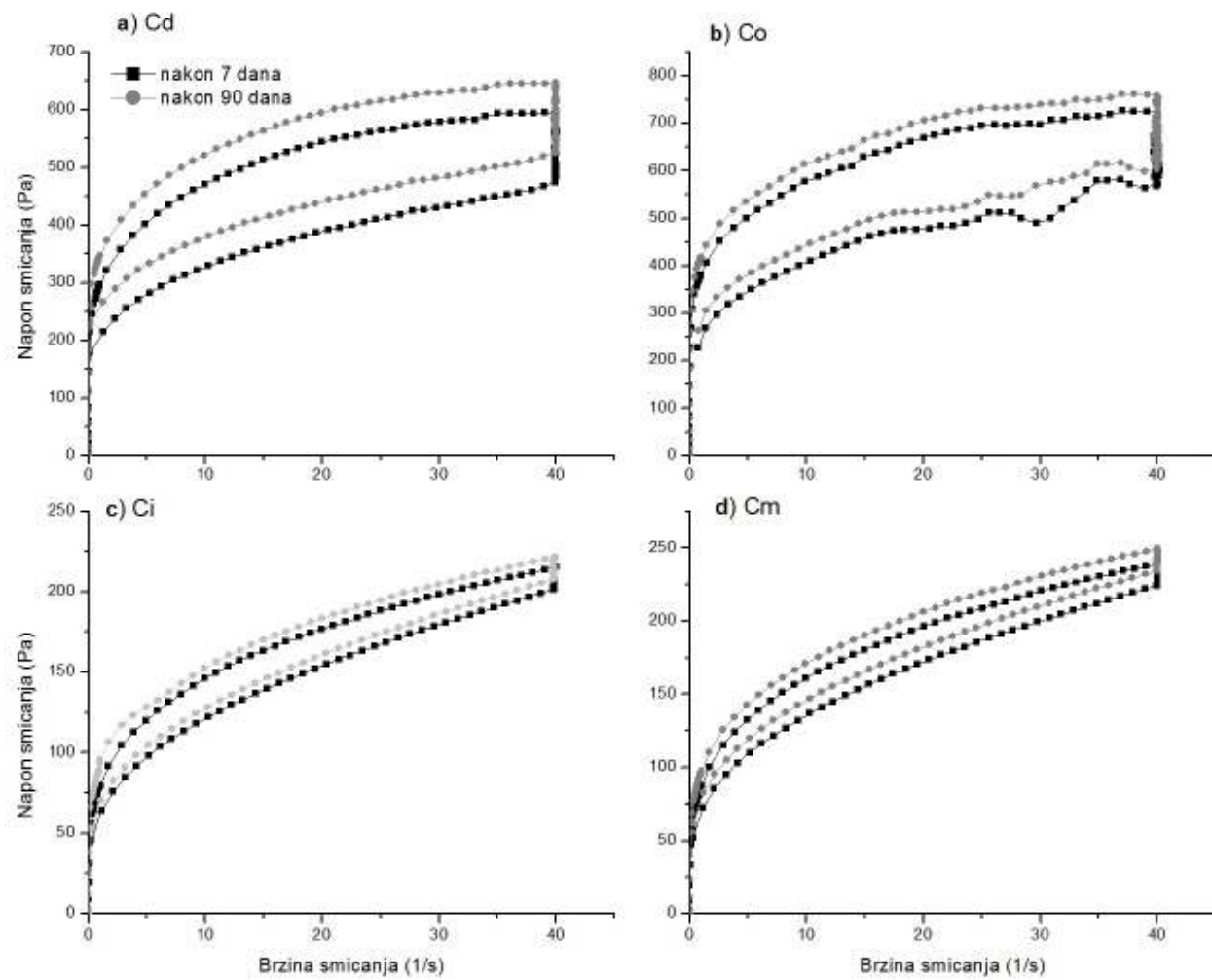
Kontinualna reološka merenja sprovedena u ovom delu ispitivanja imala su za cilj procenu fizičke stabilnosti i dobijeni rezultati su diskutovani samo sa tog aspekta. Reološka merenja, odnosno parametri dobijeni kontinualnim reološkim merenjima sprovode se kako sa ciljem dobijanja podataka o koloidnoj strukturi emulzionih sistema, tako i podataka o njihovoj fizičkoj stabilnosti (Tadros, 2004). Kako emulzije predstavljaju termodinamički nestabilne sisteme najznačajniji faktor koji treba uzeti u obzir u tehnologiji emulzionih sistema je njihovo "starenje" odnosno ponašanje u toku vremena, zbog čega se reologija emulzija dominantno fokusira na njen odnos sa stabilnošću istih (Gallegos i Franco, 1999).

Tabela 10. Vrednosti pH i električne provodljivosti V/U emulzija 7 i 90* dana nakon izrade

Uzorak	pH	El. provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH*	El. provodljivost* ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Cm	6,45	0,123	6,19	0,003
Ci	6,54	0,028	6,42	0,023
Co	6,52	0,215	6,35	0,024
Cd	6,46	0,147	6,41	0,016

Krive proticanja koje pokazuju zavisnost napona smicanja od brzine smicanja u različitim vremenskim tačkama veoma su značajan pokazatelj eventualnih promena u fizičkoj stabilnosti emulzionih sistema. Na reogramima V/U emulzija prikazanim na Slici 17 krive proticanja nakon 7 odnosno 90 dana od izrade pokazuju da ni kod jednog uzorka nije bilo značajnih promena reoloških parametara, odnosno u ponašanju uzoraka pod dejstvom spoljašnje sile (napon smicanja).

Uporedni reogrami daju potpuniju sliku ispitivane fizičke stabilnosti i zajedno sa prethodnim rezultatima ukazuju na zadovoljavajuću stabilnost izrađenih dermokozmetičkih emulzija V/U tipa namenjenih vlaženju kože.



Slika 17. Uporedni reogrami uzoraka a) Cd, b) Co, c) Ci i d) Cm nakon 7 i 90 dana od izrade

4. 1. 2. Procena uticaja promene sastojka masne faze na senzorne, reološke i teksturne osobine V/U emulzija

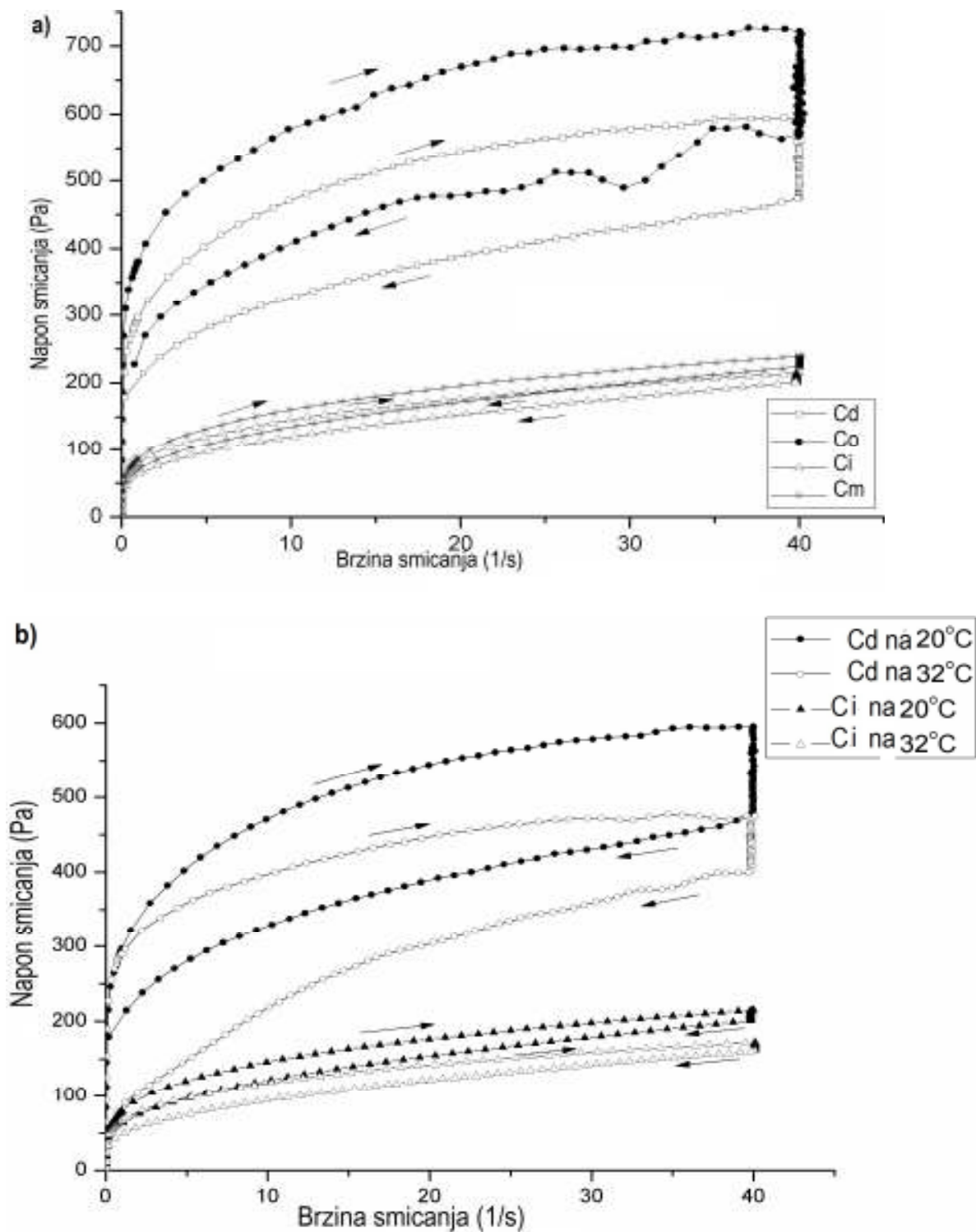
4. 1. 2. 1. Reološka merenja

Dostupna literatura koja se bavi reološkim osobinama emulzionih sistema uglavnom ispituje uticaj emulgatora, stabilizatora, ugušćujućih sredstava ili masne faze različitog sastava na reološko ponašanje (Marquez i Wagner, 2010; Sala i sar. 2007; Quintana i sar., 2002). U malom broju tih radova se dobijeni podaci na neki način dovode u vezu sa prihvatljivošću proizvoda od strane korisnika, najčešće sa aplikativnim, odnosno pojedinim senzornim osobinama. Zbog toga je bilo veoma interesantno ispitati uticaj promene samo jednog sastojka masne faze na reološke osobine, kao i vezu između reoloških i drugih karakteristika emulzija, pre svega teksturnih i senzornih. Odnosno, ispitati mogućnost upotrebe instrumentalnih merenja u predviđanju senzornih karakteristika emulzija.

U ovom delu ispitivanja sprovedena su detaljna kontinualna i oscilatorna reološka merenja u čijem fokusu je za razliku od prethodno sprovedenih merenja (čiji cilj je bio samo procena stabilnosti uzoraka) bila procena uticaja promene sastojka masne faze na reološke osobine i u tom smislu su i diskutovani prikazani rezultati.

Kontinualna reološka merenja

Krive proticanja ispitivanih emulzija na sobnoj temperaturi (20°C) prikazane su na Slici 18a. Da bi se dobilo više podataka koji bi možda mogli bolje da se povežu sa "realnim" uslovima primene kozmetičkih proizvoda reološka merenja u mirnom stanju sprovedena su i na temperaturi od 32°C, koja odgovara temperaturi površine kože (Siewert i sar, 2003). Na slici 18b prikazani su uporedni reogrami uzoraka na 20°C i 32°C (zbog sličnosti reograma uzoraka Ci i Cm, kao i Co i Cd, a zbog bolje preglednosti prikazani su reogrami uzoraka Cd i Ci – Slika 18b).



Slika 18. Krive proticanja ispitivanih emulzija na a) 20°C i b) 32°C

Izgled reograma, odnosno prisustvo histerezne površine potvrđuje da su svi uzorci pokazali vremenski zavisno – tiksotropno ponašanje (eng. *shear-thinning*). Tiksotropno ponašanje definiše se kao vremenski zavisno smanjenje viskoziteta

pri primeni sile na uzorak koji je prethodno bio u mirovanju (Mewis i Wagner 2009). Ovaj reološki fenomen značajan je u karakterizaciji polučvrstih sistema i smatra se poželjnim za preparate za kožu, jer smanjenje viskoziteta omogućava jednostavnu primenu proizvoda na koži. Kao najčešći način kvantifikovanja tiksotropije koristi se metoda određivanja histerezne površine (Lee i sar., 2009).

U Tabeli 11 su sumirane histerezne površine svih uzoraka dobijene na različitim temperaturama zajedno sa prikazanim procentnim smanjenjem ove vrednosti (% smanjenja vrednosti histerezne površine dobijena pri 20°C u poređenju sa vrednostima dobijenim na 32°C su preračunata).

Tabela 11. Histerezne površine (Pa/s) pri različitim temperaturama i % promene

Uzorak	20°C	32°C	% smanjenja na višoj temperaturi
Cm	857±2	770±10	10,1
Ci	869±9	749±12	13,8
Co	11030±54	8719±71	20,9
Cd	6446±33	6400±39	0,7

Na osnovu prikazanih karakteristika pri proticanju ispitivani uzorci se mogu podeliti u dve grupe. Prvu grupu čine uzorci sa specijalnim maslinovim uljem (Co) i dimetikonom (Cd), a drugu grupu čine uzorci sa izocetil palmitatom (Ci) i parafinskim uljem (Cm). Premda su uzorci Co i Cd pokazali slično ponašanje pri proticanju, sa izraženom tiksotropijom i mnogo višim vrednostima prinosnog napona pri ispitivanim brzinama smicanja u odnosu na druga dva uzorka, ipak su očigledne razlike u krivama proticanja i vrednostima histereznih površina kod ova dva krema.

Sa druge strane, kod uzoraka Ci i Cm tiksotropija je umerena, a vrednosti prinosnog napona pri datim brzinama su niske. Dakle, reološko ponašanje ovih uzoraka u mirnom stanju je skoro isto. Ovo ukazuje na mogućnost da jedan emolijens bude zamenjen drugim (npr. da nepolarno parafinsko ulje bude

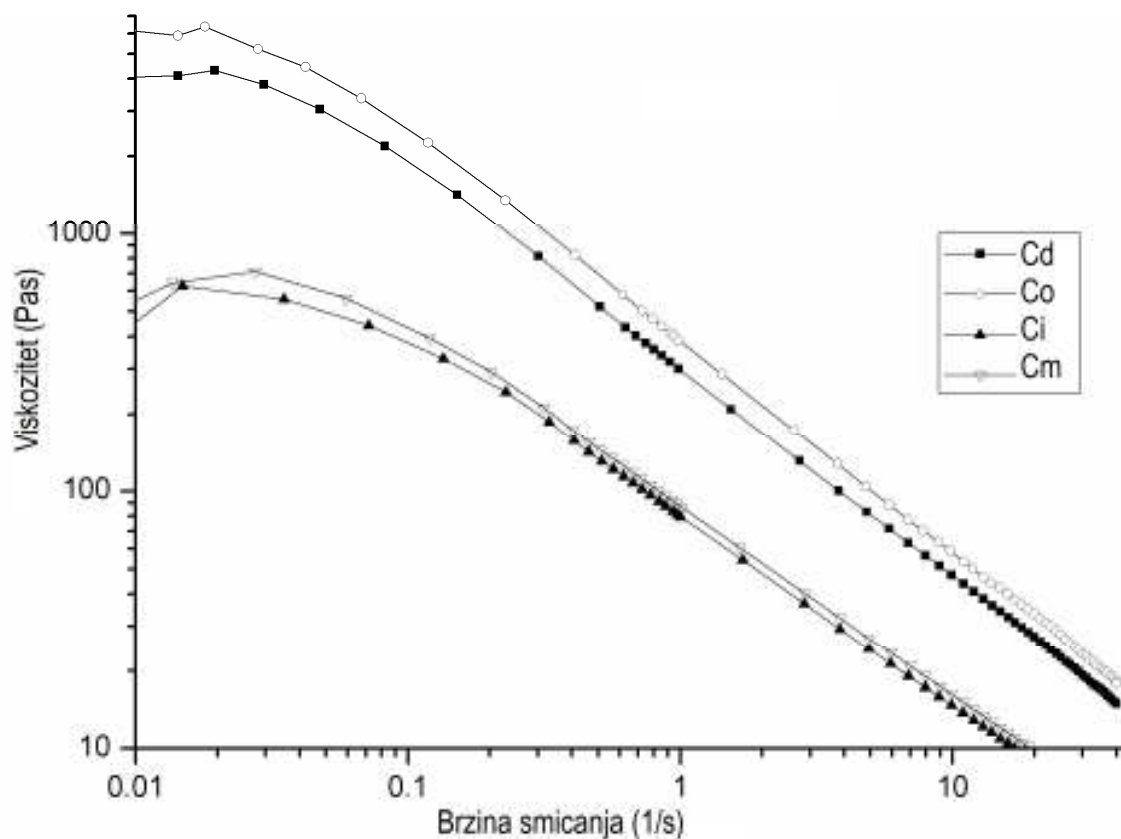
zamenjeno izocetil palmitatom – uljem umerene polarnosti), a da pri tome ne dođe do promena u mikrostrukturi emulzije, odnosno da ne dođe do promena kako u stabilnosti tako i u određenim aplikativnim karakteristikama uzoraka.

Pri merenjima sprovedenim na sobnoj temperaturi, dobijene su histerezne površine sledećeg redosleda $C_o < C_d < C_i \approx C_m$. Na osnovu ovoga može se reći da su se najintenzivnije strukturne promene pri primenjenoj brzini smicanja javile kod uzorka sa specijalnim maslinovim uljem.

Prema Liju i saradnicima na tiksotropiju emulzionih sistema utiče nekoliko faktora, kao što su pH, temperatura, koncentracija polimera (ugušćivača), promena polimera kao i dodatak katjona i anjona (Lee i sar., 2009). Naši rezultati su potvrdili da promena sastava masne faze izaziva promene u tiksotropnom ponašanju i stoga se komponente masne faze (emolijensi) mogu smatrati jednim od faktora koji utiče na tiksotropiju emulzije.

Kada su u pitanju rezultati dobijeni na temperaturi kože ($32 \pm 0,1^\circ\text{C}$), kao što se i očekivalo, dobijene krive proticanja pomerene su ka nižim vrednostima prinosnog napona kroz ceo ispitivani opseg brzine smicanja (Slika 18b). Što se tiče vrednosti histereznih površina, smanjenje je bilo očigledno za sve uzorke sem za uzorak Cd (Tabela 11).

Uporedni reogrami na kojima su krive zavisnosti viskoziteta od brzine smicanja (Slika 19) pokazuju da promena sastojka u masnoj fazi dovodi do promene viskoziteta ispitivanih emulzija. Sa grafika se vidi da su sve ispitivane emulzije pokazale pseudoplastično ponašanje sa dva različita regiona, pri niskim odnosno višim vrednostima brzine smicanja (Slika 19). Intenzitet smanjenja viskoziteta tj. gustine ispitivanih uzoraka na 20°C ima sledeći redosled $C_o < C_d < C_m < C_i$. Na temperaturi površine kože smanjenje vrednosti viskoziteta ima isti redosled.



Slika 19. Zavisnost viskoziteta (uzlazna kriva) od brzine smicanja ispitivanih emulzija na 20°C

Sa dobijenim vrednostima prinosnih napona uzlaznih i silaznih kriva sprovedena je linearna regresiona analiza u cilju procene stepena korelacije odnosno sličnosti reološkog ponašanja pri proticanju ispitivanih sistema. Dobijeni koeficijenti korelacije (R^2 vrednosti) prikazani su u Tabeli 12. U skladu sa činjenicom da su sve dobijene R^2 vrednosti veće od 0,9 pri $p < 0,001$ za sve ispitivane uzorke može se reći da promena masne faze nije uticala na promenu trenda kod krivih proticanja (odnosno promenu njihovog nagiba), što navodi na zaključak da nije došlo do promene tipa proticanja. Rezultati linearne regresione analize zajedno sa krivama proticanja (Slika 18a) ukazuju na to da je promena masne faze dovela do pomeranja krivih (nagore ili nadole). Ovo se manifestuje kao povećanje ili smanjenje prinosnog napona, odnosno praktično kao ugušćivanje ili rastečnjavanje sistema. Krive proticanja pokazuju da se gustina smanjuje sledećim

redosledom $Co < Cd < Cm < Ci$. Iako je promena masne faze dovela do promene u gustini emulzija, a samim tim i do promena osobina koje su vezane za izgled i uzimanje proizvoda iz ambalaže, zbog toga što je oblik kriva proticanja ostao praktično isti, može se očekivati da će uzorci imati slične osobine tokom primene (kada emulzija počne da teče).

Tabela 12. Rezultati linerane regresione analize za ispitivane V/U emulzije

Uzorak	Co		Ci		Cm	
Cd	0,988 _u	0,994 _s	0,977 _u	0,974 _s	0,977 _u	0,973 _s
Co	-		0,968 _u	0,969 _s	0,967 _u	0,968 _s
Ci	-		-		1,000 _u	1,000 _s

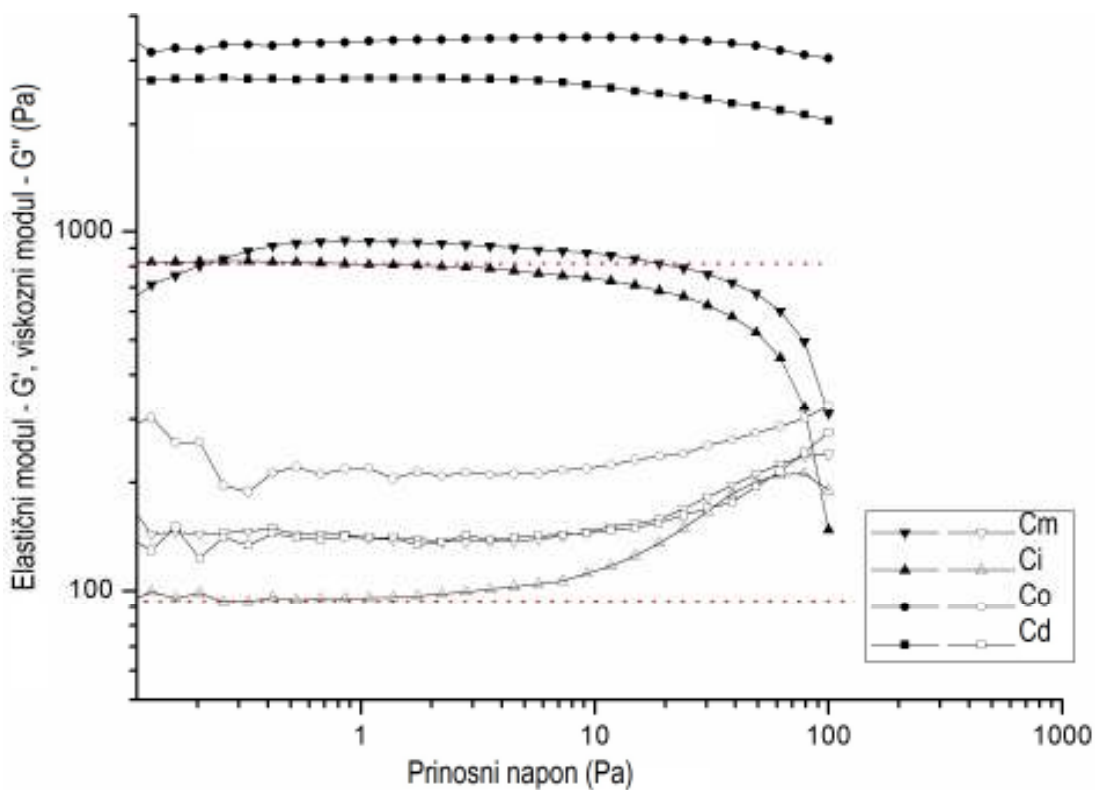
_u Dobijene R² vrednosti za uzlaznu krivu; _s Dobijene R² vrednosti za silaznu krivu; p<0,001

Rezultati kontinualnih reoloških merenja sami za sebe nisu dovoljni da se donesu konačni zaključci o sveukupnim karakteristikama emulzija. Međutim, izvesne diferencijacije između formulacija mogu da se naprave i da se koriste kao vodič u određenim fazama preformulacije/formulacije proizvoda tipa kozmetičkih emulzija.

Dinamička (oscilatorna) reološka merenja

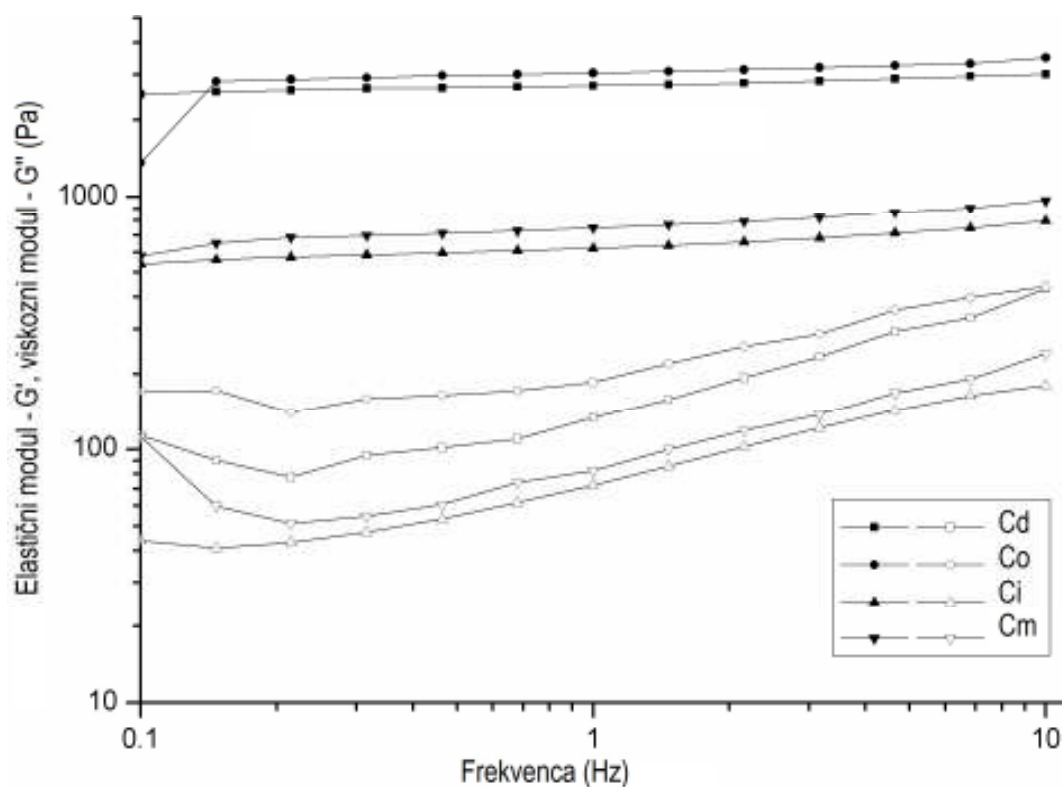
Da bi se sproveda merenja u linearnom viskoelastičnom regionu taj region je potrebno prethodno odrediti, što se postiže izvođenjem amplitudnog testa. Ovaj test ima značaja i kada je neophodno sprovesti karakterizaciju emulzija pri uslovima u kojima dolazi do narušavanja njihove strukture sa ciljem imitiranja stvarnih uslova (npr. mešanje i proticanje kroz sistem cevi).

Na Slici 20 su prikazani viskozni i elastični moduli u funkciji napona, a isprekidana linija prikazuje linearni viskoelastični region najmanje viskoelastičnog uzorka sa izocetil palmitatom Ci koji nije prelazio 3 Pa. Promena u sastavu masne faze izazvala je očiglednije promene u elastičnom nego u viskoznom odgovoru ispitivanih sistema.



Slika 20. Elastični (G' - crni simboli) i viskozni (G'' – beli simboli) moduli u funkciji prinosnog napona ispitivanih emulzija

Nakon određivanja lineranog viskoelastičnog regiona, sproveden je frekvencijski test u kome ne dolazi do narušavanja strukture emulzija. Slika 21 pokazuje uticaj varijacije u sastavu masne faze na G' i G'' module, dok su u Tabeli 13 sumirani svi značajni reološki parametri dobijeni oscilatornim merenjima. Za sve uzorke, vrednosti elastičnog modula bile su veće od vrednosti viskoznog modula, što ukazuje na više izraženu elastičnu komponentu ispitivanih sistema. Dinamičkim merenjima utvrđen je poredak u smanjenju vrednosti G' i G'' modula koji je identičan poretku smanjenja očiglednih viskoziteta uzoraka, dobijen pri merenjima u mirovanju. Primetno je da su razlike između elastičnih modula ispitivanih emulzija veće od razlika između viskoznih modula, dok su vrednosti $\tan\delta$ (G''/G') veoma slične (Slika 22). Najnižu vrednost $\tan\delta$ imao je uzorak sa dimetikonom koji se zbog toga može smatrati najelastičnijim kremom.



Slika 21. Elastični (G' - crni simboli) i viskozni (G'' – beli simboli) moduli ispitivanih emulzija u funkciji frekvence

Već je rečeno da se amplitudnim testom izvršilo određivanje viskoelastičnog regiona, dodatno, ovo merenje je iskorišćeno za dobijanje vrednosti prinosnih napona ispitivanih uzoraka. Pri vrednostima napona koji je niži od kritičnog (eng. *critical stress*) materijal se ponaša kao viskoelastično čvrsto telo, dok pri višim vrednostima, iznad vrednosti prinosnog napona, materijal počinje da teče. Ovo je razlog što je vrednost prinosnog napona moguće odrediti sa grafika zavisnosti $\tan\delta$ od napona smicanja, kao tačku nakon koje dolazi do nagle promene nagiba krive (Dapcevic i sar., 2008).

Tabela 13. Reološki parametri emulzija dobijeni oscilatornim merenjima (pri 1Hz)

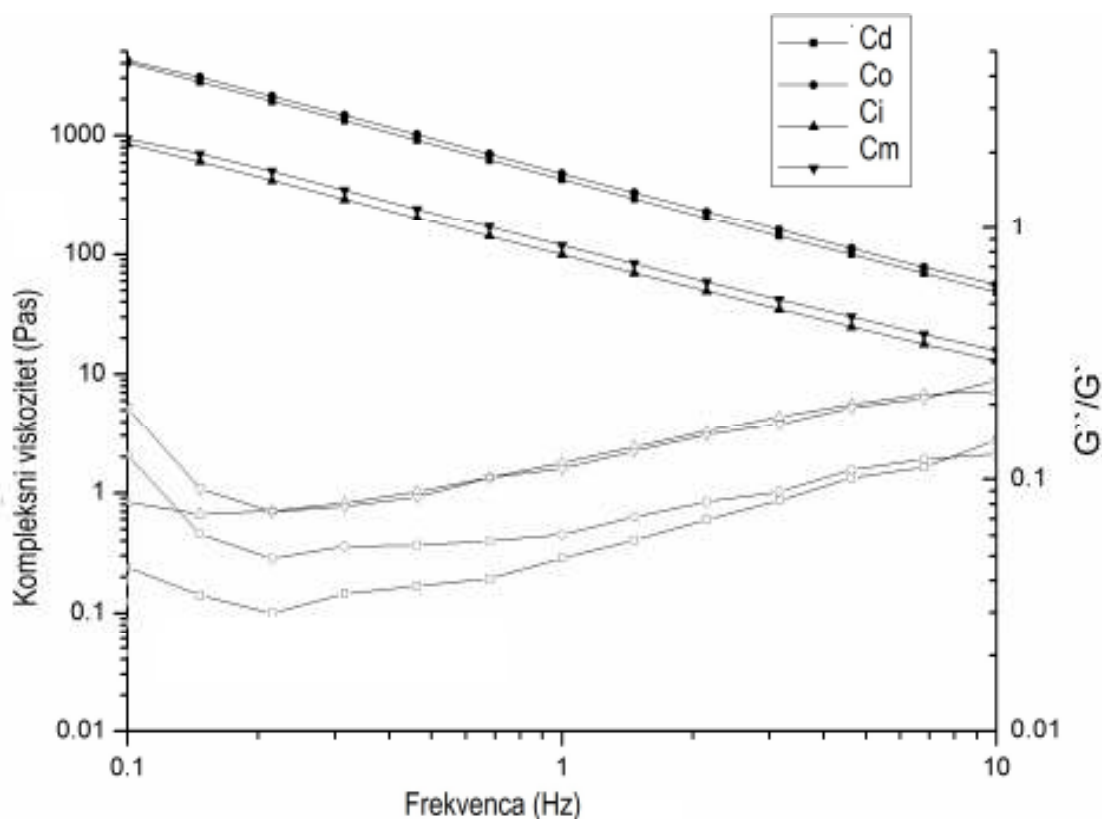
Uzorak	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tanδ
Cm	838±11	99,9±3,6	0,1192±0,0043
Ci	624±13	73,8±2,5	0,1183±0,0012
CoB	3046±51	190,1±15,7	0,0624±0,0081
Cd	2726±36	143,9±12,1	0,0528±0,0021

Promena u sastavu masne faze ispitivanih emulzija dovela je do promene prinosnog napona (Tabela 13) i dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno dobijenim rezultatima viskoznih i viskoelastičnih karakteristika model kremova.

Tako su, najviskoziji uzorci imali najveće elastične module i prinosne napone i ove vrednosti su se smanjivale sa smanjivanjem viskoziteta emulzija koji je izazvan promenom masne faze.

Kompleksni viskozitet (Slika 22), koji je određen unutar linearnog viskoelastičnog regiona gde nije došlo do narušavanja strukture bio je očekivano viši od odgovarajućeg prividnog viskoziteta dobijenog u kontinualnim merenjima.

Na osnovu svih dobijenih reoloških parametara (histerezna površina, prividni viskozitet, prinosni napon, viskoelastični moduli) ispitivani uzorci mogu biti podeljeni u dve, prethodno utvrđene, grupe (prva: Co i Cd uzorci; druga: Ci i Cm uzorci). Male vrednosti histerezne površine, viskoziteta i prinosnog napona ukazuju na lako nanošenje i rasprostiranje uzoraka Ci i Cm, koji bi zbog toga odgovarali za primenu na većim površinama kože, u odnosu na Cd i Co uzorke koji moraju biti intezivnije utrljavani.



Slika 22. Kompleksni viskozitet (crni simboli) i G''/G' (beli simboli) u funkciji frekvence (Hz)

Reološka merenja sprovedena na sobnoj i temperaturi kože pokazala su, kao što je i bilo očekivano, da promena temperature dovodi do promena u reološkom ponašanju uzoraka. Ipak, kada se posmatraju reološke karakteristike sva četiri uzorka i kada se napravi poredak među njima, dobijamo isti poredak na različitim temperaturama. Zbog toga se može reći da su, u smislu poređenja reoloških osobina ispitivanih emulzija, dobijeni isti rezultati bez obzira na temperaturu. Iz takvog nalaza proizilazi zaključak da se reološka merenja, koja se sprovode sa ciljem diferencijacije emulzija u pogledu ponašanja pri aplikaciji, mogu izvoditi na sobnoj temperaturi (bez potrebe izvođenja ovih merenja na temperaturi površine kože).

4. 1. 2. 2. Teksturna analiza

Sprovedena teksturna analiza imala je za cilj procenu uticaja promene pojedinačnih sastojaka masne faze uzoraka V/U kremova na njihove teksturne parametre. Dodatno je trebalo proceniti mogućnost primene ove veoma jednostavne tehnike ispitivanja u predviđanju aplikativnih karakteristika emulzija, ali i kao zamene za daleko složenija reološka merenja.

Parametri dobijeni teksturometrom (na sobnoj temperaturi) prikazani su u Tabeli 14. Primetno je da emulzija sa specijalnim maslinovim uljem ima najveće vrednosti svih ispitivanih parametara, a prati je uzorak sa dimetikonom 200/350. Uzorci sa izocetil palmitatom i parafinskim uljem imali su relativno slične vrednosti čvrstine (191,7 i 188,3) i kohezivnosti (114,7 i 115,5).

Tabela 14. Teksturni parametri ispitivanih V/U emulzija (sr. vrednost±st. devijacija)

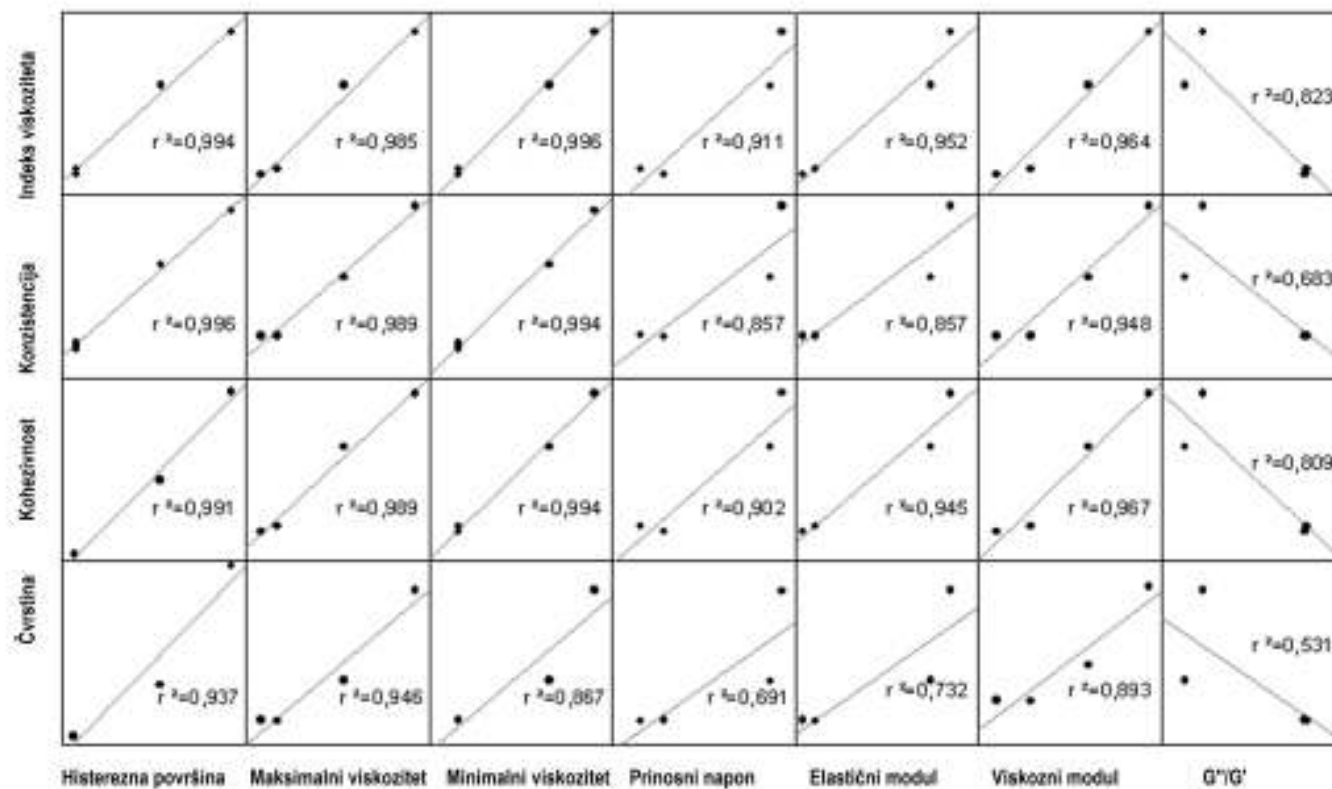
Uzorak	Čvrstina (g)	Konzistencija (Ns)	Kohezivnost (g)	Indeks viskoziteta (Ns)
Cm	188,3±12,0	1253,2±44,4	115,6±5,8	987,1±25,8
Ci	191,7±36,1	1136,7±54,3	114,7±19,6	881,3±45,3
Co	686,7±97,6	4159,2±78,2	469,9±53,7	3607,1±83,9
Cd	342,6±11,9	2977,9±31,0	276,7±1,8	2587,4±13,2

Kao i na osnovu rezultata reoloških merenja i teksturni parametri omogućavaju svrstavanje uzoraka u dve grupe. Poredak za sve teksturne parametre je isti: $Co < Cd < Ci \approx Cm$ što odgovara redosledu utvrđenom kod dobijenih reoloških parametara.

Na osnovu prethodno prikazanih rezultata reoloških i teksturnih merenja, između parametara dobijenih ovim merenjima mogao se pretpostaviti linearan odnos. Da bi se to ispitalo, dalje je analiziran stepen u kome ovi parametri koreliraju. Sprovedena je linearna regresiona analiza i dobijeni rezultati su grafički prikazani kao regresione krive (Slika 23) sa odgovarajućim korelacionim koeficijentima (r^2).

Na osnovu dobijenih rezultata vidi se da histerezna površina dobro korelira sa svim teksturnim parametrima ($r^2 > 0,9$), a najbolje sa konzistencijom ($r^2 = 0,996$, $p < 0,002$). Zatim, maksimalni i minimalni viskoziteti direktno koreliraju sa svim teksturnim parametrima, a najbolje sa konzistencijom i kohezivnošću; za maksimalni viskozitet ($r^2 = 0,989$, $p < 0,006$) i minimalni viskozitet ($r^2 = 0,994$, $p < 0,003$). Prinosni napon najbolje korelira sa kohezivnošću i indeksom viskoziteta ($r^2 = 0,902$ i $r^2 = 0,911$, $p < 0,05$). Viskozni modul dobro korelira sa svim teksturnim parametrima, dok je za elastični modul najbolja korelacija dobijena sa kohezivnošću i indeksom viskoziteta ($r^2 = 0,945$ i $r^2 = 0,952$, $p < 0,05$). $\text{Tan}\delta (G''/G')$ je u najmanjem stepenu korelirao sa teksturnim parametrima, a i stepen značajnosti ovih korelacija je bio najniži ($p < 0,1$).

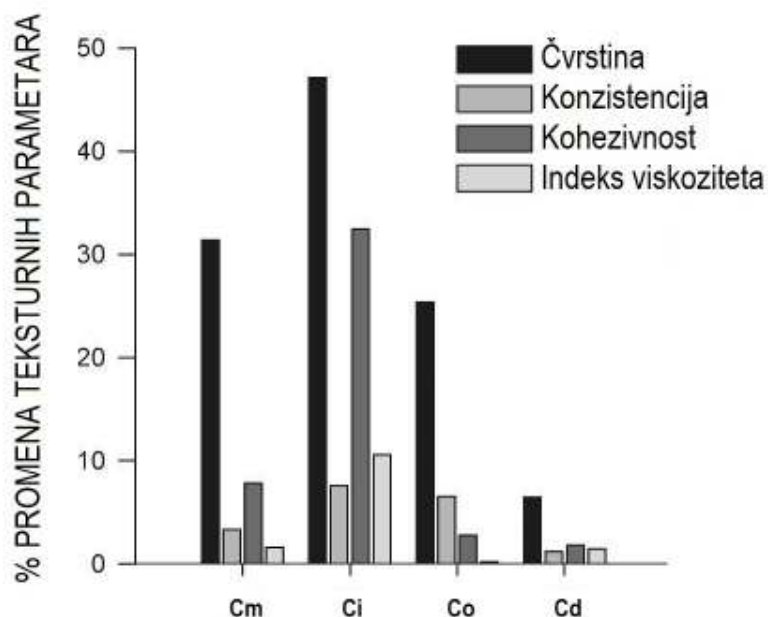
Posebno treba naglasiti visok stepen korelacije između teksturnih parametara i prinosnog napona, s obzirom na činjenicu da kada je u pitanju reološko određivanje prinosnog napona u stručnoj javnosti postoje neslaganja i polemike (Barnes, 1999). Prikazani rezultati ukazuju na mogućnost izvođenja veoma jednostavnih teksturnih merenja kao zamenu za neka reološka merenja poput određivanja vrednosti maksimalnog i minimalnog viskoziteta, odnosno prinosnog napona kod ispitivanih emulzija. Zatim, dobijeni rezultati ukazuju da teksturna analiza može da se koristi kao dovoljno osetljiva metoda u karakterizaciji i poređenju polučvrstih sistema, odnosno njihovih mehaničkih i strukturnih osobina, čak i kada se sprovode male promene u formulaciji, kao što je bio slučaj u ispitivanim model kremovima (promena jednog sastojka masne faze).



Slika 23. Odnos između reoloških i teksturnih parametara ispitivanih V/U emulzija

Na Slici 24 grafički su prikazani rezultati teksturne analize dobijeni na različitim temperaturama, kao procentne promene ovih parametara. Vrednosti teksturnih parametara su se smanjile na temperaturi površine kože što se i moglo očekivati, u poređenju sa rezultatima na sobnoj temperaturi, a najznačajnije smanjenje dobijeno je za čvrstinu kod svih emulzija, od 6% kod Cd uzorka do 47% kod Ci.

Kao i kod reološke karakterizacije, merenja teksturnih parametara na različitim temperaturama ukazuju na rastečnjavanje sistema na višim temperaturama, odnosno potrebu za stresom slabijeg intenziteta da bi sistem proticao/deformisao se, te da je ova merenja dovoljno sprovoditi samo na sobnoj temperaturi.



Slika 24. Teksturni parametri prikazani kao procentno smanjenje teksturnih parametara sa povećanjem temperature

4. 1. 2. 3. Senzorna procena ispitivanih uzoraka V/U emulzija i emolijenasa u njihovom sastavu

Kvantitativna deskriptivna analiza kozmetičkih proizvoda i sastojaka obezbeđuje detaljne, pouzdane i konzistentne podatke brojnih osobina proizvoda (Parente i sar., 2010). Da bi se dobio kompletan senzorni profil, posebno kada je reč o sličnim proizvodima, ova vrsta analize svakako je metoda izbora. Ipak, činjenica je da su ovakve studije dugotrajne i skupe. Zbog toga bi za potrebe poređenja nekoliko formulacija u toku razvoja kozmetičkog proizvoda pojednostavljena senzorna studija, u kombinaciji sa instrumentalnim merenjima mogla obezbediti neophodne podatke. Upravo je ovakav pristup uz prethodno sprovedena reološka i teksturna merenja, ispitan u ovoj fazi studije.

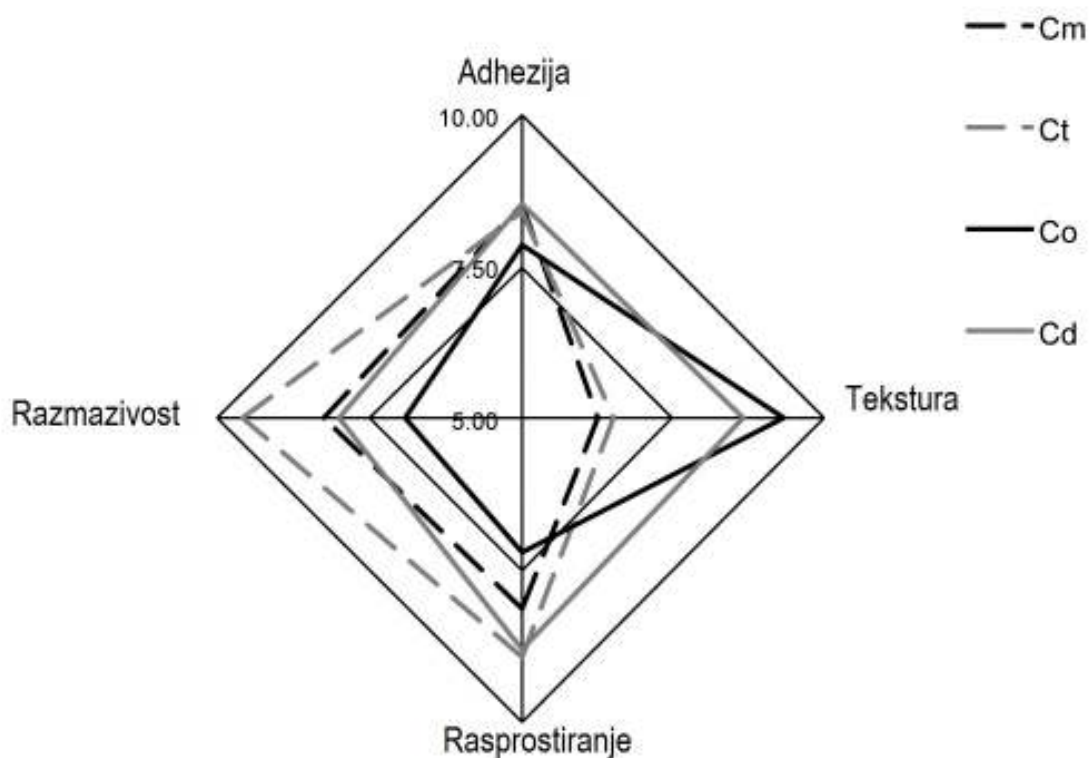
Rezultati dobijeni za senzorne atribute ocenjene opisnim terminima (koji su unapred definisani za svaki atribut – Tabela 4) prikazani su u Tabeli 15. Pošto su svi ispitivani uzorci bili V/U emulzije koje se razlikuju u samo jednoj komponenti masne faze, bilo je očekivano da određene senzorne karakteristike (kao što su sjaj, masnoća, rezidualni film) budu slične.

Ispitanici su obučeni da opišu konzistenciju uzorka pre utrljavanja samo kao "tečna" ili "polučvrsta" i kao rezultat svi uzorci su ocenjeni kao polučvrsti. Pored ovog atributa još jedan koji je procenjen od strane panelista, a povezan je sa konzistencijom, je tekstura – senzorni atribut koji je procenjivan tokom faze uzimanja proizvoda. Najvišu ocenu za teksturu dobio je uzorak Co sa specijalnim maslinovim uljem ($9,40 \pm 0,96$) koji je pratio uzorak Cd sa dimetikonom 200/350 ($8,66 \pm 1,36$), zatim uzorak Ci sa izocetil palmitatom ($6,46 \pm 0,90$) i konačno uzorak Cm sa parafinskim uljem ($6,26 \pm 1,28$). Samo između uzoraka Cm i Ci nije bilo statistički značajne razlike kada je reč o teksturi. Na Slici 25 su grafički predstavljeni atributi za koje je korišćena struktuirana skala.

Tabela 15. Kvantitativni rezultati senzorne procene ispitivanih uzoraka – atributi za koje su korišćeni opisni termini

Faza aplikacije	Senzorni atribut	Cm	Ci	Co	Cd
Pre utrljavanja i tokom uzimanja	Konzistencija		Svi uzorci opisani su kao polučvrsti		
	Sjaj	Sjajan	Blago sjajan	Biserno sjajan	Biserno sjajan/mat *
	Elastičnost	Blago elastičan	Elastičan	Elastičan	Blago elastičan
Tokom utrljavanja	Lepljivost	Nije lepljiv	Nije lepljiv	Veoma lepljiv	Lepljiv
	Gustina	Blago gust	Gust	Veoma gust	Gust
	Masnoća	Blago mastan	Blago mastan	Blago mastan	Mastan
	Sjaj	Sjajan	Veoma sjajan	Veoma sjajan	Veoma sjajan
	Upijanje	Sporo	Umereno	Umereno	Umereno
Osećaj nakon nanošenja	Rezidualni film	Umeren film	Umeren film	Izražen film	Izražen film
	Lepljivost	Nije lepljiva	Nije lepljiva/blago lepljiva*	Lepljiva	Blago lepljiva
	Masnoća	Blago masna	Blago masna	Masna	Masna
	Sjaj	Blago sjajna	Blago sjajna	Sjajna	Sjajna

* Svaki prikazani atribut je opisan prikazanim terminom od strane više od 50% ispitanika, samo atributi označeni * su opisani sa dva termina (svaki termin korišćen je više od 35% od strane ispitanika)

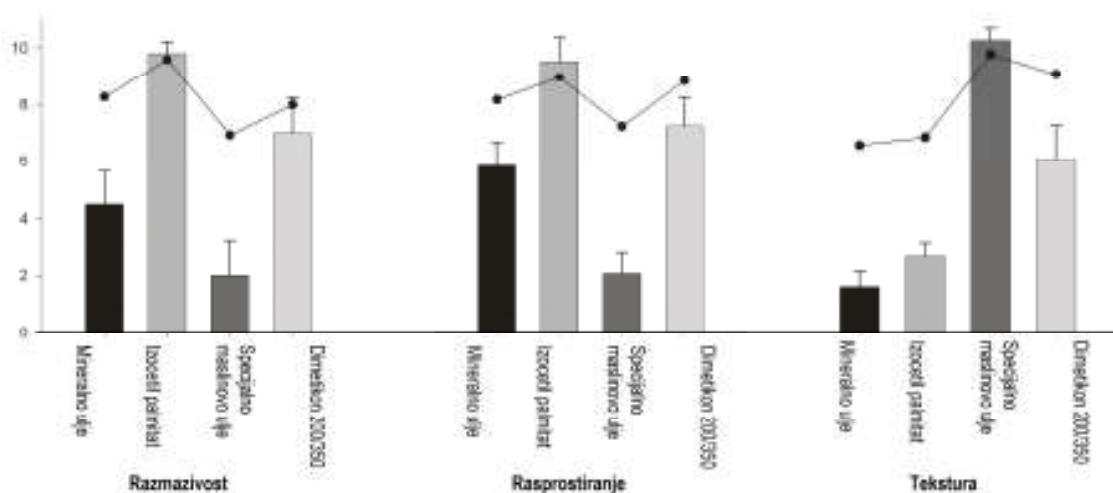


Slika 25. Rezultati senzorne studije ispitivanih uzoraka - atributi za koje je korišćena strukturirana skala

Uzorak Ci dobio je najveću ocenu za razmazivost tokom utrljavanja ($9,60 \pm 0,82$) i dobijena vrednost statistički je bila veća od vrednosti dobijenih za uzorke Co ($6,94 \pm 0,62$) i Cd ($8,02 \pm 1,02$). Što se tiče adhezije (pre utrljavanja) i rasprostiranja (tokom utrljavanja) uzorak Cm dobio je najnižu ocenu, iako između ocena koje su dobili uzorci za ove atribute nije bilo statistički značajne razlike.

Rezultati senzorne karakterizacije emolijenasa mogu naći primenu u toku razvoja proizvoda, tako što se odabirom emolijensa određenih senzornih karakteristika može uticati na senzorne karakteristike proizvoda (Pons-Guiraud, 2007). Na Slici 26 su prikazani rezultati senzorne procene 4 varirana emolijensa u ovoj studiji i oni su u saglasnosti sa rezultatima senzorne procene ispitivanih emulzija. Specijalno maslinovo ulje (emolijens u uzorku Co) dobilo je najvišu ocenu za teksturu, a prati ga dimetikon (u Cd), zatim izocetil palmitat (u Ci) i parafinsko ulje (u Cm) – isti redosled ocena je dobijen za teksturu odgovarajućih emulzija.

Distribucija rezultata dobijenih za rasprostiranje emulzija odgovara distribuciji rezultata za rasprostiranje emolijenasa. Kada je reč o razmazivosti, najvišom ocenom ocenjen je izocetil palmitat, a najnižom specijalno maslinovo ulje; što je opet u saglasnosti sa senzornom procenom razmazivosti uzoraka. Uzorak Co je opisan kao veoma lepljiv i veoma gust tokom utrljavanja i ocenjen je najvišom ocenom za teksturu. Ovo može biti objašnjeno inherentnom strukturom samo emolijensa, s obzirom na to da je specijalno maslinovo ulje dobilo najvišu ocenu u proceni teksture.



Slika 26. Senzorna procena odabranih atributa emolijenasa (barovi) i podudarni atributi odgovarajućih kremova (linije)

Dobijeni rezultati pokazuju da podaci dobijeni senzornom karakterizacijom emolijenasa mogu biti iskorišćeni pri formulisanju kozmetičkog proizvoda unapred definisanih senzornih karakteristika ili u postupku preformulacije. U slučaju razmazivosti i rasprostiranja kozmetičkih proizvoda, atributa koji su od najvećeg značaja za aplikaciju na velikim površinama kože, zamena samo jednog sastojka može napraviti značajnu razliku. Npr. postojeća krema za lice lako može biti modifikovana u losion za telo samo zamenom jednog emolijensa drugim, jednostavnim, odabirom emolijensa odgovarajućih senzornih karakteristika.

Konačno, nakon prikazivanja rezultata uticaja promene masne faze na reološke, teksturne i senzorne karakteristike bilo je moguće izvršiti i poređenje rezultata dobijenih instrumentalnim merenjem (reološko i teksturno) i senzorne procene ispitanika.

Kao što je prikazano u delu 4. 1. 2. 1. (4. 1. 2. 1. *Reološka merenja*) sprovedena reološka merenja omogućila su dobijanje podataka o maksimalnom i minimalnom viskozitetu (η_0 and η_∞), preračunavanje histerezne površine, određivanje G' , G'' , $\tan\delta$ i prinosnog napona - τ_0 (svi rezultati su radi jednostavnijeg pregleda sumirani i prikazani u Tabeli 16).

Tabela 16. Reološki parametri ispitivanih V/U emulzija

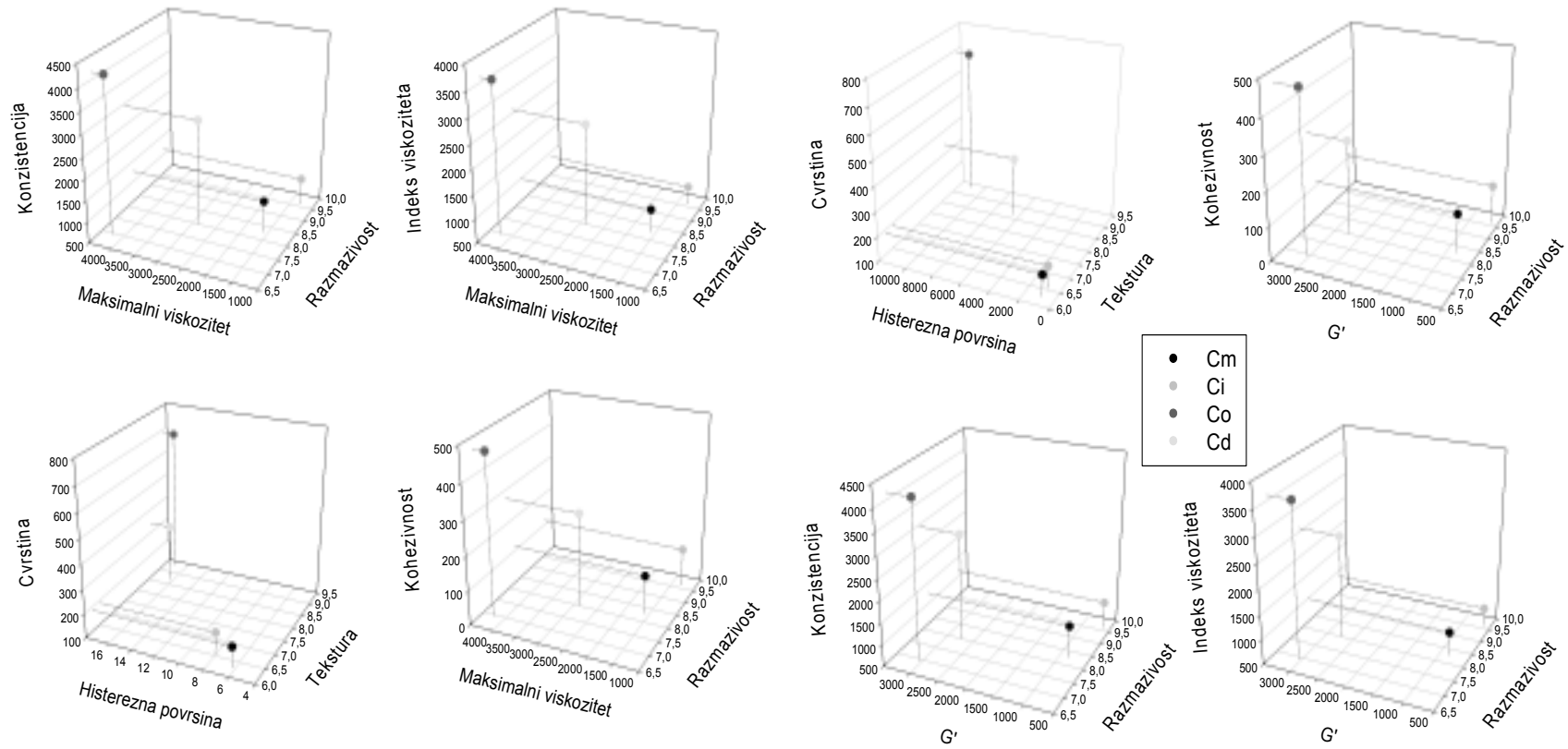
	Histerezna površina (Pa/s)	η_0	η_∞	G' (Pa)	G'' (Pa)	$\tan\delta$	τ_0 (Pa s)
Cm	857±2	1595±11	0,75±0,02	838±11	99,9±3,6	0,1192±0,0043	6,2±0,1
Ci	869±9	1294±21	0,66±0,03	624±13	73,8±2,5	0,1183±0,0012	8,0±0,1
Co	11030±54	4239±61	88,58±2,13	3046±51	190,1±15,7	0,0624±0,0081	17,0±0,3
Cd	6446±33	2875±28	59,82±0,91	2726±36	143,9±12,1	0,0528±0,0021	16,1±0,4

Uzorak Co imao je najveći η_0 , kao i histereznu površinu i prinosni napon. Prinosni naponi uzoraka Cd i Co su približne vrednosti, ali su vrednosti η_0 i histerezne površine uzorka Co bile niže. Očekivano je da kremovi sa velikim vrednostima viskoziteta, a viskozitet je mera otpora sistema prema proticanju, budu teško razmazivi i lepljivi (Parente i sar., 2005). Ovo je potvrđeno senzornom procenom, jer je uzorak Co najniže ocenjen za attribute razmazivost i rasprostiranje. Takođe, uzorak Ci dobio je najveće ocene za ove attribute, a vrednosti njegovog maksimalnog i minimalnog viskoziteta bile su najniže. Viskoelastičnost kremova već je prodiskutovana uz ponovni osvrt na činjenicu da su kod svih uzoraka vrednosti elastičnog modula bar za jednu magnitudu veće od vrednosti viskoznog modula, kao i da se Cd krem koji je imao najnižu vrednost $\tan\delta$ može smatrati najelastičnijim.

Na osnovu prethodnih rezultata senzorne procene u kombinaciji sa reološkim merenjima može se pretpostaviti da krema sa zadovoljavajućim osobinama pre (adhezija) i tokom utrljavanja (razmazivost i rasprostiranje) treba da pokazuje nešto veću tiksotropiju (veća histerezna površina), nizak prinosni napon i maksimalni viskozitet, dok G' treba da bude bar jednu magnitudu veći od G'' .

Ilustrativni prikaz statistički značajnih korelacija ($p < 0,05$) senzornih atributa, reoloških i teksturnih parametara dat je na Slici 27. Sa slike se vidi da tekstura direktno korelira sa histereznom površinom, prinosnim naponom i čvrstinom. Razmazivost direktno korelira sa maksimalnim i minimalnim viskozitetom, elastičnim i viskoznim modulom, konzistencijom, kohezivnošću i indeksom viskoziteta.

Premda su do sada studije pokazale da se određeni senzorni atributi mogu dovesti u vezu sa nekim reološkim i teksturnim osobinama (Park i Song, 2010), korelacije dobijene u ovoj studiji pokazale su da se neki senzorni atributi (u ovom slučaju tekstura i razmazivost) mogu predvideti instrumentalnim merenjima. Ovo može biti značajno u uslovima kada senzornu studiju nije moguće izvesti. Ipak, treba naglasiti da neke attribute (kao u ovoj studiji adheziju) nije moguće povezati ni sa jednim teksturnim ili reološkim parametrom, tj. nije moguće uspostaviti bilo kakvu korelaciju. Dodatno, postoje problemi u identifikovanju fizičke prirode nekih senzornih atributa. Razlog ovome može biti činjenica da neki senzorni atributi imaju snažan uticaj na hedonijski odgovor, odnosno na uživanje u određenim osobinama proizvoda. Ovaj hedonijski aspekt često ima za posledicu nelinearan odnos između senzornih atributa i drugih merljivih parametara, kao što su Kilcast i Clegg (2002) već objavili.



Slika 27. Grafički prikaz korelacija između senzornih atributa, reoloških i teksturnih parametara

Dakle, senzorni atributi koji zavise od fizičkih karakteristika emulzije (tj. osobina pri proticanju) kojima se opisuje proizvod u fazi uzimanja i utrljavanja mogu u određenom stepenu biti predviđeni instrumentalnim, odnosno reološkim i teksturnim merenjem. Tako određivanje preliminarnog senzornog profila može biti pojednostavljeno nekim instrumentalnim merenjima, kao što su reološka i teksturna merenja.

Dobijeni rezultati prikazani za formulisane emulzije Cm, Ci, Co i Cd, pokazuju da bi se samo na osnovu odgovarajućih reoloških i teksturnih parametara mogli formulisati proizvodi željenih senzornih karakteristika. Ovakav kombinovani pristup u formulisanju može uštedeti i vreme i novac i biti od pomoći u kompletnoj karakterizaciji novog kozmetičkog proizvoda.

4. 1. 3. Efikasnost V/U emulzija

Kada su u pitanju senzorni atributi i efikasnost proizvoda, Wang i saradnici (1999) pretpostavili su da bi zadovoljavajući senzorni atributi proizvoda namenjenog vlaženju kože mogli indirektno da utiču na efikasnost na taj način što bi indukovali potrošače da koriste veće količine proizvoda. Njihova istraživanja, ipak su pokazala da je upotrebljena količina krema gotovo konstantna bez obzira na njegovu prirodu i da bez obzira na pretpostavku vlažeći efekat i senzorne karakteristike nisu povezani.

Rezultati kratkotrajne *in vivo* studije za sve ispitivane V/U emulzije prikazani su u Tabeli 17 kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija i to bazalne (inicijalno) izmerene vrednosti i vrednosti izmerene jedan sat nakon nanošenja uzoraka. Nakon sat vremena svi uzorci su doveli do povećanja vlažnosti kože (SCH), ali su statistički značajno povećanje izazvali uzorci Cm, Ci i Cd. Za razliku od vlažnosti, vrednosti TEGV nisu se značajno menjale što ukazuje na odsustvo narušavanja kožne barijere. Sadržaj površinskih lipida bio je statistički značajno povećan posle aplikacije sva 4 uzorka.

Tabela 17. Vrednosti dobijene *in vivo* merenjima parametara kože (TEGV, sadržaj površinskih lipida i SCH), bazalne (inicijalne) vrednosti i vrednosti merene nakon sat vremena

Uzorci i odgovarajuće netretirane kontrole	Stepen hidratacije SC-a (SCH)		Sadržaj površinskih lipida		Transepidermalni gubitak vode (TEGV)	
	Bazalna vrednost	Nakon 1 sata	Bazalna vrednost	Nakon 1 sata	Bazalna vrednost	Nakon 1 sata
Cm	41,7±9,33	53,4±10,61*	2,0±3,29	114,5±80,72*	11,5±4,12	11,4±2,44
Cm _{kon}	43,4±10,28	40,3±10,08	1,8±2,29	6,9±6,52	12,2±4,16	11,8±3,38
Ci	44,9±7,95	55,4±9,54*	1,6±1,51	157,23±89,53*	13,9±4,59	13,5±3,38
Ci _{kon}	42±7,11	48±10,5	2,5±2,18	4,7±2,82	14,1±5,99	15,7±4,76
Co	45,8±6,45	52,3±9,80	1,5±1,71	86,5±62,61*	12,9±4,50	10,3±2,18
Co _{kon}	45,8±11,99	45,1±8,33	2,4±2,79	2,4±2,12	14,4±2,47	13,65±3,87
Cd	44,8±6,08	59,8±8,82*	2,2±1,86	130,8±52,3*	15,1±3,82	13,8±3,82
Cd _{kon}	46,7±5,62	49,7±7,19	0,8±0,83	2,8±3,33	14,7±4,17	14,4±3,58

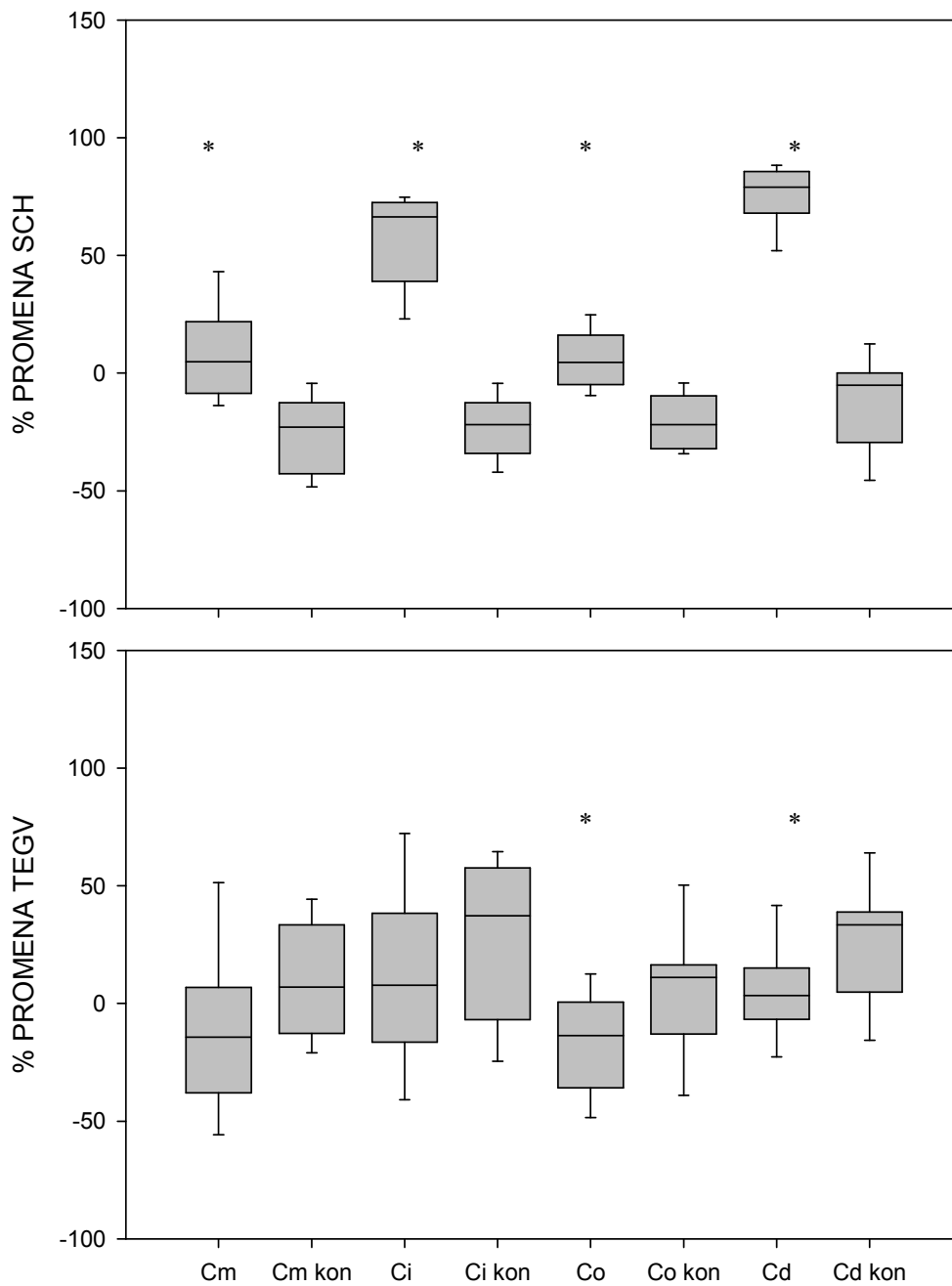
*Statistički značajne razlike u odnosu na bazalnu vrednost (p<0,05)

Senzornom procenom uzorci sa specijalnim maslinovim uljem i dimetikonom, Co i Cd, ocenjeni su najvišim ocenama (opisnim terminima) za masnoću, sjaj i rezidualni film, ipak merenje sadržaja površinskih lipida pokazalo je najveće povećanje posle primene uzorka sa izocetil palmitatom Ci.

Sadržaj sebuma na merenim mestima je prirodno veoma nizak, te se, razlike u instrumentalnim merenjima mogu objasniti inherentnim razlikama među uzorcima (različiti emolijensi) i načinom njihove apsorpcije na traci sebumetra. Nakon 7 dana sadržaj sebuma je bio nepromenjen u odnosu na inicijalna merenja. Ovo se može objasniti činjenicom da kremovi jutro pre merenja nisu aplikovani. Dakle, povećanje sadržaja sebuma posle aplikacije kremova (u 1-očasovnoj studiji) je očigledno posledica prisustva rezidualnog filma na površini kože, a ne eventualnog uticaja kremova na stvaranje sebuma.

Uticaj sedmodnevne primene ispitivanih uzoraka kremova na nivo vlažnosti površinskih slojeva kože (SCH) i njenu barijernu funkciju (TEGV) prikazan je na Slici 28. Svi uzorci doveli su do značajnog povećanja SCH kako u poređenju sa bazalnim vrednostima tako i u poređenju sa netretiranom kontrolom. Što se tiče uticaja na barijernu funkciju kože, primena svih uzoraka izazvala je trend smanjenja TEGV u odnosu na bazalne vrednosti, a značajno smanjenje izazvali su uzorci sa maslinovim uljem (Cm) i dimetikonom (Cd), iako je Cm doveo do većih promena. U poređenju sa netretiranim kontrolama na kojima ispitanicu nisu primenjivali nikakve kozmetičke proizvode tokom studije (uz podsećanje na to da je studija sprovedena u zimskom periodu) svi uzorci doveli su do statistički značajnog povećanja SCH i smanjenja TEGV.

Kod određenih ispitanika pojavila se kserotična, gruba koža sa umerenim perutanjem na netretiranim površinama. Ovo je svakako u vezi sa tzv. zimskom kserozom, stanjem koje se javlja pod uticajem niske vlažnosti vazduha i hladnoće (Byrne, 2010). Zbog toga je važno naglasiti da su ispitivani kremovi sprečili nastanak ovog stanja i stoga obezbedili odgovarajuću negu i zaštitu kože.



Statistički značajne razlike nađene su za sve uzorke u poređenju sa netretiranom kontrolom, a * su označeni uzorci za koje su dobijene statistički značajne razlike u odnosu na bazalnu vrednost

Slika 28. Uticaj ispitivanih uzoraka na SCH i TEGV nakon 7-odnevne aplikacije

Kada su u pitanju biomehanički parametri, R2 – ukupna elastičnost (eng. *gross elasticity*) koja karakteriše sveukupnu elastičnost kože i R5 – mrežna elastičnost (eng. *net elasticity*) koja je pokazatelj samo elastične komponente viskoelastičnog odgovora kože, odabrani su za dalju analizu. Za ove parametre nije bilo statistički značajne razlike između posmatranih vremenskih tačaka. Ovo se može objasniti pre svega činjenicom da su mladi ispitanici učestvovali u studiji (Moddaresi i sar., 2009) i, moguće, nedovoljno dugačkim trajanjem ispitivanja da bi se uočile, tj. nastale značajne promene viskoelastičnih parametara kože.

Rezultati ispitivanja *in vivo* efikasnosti izrađenih dermokozmetičkih V/U emulzija namenjenih vlaženju kože pokazali su zadovoljavajuće i željene efekte za sve ispitivane uzorke tj. dobru hidrataciju kože (povećanje SCH) bez narušavanja stanja kožne barijere (smanjenje TEGV). Premda postoje izvesne, manje razlike u prikazanoj efikasnosti, može se zaključiti da promena sastava masne faze (emolijensa) nije dovela do značajne promene u efikasnosti. Na osnovu svih prikazanih rezultata kratkotrajne i dugotrajne studije, za uzorak Cm moglo bi se reći da je pokazao najbolje performanse na koži, a ipak, ovaj uzorak je u senzornoj studiji sveukupno najniže ocenjen. Još jednom su rezultati senzorne *in vivo* studije pokazali da objektivni efekti i odabrani senzorni atributi kozmetičkih proizvoda nisu povezani.

4. 2. Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada

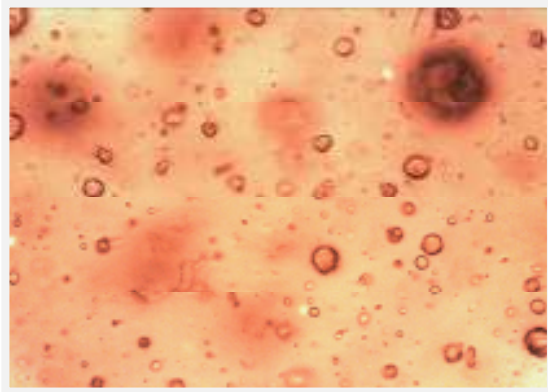
4. 2. 1. Ispitivanje mehanizama stabilizacije, koloidne strukture i bezbednosti emulzija sa APG emulgatorom – Montanov™ 202

4. 2. 1. 1. Mikroskopska analiza binarnih i ternarnih sistema

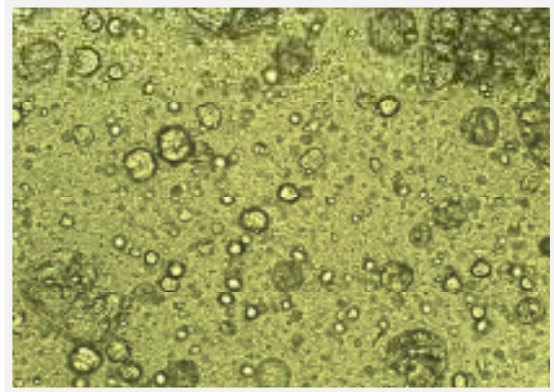
Da bi se ispitao stabilizacioni potencijal, kao i uticaj koncentracije ispitivanog emulgatora na koloidnu strukturu binarnih sistema, sprovedena je mikroskopska analiza. Mikrografije binarnih sistema snimljene su svetlosnim (Slika 29) i polarizacionim mikroskopom (Slika 30) sedam dana nakon izrade, pri uveličanju 200 i 400 puta.

Na svetlosnim mikrografijama (Slika 29) jasno se uočava da povećanje koncentracije emulgatora dovodi do ugušćivanja sistema, odnosno do povećanja broja specifičnih struktura, za čije je dalje tumačenje neophodno pogledati polarizacione mikrografije.

Anizotropne strukture, koje se definišu kao Malteški krstovi, vidljive na polarizacionim mikrografijama (Slika 30), ukazuju na prisustvo lamelarnih struktura, verovatno oba tipa, tj. lamelarne tečno-kristalne faze i α -gel kristalne faze (Savic i sar., 2005; Fairhurst i sar., 1998). Povećanje koncentracije emulgatora dovelo je do povećanja u broju i veličini anizotropnih struktura. Pri koncentracijama emulgatora većim od 20% (uzorci B5 i B6) ovo povećanje je veoma značajno. Dodatno, pažljivim posmatranjem polarizacionih mikrografija ovih uzoraka, uočava se prisustvo kristala emulgatora, koje je kod binarnih sistema očekivano, s obzirom na povećanje količine emulgatora, a odsustvo masne faze.



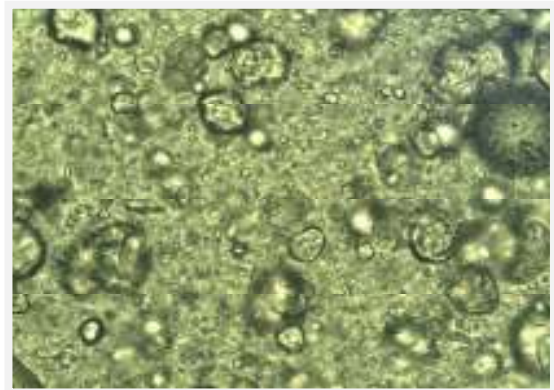
a)



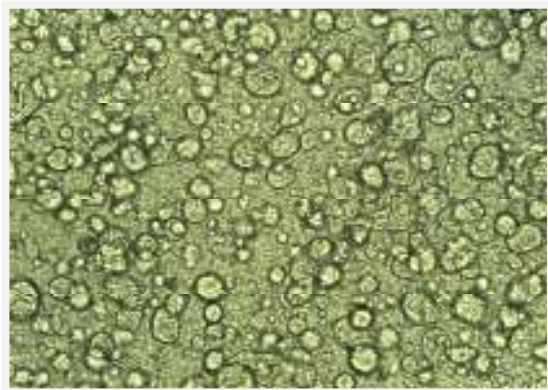
b)



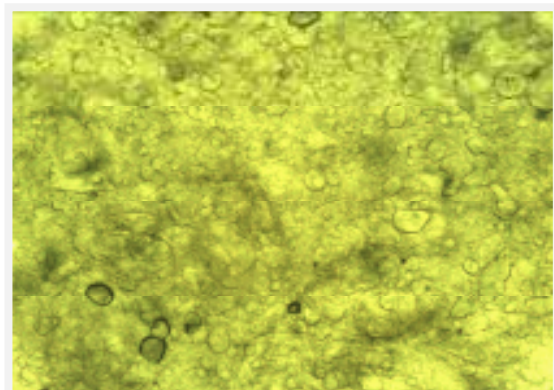
c)



d)

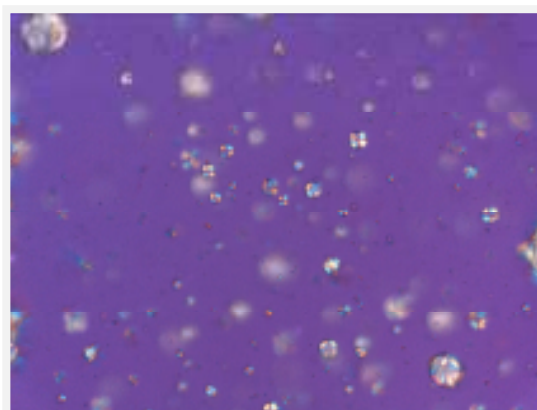


e)

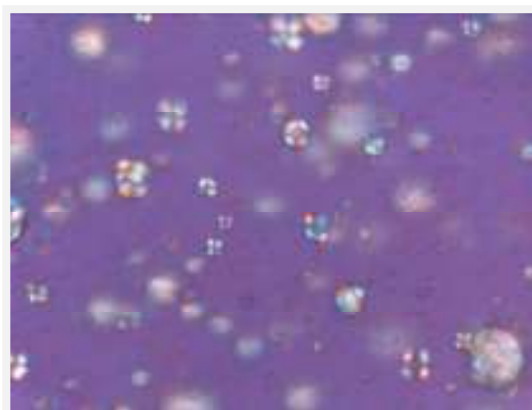


f)

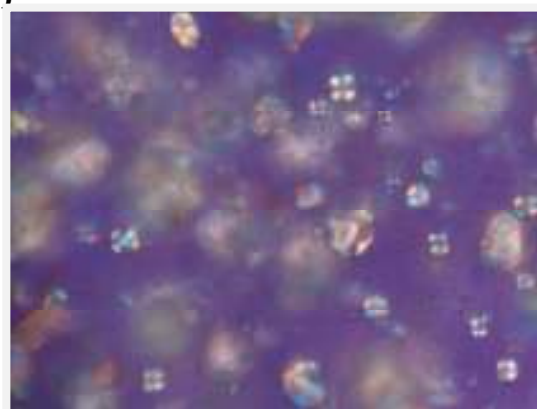
Slika 29. Svetlosne mikrografije binarnih sistema a) B1 (200x), b) B2 (200x). c) B3 (400x), d) B4 (400x), e) B5 (200x) i f) B6 (400x)



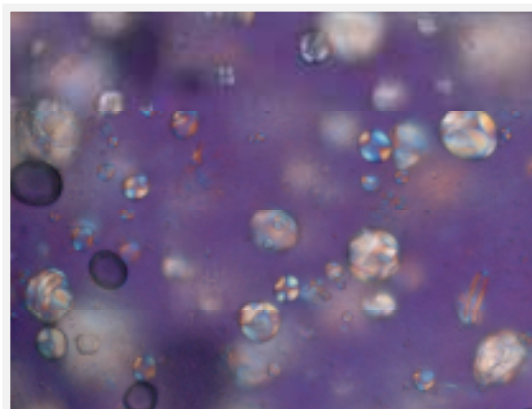
a)



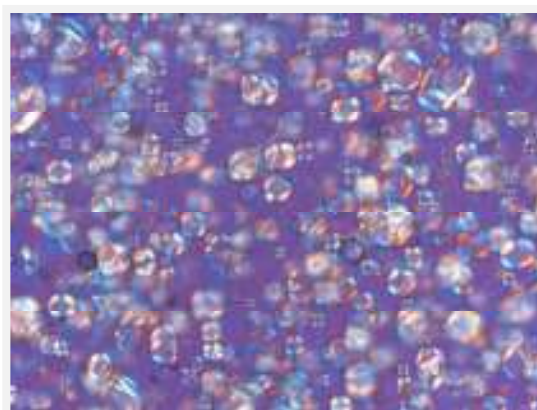
b)



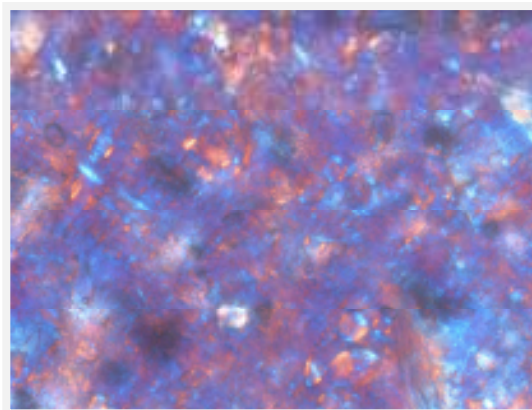
c)



d)



e)



f)

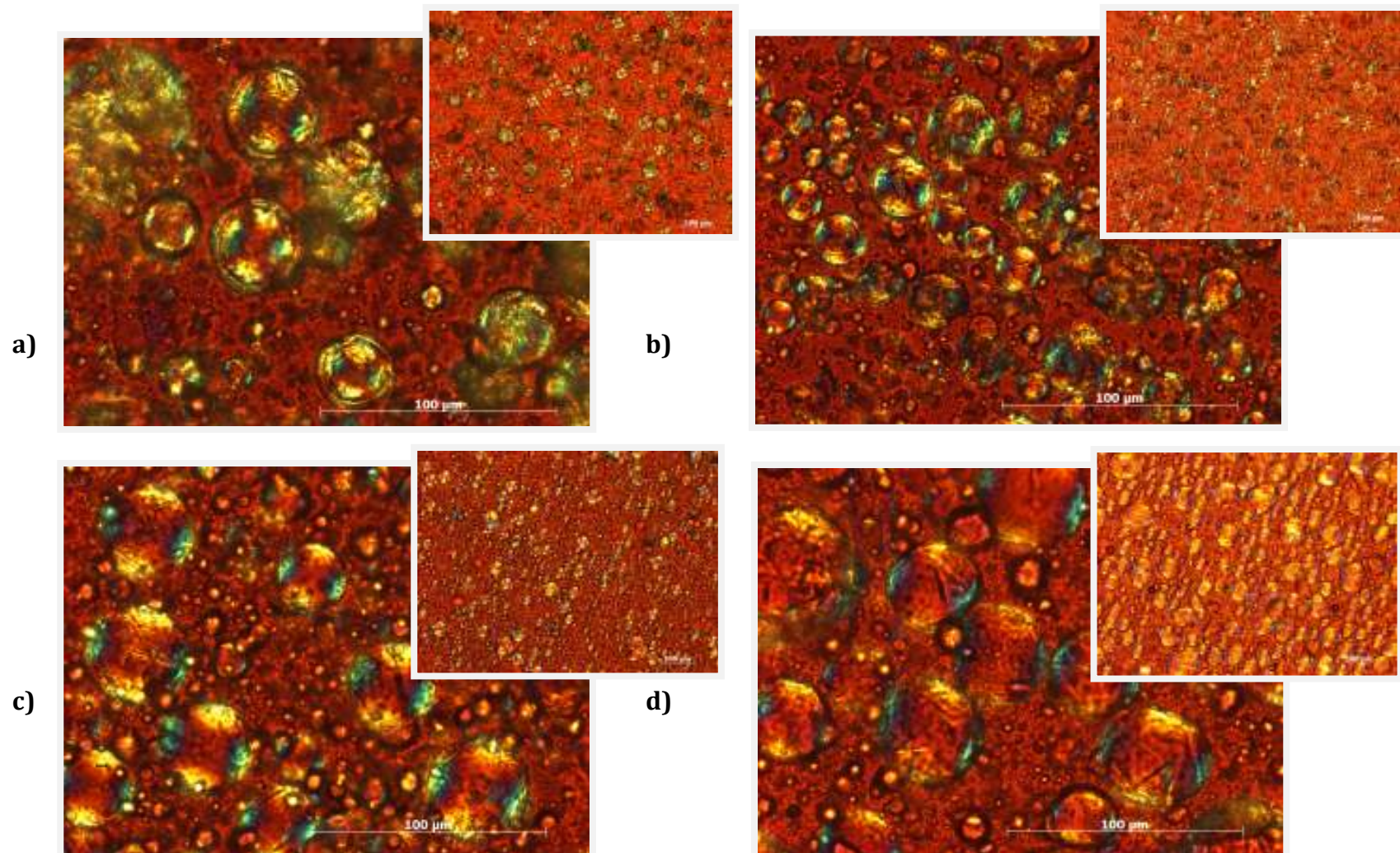
Slika 30. Polarizacione mikrografije binarnih sistema a) B1 (200x), b) B2 (400x). c) B3 (400x), d) B4 (400x), e) B5 (200x) i f) B6 (400x)

Na Slici 31 predstavljene su polarizacione mikrografije ternarnih sistema, tj. kremova sa rastućom koncentracijom uljane faze: 5, 10, 20 i 30% (m/m) kaprilno-kaprinskih triglicerida (svaki uzorak prikazan je pri uveličanju 100 i 400 puta).

Dobijeni uzorci bili su vidljivo različite konzistencije i to: mekih kremova, kakvi su bili uzorci T5mc i T10mc, odnosno gustih kremova (uzorci T20mc i T30mc). Konzistencija kremova rasla je sa porastom koncentracije ulja, dok je uzorak sa 30% masne faze pokazao i izvesnu nehomogenost – zapažaju se vidljive grudvice (T30 mc). Kod ternarnih sistema se uočavaju prethodno opisani Malteški krstovi, ali i pojava dvostrukog prelamanja na ivici masnih kapi – anizotropnih slojeva oko kapi ulja (tzv. *onion rings*), što se posebno jasno vidi na mikrografijama većeg uveličanja (Slika 31 uveličanje 400x). Povećanje u broju kapi koje su raspoređene unutar kontinualne faze sa ostacima gelske mreže (Slika 31 uveličanje 100x) ide u prilog organoleptički utvrđenom stanju, da sa povećanjem koncentracije ulja dolazi do povećanja viskoziteta sistema. Mikrografije ukazuju na to da u prisustvu masne faze ispitivani emulgator daje sisteme stabilizovane lamelarnom fazom, kao i da se sa povećanjem količine masne faze od 5 do 20% povećava broj i veličina karakterističnih anizotropnih struktura. Dalje povećanje koncentracije masne faze na 30% (T30mc, Slika 31d) ne dovodi do značajnih promena u izgledu mikrografija u poređenju sa uzorkom sa 20% masne faze (T20mc, Slika 31c).

4. 2. 1. 2. Rezultati WAXD i SAXD merenja binarnih i ternarnih sistema

Polarizacione mikrografije su iskorišćene za detekciju i potvrdu specifičnih lamelarnih mezofaza, kao prvi i uobičajeni korak u ovakvoj vrsti studija (Zetzl i sar., 2009), ali za pouzdaniji uvid i identifikaciju ovih specifičnih faza sprovedena su WAXD i SAXD merenja. Naime, činjenica je da difrakcione karakteristike ugljovodoničnih lanaca u α -kristalnoj gel fazi ($L\beta$) predstavlja prisustvo oštrog pika koji se pojavljuje na 0,41-0,42 nm i dodatne interferencije u SAXD regionu ukazujući na prisustvo lamelarne tečno-kristalne faze (Fairhurst i sar., 1998).

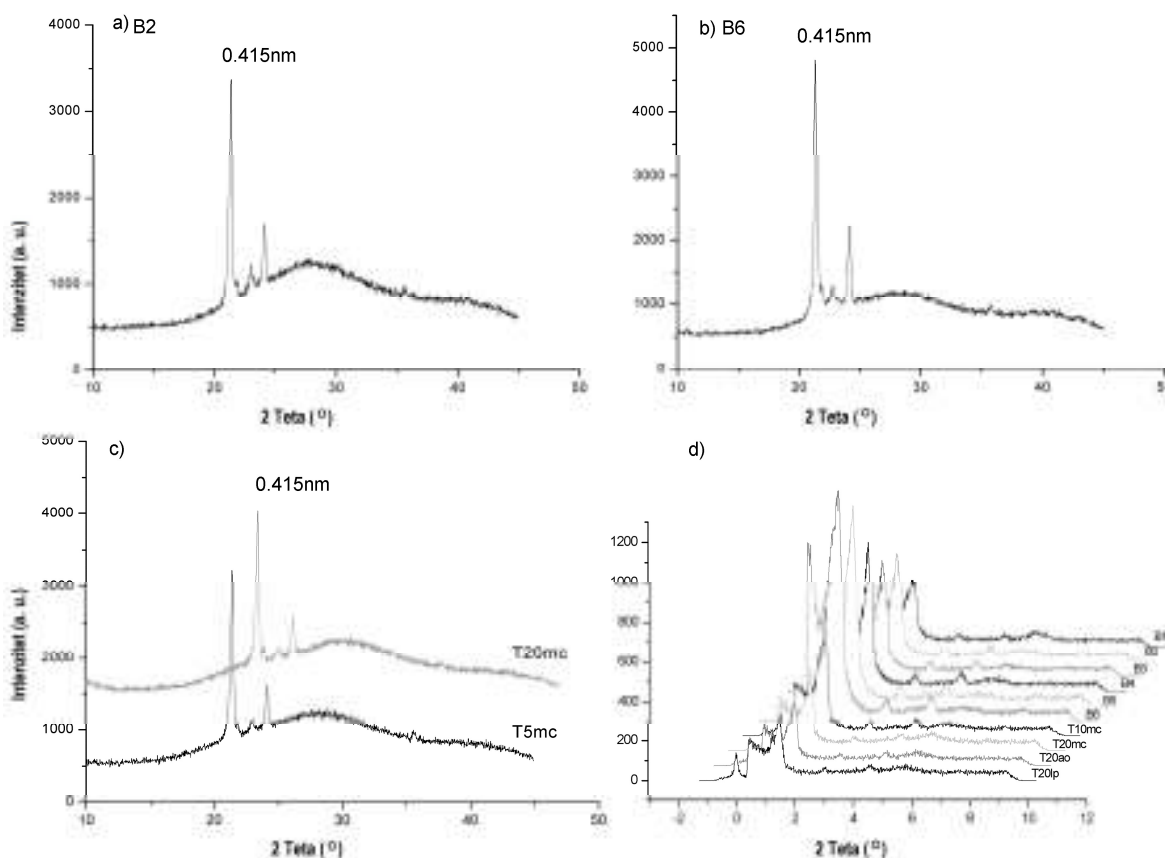


Slika 31. Polarizacione mikrografije ternarnih uzoraka (velika slika uveličanje 400x, mala slika uveličanje 100x): a) T5mc, b) T10mc, c) T20mc i c) T30mc

Pojavljivanje jedne oštre refleksije na 0,415 nm na WAXD difraktogramima (Slika 32) potvrđuje prisustvo α -kristalne gel faze i kod binarnih i kod ternarnih sistema.

Očekivano, intenzitet interferencije povećavao se sa povećanjem koncentracije emulgatora u binarnim sistemima (Slika 32a i 32b), dok je kod ternarnih sistema primetno smanjenje intenziteta sa povećanjem koncentracije ulja (Slika 32c).

Dodatno, kod svih uzoraka pojavljuje se difuzni halo-prsten u WAXD spektru sa jednim pikom na 0,45 nm. Ovim dobijeni rezultati difrakcije X-zraka pod velikim uglom potvrđuju to da je pored dominantne lamelarne α -gel kristalne faze ($L\beta$) kod ispitivanih sistema prisutna i lamelarna tečno-kristalna faza ($L\alpha$).



Slika 32. a) WAXD difraktogram uzorka B2; b) WAXD difraktogram uzorka B6; c) WAXD difraktogram uzoraka T5mc i T20mc; d) SAXD difraktogram binarnih i ternarnih sistema

Dobijeni WAXD rezultati podržani su kasnije sprovedenim SAXD merenjima (Slika 32d). Difrakcija X-zraka pod malim uglom potvrdila je prisustvo jasno uređenih struktura koje sadrže lamele sa dobro definisanim međuslojnim rastojanjem, tj. oštre refleksije u odnosu $d:d/2:d/3$, što je karakteristika lamelarne tečno-kristalne faze.

4. 2. 1. 3. Termalna analiza binarnih i ternarnih sistema

Termalne metode – termogravimetrijska analiza (TGA) i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) imaju široku primenu u ispitivanju disperznih sistema. Fenomeni transfera mase prilikom hlađenja i/ili zagrevanja koji se ovim metodama proučavaju mogu se iskoristiti za dobijanje brojnih podataka; s jedne strane, onih podataka koji se odnose na stabilnost, a sa druge, onih koji se odnose na fizičko-hemijske karakteristike emulzija (Clausse, 2010; Clausse i sar., 2005; Schwarz i Pfeffer, 1997). DSC tehnika kao metoda izbora kada se ispituju fazne tranzicije u koloidnim sistemima, nalazi čestu primenu u studijama koje se bave različitim lipidima i smešama lipida, vode i surfaktanata (Zetzel i sar., 2009; Goetz i El-Aasser., 1990). Na osnovu ovoga, jasno je zašto je očekivano da se primenom DSC tehnike mogu dobiti značajni podaci o emulzionim sistemima stabilizovanim APG emulgatorima, posebno kada taj emulgator sadrži masne alkohole dugog lanca. S druge strane, TG analiza može se koristiti u proučavanju mehanizama vezivanja vode i daljoj strukturnoj analizi (Csizmazia i sar., 2010). Kada je reč o klasičnim emulzijama, način distribucije vode je od posebnog značaja, zbog toga što slobodna (eng. *bulk*) voda isparava ubrzo nakon primene, dok je interlamelarnoj (vezanoj) vodi potrebno određeno vreme da se oslobodi iz sistema (Peramal i sar., 1997). TGA bi time mogla da doprinese istraživanju mezomorfno ponašanja APG emulgatora i proceni vlažećeg kapaciteta emulzija sa ispitivanim APG emulgatorom.

U skladu sa prethodnim, DSC merenja omogućila su praćenje fenomena promene mase u emulzijama tokom zagrevanja. Tačke topljenja i promene entalpije su procenjene sa ciljem određivanja tipa dobijenih mezofaza i sa ciljem

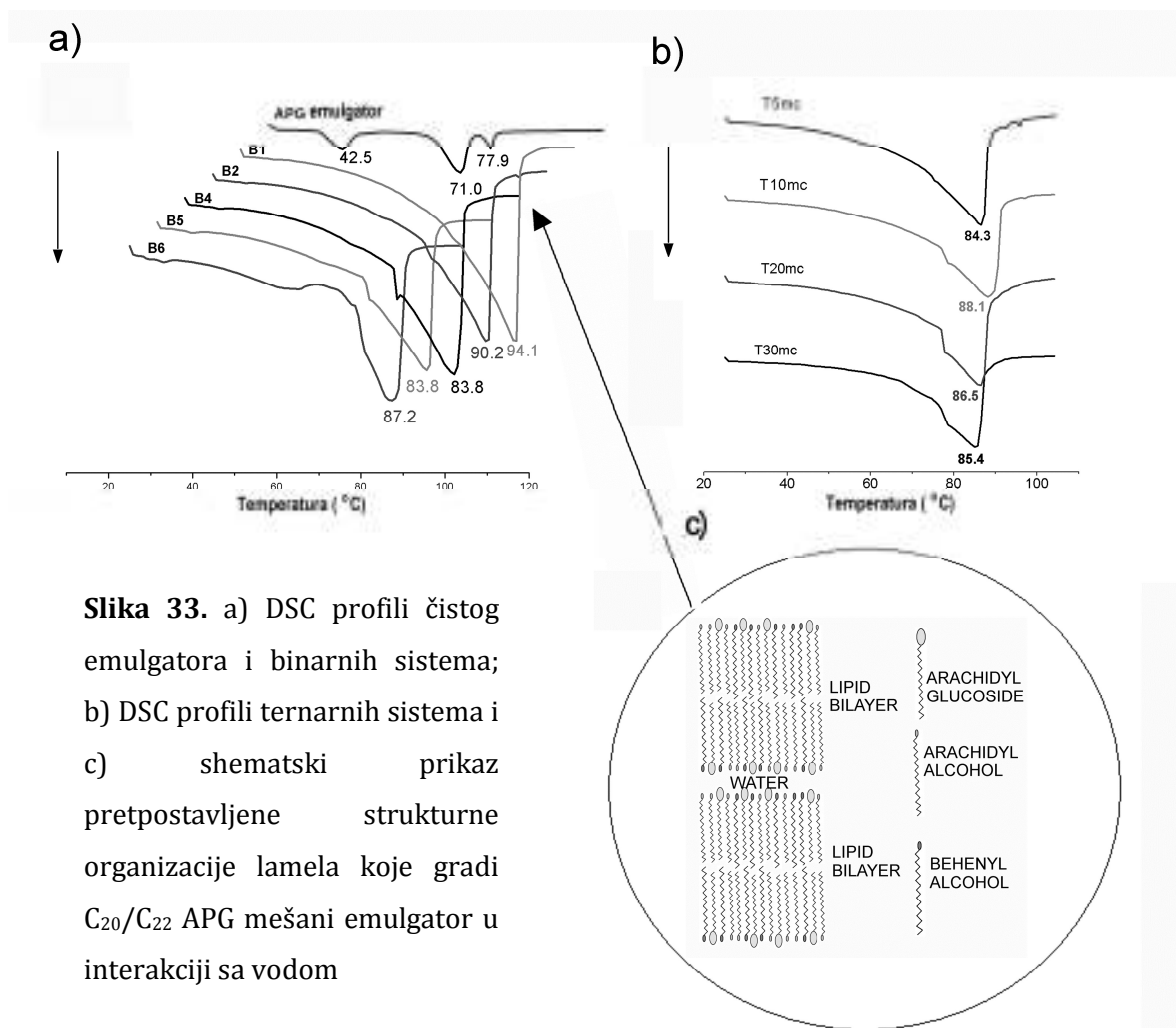
poređenja faznih promena koje se dešavaju u ispitivanim uzorcima. Kod binarnih sistema ispitivan je uticaj koncentracije emulgatora na pojavu određenih mezofaza, odnosno opseg koncentracije emulgatora koji je neophodan da bi se konačno dobila emulzija zadovoljavajuće polučvrste konzistencije. Kod ternarnih sistema, na ovaj način, procenjen je uticaj koncentracije masne faze na koloidnu strukturu.

Termalno ponašanje čistog emulgatora i binarnih sistema prikazano je na Slici 33 (Slika 33a). Čist emulgator karakterišu tri izražena pika sa ukupnim entalpijama 787,2 mJ/mg, 1608,1 mJ/mg i 205,4 mJ/mg, respektivno. Kako su tačke topljenja arahidil i behenil alkohola u opsegu 64-66°C, odnosno 68-72°C, drugi široki endotermni pik bi mogao da odgovara tranziciji odnosno topljenju slobodnog alkohola. Treći, manji i oštiji pik mogao bi biti znak topljenja smeše alkil poliglukozida, surfaktantne komponente mešanog emulgatora, dok bi prvi pik mogao da bude pokazatelj β - α tranzicije slobodnih (arahidil i behenil) alkohola na 42,5°C (Goetz i El-Aasser, 1990).

Kada je reč o binarnim sistemima njihovi DSC termogrami pokazuju samo jedan široki endotermni pik, koji pored toga što se sa povećanjem koncentracije emulgatora pomera ka većim promenama entalpije (Tabela 18) ujedno se pomera i ka većim temperaturama (Slika 33a). Prema Savic i sar. (2005), strukture formirane kao rezultat inkorporiranja vode između lipidnih lamela (dvoslojeva) kompleksnog sastava mogu da modifikuju fazno ponašanje na ovaj način.

Velika količina aktivacione energije potrebna za topljenje binarnih sistema kada se razmatra u kombinaciji sa dobijenim rezultatima polarizacione mikroskopije, WAXD i SAXD merenja može biti objašnjenja formiranjem kompleksne lamelarne faze koja se satoji od oba tipa, tečno-kristalne i gel-kristalne mezofaze. Dodatno, DSC profili binarnih sistema (B1-B5) na kojima se uočava odsustvo β - α tranzicije ukazuju na to da se alkil lanci masnih alkohola u binarnim sistemima na sobnoj temperaturi nalaze u α -kristalnoj formi (Goetz i El-Aassar, 1990). DSC rezultati ukazuju na to da se temperature topljenja (Slika 33a) i promene entalpije – ΔH (Slika 34) povećavaju sa povećanjem sadržaja vode (smanjenjem koncentracije emulgatora). Kada se uzmu u obzir prethodno

objavljeni podaci (Savic i sar., 2005), razmatranje lamelarnih struktura unutar ovih sistema nedvosmisleno ukazuje na to da su molekuli alkil glukozida verovatno umetnuti između molekula masnog alkohola, kao što je pretpostavljeno na šematskom prikazu (Slika 33c).



Slika 33. a) DSC profili čistog emulgatora i binarnih sistema; b) DSC profili ternarnih sistema i c) shematski prikaz pretpostavljene strukturne organizacije lamela koje gradi C₂₀/C₂₂ APG mešani emulgator u interakciji sa vodom

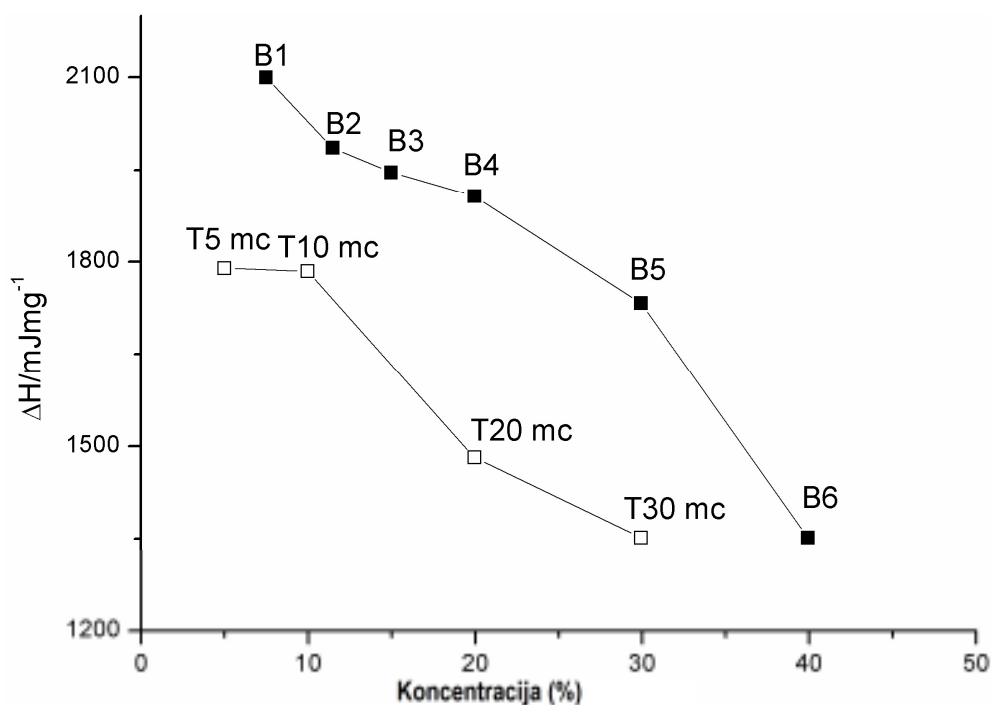
Moguće objašnjenje ovakvog DSC ponašanja jeste da se sa povećanjem sadržaja vode povećava bubrenje α -kristala masnih alkohola kao i to da su hidratizane hidroksilne grupe glukozida koje su orjentisane i infiltrirane u interlamelarne vodene slojeve. Ovo stoji u saglasnosti sa literaturnim podacima o

većim tačkama topljenja hidratizane α -faze u odnosu na dehidratisanu (Ecclestone, 1997).

Tabela 18. DSC integracioni podaci – ukupne entalpije (mJ/mg), prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija

Uzorak	ΔH (mJ/mg) \pm Sd
B1	2100,7 \pm 57,5
B2	1986,1 \pm 23,7
B3	1946,8 \pm 21,8
B4	1907,7 \pm 1,7
B5	1733,8 \pm 8,5
B6	1352,4 \pm 29,3
T5mc	1790,6 \pm 32,9
T10mc	1785,3 \pm 13,2
T20mc	1482,4 \pm 43,8
T30mc	1292,7 \pm 8,3

DSC kriva ternarnog sistema sa 5 % masne faze (T5mc, Slika 33b) u velikoj meri podseća na DSC krivu binarnog sistema (B2). Dodatak masne komponente smanjio je ukupnu entalpiju sistema, ona se postepeno smanjuje sa povećanjem koncentracije ulja (Slika 33b i 34, Tabela 18). U poređenju sa odgovarajućim binarnim sistemom (B2) sa istim fiksnim odnosom emulgator:voda (1:7,7) kod svih ternarnih sistema javlja se pik koji je strmiji i pomeren prema nižim temperaturama. Pored toga, sve detektovane promene postaju više izražene sa povećanjem koncentracije ulja. Moguće objašnjenje ovakvih rezultata leži u umetanju alkil lanaca srednje dužine koji su poreklom iz ulja u lipidne dvoslojeve što može poremetiti blisko pakovanje mešanog APG emulgatora i na ovaj način njegovo bubrenje i formiranje lamerane faze. Lamelarna faza čije formiranje bi najpre moglo biti izmenjeno je hidrofilna lamelarna gel faza koja se sastoji i od APG jedinica i od dugih lanaca masnog alkohola. Posledično bi deo masne faze mogao biti solubilizovan u ovu strukturu, čime bi relativno kruta gel struktura postala fluentnija što rezultuje u primećenom smanjenju ΔH i temperaturnih pikova.



Slika 34. Grafik zavisnosti ukupnih entalpija topljenja (ΔH) od procenta APG emulgatora (crni kvadrati) i od koncentracije kaprilno-kaprinskih triglicerida (beli kvadrati)

Dobijeni DSC rezultati su u skladu sa termogravimetrijskim merenjima, koja su sprovedena sa ciljem preciznijeg ispitivanja moda distribucije vode unutar sistema. Direktna procena TG profila omogućila je uvid u delimičan gubitak mase uzoraka pri različitim temperaturnim opsezima dok je poređenje prvih derivativnih TG kriva (DTGA profili) indirektno ukazalo na stepen isparavanja vode iz ispitivanih uzoraka.

S obzirom na to da u uzorcima sem vode nema drugih isparljivih sastojaka, svako snimljeno smanjenje mase nesumnjivo odgovara evaporaciji vode iz sistema, tako da je preračun procentnog gubitka vode u sistemu izveden u odnosu na ukupan sadržaj vode u formulaciji (Tabela 19). Dobijeni TG rezultati ukazuju na to da je voda u binarnim i ternarnim sistemima dominantno inkorporirana kao interlamelarno vezana (depo) voda i stoga uglavnom isparava u trećem temperaturnom opsegu (70-110°C). Ovo se verovatno dešava usled postepenog narušavanja (dehidratacije i topljenja) lamelarne faze – lipidnih lamela različitog

tipa: 1) fluidnije tečno-kristalne lamele izgrađene uglavnom iz jedinica APG emulgatora, 2) rigidniji hidrofilni lamelarni gel nasumično raspoređen kroz kontinualnu fazu ternarnih sistema, koja se sastoji delom od jedinica APG emulgatora, a delom od dugolančanih masnih alkohola i 3) rigidni lipofilni gel sa udelom dispergovanog ulja i semi-hidrata arahidil i behenil alkohola.

Tabela 19. Vrednosti gubitka mase izražene u procentima* - u funkciji promene temperature pri specificiranim temperaturnim opsezima za binarne i ternarne sisteme; prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija

Uzorak	Gubitak vode - 30-50°C (%)	Gubitak vode 50-70°C (%)	Gubitak vode 70-110°C (%)
B1	5,77 \pm 1,40	32,36 \pm 0,91	60,56 \pm 0,72
B2	5,90 \pm 0,61	29,82 \pm 0,03	60,97 \pm 0,02
B3	5,87 \pm 2,11	28,27 \pm 0,21	62,24 \pm 0,10
B4	5,33 \pm 0,91	29,46 \pm 0,12	62,18 \pm 0,30
B5	8,48 \pm 0,76	24,32 \pm 0,41	66,15 \pm 0,03
B6	11,48 \pm 0,67	19,32 \pm 0,32	68,15 \pm 0,08
T5mc	4,89 \pm 0,80	24,38 \pm 0,03	66,21 \pm 1,77
T10mc	6,04 \pm 0,23	26,30 \pm 1,23	63,49 \pm 0,72
T20mc	5,96 \pm 0,97	29,17 \pm 0,78	58,97 \pm 1,02
T30mc	7,84 \pm 1,12	26,69 \pm 1,23	54,63 \pm 0,86

*Procentni gubitak vode preračunat je u odnosu na ukupni sadržaj vode

Ovakav nalaz (Tabela 19) ukazuje da pored hidratisanih APG jedinica mešanog emulgatora behenil i arahidil alkohol u višku mogu biti odgovorni za vezivanje dela vode, koja se javlja u obliku vezane (sekundarne) vode (Peramal, 1997; Junginger, 1992).

Kod binarnih sistema procenat isparavanja vode tokom trećeg temperaturnog opsega postepeno raste od 60,97% u binarnom sistemu B1 do 68,15% u B6. Kao što je očekivano, povećanje koncentracije emulgatora u binarnim sistemima dovodi do većeg vezivanja interlamelarne vode. Opet, kod ternarnih sistema, povećanje koncentracije ulja dovelo je do smanjenja isparavanja

vode u trećem temperaturnom opsegu. Dakle, rezultati TG ukazuju na to da se sa povećanjem koncentracije masne faze smanjuje količina interlamelarne vode.

Sagledavanje prethodno dobijenih rezultata WAXD i DSC merenja za ternarne sisteme, koja su pokazala da se intenzitet interferencije kod ternarnih sistema (Slika 32c) primetno smanjenjuje sa povećanjem koncentracije ulja, odnosno da se smanjuje ukupna entalpija sistema (Tabela 18) i dobijenih TG rezultata ukazuje na to da se sa povećanjem koncentracije masne faze smanjuje formiranje lamelarne faze. Kao što je prethodno diskutovano moguće objašnjenje ovakvih rezultata jeste posledica prelaska iz lamelarne gel-kristalne u tečno-kristalnu fazu. Takođe, ne treba zaboraviti da veća količina masne faze okupira veću količinu emulgatora, zapravo on gradi monomolekularni film na granici faza, te nije slobodan za formiranje drugih struktura.

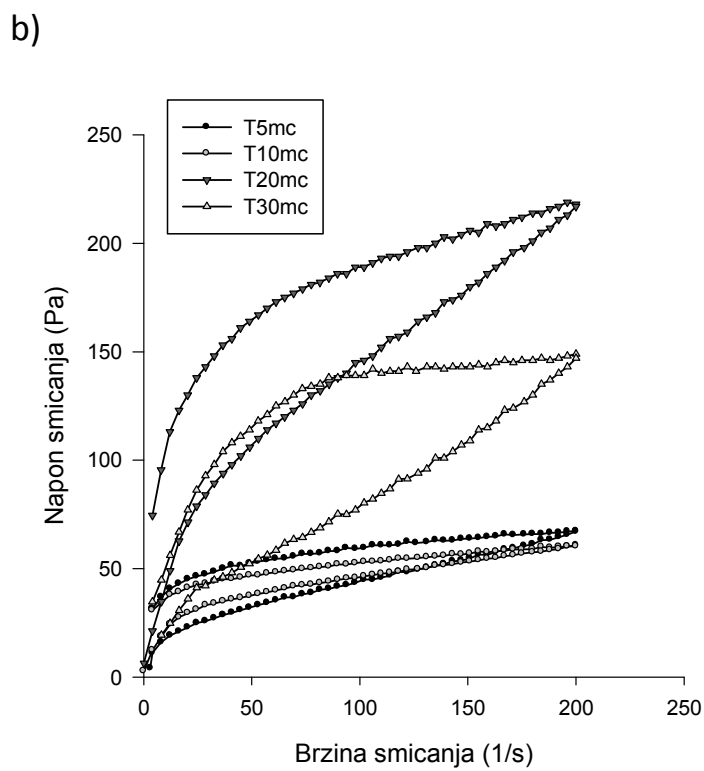
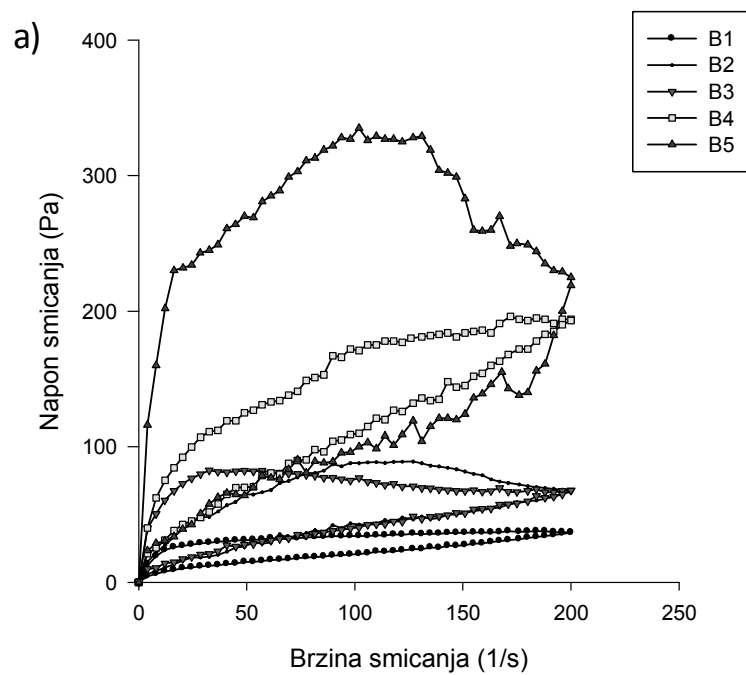
4. 2. 1. 4. Rezultati reoloških merenja binarnih i ternarnih sistema

Za potrebe detaljnijeg ispitivanja sposobnosti emulgatora da stabilizuje emulzije sprovedena su reološka merenja. Prisustvo histerezne petlje na graficima koji pokazuju zavisnost napona od brzine smicanja (Slika 35) potvrđuje da su svi binarni i ternarni sistemi bez obzira na koncentraciju emulgatora, odnosno ulja pseudoplastični sistemi koji se rastečnjavaju pod dejstvom spoljašnje sile, tj. da se tiksotropno ponašaju.

Uporedni reogrami binarnih sistema (Slika 35a) pokazuju da je tiksotropija više izražena kod uzoraka sa većom koncentracijom emulgatora, kao što je i kod ternarnih sistema (Slika 35b) više izražena kod uzoraka sa većom koncentracijom ulja. Postepen rast vrednosti histerezne površine i maksimalnog viskoziteta binarnih i ternarnih sistema (Tabela 20) ukazuje na ugušćivanje sistema usled povećanja koncentracije emulgatora, odnosno ulja u ispitivanim nosačima. Ustvari, ovo ugušćivanje je uglavnom posledica formiranja lamelarne faze – tečno-kristalnih lamela koje okružuju dipergovane kapi ulja i oba tipa lamelarnog gela koji se pružaju kroz kontinualnu fazu.

Pod dejstvom sile dolazi do promene lamela i u zavisnosti od domen-domen interakcija spoljašnji stres definiše viskozitet sistema (Nemeth i sar., 1998). Šta više, ovakvi reološki nalazi odgovaraju prethodno sprovedenim termalnim merenjima i potvrđuju pretpostavku da kod ispitivanih sistema postoji sinergizam između dva osnovna tipa lamelarnih faza: tečno-kristalne ($L\alpha$) i gel-kristalne ($L\beta$) faze.

Kada je reč o ternarnim sistemima, detaljnijom elaboracijom prikazanih rezultata može se zaključiti da je povećanje koncentracije masne faze od 5 do 20% dovelo do ugušćivanja sistema (više vrednosti prinosnog napona, viskoziteta i histereznih površina). Ovaj rastući trend kada se posmatra histerezna površina se zaustavlja kod uzorka sa 30% kaprilno-kaprinskih triglicerida. Preparati koji se primenjuju na koži treba da pokazuju određeni otpor prema primenjenom stresu – koji se u reologiji manifestuje kao prinosni napon (Barnes, 1999). Nakon postizanja vrednosti prinosnog napona sistem počinje da teče, a u praktičnom – aplikativnom smislu, počinje da se rasprostire i ovo se manifestuje kao rastečnjavanje, tj. tiksotropno ponašanje.



Slika 35. Krive proticanja a) binarnih i b) ternarnih sistema

Tabela 20. Vrednosti histereznih površina i maksimalnih viskoziteta binarnih i ternarnih sistema

Uzorak	η_{\max} (4,08 s ⁻¹)	Histerezna površina (Pas ⁻¹)
B1	2,97±0,04	2259±12
B2	3,18±0,02	6085±7
B3	9,75±0,11	6422±12
B4	9,80±0,42	8637±22
B5	28,41±0,09	34698±20
B6	214,12±1,23	137391±54
T5mc	4,37±0,08	2859±19
T10mc	3,73±0,04	2319±6
T20mc	18,30±0,91	7714±12
T30mc	23,42±0,87	6003±7

Konačno, na osnovu svih prethodno prokomentarisanih rezultata, može se zaključiti da bi sistem sa 30% masne faze, premda se ponašao slično uzorku sa 20% masne faze, ipak mogao biti okarakterisan kao sistem manje fizičke stabilnosti. Dodatno, rezultati I dela studije pokazali su da su u aplikativnom smislu sistemi sa nižim vrednostima viskoziteta, prinosnog napona, kao i umerenim vrednostima histerezne površine prijemčiviji za potrošače (imaju zadovoljavajuće senzorne karakteristike), zbog čega su uzorci sa koncentracijom masne faze od 20%, odabrani za dalja ispitivanja.

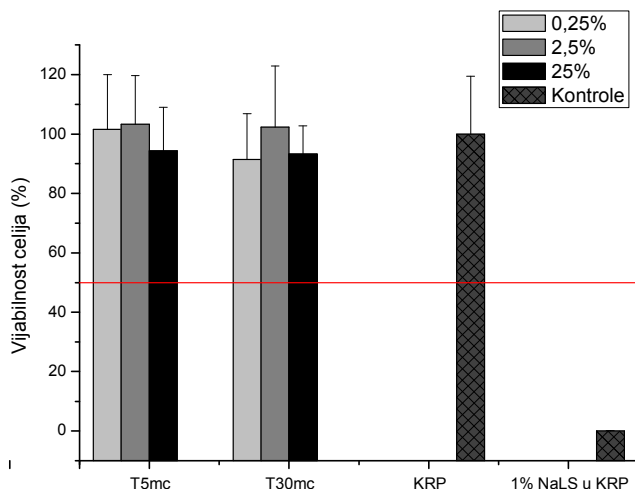
Ispitivanje APG emulgatora dugog lanca pokazalo je da on ima veliki potencijal za formiranje lamelarne faze, kada se koristi u određenim koncentracijama. Dobijeni rezultati pokazali su da kod sistema stabilizovanih ovim emulgatorom postoji sinergizam između dva glavna tipa lamelarne faze: tečno-kristalne (L α) i gel-kristalne (L β) faze.

4. 2. 1. 5. *In vitro* procena bezbednosti ternarnih sistema sa ispitivanim APG emulgatorom

U ovom delu studije, u cilju *in vitro* procene iritacionog potencijala model emulzija, kao veoma značajnog dela ispitivanja dermokozmetičkih proizvoda (Vinardell i Mitjans, 2008), primenjen je trodimenzionalni model humane kože sa funkcionalnim SC-om. Efekti uzoraka emulzija na vijabilnost ćelija ovakvog modela smatraju se merom njihovog potencijala da iritiraju humanu kožu. U ovom ispitivanju vijabilnost je kvantifikovana upotrebom tzv. MTT testa kao markera ćelijske vijabilnosti (OECD, 2008). Kvantifikacija je vršena u cilju određivanja i poređenja iritacionih potencijala ternarnih sistema sa mešanim C₂₀/C₂₂ APG emulgatorom sa različitim koncentracijama masne faze, a uzorci odabrani za poređenje bili su T5mc i T30mc.

Oba ispitivana uzorka pokazala su minimalne efekte na vijabilnost ćelija kultivisane humane kože (Slika 36). Čak i pri koncentraciji ispitivanog uzorka od 25%, vijabilnost ćelija bila je preko 90% (za uzorak T5mc 94,4±14,6%, a za uzorak T30mc 93,3±9,5%).

Imajući u vidu da je granično prihvatljiva vijabilnost humanih fibroblasta u *in vitro* studiji iritacionog potencijala 50% (na grafiku predstavljen crvenom linijom), može se zaključiti da u ispitivanim koncentracijama ne postoji statistički značajna razlika u uticaju ispitivanih uzoraka na vijabilnost ćelija veštačke humane kože. Ovo ukazuje ne samo na odličan bezbednosni profil ispitivanog emulgatora, već i odgovarajućih formulacija model podloga.



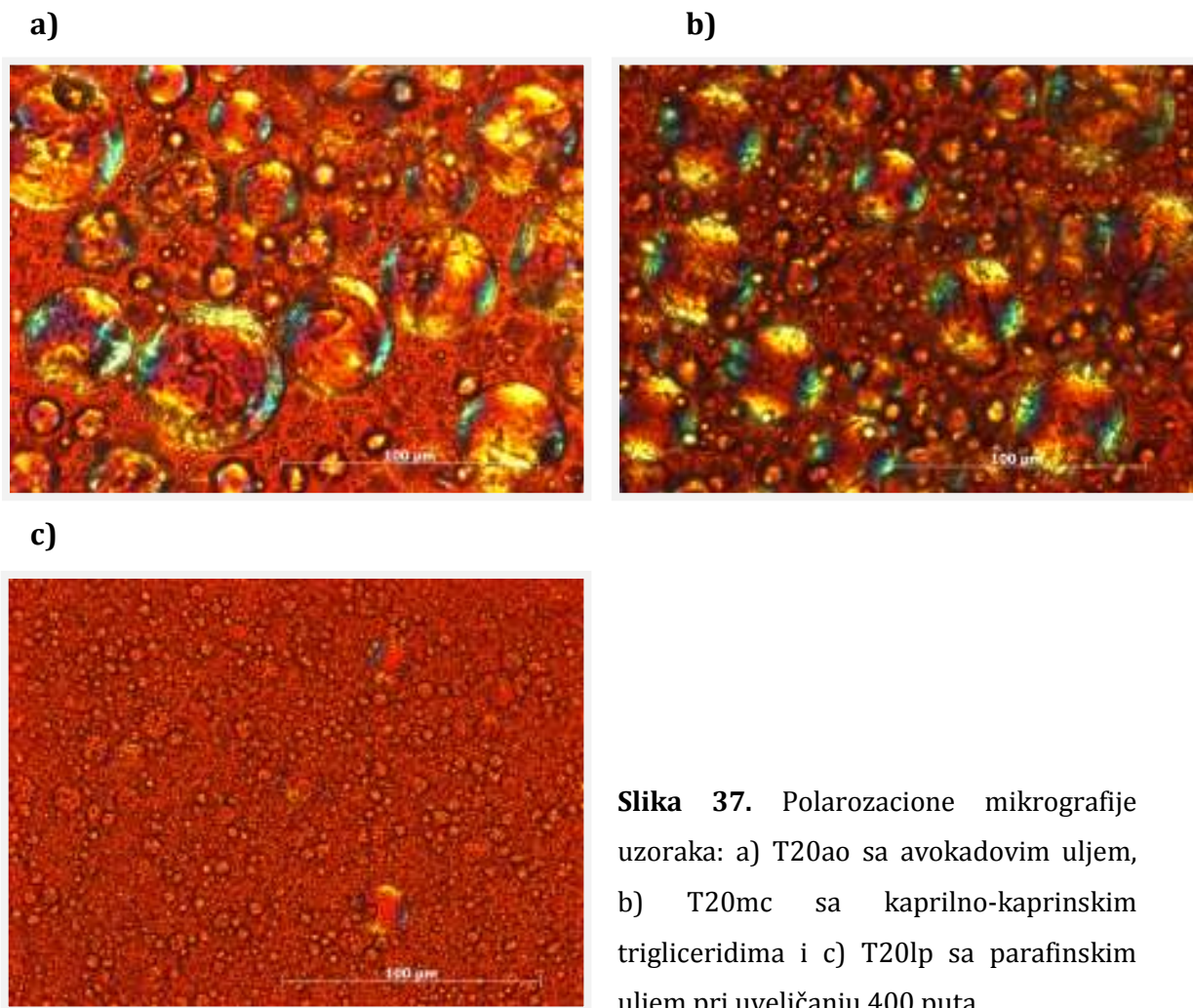
Slika 36. *In vitro* ispitivanje iritacionog potencijala ternarnih sistema (T5mc, T30mc), predstavljeno grafički kao zavisnost vijabilnosti ćelija (%) od koncentracije ispitivanih podloga

4. 2. 2. Procena uticaja različitih masnih faza na stabilnost, strukturu, senzorne osobine i vlažeći efekat model kremova uz Montanov™ 202

4. 2. 2. 1. Uticaj različitih masnih faza na fizičko-hemijske karakteristike model kremova

Polarizaciona mikroskopija

Na Slici 37 su prikazane polarizacione mikrografije uzoraka sa različitim uljima (različite polarnosti, sastava i porekla) 7 dana nakon njihove izrade. Sa uljima umerene polarnosti (avokadovo ulje i kaprilno-kaprinski trigliceridi) mešani emulgator formira lamelarne faze koje su okarakterisane prisustvom brojnih Malteških krstova (Slika 37a i b). Ipak, sa Slike 37c jasno je da nepolarano parafinsko ulje, premda omogućava formiranje mekanog krema sa malim kapima, redukuje specifičnu lamelarnu strukturu.



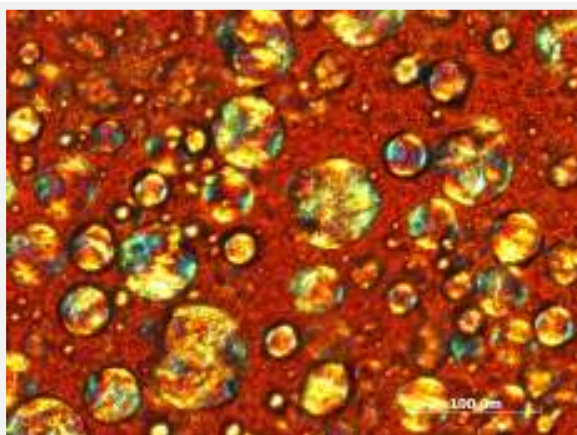
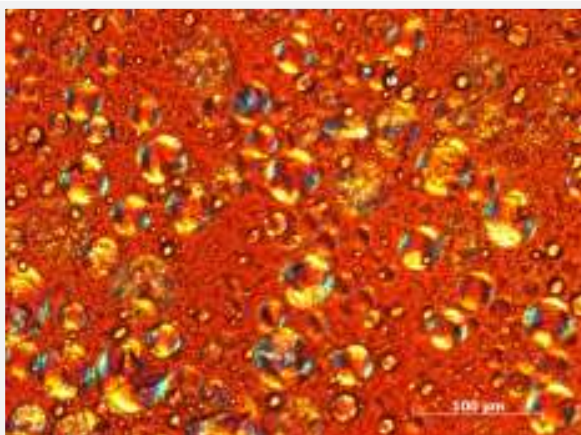
Slika 37. Polarozacione mikrografije uzoraka: a) T20ao sa avokadovim uljem, b) T20mc sa kaprilno-kaprinskim trigliceridima i c) T20lp sa parafinskim uljem pri uveličanju 400 puta

U cilju procene stabilnosti emulzija tri meseca nakon izrade, uzorci koji su čuvani na sobnoj temperaturi ponovo su snimljeni. Na Slici 38 su prikazane mikrografije uzoraka sa uljima umerene polarnosti. Dok, mikrografije uzorka sa nepolarnim uljem nisu prikazane jer je nakon 3 meseca kod ovog uzorka primećena nestabilnost koja se manifestovala razdvajanjem faza. Kod uzorka T20ao i T20mc nisu primećene značajne promene u izgledu mikrografija, sem blagog povećanja veličine kapi kod uzorka sa avokadovim uljem.

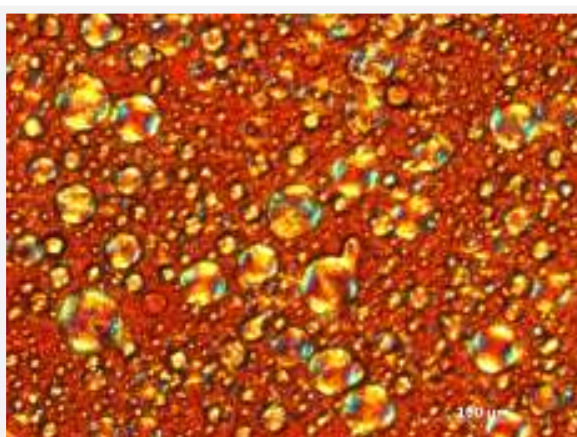
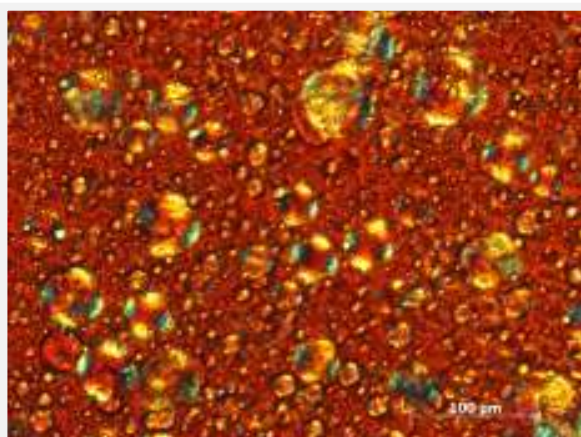
7 dana nakon izrade

3 meseca nakon izrade

a)



b)



Slika 38. Polarizacione mikrofografije model kremova: a) T20mc i b) T20ao pri uveličanju 200x

Rezultati merenja pH vrednosti i električne provodljivosti

Merenjem pH vrednosti utvrđeno je da svi model kremovi imaju zadovoljavajuću pH vrednost, blisku fiziološkoj, kao i da tokom 90-odnevnog stajanja nije došlo do značajne promene ovog parametra kod uzoraka T20mc i T20ao (Tabela 21). Kada je reč o uzorku T20lp, kao što je prethodno spomenuto, merenja nakon 90 dana nisu sprovedena usled primetnog razdvajanja faza.

Tabela 21. Vrednosti pH i električne provodljivosti U/V emulzija 7 i 90* dana nakon izrade

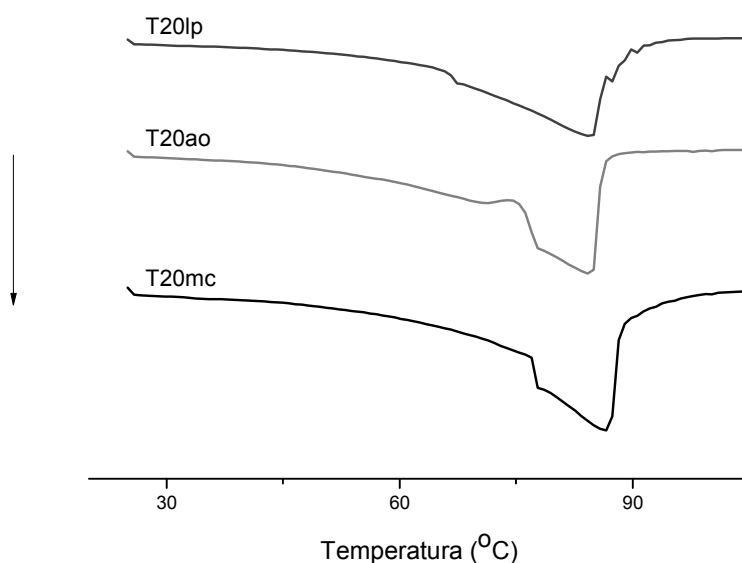
Uzorak	pH	El. provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH*	El. provodljivost* ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
T20mc	5,56	61,8	5,52	53,7
T20ao	5,70	79,8	5,81	72,5
T20lp	5,82	53,5	-	-

Merenje električne provodljivosti potvrdilo je da su svi kremovi emulzije U/V tipa, a odsustvo značajnih promena ove vrednosti kod uzoraka T20mc i T20ao ukazuje, zajedno sa rezultatima polarizacione mikroskopije i pH merenja, na zadovoljavajuću preliminarnu stabilnost ovih uzoraka.

Nestabilnost uzorka T20lp može se objasniti pre svega uticajem parafinskog ulja na formiranje specifičnih anizotropnih struktura kojima su stabilizovani sistemi sa ispitivanim mešanim emulgatorom.

Termalna analiza

Termalno ponašanje model kremova, odnosno ternarnih sistema sa različitim masnim fazama ispitano je nakon analize binarnih i ternarnih sistema sa različitom koncentracijom masne faze. Dobijeni DSC profili (Slika 39) se međusobno značajno ne razlikuju. Takođe su dobijene slične ΔH vrednosti, kao i temperaturni pikovi (82,5-85,9°C). DSC kriva uzorka sa nepolarnim tečnim parafinom najviše se razlikovala od druge dve krive usled prisustva veoma širokog pika. Ovo je u skladu sa prethodnim rezultatima polarizacione mikroskopije i može se objasniti redukcijom specifične lamelarne strukture.



Slika 39. DSC profili model kremova

TGA je pokazala da procenat vode koja isparava između 70 i 110°C varira od 48,13 (T20lp) do 63,48% (T20ao), što ukazuje na to da je kod svih uzoraka polovina od ukupne količine vode na neki način vezana, odnosno interlamelarna voda (Tabela 22).

Uzorak T20lp imao je najveći stepen evaporacije tokom prvog (30-50°C) i drugog temperaturnog opsega (50-70°C) i već pomenuto najniži u trećem temperaturnom opsegu. Ovi rezultati su već ukazivali na nekompatibilnost nepolarnog ulja sa APG emulgatorom i potencijalnu fizičku nestabilnost ovakvog sistema, što je u tromesečnoj studiji potvrđeno.

Tabela 22. Vrednosti gubitka mase izražene u procentima* - u funkciji promene temperature pri specificiranim temperaturnim opsezima za binarne i ternarne sisteme; prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija

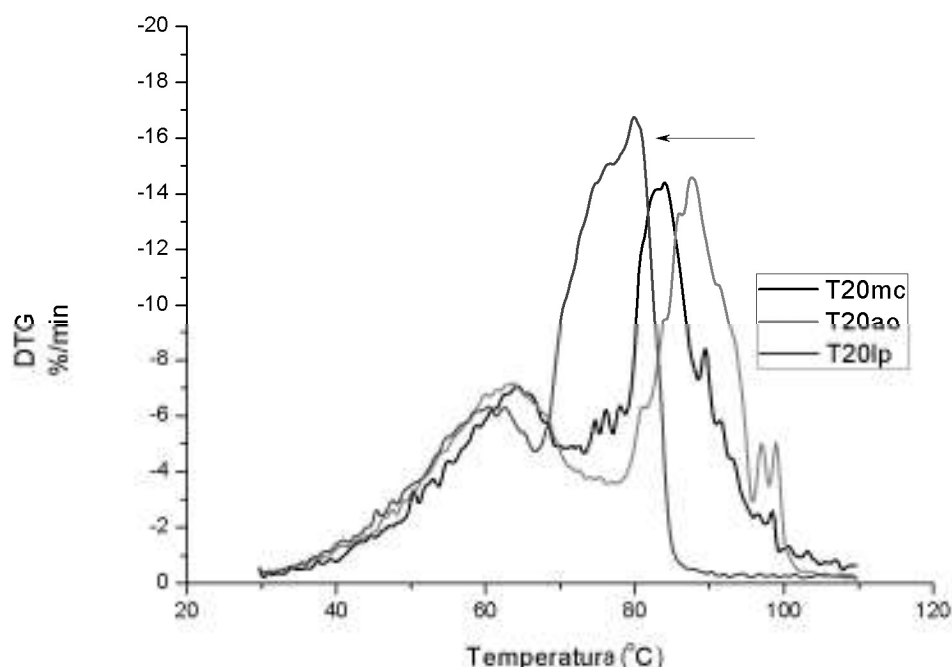
Uzorak	Gubitak vode - 30-50°C (%)	Gubitak vode 50-70°C (%)	Gubitak vode 70-110°C (%)
T20ao	5,59±2,55	26,30±0,91	63,46±0,09
T20lp	9,28±1,13	35,00±0,08	48,13±1,23
T20mc	5,96±0,97	29,17±0,78	58,97±1,02

*Procentni gubitak vode preračunat je u odnosu na ukupni sadržaj vode

Procenat vode koja je isparila kod uzorka T20ao u različitim temperaturnim opsezima bio je nalik gubitku vode kod uzorka T20mc (Tabela 22). Dalja procena termalnog ponašanja, odnosno poređenje derivativnih krivih (DTGA krive) potvrdilo je njihovo slično ponašanje kada je reč o isparavanju vode. Na Slici 40 se ovo jasno ogleda u izgledu DTGA krivih ova dva uzorka koje se do 70°C gotovo preklapaju, a i nakon toga, iako postoji blago pomeranje krive za uzorak T20ao, način evaporacije vode je gotovo isti. DTGA kriva uzorka T20lp (označena strelicom) pomerena je prema nižim temperaturama i evaporacija je najveća u temperaturnom opsegu izeđu 66,8 i 84,4°C (Tabela 23).

Tabela 23. Temperaturni opsezi u kojima je stepen evaporacije bio najveći

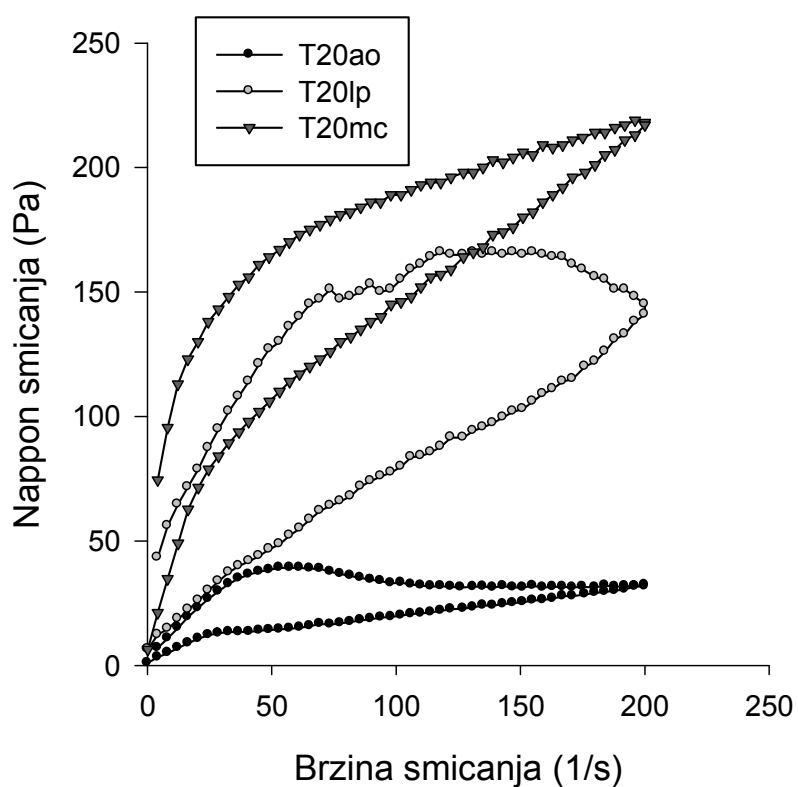
Uzorak	Temperaturni opseg (°C)
T20mc	78,7-96,9
T20ao	79,2-100
T20lp	66,8-84,4



Slika 40. Profili DTGA krivih model kremova

Reološka merenja

Kremovi sa različitim masnim fazama, premda su imali jednake udele ulja, pokazali su različito ponašanje pri proticanju (Slika 41). Drugačiji reološki profili uz prikazane vrednosti maksimalnog viskoziteta i histereznih površina kremova (Tabela 24) ukazuju na razlike u samoj strukturi ovih sistema. Dobijeni rezultati su u skladu sa organoleptičkim zapažanjima, gde je krem sa avokadovim uljem bio najmekši krem, dok su viskoziji, ali i dalje meki kremovi, slične konzistencije, bili kremovi sa trigliceridima srednjeg lanca i parafinskim uljem.

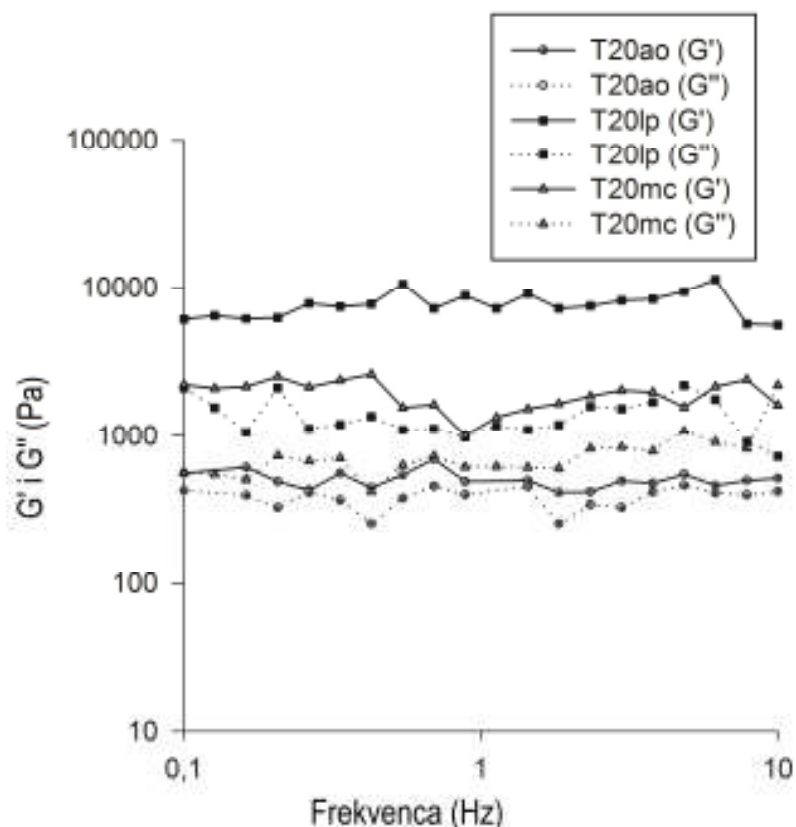


Slika 41. Uporedni reogrami model kremova

Tabela 24. Vrednosti histereznih površina i maksimalnih viskoziteta model kremova

Uzorak	η_{\max} (4,08 s ⁻¹)	Histerezna površina (Pas ⁻¹)
T20mc	18,30±0,91	7714±12
T20ao	1,73±0,08	2322±5
T20lp	10,60±0,87	12239±43

Dodatno sa ovim uzorcima sprovedeno je i određivanje linearnog viskoelastičnog regiona i nakon toga izvedeni su frekvencioni testovi (Slika 42). Oscilatorna merenja pokazala su da je elastični modul (G') duž celog viskoelastičnog regiona veći od viskoznog modula (G'') kod svih uzoraka. Ovo ukazuje na više izraženu elastičnu nego viskoznu komponentu – jednu od osnovnih karakteristika lamelarne faze.

**Slika 42.** Zavisnost elastičnog (G') i viskoznog (G'') modula model kremova od frekvence

Iako su prethodni rezultati potvrdili prisustvo lamelarne faze kod uzorka sa avokadovim uljem, rezultati dobijeni oscilatornim merenjem nisu bili u skladu sa očekivanim, a to je da su vrednosti G' modula bar za jedan red veličine veće od vrednosti G'' . Kod T20ao uzorka G' je veći od G'' , ali su vrednosti istog reda veličine. Ovakvi rezultati su u skladu sa radom Siddig-a i saradnika (2006) koji su pokazali da razlika između G' i G'' može biti mala, odnosno, iako su elastične osobine više izražene one mogu biti istog reda veličine kao i viskozne.

Rezultati procene uticaja različitih masnih faza na stabilnost i strukturu emulzija na bazi ispitivanog emulgatora pokazali su da je pri radu sa emulgatorom Montanov™ 202 neophodno voditi računa o izboru masnih komponenti. Razlike u strukturi ispitivanih sistema koje su se manifestovale različitim izgledom polarizacionih mikrofotografija, termalnim i reološkim ponašanjem, verovatno su posledica različitog pakovanja molekula masne faze u tečno-kristalne ili gel-kristalne lamele. Formiranje lamelarnih struktura zavisi od sposobnosti molekula da se blisko pakuju i intereaguju sa vodom. Kako je poređenje dobijenih rezultata pokazalo da je u prisustvu nepolarnog parafinskog ulja smanjena sposobnost formiranja lamelarnih faza, moglo bi se pretpostaviti da umetanje nepolarnih ugljovodoničnih lanaca koji ulaze u sastav parafinskog ulja između lipidnih dvoslojeva dugih alkoholnih lanaca narušava lamelarnu strukturu. Ovo bi delom moglo da bude i posledica dužine nepolarnih ugljovodoničnih lanaca koji su skoro dvostruko kraći od dugih lanaca masnih alkohola koji ulaze u sastav ispitivanog emulgatora (Seppic, 2001, Ph. Eur. 7.0, 2010).

Dakle, sposobnost ispitivanog emulgatora da stabilizuje emulzije formiranjem lamelarnih faza smanjena je u prisustvu nepolarnog medijuma, zbog čega pri formulisanju treba voditi računa o kompatibilnosti mešanog emulgatora i komponenata masne faze.

Teksturna analiza

Rezultati teksturne analize model kremova prikazani su tabelarno (Tabela 25). Vrednosti svih parametara – čvrstina, konzistencija, kohezivnost i indeks viskoziteta – imaju isti poredak: najveća vrednost za uzorak sa kaprilno-kaprinskim trigliceridima, koji prati uzorak sa parafinskim uljem, i sa najnižim vrednostima uzorak sa avokadovim uljem (T20mc>T20lp>T20ao). Ovakvi rezultati su u skladu sa reološkim merenjima (vrednostima viskoziteta, histereznih površina i modula), ali treba naglasiti da su za svaki parametar dobijene vrednosti istog reda veličine, odnosno veoma bliske.

Tabela 25. Teksturni parametri ispitivanih model kremova (sr. vrednost ±st. devijacija)

Uzorak	Čvrstina (g)	Konzistencija (Ns)	Kohezivnost(g)	Indeks viskoziteta (Ns)
T20lp	67,5±1,41	690,8±11,55	40,7±1,13	468,6±17,55
T20ao	37,3±0,23	435,5±2,67	22,8±0,15	258,4±0,60
T20mc	104,2±1,07	1080,8±4,15	70,5±0,77	718,9±7,97

Dobijeni rezultati mogu se objasniti činjenicom da su svi ispitivani ternarni sistemi sa različitim uljima bili kremovi meke konzistencije.

4. 2. 2. 2. Uticaj različitih masnih faza na senzorne osobine model kremova

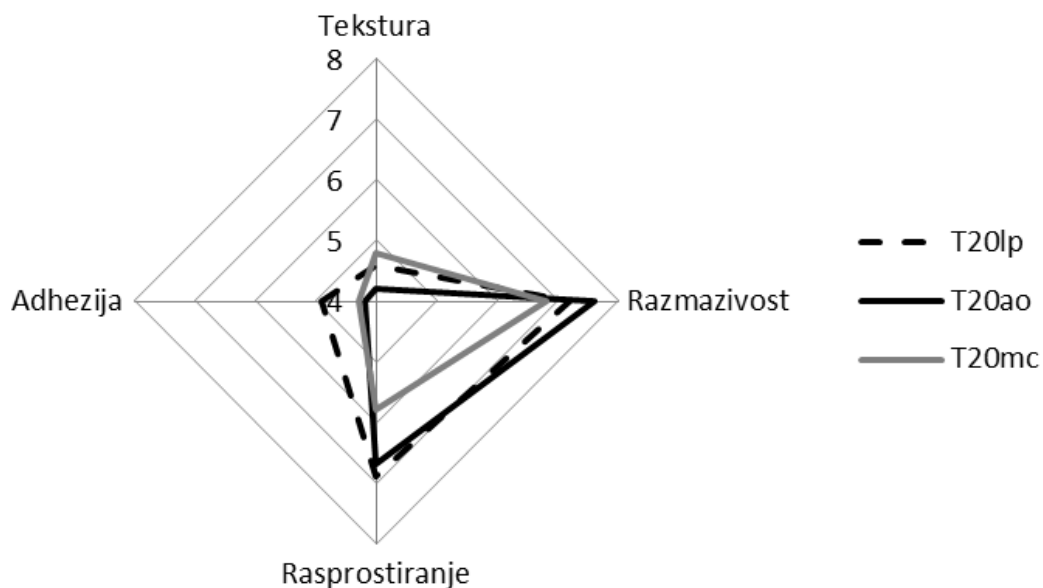
Prethodno osmišljena senzorna studija sprovedena je i u ovom delu ispitivanja, a sa model kremovima U/V tipa. U Tabeli 26 prikazani su rezultati senzorne procene za attribute koji su opisani odgovarajućim terminima. Sličnost u osobinama kao što su lepljivost, masnoća i sjaj tokom utrljavanja i nakon nanošenja, odnosno opis uzoraka kao nelepljivih, blago masnih i blago sjajnih svakako se može očekivati od emulzija U/V tipa. Ipak, ovakvi rezultati, kao i izuzetna sličnost među senzornim atributima može se objasniti pre svega jednostavnošću unutrašnje (masne) faze ispitivanih sistema. U tom smislu da su emulijensi, koji u najvećoj meri diktiraju senzorne osobine (Wieshers, 2007), bili unutrašnja faza ovih emulzionih sistema, kao i to da ih je emulgator uspešno i na sličan način inkorporirao u specifične strukture, zbog čega senzorne osobine samih emulijenasa koje mogu uticati na senzorne osobine formulacija (Lukic i sar., 2012), nisu mogle doći do izražaja.

Tabela 26. Kvantitativni rezultati senzorne procene ispitivanih uzoraka – atributi za koje su korišćeni opisni termini

Faza primene	Senzorni atribut	T20ao	T20mc	T20lp
Pre utrljavanja i tokom uzimanja	Konzistencija		Svi uzorci opisani su kao polučvrsti	
	Sjaj	Blago sjajan	Blago sjajan	Mat
	Elastičnost	Blago elastičan	Blago elastičan	Blago elastičan
Tokom utrljavanja	Lepljivost	Nije lepljiv	Nije lepljiv	Nije lepljiv
	Gustina	Redak	Redak/blago gust *	Blago gust
	Masnoća	Blago mastan	Blago mastan	Blago mastan
	Sjaj	Nije sjajan/blago sjajan*	Blago sjajan	Blago sjajan
	Upijanje	Umereno	Umereno	Umereno
Osećaj nakon nanošenja	Rezidualni film	Umeren film	Umeren film	Umeren film
	Lepljivost	Nije lepljiv	Nije lepljiv	Nije lepljiv
	Masnoća	Nije masna	Nije masna/Blago masna	Blago masna
	Sjaj	Blago sjajna	Nije sjajna/Blago sjajna	Blago sjajna

* Svaki prikazani atribut je opisan prikazanim terminom od strane više od 50% ispitanika, samo atributi označeni * su opisani sa dva termina (svaki termin korišćen je više od 35% od strane ispitanika)

Rezultati dobijeni za četiri senzorna atributa, za koja je korišćena strukturirana skala dobijene vrednosti prikazane su na grafiku (Slika 43).



Slika 43. Rezultati senzorne studije model kremova

Za teksturu i adheziju najvišu ocenu dobio je uzorak T20lp ($4,61 \pm 1,19$ i $4,97 \pm 0,84$), dok je najnižu dobio uzorak T20ao ($4,22 \pm 0,92$ i $4,24 \pm 0,45$). Za razmazivost najvišom ocenom ocenjen je uzorak T20ao ($7,62 \pm 0,87$), a za rasprostiranje uzorak T20lp ($6,92 \pm 0,79$). Poredak koji postoji između određenih senzornih atributa zapažen je i kod nekih reoloških, odnosno teksturnih parametara, npr. tekstura ($T20mc > T20lp > T20ao$) i maksimalni viskozitet (Tabela 24), tj. čvrstina i dr. Još jednom, ovakvi rezultati ukazuju na mogućnost predviđanja određenih senzornih osobina na osnovu instrumentalnih merenja.

Odsustvo statistički značajnih razlika između ispitivanih atributa je u skladu sa prethodno sprovedenim reološkim i teksturnim merenjima, a na osnovu zapažanja iz prvog dela eksperimentalnog rada to je bilo i očekivano.

Prethodno razmatranje razloga sličnosti deskriptivnih atributa (jednostavnost unutrašnje/masne faze, prisustvo emolijenasa u specifičnim

strukturama) objašnjavaju i bliskost u dobijenim ocenama za razmazivost, rasprostiranje, adheziju i teksturu model kremova. Dodatno, s obzirom na to da su u svim ispitivanim model kremovima formirane iste specifične strukture lamelanih faza, moguće objašnjenje sličnih rezultata senzorne studije moglo bi da bude i to da su upravo dobijene senzorne osobine (laka razmazivost i rasprostiranje, umeren nemastan i nelepljiv film na koži) diktirane upravo prisutnim strukturama.

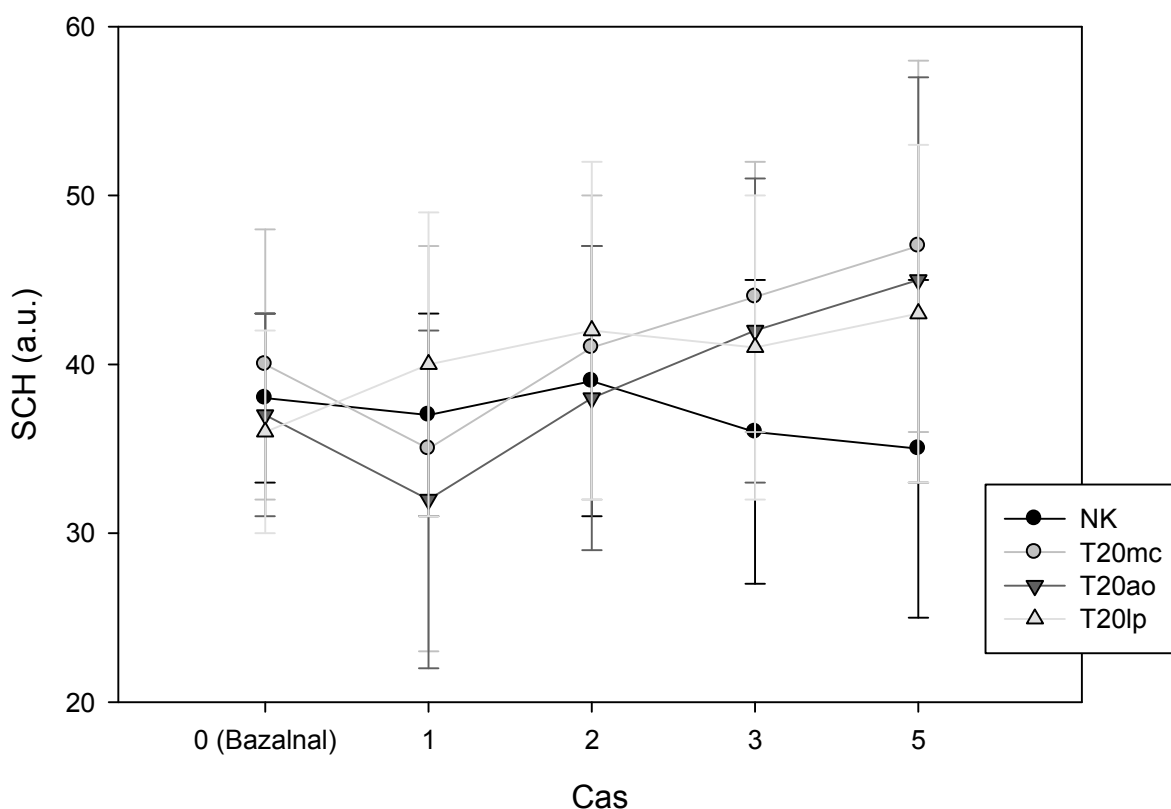
4. 2. 2. 3. Uticaj različitih masnih faza na vlažeći efekat model kremova

Specifična struktura sistema stabilizovanih lamelarnim fazama omogućava kompleksno vezivanje vode, koje pojačava vlažeći efekat, imajući pri tome uticaj na permeabilnost kože i penetracioni potencijal aktivnih supstanci (Loden, 2005). Zbog toga je u ovom delu studije u cilju ispitivanja vlažećeg efekta model kremova u realnim uslovima, kao i zbog poređenja sa prethodno dobijenim rezultatima termalne analize, sprovedena *in vivo* studija na humanim dobrovoljcima.

Petočasovna kratkotrajna studija sprovedena je sa uzorcima T20mc, T20ao i T20lp uz netretiranu kontrolu (NK) u 5 vremenskih tačaka (0 – inicijalno merenje bazalnih vrednosti, 1 - nakon 1 časa, 2 – nakon 2 časa, 3 – nakon 3 časa i 5 – nakon 5 časova), a dobijeni rezultati su prikazani grafički na Slici 44. Zbog bolje preglednosti dobijeni rezultati prikazani su kao srednje vrednosti sa odgovarajućim standardnim devijacijama dobijeni u različitim vremenskim tačkama.

Dobijeni rezultati su pokazali da jedan sat nakon aplikacije uzoraka sa avokadovim uljem i kaprilno-kaprinskim trigliceridima dolazi do blagog smanjenja stepena hidratisanosti SC-a (bez statističke značajnosti), a bez promena vrednosti TEGV. Uobičajeno, 1-časovne studije pokazuju povećanje u vrednostima SCH, što je posledica povećanog sadržaja vode, usled oslobađanja vode iz kremova. Rezultati ukazuju na to da je sadržaj slobodne, odnosno slabo vezane vode koja isparava neposredno nakon aplikacije, a koja bi mogla u kratkom vremenskom periodu da poveća SCH, zanemarljiv u uzorcima T20mc i T20ao. Ovo je u saglasnosti sa TG rezultatima (Tabela 22) i procentom vode koja isparava tokom prvog

temperaturnog opsega (30-50°C). Kao što se i očekivalo, na osnovu prethodnih rezultata, 2 i 3 sata nakon aplikacije kremova SCH vrednosti su postepeno rasle, da bi se nakon 5 časova završnim merenjima utvrdilo statistički značajno povećanje vlažnosti na svim tretiranim površinama. Objašnjenje ovakvog produženog vlažećeg efekta može biti postepeno oslobađanje interlamelarno vezane vode.



Slika 44. Vlažeći efekat model kremova

Poznato je da primena emulzija stabilizovanih tradicionalno korišćenim nejonskim emulgatorima (etoksilovanim i propoksilovanim derivatima i poliolnim estrima) povećava TEGV usled promena koje izazivaju na nivou lamelarnih lipida SC-a i intercelularnog matriksa (Bárányi i sar., 2000; Ildson, 1991). Za razliku od njih ispitivani model kremovi na bazi APG emulgatora nisu doveli do značajnih promena TEGV vrednosti ni u jednoj vremenskoj tački. Odsustvo promena u vrednostima TEGV može se objasniti sličnošću tečno kristalne strukture uzoraka sa

strukturu fizioloških lipida kože. Ovo, s jedne strane, potvrđuje zadovoljavajući bezbednosni profil ispitivanog emulgatora, a s druge strane postojanje specifične koloidne strukture APG stabilizovanih nosača.

Sprovedeno ispitivanje efekata u realnim uslovima obezbedilo je značajne informacije o vlažećem potencijalu ispitivanih emulzija, pokazavši da je on kod sistema sa MontanovTM-om 202 značajan. Dodatno, dobijeni rezultati ukazuju i na to da ovi sistemi mogu imati i pozitivan doprinos na stanje kožne barijere. Na osnovu prethodnog može se očekivati da emulzije stabilizovane C₂₀/C₂₂ APG emulgatorom mogu uticati na isporuku aktivnih supstanci, kako hidrofilnog tako i lipofilnog tipa.

Termalne metode (DSC i TGA) koje su u ovoj studiji korišćene da bi se ispitalo mezomorfno ponašanje C₂₀/C₂₂ APG mešanog emulgatora, kao i način distribucije vode unutar sistema, omogućile su da se predvide rezultati *in vivo* studije. Ostale tehnike koje se uobičajeno koriste u karakterizaciji ispitivanih sistema kao što su mikroskopija, reologija i difrakcije X-zracima potvrdile su rezultate dobijene termalnom analizom. Zbog toga je svakako među zaključke neophodno uvrstiti i taj da bi termalne metode mogle imati značajniju primenu kako u karakterizaciji novih sirovina koje stabilizuju emulzione sisteme, tako i u ispitivanju kompleksnih emulzionih sistema *per se*.

4. 3. Rezultati i diskusija III faze eksperimentalnog rada

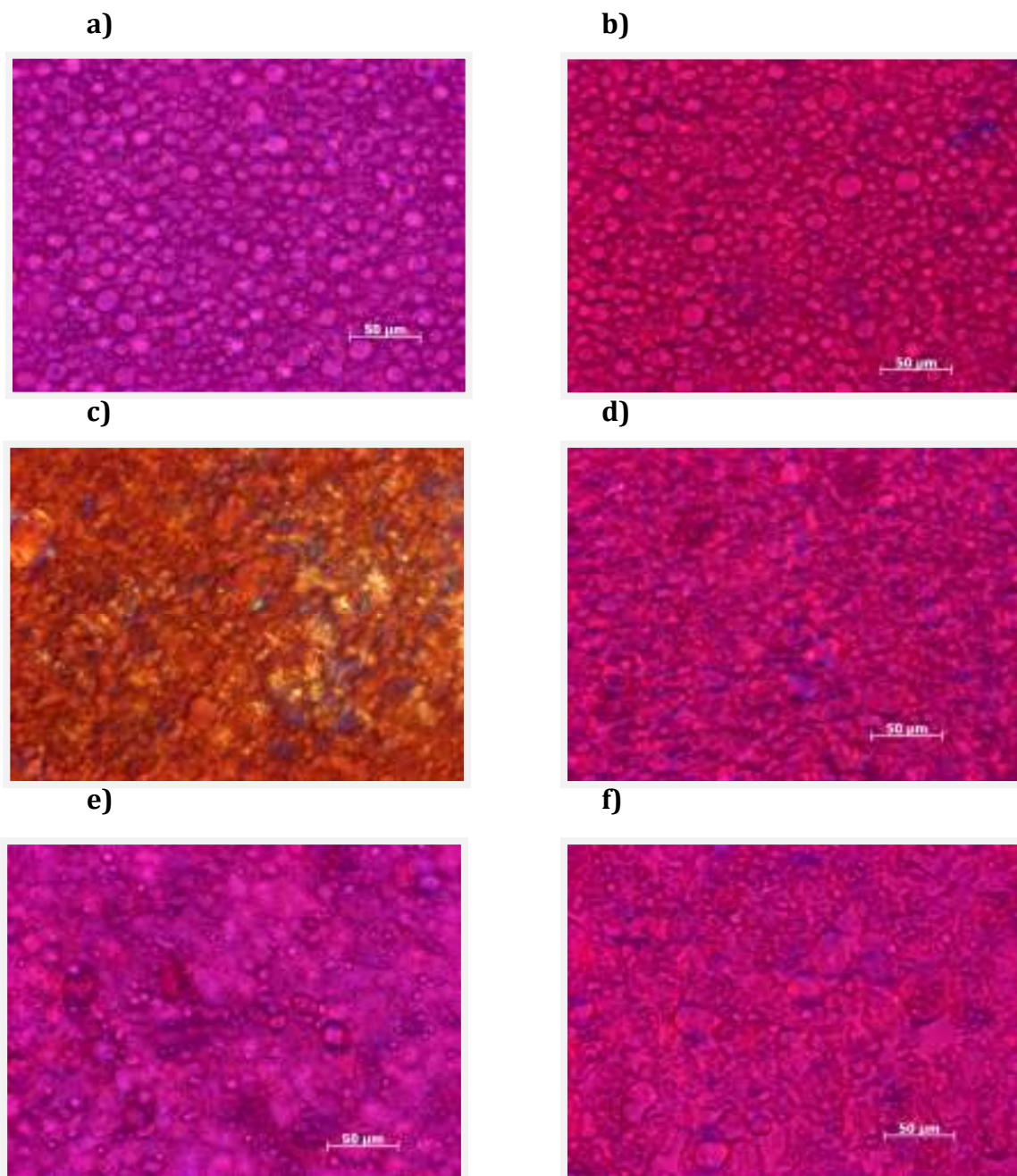
4. 3. 1. Ispitivanje uticaja kiselih aktivnih supstanci i izopropil alkohola na koloidnu strukturu, stabilnost i karakteristike model krem nosača uz emulgator Montanov™ 202

Cilj ove faze eksperimentalnog rada bila je procena tzv. kiselostabilnog potencijala ispitivanog emulgatora, odnosno ispitivanje kompatibilnosti i stabilnosti kiselih aktivnih supstanci, kao što su glikolna (2% i 10%) i salicilna kiselina (2%) u nosačima sa ovim emulgatorom. Takođe je ispitana i mogućnost inkorporiranja izopropil alkohola i njegovog rastvora aktivne supstance u emulzioni nosač. Za ovo je bilo neophodno formulirati dermokozmetički emulzioni nosač U/V tipa koji je stabilizovan dugolančanim APG emulgatorom. Ovo je postignuto nastavkom formulacionih ispitivanja, koja su se oslanjala na prethodno dobijene rezultate u fazi II. Na osnovu sveukupnih podataka koji su dobijeni fizičko-hemijskim ispitivanjima i primenom standardizovanog seta instrumentalnih i senzornih testova na model kremove sa različitim uljima, kao osnovna komponenta masne faze odabrani su kaprilno-kaprinski trigliceridi. U formulisan osnovni emulzioni nosač (K) inkorporirane su glikolna i salicilna kiselina, odnosno, izopropil alkohol (IPA) ili njegov rastvor salicilne kiseline (opisano u delu 3. 1. 2. 4. 1). Dodatno, formulisane dermokozmetičke emulzije U/V tipa iskorišćene su da se ispita uticaj svake dodate aktivne supstance na senzorne osobine razvijenim senzornim panelom, a primenom tehnika bioiženjeringa kože ispitan je kratkotrajni efekat uzoraka sa model supstancama.

Polarizaciona mikroskopija

Na polarizacionim mikrografijama (Slika 45) svih uzoraka uočava se prisustvo karakterističnih anizotropnih struktura – Malteških krstova i dvostrukog prelamanja svetlosti na granici uljanih kapi. Sa aspekta razmatranja uticaja IPA i kiselih supstanci na specifičnu strukturu na mikrografijama se vidi da je izopropil alkohol (Slika 45b), doveo do nešto većeg narušavanja osnovne strukture nosača

(Slika 45a) u odnosu na uticaj salicilne kiseline (SK) i glikolne kiseline (Slika 45c i d).



Slika 45. Polarizacione mikrografije uzoraka a) K, b) Ki, c) KG2%, d) KG10%, e) KSA i f) KiSA, uvećane 400 puta

Dodatno se kod uzorka KSA (Slika 45e), u kome je SK suspendovana, uočava prisustvo kristala SK. Kod uzorka KiSA (Slika 45f) u kome je SK rastvorena u izopropil alkoholu primetan je određen stepen nehomogenosti u veličini kapi emulzija u odnosu na uzorke koji sadrže samo IPA (Slika 45b) odnosno samo SK (Slika 45e). Treba spomenuti da je glikolna kiselina (GK) dovela do ugušćivanja sistema, što se primećuje i na mikrografijama (Slike 45c i d – veliki broj podslojeva).

Ispitivanje pH vrednosti i električne provodljivosti

Vrednosti pH i električne provodljivosti izmerene su 7 dana nakon izrade, a u cilju procene stabilnosti uzoraka merenja su ponovljena nakon 60 dana. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 27.

Inicijalni pH uzorka K se smanjuje dodatkom IPA i kiselina u krem. Da bi se izbegla pojava iritacije koju mogu da izazovu proizvodi sa kiselinama, pH ovih uzoraka podešena je dodatkom trietanolamina (TEA) tako da bude u opsegu 3,5-3,6 (# su označeni uzorci čija je pH podešavana dodatkom TEA). Iz Tabele 27 se vidi da nakon 60 dana nije bilo značajnijih promena pH ni jednog uzorka.

Inicijalne vrednosti el. provodljivosti (nakon 7 dana) ispitivanih uzoraka su se međusobno značajno razlikovale. Električna provodljivost model krema K (> 50 μ S/cm) pokazuje da je izrađena podloga U/V tipa.

Tabela 27. Vrednosti pH i električne provodljivosti U/V emulzija 7 i 60* dana nakon izrade

Uzorak	pH	El. provodljivost (μ S/cm)	pH*	El. provodljivost (μ S/cm)
K	4,9	63,1	4,83	59,2
Ki	4,60	23,4	4,53	8,12
KG2%	3,57#	804	3,51#	650
KG10%	3,59#	1,77 mS/cm	3,52#	1,57 mS/cm
KSA	3,60#	345	3,55#	215
KiSA	3,60#	159	3,92#	220

- označeni su uzorci čija pH je podešena dodatkom TEA

Dodatak IPA u podlogu doveo je do promena koje su uslovile da uzorak Ki bude emulzija mešovito tipa. Kod uzoraka bez aktivnih supstanci je vremenom došlo do blagog smanjenja el. provodljivosti, ali se tip sistema nije menjao. Model kremovi sa aktivnim supstancama su imali veoma različite vrednosti el. provodljivosti i sve pokazuju da su ovi sistemima U/V tipa. Ovako nešto je bilo i očekivano jer su inkorporirane aktivne supstance elektroliti. Promene el. provodljivosti do kojih je došlo kod ispitivanih sistema, odnosno očigledno smanjenje el. provodljivosti kod svih uzoraka (sem KiSA) moglo bi biti objašnjeno naknadnom strukturacijom koja je pre svega povezana sa načinom distribucije vode.

Pored specifičnih lamelarnih struktura koje mogu biti odgovorne za vezivanje vode (interlamelarna voda) kod uzoraka sa GK pad u vrednosti el. provodljivosti može se objasniti i sposobnošću ove aktivne supstance da sama vezuje određenu količinu vode. Naime, premda je GK mala molekula ona ima dve funkcionalne grupe (hidroksi i karboksilna), što omogućava istovremeno građenje intra- i intermolekulskih vodoničnih veza (Roy i sar., 2007).

Reološka merenja

U ovom delu studije sprovedena su kontinualna reološka merenja, inicijalno (nakon 7 dana od izrade uzoraka), da bi se uporedilo ponašanje ispitivanih emulzionih sistema tokom proticanja, odnosno da bi se procenio uticaj dodatnih supstanci (IPA, GK i SK) na osnovnu strukturu nosača (uzorak K). Dodatno su u cilju praćenja stabilnosti sprovedena ista merenja nakon 60 dana na uzorcima koji su čuvani na sobnoj temperaturi.

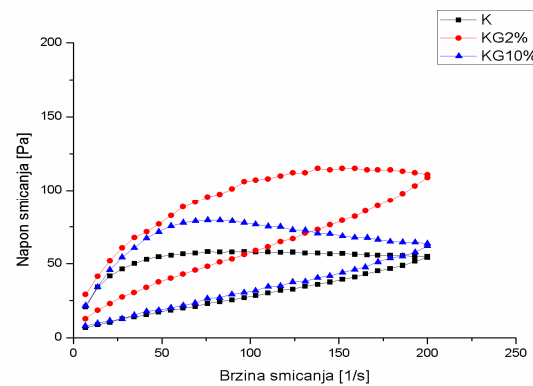
Uporedni reogrami osnovnog nosača tipa krema (K) i uzoraka koji sadrže glikolnu kiselinu u koncentraciji od 2% (KG2%) i 10% (KG10%) prikazani su na Slikama 46a (prinosni napon u funkciji brzine smicanja) i 46b (viskozitet u funkciji smicanja). Izgled dobijenih kriva ukazuje na pseudoplastično, tiksotropno ponašanje ispitivanih uzoraka. Poređenje prikazanih profila proticanja omogućava sagledavanje uticaja GK čiji je dodatak doveo do blagog ugušćivanja nosača (povećanje viskoziteta i napona pri istim brzinama smicanja). Interesantno je

primetiti da je dodatak manje količine GK (2%) doveo do većih promena u gustini i reološkom ponašanju u odnosu na veću količinu GK (10%), što je primećeno i organoleptički i na mikrografijama (Slike 45c i 45d). Ovo bi se moglo objasniti time da je GK u nižoj koncentraciji bolje distribuirana unutar sistema odnosno specifičnih lamelarnih struktura, odnosno interlamelarno vezane vode, i da kao njihov konstituens doprinosi nadogradnji (eng. *build up*) strukture (Roy i sar., 2007). Sa druge strane, u većoj koncentraciji, možda u određenoj meri narušava specifične strukture. Ovakvo tumačenje, ipak treba ograničiti na nivo pretpostavke za čiju potvrdu je neophodno uraditi dodatna ispitivanja koloidne strukture model kremova.

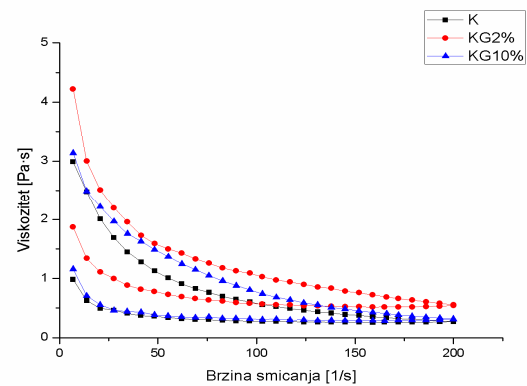
Na slikama 46c i 46d prikazani su odgovarajući uporedni reogrami osnovnog nosača (K) i uzoraka sa IPA (Ki) i SK (KSA), odnosno sa IPA rastvorom SK (KiSA). Krive proticanja pokazuju da, po dodatku IPA u nosač umerena tiksotropija, vidljiva kod sistema K i KSA, postaje značajno izraženija. Može se očekivati da su sa aspekta aplikacije uzorci sa IPA (Ki i KiSA) manje prihvatljivi. Izgled krivih viskoziteta ukazuje na to da je pri nanošenju ovih kremova potrebno primeniti veću silu, dok velike vrednosti histerezne površine ukazuju da je za njihovo razmazivanje i/ili rasprostiranje potrebno više vremena. Salicilna kiselina suspendovana u kremu nije značajno uticala na profil tečenja nosača, a ponašanje uzorka KiSA je vrlo slično ponašanju uzorka Ki, što je logično očekivati, jer je SK rastvorena u IPA, i ne utiče na reološke osobine.

Drugačije reološko ponašanje uzoraka sa IPA može se objasniti uticajem alkohola na specifičnu mikro strukturu osnovnog nosača. Ipak, kako polarizacione mikrografije nisu pokazale značajnije promene u strukturi između K i Ki uzorka za preciznije objašnjenje ovakvog ponašanja neophodna su dodatna ispitivanja.

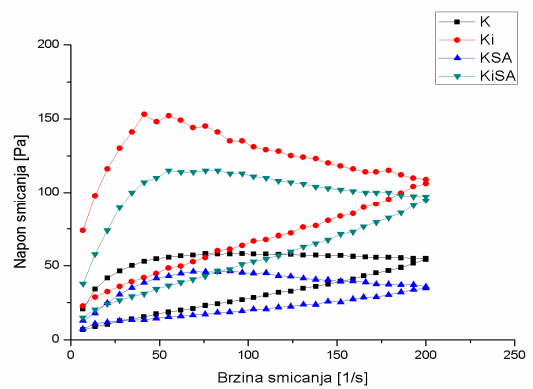
a)



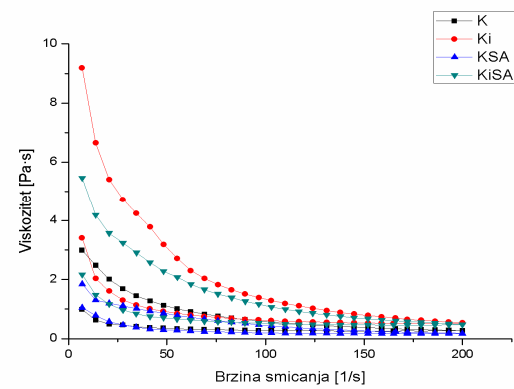
b)



c)



d)



Slika 46. Uporedni reogrami ispitivanih U/V emulzija na kojima je prikazana zavisnost napona smicanja od brzine smicanja (a i c), odnosno viskoziteta od brzine smicanja (b i d)

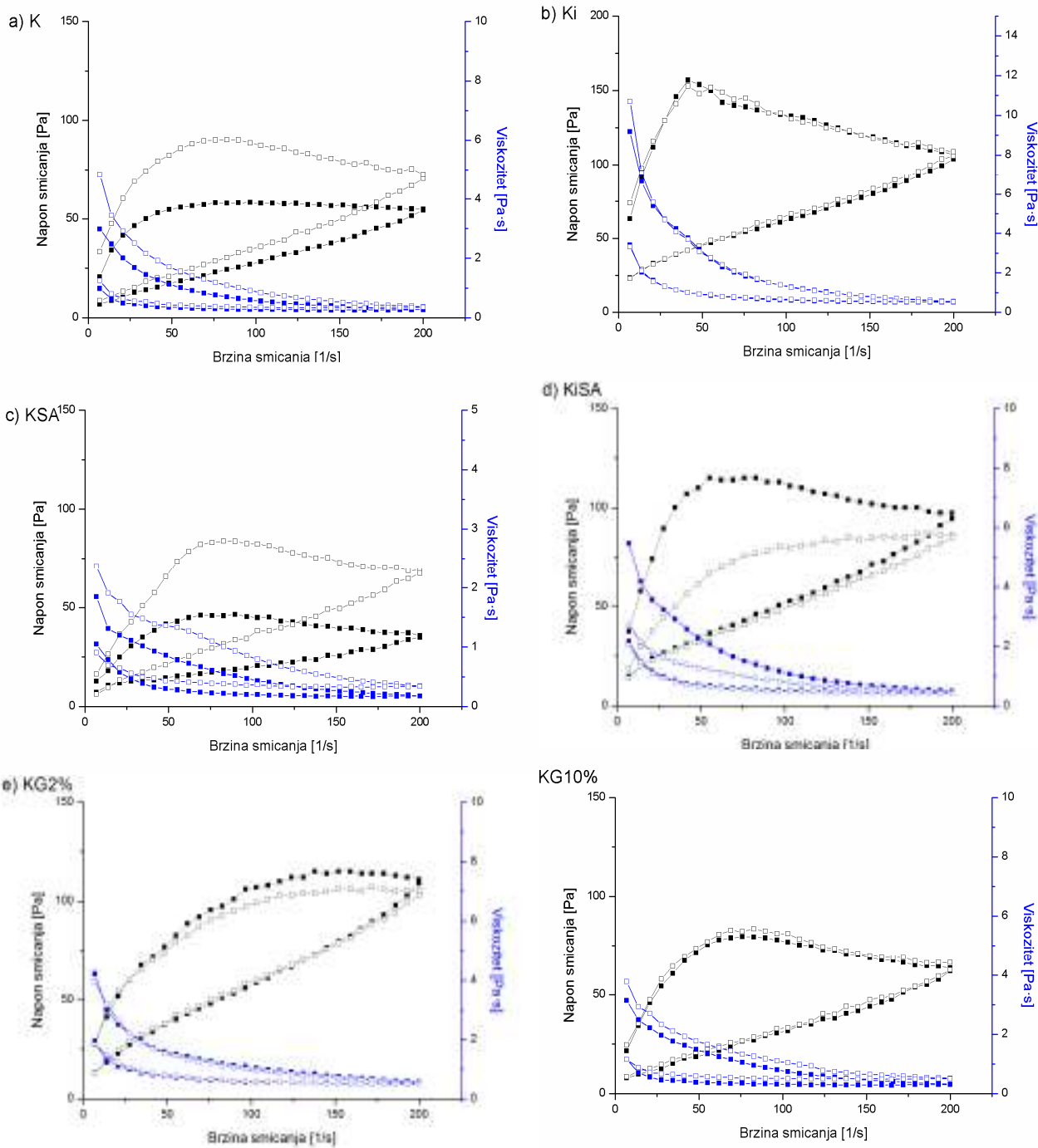
U cilju diskusije dobijenih rezultata procene stabilnosti na Slici 47 prikazani su uporedni reogrami (zavisnost napona smicanja – leva ordinata i viskoziteta – desna ordinata od brzine smicanja) za svaki uzorak posebno, gde su ispunjenim simbolima prikazani inicijalni, a praznim simbolima rezultati posle 60 dana skladištenja na sobnoj temperaturi.

Osnovni uzorak (Slika 47a) i uzorak sa SK (Slika 47c) pokazali su slično ponašanje tokom stajanja. Kod oba uzorka došlo je do blagog povećanja prinosnog napona i histerzne površine, tj. ugušćivanja sistema. Ovo se može objasniti naknadnim struktuiranjem nosača sa APG emulgatorom koji stabilizuje sistem građenjem lamelarnih faza. Kod uzorka sa IPA (Ki – Slika 47b), kao i kod uzorka sa GK (KG2% - Slika 49e i KG10% - Slika 49f) nije bilo promena u reološkom ponašanju nakon 60 dana. Uzorak u kome je SK rastvorena u IPA pokazao je drugačije ponašanje i od uzorka samo sa IPA i od uzorka samo sa SK, zbog čega se može pretpostaviti da je izvesni pad u viskozitetu i naponu pri datim brzinama smicanja posledica interakcije IPA sa SK.

Dobijeni rezultati praćenja pH vrednosti, el. provodljivosti i reoloških merenja u vremenu ukazuju na zadovoljavajuću preliminarnu stabilnost ispitivanih uzoraka.

Ponašanje uzorka sa glikolnom i salicilnom kiselinom pokazalo je da dodatak ovih aktivnih supstanci, iako dovodi do promena nekih osobina (smanjenje pH, povećanje el. provodljivosti, povećanje viskoziteta) osnovnog nosača ne utiče na narušavanje emulzione stukture. Ovo omogućava svrstavanje ispitivanog C₂₀/C₂₂ dugolančanog APG emulgatora u grupu kiselostabilnih emulgatora koji se mogu koristiti kao stabilizatori sistema sa kiselim aktivnim supstancama.

Ponašanje uzorka Ki sa 10% IPA (odsustvo organoleptičkih promena, promena pH, el. provodljivosti i reološkog profila u toku 60 dana skladištenja) ukazuje na eventualnu mogućnost inkorporiranja i većih količina ovog alkohola u emulzije stabilizovane ispitivanim emulgatorom.

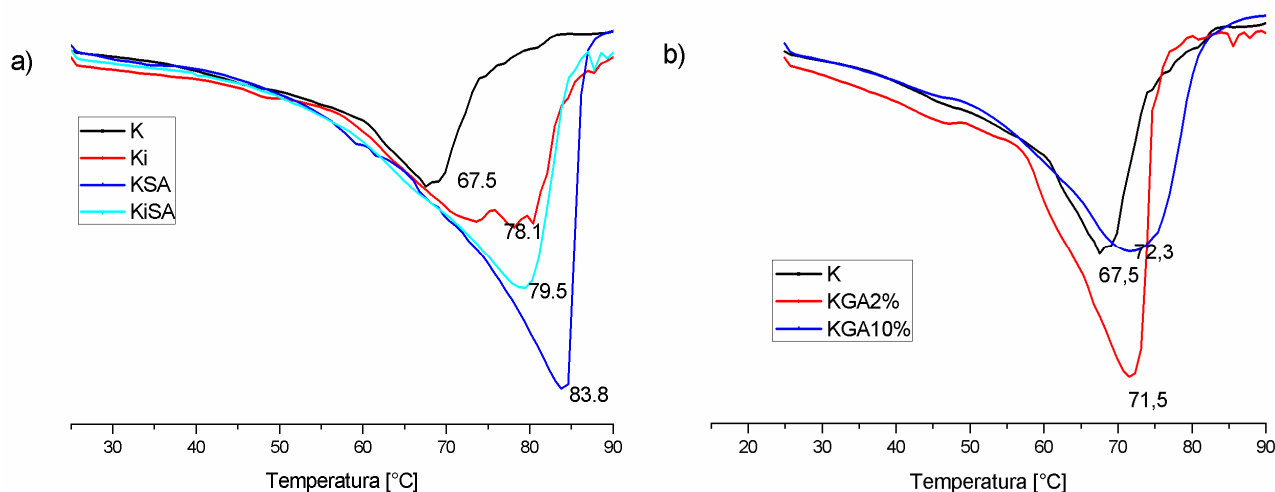


Slika 47. Usporedni reogrami koji prikazuju zavisnost napona smicanja od brzina smicanja (crno) i viskozita od napon smicanja (plavo) snimljeni inicijalno (ispunjeni simboli) i nakon 60 dana (prazni simboli) za ispitivane uzorke: a) K, b) Ki, c) KSA, d) KiSA, e) KG2% i f) KG10%

Termalna analiza

U rezultatima II faze eksperimentalnog rada prodiskutovana je, u većem obimu, mogućnost primene termalnih metoda, kako u oblasti ispitivanja emulzionih sistema, tako i u karakterizaciji novih sirovina. Prethodno diskutovani rezultati termalne analize binarnih i ternarnih sistema omogućili su rasvetljavanje stabilizacionih mehanizama ispitivanog emulgatora, kao i bolje razumevanje uticaja različitih masnih faza na specifičnu strukturu emulzija, tj. doprineli karakterizaciji ispitivanog emulgatora. U III fazi eksperimentalnog rada DSC merenja sprovedena na model kremovima imala su za cilj poređenje faznih promena koje se dešavaju u prisustvu IPA i/ili kiselih aktivnih supstanci u odnosu na osnovni koloidni nosač. TG analiza je i u ovom delu sprovedena radi rasvetljavanja načina distribucije vode unutar sistema.

Na Slici 48 su prikazani DSC profili model kremova. Radi jednostavnijeg pregleda uticaja dodatih sastojaka na fazne promene u odnosu na osnovni nosač na slikama je dat uporedni prikaz DSC profila: a) osnovnog nosača i uzoraka sa IPA i/ili SK i b) osnovnog nosača i uzoraka sa različitim koncentracijama GK.



Slika 48. DSC profili model kremova a) uporedni prikaz DSC profila uzoraka K, Ki, KSA i KiSA i b) uporedni prikaz DSC profila uzoraka K, KG2% i KG10%

Sve uzorke karakteriše postojanje jednog širokog endotermnog pika, a sa grafika se jasno vidi da dodatak IPA i aktivnih supstanci dovodi do njegovog, kako povećanja, tako i pomeranja ka višim temperaturama. Dodatak suspendovane salicilne kiseline izazvao je najveću promenu DSC profila osnovnog nosača. Temperaturni pik je sa 67,5°C pomeren na 83,8°C, a promena entalpije (ΔH) uzorka K sa 9322 mJ/mg porasla na $15,2 \times 10^3$ mJ/mg kod KSA uzorka. Ovo se može objasniti prisustvom suspendovane SK koja je dovela do ovakvih faznih promena. Prisustvo IPA dovelo je do temperaturnog pomeranja pika, njegovog širenja i pojave dva mala ramena na piku (Pantelic i sar., 2013). DSC profil uzorka u kome je SK rastvorena u IPA oblikom pika u najvećoj meri podseća na DSC profil uzorka sa SK, samo što je pik na nižoj temperaturi, što opet ukazuje na uticaj IPA na termalno ponašanje uzorka (Jaksic i sar., 2012).

Uzorci sa glikolnom kiselinom su pokazali različito ponašanje u zavisnosti od koncentracije GK. DSC profil uzorka sa 10% GK, kao i u slučaju reoloških profila, veoma je sličan DSC profilu osnovnog nosača, sa izuzetkom blagog pomeranja temperaturnog pika ka višim temperaturama (od 67,5°C do 72,3°C). GK prisutna u koncentraciji od 2% dovela je do povećanja i temperaturnog pika i ukupne promene entalpije. Ovakvi rezultati doprinose prethodno iznetim tvrdnjama da GK u nižoj koncentraciji učestvuje u izgradnji specifičnih struktura.

Merenja TGA sprovedena su sa ciljem procene distribucije vode u ispitivanim emulzionim nosačima. Preračun gubitka mase je izveden u odnosu na ukupnu masu uzorka, jer pored vode kod uzoraka sa IPA isparava i alkoholna frakcija. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 28.

Tabela 28. Vrednosti gubitka mase izražene u procentima* - u funkciji promene temperature pri specificiranim temperaturnim opsezima za ispitivane model kremove; prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija

Uzorak	Gubitak mase 30-50°C (%)	Gubitak mase 50-70°C (%)	Gubitak mase 70-110°C (%)
K	6,42	14,52	37,81
Ki	8,66	42,14	6,4
KSA	11,17	35,85	24,59
KiSA	6,43	30,76	10,47
KG2%	8,34	16,76	17,1
KG10%	3,2	23,36	12,87

*Procentni gubitak mase preračunat je u odnosu na ukupnu masu uzorka

U skladu sa prikazanim rezultatima najmanji procenat gubitka mase kod svih ispitivanih sistema, sa izuzetkom uzorka Ki, prisutan je u prvom temperaturnom opsegu. Kod uzorka sa IPA najveći gubitak mase dešava se u drugom temperaturnom opsegu dok je u trećem gubitak neznatan. Ovakvo ponašanje može se objasniti isparavanjem IPA koji sa sobom povlači i vodu koja je slobodna, odnosno odsustvom interlamelarne vode usled redukcije specifičnih lamelarnih struktura, koje je izazvao IPA.

Iz osnovnog nosača K, skoro 40% vode isparava posle 70°C. U prisustvu salicilne kiseline najveći deo vode isparava na temperaturi između 50 i 70°C, ali je i deo koji isparava posle 70°C veoma visok. Kod uzorka KiSA, prisustvo IPA uslovalo je da ponašanje pri smanjenju gubitka mase bude slično onom kod uzorka Ki, odnosno najveći gubitak dešava se u drugom temperaturnom opsegu, dok je deo koji isparava u trećem opsegu značajno smanjen u odnosu na uzorak KSA.

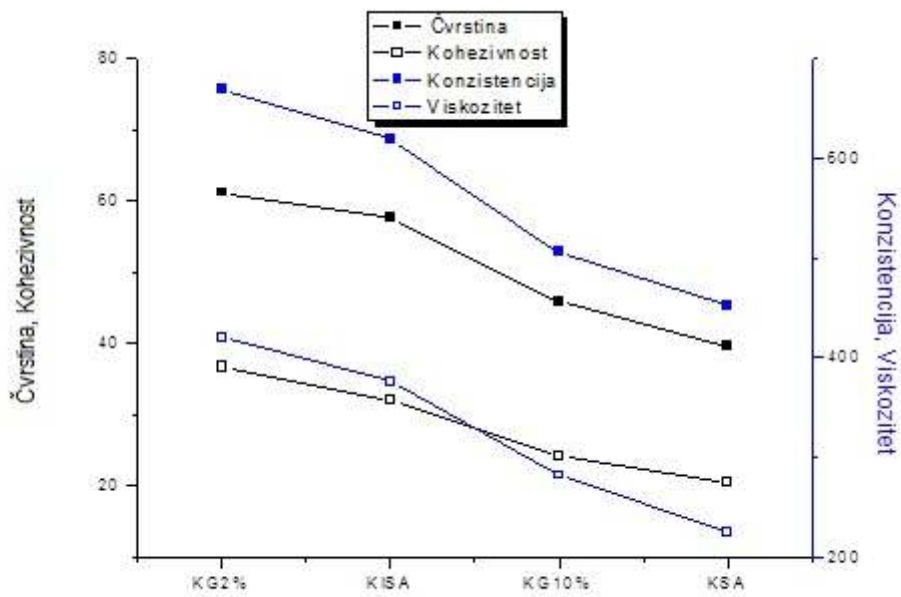
Dodatak GK doveo je do smanjenja gubitka mase u trećem temperaturnom opsegu, a povećanja u drugom, što je posebno naglašeno kod uzorka sa 10% GK.

Na osnovu dobijenih rezultata može se očekivati da će svi model kremovi pokazati dobar vlažeći efekat, a većina i produženu hidrataciju. Samo na osnovu TGA rezultata koji pokazuju koji ispitivani uzorak ima najveći gubitak mase u različitim temperaturnim opsezima, najbolji efekat produžene hidratacije očekivao bi se od uzoraka K i KSA. Ono što treba imati na umu je činjenica da je u ispitivanim kremovima prisutna kozmetički aktivna supstanca koja spada u grupu ovlaživača (Yu i Van Scott, 2004). U tom smislu *in vivo* efekti koji se očekuju neposredno nakon primene ispitivanih kremova nisu uslovljeni samo delovanjem vode koja se oslobađa iz emulzionih sistema već i specifičnim delovanjem aktivne supstance (Green i sar., 2009).

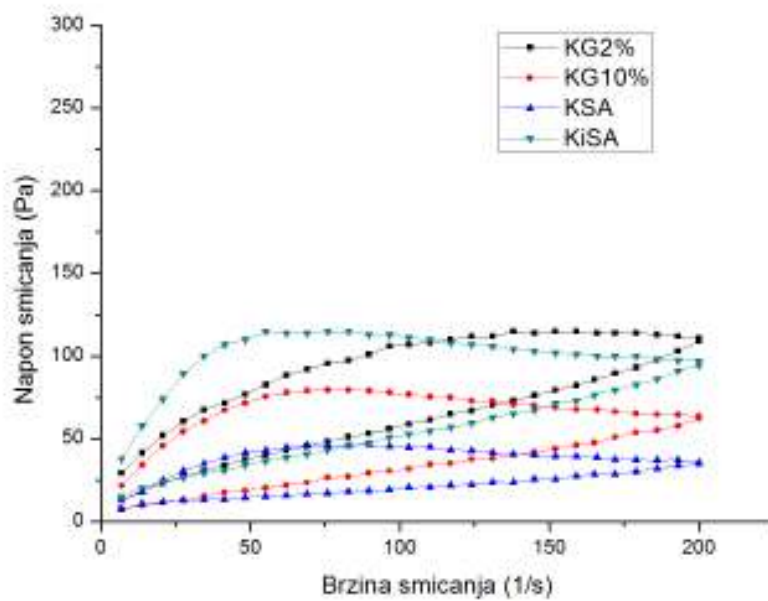
Teksturna analiza

Teksturna i senzorna analiza u ovom delu eksperimentalnog rada sprovedene su samo na aktivnim uzorcima. U prethodnim fazama ispitan je uticaj promene masne faze, ili komponenata masne faze, na teksturne i senzorne osobine. U ovoj fazi rada je ispitan uticaj svake od dve aktivne supstance i različite koncentracije GK, ali i načina inkorporiranja SK u osnovni krem na određene karakteristike kremova.

Rezultati teksturne analize prikazani su na Slici 49. Među svim dobijenim teksturnim parametrima se uočava isti poredak: KG2%>KiSA>KG10%>KSA. Radi jednostavnijeg poređenja sa reološkim profilima na Slici 50 je dat uporedni prikaz reograma uzoraka sa aktivnim supstancama.



Slika 49. Teksturni parametri model kremova



Slika 50. Uporedni reogrami uzoraka sa kozmetički aktivnim supstancama

Prikazani reogrami ukazuju na sličnost rezultata dobijenih reološkom i teksturnom analizom kremova. Na osnovu reoloških merenja uzorci KiSA i KG2% mogu se okarakterisati kao najgušći odnosno najviskoziji kremovi, a zatim KG10%, pa KSA uzorak. Kod teksturnih merenja se zbog visokog stepena sličnosti dobijenih rezultata za sve kreme, ne može govoriti o značajnim razlikama, ali se na osnovu ovih jednostavnih merenja ipak uspela napraviti razlika među ispitivanim uzorcima i u saglasnosti sa reološkim merenjima.

Na osnovu prikazanih rezultata može se reći da dve različite aktivne supstance, različite koncentracije GK od 2% i 10%, ali i različit način inkorporiranja SK ne utiču značajno na promenu teksture kremova.

Senzorna analiza

U skladu sa standardizovanim setom instrumentalnih i senzornih testova modifikovana senzorna studija koja je razvijena u prethodnim fazama eksperimentalnog rada sprovedena je i na model kremovima sa aktivnim supstancama.

U Tabeli 29 prikazani su termini kojima su opisani definisani deskriptivni senzorni atributi. Između ovih karakteristika gotovo da nije bilo razlike, a interesantno je skrenuti pažnju na sličnost rezultata dobijenih kod "aktivnih" model kremova i onih za ternarni sistem sa kaprilno-kaprinskim trigliceridima – T20mc (Tabela 28).

Senzorni atributi za koje su konstruisane skale dobili su veoma slične ocene. Između dobijenih srednjih vrednosti ocena za adheziju, teksturu, razmazivost i rasprostiranje mogao bi se napraviti određeni poredak, ali visoke vrednosti standardnih devijacija ne dozvoljavaju ovakvo poređenje, zbog čega dobijeni rezultati nisu ni predstavljeni. U skladu sa podacima dobijenim reološkim i teksturnim merenjima može se reći da su ovakvi rezultati bili očekivani.

Odsustvo bilo kakve statističke značajnosti između dobijenih vrednosti dovodi do zaključka da različite aktivne supstance (SK i GK) i različite

koncentracije GK (2 i 10% GK), kao i načina inkorporiranja SK (suspendovana i rastvorena SK) ne dovode do značajnih promena u ispitanim senzornim atributima.

Tabela 29. Kvantitativni rezultati senzorne procene ispitivanih uzoraka – atributi za koje su korišćeni opisni termini

Faza aplikacije	Senzorni atribut	KG2%	KG10%	KiSA	KSA
Pre utrljavanja i tokom uzimanja	Konzistencija	Svi uzorci opisani su kao polučvrsti			
	Sjaj	Blago sjajan	Blago sjajan	Blago sjajan	Sjajan
	Elastičnost	Elastičan	Blago elastičan	Elastičan/blago elastičan	Blago elastičan
Tokom utrljavanja	Lepljivost	Nije lepljiv			
	Gustina	Blago gust	Blago gust	Blago gust	Blago gust
	Masnoća	Blago mastan			
	Sjaj	Blago sjajan			
	Upijanje	Umereno	Sporo	Umereno	Umereno
Osećaj nakon nanošenja	Rezidualni film	Umeren film			
	Lepljivost	Nije lepljiv			
	Masnoća	Blago masna	Blago masna	Nije masna	Blago masna
	Sjaj	Blago sjajna			

4. 3. 2. Ispitivanje efikasnosti dermokozmetičkih emulzija U/V tipa

Sa izrađenim model kremovima sprovedena je petočasovna *in vivo* studija ispitivanja efikasnosti. Primenjenim tehnikama bioinženjeringa praćeni su sledeći parametri:

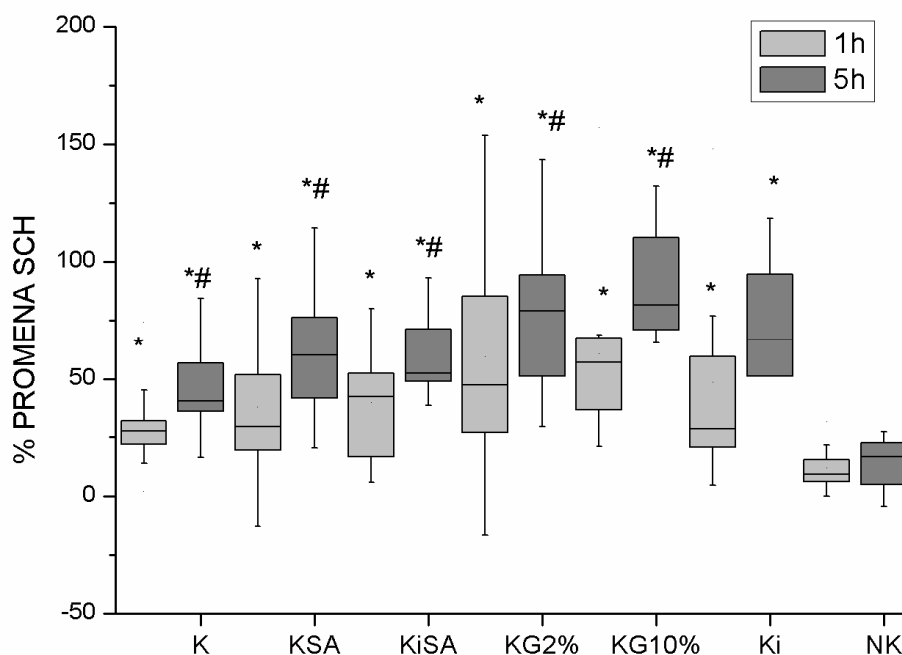
- stepen vlažnosti SC-a (SCH) – u cilju procene vlažećeg efekta,
- transepidermalni gubitak vode (TEGV) – u cilju procene uticaja dermokozmetičkih emulzija na kožnu barijeru,
- eritema indeks (EI) i pH kože (pH) – u cilju procene stepena iritacije i oštećenja koja bi mogla nastati kao posledica primene emulzija sa kiselim aktivnim supstancama na kožu.

Merenja su sprovedena inicijalno (bazalne vrednosti) i nakon 1 (1h) odnosno 5 sati (5h) posle primene ispitivanih uzoraka. Svi uzorci doveli su do značajnog povećanja vlažnosti nakon 1 sata u odnosu na inicijalna merenja odnosno bazalne vrednosti (Slika 51). Isti trend nastavljen je i nakon 5 sati po primeni kremova, pri čemu su svi uzorci značajno povećali stepen hidratisanosti SC-a u odnosu na bazalne vrednosti. Treba spomenuti i da je SCH kod svih uzoraka, osim kod uzorka Ki, nakon 5h bio značajno povećan i u odnosu na vremensku tačku - 1h po primeni. Ovakvi rezultati ukazuju na značajan potencijal produženog vlaženja kože primenjenih model kremova.

Sa grafika se vidi da su uzorci sa obe kiseline i izopropil alkoholom doveli do većeg vlažećeg efekta u odnosu na osnovu model podlogu, ali je samo uzorak sa 10% GK izazvao povećanje SCH vrednosti u odnosu na efekat uzorka K, koje je statistički značajno i to samo u jednoj vremenskoj tački (nakon 5h). Na osnovu ovih rezultata može se tvrditi da uzorak KG10% ima najveći vlažeći potencijal, odnosno izaziva najveći efekat kako trenutne tako i produžene hidratacije kože.

U skladu sa prethodno komentarisanim rezultatima TG analize treba istaći da su *in vivo* ispitivanja pokazala da je doprinos aktivne supstance u ostvarivanju vlažećeg efekta neosporan. Odnosno, TGA može biti veoma korisna u predviđanju ovog efekta za uzorke koji ne sadrže vlažeća sredstva, gde je hidratacija kože

posledica oslobađanja prisutne vode iz primenjivanog uzorka. U situacijama kada su prisutni ovlaživači kože, treba biti oprezan u tumačenju TG rezultata sa aspekta očekivanog vlažećeg efekta.



* statistički značajno povećanje u odnosu na bazalne vrednosti ($p < 0,001$);

statistički značajno povećanje u odnosu na 1h ($p < 0,05$)

Slika 51. Procentne promene SCH vrednosti 1h i 5h nakon primene dermokozmetičkih emulzija

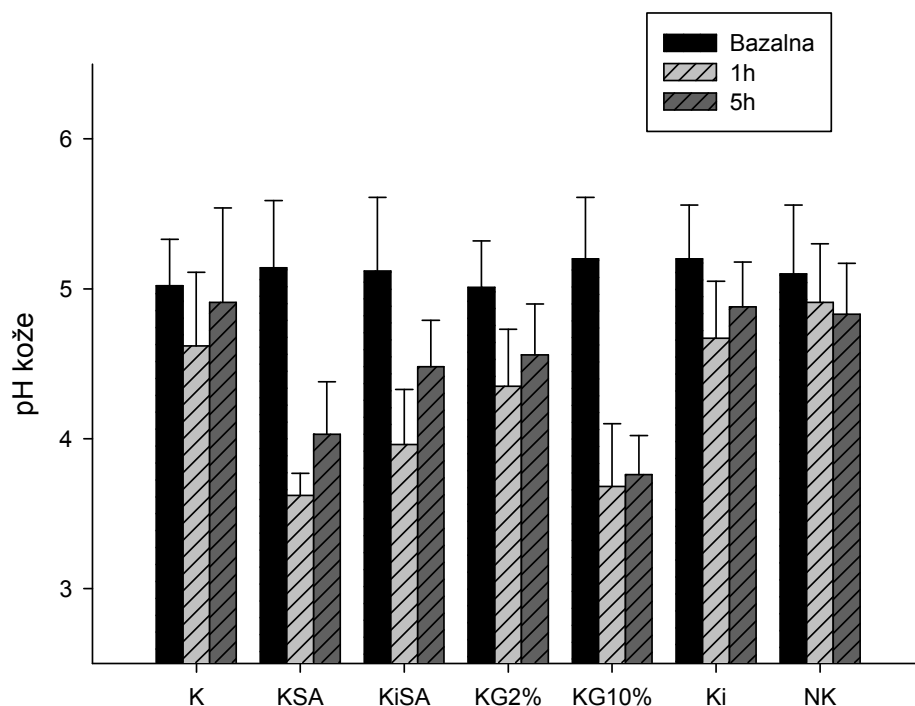
Kao što je u uvodnom delu (1. 4. 5.) već rečeno upotreba hidroksi kiselina, naročito “starijih” generacija (kakve su glikolna i salicilna kiselina), često je povezana sa pojavom neželjenih reakcija. Iritacioni odgovor koji se najčešće javlja je pojava eritema i nelagodnosti u vidu peckanja i svraba (Yu и Van Scott, 2004).

Rezultati naše studije pokazali su da aplikacija model kremova nije dovela do značajnih promena u vrednostima TEGV kao ni EI. Trend povećanja TEGV koji je prisutan 1h i 5h nakon aplikacije svih uzoraka svakako se može objasniti povećanjem stepena hidratacije SC-a, koji je praćen narušavanjem intaktnosti kožne barijere (Fluhr i sar., 2001). Ipak, činjenica da TEGV nije značajno povećan u uslovima produžene hidratacije i to u prisustvu hidroksi kiselina i IPA koji i sami mogu da dovedu do oštećenja kožne barijere može se objasniti pozitivnim efektom samog nosača stabilizovanog fazom tečnih kristala.

Odsustvo promena vrednosti eritema indeksa, posebno kada je reč o uzorku KG10%, ukazuje na zadovoljavajući bezbednosni profil ispitivanih dermokozmetičkih emulzija, kao doprinos nosača za GK koji je sa ispitivanim APG emulgatorom.

Zbog (veoma) niske pH vrednosti ispitivanih kremova sa kiselinama (koja je podešena na dozvoljeni minimum od 3,5) praćen je i parametar pH kože. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 52 i pokazuju da je nakon 1h primena svih uzoraka izazvala značajno smanjenje pH vrednosti kože, što se svakako može objasniti pH vrednostima ispitivanih uzoraka (Tabela 29). Nakon 5 h pH kože je porasla. Tumačeno paralelno sa rezultatima merenja TEGV i SCH, može se reći da ove promene pH kože nisu dovele do narušavanja transepidermalnog difundovanja vode.

Sprovedena studija pokazala je da izrađeni model kremovi pored toga što imaju veliki hidratišući potencijal imaju i povoljan bezbednosni profil.



Slika 52. pH kože izmerena inicijalno (bazalna), nakon 1 (1h) i nakon 5 časova (5h) od primene ispitivanih kremova (prikazane kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama)

Rezultati III faze su pokazali u prvom delu da nosači sa ispitivanim APG emulgatorom dugog lanca, imaju zadovoljavajući kiselostabilni potencijal, kao i da se mogu koristiti za inkorporiranje do 10% IPA. Uz podsećanje na činjenicu da se pri formulisanju kozmetičkih emulzija sa hidroksi kiselinama, kao i sa kiselim aktivnim supstancama, generalno, mogu javiti problemi kako pri formulisanju tako i pri korišćenju, dobijeni rezultati i druge i treće faze eksperimentalnog rada ukazuju na to da su nosači sa Montanov™ 202, dobar izbor za dermokozmetičke emulzije.

U prvom delu eksperimentalnog rada pokazano je da se određeni senzorni atributi (tekstura i razmazivost) mogu predvideti instrumentalnim merenjima, što je posebno značajno u uslovima kada senzornu studiju nije

moguće izvesti. U narednoj fazi rada upotreba seta instrumentalnih i senzornih testova, standardizovanih u prvom delu eksperimentalnog rada, našla je svoju primenu i u drugoj i u trećoj fazi, tj. u razvoju i ispitivanju dermokozmetičkog nosača U/V tipa namenjenog vlaženju kože. Ovim se pokazalo da koncept uporedne reološke, teksturne i senzorne procene može imati veću primenu u formulaciji dermokozmetičkih emulzija. Tačnije, ovaj uporedni pristup se, uz razvoj odgovarajućih senzornih panela može koristiti u formulaciji efikasnih, bezbednih i estetski prihvatljivih kozmetičkih proizvoda.

5. ZAKLJUČAK

Prva faza eksperimentalnog rada

1. Sensorni atributi koji zavise od fizičkih karakteristika emulzije, a kojima se opisuje ponašanje kozmetičkog proizvoda u toku uzimanja i nanošenja na kožu, mogu se donekle predvideti instrumentalnim, odnosno reološkim i teksturnim merenjima. Tako je moguće teksturu kozmetičke emulzije predvideti reološkim (histerezna površina, prinosni napon) i teksturnim parametrima (čvrstina). Sensorni atribut razmazivost, može se predvideti na osnovu vrednosti maksimalnog i minimalnog viskoziteta, elastičnog modula kao reoloških parametara, odnosno konzistencijom, kohezivnošću i indeksom viskoziteta, kao teksturnim parametrima.
2. Ispitivanja senzornih osobina koja su vremenski i novčano zahtevna, a kojima se vrši određivanje senzornog profila mogu biti pojednostavljena upotrebom instrumentalnih metoda, kao što su reološka i teksturna merenja.
3. Kombinovani pristup koji podrazumeva upotrebu instrumentalnih metoda i modifikovanih senzornih studija može se koristiti u postupku preformulacije i formulacije kozmetičkog proizvoda prihvatljivog za potrošača.
4. Podaci dobijeni senzornom karakterizacijom emolijenasa mogu biti iskorišćeni pri formulisanju kozmetičkih emulzija unapred definisanih senzornih osobina, ili u postupku izmena sastava kozmetičkog proizvoda da bi se dobio proizvod željenih/zadovoljavajućih karakteristika u odnosu na namenu ili očekivanja korisnika.
5. Utvrđeno je da se reološka merenja, kao što su merenja prinosnog napona i viskoziteta u funkciji brzine smicanja, čija je svrha predviđanje ponašanja emulzija prilikom primene, mogu izvoditi na sobnoj temperaturi, bez potrebe simuliranja realnih uslova kao što je temperatura kože (32°C).
6. Teksturna analiza može se koristiti kao dovoljno osetljiva metoda u karakterizaciji i poređenju ispitivanih V/U i U/V kremova, odnosno njihovih

mehaničkih i strukturnih osobina, čak i kada se sprovede male promene u formulaciji, kao što je promena jedne komponente masne faze.

7. Zaključeno je da jednostavna metoda teksturne analize može da se izvodi kao zamena za neka reološka merenja (merenje minimalnog i maksimalnog viskoziteta, prinosnog napona).
8. Poređenja efikasnosti i senzornih atributa kozmetičkih proizvoda pokazala su da najefikasniji proizvod ne mora biti i estetski najprihvatljiviji (najbolje ocenjen proizvod), odnosno da između njih ne postoje korelacije.

Druga faza eksperimentalnog rada

9. Alkil poliglukozidni mešani C₂₀/C₂₂ emulgator (INCI: arahidil glukozid i arahidil i behenil alkohol) pod komercijalnim nazivom Montanov™ 202 pokazao je veliki potencijal u obrazovanju lamelarne faze. Sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija ispitivanih uzoraka, koja je započeta mikroskopskom analizom binarnih i ternarnih sistema, a nastavljena WAXD, SAXD merenjima, termalnom analizom i reološkim merenjima, potvrdila je osnovnu hipotezu da ispitivani APG emulgator vrši stabilizaciju formulisanih emulzionih sistema obrazovanjem lamelarne tečno-kristalne (L α) i gel-kristalne (L β) faze.
10. Kod svih ispitivanih sistema sa navedenim emulgatorom, veliki deo vode predstavlja na neki način vezana voda (bilo da je reč o interlamelarno vezanoj vodi ili tzv. sekundarnoj vodi) koja se smatra odgovornom za značajan (produženi) hidratišući efekat ovih uzoraka i njihov potencijal za kontrolisano produženo vlaženje kože.
11. Pri formulisanju kozmetičkih emulzija sa emulgatorom Montanov™ 202, neophodno je voditi računa o izboru vrste masnih komponenti, jer je sposobnost ispitivanog emulgatora da stabilizuje emulzije formiranjem lamelarnih faza smanjena u prisustvi nepolarnih ulja, kao što je parafinsko ulje.

Drugim rečima pri formulisanju treba voditi računa o kompatibilnosti ovog mešanog emulgatora i komponenata masne faze.

12. Termogravimetrijska analiza, kojom je ispitan način distribucije vode unutar formulisanih sistema može se sa visokim stepenom tačnosti koristiti za predviđanje vlažećeg efekta kozmetičkih emulzija u kojima nisu prisutne kozmetički aktivne supstance iz grupe vlažećih sredstava.
13. Na osnovu brojnih podataka koji su dobijeni termalnim metodama, DSC i TGA, u različitim fazama ovog rada (ispitivanja binarnih i ternarnih sistema, model kremova sa i bez kozmetički aktivnih supstanci), može se zaključiti da one mogu imati značajniju primenu kako u karakterizaciji novih sirovina koje stabilizuju emulzione sisteme, tako i u ispitivanju kompleksnih emulzionih sistema *per se*.

Treća faza eksperimentalnog rada

14. Emulzije stabilizovane emulgatorom Montanov™ 202 pokazale su zadovoljavajuću stabilnost pri inkorporiranju kiselih supstanci kao što su glikolna i salicilna kiselina, bez obzira da li su one inkorporirane u vidu vodenog rastvora (GK), izopropanolnog rastvora (SK) ili su suspendovane (SK) u formulisan krem. Može se izvesti zaključak da je ispitivani emulgator i kremovi formulisani sa njim kompatibilan sa glikolnom i salicilnom kiselinom u koncentracijama dozvoljenim za kozmetičku primenu.
15. Uzorci sa IPA pokazali su da se emulzije sa ispitivanim emulgatorom mogu koristiti kao nosači kada je potrebno da se u njih inkorporira izopropanol.
16. *In vivo* studije sprovedene sa uzorkom obeleženim kao osnovni nosač - placebo (bez kozmetički aktivnih supstanci) i sa aktivnim (sa kozmetički aktivnim supstancama) uzorcima u II i III delu pokazale su da produženom vlažećem efektu ispitivanih derm kozmetičkih emulzija formulisanim sa APG

emulgatorom (čak 5 sati nakon primene ispitivanih kremova) u velikoj meri doprinosi sam nosač.

17. Pored zadovoljavajućeg vlažećeg efekta kremovi su pokazali povoljan uticaj na stanje kožne barijere kao i povoljan bezbednosni profil, time što nisu doveli do promena u vrednostima TEGV ni EI, koji su očekivani i opisani pri primeni hidrokiseline. Zbog svega prethodno iznetog, kremovi sa emulgatorom Montanov™ 202 predstavljaju dobar/pogodan izbor nosača pri formulisanju dermokozmetičkih preparata za vlaženje kože.
18. Upotreba seta instrumentalnih i senzornih testova standardizovanih u prvom delu eksperimentalnog rada našla je svoju primenu u drugoj i u trećoj fazi, tj. u razvoju i ispitivanju dermokozmetičkog krema tipa U/V, namenjenog vlaženju kože. Ovim se pokazalo da koncept uporedne reološke, teksturne i senzorne procene može imati veću primenu u razvoju formulacija dermokozmetičkih emulzija. Tačnije, ovaj uporedni pristup se, uz razvoj odgovarajućih senzornih panela, može koristiti u formulaciji efikasnih i estetski prihvatljivih kozmetičkih proizvoda.

6. LITERATURA

Adams RM, Maibach HI. A five-year study of cosmetic reactions. *J Am Acad Dermatol.* 1985; 13: 1062-1069.

Ahn S, Kim S, Lee H, Moon S, Chang I. Correlation between a Cutometer and quantitative evaluation using Moire topography in age-related skin elasticity. *Skin Res Technol.* 2007; 13: 280-284.

Al-Bawab A, Friberg SE. Amphiphilic association structures in a model skin lotion with hydroxy acids. *Int J Cosmetic Sci.* 2004; 26: 139-147.

Almeida IF, Gaio AR, Bahia MF. Hedonic and descriptive skinfeel analysis of two oleogels: comparison with other topical formulations. *J Sens Stud.* 2008; 23: 92-113.

Anderson RL, Cassidy JM, Hansen JR, Yellin W. Hydration of stratum corneum. *Biopolymers.* 1976; 12: 2789-2802.

Andreassi L. Bioengineering in Dermatology: General Aspects and Perspectives. *Clin Dermatol.* 1995; 13: 289-292.

ASTM Committee E 18. Manual on Descriptive Analysis Testing for Sensory Evaluation. RC. Hootman (ed). American Society for Testing and Materials. 1992. Philadelphia, PA, MNL 13.

ASTM Committee E 1490-03. Standard practice for descriptive skinfeel of creams and lotions. American Society for Testing and Materials. 2003. West Conshohocken, PA.

Bárány E, Lindberg M, Lodén M. Unexpected skin barrier influence from nonionic emulsifiers. *Int J Pharm.* 2000; 195: 189-201.

Bárány E. Human in vivo skin irritancy testing. U: Loden M, Maibach HI (Eds.). *Dry Skin and Moisturizers*, 1st ed. CRC Press. Boca Raton: 2000. pp. 175-182.

Barnes HA. Thixotropy — a review. *J. Non-Newton Fluid Mech.* 1997; 70: 1-33.

Barnes HA. Rheology of emulsion – a review. *Colloid Surface A.* 1994; 91: 89-95.

Barnes HA. The yield stress – a review or ‘panta rei’ – everything flows. *J Non-Newtonian Fluid Mech.* 1999; 81: 133-178.

Berardesca E. EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods. *Skin Res Technol.* 1997; 3: 126-132.

Bergfeld W, Tung R, Vidimos A, Vellanki L, Remzi B, Stanton-Hicks U. Improving the cosmetic appearance of photoaged skin with glycolic acid. *J Am Acad Dermatol.* 1997; 36: 1011-1013.

- Bernstein EF, Lee J, Brown DB, Yu R, Van Scott E. Glycolic acid treatment increases type I collagen mRNA and hyaluronic acid content of human skin. *Dermatol Surg.* 2001; 27: 429–433.
- Bettinger J, Gloor M, Vollert A, Kleesz A, Fluhr J, Gehring W. Comparison of different non-invasive test methods with respect to the effect of different moisturizers on skin. *Skin Res Technol.* 1999; 5: 21–27.
- Brace I. *Questionnaire Design: How to Plan, Structure and Write Survey Material for Effective Market Research.* 2004. Kogan Page, Philadelphia, PA.
- Breene WM. Application of texture profile analysis to instrumental food texture evaluation. *J Texture Stud.* 1975; 6: 53- 82.
- Brummer R, Godersky S. Rheological studies to objectify sensations occurring when cosmetic emulsions are applied to the skin. *Colloid. Surface A.* 1999; 152: 89-94.
- Brummer R. (Ed). *Rheology Essentials of Cosmetic and Food Emulsions.* Springer, Berlin, Heidelberg. 2006.
- Byrne AJ. Bioengineering and subjective approaches to the clinical evaluation of dry skin. *J Cosm Sci.* 2010; 32:410-421.
- Caspers PJ, Lucassen GW, Carter EA, Bruining HA, Puppels GJ. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol.* 2001; 116: 434–442.
- Caussin J, Wouter Groenink HW, de Graaff AM, Gooris GS, Wiechers JW, van Aelst AC, Bouwstra JA. Lipophilic and hydrophilic moisturizers show different actions on human skin as revealed by cryo scanning electron microscopy. *Exp Dermatol.* 2007; 16:891-898.
- Clause D. Differential thermal analysis, differential scanning calorimetry, and emulsions. *J Thermal Anal Calorim.* 2010; 101: 1071-7.
- Clause D, Gomez F, Pezron I, Komunjer L, Dalmazzone C. Morphology characterization of emulsion by differential scanning calorimetry. *Adv Colloid Interface Sci.* 2005;117: 59-74.
- Colipa report on the 8 World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal 2011.
- Colipa Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products, Third Edition, May, 2008.
- Cosmetics Directive 76/768/EEC; Council Directive of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. Dostupno sa: <http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/documents/directive/index_en.htm#h2-consolidated-version-of-cosmetics-directive-76/768/eec>; pristupljeno 11. 07. 2014.

Council Directive 93/35/EEC of June 14, 1993, amending for the sixth time Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetics products, Official Journal of the EU, series L151 32-37, Jun 23, 1993.

Csizmazia E, Budai-Szűcs M, Erős I, Makai Z, Szabó-Révész P, Varju G, Csányi E. Thermoanalytical method for predicting the hydration effect permanency of dermal semisolid preparations. *J Thermal Anal Calorim.* 2010; 101: 313-6.

Dapcevic T, Dokic P, Hadnadev M, Pojic M. Determining the yield stress of food products – importance and shortcomings. *Food Processing, Quality and Safety.* 2008; 35: 143-149.

Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, Fluhr JW. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 72: 295-303.

Davis SS. Viscoelastic properties of pharmaceutical semisolids IV: Destructive oscillatory testing. *J Pharm Sci.* 1971; 60: 1356-1360.

Davis SS. Viscoelastic properties of pharmaceutical semisolids III: Nondestructive oscillatory testing. *J Pharm Sci.* 1971; 60: 1351-1356.

De Groot AC, Nater JP, Van der Lende R, Rijcken B. Adverse effects of cosmetics and toiletries: a retrospective study in the general population. *Int J Cosmetic Sci.* 1987; 9: 255–259.

De Rigal J, Leveque JL. In vivo measurement of stratum corneum elasticity. *Bioeng Skin.* 1985; 1: 13-23.

Distante F, Berardesca E. U: Berardesca E, Elsner P, Wilhelm KP, Maibach HI. (Eds). *Bioengineering of the Skin: Methods and Instrumentation.* CRC Press. Boca Raton. 1995; pp. 5-11.

Dobrev H. Use of Cutometer to assess epideram hydration. *Skin Res Technol.* 2000; 6: 239-244.

Draelos ZD. An evaluation of prescription device moisturizers. *J Cosmet Dermatol.* 2009; 8: 40-43.

Draelos ZD. Active agents in common skin care products. *Plast Reconstr Surg.* 2010; 125 (2): 719–724.

Draelos ZD. α -Hydroxy acids, β -hydroxy acids and other topical agents. *Dermatol Ther.* 2000; 13: 154-158.

Durairaj R, Ekere NN, Salam B. Thixotropy flow behavior of solder and conductive adhesive pastes. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 2004; 15: 677–683.

Ecclestone GM. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. *Colloid Surface A.* 1997; 123-124: 169-82.

ECVAM, 2009. Skinethic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Dostupno sa: <[http://ecvam.jrc.it/ft_doc/SkinEthic_RHE_SOP%20 INVITTOX%202.0. pdf](http://ecvam.jrc.it/ft_doc/SkinEthic_RHE_SOP%20INVITTOX%202.0.pdf)>.

ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Statement, 2008. Statement on the Scientific Validity of in-vitro Tests for Skin Irritation Testing. ESAC 29th Meeting, 4–5th November 2008. Dostupno sa: <<http://ecvam.jrc.it/index.htm>>.

ElGammal C, Pagnoni A, Kligman AM, ElGammal S. A model to assess the efficacy of moisturizers: the quantification of soapinduced xerosis by image analysis of adhesive-coated discs (D-Squames(R)). *Clin Exp Dermatol.* 1996; 21: 338–343.

Elias PM. Epidermal lipids, membranes and keratinization. *Int J Dermatol.* 1981; 20: 1–19.

Engelen L, Van Der Bilt A. Oral physiology and texture perception of semisolids. *J Texture Stud.* 2008; 39: 83–113.

European Pharmacopoeia 7th edition, Strasbourg: Council of Europe, 2010.

Fairhust CE, Fuller S, Graz J, Holmes MC. Lyotropic surfactant liquid crystals. U: Demus D, Goodby J, Gray GW, Spiess HW, Vill V. (Eds). *Handbook of liquid crystals.* 3rd vol. Wiley VCH. Weinheim; 1998. pp. 341-392.

Faller C, Bracher M, Dami N, Roguet R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicol in Vitro.* 2002; 16: 557-72.

Fischer TW, Wigger-Alberti W, Elsner P. Assessment of dry skin: current bioengineering methods and test designs. *Skin Pharmacol Physiol.* 2001; 14: 183-195.

Fluhr JW, Cavallotti C, Berardesca E. Emollients, moisturizers, and keratolytic agents in psoriasis. *Clin Dermatol.* 2008; 26: 380-386.

Fluhr J, Elsner P, Berardesca E, Maibach HI. (Eds). *Bioengineering of the skin: water and the stratum corneum.* London, CRC Press. 2005; pp 97-102.

Fluhr JW, Kuss O, Diepgen T, Lazzerini S, Pelosi A, Gloor M, Berardesca E. Testing for irritation with a multifactorial approach: comparison of eight non-invasive measuring techniques on five different irritation types. *Brit J Dermatol.* 2001; 145: 696–703.

Flynn TC, Petros J, Clark RE, Viehman GE. Dry Skin and Moisturizers. *Clin Dermatol.* 2001; 19: 387-392.

Gallegos C, Franco JM. Rheology of food, cosmetics and pharmaceuticals. *Curr Opin Colloid In.* 1999; 4:288-293.

Ghadially R, Halkier-Sorensen L, Elias PM. Effects of petrolatum on stratum corneum structure and function. *J Am Acad Dermatol.* 1992; 26: 387-96.

- Giacomoni PU, Mammone T, Teri M. Gender-linked differences in human skin. *J Dermatol Sci.* 2009; 55: 144-149.
- Goetz R, El-Aasser M. Dilute Phase Behavior of Cetyl Alcohol, Sodium Lauryl Sulfate, and Water. *Langmuir.* 1990; 6: 132-6.
- Goldsmith K. Note on the rheological properties of elasto-plastic materials. *Br J Appl Phys.* 1950; 1: 107-109.
- Green B, Yu RJ, Van Scott EJ. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. *Clin Dermatol.* 2009; 27: 495-501.
- Green H, Weltmann R. Analysis of the Thixotropy of Pigment- Vehicle Suspensions. *Ind Eng Chem Anal Ed.* 1943; 15: 201-206.
- Harding CR. The stratum corneum. Structure and function in health and disease. *Dermatol Ther.* 2004; 17(1): 6-15.
- Harold JB. Relevance of Cosmeceuticals to the Dermatologic Surgeon. *Dermatol Surg.* 2005; 31: 796-798.
- Heinrich U, Koop U, Leneveu-Duchemin MC, Osterrieder K, Bielfeldt S, Chkarnat C, Degwert J, Häntschel D, Jaspers S, Nissen HP, Rohr M, Schneider G, Tronnier H. Multicentre comparison of skin hydration in terms of physical-, physiological- and product-dependent parameters by the capacitive method (Corneometer CM 825). *Int J Cosmetic Sci.* 2003; 25:45-53.
- Hendriks FM. Mechanical Behaviour of Human Skin In Vivo. Nat. Lab. Unclassified Report 2001/820. ©Koninklijke Philips Electronics.
- Hildebrandt D, Ziegler K, Wollina U. Electrical impedance and transepidermal water loss of healthy human skin under different conditions. *Skin Res Technol.* 1998; 4: 130-134.
- Hoffmann C, Mueller-Goymann CC. Use of artificial skin constructs in permeation studies of clindamycin phosphate. *Pharmazie.* 2005; 60: 350-353.
- Husson F, Le S, Pages JF. Variability of the representation of the variables resulting from PCA in the case of a conventional sensory profile. *Food Qual. Prefer.* 2007; 18: 933-937.
- Idson B. Effect of emulsifiers on skin. *Cosmet Toiletries.* 1991; 106: 43-51.
- Imhof RE, De Jesus MEP, Xiao P, Ciortea LI, Berg EP. Closed-chamber transepidermal water loss measurement: microclimate, calibration and performance. *Int J Cosmetic Sci.* 2009; 31: 97-118.
- Imokawa G, Kuno H, Kawai M. Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator. *J Invest Dermatol.* 1991; 96: 845-851.
- Inoue T, Tsujii K, Okamoto K, Toda K. Differential scanning calorimetric studies on the melting behavior of water in stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 1986; 86: 689-693.

IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed., 1997 http://www.iupac.org/index_to.html.

Jaksic I, Lukic M, Malenovic A, Reichl S, Hoffmann C, Müller-Goymann C, Daniels R, Savic S. Compounding of a topical drug with prospective natural surfactant-stabilized pharmaceutical bases: physicochemical and in vitro/in vivo characterization. A ketoprofen case study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012; 80: 164-175.

Jemec GBE, Serup J. Epidermal hydration and skin mechanics. The relationship between electrical capacitance and the mechanical properties of human skin in vivo. *Acta Derm Venereol.* 1990; 70: 245-247.

Jemec GBE, Wulf HC. The plasticising effect of moisturisers on human skin in vivo: a measure of moisturizing potency? *Skin Res Technol.* 1998; 4: 88-93.

Junginger HE. Colloidal structures of O/W creams. *Pharm Weekblad.* 1984; 6: 141-149.

Junginger H, Fuhrer C, Ziegenmeyer J, Friberg S. Strukturuntersuchungen von Salbe Mitteilung: Strukturuntersuchungen an der wasserhaltigen Hydrophielen Salbe DAB 7. *J Soc Cosmet Chem.* 1979; 30: 9-23.

Junginger HE. Pharmaceutical emulsions and creams. U: Sjöblom J. (Ed). *Emulsions – A Fundamental and Practical Approach.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands 1992; pp. 189-205.

Kasting GB, Barai ND. Equilibrium water sorption in human stratum corneum. *J Pharm Sci.* 2003; 92: 1624-1631.

Kemp ES, Hollowood T, Hort J. (Eds). *Sensory Evaluation: A Practical Handbook.* 2009. Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Ltd, Publication, UK.

Kilcast D, Clegg S. Sensory perception of creaminess and its relationship with food structure. *Food Qual Prefer.* 2002; 13: 609-623.

Kligman AM. Why cosmeceuticals. *Cosmet Toiletries.* 1993; 108: 37-38.

Kligman AM. Perspectives on bioengineering of the skin. U: Serup J, Jemec GBE (Eds). *Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin.* CRC Press, Boca Raton. 1995; pp 9-16.

Koehl L, Zeng X, Zhou B, Ding Y. Intelligent sensory evaluation: Concepts, implementations and applications. *Math Comput Simulat.* 2008; 77: 522-530.

Korhonen M, Hellen L, Hirvonen J, Yliruusi J. Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements. *Int J Pharm.* 2005; 197: 143-151.

Kuss O, Diepgen TL. Proper statistical analysis of transepidermal water loss (TEWL) measurements in bioengineering studies. *Contact Dermatitis.* 1998; 32: 64-67.

- Laba D. (Ed). *Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries*. Marcel Dekker, New York. 1993.
- Lazar AP, Lazar P. Dry skin, water, and lubrication. *Dermatol Clin*. 1991; 9: 45–51.
- Lee CH, Moturi V, Lee Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J Control Release*. 2009; 136: 88-98.
- Lemaitre-Aghazarian V, Piccerele P, Reynier JP, Joachim S, Phan-Tan-Lun R, Sergent M. Textural optimization of water-in-oil emulsions. *Pharm Dev Technol*. 2004; 9: 125-134.
- Loden M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of skin barrier disorders. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2003; 4: 771-778.
- Loden M. The clinical benefit of moisturizers. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005; 19: 672–688.
- Loden M, Andersson AC, Andersson C, Frödin T, Öman H, Lindberg M. Instrumental and dermatologist evaluation of the effect of glycerin and urea on dry skin in atopic dermatitis. *Skin Res Technol*. 2001; 7: 209-213.
- Loden M, Lindberg M. Product testing – testing moisturizers. U: Berardesca R, Elsner P, Wilhelm KP, Maibach HI (Eds). *Bioengineering of the Skin: Water and Stratum Corneum*. CRC Press, Boca Raton. 1994; pp. 275-285.
- Loden M, Maibach H (Eds). *Dry Skin and Moisturizers; Chemistry and Function*. CRC Press, New York. 1999.
- Louden JD, Patel HK, Rowe RC. A preliminary examination of the structure of gels and emulsions containing stearylalcohol and cetrimide using laser raman spectroscopy. *Int J Pharm*. 1985; 25: 179-190.
- Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Cekic N, Savic S. A combined approach in characterization of an effective w/o hand cream: the influence of emollient on textural, sensorial and in vivo skin performance. *Int Jour Cosm Sci*. 2012; 34: 140-149.
- Lynde CW. Moisturizers: what they are and how they work. *Skin Ther Lett*. 2001; 6: 3–5.
- Mak VH, Potts RO, GuyRH. Does hydration affect intercellular lipid organization in the stratum corneum? *Pharmaceut Res*. 1991; 8(8): 1064-1065.
- Makai M, Csányi E, Németh Zs, Pálinkás J, Erős I, Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *Int J Pharm*. 2003; 256: 95-107.
- Mao-Qiang M, Brown BE, Wu-Pong S, Feinglod KR, Elias PM. Exogenous non-physiologic vs physiologic lipids. Divergent mechanisms for correction of permeability barrier dysfunction. *Arch Dermatol*. 1995; 131: 809–816.
- Marquez AM, Wagner JR. Rheology of double (w/o/w) emulsions prepared with soybean milk and fortified with calcium. *J Texture Stud*. 2010; 41: 651-671.

- Marks R. The stratum corneum barrier: the final frontier. *J. Nutr.* 2004; 134: 2017S–2021S.
- Marty JP. NMF and cosmetology of cutaneous moisturisation. *Ann Dermatol Venereol.* 2002; 129: 131–136.
- Masmoudi H, Ledreane Y, Piccerelle P, Kister J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int J Pharm.* 2009; 289: 117-131.
- Matarasso SL, Salman SM, Glogau RG, Rogers GS. The role of chemical peeling in the treatment of photodamaged skin. *J Dermatol Surg Oncol* 1990; 16: 945–54.
- Mehling A, Hensen H, Comparative studies on the irritation potential of surfactants. *Exog Dermatol.* 2004; 3: 191-200.
- Mewis J, Wagner NJ. Thixotropy. *Adv Colloid Interface Sci.* 2009; 147-148: 214-227.
- Millikan LE. Cosmetology, Cosmetics, Cosmeceuticals: Definitions and Regulations. *Clin Dermatol.* 2001; 19: 371–374.
- Moddarsi M, Tamburic S, Williams S, Jones SA, Zhao Y, Brown MB. Effects of lipid nanocarriers on the performance of topical vehicles in vivo. *J Cosmet Dermatol.* 2009; 8: 136-143.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
- Murray BC, Wickett RR. Sensitivity of Cutometer data to stratum corneum hydration level. A preliminary study. *Skin Res Technol.* 1996; 2: 167–172.
- Naik A, Kalia YN, Pirot F, Guy RH. Characterization of molecular transport across human stratum corneum in vivo. U: Bronaugh RL, Maibach HI. (Eds.), *Percutaneous Absorption 3rd edn*, New York, MerceL Dekker Inc. 1999: pp. 149-175.
- Nakano K, Horiuchi K, Soneda T, Kashimoto A, Tsuchiya R, Yokoyama M. A neural network approach to predict tactile comfort of applying cosmetic foundation, *Tribol. Int.* 2010; 43: 1978-1990.
- Nemeth Z, Halasz L, Palinkas J, Bota A, Horanyi T. Rheological behaviour of a lamellar liquid crystalline surfactant-water system. *Colloid Surface A.* 1998; 145: 107-119.
- OECD, 2008. OECD Guideline for the testing of chemicals, draft proposal for a new guideline: In vitro skin irritation: human skin model test. Dostupno sa: <http://www.oecd.org/searchResult/0,3400,en-2649-201185-1-1-1-1,00.html>; (pristupljeno 22. 07. 2013).
- Pantelic I, Lukic M, Markovic B, Lusiana, Hoffmann C, Müller-Goymann C, Milic J, Daniels R, Savic S. Development of a prospective isopropyl alcohol-loaded pharmaceutical base using simultaneous in vitro/in vivo characterization methods

of skin performance. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013 (in press). doi: 10.3109/03639045.2013.794827 (IF 1,539/2012)

Parente ME, Ares G, Manzoni AV. Application of two consumer profiling techniques to cosmetic emulsions. *J Sens Stud.* 2010; 25: 685-705.

Parente ME, Gambaro A, Solana G. Study of sensory properties of emollients used in cosmetics and their correlation with physicochemical properties. *J Cosmet Sci.* 2005; 56: 175-182.

Park EK, Song KW. Rheological evaluation of petroleum jelly as a base material in ointment and cream formulations: Steady shear flow behavior. *Arch Pharm Res.* 2010; 33: 141-150.

Patel HK, Rowe RC, McMahon J, Stewart RF. A systematic microscopical examination of gels and emulsions containing cetrimide and cetostearylalcohol. *Int J Pharm.* 1985; 25: 13-25.

Patravale VB, Mandawgade SD. Novel cosmetic delivery systems: an application update. *Int J Cosmetic Sci.* 2008; 30: 19-33.

Pedersen LK, Jemec GBE. Plasticising effect of water and glycerin on human skin in vivo. *J Dermatol Sci.* 1999; 19: 48-52.

Peramal VL, Tamburic S, Craig DQM. Characterization of the variation in the physical properties of commercial creams using thermogravimetric analysis and rheology. *Int J Pharm.* 1997; 155: 91-98.

Piérard GE. EEMCO guidance for the assessment of skin colour. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1998; 10: 1-11.

Pons-Guiraud A. Dry skin in dermatology: a complex physiopathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007; 21(2): 1-4.

Pravilnik o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljati u promet, Službeni list SFRJ br. 26/83, 61/84, 56/86, 50/89 i 18/91.

Quintana JM, Califano AN, Zaritzky NE, Partal P, Franco JM. Linear and nonlinear viscoelastic behavior of oil-in-water emulsions stabilized with polysaccharides. *J Texture Stud.* 2002; 33: 215-236.

Ramos-E-Silva M. Hydroxy Acids and Retinoids in Cosmetics. *Clin Dermatol.* 2001; 19: 460-466.

Rawlings AV. Trends in stratum corneum biology and the management of dry skin. *International Journal of Cosmetic Science.* 2003; 25: 63-95.

Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther.* 2004; 17(1): 43-48.

Rawlings AV, Canestrari DA, Dobrowski B. Moisturizer technology versus clinical performance. *Dermatol Ther.* 2006; 17: 49-56.

Rawlings AV, Matts PJ. Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. *J Invest Dermatol.* 2005; 124: 1099-1110.

REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30 November 2009 on cosmetic products.

Rieger MM. Stability testing of macroemulsions. *Cosmet Toiletries.* 1991; 106: 59-67.

Rogiers V. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl.* 2001; 14: 117-128.

Rogrigues L. EEMCO guidance to the in vivo assessment of tensile functional properties of the skin. Part 2: instrumentation and test modes. *Skin Pharmacol Appl.* 2001; 14: 52-62.

Roy AK, Hart JR, Thakkar AJ. Clusters of glycolic acid and 16 water molecules. *Chemical Physics Letters.* 2007; 434: 176-181.

Sala G, Van Aken GA, Stuart MAC, Ven De Velde F. Effect of droplet-matrix interactions on large deformation properties of emulsion-filled gels. *J Texture Stud.* 2007; 38: 511-535.

Savić S. Fizičko-hemijski aspekti i in vitro/in vivo karakterizacija emulzionih sistema sa nejonskim emulgatorom tipa šećernog etra. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu. 2004.

Savic S, Vuleta G, Daniels R, Müller-Goyman C. Colloidal microstructure of binary systems and model creams stabilized with alypolyglucoside non-ionic emulsifier. *Colloid Polym Sci.* 2005; 283: 439-51.

Savic S, Weber C, Tamburic S, Savic M, Müller-Goyman C. Topical Vehicles Based on Natural Surfactant/Fatty Alcohols Mixed Emulsifier: The Influence of Two Polyols on the Colloidal Structure and In Vitro/In Vivo Skin Performance. *J Pharm Sci.* 2009; 98: 2073-90.

Savic S, Lukic M, Jaksic I, Reichl S, Tamburic S, Müller-Goyman C. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: The influence of colloidal structure on emulsion hydration potential. *J Colloid Interface Sci.* 2011; 358: 182-91.

Schlangen LJM, Brokken D, Kemenade PM. Correlations between small aperture skin suction parameters: statistical analysis and mechanical model. *Skin Res Dermatol.* 2003; 9: 122-130.

Schwarz E, Pfeffer S. Use of subambient DSC for liquid and semisolid dosage forms Pharmaceutical product development and quality control. *J Thermal Anal Calorim.* 1997; 48: 557-67.

Seidenari S, Francomano M, Mantovani L. Baseline biophysical parameters in subjects with sensitive skin. *Contact Dermatitis.* 1998; 38:311-315.

- Seppic, Francuska, Katalog – Montanov™ 202, 2001.
- Siddig MA, Radiman S, Jan LS, Muniandy SV. Rheological behaviors of the hexagonal and lamellar phases of glucopone (APG) surfactant. *Colloid Surface A*. 2006; 276: 15-21.
- Siewert M, Dressman J, Brown CK, Shah VP. FIP/AAPS Guidelines to Dissolution/in Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2003; 4: 1-10.
- Smith HR, Rowson M, Basketter DA, McFadden JP. Intra-individual variation of irritant threshold and relationship to transepidermal water loss measurement of skin irritation. *Contact Dermatitis*. 2004; 51:26–29.
- Sotoodian B, Maibach HI. Noninvasive test methods for epidermal barrier function. *Clin Dermatol*. 2012; 30: 301–310.
- Stone H, Sidel JL. (Eds) *Sensory Evaluation Practices*. 2004. Academic Press. New York.
- Stubenrauch C. Sugar surfactants - aggregation, interfacial and adsorption phenomena. *Cur Opin Colloid Interf Sci*. 2001; 6: 160-70.
- Szczesniak AS. Objective measurements of food texture. *Journal Food Science*. 1963; 28: 410-420.
- Szczesniak AS, Brandt MA, Friedman H. Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and the sensory methods of texture evaluation. *Journal Food Science*. 1963; 28: 397-403.
- Tadros TF. Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloid Surface A*. 1994; 91: 39-55.
- Tadros T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Adv Colloid Interface Sci*. 2004; 108-109: 227-258.
- Tadros TF. *Applied Surfactants – Principles and Applications*. Wiley VHC. Weinheim. 2005.
- Trapp M. Is there room for improvement in the emollients for adjuvant therapy? *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007; 21 (2): 14-18.
- Van Scott EJ, Yu RJ. Control of keratinization with the alpha hydroxy acids and related compounds. *Arch Dermatol*. 1974; 110: 586–90.
- Van Scott EJ, Yu RJ. Alpha hydroxy acids: procedures for use in clinical practice. *Cutis*. 1989; 43 :222–8.
- Vasiljević D, Savić S, Đorđević Lj, Krajišnik D. *Priručnik iz kozmetologije, drugo izdanje*, Nauka, Beograd. 2009.

- Vazquez-Araujo L, Verdu A, Murcia R, Burlo F, Carbonell-Barrachina AA. Instrumental texture of a typical Spanish confectionery product Xixona Turrón as affected by commercial category and manufacturing company. *J. Texture Stud.* 2006; 37: 63-79.
- Verdier-Sevrain S, Bonte F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol.* 2007; 6: 75-82.
- Vinardell MP, Mitjans M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *J Pharm Sci.* 2008; 97: 46-59.
- Vuleta G, Milić J, Primorac M, Savić S. *Farmaceutska tehnologija I, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Beograd.* 2012.
- Wang S, Kislalioglu MS, Breue M. The effect of rheological properties of experimental moisturizing creams/lotions on their efficacy and perceptual attributes. *J Cosmet Sci.* 1999; 21: 167-188.
- Wang X, Ujihara M, Imae T, Ishikubo A, Sugiyama Y, Okamoto T. Characterization of mimetic lipid mixtures of stratum corneum. *Colloid Surface B.* 2010; 78: 92-100.
- Wallach D. The field of cosmetic dermatology: the need for a patient-centred approach. *J Cosmet Dermatol.* 2002; 1; 137-141.
- Wenninger JA, Canterbury RC, McEwen GN, Jr. (Eds). *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, Vol. 2, 8th edn.* The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Washington, DC. 2000; pp 1767-1785.
- Wieschers JW. (Re)Formulating within REACH with Formulating from First Principles. *Cosmetics & Toiletries.* 2007; 122: 63-72.
- Wigger-Alberti W, Elsner P. Barrier creams and emollients. U: Kanerva L, Elsner P, Wahlberg JE, Maibach HI. (Eds), *Handbook of occupational dermatology.* Berlin Heidelberg New York, Springer. 2000; pp 490-496.
- Winkler A, Muller-Goymann CC. Comparative permeation studies of delta-aminolevulinic acid and its n-butylester through stratum corneum and artificial skin constructs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002; 53: 281-287.
- Wortel VAL, Wiechers JW. Skin sensory performance of individual personal care ingredients and marketed personal care products. *Food Qual. Prefer.* 2000; 11: 121-127.
- Wu Y, Wang X, Zhou Y, Tan Y, Chen D, Chen Y, Ye M. Correlation between stinging, TEWL and capacitance. *Skin Res Technol.* 2003; 9:90-93.
- Yu RJ, Van Scott EJ. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. *J Cosmet Dermatol.* 2004; 3: 76-87.
- Yu RJ, Van Scott EJ. Bioavailability of alpha-hydroxy acids in topical formulations. *Cosmet Dermatol.* 1996; 9: 954-62.

Yu RJ, Van Scott EJ. α -Hydroxyacids, polyhydroxyacids, aldobionic acids and their topical action. U: Baran R, Maibach HI. (Eds.). Textbook of cosmetic dermatology. Taylor and Francis, UK. 2005; pp 77-94.

Zeng X, Ruan D, Koehl L. Intelligent sensory evaluation: Concepts, implementations and applications. Math Comput. Simulat. 2008; 77: 443-452.

Zetzl A, Ollivon M, Marangoni A. A Coupled Differential Scanning Calorimetry and X-ray Study of the Mesomorphic Phases of Monostearin and Stearic Acid in Water. Cryst Growth Des. 2009; 9: 3928-3933.

7. PRILOZI

7. 1. Publikovani i saopštteni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima – M22:

Lukic M, Pantelic I, Daniels R, Müller-Goyman C. C, Savic M, Savic S. Moisturizing emulsion systems based on the novel long-chain alkyl polyglucoside emulsifier: the contribution of thermoanalytical methods to the formulation development. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2013; 111 (3): 2045-2057 doi: 10.1007/s10973-012-2263-0.

Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Dokic LJ, Savic S. Effect of small change in oil phase composition on rheological and textural properties of w/o emulsion. Journal of Texture Studies. 2013; 44: 34–44; doi:10.1111/j.1745-4603.2012.00363.x

Rad u međunarodnom časopisu – M 23:

Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Cekic N, Savic S. A combined approach in characterization of an effective w/o hand cream: the influence of emollient on textural, sensorial and in vivo skin performance. International Journal of Cosmetic Science. 2012; 34 (2): 140-149; doi: 10.1111/j.1468-2494.2011.00693.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini – M33:

Lukić M, Jakšić I, Savić S. Razvoj optimalne formulacije dermokozmetičke emulzije za suhu kožu na bazi novog alkil poliglukozidnog emulgatora. II Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem, 17-20.11.2011. Banja Luka, Zbornik radova, str. 225-228.

Lukic M, Jaksic I, Krajisnik D, Vuleta G, Savic S. Correlation of rheological and sensory properties and their comparison with in vivo effects of W/O emulsions for

dry skin; 5th World Congress on Emulsions 12-14 Oct. 2010; Lyon, France; CD ROM

Saopštenje sa međunarodnih skupova štampana u izvodu – M34:

Lukic M, Pantelic I, Milic J, Vuleta G, Savic S. Potential of C20/C22 Alkyl Polyglucoside Surfactant to Create Stable Emulsions in the Presence of Alcohol and an Acidic Cosmetic Active. 9th World Surfactant Congress and Business Convention (CESIO), Barcelona, Spain, 10-12 June 2013, P14

Lukic M, Pantelic I, Cekic N, Krstonosic V, Milic J, Savic S. A preformulation study on a novel alkyl polyglucoside emulsifier: Rheological and textural performance of the emulsion systems. Skin and Formulation 4th Symposium, APGI, Lyon, France; 2012: Book of abstracts, N° 012.

M. Lukic, I. Jaksic, R. Daniels, S. Savic. A C20/22 Alkyl Polyglucoside-Based Emulsion Vehicles: Adjusting of colloidal structure for better skin performance; Skin Forum 12th Annual Meeting; 2011, Frankfurt, Nemačka; CD

M. Lukic, I. Jaksic, R. Daniels, G. Vuleta, S. Savic. Natural Surfactant of Alkyl Polyglucoside Type: A Physicochemical Characterization of New Mixed Emulsifier; 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology; Graz 2010; Sci Pharm 2010; 78:719; doi: 10.3797/scipharm.cespt.8.POT04

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu – M64:

Milica Lukić, Ivana Jakšić, Gordana Vuleta, Snežana Savić. Efikasnost kozmetičkih proizvoda – koje efekte je moguće ispitati i kako?; V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem; Arhiv za farmaciju 5/2010: 730-731

Milica Lukić, Ivana Jakšić, Gordana Vuleta, Snežana Savić. Formulisanje V/U emulzije za negu suve kože: optimalne reološke i senzorijske karakteristike; V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem; Arhiv za farmaciju 5/2010: 784-785

Tehničko rešenje novi tehnološki postupak – M83:

Snežana Savić, Jela Milić, Milica Lukić, Ivana Jakšić, Mirjana Rajić, Katarina Jončić-Savić, Gordana Vuleta. Razvoj formulacije podloge na bazi prirodnog emulgatora alkil poliglukozidnog tipa za ex tempore izradu magistralnih lekova; 2009 – 2010; U okviru projekta TR 19058 koje finansira Ministarstvo nauke i tehnološkog razvoja.

Usmena izlaganja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima:

Lukić M, Pantelić I, Daniels R, Vuleta G, Savić S. Alkil poliglukozidni emulgator dugog lanca: nova generacija stabilizatora sistema za dermalnu isporuku. 50. savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, 14-15.06.2012. godine; Zbornik radova i CD-ROM, str. 80-85

7. 2. Biografija autora

Milica Lukić je rođena 1979. godine u Somboru. U Beogradu je završila osnovnu školu i XIII beogradsku gimnaziju. Farmaceutski fakultet je upisala školske 1998/1999. godine, a diplomirala je u junu 2004. godine sa prosečnom ocenom 8,77 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Nakon završenog jednogodišnjeg staža na Vojnomedicinskoj akademiji i dve godine rada u apoteci školske 2007/2008. godine upisala je doktorske akademske studije iz Kozmetologije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu.

Od oktobra 2007. godine zaposlena je kao saradnik u nastavi na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, a kao asistent od oktobra 2009. godine kada je izabrana u ovo zvanje. Učestvuje u izvođenju i organizaciji praktične nastave u okviru integrisanih akademskih studija iz predmeta Farmaceutska tehnologija I, Farmaceutska tehnologija II, Kozmetologija i Osnovi farmaceutske biotehnologije.

Od 2008 do kraja 2010. godine učestvuje kao saradnik na projektu tehnološkog razvoja pod nazivom „Razvoj i karakterizacija koloidnih nosača za antiinflamatorne lekove“ (TR-19058), a od 2011. godine na projektu tehnološkog razvoja „Razvoj mikro- i nanosistema kao nosača za lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju“ (TR-34031).

7. 3. Izjava o autorstvu

Potpisana: Milica Lukić

Broj indeksa: 01/07

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Formulaciona istraživanja dermokozmetičkih emulzija za vlaženje kože: koncept
uporedne reološke, teksturne i senzorne procene

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18. 08. 2014. godine



7. 4. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora: Milica Lukić

Broj indeksa: 01/07

Studijski program: Doktorske akademske studije iz Kozmetologije

Naslov rada: Formulaciona istraživanja dermokokozmetičkih emulzija za vlaženje kože: koncept uporedne reološke, teksturne i senzorne procene

Mentor: prof. dr. Snežana Savić

Potpisana: Milica Lukić


Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18. 08. 2014. godine



7. 5. Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Formulaciona istraživanja dermokozmetičkih emulzija za vlaženje kože: koncept uporedne reološke, teksturne i senzorne procene

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade

4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo - bez prerade

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18. 08. 2014. godine

