

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Radava R. Martić

EMULZIJE ULJE U VODI KOJE PODLEŽU
BRZOJ INVERZIJI FAZA NA KOŽI:
STABILNOST, KOLOIDNA STRUKTURA I
PRIMENA KAO NOSAČA
FOTOPROTEKTIVNIH SUPSTANCI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2016.

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Radava R. Martić

EMULZIJE ULJE U VODI KOJE PODLEŽU
BRZOJ INVERZIJI FAZA NA KOŽI:
STABILNOST, KOLOIDNA STRUKTURA I
PRIMENA KAO NOSAČA
FOTOPROTEKTIVNIH SUPSTANCI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Radava R. Martić

**FAST INVERTED OIL-IN-WATER
EMULSIONS: STABILITY, COLLOIDAL
STRUCTURE AND APPLICATION AS A
VEHICLE FOR PHOTOPROTECTIVE
SUBSTANCES**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2016.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutski fakultet.

MENTOR

Dr Jela Milić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. _____
Dr Danina Krajišnik, docent,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

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

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

4. _____
Dr Nebojša Cekić, vanredni profesor,
Univerzitet u Nišu – Tehnološki fakultet, Leskovac

Datum odbrane: _____

Najiskrenije se zahvaljujem mentoru *prof. dr Jeli Milić* na bezrezervnoj podršci i pomoći tokom izbora teme, kao i na velikom razumevanju, savetima, smernicama i poverenju koje mi je ukazala tokom svih faza izrade disertacije.

Posebno se zahvaljujem *doc. dr Danini Krajišnik* na razumevanju, ličnom angažovanju i neizmernoj pomoći koju mi je pružila u toku svih faza eksperimentalnog rada, kao i na dragocenim savetima i sugestijama tokom pisanja stručnih radova i same disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem *prof. dr Snežani Savić* na nesebičnoj pomoći i angažovanju u realizaciji dela eksperimentalnog rada na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard Karls Univerziteta u Tübingenu i na stručnim savetima i korisnim sugestijama kojima je značajno unapređen kvalitet objavljenih publikacija i same disertacije.

Zahvaljujem se *prof. dr Gordani Vuleta* na stručnim savetima i sugestijama koji su doprineli konačnom uobličavanju disertacije.

Prof. dr Nebojši Cekiću se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći u početnoj i završnoj fazi rada.

Veliku zahvalnost dugujem *prof. dr Petru Jovančiću* sa Katedre za tekstilno inženjerstvo Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, *prof. dr Anđeliji Malenović* i kolegini *Jeleni Čolović*, *studentu doktorskih studija*, sa Katedre za analitiku lekova Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, za pomoć u realizaciji dela eksperimentalnog rada i sugestijama u tumačenju dobijenih rezultata.

Iskreno se zahvaljujem svim kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, koji su na različite načine doprineli izradi ove doktorske disertacije. Posebno se zahvaljujem *doc. dr Ivani Pantelić*, *doc. dr. Milici Lukić*, *doc. dr Bojanu Čaliji* i *studentu doktorskih studija Saneli Dorđević* na ličnom angažovanju u realizaciji dela eksperimentalnog rada i pomoći pri tumačenju dobijenih rezultata.

Zahvaljujem se *prof. dr Radi Pjanović*, rukovodiocu Istraživačko-razvojnog centra Beohemija poslovnog sistema u kome sam zaposlena, *g. Predragu Lučiću*, kao i svim kolegama, na velikom razumevanju i podršci koju su mi pružili pri izradi ove disertacije.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici posebno roditeljima, bratu i suprugy za pruženu bezgraničnu ljubav, razumevanje i podršku u svakom trenutku mog školovanja.

Emulzije ulje u vodi koje podležu brznoj inverziji faza na koži: stabilnost, koloidna struktura i primena kao nosača fotoprotektivnih supstanci

SAŽETAK

Uvod Emulzije, ulje u vodi (u/v) i voda u ulju (v/u), su veoma zastupljene u kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima. Oba tipa emulzija imaju specifične karakteristike koje definišu njihovu upotrebu. U cilju dobijanja emulzija koje imaju najbolje karakteristike emulzija tipa u/v i v/u, razvijene su *SWOP* (engl. *SWitch-Oil-Phase*) emulzije. Ove emulzije su metastabilne emulzije tipa u/v koje podležu brznoj inverziji faza, u emulzije tipa v/u prilikom primene mehaničke energije tokom razmazivanja na koži. *SWOP* emulzije nastaju kombinacijom odgovarajućih emulgatora tipa v/u, anjonskih surfaktanata i polimernih stabilizatora, ali njihovo formiranje kao i sposobnost inverzije faza tokom primene na koži nisu dovoljno objašnjeni u poznatim radovima o ovim emulzijama. One formiraju lipofilni film na koži mnogo brže od emulzija tipa u/v i zbog toga su pogodne kao vehikulumi/nosači u proizvodima za zaštitu od ultravioletnog (UV) zračenja i za bolju raspoloživost aktivnih supstanci. Primena proizvoda sa antioksidansima na koži predstavlja veoma dobar način za podršku endogenog zaštitnog sistema kože i može biti dobra strategija za smanjenje oksidativnog oštećenja u koži do kojih dovodi UV zračenje. Flavonoidi, prečišćeni ili prisutni u biljnim ekstraktima, su grupa biljnih polifenolnih jedinjenja, koji se dugo koriste u kozmetičkim proizvodima zbog svojih mnogobrojnih, korisnih karakteristika. Flavonoid dihidrokvercetin (DHK) je snažan antioksidans koji deluje slično α -tokoferolu i pokazuje apsorpcionu aktivnost u širokom spektru UV zračenja, pa se može koristiti za smanjenje oštećenja u koži do kojih dovodi UV zračenje. Ove karakteristike DHK ga čine supstancom interesantnom za buduća ispitivanja, posebno u kombinaciji sa klasičnim UV filterima inkorporiranim u *SWOP* emulziju kao nosač.

Cilj Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je bio da se izvrši sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija nove grupe emulzionih sistema tipa u/v, baziranih na *SWOP* tehnologiji, za koje je karakteristično da tokom primene na koži podležu inverziji faza i prelaze u emulzije tipa v/u. Planirano je da se ispita stabilizacioni potencijal emulgatorskog sistema baziranog na prirodnom nejonskom emulgatoru tipa gliceril estara

masnih kiselina (INCI: *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate*) i blagom anjonskom surfaktantu iz nove generacije alkilpoliglukozida (APG) (INCI: *Sodium Lauryl Glucose Carboxylate, Lauryl Glucoside*), kao i da se sagleda koloidna struktura ovog emulzionog sistema u cilju boljeg razumevanja koncepta brze inverzije faza *SWOP* emulzija u kontaktu sa površinom kože (uticaj sastava, znoja, temperature kože). Nakon sveobuhvatne karakterizacije pripremljenih uzoraka *SWOP* emulzije, dodatno, u uzorak sa optimalnim karakteristikama cilj je inkorporirati odabranu/model kozmetički aktivnu supstancu (KAS) prirodnog porekla dihidrokvercetin (INCI: *Dihydroquercetin*) u cilju procene pogodnosti *SWOP* emulzije kao nosača za ovu KAS i ispoljavanje fotoprotektivnog potencijala (zaštita od UVA i UVB zračenja).

Metode Eksperimentalni rad bio je podeljen u tri faze: 1) formulisane su emulzije tipa u/v sa nejonskim emulgatorom i anjonskim surfaktantom u odnosu 4:1,5 neophodnim za građenje *SWOP* emulzija uz variranje komponenti masne faze i polimernog stabilizatora kako bi se ispitao njihov uticaj na stabilnost emulzionog sistema i odabrala optimalna formulacija. Dodatno, formulisane su i poredbene emulzije tipa u/v i v/u sa odgovarajućim emulgatorima i sa kvalitativno i kvantitativno identičnim komponentama masne faze. Na pripremljenim emulzijama (*SWOP* i poredbene emulzije), u cilju ispitivanja stabilnosti sistema i poređenja odabranih formulacija, primenjena je sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija (organoleptička procena, mikroskopska analiza, određivanje pH i električne provodljivosti, test centrifugiranja, reološka karakterizacija, ubrzani test starenja). 2) Da bi se ispitala osobina odabrane optimalne formulacije da se invertuje u određenom vremenskom periodu, primenjena je metoda zasnovana na merenju kontaktnog ugla. Dodatno, za ispitivanje koloidne strukture i razumevanje mehanizma inverzije faza izabrane optimalne formulacije primenom polarizacione mikroskopije i termalne analize, pripremljene su serije binarnih sistema i emulzija (jednostavnijeg sastava) izabrane optimalne formulacije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u radi poređenja. Na izabranoj optimalnoj formulaciji i poredbenim emulzijama tipa u/v i v/u urađena je detaljna reološka karakterizacija pod različitim uslovima: u prisustvu jona, pri razblaženju emulzija sa prečišćenom vodom i pri povišenoj temperaturi (32 °C) i senzorna studija kako bi se uspostavila korelacija između reološkog ponašanja i senzornih osobina izabrane optimalne formulacije. 3) ispitivanje mogućnosti inkorporiranja kozmetički aktivne supstance dihidrokvercetina (DHK) u izabrane

emulzione nosače, sprovedeno je ispitivanjem fizičko-hemijske stabilnosti uzoraka primenom mikroskopske analize, određivanjem pH vrednosti i električne provodljivosti, reološke, termalne analize i reverzno fazne tečne hromatografije visokih performansi, tj. *RP-HPLC* analize. Određivanje potencijala DHK u izabranoj optimalnoj formulaciji, kao nosaču za zaštitu od UV zračenja sprovedeno je određivanjem faktora zaštite od UVB i UVA zračenja (engl. *sun protection factor – SPF* i *UVA protection factor – UVA-PF*) primenom spektrofotometrijske metode. Procena preliminarne efikasnosti i bezbednosnog profila izabrane optimalne formulacije sprovedena je primenom tehnika bioinženjeringa kože.

Rezultati Tokom formulisanja *SWOP* emulzija, na osnovu fizičko-hemijske karakterizacije, utvrđeno je da je pored kombinacije nejonskog emulgatora i anjonskog surfaktanta za stabilnost emulzije neophodno i prisustvo polimernog ugušćivača natrijum poliakrilata. Ispitivanjem stabilnosti *SWOP* emulzije u uslovima prirodnog i ubranog starenja potvrđena je njena stabilnost i u toku dužeg vremena čuvanja. Primenom metode zasnovane na merenju kontaktnog ugla potvrđeno je specifično ponašanje *SWOP* emulzije i brza inverzija faza nakon njene primene na koži. Tom prilikom, izmereni su kontaktni uglovi veći od 30°, što je dovoljna potvrda vodootpornosti *SWOP* emulzije. Primenom mikroskopske analize i termalnih analiza dobijen je dublji uvid u koloidnu strukturu *SWOP* emulzije. Formiranjem diskontinuiranog sloja, koji čine emulgator i surfaktant, oko vode gelirane polimerom omogućeno je brže narušavanje gel strukture prilikom primene *SWOP* emulzije na kožu, kao i znatno brže isparavanje vode u odnosu na poredbenu emulziju tipa u/v. Kontinualna reološka analiza ukazala je na nenjutnovski tip tečenja sa umerenom tiksotropijom kod *SWOP* emulzije, dok je oscilatorna reološka analiza ukazala na njeno dominantno elastično ponašanje u oblasti primenjenih frekvencija. Reološki parametri *SWOP* emulzije dobijeni reološkim merenjem pod specifičnim uslovima i analizirani rezultati (ANOVA) senzorne studije potvrdili su sličnost između *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v. Rezultati većine odabranih senzornih atributa su u saglasnosti sa rezultatima reoloških ispitivanja. Ispitivanja (određivanje pH vrednosti i električne provodljivosti, test centrifugiranja, mikroskopska analiza, reološka kontinualna analiza, termalna analiza) sprovedena na uzorcima *SWOP* emulzije sa inkorporiranom aktivnom supstancom (0,5% m/m DHK) ukazala su na zadovoljavajuću fizičko-hemijsku stabilnost u toku prirodnog starenja od 60 dana.

Međutim, ispitivanja koja su obuhvatila određivanje električne provodljivosti i reološku kontinualnu analizu sprovedenu na uzorcima *SWOP* emulzije sa inkorporiranom aktivnom supstancom nakon prirodnog starenja od godinu dana ukazala su na nestabilnost ispitivanog sistema. Dodatno, analizom sadržaja aktivne supstance DHK u *SWOP* emulziji potvrđeno je njeno smanjenje u toku vremena (godinu dana), dok je zabeležen porast sadržaja njenog oksidacionog proizvoda kvercetina. Rezultati *in vivo* studije performansi ukazali su na bolji hidratacioni potencijal *SWOP* emulzije i *SWOP* emulzije sa DHK u odnosu na poredbenu emulziju tipa u/v, na njen zadovoljavajući preliminarni iritacioni potencijal, kao i na inverziju faza koja se odvija prilikom njene primene na koži. *In vitro* određene vrednosti *SPF* i *UVA-PF* za *SWOP* emulziju sa 5% m/m DHK ukazale su na fotoprotektivnu aktivnost uzoraka ispitivanih emulzija sa DHK, pri čemu je dobijen *UVA-PF/SPF* odnos viši od 0,33 pa se DHK može razmatrati kao potencijalni UVA i UVB filter. Dodatno, na osnovu *UVA-PF* vrednosti *SWOP* emulzije sa inkorporiranim DHK (5% m/m) i UV filterom – homosalom (8% m/m) primećen je sinergistički efekat homosala i DHK, koji se ogleda u višoj vrednosti *UVA-PF*.

Zaključak Kombinacija nejonskog emulgatora tipa v/u sa anjonskim surfaktantom u odnosu 4:1,5 kao i prisustvo polimernog ugušćivača natrijum poliakrilata neophodni su za formiranje *SWOP* emulzije, njenu stabilnost i specifičnu koloidnu strukturu kojom se objašnjava njeno karakteristično ponašanje praćeno brзом inverzijom faza na koži tokom primene. Zaključeno je da zbog osobine brze inverzije faza *SWOP* emulzija pokazuje zadovoljavajuću vodootpornost, što je čini pogodnim vehikulumom za proizvode za zaštitu od UV zračenja. Većina senzornih atributa *SWOP* emulzije može se predvideti reološkim merenjima pod normalnim i specifičnim uslovima (temperatura kože, prisustvo jona), što se može iskoristiti pri formulisanju novih ili unapređenju postojećih *SWOP* emulzija i podešavanju njenih aplikativnih osobina. Dobar hidratacioni potencijal *SWOP* emulzije sa kozmetički aktivnom supstancom, zadovoljavajući preliminarni iritacioni potencijal, uz njenu specifičnu osobinu brze inverzije faza, čine ovu emulziju pogodnim vehikulumom za kozmetičke proizvode različite namene. Visoke vrednosti, *in vitro* određenih, *SPF* i *UVA-PF* *SWOP* emulzije sa DHK ili iste emulzije sa kombinacijom DHK i dozvoljenog UV filtera (homosalat) svrstavaju DHK u potencijalne UV filtere sa mogućnošću sinergističkog delovanja pri kombinovanju sa drugim dozvoljenim UV filterima. Ipak, nestabilnost DHK, kao što je podložnost oksidaciji, može biti

ograničavajući faktor, jer sama *SWOP* emulzija nije dovoljna zaštita za takve supstance, pa se javlja potreba za uvođenjem drugih sastojaka što vodi ka formulisanju emulzija složenijeg sastava.

Ključne reči: *SWOP* (engl. *Switch-Oil-Phase*) emulzije, inverzija faza, koloidna struktura, merenje kontaktnog ugla, vodootpornost emulzije, dihidrokvercetin, *in vitro* određivanje *SPF* i *UVA-PF*

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Kozmetologija

UDK broj: 615.451.3 : 543.061(043.3)

Fast inverted oil-in-water emulsions: stability, colloidal structure and application as a vehicle for photoprotective substances

ABSTRACT

Introduction Emulsions (oil-in-water (o/w) and water-in-oil (w/o)) are widely used in cosmetic and pharmaceutical formulations and both types of emulsions have specific characteristics that determine their application. To obtain emulsions that would have the best characteristic of both w/o and o/w emulsions, recently so-called *SWOP* (*SWitch-Oil-Phase*) emulsions have been introduced as an alternative. *SWOP* emulsions are metastable o/w emulsions that invert into w/o emulsions on application of mechanical energy while rubbing it onto the skin. These emulsions are formed by a combination of appropriate w/o emulsifiers, anionic surfactants and polymeric stabilizers but their formation and its ability to invert into a w/o emulsion during application on the skin is not sufficiently explained in known works related to *SWOP* emulsions. They form a lipophilic layer on the skin much faster than o/w emulsions and due to their properties, are especially suitable as a carrier in sun-protection products and for better availability of the active ingredients. Topical administration of antioxidants provides an efficient way to enrich the endogenous cutaneous protection system and thus may be a successful strategy for diminishing ultraviolet radiation-mediated oxidative damage in the skin. Flavonoids, a group of plant polyphenolic compounds, are extensively used in cosmetics because of their many possible beneficial properties. The flavonoid dihydroquercetin (INCI: *Dihydroquercetin* - DHQ) acts as a powerful antioxidant similarly to α -tocopherol and shows absorption activity over a wide range of ultraviolet (UV) spectrum, it may be used for diminishing skin damage caused by UV radiation. These properties of DHQ indicate that this substance could be interesting for further investigation, especially in combination with other UV filters incorporated into *SWOP* emulsion as a carrier.

Aim The aim of this work was to perform a comprehensive physicochemical characterization of new class o/w emulsions based on *SWOP* technology, that invert into w/o emulsions during application on the skin. This mean to investigate the stabilization potential of the emulsion system that is based on a natural non-ionic emulsifier from the group of polyglycerol esters (INCI: *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate*) and mild

anionic surfactant from the group of new generation of alkyl polyglucosydes (APG) (INCI: *Sodium Lauryl Glucose Carboxylate, Lauryl Glucoside*), and to examine the colloidal structure of the emulsion system with the aim to better understand the concept of fast phase inversion of *SWOP* emulsions in contact with the skin surface. Additionally, the aim of investigation was to incorporate model cosmetic active ingredient of natural origin, dihydroquercetin into *SWOP* emulsion with optimal characteristics and to evaluate the suitability of *SWOP* emulsion as a carrier for this cosmetic active ingredient and their expression of photoprotective potential (UVA and UVB protection).

Methods Experimental work was organized in three phases: 1) the o/w emulsions with non-ionic emulsifier and anionic surfactant in the ratio 4:1.5 essential for *SWOP* emulsion formation were formulated. The variation of the fatty phase components and polymeric stabilizers were performed in order to study their influence on the stability of the emulsion system, and to select the optimal formulations of *SWOP* emulsion for further investigation. Additionally, o/w and w/o reference emulsions with a suitable emulsifiers and with qualitatively and quantitatively identical components of the fatty phase were formulated. A comprehensive physicochemical characterization (organoleptic assessment, microscopic analysis, pH and conductivity measurements, centrifugation test, rheological measurement, cyclic temperature stress test) was performed on the prepared emulsions samples with a purpose to investigate their stability and to compare them. 2) Contact angle measurement was carried out in order to investigate the property of *SWOP* emulsion to invert into w/o emulsion on the skin within a certain period of time. Additionally, series of *SWOP*, o/w and w/o binary systems and emulsions were prepared in order to investigate and compare their colloidal structure and to understand phase inversion mechanism of *SWOP* emulsion by using polarization microscopy and thermal analysis. A detailed rheological characterization under specific conditions: in the presence of ions, in dilution, at an elevated temperature (skin temperature) and sensory studies were performed for the *SWOP* and o/w and w/o reference emulsions, in order to establish a correlation between the rheological behavior and sensory properties of the *SWOP* emulsion. 3) The possibility of incorporating cosmetic active substances dihydroquercetin was conducted by investigation of physicochemical stability of the samples, by using microscopic analysis, pH and conductivity measurements, rheological, thermal and *RP-HPLC* analysis. The potential of DHQ incorporated into *SWOP* emulsion

as a carrier for protection against UV radiation was conducted by spectrophotometry and by determining of sun protection factor - *SPF* and UVA protection factor - *UVA-PF*. Evaluation of the preliminary efficacy and safety profile of the *SWOP* emulsion was carried out using bioengineering techniques.

Results After physicochemical characterization of different formulation of *SWOP* emulsion it was found that in addition to a combination of non-ionic emulsifiers and anionic surfactant for emulsion stability, the presence of polymer thickener sodium polyacrylate is essential. The long-term stability of *SWOP* emulsion was confirmed by real time and accelerated stability testing, while specific property of *SWOP* emulsion and its fast phase inversion during application on the skin were confirmed by contact angle measurements. The measured contact angles were higher than 30°, which was a good indication of *SWOP* emulsion waterproofness. Deeper insight into the colloidal structure of *SWOP* emulsion was obtained using microscopic and thermal analysis. The emulsifier and surfactant together forming a discontinuous layer around the water gelled by polymer which enabled faster destruction of gel structures and much faster evaporation of water in comparison to the reference o/w emulsion during application of the *SWOP* emulsion on the skin. Continual rheological measurements of *SWOP* emulsion indicated the non-Newtonian flow behavior with moderate thixotropy, while the oscillatory rheological measurements indicated its elastic behavior predominantly in the field of applied frequencies. Rheological parameters of *SWOP* emulsion obtained by rheological measurements under specific conditions and analyzed results of sensory studies (by ANOVA) confirmed a certain similarity of *SWOP* emulsion and reference o/w emulsion. Results of analysis of most sensory attributes were in accordance with the results of rheological measurements. Tests (pH and conductivity measurements, centrifugation test, continuous rheological measurements, microscopic and thermal analysis) performed on the samples of *SWOP* emulsion with incorporated active ingredient (0.5% w/w DHQ) pointed to the satisfactory physicochemical stability in real time testing during 60 days. Additionally, analyzing the content of the active ingredient DHQ in *SWOP* emulsion, it was found that the content of DHQ was decreasing over time, while there was an increase in the content of its oxidation product quercetin. Results from *in vivo* performance study indicated better hydration potential of the *SWOP* emulsion and *SWOP* emulsion with DHQ in comparison to the reference o/w emulsion, satisfactory preliminary irritation

potential, and phase inversion that occurs after its application on the skin. *In vitro* determined *SPF* and *UVA-PF* values of the *SWOP* emulsion with 5% w/w DHQ pointed out the photoprotection activity of the active substance, whereby the *UVA-PF/SPF* ratio was higher than 0.33 and consequently, the DHQ can be considered as a wide range UV filter. In addition, on the basis of *UVA-PF* value of *SWOP* emulsion with incorporated DHQ (5% w/w) and UV filter homosalate (8% w/w) it was observed the synergistic effect of homosalate and DHQ.

Conclusion The combination of non-ionic w/o emulsifier with anionic surfactant in the ratio 4:1.5 and the presence of polymer thickener sodium polyacrylate are essential for the formation of *SWOP* emulsions, its stability, and the specific colloidal structure that explains its characteristic behavior followed by fast phase inversion on the skin during application. It was concluded that due to fast phase inversion, *SWOP* emulsion exhibiting satisfactory waterproofness, which makes this emulsion a suitable vehicle for sun protection products. Mostly, sensory attributes of *SWOP* emulsion may be predicted by rheological measurements under normal and specific conditions (skin temperature, the presence of ions), which can be used for the formulation of new or improving old *SWOP* emulsions and for adjusting of its application features. A high hydration potential of *SWOP* emulsion with active ingredient, satisfactory preliminary irritation potential alongside with its specific feature of fast phase inversion make this emulsion a suitable vehicle for cosmetic products for various purposes. High, *in vitro* determined *SPF* and *UVA-PF* values of *SWOP* emulsions with active ingredient DHQ and with the combination of DHQ and UV filter homosalate classified DHQ as a potential UV filters with the possibility of synergistic effects in combination with other known UV filters. However, the instability of the active substance such as the susceptibility to oxidation can be a limiting factor, because the *SWOP* emulsion is not efficient for the protection of such a substance, and there arises the need for introduction of other substances and formulation of more complex *SWOP* emulsion.

Keywords: *SWOP* (*SWitch-Oil-Phase*) emulsion, phase inversion, colloidal structure, contact angle measurements, waterproofness of emulsion, dihydroquercetin, *in vitro SPF* and *UVA-PF* determination

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Cosmetology

UDC: 615.451.3 : 543.061(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Emulzije kao kozmetički vehikulumi/nosači kozmetički aktivnih supstanci	1
1.1.1. <i>SWitch-Oil-Phase (SWOP)</i> emulzije	5
1.1.1.1. Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate (INCI).....	7
1.1.1.2. Sodium Lauryl Glucose Carboxylate & Lauryl Glucoside (INCI)	8
1.1.1.3. Sodium Polyacrylate (INCI).....	10
1.1.1.4. Metode za karakterizaciju <i>SWOP</i> emulzija.....	11
1.2. Sunčevo (solarno) zračenje	16
1.2.1. Spektar solarnog zračenja.....	16
1.2.2. Koža i UV zračenje.....	18
1.2.3. Negativni efekti UV zračenja na ljude	22
1.2.4. Molekularni medijatori UV indukovanog eritema i inflamacije	25
1.2.5. Citokini i UV inflamatorni odgovor	26
1.2.6. Signalni putevi i UV indukovana inflamacija	28
1.2.7. Neposredne mete UV indukovanog inflamatornog odgovora.....	28
1.2.8. Povezanost UV zračenja i kancera kože.....	29
1.2.9. Pozitivni efekti UV zračenja na ljude.....	32
1.2.10. Kozmetički aktivne supstance sa fotoprotektivnim efektom.....	34
1.2.10.1. Dihidrokvercetin.....	43
1.3. Ispitivanje kozmetičkih proizvoda.....	46
1.3.1. Senzorna analiza kozmetičkih proizvoda	47
1.3.2. <i>In vivo</i> ispitivanje efikasnosti kozmetičkih proizvoda tipa emulzija.....	49
1.3.3. <i>In vitro</i> određivanje <i>SPF</i> i <i>UVA-PF</i> kozmetičkih proizvoda za zaštitu od UV zračenja.....	51
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	55
3. EKSPERIMENTALNI DEO	59
3.1. Materijali i metode.....	59
3.1.1. Materijali	59
3.1.2. Metode i oprema.....	62

3.1.2.1.	Formulacija i fizičko-hemijska karakterizacija <i>SWOP</i> emulzija i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u	62
3.1.2.1.1.	Izrada <i>SWOP</i> emulzija	65
3.1.2.1.2.	Preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti <i>SWOP</i> emulzija.....	66
3.1.2.1.3.	Izrada poredbenih emulzija tipa u/v i v/u.....	68
3.1.2.1.4.	Preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti poredbenih emulzija tipa u/v i v/u	68
3.1.2.1.5.	Procena fizičko-hemijske stabilnosti odabranih formulacija <i>SWOP</i> i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u u dužem vremenskom intervalu.....	69
3.1.2.2.	Merenje kontaktnog ugla, karakterizacija koloidne strukture i uporedna senzorna i reološka analiza izabrane <i>SWOP</i> emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u.....	70
3.1.2.2.1.	Merenje kontaktnog ugla.....	73
3.1.2.2.2.	Izrada binarnih sistema i jednostavnih emulzija	73
3.1.2.2.3.	Fizičko-hemijska karakterizacija binarnih sistema i jednostavnih emulzija.....	74
3.1.2.2.4.	Senzorna procena izabrane <i>SWOP</i> emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u i njihova reološka analiza i određivanje električne provodljivosti pod specifičnim uslovima	75
3.1.2.3.	Određivanje potencijala dihirokvercetina u <i>SWOP</i> emulziji kao nosaču u zaštiti od UV zračenja sa <i>in vivo</i> preliminarnom procenom efikasnosti i bezbednosnog profila.....	80
3.1.2.3.1.	Izrada <i>SWOP</i> , poredbenih i standardnih emulzija sa dihidrokvercetinom i/ili homosalom.....	83
3.1.2.3.2.	Određivanje sadržaja inkorporirane kozmetički aktivne supstance dihirokvercetina u <i>SWOP</i> emulziji	84
3.1.2.3.3.	<i>In vitro</i> određivanje <i>SPF</i> i <i>UVA-PF</i> pripremljenih emulzija.....	86
3.1.2.3.4.	<i>In vivo</i> preliminarna procena efikasnosti i bezbednosnog profila <i>SWOP</i> emulzija (sa i bez dihidrokvercetina)	87
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	90
4.1.	Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog rada	90
4.1.1.	Formulacija i fizičko-hemijska karakterizacija <i>SWOP</i> emulzija i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u.....	90

4.1.1.1.	Formulacija i preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti <i>SWOP</i> emulzija i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u	90
4.1.1.2.	Procena fizičko-hemijske stabilnosti <i>SWOP</i> emulzija i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u studijom prirodnog starenja.....	95
4.1.1.3.	Procena fizičko-hemijske stabilnosti <i>SWOP</i> emulzija i poredbene emulzije tipa u/v primenom cikličnog temperaturnog stres testa	98
4.2.	Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada	102
4.2.1.	Merenje kontaktnog ugla	102
4.2.2.	Ispitivanje koloidne strukture – distribucije vode u emulzionom sistemu.....	105
4.2.2.1.	Mikroskopska analiza binarnih sistema i jednostavnih emulzija....	105
4.2.2.2.	Termalna analiza binarnih sistema i jednostavnih emulzija.....	109
4.2.2.3.	Reološka analiza i određivanje električne provodljivosti izabrane <i>SWOP</i> emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u pod specifičnim uslovima.....	115
4.2.2.4.	Senzorna analiza izabrane <i>SWOP</i> emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u.....	124
4.3.	Rezultati i diskusija III faze eksperimentalnog rada.....	129
4.3.1.	Inkorporiranje kozmetički aktivne supstance dihidrokvercetina u <i>SWOP</i> emulziju.....	129
4.3.2.	Određivanje sadržaja dihidrokvercetina sa aspekta procene stabilnosti.	144
4.3.3.	<i>In vitro</i> određivanje fotoprotektivnih osobina ispitivanih uzoraka emulzija.....	147
4.3.4.	<i>In vivo</i> preliminarna procena efikasnosti i bezbednosnog profila	149
5.	ZAKLJUČAK	152
6.	LITERATURA.....	158
7.	PRILOZI.....	186
7.1.	Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije	186
7.2.	Biografija autora	186
7.3.	Izjava o autorstvu.....	189
7.4.	Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije....	190
7.5.	Izjava o korišćenju	191

1. UVOD

1.1. Emulzije kao kozmetički vehikulumi/nosači kozmetički aktivnih supstanci

Vehikulum/nosač i kozmetički aktivna supstanca (KAS) čine kozmetički proizvod čija je uloga da neguje i štiti kožu, kosu i/ili nokte (Epstein, 2009). Ovi efekti postižu se delovanjem KAS ili samog vehikuluma na mestu primene na koži. U zavisnosti od sastojaka, kozmetički vehikulumi se koriste kako bi postigli određene efekte na koži (Epstein, 2009; da S. Souza i sar., 2015):

1) čišćenje kože – najučestalija i najstarija upotreba kozmetičkih proizvoda je za čišćenje tela. Danas se, pored sapuna, koriste i mnogi drugi, prefinjeniji, kozmetički proizvodi za čišćenje.

2) ulepšavanje – da bi se postigao prijatan izgled i smanjili nedostaci na licu (boja, oblik) uz nenametljivo naglašavanje i isticanje boljih delova lica koriste se različiti kozmetički proizvodi za ulepšavanje.

3) nega – većina kozmetičkih proizvoda primenjuje se zbog nege kože, kose i noktiju. Primena odgovarajućeg vehikuluma može biti sasvim dovoljna za negu tela.

4) hidratacija – za tretiranje suve kože obično se primenjuju odgovarajući vehikulumi koji sadrže specifične komponente za smanjene transepidermalnog gubitka vode (TEGV), što dovodi do povećanja vlažnosti *stratum corneum*-a (SC) i manifestuje se glatkom površinom kože.

5) zaštita – bitna uloga kozmetičkih nosača je da formiraju zaštitni sloj i tako zaštite kožu od spoljašnjih, potencijalno štetnih faktora (zagađivači vazduha, ultraljubičasto (UV) zračenje).

Kozmetički vehikulumi mogu prenositi KAS do specifičnog mesta delovanja u određenim (dubljim) delovima kože, ali pri tom ne sme doći do bilo kakvog sistemskog, fiziološkog ili farmakološkog efekta, odnosno proizvod mora biti bezbedan (Epstein, 2009).

Među mnogobrojnim formulacijama kozmetičkih proizvoda najzastupljenije su emulzije (Epstein, 2009; Epstein, 2014) i one predstavljaju bazu za proizvode za negu kože u koje se mogu dispergovati/ugraditi i lipofilne i hidrofilne kozmetički aktivne supstance/komponente (Otto i sar., 2009; Epstein, 2014). Razlozi za široku primenu različitih tipova emulzionih sistema su: dobra kompatibilnost sa kožom, mogućnost varijacija konzistencije (od tečnih, preko losiona, mleka do polučvrstih kremova različitog viskoziteta), elegantan izgled i veoma dobra prihvatljivost od korisnika/potrošača.

Emulzije spadaju u klasu disperznih sistema sačinjenih od najmanje dve tečnosti koje se međusobno ne mešaju (Epstein, 2014). Kapi jedne tečnosti (disperzna faza) su dispergovane u tečnom medijumu (kontinualna faza) (Pal, 2011; Tadros, 2013). Da bi se dispergovale dve tečnosti koje se ne mešaju potrebna je i treća komponenta, emulgator (Pal, 2011; Tadros, 2013). Emulgator ima dve osnovne funkcije: 1) da smanji međupovršinski napon između dve faze i 2) da stabilizuje dispergovnu fazu sprečavajući koalescenciju (Pal, 2011). U zavisnosti od prirode emulgatora mogu nastati različite vrste emulzionih sistema. Emulgatori su površinski aktivne materije (surfaktanti) i prema hemijskoj prirodi mogu se podeliti u različite grupe (Epstein, 2014, Tadros, 2013):

1) jonski – anjonski i katjonski za emulzije tipa u/v, osetljivi su na prisustvo elektrolita;

2) nejonski – mogu biti neutralni ili kiseli i koriste se za emulzije tipa ulje u vodi (u/v) ili voda u ulju (v/u), vrše stabilizaciju sprečavajući flokulaciju i koalescenciju;

3) smeše polimera i surfaktanata – koriste se za postizanje jednostavnog emulgovanja i stabilizaciju emulzije;

4) nastala lamelarna tečno kristalna faza – može se formirati upotrebom smeše određenih surfaktanata (mešani emulgatori), i veoma je efikasna u stabilizaciji emulzija;

5) čvrste čestice – nakupljaju se na u/v međupovršini, dobro stabilizuju emulzije, poznate kao *pickering* emulzije, gde su čestice delimično izložene masnoj fazi, a delimično vodenoj fazi.

6) polimerni emulgatori – u poslednje vreme postoji težnja da se smanji količina emulgatora u formulaciji ili da se emulgatori potpuno izostave iz formulacije kako bi se

dodatno smanjio iritacioni potencijal formulacije. Moguće je formulisati emulzije bez klasičnih emulgatora (površinski aktivnih materija – PAM), tzv. „*emulsifier-free*“ emulzije, pomoću derivata umreženog akrilnog polimera (hidrofilni polimeri koji su hidrofobno modifikovani dodatkom alkilnog lanca) ili derivati silikona (Epstein, 2014).

U odnosu na strukturu sistema, emulzije se mogu klasifikovati kao (Epstein, 2009; Tadros, 2013):

1) makroemulzije tipa u/v ili v/u i veličina njihovih kapi je u opsegu od 0,1-5 μm , a najčešće 1-2 μm ;

2) nanoemulzije kod kojih je veličina kapi u opsegu od 20-100 nm. Kao i makroemulzije, nanoemulzije su samo kinetički stabilne;

3) micelarne emulzije ili mikroemulzije sa veličinom kapi u opsegu od 5-50 nm. Ove emulzije su termodinamički stabilne;

4) duple i višestruke emulzije koje predstavljaju emulziju emulzije, voda-ulje-voda (v/u/v) ili ulje-voda-ulje (u/v/u) sistemi;

5) mešane emulzije tj. sistemi koji se sastoje od dve različite disperzne faze koje se ne mešaju u kontinualnoj fazi.

Među kozmetičkim emulzija najzastupljenije su makroemulzije tipa u/v ili v/u. One se razlikuju po tehnološkom postupku izrade kao i po nameni. Tehnološki postupak izrade „klasičnih“/tradicionalnih emulzija tipa v/u sa konvencionalnim emulgatorima uglavnom je složeniji i zahteva više energije, kao i upotrebu stabilizatora. Emulzije tipa v/u sadrže 45 – 80% masne faze (Epstein, 2014) zbog čega su obično masne, teže se utrljavaju i na koži ostavljaju masan i lepljiv film. Međutim, zbog formiranja masnog koherentnog filma na koži, veoma su pogodne za negu suve i/ili starije kože, zaštitu nežne kože beba, negu, zaštitu i lečenje obolele kože (atopijski dermatitis, hiperkeratoze, psorijaza, i druge dermatoze sa suvom kožom), zaštitu kože od UV zračenja. Neki proizvodi dekorativne kozmetike (*make-up* proizvodi) su emulzije tipa v/u sa biranim sastojcima masne faze i odgovarajućim emulgatorom. Pored toga, prednosti emulzija tipa v/u su: sličnost sa prirodnim, zaštitnim lipidnim slojem u SC, održavanje hidratacije kože zbog formiranja semiokluzivne barijere koja smanjuje isparavanje vode iz kože, a dodatno, postepeno se oslobađa voda inkorporirana u unutrašnju fazu emulzije, smanjen

rizik rasta mikroorganizama, odgovarajuće konzistencije i pri niskim temperaturama (nega u zimskim uslovima) i poboljšavaju penetraciju lipofilnih komponenti u lipofilne delove SC (Epstein, 2009). U poslednje vreme sve više raste interesovanje za formulisanje elegantnijih emulzija tipa v/u, a to je moguće postići korišćenjem novih emulgujućih komponenti kao što su emolijensi (estri, Guerbet alkoholi i silikoni) pri čemu je veoma bitno da se uskladi viskozitet emulzije sa molekularnom masom emolijenasa koji se koriste u emulziji (Epstein, 2014). Koemulgatore sa velikom molekulskom masom treba kombinovati sa emolijensima sa velikom molekulskom masom kako bi se dobile stabilnije emulzije tipa v/u. Polarnost emolijenasa takođe je bitna za stabilnost ovih emulzija, dok su anjonski emulgatori neefikasni u stabilizaciji emulzija tipa v/u, jer obično zahtevaju prisustvo efikasnijih PAM (Epstein, 2014). Noviji tipovi v/u emulgatora na tržištu kozmetičkih materijala/sirovina, koji se predlažu za formulacije kozmetičkih emulzija tipa v/u za različite namene su: estri sorbitana i masnih kiselina (sorbitan izostearat, sorbitan stearat, sorbitan oleat), poliglicerol estri (poligliceril-3 ricinoleat, poligliceril-4 oleat, poligliceril-6 oktastearat, heksaglicerol dioleat), metoksi PEG-22/dodecil glikol kopolimer, etri i estri polietilen glikola (PEG-2 stearil etar, cetearat-20, PEG-30 dipolihidroksistearat), itd (Epstein, 2014).

Emulzije tipa u/v obično sadrže 10 – 30% masne faze. Kod emulzija nižeg viskoziteta udeo masne faze se smanjuje na 5 – 15%. Kapi masne faze u emulziji imaju manju gustinu u odnosu na spoljašnju, vodenu fazu, pa je neophodno podesiti da specifične težine ovih faza budu što približnije kako bi se postigla stabilnost emulzije. Postoje dve mogućnosti: 1) dodatak voskova masnoj fazi koji može imati negativan efekat na izgled, teksturu i osećaj prilikom primene proizvoda na kožu, 2) povećanje viskoziteta vodene faze dodatkom prirodnih ugušćivača (alginati, karageni, ksantan) i celuloznih (karboksimetil celuloza) guma (Epstein, 2014). Voda u spoljašnjoj fazi emulzije služi kao rastvarač za KAS koje su rastvorne u vodi (Epstein, 2014). „Klasične“ emulzije tipa u/v, za razliku od tipa v/u, uglavnom su jednostavnije za izradu/proizvodnju i bez velikog utroška energije. Karakteriše ih jednostavnost primene, lako razmazivanje, nemasni film koji zaostaje na koži, efekat hidratacije SC koji stvara spoljašnja vodena faza i efekat hlađenja koji je posledica isparavanja spoljašnje vodene faze (Epstein, 2009). Ovaj tip emulzija pogodan je za negu masne i normalne kože tokom dana. Kozmetičke emulzije tipa u/v mogu se formulisati uz različite emulgatore: konvencionalne anjonske ili

nejonske, mešane emulgatore, polimerne emulgatore, mešane emulgatore koji grade tečno-kristalne gelske faze, itd.

Kao što je navedeno, oba tipa emulzije pokazuju izvesne prednosti, ali i nedostatke.

1.1.1. *SWitch-Oil-Phase (SWOP) emulzije*

Novija klasa emulzija tipa u/v koje podležu brznoj inverziji faza na koži tzv. *SWOP* emulzije, razvijena je sa ciljem da se iskoriste prednosti oba tipa „klasičnih“ makroemulzija (u/v i v/u) i istovremeno izbegnu njihovi nedostaci. Ova vrsta emulzija prvi put je opisana u patentu objavljenom 2008, čiji je podnosilac bila kompanija Cognis (Beuché i sar., 2008), a danas je to BASF (Nemačka). *SWOP* emulzije su metastabilne emulzije tipa u/v koje usled primene mehaničke energije tokom razmazivanja/utrljavanja na koži, prelaze u emulzije tipa v/u. Formiranje lipofilnog sloja na koži, kod ovih emulzija, odvija se znatno brže u odnosu na konvencionalne emulzije tipa u/v (Beuché i sar., 2008).

SWOP emulzije u svom sastavu imaju kombinacije odgovarajućih nejonskih emulgatora tipa v/u sa anjonskim surfaktantima i polimernim stabilizatorima, ali njihovo formiranje kao i sposobnost inverzije faza tokom primene na koži nisu dovoljno objašnjeni u poznatim radovima o ovim emulzijama. Predlaže se kombinacija emulgatora tipa v/u (u koncentraciji 1-7%, a optimalno 2-5%) iz grupe nejonskih PAM npr. sorbitan estri ili poliglicerol estri sa anjonskim surfaktantom (u koncentraciji 0,1-5%, a optimalno 0,5-3,5%) koji bi trebalo izabrati iz grupe koja sadrži N-acil amino kiseline (acilglutamati, alk(en)il oligoglukozid karboksilati, alkil poliglikoletar citrati) i odgovarajućim polimernim stabilizatorom (u koncentraciji 0,05-1,5%, a optimalno 0,5-1%) iz grupe poliakrilata ili polisaharida (Beuché i sar., 2008). *SWOP* emulzije mogu sadržati 10-35% masne faze, a smatra se da su najstabilnije sa 10-30% masne faze. Ova vrsta emulzionih sistema može biti nosač za različite KAS primenjene u koncentraciji 0,1-10% (optimalna koncentracija 0,5-8%). Grupe KAS za koje *SWOP* emulzije mogu da budu pogodni nosači obuhvataju: antioksidanse, pigmente, različite biljne ekstrakte i UV filtere (Beuché i sar., 2008).

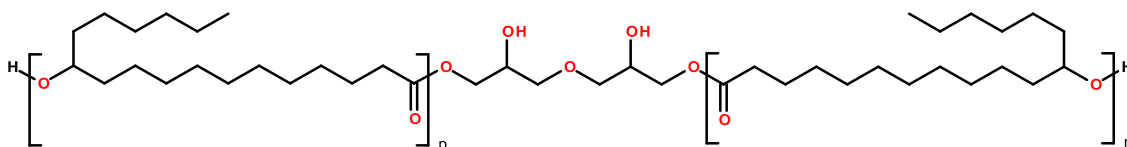
U predlozima model formulacija *SWOP* emulzija, dostupnim u različitim dokumentima proizvođača (BASF), kao emulgatorsko – stabilizatorski sistem najzastupljenija je kombinacija *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate*, emulgatora tipa v/u, i smeše *Sodium Lauryl Glucose Carboxylate & Lauryl Glucoside*, anjonskog surfaktanta tipa u/v, u odnosu 4:1,5, a kao ugušćivač navodi se polimerni stabilizator *Sodium Polyacrylate*, sam ili u kombinaciji sa ksantan gumom.

Izrada *SWOP* emulzija je jednostavna, slična izradi konvencionalnih emulzija tipa u/v, a u zavisnosti od konzistencije komponenti masne i vodene faze, mogu se primeniti različiti postupci emulgovanja, toplo-toplo, toplo-hladno ili hladno-hladno. Kod većine emulzija tipa u/v, tokom izrade, vodena faza se dodaje u masnu fazu i ovaj postupak se može koristiti prilikom izrade *SWOP* emulzija. Međutim, preporuka je da se tokom izrade *SWOP* emulzija masna faza dodaje u vodenu fazu (Beuché i sar., 2008), a razlog su ugušćivači koji su deo vodene faze i dodaju se tokom njene pripreme, zbog čega ona postaje viskozija. Viskozitet pripremljenih *SWOP* emulzija može varirati od veoma niskog (sprej emulzije) do visokog (viskozni kremovi) što se postiže dodatkom modifikatora konzistencije i ugušćivača (Beuché i sar., 2008). Emulzije, kao i mnogi drugi proizvodi za lokalnu/topikalnu primenu, se primenjuju na koži različitih delova tela, pa je neophodno da budu otporne na temperaturne promene i veoma stabilne u dužem vremenskom periodu (Iwata i Shimada, 2012). Bitna karakteristika *SWOP* emulzija je da ostaju stabilne pri odgovarajućim uslovima čuvanja (Beuché i sar., 2008).

Zbog svojih osobina (jednostavna izrada, dobre aplikativne osobine slične tradicionalnim emulzijama tipa u/v, dobra vodootpornost kao kod emulzija tipa v/u, mogućnost izrade stabilnih niskoviskoznih proizvoda pogodnih za raspršivanje, kompatibilnost sa velikim brojem aktivnih supstanci) *SWOP* emulzije su pre svega namenjene za proizvode za zaštitu od UV zračenja, ali se mogu koristiti i za kozmetičke proizvode druge namene, kao i za različite farmaceutske proizvode namenjene suvoj koži (Beuché i sar., 2008).

1.1.1.1. Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate (INCI)

Nejonski emulgator namenjen za emulzije tipa v/u INCI: *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate* na tržištu se može pronaći pod komercijalnim nazivom Dehymuls® PGPH (proizvođača BASF, Nemačka). Prema podacima iz dokumentacije proizvođača kozmetičkih sirovina, ovaj emulgator koristi se za pripremu niskoviskoznih emulzija tipa v/u, dok u kombinaciji sa drugim emulgatorima/koemulgatorima tipa v/u Lameform® TGI (INCI: *Polyglyceryl-3 Diisostearate*) i/ili Monomuls® 90-O 18 (INCI: *Glyceryl Oleate*) gradi kremove tipa v/u koji mogu sadržati veći udeo biljnih ulja (Ansmann i sar., 1995). Dehymuls® PGPH je zamućena, viskozna tečnost pa je pogodan i za hladni proces emulgovanja (Ansmann i sar., 1995). Hemijski, to je poliglicerol ester poli-12-hidroksistearinske kiseline (slika 1), biljnog je porekla i ne sadrži grupe etilen oksida (EO) tj. spada u *PEG (polyethyleneglycol) free* emulgatore, zbog čega se smatra da ima bolju podnošljivost od strane kože, odnosno manji iritacioni potencijal (Schliemann i sar., 2013; Bartels i sar., 2014).



Slika 1. Hemijska formula *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate*

Takođe, u stručnim publikacijama mogu se naći podaci o kompatibilnosti ovog emulgatora sa različitim uljima i smešama ulja bez obzira na njihovu molekulsku masu i polarnost (Herzog i sar., 2009; Schliemann i sar., 2013). Primenom ovog emulgatora u relativno niskoj koncentraciji 3-5% i različitih ulja u masnoj fazi mogu se dobiti veoma stabilni losioni tipa v/u dobrih reoloških karakteristika (Ansmann i sar., 1995). Kada se kao masna faza koriste ulja veće molekulske mase, kao i smeše ulja i voskova mogu se dobiti stabilni kremovi (Ansmann i sar., 1995; Meyer i sar., 2005).

Inicijativom australijske komisije za zdravlje i procenu bezbednosti (*National Occupational Health and Safety Commission*) organizacija *National Industrial*

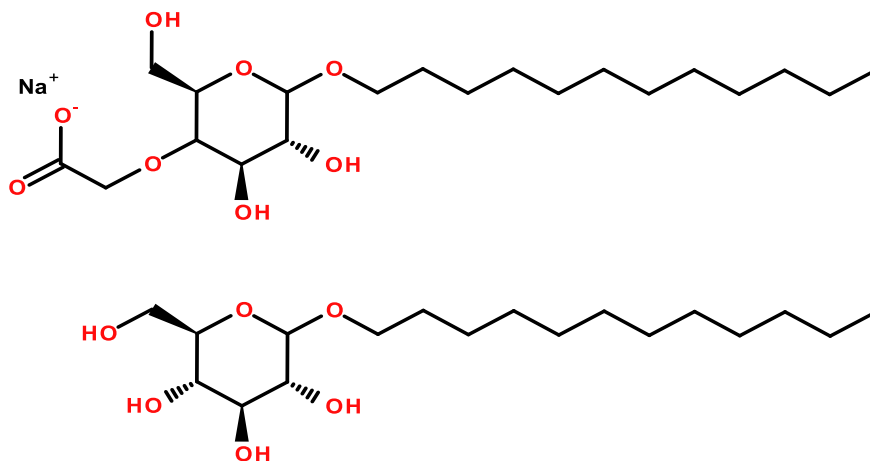
Chemicals Notification And Assessment Scheme (NICNAS) sprovela je procenu bezbednosti *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate* i 2000. godine izdala detaljan izveštaj za javnost (*NICNAS Dehymuls PGPH. Full Public Report, PLC/96, 2000*). U izveštaju je potvrđeno da je *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate* biorazgradiv i da se procesom razgradnje dobijaju voda, metan i ugljendioksid. Toksikološka ispitivanja potvrdila su da je *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate* veoma bezbedan. Ispitivanja na životinjama (zec i zamorac), koja su najvećim delom izvedena do 2000. godine, potvrđuju da čista supstanca dovodi do blagih iritacija oka i slabe senzibilizacije kože životinja, ali nedovoljno da bi bila klasifikovana kao hazard. Na osnovu procene delovanja 20% etanolonog rastvora supstance na koži humanih dobrovoljaca (20) pod okluzijom pokazano je da je Dehymuls® PGPH kompatibilan sa kožom i da se može koristiti kao emulgator u koncentraciji do 10% u kozmetičkim i farmaceutskim formulacijama. Takođe, ispitivanja su potvrdila da Dehymuls® PGPH nije fototoksičan i mutagen kao i da njegovom upotrebom u proizvodima neće doći do zagađenja sredine (*NICNAS Dehymuls PGPH. Full Public Report, PLC/96, 2000*).

1.1.1.2. Sodium Lauryl Glucose Carboxylate, Lauryl Glucoside (INCI)

Anjonski, prirodni surfaktant, smeša dve komponente INCI: *Sodium Lauryl Glucose Carboxylate, Lauryl Glucoside* (slika 2) okarakterisan kao blaga PAM koja dobro peni, spada u alkilpoliglukozide nove generacije, a na tržištu se može pronaći pod komercijalnim nazivom Plantapon® LGC Sorb (proizvođača BASF, Nemačka). Prema preporuci proizvođača Plantapon® LGC Sorb može se koristiti kao primarni blagi surfaktant u svim proizvodima koji se spiraju, a posebno je pogodan za formulacije bez sulfata (engl. *sulfate free cleansing concepts*), formulacije za bebe, proizvode za pranje osetljive kože i kože podložne aknama, vlažne maramice sa blagim surfaktantima, kao i za proizvode za čišćenje lica koji sadrže salicilnu kiselinu.

Ova PAM može da formira znatnu količinu pene (Oldenhove de Guertechin, 2009) koja se, po volumenu i nastalim sitnim mehurićima, može uporediti sa penom koju daje natrijum lauretsulfat (engl. *Sodium Laureth Sulfate - SLES*) i kokamidopropil betain.

S druge strane, *Sodium Lauryl Glucose Carboxylate*, *Lauryl Glucoside* ne sadrži grupe EO i spada u *PEG free* surfaktante.



Slika 2. Hemijska formula *Sodium Lauryl Glucose Carboxylate* i *Lauryl Glucoside*

Ispitivanja sprovedena *in vitro* u cilju procene iritacionog potencijala za sluzokožu i kožu ukazala su da Plantapon® LGC Sorb pokazuje manji iritacioni potencijal za oko od *SLES* i svrstava se među surfaktante sa slabim iritacionim potencijalom, ali je svrstan i u hazarde (Mehling i sar., 2007).

Pored toga, Plantapon® LGC Sorb je stabilan pri niskim vrednostima pH, pa je pogodan za formulacije koje sadrže KAS za čiju stabilnost i delovanje je potreban niži pH (Abels i sar., 2014). Preporuka je da se Plantapon® LGC Sorb koristi u formulacijama u kojima je pH vrednost veća od 3,5 (Cognis. Customer Information, 2004).

Plantapon® LGC Sorb je dostupan u obliku bistre tečnosti, koja sadrži do 34% PAM i do 67% vode. Utvrđeno je da Plantapon® LGC Sorb ne dovodi do senzibilizacije kože, da nije mutagen, kancerogen i teratogen (*NICNAS* Chemical in Plantapon LGC, Full Public Report, File No: STD/1186, July 10, 2006).

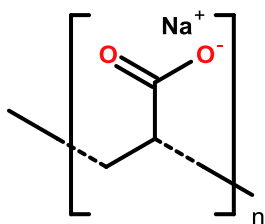
Spada u kategoriju biorazgradivih materija i lako se rastvara u vodi. Preporuka proizvođača kozmetičkih sirovina je da se kao primarni surfaktant koristi u koncentraciji 15-45%, a kao sekundarni surfaktan u koncentraciji 3-15%. Nalazi se na listi

supstanci/proizvoda koje je odobrio ECOCERT (organizacija za izdavanje sertifikata za organske materije) (BASF. Products Approved or Certified by ECOCERT for Natural and Organic Cosmetics, 2014).

Plantapon® LGC Sorb je bitna komponenta *SWOP* emulzija, odgovorna za inverziju faza koja se odvija na koži u toku primene *SWOP* emulzija.

1.1.1.3. Sodium Polyacrylate (INCI)

Polimerni ugušćivač (neutralisan) vodene faze natrijum poliakrilat (INCI: *Sodium Polyacrylate*) (slika 3) može se naći na tržištu pod različitim komercijalnim nazivima: Cosmedia® SP (proizvođača BASF, Nemačka), Resil SP (proizvođača Res Pharma, Italija), Rapitix® A-100 (proizvođača Ashland Specialty Chemical, SAD). Pored njegove glavne osobine da ugušćuje vodenu fazu, natrijum poliakrilat je i polimerni emulgator i stabilizator (Medina-Torres i sar., 2014). Prema podacima iz stručne literature sa natrijum poliakrilatom može se postići gel krem tekstura odgovarajuće formulacije (Pian i sar., 2002). Pogodan je za izradu „laganih“ (tzv. *light*) emulzionih formulacija koje se lako razmazuju. Kompatibilan je sa različitim uljima, što daje mogućnost izrade formulacija različitog viskoziteta, kao i različitih senzornih osobina. Finoća i elastičnost mreže koju gradi natrijum poliakrilat obezbeđuje stabilnost formulacije u dužem vremenskom periodu. Cosmedia® SP je praškaste konzistencije i sadrži minimum 88% suve materije. Koristi se u opsegu pH 5-12, pri čemu je pH 1% vodenog rastvora natrijum poliakrilata između 6 i 7 (Pian i sar., 2002). Formiranje mreže odvija se na pH između 4 i 6, a efekat ugušćivanja emulzija je najjači na pH između 6 i 9, što odgovara većini kozmetičkih proizvoda (Medina-Torres i sar., 2014).



Slika 3. Hemijska formula *Sodium Polyacrylate*

Dokazano je da ne dovodi do iritacije kože i oka, nije mutagen, nema kancerogen, ni teratogen potencijal (*CIR Expert Panel. Final Safety Assessment Crosslinked Alkyl Acrylates as Used in Cosmetics, November 17, 2011.*). Slabo je biodegradabilan, a može se prevesti u biodegradabilan polimer uvođenjem peptida (Vroman i Tighzert, 2009). Cosmedia® SP, prema navodima proizvođača, predstavlja umreženi homopolimer koji u vodi bubri i formira trodimenzionalnu mrežu u koju se može dispergovati nepolarna (masna) faza. Spada u jedan od najefikasnijih emulgjućih polimera, kompatibilan je i sa alkoholom (čak do 35%) i ne menja viskozitet pri izlaganju UV zracima.

Na osnovu preporuka proizvođača kozmetičkih sirovina natrijum poliakrilat se može koristiti u hladnom i toplom postupku emulgovanja. Najčešće se disperguje u vodi gde formira gel, ali se može dispergovati i u polietilenglikolu ili uljima. Cosmedia® SP koristi se kao primarni emulgator u koncentraciji 0,8-1,5%, dok u koncentraciji 0,2-0,5% ima ulogu ugušćivača i stabilizatora. Kompatibilan je sa anjonskim i nejonskim emulgatorima sa EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina), različitim mirisnim kompozicijama i KAS. U prisustvu amfoternih i katjonskih supstanci, hidrosolubilnih UV filtera i veće količine elektrolita može doći do smanjenja viskoziteta (Medina-Torres i sar., 2014). Primenjuje se u velikom broju proizvoda za negu lica i tela, kao i proizvoda za ličnu higijenu koji sadrže veće količine alkohola. Posebno je pogodan za proizvode za zaštitu od UV zračenja jer smanjuje masan osećaj koji izazivaju UV filteri, kao i u proizvodima sa višim zaštitnim faktorom od sunca (engl. *sun protection factor – SPF*), a uz to je kompatibilan sa organskim UV filterima, vodootpornim sredstvima i emolijensima (Pian i sar., 2002).

1.1.1.4. Metode za karakterizaciju SWOP emulzija

Za fizičko-hemijsku karakterizaciju i procenu fizičke stabilnosti SWOP emulzija, kao nove klase emulzija tipa u/v, mogu se primeniti konvencionalne/poznate metode. Međutim, zbog inverzije faza kojoj podležu ove emulzije, pod određenim uslovima, pojedine metode je neophodno modifikovati kako bi se dobili što precizniji rezultati. Sledeće metode koriste se za karakterizaciju SWOP emulzija:

Određivanje pH vrednosti i električne provodljivosti

Ispitivanje pH vrednosti emulzionog sistema jedno je od osnovnih ispitivanja koje se sprovodi u cilju procene prihvatljivosti emulzionog nosača za određenu namenu i stabilnost tog sistema i važan je parametar za ispitivanje kvaliteta kozmetičkog proizvoda. Test električne provodljivosti se koristi za određivanje tipa emulzije i kao jedno od ispitivanja za procenu njene stabilnosti. Prisustvo elektrolita u vodenoj fazi predstavlja osnov za merenje električne provodljivosti i utvrđivanje tipa klasičnih emulzija i distribucije vodene faze u emulzionim sistemima. Vrednosti električne provodljivosti više od 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ukazuju na emulzije tipa u/v, dok vrednosti manje od 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ukazuju na emulzije tipa v/u (Jiang i sar., 2013), jer je uobičajena električna provodljivost masne faze 100 ili 1000 puta niža od provodljivosti vodene faze, a pokretljivost jona je ograničena uljem koje prekida vodenu fazu u emulzionom sistemu (Prieto i Calvo, 2013).

Ciklični temperaturni stres test

Ovaj test se najviše koristi u industriji za predviđanje stabilnosti emulzije u dužem vremenskom intervalu i utvrđivanju roka upotrebe, pri čemu se koriste različiti protokoli. Test se obično sastoji iz 6 ciklusa, pri čemu u jednom ciklusu uzorak emulzije prolazi kroz periode (24 h) zagrevanja na temperaturi do + 45 °C i hlađenja na temperaturi do - 18 °C (COLIPA¹ Guidelines on stability testing of cosmetic products, March 2004; Almeida i Bahia, 2006; Estanqueiro i sar., 2014).

Test centrifugiranja

Poznato je da su makroemulzije termodinamički nestabilni sistemi, koji postoje u metastabilnom stanju. Fizička nestabilnost emulzija ogleda se u pojavi kapljica masne faze na površini sistema tzv. *creaming*, ili sedimentaciji njenih komponenti pod delovanjem sile gravitacije (Dukhin i sar., 2005). U cilju procene fizičke stabilnosti, odnosno otpornosti na spoljašnje faktore kojima emulzioni sistem može biti izložen, primenjuje se test centrifugiranja.

¹ COLIPA je promenila ime u Cosmetics Europe.

Reološka karakterizacija

Reološka karakterizacija emulzija daje uvid u fizičku stabilnost, koloidnu strukturu i interakcije u stresnim uslovima. Reološka ili viskoelastična karakterizacija se obično vrše u cilju kvalitativnog kvantifikovanja protoka materijala za potrebe procene kvaliteta, odnosno mazivosti na koži (Adeyeye i sar., 2002). Razmazivost, tekstura, tvrdoća i osećaj su samo neke od osobina koje su ključne u smislu proizvodnje dobrog proizvoda za tržište. Kontinualna reološka analiza obuhvata merenja viskoziteta i zavisnosti napona smicanja od brzine smicanja. *SWOP* emulzije spadaju u nenjutnovske sisteme koje karakteriše vremenski zavisni tip tečenja sa umerenom tiksotropijom. Pored kontinualne reološke karakterizacije koristi se i oscilatorna reološka karakterizacija kako bi se odredila elastičnost ovih sistema i ispitala njihove viskoelastične osobine.

Merenja kontaktnog ugla i određivanje tačke inverzije

Metoda zasnovana na merenju kontaktnog ugla je značajna u karakterizaciji emulzija, a posebno se može izdvojiti kao značajna u karakterizaciji *SWOP* emulzija. Merenjem promena kontaktnog ugla između kapi vode aplikovanih na kožu tretiranu *SWOP* emulzijom u određenim vremenskim intervalima može se dokazati inverzija faza kod *SWOP* emulzija (Beuché i sar., 2008), ali i njena vodootpornost.

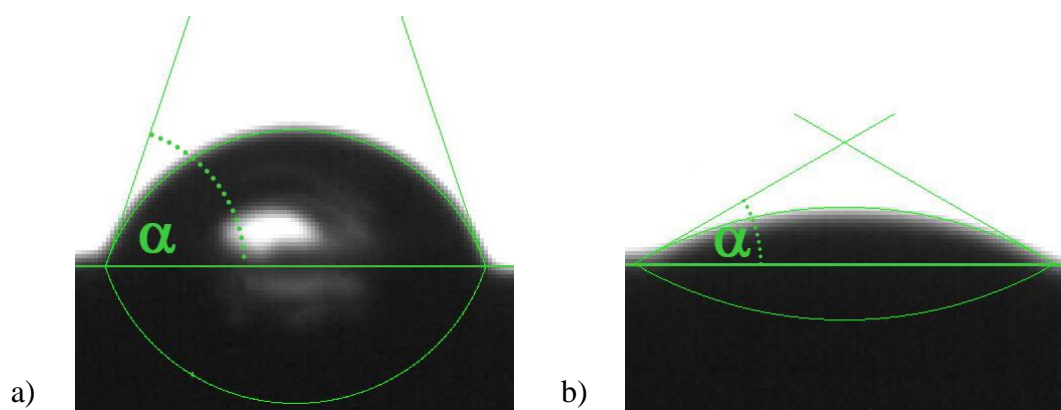
Metoda za određivanje vodootpornosti proizvoda za zaštitu od UV zračenja, koju preporučuje i propisuje *Cosmetics Europe (COLIPA Guidelines for Evaluating Sun Product Water Resistance, December 2005)* je *SPF/imerzija/SPF* metoda. Ona podrazumeva da se na određene delove kože na leđima ispitanika/volontera primeni ispitivani proizvod u količini od 2,0 mg/cm² i ostavi da se osuši 15 do 30 minuta. Nakon toga vrši se određivanje *SPF* na osnovu COLIPA vodiča za određivanje *SPF (COLIPA, CTFA SA, JCIA, CTFA International Sun Protection Factor (SPF) Test Method, May 2006)* pre i nakon dve imerzije od 20 minuta u vodi koja cirkuliše i čija je temperatura 29 ± 2 °C. Posebno za svakog ispitanika/testiran subjekt vrši se preračun procenta zadržavanja vodootpornosti (%WRR_i) pomoću sledeće jednačine:

$$\%WRR_i = \frac{SPF_{iw}-1}{SPF_{is}-1} \times 100,$$

gde je SPF_{iw} individualni SPF nakon potapanja u vodu, a SPF_{is} je individualni SPF pre potapanja u vodu. Srednji procenat zadržavanja vodootpornosti (%WRR) izračunava se kao aritmetička sredina n individualnih procenta zadržavanja vodootpornosti (%WRR_i).

Nedostatak ove metode je što se u proračunu vodootpornosti koriste vrednosti SPF za čije određivanje je neophodno vršiti izlaganje volontera UV zracima i to najmanje dva puta.

In vitro metoda za određivanje vodootpornosti proizvoda za zaštitu od UV zračenja zasnovana je na određivanju kvašenja tretirane kože kao mere vodootpornosti proizvoda za zaštitu od UV zračenja, a izvodi se merenjem kontaktnog ugla (slika 4) između kapi vode aplikovane na kožu tretiranu proizvodom za zaštitu od UV zračenja, pri čemu se formulacije koje daju vrednosti kontaktnog ugla iznad 30° mogu okarakterisati kao vodootporne i dalje se ne moraju testirati prema standardnom *COLIPA* protokolu (Hagens i sar., 2007).

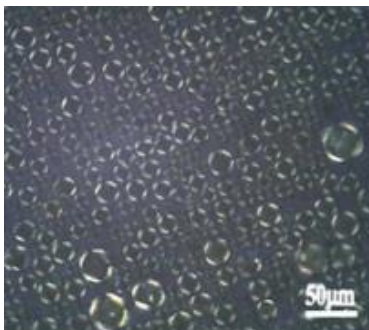


Slika 4. Kontaktni ugao (α) između kapi vode i kože na koju je primenjena emulzija a) vodotporna, slabo kvašenje; b) nije vodootporna, dobro kvašenje

Polarizaciona svetlosna mikroskopija

SWOP emulzije nastaju kombinacijom emulgatora među kojima se nalaze i emulgatori (lauril glukozid i poligliceril-2 dipolihidroksistearat) za koje je poznato da grade fazu tečnih kristala. Tečni kristali imaju osobinu da dvostruko prelamaju polarizacionu svetlost, što se može uočiti pomoću polarizacionog mikroskopa (slika 5). U cilju postizanja uvida u specifičnu koloidnu mikrostrukturu binarnih smeša koju čine

emulgator i faza u kojoj je emulgator rastvoren i emulzionih sistema primenjena je polarizaciona svetlosna mikroskopija.



Slika 5. Mikrografija tečnih kristala na polarizacionom mikroskopu (Zhang i Liu, 2013)

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

DSC je metoda kojom se beleži i analizira toplota koja se oslobađa ili apsorbuje od strane ispitivanog uzorka, poredeći ga sa referentnim uzorkom, u zavisnosti od temperature koja se menja konstantnom brzinom. Zapravo, na ovaj način detektuje se promena entropije (ΔS) ili entalpije (ΔH) u ispitivanom sistemu. Nastale promene dovode do pojave endotermnih ili egzotermnih signala u zavisnosti od toga da li dolazi do utroška energije ili njenog oslobađanja. *DSC* prati fizičke promene materijala koje nastaju pod uticajem temperature kao što su kristalizacija, oksidacija, itd, pa je veoma korisna metoda za procenu stepena kristalizacije, ali i polimorfnih struktura unutar materijala, kao što su voskovi (Matas i sar., 2003). Na osnovu *DSC* merenja promena entalpije u zavisnosti od temperature može se dobiti dublji uvid o raspodeli vode i koloidnoj strukturi emulzionih sistema.

Termogravimetrijska analiza (TGA)

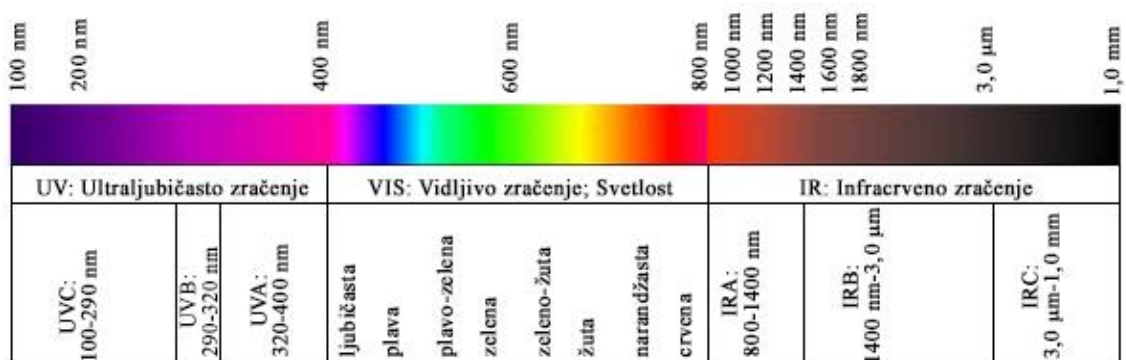
TGA spada u termičke analize kojom se ispituje promena određenih fizičkih parametara sistema usled promene temperature. Posebno, daje preciznije informacije o koloidnoj strukturi emulzija kroz diferencijaciju slobodne (engl. *bulk*) frakcije vode od potencijalno fiksirane, odnosno interlamelarno vezane vode u sistemu. Različite količine energije neophodne su za oslobađanje različito vezanih frakcija vode, što se prikazuje kao gubitak vode u funkciji temperature (Junginger, 1992). U temperaturnom opsegu do 50

°C oslobađa se slobodna „bulk“ voda; opseg 50 °C – 70 °C je bitan za strukture tečnih kristala; i preko 70 °C oslobađa se voda koja je najjače vezana unutar struktura (Junginger, 1992).

1.2. Sunčevo (solarno) zračenje

1.2.1. Spektar solarnog zračenja

Sunce konstantno emituje fotone koji zrače Zemlju (Romanhole *i sar.*, 2015). Fotoni su energetske čestice odnosno „nosači energije“ od kojih je sačinjeno elektromagnetno zračenje (Romanhole *i sar.*, 2015). Sunčeva svetlost se sastoji od kontinuiranog spektra elektromagnetnog zračenja (između 0,1 nm što odgovara gama zracima i 2×10^{13} nm tj. 20 km što odgovara radio talasima (Romanhole *i sar.*, 2015)) koji se u zavisnosti od talasne dužine deli na tri glavne regije: ultraljubičastu (engl. *ultraviolet* – UV), vidljivu i infracrvenu (engl. *infrared* – IR) (Gartland, 2012). Udeo infracrvenog zračenja od ukupnog elektromagnetnog zračenja koje dolazi do Zemlje iznosi 56%, dok vidljivom delu (400 – 780 nm) pripada 39%, a udeo UV zračenja (290 – 400 nm) je svega 5% (Romanhole *i sar.*, 2015). UV zračenje obuhvata talasne dužine od 200 do 400 nm, što predstavlja raspon kraćih talasnih dužina, koje prethodi vidljivom spektru (400 – 700 nm), i infracrvenom spektru (700 nm – 1 mm) (Matsumura i Ananthaswamy, 2004) (slika 6).



Slika 6. Spektar solarnog (sunčevog) zračenja

UV spektar zračenja, u zavisnosti od talasne dužine, se dalje deli na tri oblasti: kratkotalasnu UVC (200 – 290 nm), srednjetalasnu UVB (290 – 320 nm, odnosno po nekim autorima (Dupont i sar., 2013) 280 – 315 nm) i dugotalasnu UVA oblast (320-400 nm, odnosno po nekim autorima (Dupont i sar., 2013) 315 – 400 nm) (Romanhole i sar., 2015) (slika 6), u kojoj se razlikuju UVA2 (320 – 340 nm) i UVA1 oblast (340 – 400 nm) (Tundis i sar., 2015). Na talasnim dužinama manjim od 200 nm nalaze se X-zraci koji zbog isuviše male talasne dužine ne mogu da penetriraju u ljudski organizam (Balogh i sar., 2011; Romanhole i sar., 2015).

Energija koju nosi svaki deo spektra je obrnuto proporcionalna talasnoj dužini, pa tako najviše energije nose zraci UVC oblasti, a najmanje zraci UVA oblasti. Međutim, dubina prodiranja UV zraka u kožu raste sa porastom talasne dužine (Romanhole i sar., 2015). UVC zraci prenose najviše energije i biološki su najštetniji, ali ih efikasno zaustavlja ozonski omotač u stratosferi (apsorbuje ih 100%) (Romanhole i sar., 2015), vodena para, kiseonik i ugljen dioksid, pa je njihova uloga u patogenezi humanih oboljenja minimalna (Matsumura i Ananthaswamy, 2004; Romanhole i sar., 2015). UVA i UVB zračenje dospevaju do površine Zemlje u dovoljnim količinama da mogu da ostvare značajne biološke efekte na koži i očima. Sunčeva svetlost koja dospeva do površine Zemlje sadrži 5% UVB i 95% UVA zraka (IARC, 2012). Dodatno, oštećenja ozonskog omotača nastala pod uticajem klimatskih promena doprinose povećanju količine UVB zraka koji stižu do površine Zemlje, dok nemaju značajan uticaj na količinu UVA zraka (Romanhole i sar., 2015). Pesak, sneg, voda mogu reflektovati do 85% sunčevog zračenja pri čemu se pojačava njihov intenzitet. UV zračenje može da penetrira čak 60 cm duboko u vodu, što takođe predstavlja značajnu izloženost kože ovim zracima tokom aktivnosti u vodi (Pareek, 2014). UVA zračenje je relativno konstantno tokom dana i godine, dok je UVB zračenje većeg intenziteta tokom leta, sredinom dana kao i u oblastima bližim ekvadoru (Balk, 2011;. Pareek 2014). Zraci iz UVB oblasti solarnog spektra se apsorbuju u koži dovodeći do crvenila, solarnog eritema ili opekotina i kancera kože (Romanhole i sar., 2015). U početku, UVA zraci su smatrani bezbednim, a njihova uloga u razvoju opekotina zanemarljiva, međutim izlaganjem normalne kože lampama koje emituju UVA zrake uočeni su efekti slični efektima koje izazivaju UVB zraci (Foster i sar., 2007; Romanhole i sar., 2015), što je podstaklo nova istraživanja o efektima UVA zraka.

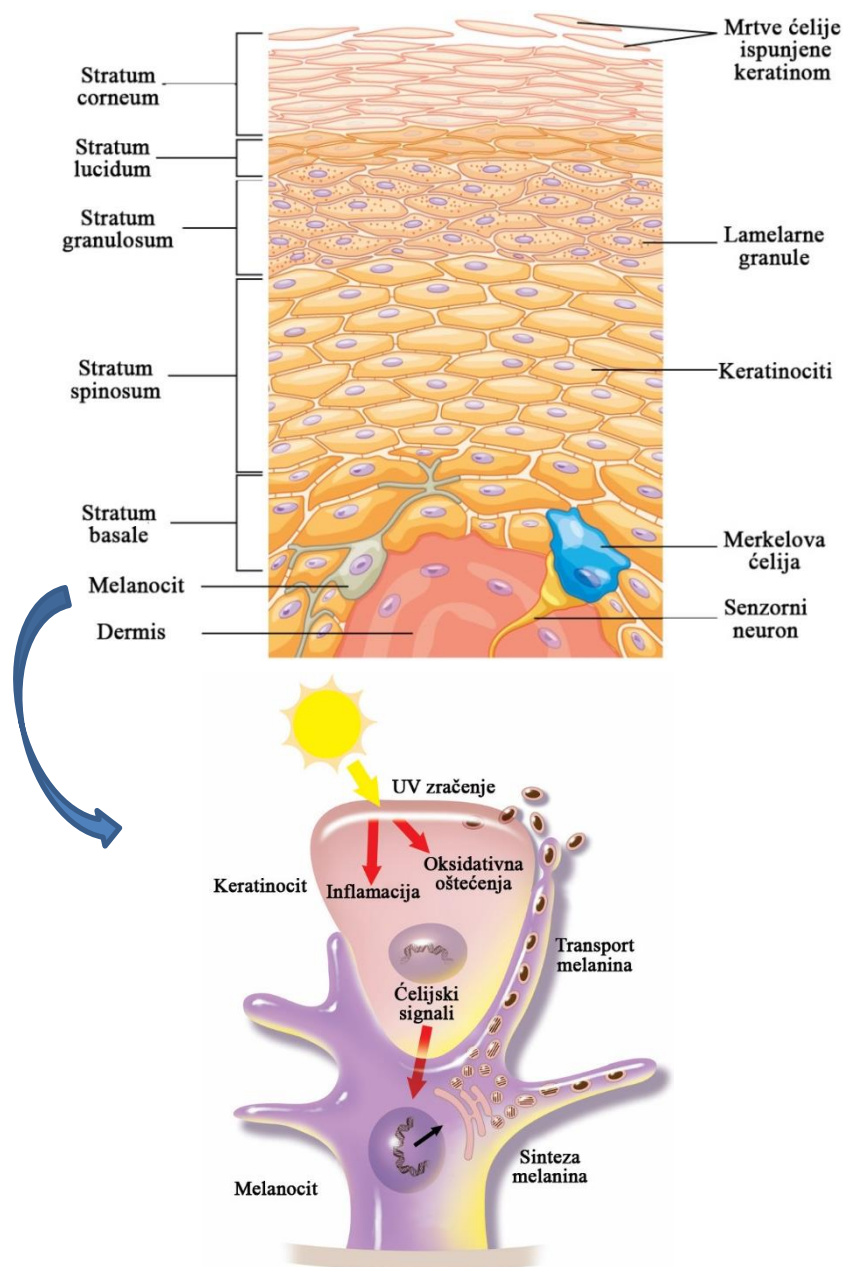
1.2.2. Koža i UV zračenje

Koža je najveći organ u ljudskom organizmu. Njena prosečna masa iznosi oko 4 kg (ili oko 16% ukupne telesne mase), a dostiže površinu do 2 m² (Bensouilah i Buck, 2006, Weller i sar., 2015). Istovremeno ona je složen, metabolički aktivan organ, koji vrši značajne fiziološke funkcije (Bensouilah i Buck, 2006). Dodatno, koža se konstantno menja, jer se ćelije spoljašnjeg sloja kože stalno skidaju („ljušte“), i bivaju zamenjene novim ćelijama koje se pomeraju iz unutrašnjosti kože ka površini (Forslind i Lindberg, 2014). Nju čine tri sloja: epidermis, dermis i hipodermis (Weller i sar., 2015).

Epidermis je spoljašnji sloj kože čija debljina varira od 0,05 mm na očnim kopcima do 0,8-1,5 mm na tabanima i dlanovima, a ima ulogu fizičke i hemijske barijere između spoljašnje sredine i unutrašnjosti tela (Bensouilah i Buck, 2006). Epidermis je stratifikovani skvamozni epitel (Forslind i Lindberg, 2014; Weller i sar., 2015). Najzastupljenije ćelije epidermisa su keratinociti (95% od svih ćelija) (Forslind i Lindberg, 2014) i oni sintetišu protein keratin (8-10 nm) (Forslind i Lindberg, 2014). Pored keratinocita u epidermisu se nalaze i melanociti, Langerhansove (Forslind i Lindberg, 2014) i Merkelove ćelije (Bensouilah i Buck, 2006). Proteinski mostovi koji se nazivaju dezmozomi (Forslind i Lindberg, 2014) povezuju keratinocite, koji su u stalnom kretanju od dubljih slojeva ka površinskim slojevima. U zavisnosti od faze sazrevanja keratina formiraju se i razlikuju četiri sloja epidermisa (Bensouilah i Buck, 2006). Polazeći od unutrašnjih ka spoljašnjim slojevima razlikuju se: *stratum basale* (bazalni ili germinativni sloj ćelija), *stratum spinosum* (sloj „trnastih“ ćelija), *stratum granulosum* (sloj granuliranih ćelija) i *stratum corneum* (rožnati sloj ćelija) (Bensouilah i Buck, 2006) (slika 7).

Melanociti čine mali deo populacije bazalnih ćelija specijalizovanih za proizvodnju pigmenta melanina (Osawa, 2008) (slika 7). Pigment melanin javlja se u dva oblika i to kao više zastupljen eumelanin-braon/crni pigment i manje zastupljen feomelanin-crveni ili žuti pigment (Bensouilah i Buck, 2006). Ove ćelije karakterišu dendritski nastavci koji se protežu između velikog broja susednih keratinocita (Bensouilah i Buck, 2006), ali ne ostvaruju veze sa njima, već preko molekula E-kaderina adheriraju za keratinocite (Haake i sar., 2001). Melanin se sakuplja u melanozomima koji

ga prenose do susjednih keratinocita (Bensouilah i Buck, 2006). Jedan melanocit prenosi melanozome do čak 40 keratinocita („epidermalna jedinica melanina“) (Delevoje, 2014). U unutrašnjim slojevima epidermisa, granule melanina formiraju zaštitini omotač iznad jedara korneocita, dok su u spoljašnjim slojevima ravnomerno raspoređene po unutrašnjosti korneocita (Ando i sar., 2012) (slika 7).



Slika 7. Građa epidermisa i aktivacija melanocita pod dejstvom UV zračenja

Oni sprečavaju oštećenja izazavana UV zračenjem (Weller i sar., 2015) i slobodnim radikalima (Williams, 2003). Melanin apsorbira UV zrake i tako štiti ćelijsko jedro odnosno dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) od oštećenja (slika 7). UV zračenje indukuje proliferaciju keratinocita, što dovodi do zadebljanja epidermisa (Bensouilah i Buck, 2006). Hronično izlaganje sunčevom zračenju povećava broj melanocita u odnosu na keratinocite, pa se više melanocita može naći u koži lica ili spoljašnjeg dela ruku nego u koži donjeg dela leđa ili unutrašnjeg dela ruku (Bensouilah i Buck, 2006; Kumar i Parsad, 2014). Broj melanocita je isti na istim delovima tela kod ljudi bele i crne kože, ali je distribucija i brzina stvaranja melanina različita (Kumar i Parsad, 2014). Prirodno starenje smanjuje populaciju melanocita (Cichorek i sar., 2013).

Koža sadrži sve elemente ćelijskog imuniteta, sa izuzetkom B ćelija (Bensouilah i Buck, 2006). Za njenu imunološku ulogu (tebela 1) bitne su Langerhansove ćelije koje deluju kao antigen-prezentujuće ćelije (Bensouilah i Buck, 2006) i u vezi su sa T limfocitima (Seneschal, 2012). To su dendritske ćelije koje pokazuju imunološku aktivnost i nalaze se u celokupnom epidermisu, ali su najviše lokalizovane u srednjem delu ovog sloja (Bensouilah i Buck, 2006). Langerhansove ćelije čine 2-8% od ukupne populacije epidermalnih ćelija i povezuju se sa keratinocitima preko receptora za E-kaderin (Mayumi i sar., 2013). Sposobnost Langerhansovih ćelija da stimulišu T limfocite se smanjuje prilikom izlaganja UVB zracima (Haake i sar., 2001).

Poslednji sloj ćelija epidermisa, koji je u dodiru sa spoljašnjom sredinom, je *stratum corneum* (SC) i formira se kao rezultat konačnog ishoda sazrevanja keratinocita, a sačinjen je od slojeva neživih, rožnatih ćelija heksagonalnog oblika poznatih kao korneociti (Forslind i Lindberg, 2014) (slika 7). Skoro na svim delovima kože ima 10-30 slojeva naslaganih korneocita (Forslind i Lindberg, 2014), pri čemu ih je najviše na tabanima i dlanovima (Bensouilah i Buck, 2006), a najmanje na usnama (Williams, 2003). Svaki korneocit je okružen proteinskim omotačem (~15 nm) okrenutim ka citoplazmi i lipidnim omotačem (~4 nm, ω -hidroksi ceramidi, slobodne masne kiseline, holesterol) okrenutim ka međućelijskom prostoru (Forslind i Lindberg, 2014). Amorfni matriks korneocita ispunjen je pretežno α -keratinom (oko 70%) i β -keratinom (oko 10%) (Williams, 2003). Ćelijski oblik i horizontalna orijentacija keratinskih proteina (Forslind i Lindberg, 2014) daje čvrstinu SC (Bensouilah i Buck 2006). Ovakva struktura

obezbeđuje prirodnu fizičku barijeru (za štetne materije i mikroorganizme), a reguliše i gubitak vode iz tela (Forslind i Lindberg, 2014) (tabela 1). Sloj korneocita može da apsorbuje tri puta više vode u odnosu na njegovu masu, ali ako sadržaj vode opadne ispod 10% on gubi savitljivost i puca (Bensouilah i Buck, 2006). Kod zdrave kože normalan sadržaj vode u SC je oko 30%, a za njeno održavanje zadužen je protein filagrin koji se stvara na spoljašnjoj strani korneocita i razlaže na amino kiseline u slučaju smanjenja sadržaja vlage u koži (Bensouilah i Buck, 2006). Slobodne aminokiseline (serin, glicin, alanin, histidin, arginin, ornitin, prolin) (Williams, 2003), zajedno sa drugim komponentama kao što su mlečna kiselina, urea, soli su poznati kao „prirodni vlažeći faktori“ (eng. *natural moisturising factors* – NMF) i odgovorni su za elastičnost kože zbog sposobnosti da privuku i zadrže vodu (Bensouilah i Buck, 2006). Pored toga, prisustvo pomenutih međucelijskih lipida koji okružuju korneocite je još jedan od bitnih faktora u održavanju vlažnosti elastične kožne barijere. Ceramidi, tip sfingolipida, uglavnom su odgovorni za stvaranje složenih lipidnih struktura koje zadržavaju molekule vode u svojim hidrofilnim regijama (Bensouilah i Buck, 2006) i stvaraju nepropusnu barijeru sprečavanjem kretanja vode i NMF van površinskih slojeva kože (Bensouilah i Buck, 2006). Tvorevine kože, lojne žlezde, koje su udružene sa folikulima dlake sekretuju sebum (sačinjen od slobodnih masnih kiselina, voskova i triglicerida) koji premašćuje površinu kože i doprinose održanju površinskog pH oko 5 (Williams, 2003). Kod ljudi, nakon 40 godina starosti dolazi do naglog opadanja količine lipida u koži, što povećava uslove za razvoj suve kože (Bensouilah i Buck, 2006).

Tabela 1. Funkcije kože (Bensouilah i Buck, 2006)

-
- Obezbeđuje zaštitnu barijeru od mehaničkih, termalnih i fizičkih povreda i štetnih agenasa
 - Štiti od gubitka vlage
 - Smanjuje štetne efekte UV zračenja
 - Deluje kao senzorni organ
 - Pomaže u regulisanju temperature tela
 - Ima bitnu imunološku ulogu
 - Učestvuje u sintezi vitamina D3 (holekalciferol)
 - Ima kozmetičku, socijalnu i seksualnu ulogu
-

Koža igra bitnu ulogu u održavanju konstantne temperature tela (Weller i sar., 2015) (tabela 1) zahvaljujući promenama protoka krvi u vaskularnom sistemu kože u dermisu i isparavanjem znoja sa površine kože (Bensouilah i Buck, 2006). Ekrine (znojne) žlezde su raspoređene po koži skoro celog tela i ima ih 100-200 po cm² kože. Stimulisane toplotom ili emocionalnim stresom one sekretuju znoj, razblaženi rastvor soli sa pH oko 5 (Williams, 2003).

„Ljuštenje“ ćelija SC je bitan faktor u održavanju integriteta i glatkoće kože. U odsustvu vode deskvamacija ćelija se ne odvija normalno i koža postaje gruba, suva, debela, sa ćelijama koje se nagomilavaju na koži (Bensouilah i Buck, 2006). Inače, kretanje epidermalnih ćelija od bazalnog sloja do SC obično traje oko 14 dana, a prolaz kroz SC i deskvamacija traju još 14 dana (Williams, 2003), pa je za potpuno obnavljanje epitela potrebno oko 28 dana (Weller i sar., 2015).

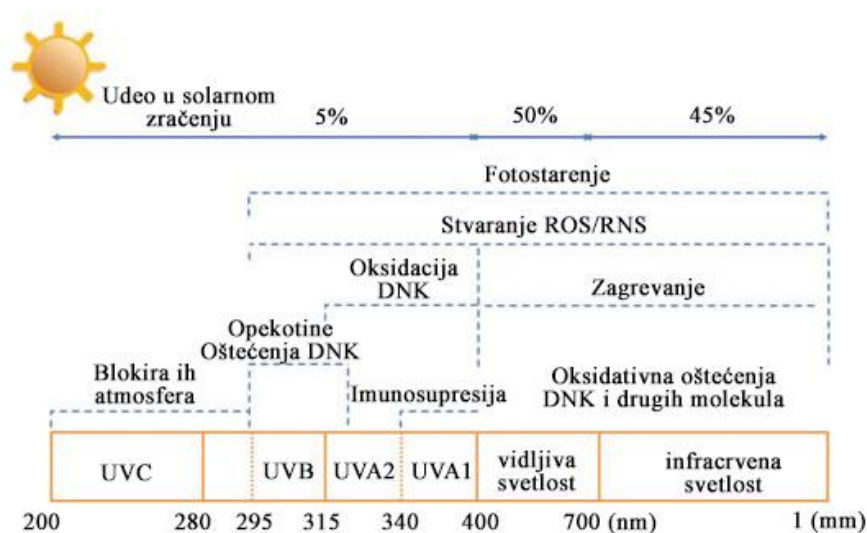
1.2.3. Negativni efekti UV zračenja na ljude

Poznato je da u nekim slučajevima UV zraci mogu imati pozitivne efekte na obolelu kožu. Tretmani sa širim spektrom UVB, užim spektrom UVB zračenja (El-ofty i sar., 2005; Bandow i Koo, 2004; Ada i sar., 2005), psoralenom u kombinaciji sa UVA fotohemoterapijom (PUVA) (Parsad i sar., 2006; Weber F. i sar., 2005; Yones i sar., 2006) i UVA zracima (Dawe, 2003; Breuckmann i sar., 2002) imali su za rezultat značajno poboljšanje stanja kod pacijenata sa psorijazom, kožnim T limfomom i vitiligom. Međutim, pokazano je da UV zračenje u velikom obimu i intenzitetu može dovesti do značajne toksičnosti (Foster i sar., 2007; Dupont i sar., 2013). Individualna genetička preosetljivost značajno određuje način na koji će čovek/pojedinac reagovati na UV zračenje. Neke studije su ukazale na jedinstven polimorfizam u genima koji kodiraju interleukin-1 beta (IL-1 β) (Sleijffers i sar., 2003) i faktor nekroze tumora-alfa (*TNF- α*) (Niizeki i sar., 2002) kao modulatore humanog odgovora na UV zrake (Foster i sar., 2007; Saewan i Jimtaisong, 2015).

Kada UV zračenje dođe do kože, deo zraka se reflektuje, a deo bude apsorbovan od strane različitih komponenti kože. Zraci talasnih dužina iz UVB oblasti uglavnom se

apsorbuju zahvaljujući komponentama epidermalnih ćelija (različite hromofore kao što su melanin, DNK, ribonukleinska kiselina (RNK), proteini, aromatične amino kiseline, urokanska kiselina (Gonzalez i sar., 2008; Romanhole i sar., 2015)), dok UVA zraci penetriraju dublje u kožu, čak do bazalnog sloja epidermisa i dermalnih fibroblasta, utičući na vezivno tkivo, proizvodnju slobodnih radikala (engl. *Reactive Oxygen Species* – *ROS*) i stimulaciju proizvodnje matriks metaloproteinaza (Balogh i sar., 2011; Romanhole i sar., 2015).

Odgovor normalne kože na UV zračenje sastoji se od niza promena u mikrocirkulaciji i tkivu koje rezultira glavnim znacima inflamacije (Saewan i Jimtaisong, 2015) (slika 8), a njih je prvobitno opisao Aulus Cornelius Celsus: *calor* (toplina), *dolor* (bol), *tumor* (oticanje), i *rubor* (crvenilo) (Foster i sar., 2007). Inflamatorni odgovor kože na UV zračenje praćen je mnoštvom ćelijskih i molekularnih promena (Foster i sar., 2007). Ćelijske promene koje se javljaju kao rezultat izlaganju UV zracima mogu se podeliti na vaskularne promene praćene eritemom, infiltracijom inflamatornih ćelija, ultrastrukturnim i morfološkim promenama, formiranjem apoptotskih ćelija opekotine i hiperproliferacijom keratinocita (Foster i sar., 2007; Saewan i Jimtaisong, 2015) (slika 8).



Slika 8. Odgovor normalne kože na UV, vidljivo i infracrveno zračenje

Aktivacija različitih molekularnih puteva koji: a) štite od oksidativnih oštećenja i nastanka slobodnih radikala, b) štite DNK, c) aktiviraju citokinsku signalizaciju, d) modulišu sintezu prostaglandina, i e) aktiviraju oslobađanje histamina i drugih medijatora

inflamacije prate kliničke i histološke promene koje se uočavaju u koži posle izlaganja UV zračenju (Foster i sar., 2007). Tako se kao efekti akutnog delovanja UVB zraka na kožu mogu izdvojiti: eritem, edem, tamnjenje kože, debljanje dermisa i epidermisa, dok se nakon hroničnog izlaganja UVB zracima, kao i UVA zracima uočava fragilnost kože, preosetljivost, hrapavost, izražena suvoća, hiperpigmentacija, formiranje plihova, pojava bora (Tundis, 2015). Dodatno, delovanje UVA zraka dovodi do degenerativnih promena na retini oka (Tundis, 2015).

UV zračenje indukuje eritem, koji se odlikuje nekim osobinama zajedničkim za sve talasne dužine: 1) postoji odložen početak pojave eritema, 2) eritem traje nekoliko sati ili dana, i 3) javlja se kraći latentni period i duže trajanje reakcije sa povećanjem izlaganja UV zračenju (Foster i sar., 2007). Međutim, postoje i razlike u eritemu koji nastaje kao posledica zračenja različitih talasnih dužina. Tako je za nastanak UVA eritema neophodno intenzivno zračenje UVA zracima ($10-100 \text{ J/cm}^2$), dok je za nastanak UVB eritema potrebno znatno manje energije ($10-20 \text{ mJ/cm}^2$) (Foster i sar., 2007; Krakowski i Kaplan, 2012). Eritem koji nastaje nakon 24-48 h usled izlaganja UVA zračenju, dostiže maksimum u toku 72 h, i može trajati duže od 7 dana, pri čemu je nastala pigmentacija kože veoma intenzivna (Hall i Hall, 2010). UVB eritem se pojavljuje oko 2 h nakon izlaganja zračenju, dostiže maksimum u toku 24 h i počinje da slabi nakon 48 h, pri čemu je nastala pigmentacija kože manje intenzivna (Hall i Hall, 2010). Na još manjim talasnim dužinama koje odgovaraju UVC zracima (254 nm), eritem koji nastaje je proizvod delovanja veoma male energije (9 mJ/cm^2), a karakteriše ga bledo roze boja i veoma slaba pigmentacija (Foster i sar., 2007).

DNK je glavna meta UV zračenja, tačnije njene pirimidinske baze koje podležu različitim fotohemijским modifikacijama formirajući pritom ciklobutan dimere (Saewan i Jimtaisong, 2015) i druge fotoprodukte koji se mogu popraviti specifičnim enzimima. Kada ćelija nije u mogućnosti da popravi nastalo oštećenje dolazi do pojave mutacija koje se mogu preneti na nove ćelije nakon mitoze. Pri tome može doći do promena u fotoprotektivnim mehanizmima koji su zasnovani na inhibiciji replikacije, apoptozi ili ćelijskoj smrti mutiranih nosioca (Gonzalez i sar., 2008; Romanhole i sar., 2015).

Pored UV zračenja, treba pomenuti i uticaj IR zračenja i vidljive svetlosti (slika 8). Naime, IR zračenje može povećati temperaturu kože preko $40 \text{ }^\circ\text{C}$ i delovati kao

toplota. Hronično izlaganje toploti dovodi do promena u koži i razvoja bolesti kako što su eritem ab igne, hiperpigmentacija, epidermalna atrofija i teleangiektazije (Weber MB i sar., 2005; Mahmoud i sar., 2008; Romanhole i sar., 2015). Za talasne dužine iz vidljivog dela spektra pokazano je da dovode do neposredne pigmentacije i bez prisustva UV zraka, neposrednog eritema i odloženog tamnjenja, a čak mogu dovesti do oštećenja melanocita, fotostarenja, pa i kancera kože (Chiarelli-Neto i sar., 2014; Mahmoud i sar., 2008; Romanhole i sar., 2015).

1.2.4. Molekularni medijatori UV indukovanog eritema i inflamacije

Histamin je bio prvi kandidat od mnogobrojnih endogenih vazoaktivnih supstanci koje su razmatrane kao potencijalni medijatori akutne inflamacije (Lewis, 1927; Owen i sar., 1980). Zahvaljujući eksperimentima u kojima su korišćeni antagonisti histaminskih N1 i N2 receptora doveli do smanjenja hiperemije i vaskularne permeabilnosti izazvane delovanjem UV zračenja (Owen i sar., 1980) došlo se do dokaza da je histamin medijator ranog prolaznog inflamatornog odgovora i da će izostati efikasnost antihistamina u odloženom odgovoru kod ljudi (Foster i sar., 2007).

Prostaglandini igraju bitnu ulogu u inflamatornom odgovoru na UV zračenje. Prekursor u metabolizmu prostaglandina je arahidonska kiselina, koja se nalazi u ćelijskoj membrani svih ćelija i njeno oslobađanje iz fosfolipida pomoću fosfolipaze A₂ (PLA₂) se smatra limitirajućim korakom u generisanju leukotriena i prostaglandina (Murakami i sar., 2003). Povećane količine citosolne PLA₂ su uočene u eritomatoznoj koži koja nastaje kao posledica delovanja UVB zračenja, tj. sinteza citosolne PLA₂ dešava se samo kada je koža izložena UV dozama koje su dovoljne da izazovu eritem (citosolna sinteza PLA₂ se povećava tri do četiri puta 6 h nakon zračenja) (Foster i sar., 2007).

Takođe, postoje mnogobrojni dokazi koji potvrđuju porast koncentracije arahidonske kiseline, PGE₂ i PGF_{2α} u humanoj koži nakon delovanja UV zračenja (Prasad i Katiyar, 2013). Pokazano je da ozračeni humani keratinociti metabolišu arahidonsku kiselinu u PGE₂ i PGF_{2α} tj. da njihova membrana učestvuje u iniciranju odgovora na izlaganje UV zračenju (DeLeo i sar., 1984; Prasad i Katiyar, 2013).

Enzim *ciklooksigenaza* (*COX*) igra bitnu ulogu u konverziji arahidonske kiseline u prostaglandine (Prasad i Katiyar, 2013). Postoje dve izoforme *COX*: *COX-1* i *COX-2* (Foster i sar., 2007). *COX-1* se nalazi u većini ćelijskih tipova (Kam i See, 2000), dok *COX-2* ima manju bazalnu ekspresiju u većini tkiva uključujući kožu, ali je indukovana tumor promotorima (Kujubu i sar., 1991), faktorima rasta (Moatter i Gerritsen, 1992), citokinima (O'Banion i sar., 1996) i endotoksinima (O'Sullivan i sar., 1992). Kod ljudi izloženih UV zračenju, lokalna primena na koži/topikalna primena *COX-1* i *COX-2* inhibitora (indometacin) dovodi do smanjenja temperature kože i smanjenja eritema kao posledice UVB zračenja (Prasad i Katiyar, 2013), ali ne utiče na smanjenje odloženog eritema izazvanog UVA zračenjem (Morison i sar., 1977). Pored učešća u inflamatornom odgovoru na UV zračenje, *COX* (pre svega *COX-2*) igra bitnu ulogu u razvoju kancera kože.

UV zračenje uzrokuje pojavu *COX-2*, pa topikalna primena specifičnog *COX-2* inhibitora (celekoksib) efikasno smanjuje mnoge parametre inflamacije izazvane delovanjem UVB zračenja (Prasad i Katiyar, 2013), uključujući PGE₂ i formiranje ćelija opekotina (Wilgus i sar., 2000), edem, infiltraciju i aktivaciju dermalnih neutrofila i aktivnost dermalne mijeloperoksidaze (Wilgus i sar., 2002).

Epidermalni trombocitni aktivirajući faktor (engl. *platelet-activating factor* – *PAF*) je fosfolipid plazma membrane koji učestvuje u razvoju akutnih i hroničnih inflamatornih odgovora pa i odgovora na UVB zračenje (Foster i sar., 2007). Keratinociti imaju *PAF* receptore i kao odgovor na UVB zračenje i oksidativni stres sintetizuju *PAF* i fosfolipide slične *PAF*-u (Marathe i sar., 2005; Marsh-Wakefield i Byrne, 2015). Oni se dalje vezuju za receptore na keratinocitima dovodeći do njihove apoptoze (Marsh-Wakefield i Byrne, 2015).

1.2.5. Citokini i UV inflamatorni odgovor

Faktor nekroze tumora - alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha* – *TNF- α*) je poznat i kao kahektin, a ime je dobio po svojoj sposobnosti ubijanja ćelija tumora i izazivanja kaheksije (gubitak depoa adipoznog tkiva), koja se obično javlja zajedno sa infekcijama i malignitetom (Foster i sar., 2007). *TNF- α* je multifunkcionalni citokin koga

proizvode različiti tipovi ćelija uključujući mast ćelije (Gordon i Galli, 1990), keratinocite (Koch i sar., 1990), aktivirane Langerhansove ćelije (Larrick i sar., 1989) i dermalne dendritske ćelije (Bruynzeel i sar., 1992). Sinteza i oslobađanje *TNF- α* je između ostalog regulisana UV zračenjem (Luger i Schwarz, 1995), pa se *TNF- α* značajno povećava posle izlaganja kože UVB zračenju (Oxholm i sar., 1988; Tundis, 2015) i smatra se da ima glavnu ulogu u UVB indukovanoj inflamaciji i formiranju ćelija opekotina (Schwarz i sar., 1995; Saewan i Jimtaisong, 2015). Vezivanjem *TNF- α* na receptore dovodi do aktivacije dva glavna transkripciona faktora, aktivator proteina-1 (AP-1) i nuklearnog faktora-kapa-B (NF- κ B) koji indukuje gene uključene u akutne i hronične odgovore (Bashir i sar., 2009).

Interleukin-1 (IL-1) ima proinflamatorne efekte kao što je indukcija groznice i proteina akutne faze (Foster i sar., 2007; Magcwebeba i sar., 2012). Tri proteina čine IL-1 familiju od kojih su dva agonisti, IL-1 α i IL-1 β , a treći je IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) (Foster i sar., 2007). IL-1 α se nalazi u citosolu ili ćelijskoj membrani i verovatno reguliše intraćelijsku sredinu (Foster i sar., 2007). IL-1 sintetišu keratinociti (Schmitt i sar., 1986; Sauder, 1985), a IL-1 α je dominantna forma koju keratinociti sintetišu u slučaju povreda uključujući i UV zračenje (Magcwebeba i sar., 2012). Količina IL-1 prati UVB zračenje dostižući maksimum 1 do 4 h nakon izlaganja zračenju, a vraća se na normalan nivo nakon 8 sati (Foster i sar., 2007).

Interleukin-6 (IL-6) je multifunkcionalni citokin koji ima različite biološke funkcije, uključujući indukciju groznice i proteine akutne faze (Foster i sar., 2007). Uloga IL-6 u inflamatornom odgovoru na UV zračenje je dobro poznata (Tundis, 2015; Saewan i Jimtaisong, 2015). IL-6 proizvode keratinociti nakon izlaganja UV zračenju (Tundis, 2015). Histamin stimuliše proizvodnju IL-6 (Shinoda i sar., 1998), ali je pre svega IL-1 odgovoran za indukciju IL-6 sinteze (Wlaschek i sar., 1994). Istraživanja su pokazala da polifenoli zelenog čaja inhibiraju UV indukovanu proizvodnju IL-6 i tretman kultivisanih humanih keratinocita sa (-)-epigalokatehin-3-galatom (EGCG) značajno smanjuje UVA i UVB indukovanu sekreciju IL-6 (Xia i sar., 2005).

Interleukin-8 (IL-8) je moćan proinflamatorni hemokin koji deluje kao aktivacioni faktor za neutrofile i T-limfocite (Larsen i sar., 1989). U keratinocitima ga indukuju i UVB i UVA1 zračenje (Kondo i sar., 1993; Pernet i sar., 1999) i njegov nivo

raste 11-13 puta iznad normalnog, ostajući povišen najmanje 24 h nakon zračenja (Foster i sar., 2007).

1.2.6. Signalni putevi i UV indukovana inflamacija

Aktivator proteina (AP-1) sastoji se od Jun i Fos familije proteina (Angel i Karin, 1991). Izlaganjem UV zračenju dovodi do povećanja nivoa c-Jun proteina (Fisher i sar., 1998) koji se održava najmanje 24 h nakon zračenja (Angel i sar., 2001). AP-1 moduliše ekspresiju mnogih gena, što obuhvata i transkripciju matriks metaloproteinaze-1 (MMP-1, kolagenaza 1), koja započinje degradaciju kolagenih vlakana tipa I i III, MMP-9 (želatinaza) koja dalje degradira kolagene fragmente dobijene dejstvom kolagenaze, i MMP-3 (stromelizin 1) koja degradira kolagen tipa IV u bazalnoj membrani i aktivira proMMP-1 (Foster i sar., 2007). Dodatno, ugrožena je sinteza kolagena tipa I, pa se može reći da AP-1 doprinosi fotooštećenju do kog dovodi UV zračenje (Rittie i Fisher, 2002).

NF- κ B sastoji se od 5 proteina (Foster i sar., 2007) i oni se vezuju za DNK i tako regulišu veliki broj fizioloških i patofizioloških procesa koji obuhvataju inflamatorne i imune odgovore, preživljavanje ćelija, ćelijsku proliferaciju, i odgovor na stres (Ghosh i Karin, 2002). Aktivacija NF- κ B pre svega je povezana za povećan broj ROS (Foster i sar., 2007), a dešava se prilikom UV zračenja čije su doze dovoljne da dovedu do značajnih oštećenja membrane ćelija i nisu u vezi sa DNK oštećenjem (Vile i sar, 1995). Pokazano je da vitamin E (alfa-tokoferol) (Maalouf i sar., 2002) i drugi antioksidansi (alfa-lipoinna kiselina, silimarín, piknogenol, antocijanidini iz semenki grožđa, epigalokatehin-3-galat, resveratrol) značajno inhibiraju aktivaciju NF- κ B (Maalouf i sar., 2002; Saliou i sar., 1999; Saliou i sar., 2001; Mantena i Katiyar, 2006; Tundis, 2015) 4 do 8 h nakon UVB zračenja (Maalouf i sar., 2002).

1.2.7. Neposredne mete UV indukovanog inflamatornog odgovora

Dokazi ukazuju da je DNK glavna hromofora za eritem (Foster i sar., 2007) i da će izostati pojava eritema i formiranje ćelija opekotina ako se izvrši popravka

dimerizovanih piridinskih baza (enzim fotolijaza) u transkripciono aktivnoj DNK (Clydesdale i sar., 2001; Ley i sar., 2000; Berg i sar., 1998).

U eritemskom odgovoru na UV zračenje *azot oksid* (NO) ima bitnu ulogu. NO se sintetise u koži pomoću NO sintaze, koja prevodi L-arginin i kiseonik u citrulin i NO (Russo i Halliday, 2006). NO se udružuje sa superoksidom i formira peroksinitrit, koji je medijator oštećenja tkiva, i ujedno lošiji vazodilatator od NO (Juzeniene i Moan 2012). UVB zraci su moćan stimulator proizvodnje NO, tako što indukuju azot-oksidi sintazu u keratinocitima (Deliconstantinosi sar., 1997). Takođe i UVA zraci stimulišu proizvodnju NO (Paunel i sar., 2005; Juzeniene i Moan 2012).

Literaturni podaci ukazuju da i UVA i UVB zračenje indukuju inflamatornu signalnu kaskadu koju pokreću *ceramidi* (Foster i sar., 2007). UVA zračenje dovodi do oslobađanja ceramida u humanim keratinocitima u dve faze, prvo nakon 0,5 do 2 h i kasnije 16 h nakon zračenja, a traje do 48 h (Grether-Beck i sar., 2005). Za razliku od UVA, UVB zračenje dovodi do akumulacije ceramida koja počinje 15 minuta posle izlaganja i progresivno raste do 24 h nakon zračenja (Magnoni i sar., 2002).

Urokanska kiselina je jedinjenje koje se nalazi u epidermisu, a nastaje deaminacijom histidina pomoću enzima histidin amonijum lijaze (Noonan i sar., 1981). Sa izlaganjem UV zračenju urokanska kiselina prelazi iz *trans*-izomera u *cis*-izomer (Foster i sar., 2007). *Cis*-urokanska kiselina i histamin sinergično povećavaju proizvodnju prostaglandina E₂ u keratinocitima (Jaksic i sar., 1995; Kaneko i sar., 2011) što doprinosi inflamaciji.

1.2.8. Povezanost UV zračenja i kancera kože

Kancer kože postao je veliki zdravstveni problem od kada je incidenca kutanog malignog melanoma i drugih kancera kože porasla više od 600% na nivou svetske populacije od 1940-ih (Romanhole i sar., 2015). Kancer kože se najčešće javlja u tri glavna oblika: melanom, karcinom bazalnih ćelija (bazocelularni karcinom) i karcinom skvamoznih ćelija (ili epidermoid, spinocelularni karcinom) kože. Najučestaliji su

bazocelularni karcinom i spinocelularni karcinom kože, a posebno su česti kod ljudi svetle kože.

Tabela 2. Tipovi kože po Fitzpatrick-u (Greinert i sar., 2015)

	Fenotip	UV preosetljivost		Rizik od kancera kože
Tip I	Veoma bleđa koža, bleđa bela, svetlo obojena ili crvena kosa, zelene ili plave oči, često pegavi.	++++	Koža veoma lako gori i nikada ili veoma teško tamni (Keltski tip).	Najveći rizik za kancer kože.
Tip II	Bleđa, bela koža, svetla kosa (plava, crvena ili svetlo braon) i plavih ili braon očiju. Neki mogu imati i tamnu kosu.	+++	Koža lako gori i sporo tamni (Svetli kavkaski tip).	Visok rizik za kancer kože.
Tip III	Svetla braon, svetlo maslinasta koža sa tamnom kosom i braon ili zelenim očima.	++	Koža ne gori lako i tamni (Kavkaski tip).	Visok rizik za kancer kože.
Tip IV	Umereno braon, braon oči i tamna kosa	+	Koža veoma teško gori i tamni lako (Mediterranski tip kože).	Postoji rizik za kancer kože.
Tip V	Tamno braon, braon oči i tamna kosa.	+/-	Koža nikada ne gori, prirodno je tamna (Azijski tip kože).	Kancer kože je relativno redak, ali ako se pojavi najčešće se detektuje kasnije, u mnogo opasnijem stanju.
Tip VI	Veoma pigmentisana tamna braon do crna koža sa tamno braon očima i crnom kosom.	-	Koža nikada ne gori, prirodno je tamna (Negroidni tip kože)	Kancer kože je relativno redak, ali ako se pojavi najčešće se detektuje kasnije, u mnogo opasnijem stanju.

Preterano izlaganje sunčevom zračenju kao i preosetljivost kože na UV zračenje predstavljaju glavne faktore rizika za razvoj kancera kože. Tome treba dodati i ličnu

sklonost ka razvoju kancera kože (osoba koja je imala melanom, 4-9% joj se povećava rizik za razvoj drugog primarnog melanoma), porodičnu sklonost ka kanceru kože, fizičke osobine kao što su bleđa koža udružena sa pegama (I i II tip kože po Fitzpatrick-u) (tabela 2), lako dobijanje opekotina prilikom izlaganja suncu sa velikim brojem ponavljanja tokom života, crvena/plava kosa, povećan broj nevusa ili pojava atipičnih nevusa, transplantacija organa uz imunosupresivnu terapiju (Diao i Lee, 2014).

Spinocelularni karcinom, pojavljuje se isključivo na delovima kože koji su stalno izloženi sunčevom zračenju (nos, uši) (Greinert i sar., 2015; Romanhole i sar., 2015), dok se bazocelularni karcinom kože javlja na delovima kože koji su povremeno izloženi sunčevom zračenju (Romanhole i sar., 2015). Za razvoj melanoma, glavni rizik predstavlja prisustvo većeg broja nevusa na koži (Estimativa 2014; Romanhole i sar., 2015). Za razliku od spinocelularnog i bazocelularnog kancera melanom se najčešće širi na okolno tkivo i druge delove tela, pa je i smrtnost usled melanoma veća u odnosu na druge kancere kože (Chang i sar., 2010; Romanhole i sar., 2015).

Incidenca melanoma povezana je sa godinama starosti, polom, rasom, geografskim područjem, kao i načinom života. Praktično sve starosne grupe su pogođene melanomom, ali mlađa (15-30 godina) kao i starija (60+) populacija su osetljivije na povećano UV zračenje. Ispitivanja su pokazala da preterano izlaganje sunčevom zračenju u detinjstvu predstavlja glavni rizik za kasniji razvoj melanoma (IARC. 2012; Greinert i sar., 2015; Romanhole i sar., 2015).

Treba imati u vidu da i UVA i UVB zračenje doprinose razvoju kancera kože. Kancerogeni efekat UVA zraka je manji, ali i oni mogu direktno delovati na strukturu DNK. Ipak, aktivnost UVA zraka najčešće je indirektna, vođena preko slobodnih radikala koji interreaguju sa DNK i dovode do promena u njenoj strukturi. UVB zraci direktno oštećuju DNK, formirajući dimere DNK baza, ali deluju i indirektno preko slobodnih radikala. U oba slučaja ishod je isti, dolazi do mutacija koje, ukoliko ih odbrambeni mehanizmi ne poprave, dovode do razvoja kancera kože (Marrot i Meunier, 2008; Romanhole i sar., 2015).

1.2.9. Pozitivni efekti UV zračenja na ljude

Tokom prošlog veka najveći broj upozorenja po zdravlje ljudi bio je fokusiran na štetne efekte prilikom preteranog izlaganja sunčevom zračenju (Mead, 2008). Danas, preovladava stav da postoje korisni i štetni efekti po zdravlje ljudi od izlaganja UV zračenju (Springbett i sar., 2010; Editorial, 2010; Juzeniene i Moan 2012). Među štetne efekte UV zračenja ubrajaju se opekotine, oštećenje kolagenih vlakana, uništavanje vitamina A u koži, ubrzano starenje kože i povećan rizik od kancera kože koji nastaje indirektno, oštećenjem molekule DNK (Mead, 2008; Dupont i sar., 2013). S druge strane, dobro poznat pozitivan uticaj sunčeve svetlosti je njena sposobnost da poveća snadbevanje organizma vitaminom D (Springbett i sar., 2010; Editorial, 2010; Greinert, i sar., 2015) (tabela 1). Smatra se da je najmanje 1000 različitih gena, koji regulišu praktično svako tkivo u organizmu, regulisano aktivnim oblikom vitamina D – 1, 25-dihidroksivitaminom D₃, uključujući i one koji učestvuju u metabolizmu kalcijuma, kao i funkcionisanju neuromišićnog i imunog sistema (Mead, 2008). Činjenica da se koža ljudi menjala od crne ka beloju svaki put kada su ljudi migrirali iz afričkih predela na sever, u manje osunčana mesta, kao i činjenica da je beloju koži potrebno oko šest puta manje izlaganja sunčevoj svetlosti da bi obezbedila dovoljno vitamina D u odnosu na crnu kožu, ukazuje da je izlaganje sunčevoj svetlosti zdravo (Mead, 2008; Editorial, 2010). Među mnogim bolestima za koje je ustanovljen pozitivan efekat višeg nivoa vitamina D su i kardiovaskularne bolesti (Zittermann i Gummert, 2010; Greinert i sar., 2015), multipla skleroza (Kampman i Steffensen, 2010; Greinert i sar., 2015), mentalne bolesti (Humble, 2010), kanceri (Editorial, 2010; Grant, 2010; Greinert i sar., 2015). Potvrđeno je da je smrtnost od kardiovaskularnih bolesti dva puta veća kod starijih osoba, kod kojih postoji deficit vitamina D u odnosu na grupu sa adekvatnim nivoom vitamina D (Zittermann i Gummert, 2010; Editorial, 2010). Veliki broj analiza kancera dojke i kolorektalnog kancera ukazuje da se stopa učestalosti smanjuje za 50% ako se nivo kalcitriola poveća sa 24 na 78 nmol/L (Editorial, 2010; Grant, 2010). Takođe, vitamin D može značajno smanjiti rizik za multiplu sklerozu i čak izmeniti težinu bolesti (Kampman i Steffensen, 2010). Populacija na višim geografskim širinama iznad 37° ima povećan rizik od razvoja multiple skleroze tokom života za više od 100% (Ponsonby i sar., 2002; Mead, 2008). Prenatalno izlaganje sunčevom zračenju i vitamin D imaju povoljan uticaj na rizik

potomaka za dobijanje bolesti kao što šizofrenija i autizam (Humble, 2010; Editorial, 2010). Takođe dovoljne količine vitamina D u prvim godinama života povezane su sa manjim rizikom od razvoja dijabetesa tipa 1 (Littorin i sar., 2006; Mead, 2008; Greinert i sar., 2015).

Poznato je da su za pravilan razvoj kostiju neophodne dovoljne količine vitamina D (Wrightb i Weller, 2015). U slučaju nedostatka vitamina D kod dece se razvija rahitis, bolest koju karakteriše zastoj u rastu i različite deformacije skeleta sa karakteristično krivim nogama (Mead, 2008). Pokazano je da nizak nivo vitamina D kod odraslih može doprineti i čak dovesti do osteoporoze kod muškaraca i žena i prouzrokovati osteomalaciju, bolest praćenu bolom u kostima i mišićnom slabošću (Cranney i sar., 2007; Mead, 2008), a udružen je i sa gubitkom hrskavice i osteoartritisom (Wrightb i Weller, 2015). Takođe, potvrđeno je da izlaganje sunčevom zračenju povoljno deluje na obolele od tuberkuloze bez obzira na godine, a 2008. godine otkriveno je da visok nivo vitamina D smanjuje rizik od tuberkuloze za 32% (Nnoaham i Clarke, 2008; Mead, 2008).

Pacijenti kod kojih je vršena transplantacija organa usled supresije imunog sistema nastale tokom primene terapije (imunosupresivi) imaju povećan rizik da obole od kancera, pa im se savetuje da smanje izlaganje sunčevom zračenju (Editorial, 2010). S druge strane, smanjeno izlaganje sunčevom zračenju može dovesti do deficita vitamina D u njihovom organizmu (Reichrath, 2010; Editorial, 2010). Pored njih osobe sa tamnom kožom koje žive u mestima na višim geografskim širinama, osobe koje retko izlaze van zatvorenih prostorija ili koje prekrivaju svoju kožu odećom, kao i osobe koje koriste velike količine proizvoda za zaštitu od sunčevog zračenja spadaju u grupu ljudi kod kojih je povećan rizik od deficita u vitaminu D (Editorial, 2010; Mead, 2008). Ispitivanja de la Roche i saradnika (2010) potvrdila su da redovno konzumiranje zelenog čaja predstavlja jednostavnu zaštitu od oštećenja DNK izazvanih UVA zracima. Ako bi se na sličan način mogli zaštititi i od negativnih efekata UVB zračenja onda ne bi bilo neophodno izbegavati sunčevo zračenje i narušavati sintezu vitamina D.

Ima puno potvrda da je povremeno izlaganje sunčevom zračenju mnogo opasnije od redovnog izlaganja umerenom sunčevom zračenju (Editorial, 2010; Juzeniene i Moan, 2012). Dok je kancer kože povezan sa preteranim izlaganjem UV zračenju, što je potvrđeno u Australiji, Novom Zelandu (gde je sunčevo zračenje većeg intenziteta usled

oštećenja ozonskog omotača), Kanadi i Severnoj Evropi (gde pretežno žive ljudi svetlije kože) sa zaustavljanjem incidence melanoma kod ljudi koji koriste šešire, proizvode za zaštitu od sunca i provode vreme u senci, druge vrste kancera (kolorektalni kancer, kancer prostate) (Sobolewski i sar., 2013) povezane su sa nedovoljnim izlaganjem sunčevom zračenju (Lin i sar. 2013; Wrightb i Weller, 2015). Život u mestima na višim geografskim širinama povećava rizik od Hodgkinovog limfoma, kancera dojke, kolona, ovarijuma, pankreasa, prostate i drugih u odnosu na niže geografske širine (Mead, 2008). Klinička ispitivanja potvrdila su da uzimanjem 2-4 puta u toku dana 200-600 IU vitamina D3 i kalcijuma dovodi do smanjenja stope svih kancera za 50-77% (Lappe i sar., 2007; Mead, 2008). Pored toga, iako je ustanovljeno da preterano izlaganje sunčevom zračenju predstavlja faktor rizika za kutani maligni melanom, kontinuirano izlaganje sunčevom zračenju je povezano sa povećanim preživljavanjem kod pacijenata sa melanomom u ranom stadijumu (Berwick i sar., 2005; Mead, 2008; Newton-Bishop i sar., 2011; Vuong i sar, 2014). U prilog tome ide i činjenica da se većina melanoma razvija na delovima tela koji su manje izloženi sunčevom zračenju i obično bolje zaštićeni proizvodima za zaštitu od UV zračenja (Mead, 2008; Borkowska, 2014).

1.2.10. *Kozmetički aktivne supstance sa fotoprotektivnim efektom*

Zaštita od UV zračenja podrazumeva preventivne mere za zaštitu kože od opekotina, kancera i fotostarenja. Pre svega neophodno je izbegavati izlaganje sunčevom zračenju u periodima kada je UV zračenje najjače ili koristiti odgovarajuću odeću koja će zaštititi kožu, šešire, naočari i primenjivati odgovarajuće proizvode za zaštitu od UV zračenja (González i sar., 2008; Gilaberte i González, 2010). Ove mere zaštite neophodno je preuzeti prilikom obavljanja aktivnosti na otvorenom u dužem vremenskom periodu, a posebno ako se radi o osobama svetlije kože i osobama kod kojih postoji opasnost od razvoja kancera kože (Gilaberte i González, 2010).

Proizvodi za zaštitu od UV zračenja sadrže molekule ili komplekse molekula koji mogu da apsorbuju, reflektuju ili rasipaju UV fotone (Gilaberte i González, 2010). U te svrhe najviše se koriste organski i neorganski filteri (UV apsorberi i neorganski pigmenti) u proizvodima za lokalnu primenu. Od proizvoda za zaštitu od UV zračenja

očekuje se da spreče, neutrališu i čak poprave oštećenja kože nastala delovanjem UV zraka. Njihov protektivni efekat uključuje: 1) direktnu apsorpciju protona, 2) inhibiciju hronične inflamacije, 3) modulaciju imunosupresije, 4) indukciju apoptoze, 5) direktno delovanje kao antioksidansi neutrališući i hvatajući slobodne radikale, 6) indirektno delovanje kao antioksidansi tako što pokreću citoprotektivne reakcije koje vode do čišćenja od različitih oksidanasa (Dinkova-Kostova, 2008; Gilaberte i González, 2010). Uz sve to treba da su bezbedni ne samo za ljude već i za životnu sredinu (Gilaberte i González, 2010). Poslednjih godina, kada je fotoprotekcija u pitanju, najviše se istraživalo na polju uvođenja novih supstanci/sastojaka u tradicionalne kozmetičke proizvode za zaštitu kože od UV zračenja (Tundis i sar., 2015) i na upotrebi oralnih proizvoda koji bi poboljšali sistemsku zaštitu od UV zračenja (tabela 3) (Gilaberte i González, 2010; Lorencini i sar., 2014).

Tabela 3. Glavne grupe aktivnih supstanci sa fotoprotektivnim efektom (Gilaberte i González, 2010).

1. Aktivne supstance sa fotoprotektivnim efektom namenjene za topikalnu primenu
a) Organski filteri
b) Neorganski filteri/Neorganski pigmenti
c) Antioksidansi
i) Karotenoidi
ii) Polifenoli
(1) Flavonoidi
(2) Rezervatol
(3) Hidroksicimetne kiseline
(4) Ekstrakt zelenog čaja
(5) Ekstrakt <i>Polypodium leucotomos</i>
(6) Ekstrakt nara
iii) Druge sirovine
(1) Ekstrakt brokolija
(2) Kofein

Tabela 3. Glavne grupe aktivnih supstanci sa fotoprotektivnim efektom (Gilaberte i González, 2010) - nastavak.

(3) Koren <i>Polygonum multiflorum thunb</i>
d) Sredstva koja popravljaju DNK
i) T4 endonukleaza V inkapsulirana u liposome
ii) Fotolijaza
iii) Enzim oksoguanin glikozilaza
iv) Timidin oligonukleotidi
e) Inhibitori ciklooksigenaze-2
f) Helatori gvožđa
g) Osmoliti
h) Druge supstance
i) Dihidroksiaceton
ii) Pitiriacitrin
2. Supstance i proizvodi za koje postoje podaci da pokazuju fotoprotektivne efekte nakon oralne primene
a) Biljne dijetalne supstance
i) Karotenoidi
ii) Epigalokatehin 3-galat
iii) Flavonoidi
iv) Ekstrakt <i>Polypodium leucotomos</i>
v) Čokolada
vi) Kofein
b) Polinezasićene masne kiseline
i) Eikozapentaenska kiselina
ii) Omega-3 masne kiseline
c) Kombinacije antioksidanasa
3. Nove strategije za postizanje fotoprotektivnog efekta
a) Stimulacija melanogeneze
i) Forskolin
ii) Analozii α -melanocit-stimulirajućeg hormona

Među proizvodima za zaštitu od UV zračenja za primenu na koži najzastupljenije su emulzije različitog viskoziteta, koje služe kao nosači fotoprotektivnih supstanci. Postoje dokazi da primenom proizvoda na koži za zaštitu od UV zračenja kod ljudi mogu da se spreče akutni efekti sunčevog zračenja i umanju incidenca za neke kancere kože kao što je spinocelularni karcinom (Thompson i sar., 1993; Neale i sar., 2002; Van der Pols i sar., 2006), mada je još uvek nejasno da li su dovoljno efikasni u zaštiti od bazocelularnog karcinoma, melanoma i fotostarenja (Gilaberte i González, 2010; Zillich i sar., 2015). Ipak pokazano je da dnevna upotreba proizvoda za zaštitu od UV zračenja u širokom UV spektru značajno smanjuje oštećenje kože koje uzrokuje UV zračenje (Seité i sar., 2010), a uz to štite ne samo od opekotina već i od UV indukovane imunosupresije (Moyal i Fourtanier, 2008; Tundis i sar., 2015). Idealan proizvod za zaštitu od UV zračenja trebao bi da štiti i od UVB i UVA zračenja, „hvata“/blokira slobodne radikale i sadrži enzime ili druge aktivne sastojke koji bi stimulisali sisteme za popravku DNK, a uz to bi trebalo da je stabilan i bezbedan (Gilaberte i González, 2010).

Među organskim filterima novije generacije dominiraju tetraftalidin dikamfor sulfonska kiselina (Mexoryl SX) i drometrizol trisiloksan (Mexoryl XL) koji apsorbuju UVA i UVB zrake, a razvio ih je L'Oreal (Dinkova-Kostova, 2008). Pored njih, koriste se metilen bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol i bis-etilheksiloksifenol metoksifenil triazin koji apsorbuju i reflektuju fotone, a zastupljeni su i UV filteri starije generacije: oktokrilen, avobenzon, etilheksil salicilat, etilheksil triazon, dietilheksil butamido triazon, fenilbenzimidazol sulfonska kiselina, dietilamino hidroksibenzoil heksil benzoat (Albuszies i Müller, 2014). Oktokrilen je veoma bitan sastojak novih formulacija, jer vrši stabilizaciju drugih UV filtera i efikasno ih solubilizuje, ali je veoma lepljiv i estetski teško prihvatljiv (Albuszies i Müller, 2016). Neka istraživanja su pokazala da su organski filteri kao avobenzon ili etilheksil metoksinamat fotonestabilni (Gaspar i Campos, 2007) ili skloni rekristalizaciji (benzofenon-3) (Toskić-Radojčić i sar., 2004; Albuszies i Müller, 2014). Kada se kombinuju različiti organski UV filteri (npr. avobenzon i dietilamino hidroksibenzoil heksil benzoat) može doći do interakcija među njima i potencijalnih toksičnih efekata (Albuszies i Müller, 2014). Bezbednost organskih filtera još uvek se ispituje, posebno zbog mogućnosti njihove apsorpcije, jer su neke studije pokazale da srednja koncentracija filtera u plazmi raste 96 h nakon primene proizvoda u odnosu na vrednosti izmerene nakon 24 h (Janjua i sar., 2008). Nove formulacije pod

nazivom UV Pearls (Baumann i sar., 2008) razvijene su sa tzv. sol-gel staklenim mikrokapsulama koje sadrže apsorbere fotona inkapsulirane u silikonsku opnu čiji je dijametar oko 1 μm čime se izbegava penetracija UV filtera u kožu, a postiže se bolja fotostabilnost i smanjuje se alergeni potencijal (Lapidot i sar., 2003). Drugi trend u razvoju novih proizvoda za zaštitu od UV zračenja je uvođenje sastojaka koji imaju antioksidantne osobine, npr. kombinacija UVB apsorbera etilheksil metoksicinamata i antioksidansa piperidin nitroksida (Damiani i sar., 2006), čime se postiže zaštita od UVA i UVB zračenja, hvatanje slobodnih radikala i smanjenje lipidne peroksidacije (Gilaberte i González, 2010; Saewan i Jimtaisong, 2014). Upotreba antioksidanasa pruža mogućnost za smanjenje broja sastojaka u formulaciji, a da se zadrži ili čak i poveća ukupna efikasnost proizvoda (Venditti i sar., 2008; Oresajo i sar., 2010).

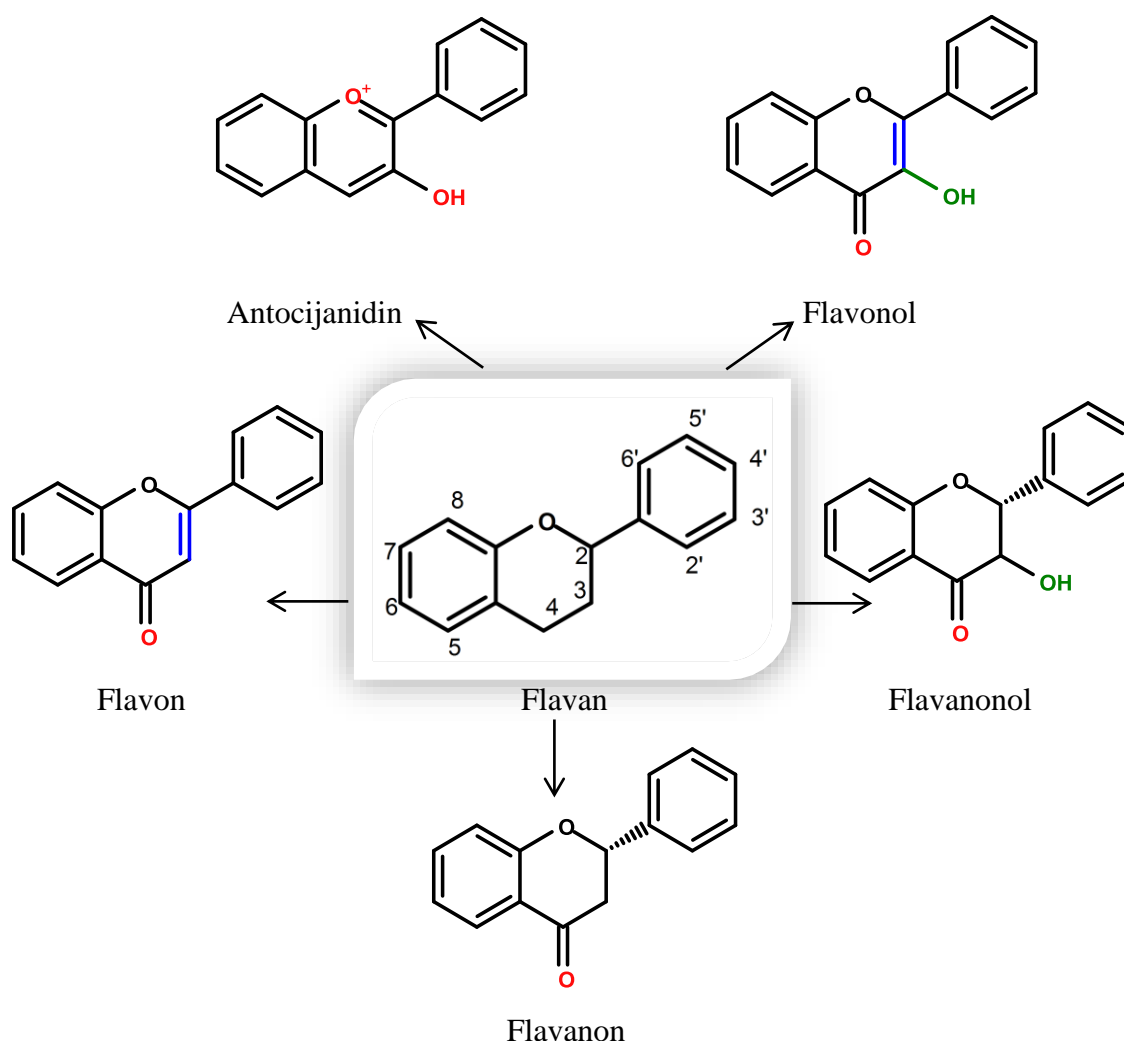
Neorganski filteri su sačinjeni od sitnih čvrstih čestica koje rasipaju, odbijaju ili apsorbuju sunčevo zračenje u UV, vidljivoj, pa čak i IR oblasti. Najviše se koriste mikronizirani cink-oksidi i titan-dioksidi (Gilaberte i González, 2010). U poslednje vreme ove supstance se inkapsuliraju ili kombinuju sa nosačima kao što je karnauba vosak sa ciljem da se dobije stabilna disperzija, idealnog viskoziteta, kao i da se postigne značajno povećanje *SPF* (Villalobos-Hernández i Müller-Goymann, 2007). Strategija koja se koristi u cilju povećanja efikasnosti proizvoda za zaštitu od UV zračenja podrazumeva uvođenje u sastav proizvoda materijala koji odbijaju ili disperguju svetlost. Mikrosfere od različitih polimera (poliakrilati, metilceluloza, stiren/akrilat kopolimer, hidrolizovani proteini pšenice sa polivinil piroolidon (PVP) polimerom) koje ostaju na površini kože razvijene su da bi se koristile u kombinaciji sa konvencionalnim organskim filterima. Ove sfere (Syntran, Solterra Boost, SolPerform, SunSpheres) odbijaju sunčevu svetlost i mogu povećati *SPF* od 50% do 70% (Gilaberte i González, 2010).

Poznato je da UV zračenje dovodi do oštećenja DNK, oksidacije proteina i indukovanja sinteze matriks metaloproteinaza u koži (Saewan i Jimtaisong, 2014; Tundis i sar., 2015). Upotreba antioksidanasa biljnog porekla u zaštiti kože od štetnih efekata UV zračenja je tema koja privlači veliko interesovanje poslednjih godina u svetu istraživanja fotozaštite (Sies i Stahl, 2004; Saewan i Jimtaisong, 2014). Antioksidantni kapacitet ovih jedinjenja smanjuje oštećenje do koga dovodi UV zračenje, a ne utiče na sintezu vitamina D u koži. Dodatno, mnoge od ovih prirodnih supstanci pokazale su da poseduju i druge

fotozaštitne osobine pored antioksidantnog efekta. Klasični antioksidansi koji se koriste u proizvodima za zaštitu od UV zračenja su vitamin C i E i β -karoten (Pinnell, 2003; Korać i Khambholja, 2011).

Polifenoli su grupa hemijskih supstanci koje se mogu naći u biljkama, a karakteriše ih prisustvo više od jedne fenolne grupe po molekulu. Uopšteno, oni se dele u hidrolizujuće tanine i fenilpropanoide. Fenilpropanoide obuhvataju flavonoide i druge komponente. Mnoge prirodne supstance koje imaju fotoprotektivne efekte su s hemijskog aspekta polifenoli (Gilaberte i González, 2010).

Flavonoidi (slika 9) su prirodni pigmenti koji se nalaze u povrću i ispoljavaju fotoprotektivan efekat smanjujući oštećenja do kojih dovode oksidujuća sredstva, kao što su UV zračenje i zagađenja iz vazduha.



Slika 9. Strukturne formule flavonoida

Pošto ljudski organizam ne može da proizvodi ove hemijske supstance, flavonoidi se moraju uneti putem hrane ili dijetetskih proizvoda (suplementi). Oni se nalaze u mnogim biljkama, voću, povrću i pićima i glavni su sastojci neenergetskog dela ljudske ishrane (Gilaberte i González, 2010). Flavonoidi imaju različit broj fenolnih hidroksilnih grupa (slika 9) u svojoj hemijskoj strukturi i odlični su helatori gvožđa i drugih metala, što ih i čini efikasnim antioksidansima. Oni igraju esencijalnu ulogu u zaštiti organizma od oksidativnog oštećenja. Takođe imaju i terapijske efekte kod mnogih bolesti, kao što su ishemijska bolest srca, ateroskleroza, kancer (Martínez-Flórez i sar., 2002). Flavonoidi, čak i u obliku glikozida su teško rastvorljivi u vodi, imaju lošu bioraspoloživost i veoma lako podležu uticajuma faktora spoljašnje sredine kao što su temperatura, pH, svetlost (Bilia i sar., 2014).

U zavisnosti od njihove hemijske strukture i karakteristika flavonoidi se klasifikuju u sledeće grupe (slika 9): 1) flavanoli, kao što je katehin; 2) flavonoli, kao što je kvercetin; 3) flavoni, kao što je diosmetin; i 4) antocijanidini.

Identifikovano je više od 5000 flavonoida (Ross i Kasum, 2002), a među njima izdvaja se nekoliko sa fotoprotektivnim efektom. Flavonoidi imaju tri različita fotoprotektivna efekta: apsorbuju UV zračenje, imaju direktne i indirektno antioksidantne osobine i modulišu nekoliko signalnih puteva (Gilaberte i González, 2010).

Genistein je izoflavon izolovan iz soje (*Glycine max*), za koga postoje podaci u literaturi da blokira i UVA i UVB zračenje i umanjuje fotokancerogeni efekat i efekat fotostarenja (Saewan i Jimtaisong, 2014; Tundis i sar., 2015). Primena genisteina na humanoj koži sat vremena pre izlaganja UV zracima dovodi do smanjenja eritema i nelagodnosti (Wei i sar., 2003; Gilaberte i González, 2010). Interesantni su podaci da genistein ima protektivni efekat od oštećenja izazvanog sunčevim zračenjem čak i kada se primeni 1 do 4 sata nakon izlaganja ovom zračenju (Brand i Jendrzejewski, 2008; Gilaberte i González, 2010).

Silimarin je flavonoid izolovan iz semena šarenog čkalja (*Sylibum marianum*) i predstavlja smešu 3 flavonoida: silibinina, silidianina i silikristina. Ispitivanja su ukazala da silimarin moduliše veliki broj akutnih i hroničnih efekata UV zračenja kod miševa i

da štiti od kancera kože izazvanog UVB zračenjem (Gilaberte i González, 2010; Saewan i Jimtaisong, 2014).

Ekviol (4', 7 – izoflavandiol) je izoflavonoid koji nastaje u intestinumu sisara usled metabolizma diadzeina od strane bakterijske flore. Primena na koži kod miševa ukazala je na fotoprotektivni efekat (Widyarini, 2006), koji je nešto niži u odnosu na druge flavonoide kao što su njegovi prekursori daidzein ili genistein (Lin i sar., 2008; Gilaberte i González, 2010). Ekviol deaktivira aktivnost *cis*-urokanske kiseline, koja je glavni imunosupresivni fotoproizvod (nastaje u koži usled delovanja UV zračenja) (Saewan i Jimtaisong, 2014).

Kvercetin je flavonoid sa najjačim antioksidantnim osobinama. Podaci o ispitivanju fotoprotektivnih efekata kvercetina su oskudni, ali je pokazano da neke formulacije koje sadrže kvercetin posle primene na koži inhibiraju oštećenja nastala UVB zračenjem kod životinja (Widyarini, 2006; Gilaberte i González, 2010; Saewan i Jimtaisong, 2014). Istraživanje u kome su kvercetin i rutin korišćeni kao filteri UV zraka ukazalo je na njihov potencijal u zaštiti od UVA i UVB zračenja ($SPF_{kvercetin}$ 4,52, $UVA-PF_{kvercetin}$ 5,77; SPF_{rutin} 4,72, $UVA-PF_{rutin}$ 4,92) i da bi se mogli koristiti u kozmetičkim proizvodima (Choquenot i sar., 2008; Korać i Khambholja, 2011).

Apigenin je bioflavonoid koji sprečava fotokarcinogenezu kod miševa inhibirajući efekte UVB zračenja (Tong i sar., 2007; Gilaberte i González, 2010), delovanjem na nivou unutrašnjih i spoljašnjih puteva.

Piknogenol je ekstrakt kore francuskog primorskog bora (*Pinus pinaster subsp atlantica*) koji je rastvoran u vodi i sadrži brojne fenolne i polifenolne flavonoide, uključujući i monomerne procijanidine (katehin, epikatehin, dihidrokvercetin) i oligomerne procijanidine sa različitom dužinom lanca i različitim načinom vezivanja (Rohdewald, 2002; Gilaberte i González, 2010). Primena piknogenola na koži odmah nakon izlaganja zračenju značajno smanjuje i akutne i hronične efekte UV zračenja kod eksperimentalnih životinja (Sime i Reeve, 2004).

Crvena detelina (*Trifolium pretense*) je bogat izvor izoflavona kao što su genistein i daidzein. Njihov efekat, kao i efekat njihovih derivata zasnovan je na

smanjenju edema i imunosupresije do koje dovodi UV zračenje (Widyarini i sar., 2001; Gilaberte i González, 2010; Saewan i Jimtaisong, 2014).

Kapar (*Capparis spinosa*) se koristio u medicinske svrhe kod starih Grka i Rimljana. Primena proizvoda za zaštitu od UV zračenja koji sadrže ekstrakt kapara čak 59,6% inhibira eritem, što je mnogo efikasnije od tokoferil acetata (22%) (Saewan i Jimtaisong, 2014).

Bademovo (*Prunus amygdalus* Batsch) seme je bogato polifenolnim jedinjenjima, posebno flavonoidima i fenolnim kiselinama. Lokalna primena ekstrakta badema pre izlaganja UV zračenju ukazuje na jaku antioksidantnu aktivnost tako što smanjuje nivoe lipidne peroksidacije, a istovremeno povećava nivo glutaciona (Sachdeva i Katyal, 2011; Saewan i Jimtaisong, 2014).

Grožđe (*Vitis vinifera*) se koristi za ishranu širom sveta. Semenke grožđa su bogat izvor polifenola (60-70%), a tu spadaju katehin, epigalokatehin i oligomerni proantocijanidini. Dodatno, sadrži i resveratrol – polifenolni fitoaleksin (Korać i Khambholja, 2011). Lokalna primena resveratrola pre UV zračenja rezultuje značajnom inhibicijom edema kože, inflamacije, ciklooksigenaze i ornitin dekarboksilaze kao i lipidne peroksidacije u koži (Saewan i Jimtaisong, 2014).

Cvetovi biljke poznate kao plamen šume (*Spathodea campanulata*) sadrže flavonoide koji apsorbuju UV zračenje u oblasti 200 – 325 nm i predstavljaju bezbedniju alternativu klasičnim organskim filterima (Patil i sar., 2009; Saewan i Jimtaisong, 2014).

Čaj (*Camelia sinensis*) sadrži veliku količinu antioksidanasa, pre svega katehina. Najzastupljeniji među katehinima je (-) epigalokatehin-3-galat. Ovaj polifenol je „hvatač“ slobodnih radikala i može da apsorbuje UVB zračenje, obezbeđujući zaštitu od imunosupresije i fotokarcinogeneze koju uzrokuje delovanje UVB zraka (Yusuf N i sar., 2007; Saewan i Jimtaisong, 2014). Primenjen na koži, pre izlaganja UV zračenju smanjuje oštećenja DNK i formiranje eritema (Camouse i sar., 2009; Korać i Khambholja, 2011; Saewan i Jimtaisong, 2014).

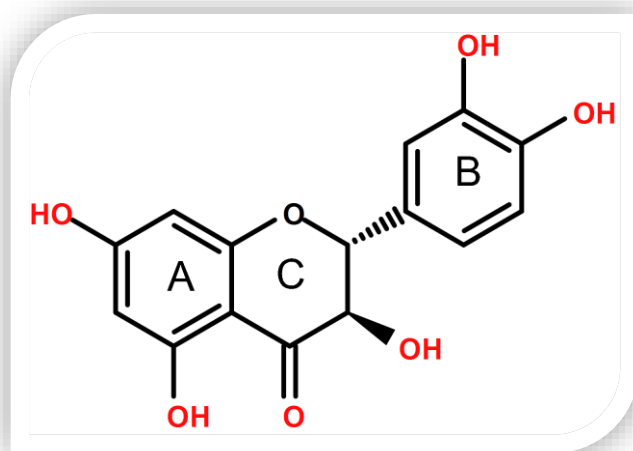
Plod borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) sadrži antocijanine koji su poznati po antioksidantnom delovanju. Njihov fotoprotektivni efekat podrazumeva smanjenja

slobodnih radikala i peroksidacije lipida membrane koje uzrokuju UVA zraci (Svobodová i sar., 2008; Saewan i Jimtaisong, 2014).

Ekstrakt jagode (*Fragaria × ananassa*) bogat je antocijaninima, pa deluje antiinflamatorno, antioksidantno, antimutageno i antikancerogeno, a fotoprotektivne osobine obuhvataju smanjenje oštećenja DNK koje izaziva UVA zračenje, blokadu razgradnje kolagena i inflamatornih reakcija (Giampieri i sar., 2012; Saewan i Jimtaisong, 2014).

1.2.10.1. Dihidrokvercetin

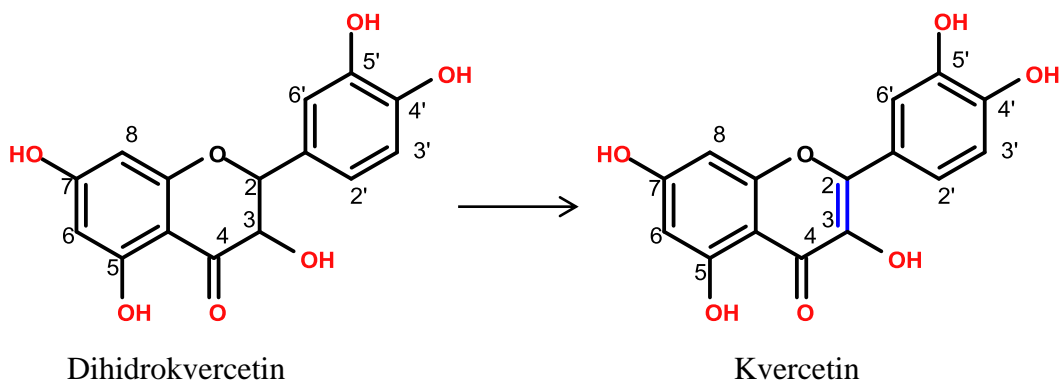
Dihidrokvercetin (DHK), poznat i kao taksifolin (slika 10), je flavonoid, odnosno flavanonol koji je prvi put izolovan iz kore duglazije (*Pseudotsuga taxifolia*) (Kiehlmann i Edmond, 1995; Weidmann, 2012), a nalazi se i u crnom luku (Slimestad i sar., 2007; Weidmann, 2012), šarenom čkalju (Wallace i sar., 2005; Weidmann, 2012), francuskom primorskom boru (Rohdewald, 2002; Weidmann, 2012), drvetu Dahurian i sibirskog ariša (*Larix sibirica* Leder. i *Larix gmelini* Rupr. (Rupr), *syn Larix dahurica* Turoz (*Pinaceae*) (Pew, 1948). HPLC analizom otkriveno je da DHK postoji u dve forme *trans* i *cis* i da kristališe kao dve nezavisne molekule u ćeliji (Nifant'ev i sar., 2006; Weidmann, 2012). Tačke topljenja za dihidrokvercetin su u opsegu od 218 °C do 253 °C (Kiehlmann i Edmond, 1995; Weidmann, 2012) i oba izomera DHK su rastvorljiva u vodeno-alkoholnom rastvoru i polarnim rastvaračima.



Slika 10. Strukturna formula dihidrokvercetina

Poznato je da (+)*trans*-dihidrokvercetin oksiduje aktivnije, donirajući atom vodonika i stvarajući kvercetin kao proizvod oksidacije (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one) (Rogozhin i Peretolchin, 2009; Weidmann, 2012). Dihidrokvercetin i kvercetin se razlikuju po jednom strukturnom elementu, a to je prisustvo/odsustvo C2, C3 dvostruke veze u C-prstenu. DHK je klasifikovan kao antioksidans (Kurth i Chan, 1951; Weidmann, 2012) i ispunjava dva od tri kriterijuma za efikasnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala, prisustvo o-dihidroksi strukture u B prstenu potvrđuje stabilnost i 5- i 7-OH grupa sa 4-okso funkcionalnom grupom u A i C prstenovima koji su odgovorni za maksimalan potencijal hvatanja slobodnih radikala (Salah i sar., 1995; Weidmann, 2012) (slika 10).

Nedostatak 2, 3 dvostruke veze u sprezi sa 4-okso funkcionalnom grupom u C-prstenu čini ga manje moćnim od drugih flavonoidnih antioksidanasa koji sadrže ovu 2, 3 dvostruku vezu kao što je njegov proizvod oksidacije i planarni hidrofobni ekvivalent, kvercetin (Seyoum i sar., 2006; Weidmann, 2012) (slika 11). Ispitivanjem analoga kvercetina potvrđeno je da su hidroksi grupe na položajima 3, 3' i 4' bitne za njihovu antioksidantnu aktivnost, ali su istovremeno i fotonestabilne, dok -OH grupe na položajima 5 i 7 nemaju bitnu ulogu u fotooksidativnom mehanizmu (Dall'Acqua i sar., 2012). Pokazano je da taksifolin primenjen u dozi od 100 mg/kg inhibira proizvodnju superoksid anjona, štiti mitohondrije od oštećenja peroksi radikalima i inhibira aktivaciju nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) zavisne citohrom P450 reduktaze indukovane mikrozomalnom lipidnom peroksidacijom (Haraguchi i sar., 1996; Weidmann, 2012) pokazujući na ovaj način sličnost sa antioksidantnim profilom α -tokoferola (Teskin i sar., 1996; Weidmann, 2012).



Slika 11. Biotransformacija dihidrokvercetina u kvercetin (Davies i Yáñez, 2012).

Poznata je sposobnost DHK da apsorbuje UV zrake u većem delu UV spektra, pri čemu maksimalnu apsorpciju postiže na 225 nm i na 325 nm (Philippov i Bogorodov, 2013; Panyushin i sar., 1999). DHK doprinosi smanjenju reakcija preosetljivosti kože na spoljašnje agense, ublažava zapaljenske reakcije u koži, smanjuje nastale iritacije na koži (Bito i sar., 2002; Fei i sar., 2005; Cai i sar., 2003) i čak suprimira UV indukovanu karcinogenezu u koži tako što deluje na EGF (engl. *epidermal growth factor*) receptor (receptor epidermalnog faktora rasta) i fosfoinozimid 3-kinazu (Oi i sar., 2012).

Taksifolin se nalazi na tržištu kao dijetetski suplement u Ruskoj Federaciji, Švajcarskoj i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) još od '90-ih. Poslednjih 20 godina taksifolin se, zbog antioksidantnog delovanja, koristi kao aditiv u hrani (u mleku, mesu i konditorskim proizvodima, u mastima i uljima kao i u alkoholnim i nealkoholnim pićima) u Ruskoj Federaciji (*Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council*; Davies i Yáñez, 2012). Dodatno, taksifolin se koristi i u kozmetičkim proizvodima kao antioksidans (baza podataka evropske komisije o kozmetičkim materijalima – CosIng, dostupna na sajtu: http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=85413).

Dihirokvercetin je supstanca koja poseduje veoma nisku toksičnost (Schauss, i sar., 2015). Efikasan je antioksidans u gotovom prehrambenom proizvodu čak i u niskim koncentracijama ako se proizvod izrađuje i skladišti pod normalnim uslovima. DHK je stabilan na visokim temperaturama, koje su uobičajene u tehnološkim procesima proizvodnje nekih prehrambenih proizvoda. DHK je beo do svetlo žut prašak koji kristališe iz vodenog rastvora koji je prethodno bio zagrejan do ključanja. Rastvorljivost taksifolina u vodi na različitim temperaturama ima eksponencijalni karakter: na sobnoj temperaturi, rastvorljivost je 0,1%; na 40 °C – 0,3%; na 60 °C – 1%; na 90 °C – 3-5,3% (Radaeva i sar., 1997; Chernukha i Kononenko, 2009) a rastvorljivost u ključaloj vodi je 9,3% (Kurth i Chan, 1951). Taksifolin je umereno rastvoran u alkoholu/etanolu, 96% v/v. Njegova rastvorljivost u vodeno-alkoholnom rastvoru raste od 0,1% do 18% kako se udeo mase alkohola povećava od 30% do 90% (Radaeva i sar., 1997; Chernukha i Kononenko, 2009). Taksifolin je nerastvoran u hloroformu, etru i benzenu (Radaeva i sar., 1997; Tyukavkina i sar., 1967).

1.3. Ispitivanje kozmetičkih proizvoda

Razvoj kozmetičkog proizvoda je dug proces koji se sastoji iz dve ključne, nerazdvojne faze: formulisanje i testiranje. Svaki novi proizvod, mora proći određena ispitivanja/testove kojima će biti potvrđen njegov kvalitet, bezbednost i efikasnost (Rogiers i Pauwels, 2008; Salvador i Chisvert, 2011). U tom pogledu, svaki kozmetički proizvod mora ispuniti zahteve koji su propisani nacionalnim, regionalnim ili međunarodnim propisima kao što su uredbe američke federalne agencije za hranu i lekove *The Food and Drug Administration – FDA*, ili evropske komisije *European Commission*, itd, vodičima kozmetičkih udruženja kao što je profesionalno udruženje evropske industrije za ličnu negu *Cosmetics Europe* (poznato pod ranijim nazivom *COLIPA*) ili odbor za proizvode za ličnu negu *Personal Care Product Council – PCPC*, poznat i pod ranijim nazivom udruženje proizvođača za ličnu higijenu i arome *the Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association – CTFA*, naučnim savetodavnim odborima kao što je naučni komitet za bezbednost potrošača *the Scientific Committee on Consumer Safety – SCCS* i baza podataka evropske komisije o kozmetičkim materijalima (CosIng).

Uredba EU 1223/2009 (Regulation EC 1223/2009) o kozmetičkim proizvodima (poznata i kao EU kozmetička uredba) donela je između ostalog i zahteve u pogledu ispitivanja bezbednosti gotovog kozmetičkog proizvoda, nove zahteve za obeležavanje kozmetičkog proizvoda, nove kriterijume za tvrdnje o efikasnosti kozmetičkog proizvoda i praćenju proizvoda nakon plasiranja na tržište (kozmetovigilanca). Ranije preporuke o formiranju posebnog kozmetičkog dokumenta, *Product Information File – PIF*, od 2013. godine postale su obaveza za sve, stupanjem na snagu EU kozmetičke uredbe. U okviru ovog dokumenta, pored stabilnosti kao i fizičkih i hemijskih karakteristika kozmetičkog proizvoda, najviše pažnje se usmerava na formiranje toksikološkog profila kozmetičkog proizvoda. Preporuke su da se toksikološki profil formira na osnovu toksikološkog profila sastojaka koji ulaze u sastav kozmetičkog proizvoda. S obzirom da se kozmetički proizvodi primenjuju na koži različitih delova tela, neophodno je da su otporni na uticaj temperature i stabilni tokom dužeg perioda, odnosno moraju imati obeležen rok upotrebe ili period nakon otvaranja - PAO (engl. *period after opening*) ako su proizvodi sa rokom preko 30 meseci. Stoga se, prilikom formulisanja i razvoja novog kozmetičkog proizvoda, mora ispitati stabilnost i fizičko-hemijske osobine bazne/osnovne formulacije (Saraf i

sar., 2012). Potvrda stabilnosti, otvara mogućnost daljeg testiranja formulacije koji obuhvataju procenu njene efikasnosti i daju informacije bitne za dalji razvoj formulacije i proizvodnju gotovog kozmetičkog proizvoda. Testovi efikasnosti obuhvataju sledeće eksperimentalne pristupe i njihove kombinacije: 1) senzorni pristup (vid, dodir, miris) od strane potrošača ili eksperata; 2) instrumentalni pristup koji favorizuje merenje specifičnih kriterijuma korišćenjem *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro* pristupa koji ne reprodukuju normalne uslove tokom korišćenja proizvoda, ali omogućavaju objektivnu analizu pod kontrolisanim uslovima (*COLIPA Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products, 2008*).

1.3.1. Senzorna analiza kozmetičkih proizvoda

Prva interesovanja za senzornu procenu vezuju se za industriju hrane i pića. Najveći podsticaj razvoju senzorne procene dala su istraživanja američke vlade tokom 40-ih i 50-tih godina prošlog veka koja je ulagala velike napore da obezbedi hranu koju će vojnici prihvatiti (Peryam i sar., 1954). Našavši svoje mesto u prehrambenoj industriji, senzorna analiza je nastavila da se razvija. Međutim, tehnike koje se koriste u okviru senzorne analize mogu se primeniti i na ostale proizvode, uključujući kozmetičke proizvode i proizvode za ličnu negu, sapune, deterdžente, kućnu hemiju, itd. Senzorni profil proizvoda, odnosno njegove osobine pre, tokom i nakon nanošenja, dobijaju se sprovođenjem studija senzorne procene sa treniranim i netreniranim/neobučanim dobrovoljcima/ispitanicima (Lukic i sar., 2013; Henning, 2015). Senzorna procena definiše karakteristike kozmetičkog proizvoda koje izražavaju čulne reakcije. Postoje različiti testovi i standardne procedure koje se koriste u senzornoj analizi, a obuhvataju diskriminativne, deskriptivne i hedonističke testove.

Diskriminativnim testovima, koji spadaju u objektivne testove, utvrđuju se razlike među proizvodima i pomoću njih dobija se odgovor na pitanje: *Da li su proizvodi različiti ili ne?*, ali se ta razlika ne kvantifikuje tj. ne dobija se odgovor na pitanje: *Koliko su proizvodi različiti?* Diskriminativni testovi obuhvataju: trougao test, duo-trio test, poređenje parova i rangiranje. Ovi testovi posebno su pogodni pri razvoju novog

proizvoda, unapređenju kvaliteta proizvoda, promeni formulacije, tokom kontrole kvaliteta i ispitivanja stabilnosti proizvoda.

Za razliku od diskriminativnih testova, deskriptivni testovi predstavljaju najsofisticiraniji metod kojim se opisuju razlike među proizvodima kao i relativni intenzitet njihovih atributa. Proizvode procenjuje panel sačinjen od dobro utreniranih stručnjaka, pridržavajući se i poštujući određene, definisane protokole. Senzorni atributi se identifikuju, definišu i kvantitativno procenjuju pomoću određenih skala. Dobijeni senzorni profili mogu se upoređivati pomoću linearnih grafika ili radar dijagrama. Deskriptivna analiza može se koristiti prilikom razvoja novih proizvoda, tokom kontrole kvaliteta, ispitivanja stabilnosti proizvoda kao i interpretacije odgovora korisnika na proizvod i uspostavljanja određenih korelacija između senzornih osobina i fizičkih i hemijskih rezultata (Parente i sar., 2005). U okviru svoje doktorske disertacije, Lukić M. se bavila uspostavljanjem korelacija između senzornih osobina i instrumentalnih metoda (reološka i teksturna merenja), pri čemu je došla do zaključka da se senzorni atributi koji zavise od fizičkih karakteristika emulzije i opisuju ponašanje kozmetičkog proizvoda u toku uzimanja i nanošenja na kožu, mogu donekle predvideti reološkim i teksturnim merenjima (Lukić, 2014).

Ispitivanje emulzionih sistema zasnovano je na proceni unapred definisanih senzornih atributa pomoću odabranog panela ispitanika u skladu sa postojećim Standardima za ispitivanje senzornih karakteristika koje je postavila internacionalna organizacija za standarde u oblasti senzornih studija ASTM – engl. *American Society for Testing and Materials* (ASTM Committee E 1490-03. Standard, 2003). Pre procene svaki senzorni atribut definiše se opisno i skalom uz precizno navođenje načina na koji se vrši njegovo određivanje.

1.3.2. *In vivo* ispitivanje efikasnosti kozmetičkih proizvoda tipa emulzija

Uredba EU 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima donela je nove zahteve u pogledu bezbednosti gotovog kozmetičkog proizvoda, ali i obavezu ispitivanja efikasnosti kozmetičkog proizvoda pre nego što se proizvod nađe na tržištu. Zapravo, na kozmetičkom proizvodu ni jedna tvrdnja o efikasnosti tog proizvoda ne može se postaviti pre nego što bude potvrđena odgovarajućim ispitivanjima/testiranjima (*Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products*; Dobrev, 2010; Clarys i Barel, 2014; Henning, 2015). Da bi se ispunili ovi zahtevi, kozmetički aktivni sastojci i gotovi proizvodi moraju biti testirani, što uključuje učešće humanih dobrovoljaca, a sa ciljem procene njihove bezbednosti, kompatibilnosti i efikasnosti (Dobrev, 2010). Testovima bezbednosti koji se izvode na humanim dobrovoljcima, obično su predhodila testiranja na životinjama ili primena *in vitro* metoda, dok se testovi efikasnosti sprovode kada postoji dokaz da proizvod neće dovesti do nekih lokalnih ili sistemskih neželjenih efekata. (Dobrev, 2010). Međutim, od 2009. godine stupila je na snagu zabrana testiranja kozmetičkih sastojaka i gotovih proizvoda na životinjama, pri čemu je data prednost alternativnim metodama koje bi mogle da smanje ili zamene upotrebu laboratorijskih životinja u svrhe testiranja (Dobrev, 2010; Henning, 2015). Za ispitivanje efikasnosti kozmetičkog proizvoda mogu se koristiti dva pristupa: senzorni i instrumentalni pristup (*COLIPA Guidelines for the evaluation of the efficacy of cosmetic products, 2008*). Senzorni pristup uključuje učešće humanih dobrovoljaca i o njemu je detaljnije pisano u odeljku 1.3.1. Iako se primenom senzorne analize dobijaju podaci koji su pre svega bitni za marketing proizvoda i prihvatljivost od strane korisnika/potrošača, prednost se uvek daje objektivnijem, instrumentalnom pristupu.

Tehnike bioinženjeringa kože spadaju u neinvazivne, objektivne tehnike i uspešno se primenjuju u proceni, pre svega, efikasnosti kozmetičkog proizvoda (Clarys i Barel, 2014), ali daju i neke informacije o bezbednosti proizvoda (Dobrev, 2010; Henning, 2015). Metodama bioinženjeringa kože koje uključuju merenje biofizičkih parametara na koži (TEGV kao mera funkcionalnosti lipidne barijere SC, eritem indeks

(EI), električna kapacitivnost (EC) kao mera sadržaja vlage u *SC* i pH kože) dobrovoljaca može se, preliminarno, *in vivo* odrediti efikasnost i bezbednost uzoraka emulzija, odnosno njihov potencijal da dovedu do iritacija kože (Henning, 2015).

Merenje TEGV ima široku primenu i uglavnom se koristi kao potvrda efikasnosti kod proizvoda za hidrataciju kože u koje spadaju i proizvodi za zaštitu od UV zračenja i za negu kože nakon izlaganja sunčevom zračenju. TEGV ukazuje na kvalitet kožne barijere i njenu sposobnost da zadrži vodu u svojoj unutrašnjosti (Taylor, 2008). Pored toga, TEGV se može koristiti da ukaže na razlike između različitih tipova i formulacija emulzija. Tako će emulzije tipa v/u, zbog formiranja masnog filma na koži, doprineti smanjenju TEGV (Taylor, 2008). Iako su *SWOP* emulzije, emulzije tipa u/v, imaju sličan efekat na kožu kao i emulzije tipa v/u, zbog njihove osobine da se tokom primene invertuju i formiraju masni film preko kože.

Slično, merenjem električnih karakteristika kože koje su u vezi sa sadržajem vode u *SC* može se proceniti stanje hidratisanosti kože (Taylor, 2008; Jeong i sar., 2013). Merenja električne kapacitivnosti kože, koja se vrše u kratkom vremenskom periodu odmah nakon nanošenja uzorka emulzije, mogu poslužiti i kao potvrda vodootpornosti primenjenog proizvoda (Beuché i sar., 2008).

Primena emulzije sa aktivnom supstancom na koži može dovesti do iritacija kože, pri čemu će se promeniti boja kože (javiće se crvenilo, tj. eritem), pa se merenjem određenih biofizičkih parametara kože (eritem indeks – *EI*) može proceniti ne samo efikasnost već i bezbednost kozmetičkog proizvoda (Henning, 2015).

Aktivne supstance dominantno, ali i druge komponente emulzije mogu uticati na pH kože i značajno ga promeniti, mada na površini kože deluje puferski kapacitet kože koji će održavati fiziološki kiseo pH površine kože do određenih granica. Normalno, pH kože se kreće u rasponu 4,5 – 6 i bitno je da primenjeni proizvodi to ne naruše, kako bi osnovna funkcija kože da štiti organizam od spoljašnjih, negativnih uticaja, bila sačuvana. Ipak, zbog stabilnosti i efikasnosti kozmetičkog proizvoda, pH određenog kozmetičkog proizvoda ne može biti u uskom području pH 5 – 6.

Rezultati merenja biofizičkih parametara kože kao što su: pH kože, TEGV, električna kapacitivnost, EI, značajno zavise od uslova u kojima se ispitivanja izvode,

odnosno pod uticajem su faktora iz spoljašnje sredine u kojoj se merenja sprovode (Boer i sar., 2016). Ispitivanja treba sprovoditi na relaksiranim dobrovoljcima koji su se adaptirali (u toku 30 minuta) na uslove sredine u kojoj se merenje izvodi. Preporuka je da to budu prostorije sa kontrolisanom temperaturom (20 – 23 °C) i vlažnošću vazduha (40 – 60% RH). Volarna strana podlaktice ispitanika je pogodna za primenu ispitivanih uzoraka i merenje parametara (Pinnagoda i sar., 1990; Berardesca, 1997; Piérard, 1998).

1.3.3. *In vitro* određivanje *SPF* i *UVA-PF* kozmetičkih proizvoda za zaštitu od UV zračenja

Proizvodi za zaštitu od UV zračenja, u zavisnosti od dela sveta, gde će se naći na tržištu, različito se klasifikuju kao: kozmetički proizvodi (Evropa, Južna Amerika), kvazi lekovi (Japan i pojedini delovi Azije), OTC (engl. *over-the-counter*) (SAD i Kanada) ili terapijski proizvodi (Australija). Bez obzira na klasifikaciju svi proizvodi koji sadrže supstance za zaštitu kože od UV zračenja podležu testovima za određivanje *SPF* i *UVA-PF*, testovima za određivanje vodootpornosti i testovima za ispitivanje stabilnosti. Nekada je za kozmetički proizvod namenjen zaštiti od UV zračenja bilo dovoljno samo odrediti *SPF* (Baumann i sar., 2008). Postupak određivanja detaljno je opisan u vodiču koji je 1994. godine izdala COLIPA, a 2006. godine je usvojen kao međunarodni metod (*International Sun Protection Factor (SPF) Test Method*). Međutim, određivanje *SPF* je zasnovano na delovanju UVB zraka i nije dobar pokazatelj zaštite od UVA zraka, za koje se pokazalo da dovode do značajnih štetnih efekata na koži. Uz to, prethodno pomenut metod za određivanje *SPF*, koristi eritem, kao odgovor kože na UV zračenje, i izvodi se *in vivo*, uz učešće bar 10 do 20 dobrovoljaca (Albuszies i Müller, 2014). Ovakvi testovi zahtevaju vreme, novac, a dodatno se postavlja pitanje etičke opravdanosti, pa se još od kraja 80-ih razmatra mogućnost da se *in vivo* testovi zamene sa *in vitro* testovima (Stokes i Diffey, 2000; Bendová i sar., 2007), kad god je to moguće, kao i da se ispita fotodegradacija korišćenih filtera u proizvodu. *In vitro* test se bazira na fizičkom i optičkom određivanju smanjenja energije u UV oblasti, kroz sloj proizvoda koji je prethodno nanet na odgovarajući supstrat (Pissavini i sar., 2003). Postoje dve metode za *in vitro* određivanje *SPF* i to su: merenje apsorpcije ili transmisije UV zračenja kroz sloj

proizvoda za zaštitu od UV zračenja na kvarcnoj pločici ili biomembranama, i određivanje apsorpcionih karakteristika supstanci za zaštitu od UV zračenja spektrofotometrijskom analizom razblaženog rastvora (Mansur i sar., 1986; Gordon, 1993; Walters i sar., 1997; Fourneron i sar., 1999; Pissavini i sar., 2003). Pošto se javljaju velike razlike u rezultatima dobijenim *in vitro* metodama, velika pažnja posvećuje se izboru supstrata koji bi trebalo da simulira ljudsku kožu, kao i postizanju homogenosti prilikom nanošenja proizvoda (Bendová i sar., 2007). Odabrani supstrat bi trebalo da bude UV transparentan, nefluorescentan, fotostabilan i inertan u odnosu na sve sastojke proizvoda koji se testira (*COLIPA Method for the in vitro determination of UVA protection provided by sunscreen products*; 2007), a uz to treba da ima optičke i fizičko-hemijske karakteristike bliske koži (Garoli i sar., 2009). Do sada, još uvek nije definisan standardni materijal za ovu metodu. Najčešće se kao supstrat koristi hrapava polimetilmetakrilatna (PMMA) pločica, Transpore® (Diffey i Robson, 1989), Vitro-Skin® (Diffey i sar., 2000), hrapava kvarcna pločica i Teflon (PTFE) (Garoli i sar., 2008). Spektralna propustljivost proizvoda za zaštitu od UV zračenja u ultraljubičastom delu spektra može se koristiti za predviđanje *in vitro* SPF vrednosti zasnovane na standardnim podacima o eritemu i solarnom zračenju (Sprincsteen i sar., 1999). *In vitro* SPF se izračunava na sledeći način:

$$SPF_{in\ vitro} = \frac{\int_{290\ nm}^{400\ nm} E_{\lambda} I_{\lambda} d_{\lambda}}{\int_{290\ nm}^{400\ nm} E_{\lambda} I_{\lambda} T_{\lambda} d_{\lambda}}$$

gde je E_{λ} – eritemalni spektar, I_{λ} – spektralno zračenje koje potiče od UV izvora, T_{λ} – spektralna propustljivost (transmisija) uzorka, d_{λ} – talasna dužina (1 nm). E_{λ} i I_{λ} su dve standardne funkcije koje opisuju relativnu osetljivost eritema na individualne talasne dužine i spektralnu distribuciju sunčeve svetlosti koja dopire do Zemlje (Matts i sar., 2010). Apsorpcioni spektar je najrelevantniji parametar za definisanje zaštitnih osobina proizvoda za zaštitu od UV zračenja (Sprincsteen i sar., 1999).

Mansur (Mansur i sar., 1986) je razvio veoma jednostavnu matematičku jednačinu koja može da zameni *in vitro* metod, a predložio je Sayre (Sayre i sar., 1979), koristeći UV spektrofotometar:

$$SPF_{\text{spektrofotometrijski}} = CF \times \sum_{290 \text{ nm}}^{320 \text{ nm}} EE_{\lambda} I_{\lambda} A$$

EE – eritemalni efektivni spektar pri talasnoj dužini λ , I – solarni spektar intenziteta pri talasnoj dužini λ , A – apsorbcija proizvoda za zaštitu od UV zračenja na talasnoj dužini λ , CF – korekcionni faktor = 10.

Određivanje se vrši tako da standardna formulacija za zaštitu od UV zračenja koja sadrži 8% m/m homosalata (prema propisima FDA – *Office of The Federal Register EILLC. Title 21 Food and Drugs Parts 300 to 499 (Revised as of April 1, 2014): 21-CFR-Vol-5: U.S. Government Printing Office; 2014*) ima *SPF* vrednost 4 (određeno UV spektrofotometrijski).

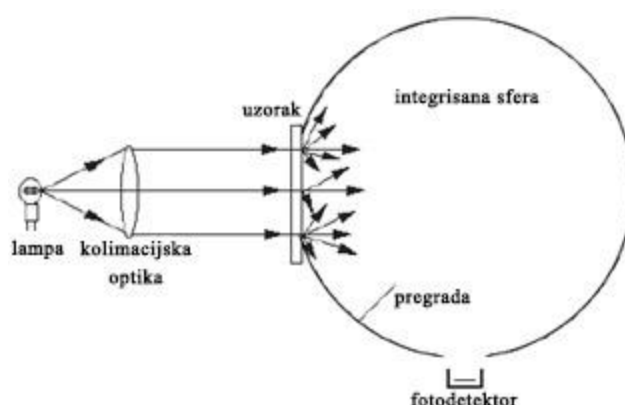
Za Mansura (Mansur i sar., 1986), kada se procenjuje proizvod za zaštitu od UV zračenja spektrofotometrijski, nije dovoljno da se identifikuje kalibraciona kriva. Potrebno je identifikovati i visinu, širinu i položaj kalibracione krive dobijene u UV spektru kako bi se izvršio preračun *SPF*.

Ispitivanja koja je izvršio Heinrich (Heinrich i sar., 2004) pokazuju da korelacija između *in vitro* i *in vivo* podataka zavisi od količine primenjenog proizvoda, a veoma je teško dobiti odnos 1:1. Međutim i drugi parametri kao što su: tip formulacije, tip supstrata, moguće hemijske reakcije između supstrata i proizvoda za zaštitu od UV zračenja, uređaj za merenje utiču na nivo korelacije. Zbog svega ovoga smatra se da se *in vitro SPF* testiranje ne može uzeti kao apsolutno i nije zamena za *in vivo* testiranje. Studije pokazuju da *in vitro* testiranje može biti korisno u odabiru najbolje formulacije za testiranje na dobrovoljcima (Velasco i sar., 2011). Međutim, drugi naučnici (Bendová i sar., 2007) prednost daju *in vitro* testiranju u odnosu na *SPF COLIPA* metod testiranja *in vivo* iz razloga smanjenja rizika koji se odnose na izlaganje dobrovoljaca UV zračenju tokom razvoja proizvoda za zaštitu od UV zračenja. Dodatno, sa uspostavljanjem kontrole

mnogih parametara koji utiču na merenja u *in vitro* uslovima, postignuta je reproduktivnost rezultata, dok reproduktivnost rezultata pri *in vivo* testiranju nije postignuta. Na osnovu ovih dokaza *in vitro* testiranje proizvoda za zaštitu od UV zračenja pokazalo se kao preciznije i tačnije, i moglo bi se iskoristiti za usavršavanje *in vivo* metode (Lutz i sar., 2015).

Međutim, kako je već pomenuto, istraživanja su pokazala da nije dovoljno zaštititi se samo od UVB zračenja, već da je važna zaštita i od UVA zračenje. Zbog toga je razvoj proizvoda za zaštitu od UV zračenja bio usmeren ka proizvodima širokog spektra zaštite za koje je neophodno pokazati da štite i u UVA oblasti.

COLIPA je 2011. godine objavila vodič za *in vitro* određivanje UVA-PF i kritične talasne dužine (*COLIPA Guidelines Method for in vitro determination of UVA protection, 2011*), koji je 2012. godine objavljen kao standard *EN ISO 24443:2012 Cosmetics – Sun protection test methods – In vitro determination of sunscreen UVA photoprotection*.



Slika 12. Shema spektrofotometra sa integrisanom sferom (dostupno na sajtu: <http://webx.ubi.pt/~hgil/FotoMetria/PDF's-DOC's/PDF's-DOC's.html>)

U te svrhe koristi se UV-VIS spektrofotometar sa integralnom sferom (slika 12). *SPF in vitro* predstavlja količnik integralne energije od 290 nm do 400 nm (razlika je 110 nm), ulazne i izlazne energije. Računa se suma po 1 nm odnosno suma 110 tačaka ulazne/suma 110 tačaka izlazne energije. Prilikom merenja koriste se kontrolni uzorci sličnog tipa proizvoda koji pokazuju slične rezultate u odgovarajućem izabranom intervalu.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Emulzioni sistemi različite konzistencije široko se koriste kao nosači različitih kozmetički aktivnih supstanci čija delovanja/kozmetički efekti treba da budu ispoljeni na koži. Prihvatljivost kozmetičkih emulzija od strane korisnika/potrošača, zavisi od velikog broja faktora među kojima najznačajnije mesto zauzimaju senzorne karakteristike, kao što su izgled, tekstura i osećaj koji ostavljaju na koži. Prilikom dizajna i razvoja kozmetičkih emulzija za različite namene treba imati u vidu sve zahteve koji se postavljaju sa aspekta fizičko-hemijske stabilnosti, postizanja planiranog kozmetičkog efekta, bezbednosnog profila i senzornih karakteristika.

Uobičajene karakteristike emulzija tipa v/u, a posebno ako su formulisane sa tradicionalnim v/u emulgatorima, su: da posle primene ostavljaju „bogat“ osećaj na koži, da su masne i formiraju masni (ponekad okluzivni) film preko kože koji doprinosi hidrataciji kože, ali se slabo mešaju sa vodom i teško se spiraju sa kože. Suprotno njima, emulzije tipa u/v su lagane teksture, lako se utrljavaju, ali se i lako mešaju sa vodom i veoma brzo spiraju sa kože. Poslednjih godina, razvijena je nova klasa emulzija poznatih kao metastabilne emulzije tipa u/v, tzv. *SWOP* emulzije, zasnovane na *SWOP* tehnologiji. Osnovna karakteristika ovog sistema je prelazak emulzije tipa u/v u emulziju tipa v/u prilikom primene na kožu. Ova tehnologija razvijena je sa ciljem da se objedine/udruže najbolje osobine emulzija tipa u/v i v/u u jednom sistemu. Smatra se da ovakvi sistemi mogu naći primenu u kozmetičkim proizvodima za suhu kožu, za negu kože beba i dece, a da su posebno interesantni za proizvode za zaštitu od UV zračenja. Kvalitet proizvoda za zaštitu od UV zračenja, pored dobro odabranih UV filtera u odgovarajućoj koncentraciji koji obezbeđuju adekvatnu zaštitu od UV zraka, zavisi i od njihove supstantivnosti, a ona je, u najvećoj meri, određena brzinom kojom voda spira supstance koje apsorbuju i/ili reflektuju UV zrake. Smatra se da se *SWOP* emulzije mogu koristiti kao pogodni, kompatibilni nosači različitih UV filtera.

Poznato je da su neki organski filteri ograničene fotostabilnosti (avobenzon, etilheksil metoksicinamat), skloni rekristalizaciji (benzofenon-3) ili penetraciji u dublje slojeve i da prilikom kombinovanja različitih organskih UV filtera može doći do interakcija među njima i potencijalnih toksičnih efekata. Postoji tendencija da se procenat organskih UV filtera smanji u savremenim formulacijama proizvoda za zaštitu od UV

zračenja, pa se kao jedna od mogućnosti razmatra primena određenih biljnih ekstrakata i izolovanih biljnih sastojaka kao fotoprotektivnih supstanci.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je bio da se izvrši sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija nove klase emulzionih sistema tipa u/v, baziranih na *SWOP* (engl. *Switch-Oil-Phase*) tehnologiji, za koje je karakteristično da tokom primene na koži podležu inverziji faza i prelaze u emulzije tipa v/u. Planirano je da se ispita stabilizacioni potencijal emulgatorskog sistema baziranog na prirodnom nejonskom emulgatoru tipa gliceril estara masnih kiselina (INCI: *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate*) i blagom anjonskom surfaktantu iz nove generacije alkilpoliglukozida (APG) (INCI: *Sodium Lauryl Glucose Carboxylate, Lauryl Glucoside*), kao i da se sagleda koloidna struktura ovog emulzionog sistema u cilju boljeg razumevanja koncepta brze inverzije faza *SWOP* emulzija u kontaktu sa kožom. Nakon sveobuhvatne karakterizacije pripremljenih uzoraka *SWOP* emulzije, u uzorak sa optimalnim karakteristikama će biti inkorporirana odabrana/model kozmetički aktivna supstanca prirodnog porekla dihidrokvercetin (INCI: *Dihydroquercetin*) u cilju procene pogodnosti *SWOP* emulzije kao nosača za ovu KAS i ispoljavanje fotoprotektivnog potencijala (zaštita od UV zračenja).

U skladu sa navedenim eksperimentalni rad u okviru doktorske disertacije podeljen je u tri faze, a ciljevi pojedinih faza bili su:

I faza eksperimentalnog rada

- da se formulišu emulzije tipa u/v stabilisane nejonskim emulgatorom iz grupe gliceril estara masnih kiselina (INCI: *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate*) i blagim anjonskim surfaktantom iz nove generacije APG (INCI: *Sodium Lauryl Glucose Carboxylate, Lauryl Glucoside*) u odnosu 4:1,5 neophodnom za građenje *SWOP* emulzija i uz variranje komponenti masne faze (ulja) sa i bez dodatka polimernog stabilizatora vodene faze (INCI: *Sodium Polyacrylate* i *Xanthan Gum*) kako bi se ispitaio uticaj različitih stabilizatora na stabilnost emulzionog sistema. Primenjene su i varijacije u tehnološkom postupku kako bi se odabrao najbolji način za izradu ovih emulzija.

- da se izvede sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija i ispita fizička stabilnost emulzionog sistema u cilju izbora optimalne formulacije.
- da se formulišu poredbene emulzije tipa u/v i v/u sa odgovarajućim emulgatorima (smeša nejonskih emulgatora u glicerolu (INCI: *Lauryl Glucoside, Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate, Glycerin*) za emulziju tipa u/v i kombinacija nejonskog emulgatora tipa v/u (INCI: *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate*) sa nejonskim koemulgatorom tipa v/u (INCI: *Polyglyceryl-3 Diisostearate*) za emulziju tipa v/u) i sa kvalitativno i kvantitativno identičnim komponentama masne faze u odnosu na izabranu optimalnu formulaciju, a u cilju sveobuhvatnog poređenja izabrane optimalne formulacije sa poredbenim uzorcima.
- da se ispita stabilnost izabranih emulzija u dužem vremenskom periodu (prirodno starenje 90 dana) kao i tokom ubrzanog testa starenja i da se izvrši poređenje dobijenih rezultata.

II faza eksperimentalnog rada

- da se ispita sposobnost izabrane optimalne formulacije/uzorka da se invertuje u određenom vremenskom intervalu (30 minuta).
- da se ispita koloidna struktura izabrane optimalne formulacije/uzorka emulzije primenom odgovarajućih metoda i korišćenjem poredbenih emulzija (i binarnih sistema) tipa u/v i v/u radi poređenja, a u cilju potpunijeg razumevanja mehanizma inverzije faza.
- da se uradi detaljna reološka karakterizacija *SWOP* emulzija i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u pod različitim uslovima: u prisustvu jona, pri razblaženju i pri povišenoj temperaturi (32 °C).
- da se ispitaju senzorne osobine *SWOP* emulzije u poređenju sa poredbenim emulzijama tipa u/v i v/u i uspostave korelacije između senzornih osobina i reološkog ponašanja *SWOP* emulzije.

III faza eksperimentalnog rada

- da se ispita mogućnost inkorporiranja odabrane aktivne supstance dihidrokvercetina (DHK) u *SWOP* emulziju.
- da se odredi potencijal DHK u *SWOP* emulziji kao nosaču u zaštiti od UV zračenja kroz *in vitro* određivanje faktora zaštite od UV zračenja (engl. *sun protection factor – SPF* i *UVA protection factor – UVA-PF*).
- da se uradi *in vivo* preliminarna procena efikasnosti (efekat vlaženja, uticaj na barijernu funkciju kože) i bezbednosnog profila (uticaj na eritem indeks i pH kože) *SWOP* emulzije i rezultati uporede sa rezultatima dobijenim za poredbenu emulziju tipa u/v (sa inkorporiranom supstancom DHK).

Sva *in vivo* ispitivanja u okviru eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije su odobrena od strane Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (odluka br. 1462/2 od 18.07.2014. godine). Svi ispitanici su potpisali odgovarajući informisani pristanak.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Materijali

Za formulisanje i pripremu *SWOP* i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u korišćene su sirovine/materijali prikazane u tabeli 4.

Tabela 4. Materijali korišćeni za izradu uzoraka

Trgovački naziv i proizvođač	INCI naziv supstance (srpski naziv)	Funkcija u kozmetičkom proizvodu	Kvalitet
Dehymuls® PGPH BASF(Cognis), Nemačka	Polyglyceryl-2 dipolyhydroxystearate (Poligliceril-2 dipolihidroksistearat)	Nejonski emulgator tipa v/u	Specifikacija proizvođača
Plantapon® LGC Sorb BASF(Cognis), Nemačka	Lauryl Glucoside, Sodium Lauryl Glucose Carboxylate (Lauril glukozid, Natrijum laurilglukozkarboksilat)	Anjonski surfaktant tipa u/v	Specifikacija proizvođača
Cosmedia® SP BASF(Cognis), Nemačka	Sodium Polyacrylate (Natrijum poliakrilat)	Polimerni stabilizator/ugušćivač vodene faze	Specifikacija proizvođača
Eumulgin® VL75 BASF(Cognis), Nemačka	Lauryl Glucoside, Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate, Glycerin (Lauril glukozid, Poligliceril-2 dipolihidroksistearat, Glicerin)	Višekomponentni nejonski emulgator tipa u/v	Specifikacija proizvođača
Lameform® TGI BASF(Cognis), Nemačka	Polyglyceryl-3 Diisostearate (Poligliceril-3 diizostearat)	Nejonski emulgator (koemulgator) tipa v/u	Specifikacija proizvođača
Paraffinum Liquidum Ra.M.Oil S.p.A., Italija	Paraffinum Liquidum (Tečni parafin)	Emolijens	Specifikacija proizvođača

Tabela 4. Materijali korišćeni za izradu uzoraka – nastavak

Myritol® 318 BASF(Cognis), Nemačka	Caprylic/Capric Triglycerides (Kaprilno-kaprinski trigliceridi)	Emolijens	Specifikacija proizvođača
Dermafeel Sunflower Oil Amedeo Brasca&C.S.r.l., Italija	Helianthus Annuus Seed Oil (Ulje semenki suncokreta)	Emolijens	Specifikacija proizvođača
Lanette® O BASF(Cognis), Nemačka	Cetearyl Alcohol (Cetearil alkohol)	Faktor konzistencije	Specifikacija proizvođača
Glycerol, refined&distilled glycerine 99,5% Peter Cremer Central Europe s.r.o.	Glycerin (Glicerin)	Humektans	Specifikacija proizvođača
1,2-Propylene Glycol USP BASF Nemačka	Propylene Glycol (Propilenglikol)	Korastvarač	Specifikacija proizvođača
Euxyl® K 300* Schulke&Mayr, Nemačka	Phenoxyethanol, Methylparaben, Butylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isobutylparaben (Fenoksietanol, Metilparaben, Butilparaben, Etilparaben, Propilparaben, Izobutilparaben)	Konzervans	Specifikacija proizvođača
Flavocon® Bioflavon Ltd., Rusija	Dihydroquercetin (Dihidrokvercetin)	Aktivna supstanca, antioksidans	Specifikacija proizvođača
Heliopan® HMS Symrise, Nemačka	Homosalate (Homosalat)	UVB filter	Specifikacija proizvođača
Etil alkohol 96% v/v Swan Lake doo, Srbija	Alcohol (Alkohol)	Korastvarač	Specifikacija proizvođača
Pharmalan PH EUR-SO-(RB) Croda Europe Ltd, Velika Britanija	Lanolin (Lanolin)	Emolijens	Specifikacija proizvođača

Tabela 4. Materijali korišćeni za izradu uzoraka – nastavak

Merkur 500 Sasol Wax GmbH, Nemačka	Petrolatum (Vazelin)	Emolijens	Specifikacija proizvođača
Tefacid 1 VT 65 AarhusKarlshamn Sweden AB, Technical Products & Feed, Švedska	Stearic Acid (Stearinska kiselina)	Emulgator	Specifikacija proizvođača
s&m Propylparaben Schülke & Mayr GmbH, Nemačka	Propylparaben (Propilparaben)	Konzervans	Specifikacija proizvođača
s&m Methylparaben Schülke & Mayr GmbH, Nemačka	Methylparaben (Metilparaben)	Konzervans	Specifikacija proizvođača
Zinco Stearato FU- USP Amedeo Brasca & C. S.r.l., Italija	Zinc Stearate (Cink stearat)	Stabilizator	Specifikacija proizvođača
Magnesium sulfate heptahydrate for analysis EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur Merck KgaA, Nemačka	Magnesium Sulfate (Magnezijum sulfat)	Stabilizator	Specifikacija proizvođača
Triethanolamine Care BASF, Nemačka	Triethanolamine (Trietanolamin)	Sredstvo za neutralizaciju	Specifikacija proizvođača
Edeta® BD BASF, Nemačka	Disodium EDTA (Dinatrijum EDTA)	Kompleksirajući agens	Specifikacija proizvođača
Prečišćena voda	Aqua (Voda)	Vodena faza	Ph. Eur. 8.0
Keltrol® CG-SFT CP Kelco, Francuska	Xanthan Gum (Ksantan guma)	Ugušćivač	Specifikacija proizvođača

*U kozmetičkim proizvodima koji su stavljeni na tržište posle 2014-te godine ovaj konzervans ne može da bude u sastavu proizvoda, zbog prisustva izobutilparabena za koji ne postoji dovoljno dokaza o bezbednosti, kao i zbog prisustva butilparabena i propilparabena za koje se, trenutno, prikupljaju novi podaci o bezbednosti.

3.1.2. Metode i oprema

I faza eksperimentalnog rada

3.1.2.1. Formulacija i fizičko-hemijska karakterizacija *SWOP* emulzija i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u

U I fazi eksperimentalnog rada, na osnovu dostupnih podataka iz literature formulisana je serija emulzija tipa u/v stabilisanih nejonskim emulgatorom iz grupe gliceril estara masnih kiselina (INCI: *Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate*) i blagim anjonskim surfaktantom iz nove generacije APG (INCI: *Sodium Lauryl Glucose Carboxylate, Lauryl Glucoside*) u odnosu 4:1,5, koji je neophodan za dobijanje *SWOP* emulzije. Korišćene su različite komponente masne faze (ulja) kako bi se procenio uticaj polarnosti i porekla ulja. Emulzije su izrađene sa i bez dodatka polimernog stabilizatora vodene faze (INCI: *Sodium Polyacrylate* i *Xanthan Gum*) u koncentracijama koje su predložene u literaturi kako bi se ispitaio uticaj različitih stabilizatora na stabilnost emulzionog sistema. Za svaku formulaciju čiji je sastav prikazan u tabeli 5 pripremljeno je nekoliko uzorka različitim postupkom izrade sa ciljem da se odabere najpogodniji postupak.

U cilju odabira formulacije *SWOP* emulzije u smislu najbolje fizičko-hemijske stabilnosti kod koje bi bila analizirana koloidna struktura, izrađeni uzorci emulzija (F1 – F10) analizirani su u cilju preliminarne procene fizičko-hemijske stabilnosti u toku perioda čuvanja (30 dana). Metode ispitivanja su obuhvatile organoleptičku procenu, određivanje električne provodljivosti i pH vrednosti uzoraka, ispitivanje fizičke stabilnosti (test centrifugiranja), procenu promene veličine kapi primenom svetlosne mikroskopije i reološku karakterizaciju primenom kontinualnih reoloških merenja 24 h i 30 dana nakon izrade uzoraka.

Nakon sprovedene fizičko-hemijske karakterizacije i ispitivanja fizičke stabilnosti različitih formulacija *SWOP* emulzije, odabrana je optimalna model formulacija *SWOP* emulzije za dalje analiziranje i detaljnije ispitivanje koloidne strukture.

Tabela 5. Sastav izrađenih *SWOP* emulzija

Formulacija	F1 (% m/m)	F2 (% m/m)	F3 (% m/m)	F4 (% m/m)	F5 (% m/m)	F6 (% m/m)	F7 (% m/m)	F8 (% m/m)	F9 (% m/m)	F10 (% m/m)
Sastojci										
Poligliceril-2 dipolihidroksistearat	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Tečni parafin	24,0	12,0	/	/	12,0	24,0	/	/	8,0	8,0
Ulje semenki suncokreta	/	/	/	/	/	/	24,0	/	8,0	8,0
Kaprilno-kaprinski trigliceridi	/	12,0	24,0	24,0	12,0	/	/	24,0	8,0	8,0
Cetearil alkohol	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Konzervans[§]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Natrijum laurilglukozkarboksilat, Lauril glukozid	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Natrijum poliakrilat	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,8
Ksantan guma	/	/	/	0,25	0,25	0,25	/	/	/	/
Glicerin	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Voda	65,0	65,0	65,0	64,75	64,75	64,75	65,0	65,0	65,0	64,2

[§]Fenoksietanol, Metilparaben, Butilparaben, Etilparaben, Propilparaben, Izobutilparaben

Poredbene emulzije tipa u/v i v/u, čiji je sastav prikazan u tabeli 6, formulisane su na osnovu podataka iz literature sa kvalitativno i kvantitativno identičnim komponentama masne faze u odnosu na izabranu optimalnu model formulaciju *SWOP* emulzije radi njihovog sveobuhvatnog poređenja.

Tabela 6. Sastav izrađenih poredbenih emulzija tipa u/v i v/u

Formulacija	Poredbena	Poredbena
	emulzija tipa u/v	emulzija tipa v/u
	RUV1 (% m/m)	RVU1 (% m/m)
Sastojci		
Lauril glukozid, Poligliceril-2 dipolihidroksistearat, Glicerin	3,0	/
Poligliceril-2 dipolihidroksistearat	/	3,0
Poligliceril-3 diizostearat	/	1,0
Cink stearat	/	1,0
Tečni parafin	8,0	8,0
Ulje semenki suncokreta	8,0	8,0
Kaprilno-kaprinski trigliceridi	8,0	8,0
Cetearil alkohol	2,0	2,0
Konzervans[§]	0,5	0,5
Natrijum poliakrilat	0,7	/
Magnezijum sulfat	/	1,0
Glicerin	3,0	3,0
Voda	66,8	64,5

[§]Fenoksietanol, Metilparaben, Butilparaben, Etilparaben, Propilparaben, Izobutilparaben

U cilju odabira formulacije poredbenih emulzija tipa u/v i v/u, s aspekta najbolje fizičko-hemijske stabilnosti, koje bi se koristile u daljim analizama za poređenje sa izabranom optimalnom formulacijom *SWOP* emulzije, primenjene su različite metode za preliminarnu procenu fizičko-hemijske stabilnosti u toku perioda čuvanja (30 dana). Metode ispitivanja su obuhvatile sve prethodno navedene metode za izabranu optimalnu model formulaciju *SWOP* emulzije odnosno: organoleptičku procenu, određivanja električne provodljivosti i pH vrednosti uzoraka, ispitivanje fizičke stabilnosti (test centrifugiranja), procenu promene veličine kapi primenom svetlosne mikroskopije i

reološku karakterizaciju primenom kontinualnih reoloških merenja 24 h i 30 dana nakon izrade uzoraka.

Dodatno, u cilju poređenja i definisanja razlika i/ili sličnosti između izabrane optimalne model formulacije *SWOP* emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u, ispitana je fizičko-hemijske stabilnost, estetske i aplikativne osobine uzoraka u toku odgovarajućeg vremena čuvanja (90 dana) i tokom ubrzanog testa starenja.

3.1.2.1.1. Izrada *SWOP* emulzija

Oprema: Rotaciona mešalica (Heidolph RZR 2020, Nemačka) sa propellerskim mešačem.

Svi uzorci emulzija pripremljeni su toplo-toplo postupkom. Masna faza je uvek pripremana na isti način za sve formulacije, odmeravanjem svih sastojaka u istom sudu. Vodena faza je pripremana u sudu odmeravanjem i mešanjem vode, glicerola i konzervansa. U ovoj smeši dispergovan je ugušćivač za formulacije F4-F6 i F9, pomoću laboratorijske propellerske mešalice u toku 2 minuta na brzini od 2000 o/min. Smeša *Sodium Lauryl Glucose Carboxylate*, *Lauryl Glucoside* dodavana je na dva načina: 1) direktno u smešu ostalih sastojaka vodene faze, pre zagrevanja, uz ručno lagano mešanje do postizanja homogenog izgleda smeše; 2) direktno u emulziju, nakon zagrevanja i spajanja masne i vodene faze uz mešanje pomoću laboratorijske propellerske mešalice na brzini od 500 o/min, kako bi se izbeglo stvaranje pene. Pripremljene faze, vodena i masna, zagrevane su na 75 °C, odnosno 70 °C. Spajanje pripremljenih, vodene i masne faze, vršeno je na dva načina:

1) vodena faza je dodata masnoj fazi ili

2) masna faza je dodata vodenoj fazi,

uz mešanje pomoću propellerske mešalice na brzini od 500 o/min u toku 5 minuta pri konstantnoj temperaturi. Nakon toga nastavljeno je mešanje na brzini od 500 o/min, odnosno do hlađenja na temperaturu od 55 °C, kada se proces mešanja nastavlja na jedan od dva načina: 1) nastavljeno je mešanje brzinom od 800 o/min u toku 3 minuta, a potom brzinom od 1300 o/min do hlađenja emulzije na sobnu temperaturu; 2) izvršena je homogenizacija pomoću propellerske rotacione mešalice na brzini od 2000 o/min u toku

1 minuta, a potom je nastavljeno mešanje brzinom od 500 o/min do hlađenja emulzije na sobnu temperaturu.

3.1.2.1.2. Preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti SWOP emulzija

❖ Organoleptička procena

Osobine pripremljenih uzoraka *SWOP* emulzija, kao što su izgled, boja, konzistencija emulzija, lakoća razmazivanja po koži, način na koji koža upija emulzije, homogenost emulzija, razdvajanje faza i spiranje zaostalog filma emulzije sa kože su procenjivani vizuelnim posmatranjem.

❖ Određivanje pH vrednosti

Oprema: pH-metar InoLab pH 7110 (WTW, Nemačka).

Za određivanje pH vrednosti pripremljenih uzoraka *SWOP* emulzija korišćena je potenciometrijska metoda (Ph.Jug.V). U pripremljene uzorke na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C) direktno je uronjena staklena elektroda pH metra, koji je pre početke rada kalibrisan. Kalibracija je izvedena u dve tačke upotrebom standardnih pufera pH vrednosti 4,0 i 7,0.

❖ Određivanje električne provodljivosti

Oprema: Konduktometar CDM230 (Meter Lab, Radiometer, Danska).

Određivanje električne provodljivosti uzoraka *SWOP* emulzija izvedeno je konduktometrijski, direktnim uranjanjem elektrode konduktometra u uzorke. Merenja su vršena na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C), a aparat je kalibrisan pre početka rada sa 0,01M rastvorom KCl.

❖ Test centrifugiranja

Oprema: Laboratorijska centrifuga (Centrifuge 5804, Eppendorf, Nemačka).

Test centrifugiranja pripremljenih uzoraka izveden je pomoću laboratorijske centrifuge, na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C), kako bi se odredila stabilnost uzoraka *SWOP* emulzija na efekat gravitacije. Svaki uzorak je odmeren (4 g) u plastičnu test kivetu od 10 ml i centrifugiran dva puta po 15 minuta na brzini od 3000 o/min. Nakon centrifugiranja svaki uzorak je pregledan vizuelno kako bi se uočile eventualne promene odnosno, razdvajanje faza.

❖ Mikroskopska analiza

Oprema: Svetlosni mikroskop (Olympus System Microscope model BX50, Japan) sa dodatkom fluorescentne lampe za fluorescentno snimanje (Olympus Reflected Light Fluorescence Attachment BX-FLA) i digitalnom kamerom (Sony Power HAD, 3CCD Color Video Camera, DXC-950P model, Japan).

Mikroskopska analiza uzoraka izvedena je pod uveličanjem od 400 puta na svetlosnom mikroskopu kako bi se pratila veličina čestica i stabilnost uzoraka emulzija. Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu podataka korišćen je Micro Image 4,0 softver.

❖ Reološka karakterizacija

Oprema: Rotacioni reometar (Rheolab MC 120, Paar Physica, Nemačka).

Kontinualna reološka karakterizacija sprovedena je pomoću rotacionog reometra na pripremljenim uzorcima koji su prošli test centrifugiranja bez naznaka razdvajanja faza/znakova nestabilnosti. Korišćen je merni sistem kupa-ploča, gde je prečnik kupe 50 mm, ugao 1°. Merenja viskoziteta i napona smicanja u zavisnosti od brzine smicanja su izvedena na temperaturi $20 \pm 0,2$ °C. Tokom kontinualnog merenja brzina smicanja je kontrolisano rasla u opsegu od 0 s^{-1} do 200 s^{-1} (uzlazna kriva) i opadala u opsegu 200 s^{-1} do 0 s^{-1} (silazna kriva). Izmerene vrednosti napona smicanja odnosno viskoziteta u zavisnosti od brzine smicanja analizirane su u okviru softvera OriginPro9 u cilju

očitavanja vrednosti minimalnog (η_{min}) i maksimalnog (η_{max}) prividnog viskoziteta sa krivih tečenja i izračunavanja vrednosti histerezni površina (*HP*). Rezultati su prikazani grafički i tabelarno.

3.1.2.1.3. Izrada poredbenih emulzija tipa u/v i v/u

Oprema: Rotaciona mešalica (Heidolph RZR 2020, Nemačka) sa propellerskim mešačem.

Emulzija tipa u/v pripremljena je istim toplo-toplo postupkom opisanim kod izrade izabrane optimalne formulacije *SWOP* emulzije, pri čemu je spajanje pripremljenih, vodene i masne faze, izvršeno dodavanjem masne faze u vodenu fazu uz mešanje pomoću laboratorijske propellerske mešalice na brzini od 500 o/min u toku 5 minuta pri konstantnoj temperaturi. Nakon toga nastavljeno je mešanje na brzini od 500 o/min, odnosno do hlađenja na temperaturu od 55 °C, kada je izvršena homogenizacija pomoću propellerske mešalice na brzini od 2000 o/min u toku 1 minuta, a potom je nastavljeno mešanje brzinom od 500 o/min do hlađenja emulzije na sobnu temperaturu.

Emulzije tipa v/u takođe su pripremljene toplo-toplo postupkom, koji se delimično razlikuje od postupka pripreme izabrane optimalne *SWOP* emulzije. Masna i vodena faza su pripremljene mešanjem njihovih komponenti i potom zagrejane na 80 °C, odnosno 85 °C. Zagrejana vodena faza dodata je zagrejanom masnoj fazi, uz mešanje pomoću laboratorijske propellerske mešalice brzinom od 2000 o/min u toku 5 minuta na konstantnoj temperaturi. Potom je nastavljeno mešanje na brzini od 1300 o/min. Na temperaturi između 55 °C i 60 °C izvršena je homogenizacija pomoću propellerske mešalice u toku 3 minuta na 2000 o/min, a potom je nastavljeno mešanje na 650 o/min do hlađenja emulzije na sobnu temperaturu.

3.1.2.1.4. Preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti poredbenih emulzija tipa u/v i v/u

Preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti poredbenih emulzija tipa u/v i v/u sprovedena je primenom metoda koje su obuhvatile organoleptičku procenu,

određivanje električne provodljivosti i pH vrednosti uzoraka, ispitivanje fizičke stabilnosti (test centrifugiranja), procenu promene veličine kapi primenom svetlosne mikroskopije i reološku karakterizaciju primenom kontinualnih reoloških merenja 24 h i 30 dana nakon izrade uzoraka. Sve analize sprovedene su na isti način, primenom iste opreme i uslova kao i u slučaju *SWOP* emulzije (odjeljak 3.1.2.1.2).

3.1.2.1.5. Procena fizičko-hemijske stabilnosti odabranih formulacija SWOP i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u u dužem vremenskom intervalu

Procena fizičko-hemijske stabilnosti odabrane *SWOP* emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u sprovedena je primenom metoda koje su obuhvatile organoleptičku procenu, određivanje električne provodljivosti i pH vrednosti uzoraka, ispitivanje fizičke stabilnosti (test centrifugiranja), procenu promene veličine kapi primenom svetlosne mikroskopije i reološku karakterizaciju primenom kontinualnih reoloških merenja 24 h, 30 i 90 dana nakon izrade uzoraka. Sve analize sprovedene su na isti način, primenom iste opreme i uslova kao i u slučaju *SWOP* i poredbenih emulzija (odjeljak 3.1.2.1.2). Dodatno, primenjena je i metoda cikličnog temperaturnog stres testa (ubrzano starenje) i ispitivanja viskoelastičnog ponašanja primenom oscilatornih reoloških merenja.

❖ **Ciklični temperaturni stres test**

Oprema: Komora (INB 500, Memmert, Nemačka).

Ciklični temperaturni stres test poznat i kao ubrzan test starenja koristi se najčešće za predviđanje stabilnosti u dužem vremenskom periodu. U ovom eksperimentalnom radu korišćen je sledeći protokol za jedan ciklus: 1) uzorci su ostavljeni u hladnjak 24 h na temperaturi od $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2) uzorci su izvađeni iz hladnjaka i ostavljeni 24 h na sobnoj temperaturi ($22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$); 3) uzorci su ostavljeni u komori 24 h na temperaturi od $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 4) uzorci su izvađeni iz komore i ostavljeni 24 h na sobnoj temperaturi ($22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Uzorci su prošli 6 ovakvih ciklusa. Istovremeno, u toku trajanja 6 ciklusa, po jedan uzorak je ostavljen izotermalno na sobnoj temperaturi ($22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), u frižideru na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i u komori na $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzorci su potom analizirani nakon trećeg i

šestog ciklusa, a dobijene vrednosti za pH, električnu provodljivost i reološka merenja međusobno su poređene.

❖ Ispitivanje viskoelastičnog ponašanja

Oprema: Rotacioni reometar (Rheolab MC 120, Paar Physica, Nemačka).

Ispitivanje viskoelastičnog ponašanja sprovedeno je izvođenjem oscilatornih reoloških merenja korišćenjem mernog sistema kupa-ploča MK 24 (dijametar kupe 75 mm, a ugao 1°). Za određivanje viskoelastičnog regiona primenjena je rastuća deformacija (engl. *amplitude sweep*) u opsegu 0,6 – 100% pri konstantnoj frekvenciji od 1 Hz. Nakon određivanja linearnog viskoelastičnog regiona praćeni su odgovarajući reološki parametri (elastični (G') modul, viskozni (G'') modul i tangens faznog ugla ($\tan \delta$)) u funkciji konstantne deformacije pri opsegu frekvencija 0,1 – 10 Hz (engl. *frequency sweep*).

❖ Statistička analiza

Svi dobijeni podaci prikazani su kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija.

Sve statističke analize sprovedene su primenom OriginPro9 softverskog paketa (OriginLab Corporation, Northampton, SAD), a nivo značajnosti bio je $p < 0,05$.

II faza eksperimentalnog rada

3.1.2.2. Merenje kontaktnog ugla, karakterizacija koloidne strukture i uporedna senzorna i reološka analiza izabrane SWOP emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u

U okviru druge faze eksperimentalnog rada sprovedena su merenja kontaktnog ugla za odabranu SWOP emulziju i poredbenu emulziju tipa u/v. Merenjem promena kontaktnog ugla između kapi vode aplikovanih na kožu tretiranu odabranom emulzijom

i tretirane kože u određenim vremenskim intervalima potvrđena je inverzija faza kod odabrane *SWOP* emulzije.

Da bi se ispitala koloidna struktura, sa posebnim osvrtom na distribuciju vode u sistemu, pripremljeni su binarni sistemi i emulzije uprošćenog sastava – jednostavne emulzije, čiji je sastav prikazan u tabeli 7. Oni sadrže odgovarajuće emulgatorske sisteme, odnosno jednodokomponentnu masnu fazu, koji kvantitativno i kvalitativno odgovaraju odabranoj emulziji i poredbenim emulzijama tipa u/v i v/u. Fizičko-hemijska karakterizacija binarnih sistema i jednostavnih emulzija obuhvatila je svetlosnu i polarizacionu mikroskopsku analizu i termalne metode (diferencijalna skenirajuća kalorimetrija – *DSC* i termogravimetrijska analiza – *TGA*).

Senzorna analiza je obuhvatila procenu senzornih osobina odabrane formulacije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u. Procenu određenih i prethodno jasno definisanih osobina bitnih za emulzione sisteme izvršila je odabrana grupa panelista nakon primene ispitivanih uzoraka. U cilju poređenja dobijenih rezultata senzorne analize i rezultata merenja sprovedenih u *in vitro* uslovima i uspostavljanja odgovarajućih korelacija izvršena je fizičko-hemijska karakterizacija (merenje električne provodljivosti i ispitivanje reoloških karakteristika) ispitivanih *SWOP* i poredbenih emulzija sa i bez prisustva rastvora sličnog znoju, odnosno prečišćene vode kao i na različitim temperaturama (20 °C i 32 °C). Rastvor sličan znoju i povišena temperatura (32 °C) odabrani su kao bitni faktori u *in vitro* ispitivanju kako bi se što bolje simulirali *in vivo* uslovi u kojima se primenju emulzije na kožu (Crosera i sar., 2015).

Rastvor sličan znoju pripremljen je mešanjem 0,5% m/m natrijum hlorida, 0,1% m/m mlečne kiseline, 0,1% m/m uree u prečišćenoj vodi. pH rastora podešena je na 6,5 pomoću 1% m/m rastvora amonijaka (Midander i sar., 2007). Poznato je da je normalna brzina oslobađanja znoja kod ljudi oko $0,38 \pm 0,14$ mg/cm² kože u toku 1 minuta (Berker i Rees, 1995), a količina emulzije koja se utrlja na kožu je između 0,5 mg/cm² i 2 mg/cm² kože (Walters, 2002). Na osnovu literaturnih podataka napravljene su smeše vehikuluma bez KAS i rastvora sličnog znoju u odnosu 5,3:1. Da bi se ispitaio uticaj efekta razblaženja na viskozitet emulzija, pripremljene su smeše vehikuluma bez KAS sa prečišćenom vodom u istom odnosu. Pripremljeni uzorci razblaženih emulzija termostatirani su na sobnoj temperaturi 15 minuta nakon pripreme uzoraka.

Tabela 7. Sastav binarnih sistema, SWOP emulzija i emulzija tipa u/v i v/u

<i>Sastojci</i>	<i>SWOP (% m/m)</i>				<i>u/v (% m/m)</i>				<i>v/u (% m/m)</i>			
	<i>binarni sistem</i>	<i>emulzija</i>			<i>binarni sistem</i>	<i>emulzija</i>			<i>emulzija</i>			
	<i>SI</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>	<i>S4</i>	<i>ReUV1</i>	<i>ReUV2</i>	<i>ReUV3</i>	<i>RUVE</i>	<i>ReVU1</i>	<i>ReVU2</i>	<i>ReVU3</i>	<i>RVUE</i>
Poligliceril-2 dipolihidroksistearat	4,0	4,0	4,0	4,0	/	/	/	/	3,0	3,0	3,0	3,0
Poligliceril-3 diizostearat	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1,0	1,0	1,0
Lauril Glukozid, Poligliceril-2 dipolihidroksistearat, Glicerin	/	/	/	/	3,0	3,0	3,0	3,0	/	/	/	/
Tečni parafin	/	26,0	26,0	8,0	/	27,0	27,0	8,0	/	/	25,0	8,0
Ulje semenki suncokreta	/	/	/	8,0	/	/	/	8,0	/	/	/	8,0
Kaprilno-kaprinski trigliceridi	/	/	/	8,0	/	/	/	8,0	/	/	/	8,0
Cetearil Alkohol	/	/	/	2,0	/	/	/	2,0	/	/	/	2,0
Cink Stearat	/	/	/	/	/	/	/	/	1,0	1,0	1,0	1,0
Konzervans [§]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Natrijum laurilglukozkarboksilat, Lauril glukozid	1,5	1,5	1,5	1,5	/	/	/	/	/	/	/	/
Natrijum poliakrilat	/	/	0,8	0,8	/	/	0,7	0,7	/	/	/	/
Magnezijum sulfat	/	/	/	/	/	/	/	/	1,0	1,0	1,0	1,0
Glicerin	/	/	/	3,0	/	/	/	3,0	/	/	/	3,0
Voda	94,0	68,0	67,2	64,2	96,5	69,5	68,8	66,8	94,5	93,5	68,5	64,5

[§]Fenoksietanol, Metilparaben, Butilparaben, Etilparaben, Propilparaben, Izobutilparaben

3.1.2.2.1. *Merenje kontaktnog ugla*

Oprema: uređaj DSA100 sa softverom DSA3, Krüss, Nemačka.

Merenje kontaktnog ugla vršeno je na koži mekog dela distalne (vršne) falange kažiprsta. Mala količina ispitivane emulzije (oko 0,05 g) je utrljana na kožu mekog dela distalne falange kažiprsta i ostavljena da se apsorbuje u toku 3 minuta. Da bi se odredio kontaktni ugao između kapi vode i ispitivane emulzije na koži, kap vode (engl. *sessile drop*) od 3 μ l je postavljena na kožu regije za ispitivanje pomoću automatskog uređaja, koji je prethodno bio programiran da dozira jednu kap prečišćene/destilovane vode na prst na početku svakog minuta u toku 30 minuta. Kada je kap vode došla u kontakt sa kožom prsta, kamera (kamera visoke rezolucije sa Falcon-ovim okvirom za hvatanje) je snimala/slikala vodenu kap na površini kože kažiprsta. Potom je kap vode pažljivo uklonjena apsorpcijom pomoću maramice. Merenjem kontaktnog ugla kapi vode na čistoj i odmašćenju (alkohol/etanol, 70 % v/v) koži kažiprsta dobijene su visoke vrednosti kontaktnog ugla (Ginn i sar., 1968), koje su korišćene kao slepa proba.

Za određivanje kontaktnog ugla na sačuvanim slikama kapi vode na površini kažiprsta, korišćen je softverski paket ImageJ (Stalder i sar., 2010; Stalder i sar., 2006). Navedeni softverski paket ima dve mogućnosti za analizu kapi: *Drop Analysis – Low Bond Axisymmetric Drop Analysis*, i *Drop Analysis – DropSNAKE*. U eksperimentu, za određivanja kontaktnog ugla između kapi vode i kože kažiprsta korišćena je opcija *Drop Analysis – Low Bond Axisymmetric Drop Analysis*, koja je bazirana na fitovanju *Young–Laplace*-ove jednačine sa podacima sa slike. Upotrebom matematičkog modela softverskog paketa OriginPro9 (*Boltzmann*-ove jednačine) formirana je kriva na grafiku promene kontaktnog ugla u zavisnosti od vremena na osnovu koje je određena tačka inverzije.

3.1.2.2.2. *Izrada binarnih sistema i jednostavnih emulzija*

Izrada uzoraka binarnih sistema (S1 i ReUV1) i jednostavnih emulzija (S2, S3, ReUV2, ReUV3, ReVU1, ReVU2, ReVU3) čiji je sastav prikazan u tabeli 7 sprovedena

je na isti način kao i izrada izabranih formulacija *SWOP* i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u, opisanih u odeljku 3.1.2.1.1. i odeljku 3.1.2.1.3.

3.1.2.2.3. Fizičko-hemijska karakterizacija binarnih sistema i jednostavnih emulzija

❖ Mikroskopska analiza

Oprema: Mikroskop Carl Zeiss ApoTomeImager Z1 microscope (Zeiss, Göttingen, Nemačka) sa integrisanom digitalnom kamerom AxioCam ICc1 i softverskim paketom AxioVision 4.6.

Pripremljeni uzorci posmatrani su pomoću mikroskopa sa integrisanom digitalnom kamerom. Mala količina svakog od uzoraka uzeta je sa tri različita mesta u uzorku, preneti na mikroskopsku pločicu. Svaki od razmaza pokriven je pokrovnim staklom. Polarizaciona i svetlosna mikroskopska analiza uzoraka sprovedena je posmatranjem pod uveličanjem 100, 200 i 400 puta u svetlosnom polju, i između ukrštenih polarizatora i analizatora uz primenu λ -pločice. Srednja vrednost prečnika kapi je određena analiziranjem kapi ($N = 100$) na mikrografiji (1380×1030 pixels) sa softverskim paketom AxioVision 4.6.2.2.9.

❖ Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

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

Mala količina svakog od uzoraka (između 10 i 12 mg) je precizno odmerena u aluminijumske lončice, hermetički zatvorena i analizirana pomoću diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra. Prazan lončić je korišćen kao referentni uzorak. Uzorci su zagrevani od 25 °C do 110 °C, sa brzinom zagrevanja od 5 °C/min kako bi se uporedile endotermne tranzicije entalpije testiranih uzoraka sa referentnim uzorkom. Sva merenja su obavljena u duplikatu.

❖ Termogravimetrijska analiza (TGA)

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

Mala količina svakog od uzoraka odmerena je u otvoren aluminijumski lončić. Analiza je izvršena zagrevanjem u temperaturnom opsegu od 30 °C do 110 °C sa izotermalnim segmentima na početku i kraju svakog merenja. Brzina zagrevanja bila je postavljena na 5 °C/min i svi uzorci su analizirani u duplikatu.

3.1.2.2.4. Senzorna procena izabrane SWOP emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u i njihova reološka analiza i određivanje električne provodljivosti pod specifičnim uslovima

❖ Senzorna procena

Ispitivane emulzije je procenila grupa od 20 ženskih ispitanika (panelista), čija je starost između 19 i 45 godina. Svi panelisti su imali iskustva u proceni kozmetičkih proizvoda i svi su stalni potrošači kozmetičkih proizvoda. Panelistima je objašnjen opšti koncept deskriptivne analize, kao i procedura u okviru 5 sesija u trajanju od 1 sata. Definicije i skale bile su date za svaku senzornu karakteristiku (atribut) koja se procenjivala. Atributi su izabrani nakon detaljne pretrage literature i diskusije sa panelistima. Referentni materijali koji su korišćeni za procenu emulzija kako bi se kvantifikovao svaki atribut takođe su izabrani u diskusiji sa panelistima. Panelisti su vršili procenu atributa koristeći struktuiranu skalu (0-10). Svaki atribut je procenjivan istovremeno za različite ispitivane emulzije. Panelisti su vršili procenu tri emulzije koje su bile odmerene (10 g) u identične plastične kutijice obeležene sa nasumično odabrane tri cifre. Testiranje se izvodilo u dobro osvetljenoj prostoriji čija je temperatura i vlažnost vazduha bila konstantna. Proces procene atributa je bio podeljen u tri faze: pre upotrebe emulzija (izgled emulzija), faza zahvatanja i utrljavanja emulzija i osećaj nakon utrljavanja emulzija (tabela 8). Prva faza analize obuhvatila je procenu emulzija bez kontakta upotrebom čula vida. U drugoj fazi procena emulzija vršena je na osnovu kontakta sa malom površinom kože (vrhovima prstiju) kao i sa većom površinom kože.

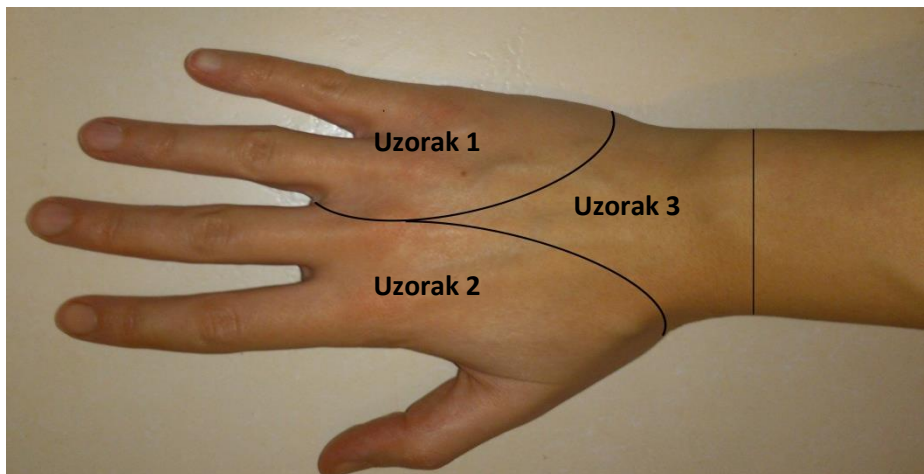
U trećoj fazi procena je izvršena 1 minut nakon nanošenja ispitivanih emulzija na veću površinu kože.

Tabela 8. Senzorni atributi, njihove definicije i referentni uzorci koji su korišćeni u proceni senzornih atributa

Proces procene - faze	Atribut	Definicija
Pre upotrebe (izgled emulzija)	Konzistencija (viskozitet)	Lakoća isticanja proizvoda iz kutije
	Sjaj	Stepen odbijene svetlosti od površine proizvoda
Zahvatanje i utrljavanje emulzije	Adhezija (Zahvatanje)	Količina uzorka koja zaostane na prstu nakon kratkog kontakta sa uzorkom iz kutije
	Elastičnost (razvlačenje)	Stepen u kome se uzorak razvlači između palca i kažiprsta
	Tekstura	Količina proizvoda koja ostaje između prstiju
	Klizanje (glatkoća)	Stepen klizavosti uzorka tokom utrljavanja
	Razmazivost	Površina kože koju uzorak prekrije tokom utrljavanja
	Rastečnjavanje	Lakoća topljenja uzorka tokom utrljavanja u kožu
	Lepljivost	Sila potrebna za odvajanje prsta od kože i utrljavanje uzorka
	Gustina	Sila potrebna da se uzorak pritisne i utrlja
	Masnoća	Količina tečnosti koja smanjuje trenje tokom utrljavanja
	Sjaj	Količina svetlosti koja se reflektuje sa kože tokom utrljavanja
	Blagost (nežnost)	Stepen prijatnosti za panelistu koji se formira tokom primene uzorka
	Apsorpcija/upijanje	Stepen apsorbovanja/upijanja proizvoda u kožu
Nakon utrljavanja emulzije	Zaostali film	Količina proizvoda koja je zaostala na koži nakon utrljavanja
	Lepljivost filma	Sila potrebna za odvajanje prsta od kože nakon utrljavanja
	Masnoća filma	Količina tečnosti koja zaostane na koži nakon aplikacije
	Blagost filma	Stepen prijatnosti za panelistu nakon aplikacije
	Sjaj filma	Stepen odbijanja svetlosti sa kože nakon aplikacije
	Spiranje filma	Stepen spiranja zaostalog filma proizvoda sa kože

Nanošenje uzoraka na veću površinu kože podrazumevalo je njihovu primenu na gornjoj (dorzalnoj) strani šake obe ruke (slika 13). Za procenu nekih atributa, protokol

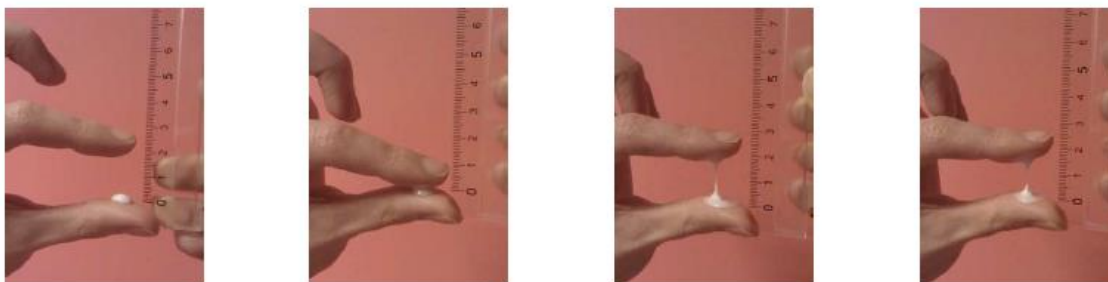
je bio isti, pa se jednim izvođenjem protokola mogla izvršiti procena nekoliko atributa. Način primene emulzija (protokol), korišćenje aplikatora i proces procene atributa bili su detaljno objašnjeni panelistima.



Slika 13. Način podele gornje (dorzalne) strane šake i primena uzoraka

Protokoli korišćeni za procenu atributa:

- **Konzistencija i sjaj** – vizuelno posmatranje
- **Adhezija** – nežnim postavljanjem kažiprsta na površinu ispitivanog uzorka i procenom količine uzorka koja se zadrži (adherira) na prstu
- **Elastičnost** – primenom 100 μ l uzorka pomoću specijalnih aplikatora na palac uz pritiskanje i odvajanje kažiprsta. Dva postupka pritiskanja/odvajanja kažiprsta treba da se odvijaju u toku 1 sekunde. Postupak se ponovi 10 puta.



Slika 14. Protokol za procenu atributa *elastičnost* (Gilbert i sar., 2013).

Pomoću lenjira meri se maksimalna visina niti u milimetrima koja je nastala nakon ovog postupka (slika 14). Lenjir se postavi sa nultom vrednošću u nivou nanetog uzorka na prst. Prsti i lenjir treba da budu u nivou očiju kako bi očitavanje bilo precizno (Gilbert i sar., 2013). Dobijene vrednosti se beleže i analiziraju.

- **Klizanje i tekstura** – primenom 50 µl uzorka na kažiprst, trljanjem 5 puta uz pomoć palca (pokretom palca “napred-nazad” duž kažiprsta) i procenom kako uzorak klizi između prstiju odnosno koliko uzorka zaostaje između prstiju.
- **Rastečnjavanje** – primenom 90 µl uzorka na gornju (dorzalnu) stranu šake, razmazivanjem uzorka emulzije pomoću kažiprsta sa dva povratna pokreta (pokret kažiprsta “napred-nazad” duž dorzalne strane šake) i procenom tendencije uzorka da se rastečni u kontaktu sa kožom.
- **Razmazivost, lepljivost, gustina, masnoća, sjaj, blagost, apsorpcija** – primenom 70 µl uzorka na gornju (dorzalnu) stranu šake, razmazivanjem sa 8 kružnih pokreta i procenom navedenih atributa.
- **Zaostali film, lepljivost, filma, masnoća filma, blagost filma, sjaj filma** – primenom 70 µl uzorka na gornju (dorzalnu) stranu šake, razmazivanjem sa 20 kružnih pokreta i procenom atributa nakon 1 minut.
- **Spiranje filma** – primenom 70 µl uzorka na gornju (dorzalnu) stranu šake, razmazivanjem sa 20 kružnih pokreta. Zaostali film se spira vodom (temperatura vode 25 °C) nakon 10 minuta i vrši se procena.

❖ Reološka karakterizacija

Oprema: Rotacioni reometar Rheolab MC 120, Paar Physica, Nemačka.

Reološka karakterizacija sprovedena je na pripremljenim uzorcima koji su prošli test centrifugiranja bez naznaka razdvajanja faza. Uzorci su pripremljeni dodavanjem rastvora sličnog znoju, odnosno prečišćene vode u baze *SWOP* emulzije odnosno poredbenih emulzija tipa u/v i v/u, kao što je opisano u odeljku 3.1.2.2. Kontinualna

reološka merenja izvršena su u triplikatu sa mernim sistemom i po proceduri opisanim u odeljku 3.1.2.1.2.

Ispitivanje viskoelastičnog ponašanja sprovedeno je pomoću mernog sistema kupa-ploča sa oznakom M 22 (dijametar 50 mm, ugao 1°). Uslovi ispitivanja viskoelastičnog ponašanja detaljno su opisani u odeljku 3.1.2.1.5.

❖ **Određivanje električne provodljivosti**

Oprema: Konduktometar CDM230 (Meter Lab, Radiometer, Danska).

Određivanje električne provodljivosti uzoraka emulzija i smeše emulzija i rastvora sličnog znoju izvedeno je konduktometrijski, direktnim uranjanjem elektrode konduktometra (CDM 230, Radiometer, Danska) u pripremljene uzorke. Znoj je dodat postepeno u tri jednake porcije od po 0,5 g i jedne od 0,4 g u prethodno odmerene emulzije (10 g). Svako dodavanje porcije rastvora sličnog znoju bilo je praćeno mešanjem i merenjem električne provodljivosti. Merenja su vršena u triplikatu na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C), a aparat je kalibrisan pre početka rada sa 0,01M rastvorom KCl.

❖ **Statistička analiza**

Svi dobijeni podaci prikazani su kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija.

Na vrednostima dobijenim u senzornoj studiji prilikom procene senzornih atributa primenjena je jednofaktorska ANOVA sa posthoc Tukey testom ukoliko je bilo potrebno.

Sve statističke analize sprovedene su primenom OriginPro9 softverskog paketa (OriginLab Corporation, Northampton, SAD), a nivo značajnosti bio je $p < 0,05$.

III faza eksperimentalnog rada

3.1.2.3. Određivanje potencijala dihirokvercetina u *SWOP* emulziji kao nosaču u zaštiti od UV zračenja sa *in vivo* preliminarnom procenom efikasnosti i bezbednosnog profila

Druga faza eksperimentalnog rada ukazala je na postojanje stabilnog emulzionog sistema adekvatnih aplikativnih karakteristika i na specifičnost koloidne strukture *SWOP* emulzije, pa se moglo preći na treću fazu u okviru koje je ispitana mogućnost inkorporiranja model kozmetičke aktivne supstance dihidrokvercetina – DHK (0,5% m/m i 1% m/m) rastvorene u alkoholu/etanolu, 96% v/v u odabranoj formulaciji *SWOP* emulzije kao nosaču i uporedno u poredbenoj emulziji tipa u/v (tabela 9). Na pripremljenim uzorcima izvršena je preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti u toku perioda čuvanja (30 dana). Metode ispitivanja su obuhvatile organoleptičku procenu, određivanje električne provodljivosti i pH vrednosti uzoraka, ispitivanje fizičke stabilnosti (test centrifugiranja), procenu promene veličine kapi primenom svetlosne mikroskopije i reološku karakterizaciju primenom kontinualnih reoloških merenja 24 h i 30 dana nakon izrade uzoraka i termalnu analizu 24 h nakon izrade.

Na uzorcima *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v sa inkorporiranom kozmetički aktivnom supstancom DHK sprovedeno je određivanje *SPF* i *UVA-PF* u *in vitro* uslovima. U te svrhe pripremljeni su uzorci *SWOP* (označeni kao S_{DHKx}) i poredbene emulzije u/v tipa (označeni kao R_{DHKx}) sa inkorporiranim većim količinama model kozmetičke aktivne supstance DHK (1% m/m, 3% m/m i 5% m/m DHK rastvorene u etanolu, 96% v/v), kao i 10% m/m model kozmetičke aktivne supstance DHK suspendovane u odabranoj formulaciji *SWOP* emulzije (označeni kao S_{DHK10}) kao nosaču i uporedo u poredbenoj emulziji tipa u/v (označeni kao R_{DHK10}) (tabela 9). Dodatno, u *SWOP* emulziju sa DHK ugrađen je i UVB filter homosalat (8% m/m) (uzorak označena kao S_{DH}). Takođe, pripremljene su i emulzije za poređenje: *SWOP* emulzija sa inkorporiranim HMS (označena kao S_{HMS}) i standardna emulzija sa HMS (prema propisu FDA – *US Food and Drug Administration Sunscreen Monograph – Office of The Federal Register EILLC. Title 21 Food and Drugs Parts 300 to 499 (Revised as of April 1, 2014): 21-CFR-Vol-5: U.S. Government Printing Office; 2014*) (označena kao R_{HMS}) (tabela 9),

kao i SWOP i poredbene emulzije tipa u/v bez aktivne supstance (označena redom kao SE i RUVE) čiji su sastavi navedeni u tabeli 5 (formulacija F10) i tabeli 6 (formulacija RUV1).

Tabela 9. Sastav SWOP i poredbenih emulzija sa DHK i HMS

<i>Sastojci</i>	<i>SWOP</i> (% m/m)				<i>u/v</i> (% m/m)		<i>Standard</i> (% m/m)
	<i>SHMS</i>	<i>SDHKx</i>	<i>SDHK10</i>	<i>SHD</i>	<i>RDHKx</i>	<i>RDHK10</i>	<i>RHMS</i>
Poligliceril-2 dipolihidroksistearat	4,0	4,0	4,0	4,0	/	/	/
Lauril glukozid, Poligliceril-2 dipolihidroksistearat, Glicerin	/	/	/	/	3,0	3,0	/
Lanolin	/	/	/	/	/	/	5,0
Vazelin (beli)	/	/	/	/	/	/	2,5
Stearinska kiselina	/	/	/	/	/	/	4,0
Propilparaben	/	/	/	/	/	/	0,05
Tečni parafin	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	/
Ulje semenki suncokreta	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	/
Kaprilno-kaprilski trigliceridi	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	/
Cetearil alkohol	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	/
Homosalat	8,0	/	/	8,0	/	/	8,0
Konzervans [§]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	/
Natrijum laurilglukozkarboksilat, Lauril glukozid	1,5	1,5	1,5	1,5	/	/	/
Natrijum poliakrilat	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	/
Glicerin	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	/
Propilenglikol	/	/	/	/	/	/	5,0
Trietanolamin	/	/	/	/	/	/	1,0
Dinatrijum EDTA	/	/	/	/	/	/	0,05
Metilparaben	/	/	/	/	/	/	0,1
Voda	56,2	do 100,0	54,2	41,2	do 100,0	do 100,0	74,3
Dihidrovercetin	/	*	10,0	5,0	*	10,0	/
Alkohol, 96% v/v	/	10,0	/	10,0	10,0	10,0	/

[§] Fenoksietanol, Metilparaben, Butilparaben, Etilparaben, Propilparaben, Izobutilparaben

* – količina dodate model aktivne supstance DHK (0,5%, 1%, 3%, 5%)

Na osnovu određenog *SPF* i *UVA-PF* procenjen je uticaj DHK na stabilnost i fotoprotektivni efekat HMS. Na pripremljenim uzorcima izvršena je preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti u toku perioda čuvanja (30 dana). Metode ispitivanja su obuhvatile organoleptičku procenu, određivanje električne provodljivosti i pH vrednosti uzoraka, ispitivanje fizičke stabilnosti (test centrifugiranja), reološku karakterizaciju primenom kontinualnih reoloških merenja 24 h i 30 dana nakon izrade uzoraka i procenu promene veličine kapi primenom svetlosne mikroskopije 24 h, 7 dana i 30 dana nakon izrade uzoraka).

Da bi se potvrdila reproduktivnost rezultata pored standardne emulzije sa homosalom za koju je poznata vrednost *SPF* i iznosi $4,47 \pm 1,279$ (prema propisu US Food and Drug Administration Sunscreen Monograph), korišćene su i dve komercijalno dostupne emulzije sa tržišta čije su vrednosti zaštitnog faktora od sunca *SPF* 10 i *SPF* 20, a sadrže kombinaciju organskih UV filtera (INCI: Octocrylene, Homosalate, Ethylhexyl Salicylate, Butyl Methoxydibenzoylmethane).

Na ispitivanim uzorcima *SWOP* emulzije i poredbene emulzija tipa u/v sa inkorporiranim 5% m/m DHK urađena je *in vivo* preliminarna procena efikasnosti i bezbednosnog profila upotrebom metode bioinženjeringa kože (odeljak 3.1.2.3.3). *In vivo* procena urađena je u kratkotrajnoj studiji na zdravoj koži dobrovoljaca.

Pošto je mikroskopska analiza pripremljenih uzoraka nakon 30 dana ukazala na kristalizaciju model aktivne supstance DHK, pripremljeni su novi uzorci *SWOP* emulzija sa 0,5% m/m i 1% m/m DHK prethodno rastvorene u propilenglikolu, kao i *SWOP* emulzija bez aktivne supstance sa propilenglikolom (tabela 10). Na pripremljenim uzorcima izvršena je procena fizičko-hemijske stabilnosti u toku perioda čuvanja (24 h, 30 dana i godinu dana). Metode ispitivanja su obuhvatile organoleptičku procenu, određivanje električne provodljivosti i pH vrednosti uzoraka, ispitivanje fizičke stabilnosti (test centrifugiranja), procenu promene veličine kapi primenom svetlosne mikroskopije, reološku karakterizaciju primenom kontinualnih reoloških merenja, kao i određivanje sadržaja kozmetički aktivne supstance 48 h, 30 dana, 60 dana i godinu dana nakon izrade i termalnu analizu 24 h nakon izrade.

Tabela 10. Sastav *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v sa *DHK* i *HMS*

<i>Sastojci</i>	<i>SWOP</i> (% m/m)		<i>u/v</i> (% m/m)
	<i>S</i>	<i>S_{TPGx}</i>	<i>R_{TPGx}</i>
Poligliceril-2 dipolihidroksistearat	4,0	4,0	/
Lauril glukozid, Poligliceril-2 dipolihidroksistearat, glicerin	/	/	3,0
Tečni parafin	8,0	8,0	8,0
Ulje semenki suncokreta	8,0	8,0	8,0
Kaprilno-kaprinski trigliceridi	8,0	8,0	8,0
Cetearil alkohol	2,0	2,0	2,0
Konzervans [§]	0,5	0,5	0,5
Natrijum laurilglukozkarboksilat, Lauril glukozid	1,5	1,5	/
Natrijum poliakrilat	0,8	0,8	0,7
Glicerin	3,0	3,0	3,0
Voda	do 100,0	do 100,0	do 100,0
Dihidrovercetin	/	*	*
Propilenglikol	10,0	10,0	10,0

[§] Fenoksietanol, Metilparaben, Butilparaben, Etilparaben, Propilparaben, Izobutilparaben

* – količina dodate model aktivne supstance *DHK* (0,5% i 1%)

3.1.2.3.1. Izrada *SWOP*, poredbenih i standardnih emulzija sa dihidrovercetinom i/ili homosalom

Standardna emulzija sa *HMS* (R_{HMS}) izrađena je prema propisu iz *US Food and Drug Administration Sunscreen Monograph*. Masna i vodena faza su zagrejane posebno na 77 °C, odnosno 82 °C uz konstantno mešanje, sve dok se sastojci u obe faze nisu dispergovali. Masna faza je dodata vodenoj fazi uz mešanje pomoću propellerske rotacione mešalice na 2000 o/min u toku 5 minuta. Mešanje je nastavljeno brzinom od 1000 o/min sve dok se emulzija nije ohladila na sobnu temperaturu (15 °C do 30 °C). Na kraju je dodata prečišćena voda kako bi se dobilo 100 g standardne emulzije za zaštitu od UV zračenja.

Ostale emulzije iz tabele 10 su pripremljene slično *SWOP* emulziji i poredbenoj emulziji tipa u/v iz odeljka 3.1.2.1.1. i odeljka 3.1.2.1.3. Homosalat je odmeren i pomešan

sa sastojcima masne faze kod emulzija koje ga sadrže (S_{HMS} i S_{HD}). DHK je rastvoren u 10 g etanola, 96% v/v i dodat u emulziju na 30 °C uz mešanje brzinom od 500 o/min kod emulzija koje sadrže 0,5 – 5,0 g DHK (S_{DHKx} i R_{DHKx}). Jedino je kod emulzija sa 10% m/m DHK (S_{DHK10} i R_{DHK10}), DHK (10 g) odmeren i dodat u masnu fazu pre zagrevanja.

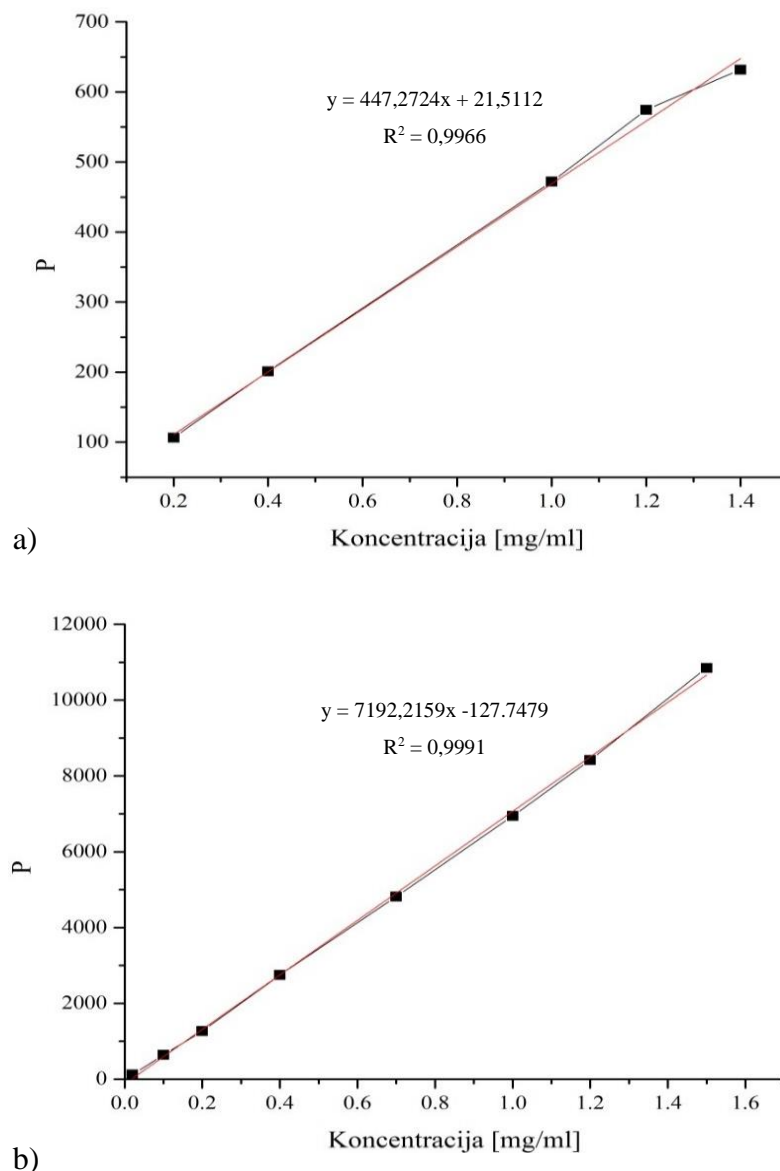
Analiziranje pripremljenih uzoraka je izvršeno 24 h nakon njihove izrade, a obuhvatilo je određivanje pH i električne provodljivosti, test centrifugiranja, kontinualnu reološku analizu, *DSC* i mikroskopsku analizu. Mikroskopska analiza emulzija izvršena je 24 h i 30 dana nakon izrade emulzija. Postupci i oprema korišćeni prilikom analiza opisani su u odeljcima 3.1.2.1.2. i 3.1.2.2.3.

3.1.2.3.2. *Određivanje sadržaja inkorporirane kozmetički aktivne supstance dihirokvercetina u SWOP emulziji*

U cilju ispitivanja stabilnosti kozmetičkog proizvoda koji sadrži KAS, između ostalog, vrši se i određivanje sadržaja KAS u periodu ispitivanja (čuvanja). U te svrhe, a u zavisnosti od prirode KAS, primenjuju se odgovarajuće analitičke tehnike. Jedna od veoma pogodnih metoda je i *HPLC* metoda, kojom se pored određivanja sadržaja KAS mogu analizirati i nečistoće.

Oprema: Tečni hromatograf (*HPLC* uređaj Finnigan Surveyor Thermo Scientific, SAD, Thermo Surveyer) opremljen sledećim komponentama: Pumpom Finnigan Surveyor Thermo Scientific *HPLC* Pump Plus, Autosemplerom Plus i UV/VIS Plus detektorom. Za razdvajanje uzoraka korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C8 150 x 4,6 mm, 5 μ m (Agilent, SAD). Za upravljanje instrumentom, prikupljanje i obradu podataka korišćen je ChromQuest softver.

Za praćenje koncentracije inkorporirane aktivne supstance *DHK* u *SWOP* emulziji razvijena je *RP-HPLC* metoda (engl. *Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography*). U te svrhe kao mobilna faza korišćena je smeša acetonitrila i vode u odnosu 30 : 70 (%v/v) na temperaturi od 45 °C. Za podešavanje pH mobilne faze na 2,8 korišćena je fosforna kiselina. Brzina proticanja mobilne faze bila je 1 ml/min. Detekcija je vršena na talasnoj dužini $\lambda = 355$ nm.



Slika 15. Kalibracione krive: a) čiste aktivne supstance DHK i b) čistog kvercetina

Pripremljeni su uzorci *SWOP* emulzije čiji je sastav i način izrade dat u tabeli 10 u odeljku 3.1.2.3. (obeležen kao S) i *SWOP* emulzije sa 0,5% m/m i 1% m/m DHK i propilenglikolom, čiji je sastav i način izrade takođe dat u tabeli 10 u odeljku 3.1.2.3. (*STPGx*) i ostavljeni su na sobnoj temperaturi 48 h pre merenja. Određivanje sadržaja kozmetički aktivne supstance DHK izvršeno je, u toku vremena odnosno 48 h, 30 dana, 60 dana i godinu dana nakon izrade. Za izradu kalibracionih krivih korišćene su čiste supstance dihidrokvercetina i kvercetina (slika 15a i 15b).

3.1.2.3.3. *In vitro* određivanje SPF i UVA-PF pripremljenih emulzija

Oprema: Spektrofotometar opremljen integrisanom sferom (Specord M40, Zeiss, Jena, Nemačka) i kvarcnim kivetama (Hellma Analytics 50×10 mm, Nemačka); Analitička vaga (Mettler analytical balance, Mettler Toledo, SAD).

Metoda koja se koristi za određivanje *SPF* i *UVA-PF* je bazirana na adaptaciji *in vitro* tehnike koju su razvili Diffey i Robson (Diffey i Robson, 1989). Ova tehnika je zasnovana na merenju transmisije uzorka primenjenog na čvrst substrat unutar opsega talasnih dužina od 200 nm do 400 nm.

Precizno, pomoću analitičke vage je odmereno 1000 mg od svakog uzorka i raspoređeno preko unutrašnje površine kvarcne kivete, pomoću laboratorijske špatule. Nakon rasprostiranja uzorka, višak mase uklonjen je sa površine. Uzorci su se sušili 15 minuta, zaštićeni od svetlosti. Merenja transmisije između 290 nm i 400 nm i između 320 nm i 400 nm za određivanje *SPF* i *UVA-PF* su izvedena pomoću spektrofotometra opremljenog integrisanom sferom. Za svaku emulziju pripremljeni su razmazi na tri kivete (unutrašnja površina), a na svakoj kiveti je urađeno devet merenja. Računanje je izvedeno pomoću sledećih jednačina:

$$SPF = \frac{\sum_{290}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} \Delta_{\lambda}}{\sum_{290}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} T_{\lambda} \Delta_{\lambda}}$$

$$UVA - PF = \frac{\sum_{320}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} \Delta_{\lambda}}{\sum_{320}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} T_{\lambda} \Delta_{\lambda}}$$

gde E_{λ} predstavlja eritemalnu spektralnu efikasnost koju je dala Internacionalna komisija za svetlost (Commission Internationale de l'Eclairage, CIE), S_{λ} je solarno spektralno zračenje i T_{λ} predstavlja spektralnu transmisiju/propustljivost uzorka (Villalobos-Hernández i Müller-Goymann, 2007; El-Boury i sar., 2007).

Praktično, integral predstavlja sumu više pojedinačnih mernih tačaka, 30 tačaka u spektralnoj oblasti od 290 nm do 320 nm (UVB) i 80 tačaka od 320 nm do 400 nm (UVA). U oblasti između 290 nm i 400 nm ima 110 nm, a merne tačke nalaze se na svakom intervalu talasne dužine od 1 nm, pa se za određivanje *SPF* koristi suma 110 izmerenih vrednosti ulazne energije i 110 izmerenih vrednosti izlazne/emitovane energije.

3.1.2.3.4. *In vivo* preliminarna procena efikasnosti i bezbednosnog profila *SWOP* emulzija (sa i bez dihidrokvercetina)

Sa ciljem da se procene *in vivo* performanse formulisanih *SWOP* emulzija, izmereni su transepidermalni gubitak vlage (TEGV), hidratacija *SC* (SCH), pH kože i eritem indeks (EI).

❖ **Protokol ispitivanja**

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

Studija je bila organizovana u dva dela. U njoj su učestvovala dve grupe dobrovoljaca. Jednu grupu činilo je 10 dobrovoljaca prosečne starosti $32 \pm 6,1$, a drugu grupu 11 dobrovoljaca prosečne starosti $30 \pm 4,8$ sa normalnom kožom, bez istorije dermatoloških bolesti.

Dobrovoljci su potpisali pisanu izjavu koja je u saglasnosti sa Helsinškom deklaracijom i Etičkim Komitetom za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Ispitanici su bili u obavezi da ne koriste druge kozmetičke proizvode 2 dana pre, kao i tokom eksperimenta. U prvom delu ispitivanja, organizovana je kratkotrajna studija u trajanju od jednog sata sa uzorcima *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v bez (prazan nosač) i sa aktivnom supstancom DHK, dok je u drugom delu bila organizovana specijalno dizajnirana kratkotrajna dvominutna studija sa *SWOP* emulzijom bez aktivne

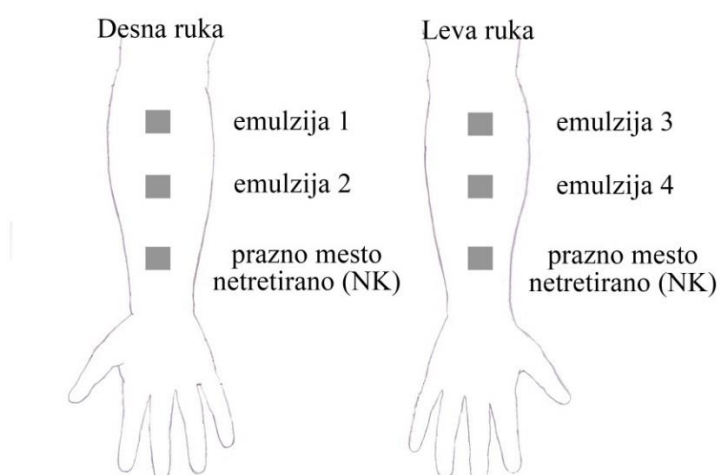
supstance. Merenja su se odvijala u laboratoriji pod kontrolisanim uslovima (temperatura 22 ± 1 °C i relativna vlažnost vazduha $35 \pm 5\%$), nakon dvadesetominutnog perioda aklimatizacije dobrovoljaca, koju preporučuju odgovarajući vodiči i literatura (Pinnagoda i sar., 1990; Berardesca, 1997; Piérard, 1998; Jaksic i sar., 2012; Leitlinien für die Bewertung der Wirksamkeit von kosmetischen Mitteln, Hrsg. IKW, 2001).

Emulzije su bile obeležene sa trocifrenim brojevima i sva merenja su se vršila na volarnoj strani podlaktice, na mestima označenim za primenu ispitivanih emulzija veličine 4 x 4 cm, pri čemu je jedno mesto ostavljeno kao netretirana kontrola (NK) (Slika 16). Za određivanje mesta i njihove površine korišćen je kartonski šablon.

Dizajn studije

Merenja su izvršena pre (inicijalno merenje), 1 minut i 1 h nakon primene uzoraka. Merenja SCH i TEGV sprovedena su na svakih 15 minuta (15, 30, 45 minuta) u toku jednočasovne studije.

U drugom delu studije izmerene su inicijalne vrednosti, a merenja su dalje nastavljena na svakih 10 s nakon primene emulzije (10 s je bilo potrebno za utrljavanje emulzije u kožu) tj. merenja su bila sprovedena u 10 vremenskih tačaka: nakon 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 i 120 s.



Slika 16. Volarna strana podlaktice sa mestima označenim za primenu ispitivanih emulzija.

❖ Statistička analiza

Dobijeni podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija. Na dobijenim vrednostima primenjena je jednofaktorska ANOVA sa posthoc Tukey testom ukoliko je bilo potrebno. Rezultati *in vivo* merenja prikazani su kao procentne razlike u vrednostima parametara u različitim vremenskim tačkama u odnosu na početne vrednosti.

Sve statističke analize sprovedene su primenom OriginPro9 softverskog paketa (OriginLab Corporation, Northampton, SAD), a nivo značajnosti bio je $p < 0,05$.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog rada

4.1.1. *Formulacija i fizičko-hemijska karakterizacija SWOP emulzija i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u*

4.1.1.1. **Formulacija i preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti SWOP emulzija i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u**

Korišćenjem dostupnih podataka iz literature i od proizvođača sirovina izrađena je serija od 18 uzoraka *SWOP* emulzije. Sastav ovih emulzija bio je različit za 10 navedenih formulacija (F1 – F10) (tabela 5), dok su ostalih 8 emulzija bile istog sastava kao neke od navedenih, ali su bile izrađene drugačijim postupkom izrade. Sve formulacije F1 – F10 u zavisnosti od postupka izrade bile su tečne ili emulzije konzistencije mekog krema, bele boje, sjajne, sa manje ili više prisutnih mehurića vazduha, koji su posledica penjenja upotrebljenog anjonskog surfaktanta. Od 10 navedenih formulacija (tabela 5) najstabilnije nakon primenjenog mehaničkog stresa (test centrifugiranja) su formulacije sa oznakom F1, F7 i F10. Uočeno je da izbor komponenata masne faze kao i brzina mešanja u toku izrade imaju uticaj na fizičku stabilnost emulzija. Postupak izrade emulzija koji je uključio homogenizaciju laboratorijskom propelerskom mešalicom pri brzini od 2000 o/min dao je stabilne uzorke emulzija u periodu od 24 h i 30 dana nakon izrade. Emulzije koje sadrže kaprilno-kaprinske trigliceride čija je polarnost 21,3 mN/m (Sorns i sar., 2007; Eichhorn i sar., 2012), bez obzira na postupak izrade, ispoljile su nestabilnost, koja se manifestovala odvajanjem faza pod dejstvom mehaničkog stresa (test centrifugiranja) već 24 h nakon izrade. Dodatno, suprotno očekivanju, dodavanje ksantan gume kao ugušćivača vodene faze, nije doprinelo stabilizaciji sistema, čak je dovelo do brže destabilizacije sistema. Druga ulja, tečni parafin kao nepolaro (43,7 mN/m) (Sorns i sar., 2007; Eichhorn i sar., 2012) i ulje semenki suncokreta kao polarno (19,3 mN/m) (Sorns i sar., 2007; Eichhorn i sar., 2012) pokazali su dobru kompatibilnost sa nejonskim emulgatorom (poligliceril-2 dipolihidroksistearat) i anjonskim

surfaktantom, dok je dodatak natrijum poliakrilata potpuno stabilizovao sistem i učinio ga viskoznijim.

Sa ciljem da se izabere optimalna model formulacija *SWOP* emulzije, koja bi bila uključena u nastavak istraživanja, bilo je neophodno uraditi preliminarnu procenu fizičko-hemijske stabilnosti pripremljenih *SWOP* emulzija. U te svrhe izvodi se studija prirodnog starenja na sobnoj temperaturi u trajanju od 3, 6, 12 meseci (USP 26; Ali i sar., 2014) i pri tome se mogu pratiti sledeći fizičko-hemijski parametri: pH vrednost, električna provodljivost, veličina kapi, distribucija veličine kapi, reološki parametri kao što su minimalni i maksimalni prividni viskozitet, histerezna površina, elastični i viskozni modul i dr (Vuleta i sar., 2012; Rieger, 1991). Preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti izrađenih emulzija izvedena je u studiji prirodnog starenja na sobnoj temperaturi (22 ± 1 °C) u trajanju od mesec dana. Pri tome su praćene promene vrednosti: električne provodljivosti i pH emulzija, promene u uzorcima tokom centrifugiranja, veličina kapi, reološki parametri (minimalni i maksimalni prividni viskozitet i histerezna površina) u periodu od 24 h i 30 dana nakon izrade uzoraka. U tabeli 11 prikazani su rezultati navedenih ispitivanja.

Tabela 11. Rezultati ispitivanja uzoraka *SWOP* emulzija, 24 h nakon izrade

Uzorak	Centrifugiranje ^a I (15 minuta)	Centrifugiranje II (15 minuta)	pH	El. provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
F1	N ^b	N	7,78	254
F2	O ^c	O	6,27	197
F3	O	O	6,09	332
F4	O	O	/	0,590
F5	O	O	/	1,214
F6	O	O	/	0,041
F7	N	N	7,83	145,1
F8	O	O	6,03	298
F9	N	O	6,23	199
F10	N	N	5,91	1349

^atest centrifugiranja detaljno je opisan u odeljku 3.1.2.1.2.

^bN – nema odvajanja faza; ^cO – odvajanje faza

Kod emulzija F1, F7 i F10 nije uočeno odvajanje faza nakon oba ciklusa centrifugiranja, pa su one ostavljene 30 dana na sobnoj temperaturi (22 ± 1 °C) (prirodno starenje).

Pored njih emulzije F8 i F9 iako su pokazale znake odvajanje faza nakon oba ciklusa centrifugiranja, odabrane su zbog sastava masne faze i ostavljene 30 dana pod istim uslovima kako bi se moglo izvršiti adekvatno poređenje. U tabeli 12 su date vrednosti praćenih parametara 30 dana nakon izrade. Određivanje pH vrednosti emulzija F4, F5 i F6 nije bilo moguće zbog njihove izražene nestabilnosti.

Tabela 12. Rezultati ispitivanja uzoraka *SWOP* emulzija, 30 dana nakon izrade

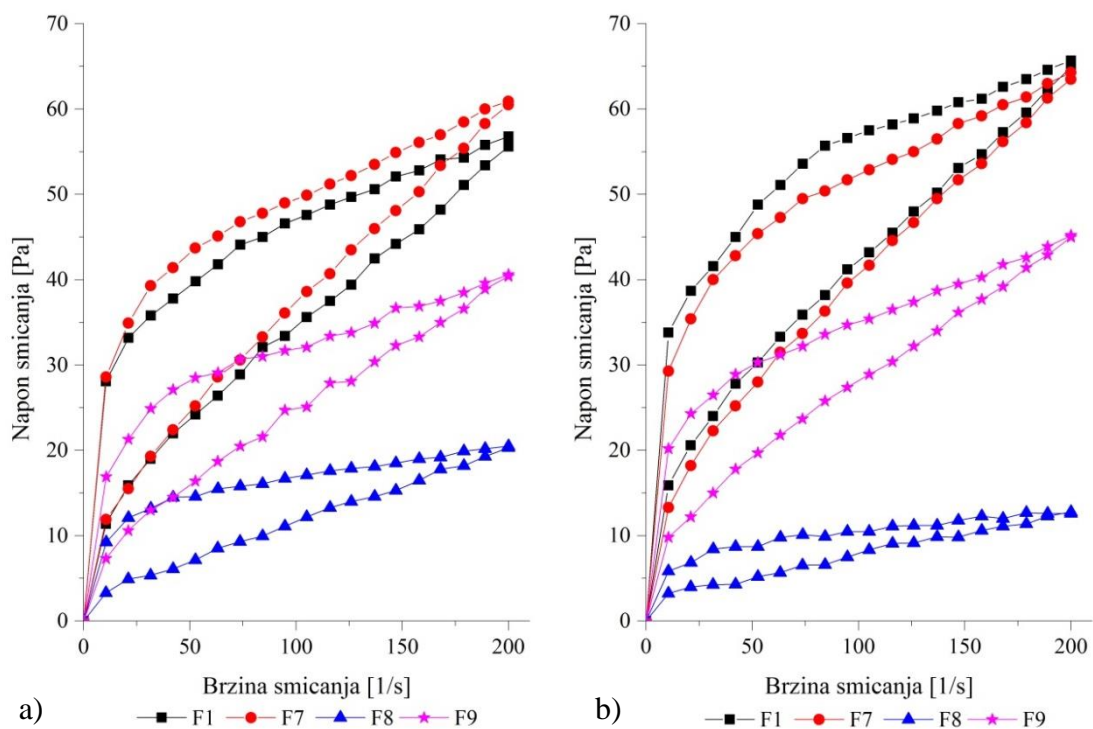
Uzorak	Centrifugiranje ^a I (15 minuta)	Centrifugiranje II (15 minuta)	pH	El. provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
F1	O ^c	O	7,28	265
F7	O	O	7,44	185
F8	O	O	5,91	372
F9	O	O	6,06	209
F10	N ^b	N	5,92	1145

^atest centrifugiranja detaljno je opisan u odeljku 3.1.2.1.2.

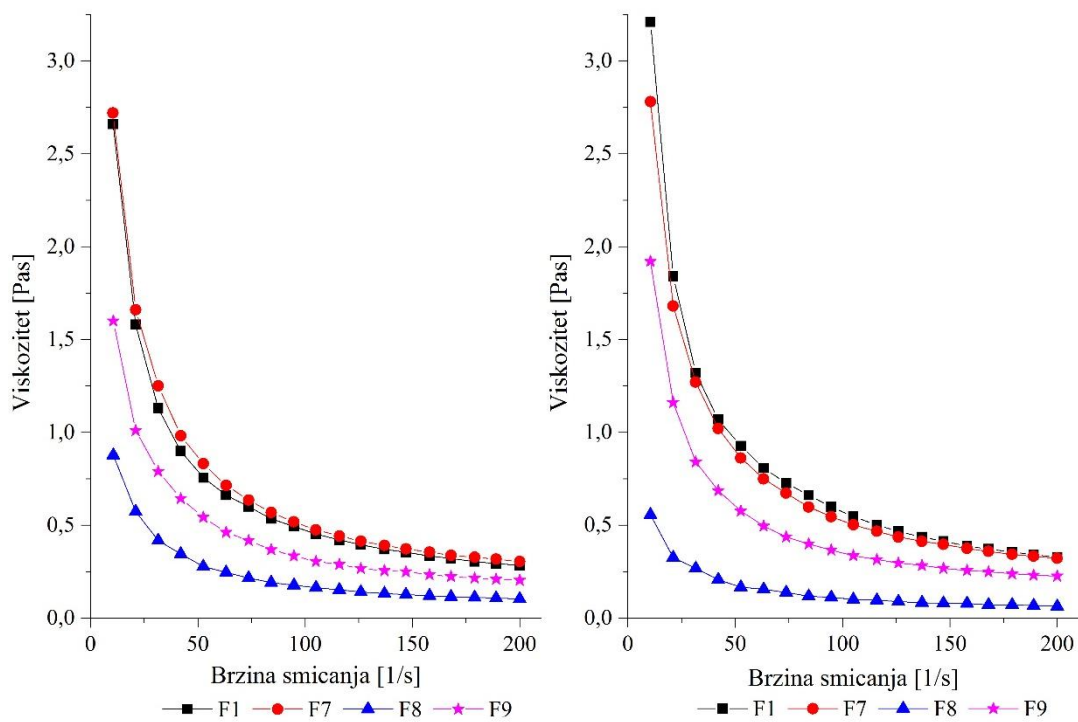
^bN – nema odvajanja faza; ^cO – odvajanje faza

Kod svih uzoraka emulzija, osim kod uzorka F10, primećen je blagi pad pH vrednosti i blago povećanje vrednosti električne provodljivosti. Posmatranjem uzoraka emulzija svetlosnim mikroskopom (mikrografije nisu prikazane) došlo se do zaključka da je kod svih uzoraka, sem uzorka F10, došlo do povećanja veličine kapi kao posledice koalescencije. Testom centrifugiranja utvrđeno je da je samo uzorak F10 ostao stabilan 30 dana nakon čuvanja na sobnoj temperaturi.

Sa slike 17 uočava se vremenski zavisno (engl. *shear thinning*) proticanje sa umerenom tiksotropijom – plastično proticanje (Hinrichs i Dreijer-van der Glas, 2015). Dodatno sa slike 17 i 18 i iz tabele 13 uočava se da se formulacija F8 najviše promenila u toku 30 dana, što ukazuje na njenu nestabilnost. Za razliku od nje emulzije F1, F7 i F9 su se neznatno promenile, pa bi se samo na osnovu rezultata reoloških merenja moglo zaključiti da su stabilne u periodu ispitivanja.



Slika 17. Upporedni reogrami ispitivanih *SWOP* emulzije na kojima je prikazana zavisnost napona smicana od brzine smicanja: a) 24 h i b) 30 dana nakon izrade



Slika 18. Krive viskoziteta ispitivanih *SWOP* emulzija: a) 24 h i b) 30 dana nakon izrade

Tabela 13. Vrednosti prividnog minimalnog i maksimalnog viskoziteta i histerezne površine za ispitivane uzorke *SWOP* emulzija

Uzorak	η_{min} [Pas] $D=200,0 \text{ s}^{-1}$		η_{max} [Pas] $D=10,0 \text{ s}^{-1}$		HP [Pa/s]	
	24 h	30 dana	24 h	30 dana	24 h	30 dana
F1	0,28	0,33	2,66	3,21	2181,2	2431,8
F7	0,30	0,32	2,72	2,78	2238,5	2116,3
F8	0,10	0,06	0,88	0,56	928,9	475,4
F9	0,20	0,23	1,60	1,92	1363,4	1282,4
F10	1,50	1,59	15,5	15,3	3893,1	3692,4

Reogrami za formulaciju F10 prikazani su na slici 17, a podaci o reološkim parametrima u tabeli 13, gde se jasno vidi da nema značajne razlike u dobijenim vrednostima parametara 24 h i 30 dana nakon izrade uzorka.

Ispitivanjem fizičke stabilnosti uzoraka *SWOP* emulzija došlo se do njene optimalne model formulacije sa oznakom F10. Pošto su *SWOP* emulzije specifične emulzije tipa u/v koje prelaze u emulzije tipa v/u tokom njihove primene na kožu, bilo je neophodno formulisati i izraditi poredbene emulzije oba tipa, u/v i v/u, kako bi se mogla raditi adekvatna poređenja tokom narednih ispitivanja.

Na osnovu literaturnih podataka i podataka dobijenih od proizvođača sirovina formulisane su i izrađene dve poredbene emulzije: emulzija tipa u/v označena kao RUV1 i emulzija tipa v/u označena kao RVU1, pri čemu je sastav tečnih komponenti masne faze kvalitativno i kvantitativno bio identičan sa optimalnom model formulacijom *SWOP* emulzije. Postupak izrade koji je odabran za *SWOP* emulziju primenjen je i na poredbenu emulziju tipa u/v, dok je poredbena emulzija tipa v/u morala biti izrađena na drugi način, odnosno na način koji je adekvatan za izradu tog tipa emulzija.

Obe poredbene emulzije su bile bele, sjajne, pri čemu je poredbena emulzija tipa u/v imala konzistenciju mekog krema, a poredbena emulzija tipa v/u je imala konzistenciju viskozne tečne emulzije (poput mleka za telo).

Dobijeni uzorci poredbenih emulzija podvrgnuti su istim preliminarnim ispitivanjima fizičko-hemijske stabilnosti, a to je obuhvatilo ispitivanje prirodnog starenja

na sobnoj temperaturi (22 ± 1 °C) u trajanju od mesec dana. Pri tome su praćene vrednosti istih parametara i u istim vremenskim intervalima kao kod uzoraka *SWOP* emulzija.

Tabela 14. Rezultati ispitivanja uzoraka poredbenih emulzija, 24 h i 30 dana nakon izrade

Uzorak	Centrifugiranje I ^a (15 minuta)		Centrifugiranje II (15 minuta)		<i>pH</i>		El. provodljivost ($\mu\text{S/cm}$)	
	24 h	30 dana	24 h	30 dana	24 h	30 dana	24 h	30 dana
RUV1	N ^b	N	N	N	5,82	5,86	107,4	235
RVU1	N	O ^c	N	O	7,19	/	0,302	/

^atest centrifugiranja detaljno je opisan u odeljku 3.1.2.1.2.

^bN – nema odvajanja faza; ^cO – odvajanje faza

Dobijeni podaci pokazali su da je poredbena emulzija tipa u/v stabilna, dok je poredbena emulzija tipa v/u pokazala nestabilnost nakon 30 dana (tabela 14). Dodatno, posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom uočeno je razdvajanje faza kod poredbene emulzije tipa v/u, dok su kod RUV1 primećene nešto krupnije kapi unutrašnje faze nakon 30 dana (mikrografije nisu prikazane).

4.1.1.2. Procena fizičko-hemijske stabilnosti *SWOP* emulzija i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u studijom prirodnog starenja

Pošto je poredbena emulzija tipa v/u bila nestabilna isključena je iz procene fizičko-hemijske stabilnosti u ispitivanju prirodnog starenja u dužem vremenskom periodu odnosno u periodu od 90 dana. U studiji koja je trajala 90 dana posmatrane i upoređivane su optimalna model formulacija *SWOP* emulzije F10 i poredbena emulzija u/v RUV1.

Test centrifugiranja kao i dobijene vrednosti određivanja pH i električne provodljivosti nakon 90 dana prirodnog starenja za obe emulzije, F10 i RUV1, ukazale su na njihovu stabilnost (tabela 15).

Tabela 15. Rezultati ispitivanja uzoraka *SWOP* i poredbene emulzije, 90 dana nakon izrade

Uzorak	Centrifugiranje I ^a (15 minuta)	Centrifugiranje II (15 minuta)	pH	El. provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
F10	N ^b	N	5,93	1776
REUV1	N	N	5,89	386

^atest centrifugiranja detaljno je opisan u odeljku 3.1.2.1.2.

^bN – nema odvajanja faza

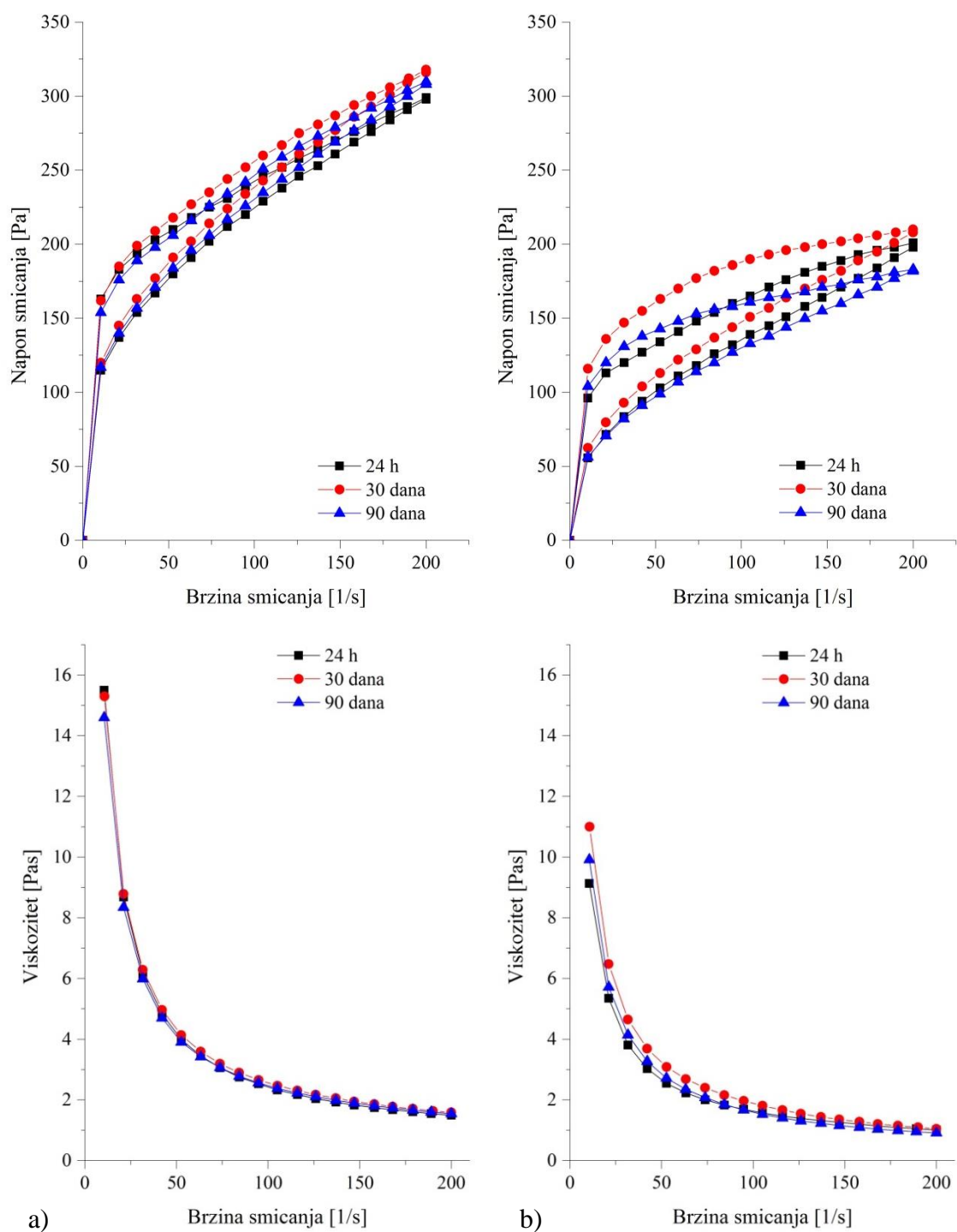
Tabela 16. Vrednosti prividnog minimalnog (η_{min}) i maksimalnog (η_{max}) viskoziteta i histerezne površine (*HP*) za ispitivane uzorke *SWOP* i poredbene emulzije u periodu čuvanja

Uzorak	η_{min} [Pas] $D=200,0 \text{ s}^{-1}$			η_{max} [Pas] $D=10,0 \text{ s}^{-1}$			<i>HP</i> [Pa/s]		
	24 h	30 dana	90 dana	24 h	30 dana	90 dana	24 h	30 dana	90 dana
F10	1,50	1,59	1,55	15,50	15,30	14,60	3893,1	3692,4	3372,9
RUV1	1,01	1,05	0,916	9,13	11,00	9,92	4981,7	6936,7	5553,3

Kontinualna reološka karakterizacija izvršena je i nakon 90 dana prirodnog starenja za obe ispitivane emulzije, F10 i RUV1 a rezultati su prikazani u tabeli 16.

Poređenjem vrednosti ispitivanih parametara može se zaključiti da obe emulzije imaju slične profile proticanja, kao i da su vrednosti za prividni minimalni i maksimalni viskozitet nešto veće za formulaciju F10 u odnosu na poredbenu emulziju RUV1, dok je histerezna površina manja.

Sa slike 19 uočava se da i nakon 90 dana prirodnog starenja emulzije zadržavaju vremenski zavisno (engl. *shear thinning*) proticanje sa umerenom tiksotropijom – plastično proticanje (Hinrichs i Dreijer-van der Glas, 2015). Dobijeni rezultati potvrdili su stabilnost odabrane *SWOP* formulacije kao i poredbene emulzije tipa u/v.



Slika 19. Uporedni reogrami na kojima je prikazana zavisnost napona smicanja od brzine smicanja (gore) i krive viskoziteta (dole) za ispitivane uzorke emulzija a) F10 i b) RUV1 nakon 24 h, 30 dana i 90 dana od izrade.

4.1.1.3. Procena fizičko-hemijske stabilnosti *SWOP* emulzija i poredbene emulzije tipa u/v primenom cikličnog temperaturnog stres testa

U cilju dobijanja pouzdanijih informacija o stabilnosti i strukturi emulzija, u kozmetičkoj industriji je uobičajeno da se parametri kao što su pH, električna provodljivost, reološki parametri prate i u ekstremnim uslovima koji obezbeđuju izvođenje testa „ubrzanog starenja“. U te svrhe pripremljeni su novi uzorci *SWOP* emulzije obeleženi sa SE i poredbene emulzije tipa u/v obeleženi sa REUV.

U stresnim uslovima već se uočavaju značajne razlike između uzoraka *SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa u/v. Tako je viskozitet *SWOP* emulzije porastao nakon trećeg ciklusa čak do 93% u poređenju sa početnom vrednošću, a potom je diskretno opao nakon sledeća tri ciklusa (povećanje do 86% u odnosu na početnu vrednost). S druge strane viskozitet poredbene emulzije tipa u/v ostao je skoro nepromenjen (porastao je do 18% u poređenju sa početnom vrednošću). Jedino je uzorak poredbene emulzije izložene visokoj temperaturi (+ 40 °C) pokazao povećanje u viskozitetu nakon trećeg ciklusa i njegovo opadanje nakon naredna tri ciklusa (tabela 17).

Sve emulzije pokazale su vremenski zavisno tečenje sa umerenom tiksotropijom i mogu se opisati *Herschel-Bulkley* modelom (Tadros, 2004) po kome se određuje i vrednost prinosnog napona (Gilbert i sar., 2013). Model se opisuje jednačinom:

$$\sigma = \sigma_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n$$

gde je σ_0 prinosni napon, K je indeks konzistencije i n je indeks (vremenski zavisne) sile; $n < 1$.

Kao što se može videti iz tabele 14, na početku, oba tipa emulzija pokazuju značajan otpor tečenju, verovatno zbog razvijene gel strukture u spoljašnjoj fazi (Gilbert i sar., 2013).

Tabela 17. Vrednosti maksimalnog (η_{max}) i minimalnog (η_{min}) prividnog viskoziteta, prinosnog napona (σ_0) i histerezne površine (HP) za ispitivanu *SWOP* i poredbenu emulziju tipa u/v

<i>Parametri</i>			η_{max} (Pas)			η_{min} (Pas)			σ_0 (Pa)			HP (Pa/s)		
			$D=10,0 \text{ s}^{-1}$			$D=200,0 \text{ s}^{-1}$			t_0	III	VI	t_0	III	VI
<i>Vreme</i>			t_0^b	III ^a	VI ^a	t_0	III	VI	t_0	III	VI	t_0	III	VI
<i>Tip emulzije</i>	<i>Uzorak</i>	<i>Uslovi čuvanja</i>												
<i>SWOP emulzija</i>	<i>SE1</i>	ciklus	6,0	10,8	11,3 ^c	0,7	0,9	0,9 ^b	39,1	69,9	32,9 ^b	1736,1	5802,9	6351,8 ^b
	<i>SE5</i>	ciklus	6,0	10,8	8,8	0,7	0,9	0,9	39,1	69,9	37,7	1736,1	5802,9	4683,4
	<i>SE2</i>	sobna temperatura	6,0	7,7	7,0	0,7	0,7	0,7	39,1	70,1	60,6	1736,1	2941,0	2803,7
	<i>SE3</i>	+40 °C	6,0	11,5	11,1	0,7	0,9	1,0	39,1	112,9	90,1	1736,1	4336,0	4832,3
	<i>SE4</i>	+4 °C	6,0	9,5	9,9	0,7	0,8	0,8	39,1	99,9	96,7	1736,1	4230,8	4685,2
<i>poredbena u/v emulzija</i>	<i>REUV1</i>	ciklus	11,8	13,9	12,7 ^b	1,1	1,1	1,1 ^b	111,5	133,9	116,0 ^b	3647,9	6528,3	5461,9 ^b
	<i>REUV5</i>	ciklus	11,8	13,9	12,3	1,1	1,1	1,1	111,5	133,9	118,7	3647,9	6528,3	4466,0
	<i>REUV2</i>	sobna temperatura	11,8	13,0	12,7	1,1	1,1	1,1	111,5	124,1	118,7	3647,9	6139,0	5702,9
	<i>REUV3</i>	+40 °C	11,8	18,6	14,4	1,1	1,5	1,3	111,5	193,4	143,1	3647,9	8658,9	4916,5
	<i>REUV4</i>	+4 °C	11,8	12,8	12,4	1,1	1,1	1,1	111,5	118,5	108,1	3647,9	5182,0	5131,8

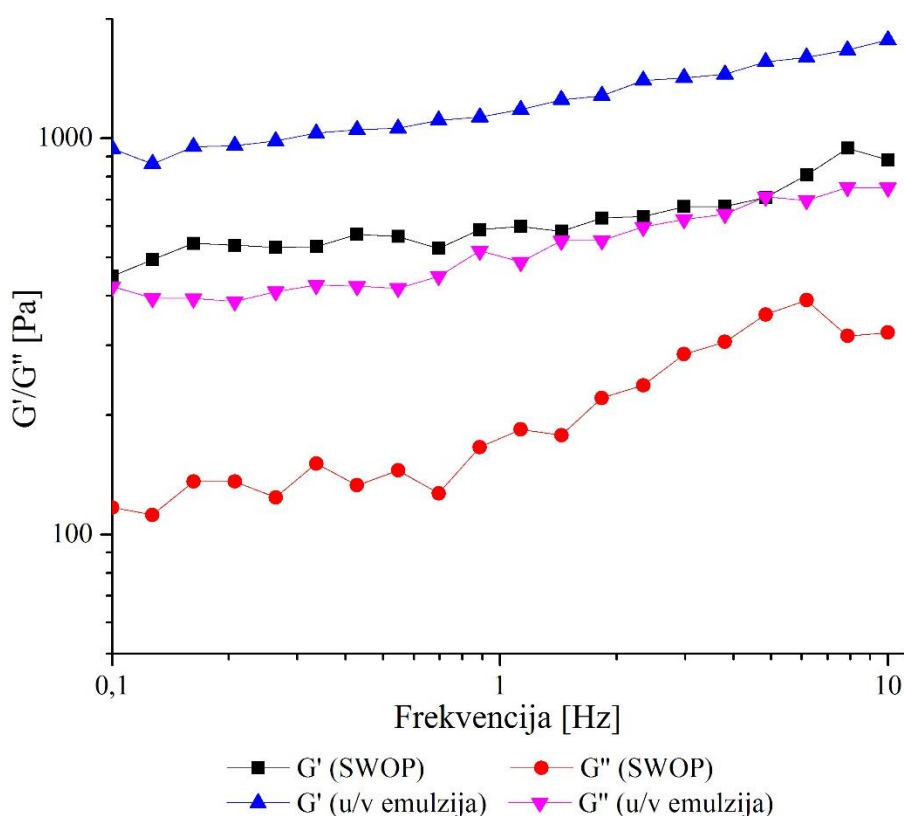
^b Vreme: t_0 – period mirovanja od 24 h nakon izrade; III – nakon trećeg ciklusa; VI – nakon šestog ciklusa

^c Nakon 24 dana (nakon trećeg ciklusa, tj. 12 dana je ostavljen na sobnoj temperaturi)

Više vrednosti prinosnog napona su dobijene za uzorke poredbene emulzije tipa u/v što ukazuje da ovi uzorci imaju jaču gel strukturu. Jača gel struktura može se objasniti manjim promenama viskoziteta kod poredbene emulzije tipa u/v u poređenju sa *SWOP* emulzijom izloženom ekstremnim temperaturnim uslovima.

Rezultati oscilatorne reologije za oba tipa emulzija pokazali su da je elastični (G') modul dominantan u odnosu na viskozni (G'') modul u primenjenom opsegu frekvencija (slika 20), što odgovara gel stanju i ponašanju sličnom čvrstim uzorcima (Masmoudi i sar., 2006).

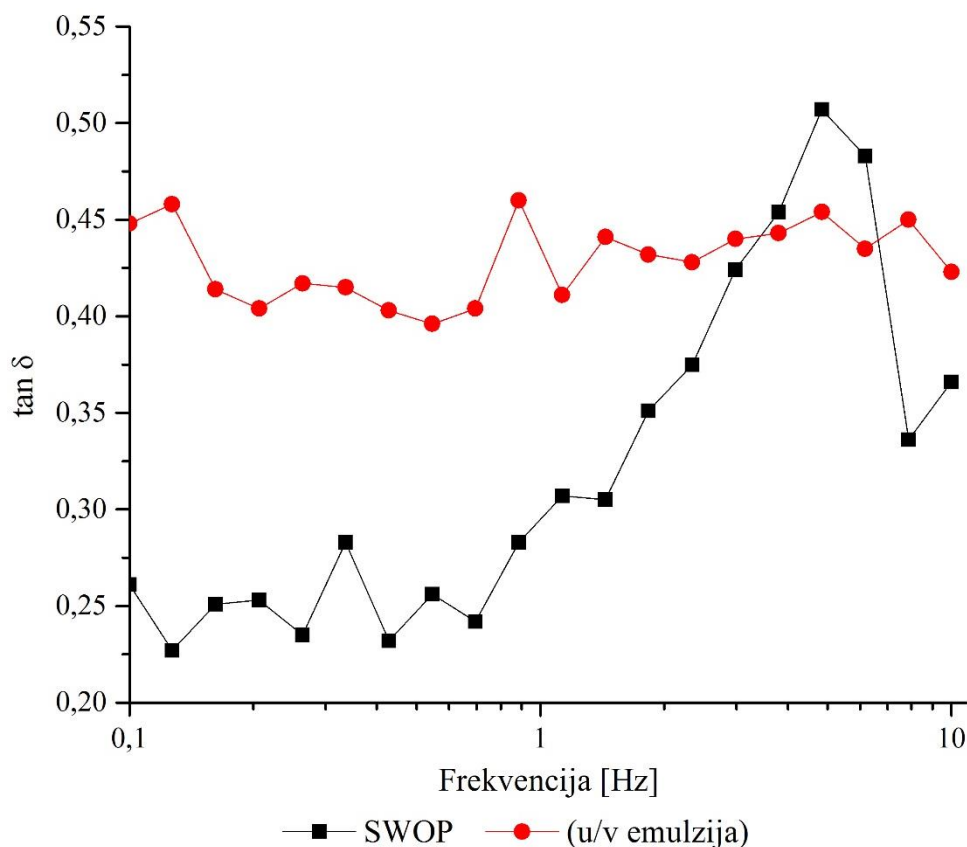
Oba modula, G' i G'' , blago rastu sa porastom frekvencije. Kada se poveća frekvencija vrednost $\tan \delta$ takođe raste (slika 21), ali G' je i dalje dominantan pa je vrednost $\tan \delta$ uvek manja od 1 ($\approx 0,4$) (slika 21), što potvrđuje elastično ponašanje ovih emulzija (Masmoudi i sar., 2006).



Slika 20. Zavisnost elastičnog (G') i viskoznog (G'') modula od frekvencije za *SWOP* emulziju i emulziju tipa u/v, 24 h nakon pripreme.

Neznatno povećanje $\tan \delta$ sa porastom frekvencije, koje je karakterističnije za *SWOP* emulziju, odgovara brzom rastu viskoznog modula (slika 21). Ovo odgovara smanjenju elastičnosti što se može objasniti slabljenjem interakcija između kapi unutrašnje faze, nakon čega sledi slabljenje strukture gel mreže što za posledicu ima destabilizaciju sistema (Masmoudi i sar., 2006; Diftis i sar., 2005).

Kod poredbene emulzije tipa u/v $\tan \delta$ se nije značajno promenio sa porastom frekvencije, a to ukazuje da poredbena emulzija tipa u/v ima jaču gel strukturnu mrežu (slika 21), što je u dobroj korelaciji sa vrednošću prinosnog napona dobijenim za poredbenu emulziju tipa u/v (tabela 17).

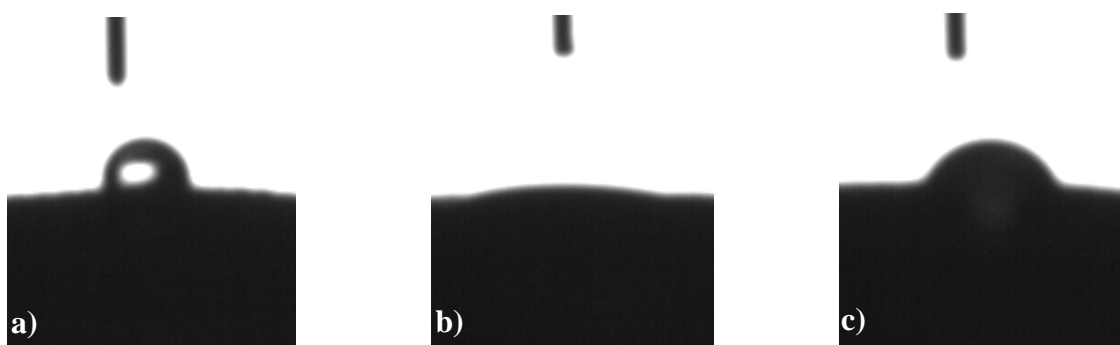


Slika 21. Zavisnost $\tan \delta$ od frekvencije za *SWOP* emulziju i emulziju tipa u/v, 24 h nakon pripreme.

4.2. Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada

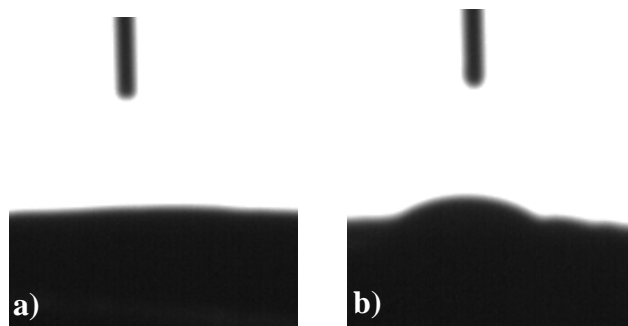
4.2.1. Merenje kontaktnog ugla

Specifičnost *SWOP* emulzija ogleda se u njihovoj sposobnosti da prilikom primene na kožu pređu iz emulzije tipa u/v u emulziju tipa v/u i formiraju lipofilni, voodootporni film na koži. Klasične emulzije tipa u/v takođe prelaze u emulzije tipa v/u na koži, ali ta inverzija se dešava posle izvesnog vremena. Da bi se napravila razlika između *SWOP* emulzija i drugih emulzija tipa u/v može se primeniti metoda zasnovana na merenju kontaktnog ugla (između kapi vode i emulzije primenjene na kožu) u zavisnosti od vremena (Beuché i sar., 2008). Merenjem kontaktnog ugla između kapi vode i *SWOP* emulzije, odnosno poredbene emulzije tipa u/v, moguće je odrediti vreme potrebno za inverziju faza kod ovih emulzija. Kada se kap vode nađe na hidrofilnoj površini, kontaktni ugao između kapi vode i hidrofilne površine je mali, a kvašenje je veliko. Na hidrofobnoj površini voda formira kap pravilnog oblika sa velikim kontaktnim uglom između kapi i hidrofobne površine, ali je kvašenje malo (Yuan i Lee, 2013). Primećeno je da čista, odmašćena koža formira veliki kontaktni ugao sa vodom (iznad 90°) (Ginn i sar., 1970), kao što se može videti i na slici 22a.



Slika 22. Kap vode na a) odmašćenoj koži (kontaktni ugao $96,89^\circ$); b) primenjenoj *SWOP* emulziji nakon 1 minuta (kontaktni ugao $16,26^\circ$); c) primenjenoj *SWOP* emulziji nakon 30 minuta (kontaktni ugao $70,34^\circ$).

Kada se primene na koži, i *SWOP* i emulzija tipa u/v formiraju hidrofilnu površinu preko kože koja smanjuje kontaktni ugao sa vodenom kapi (oko 0°) (Ginni sar., 1968).

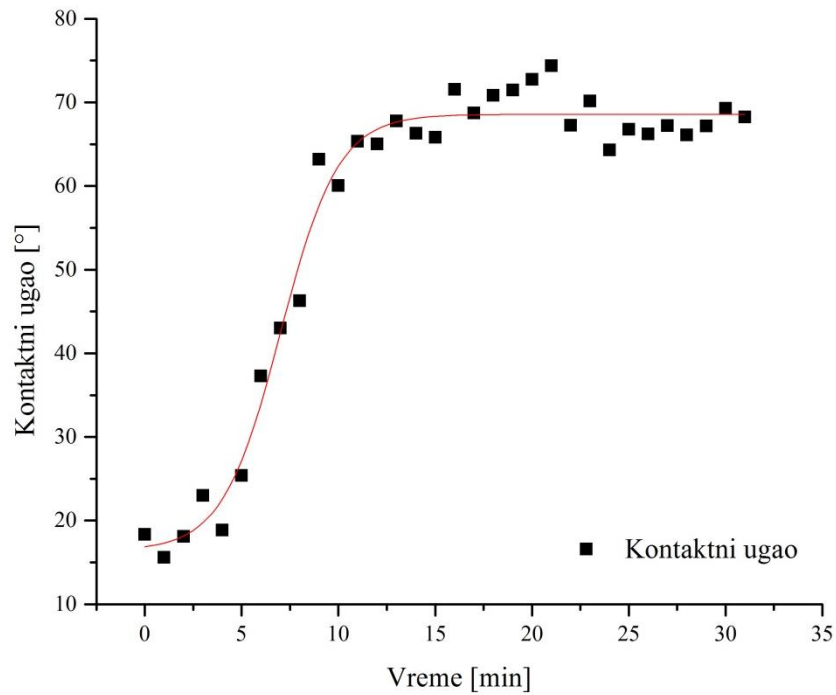


Slika 23. Kap vode na a) primenjenoj poredbenoj emulziji tipa u/v nakon 1 minuta (kontaktni ugao 10,59°); b) primenjenoj poredbenoj emulziji tipa u/v nakon 30 minuta (kontaktni ugao 38,31°).

Kontaktni ugao kapi vode raste vremenom pre nego što dostigne vrednosti veće od 60°. Vreme potrebno da se postignu viši kontaktni uglovi je različito za *SWOP* (oko 30 minuta) (slika 22c, tabela 18) i emulziju tipa u/v (oko 1 h).

Tačka inverzije koja ukazuje na vreme potrebno da emulzija tipa u/v pređe u emulziju tipa v/u (Beuché i sar., 2008) može se odrediti pomoću krive zavisnosti kontaktnog ugla od vremena (slika 24) ili korišćenjem Boltzmann-ove jednačine (tabela 18).

Tačka inverzije *SWOP* emulzije bila je između 6 minuta i 15 minuta (slika 24, tabela 18), dok je za emulziju tipa u/v bila veća od 30 minuta. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da se, nakon primene, struktura *SWOP* emulzije ruši brže, voda se oslobađa i lakše isparava, ostavljajući uniforman, masan, hidrofobni film na površini kože. Ova osobina direktno je povezana sa činjenicom da *SWOP* emulzije daju kontaktne uglove iznad 30°, što ih kategorizuje kao vodootporne bez potrebe da se dodatno testiraju COLIPA metodom za određivanje vodootpornosti (Hagens i sar., 2007).



Slika 24. Zavisnost kontaktnog ugla od vremena za kapi vode u kontaktu sa površinom na kojoj je primenjena SWOP emulzija.

Tabela 18. Prikaz Boltzmann-ove jednačine i tačke inverzije (x_0)

Model	Boltzmann		
Jednačina	$y = A2 + (A1 - A2) / (1 + \exp((x - x_0) / dx))$		
Chi-kvadrat	8,2002		
Suma R kvadrata	0,9786		
		Vrednost	Standardna greška
Početna vrednost (°)	A1	16,40	1,88
Krajnja vrednost (°)	A2	68,58	0,66
Centar (min)	x_0	7,01	0,23
Vremenska konstanta	dx	1,49	0,19

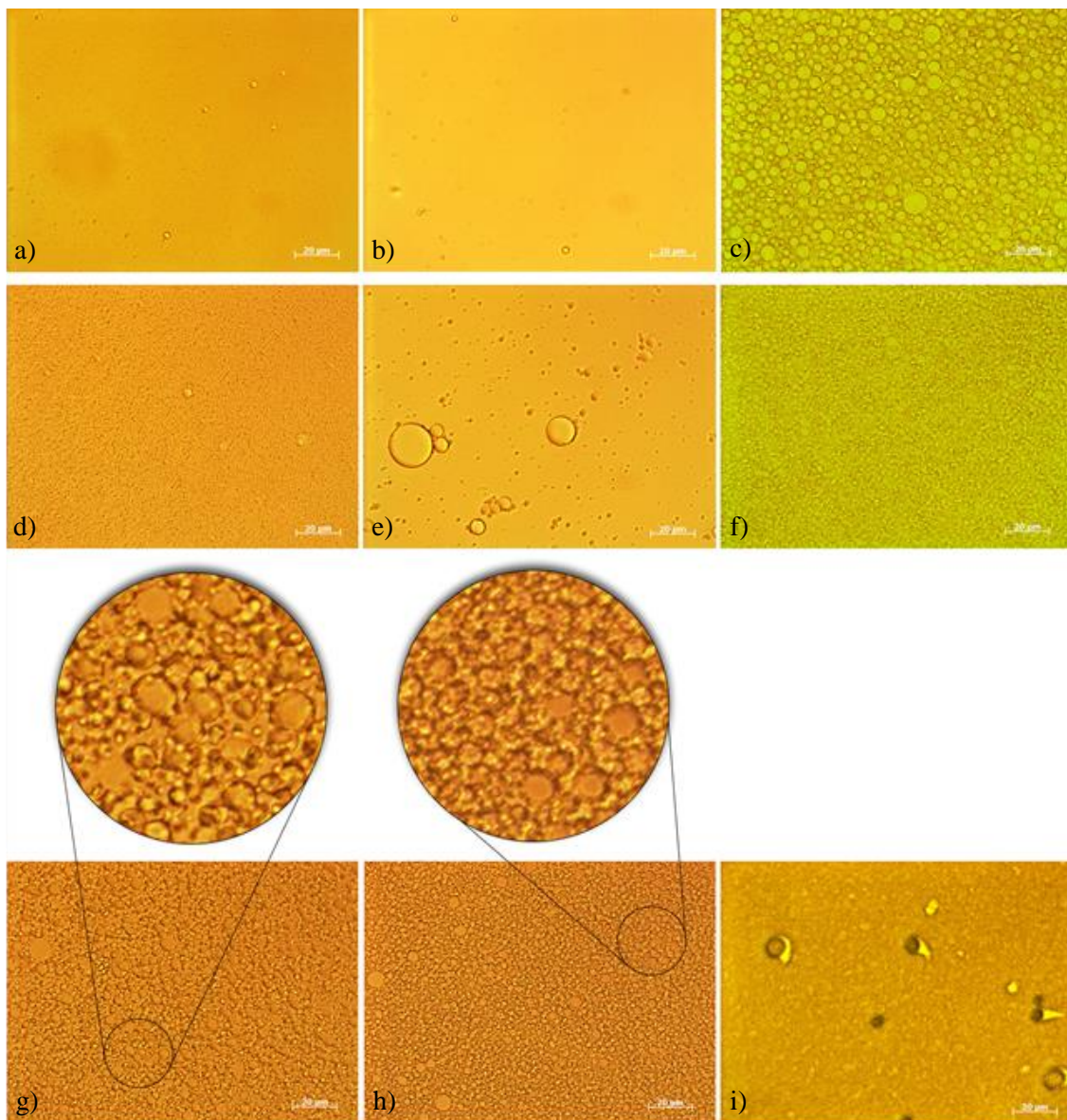
4.2.2. Ispitivanje koloidne strukture – distribucije vode u emulzionom sistemu

4.2.2.1. Mikroskopska analiza binarnih sistema i jednostavnih emulzija

Za ispitivanje koloidne strukture i distribucije vode pripremljeni su novi uzorci *SWOP* (S1, S2, S3 i S4), tip u/v (ReUV1, ReUV2 i ReUV3) i tip v/u (ReVU1, ReVU2, ReVU3) emulzije i binarni sistemi (tabela 7). Uzorak *SWOP* emulzije sa oznakom S4 po sastavu i načinu pripreme odgovara odabranoj model formulaciji *SWOP* emulzije F10. Kao što se može videti iz tabele 7, uzorci se neznatno razlikuju po sastavu. Male varijacije u sastavu odabrane su kako bi se mogla definisati uloga svake komponente u formiranju koloidne strukture emulzije. Da bi se dobio uvid u koloidnu strukturu sprovedena je detaljna fizičko-hemijska karakterizacija, prvo na uzorcima koji su se sastojali samo od vode i emulgatora (tabela 7) tzv. binarnim sistemima: S1, ReUV1, odnosno smeši emulgatora, stabilizatora (cink stearat i magnezijum sulfat) i vode u slučaju emulzije v/u označene kao ReVU1, potom na uzorcima u koje je dodato odabrano ulje (emulzije: S2 i ReUV2), odnosno v/u koemulgator (poligliceril-3 diisostearat) u slučaju emulzije ReVU2 i na kraju na uzorcima koji imaju još jednu komponentu više, bilo da je u pitanju polimerni stabilizator (natrijum poliakrilat) u *SWOP* i u/v emulzijama (S3 i ReUV3) ili odabrano ulje u slučaju emulzije v/u ReVU3.

Razmatrajući dobijene mikrografije, primećeno je da su uzorci binarnih sistema S1 i ReUV1 (slika 25a i 25b) kao i uzorci emulzija S2 i ReVU1 (slika 25d i 25c) homogeni sa malim, pravilnim kapima bez znakova koalescencije. Uzorak ReUV2 pokazuje manju homogenost sa jasno vidljivim flokulama (slika 25e). Detaljnijim uvidom u sve mikrografije uočeno je da emulzije tipa v/u: ReVU1, ReVU2, ReVU3 (slika 25c, 25f, 25i) imaju različitu strukturu u odnosu na slične *SWOP* (S3) i u/v (ReUV3) emulzije. Poslednja dva pomenuta uzorka imala su kapi sličnog oblika, distribucije i veličine (srednja vrednost prečnika kapi: 0,84 μm , odnosno 0,735 μm) što može ukazati na dobru stabilnost ovih emulzija u dužem vremenskom periodu. Iako je voda gelirana natrijum poliakrilatom (S3, slika 25g i ReUV3, slika 25h) bila jasno vidljiva u oba uzorka (srednja

vrednost prečnika geliranih struktura: 3,86 μm , odnosno 2,67 μm) postojalo je nekoliko bitnih razlika između ova dva emulziona sistema.



Slika 25. Polarizacijske mikrografije binarnih sistema: a) S1, b) ReUV1 i emulzija: c) v/u emulzije ReVU1, d) *SWOP* emulzije S2, e) u/v emulzije ReUV2, f) v/u emulzije ReVU2, g) *SWOP* emulzije S3, h) u/v emulzije ReUV3, i) v/u emulzije ReVU3.

Tačnije, na mikrografiji *SWOP* emulzije S3 (slika 25g), određeni diskontinuirani sloj nalazio se oko vode gelirane polimerom (strukture koja podseća na kap, nekompletno

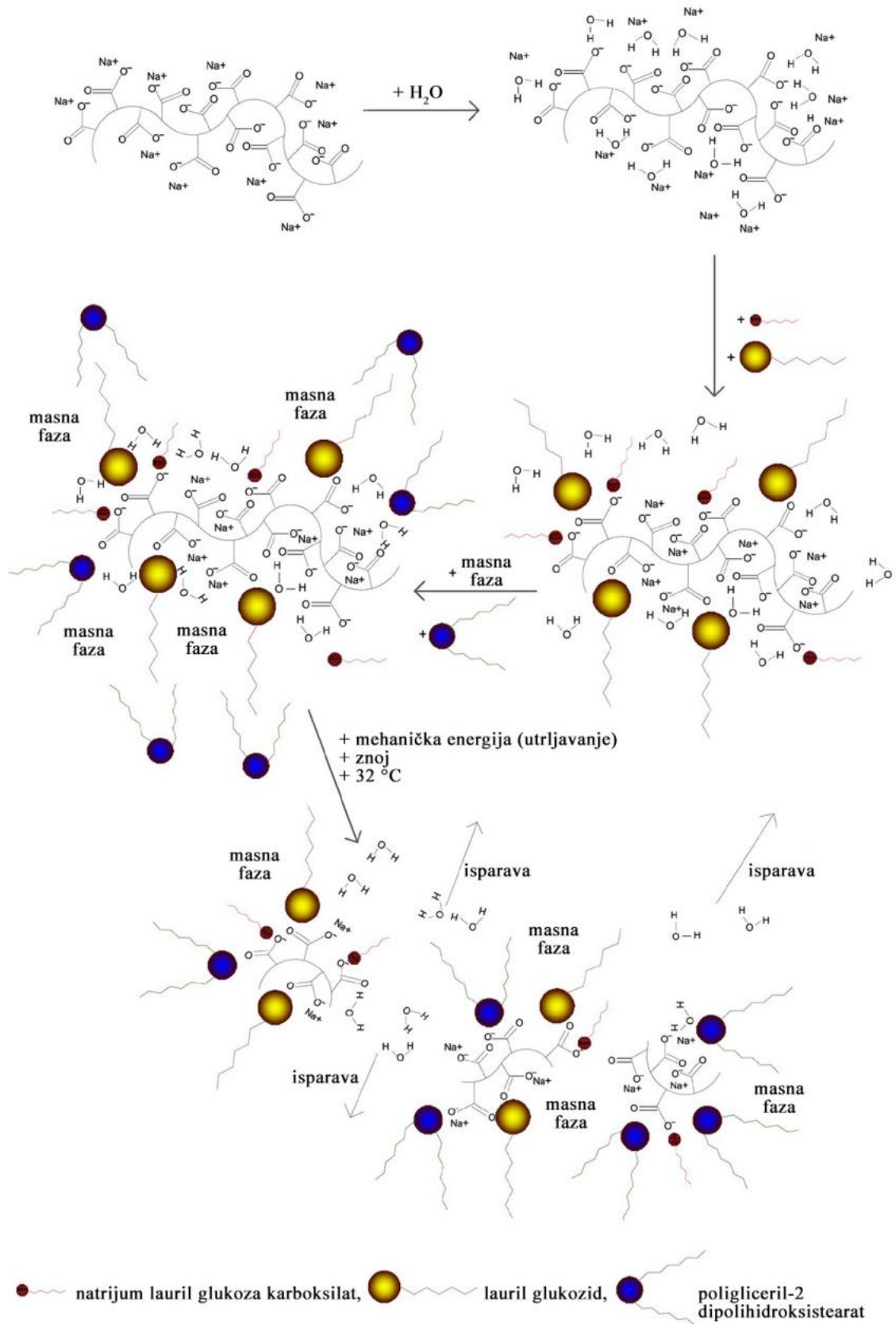
okružene sa nekoliko slojeva); ovi slojevi verovatno se sastoje od nejonskog emulgatora (poligliceril-2 dipolihidroksistearat) i anjonskog surfaktanta (natrijum laurilglukozkarboksilat, lauril glukozid).

Pomenuti prekidi emulgator/surfaktant slojeva mogli bi biti razlog curenja vode iz narušene gel strukture. Iz literature je poznato da višak natrijum dodecilsulfata proizvodi više jona i slobodnih micela u medijumu, izazivajući skupljanje mikrogela karbomera i opadanje viskoziteta (Barreiro-Iglesias i sar., 2003).

Slično zapažanjima Barreiro-Iglesias i saradnika može se pretpostaviti da prisustvo anjonskog surfaktanta (natrijum laurilglukozkarboksilat) može izazivati skupljanje poliakrilatnog gela i kao posledica toga dolazi do curenja vode iz gela. Dodatno, svuda oko gelirane vode kao i kroz frakcije slobodne vode uočeno je puno malih kapi, što najverovatnije predstavlja dispergovanu masnu fazu. Suprotno, na mikrografiji emulzije tipa u/v (ReUV3, slika 25h), gelirana voda je kompletno zatvorena u pravilno oblikovane strukture bez znakova curenja vode iz gela (slika 25h). Moguće je da u ovom uzorku određene grupe emulgatora (lauril glukozid, poligliceril-2 dipolihidroksistearat) dolaze u interakciju sa geliranom vodom i grupišu kapi masne faze na pozicije između ovih struktura. Zapravo, izgleda da emulzija tipa u/v ima mnogo pravilniju i čvršću strukturu od *SWOP* emulzije. Razlike u koloidnoj strukturi između ova dva tipa emulzija ukazuju na mogućnost brze inverzije *SWOP* emulzije nakon primene na kožu. Zahvaljujući prisustvu anjonskog surfaktanta, nejonski emulgator (poligliceril-2 dipolihidroksistearat) nije u mogućnosti da zaštiti geliranu vodu od spoljašnjih uticaja, kao što su joni iz znoja, temperatura kože i mehanička energija mazanja emulzije, koji su u mogućnosti da naruše gel i dozvole da se voda oslobodi i brže ispari (slika 26).

Na osnovu dobijenih rezultata i poznatih osobina komponenti koje čine *SWOP* emulziju može se objasniti njeno formiranje i inverzija faza koja se kod nje dešava prilikom primene na koži.

Natrijum poliakrilat je delimično neutralizovana poliakrilna kiselina i pripada grupi hidrofilnih polimera. Polimer u vodi disosuje na dva jona, karboksilatni anjon (COO^-) i katjon natrijuma (Na^+). Pošto se negativna naelektrisanja međusobno odbijaju, natrijum poliakrilat bubri i formira strukturu gela (slika 26).



Slika 26. Predlog koncepta formiranja SWOP emulzije i njene inverzije faza.

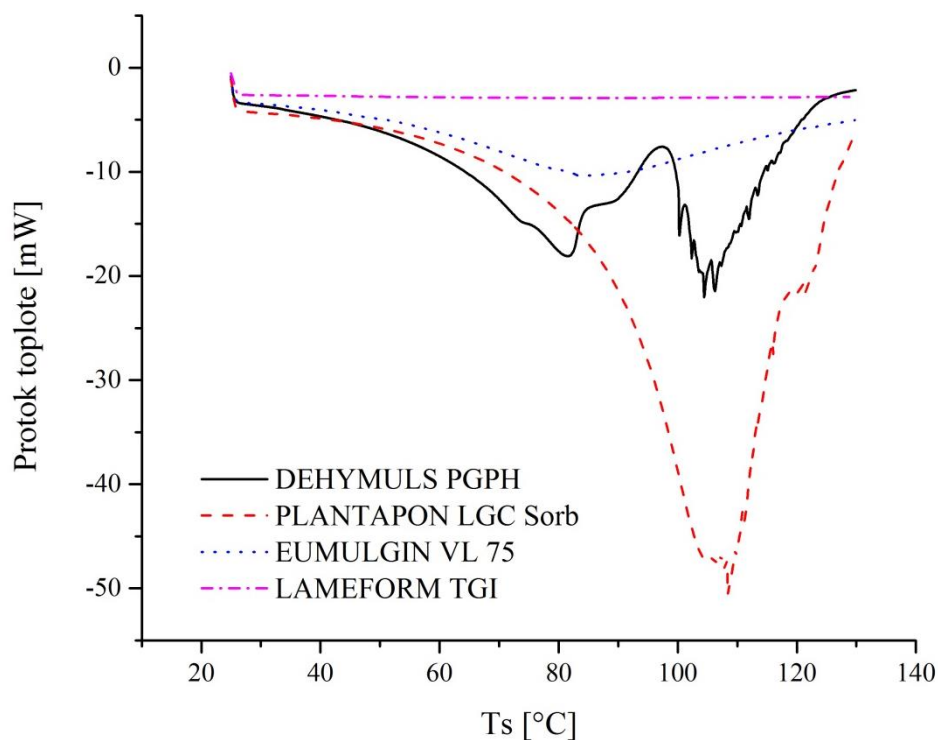
Kao što je već pomenuto, dodatak anjonskog surfaktanta (mešavina natrijum laurilglukozkarboksilata i lauril glukozida) formiranom gelu, verovatno povećava jonsku snagu medijuma, što dovodi do efekta isoljavanja, tj. gel se uvija i smanjuje (Barreiro-Iglesias i sar., 2003) istiskujući i oslobađajući vodu (slika 26).

S druge strane, interakcija između nejonskog emulgatora (poligliceril-2 dipolihidroksistearat) i polimernog stabilizatora (natrijum poliakrilat) je obično slaba i zasniva se na formiranju vodoničnih veza između ove dve komponente (Barreiro-Iglesias i sar., 2003). Na kraju, treba uzeti u obzir i pozitivnu interakciju između nejonskog emulgatora i anjonskog surfaktanta, koja dovodi do toga da ove komponente, verovatno usled hidrofobnih interakcija, formiraju mešane micide, koje stabilizuju kapi ulja diskontinuirane masne faze (slika 26). Pomenute interakcije su u ravnoteži i zahvaljujući tome formirani emulzioni sistem je stabilan. Međutim, tokom primene emulzije na kožu, ova ravnoteža se narušava delovanjem eksternih faktora kao što su joni iz znoja, temperatura kože (32 °C) i mehanička energija koja se koristi prilikom utrljavanja emulzije na kožu.

Najverovatnije primenjena mehanička energija tokom utrljavanja emulzije na kožu doprinosi narušavanju strukture gela što omogućava jonima iz znoja, pre svega Na⁺ da poveća efekat isoljavanja koji ima i anjonski surfaktant, pa se kao rezultat toga gel uvija i smanjuje/skuplja se, a voda se oslobađa. Oslobođena voda brzo isparava sa kože, posebno, jer i temperatura kože dodatno podstiče njeno isparavanje (slika 26).

4.2.2.2. Termalna analiza binarnih sistema i jednostavnih emulzija

Termalna analiza obuhvatila je *DSC* i *TGA*. *DSC* merenja dala su bolji uvid u koloidnu strukturu pripremljenih uzoraka. *DSC* je, zahvaljujući svojoj osetljivosti na termalne promene u materijalima, pogodan za procenu stepena kristalizacije, ali i polimorfnih struktura unutar materijala kao što su voskovi (Matas i sar., 2003). Dobijeni *DSC* termogrami koji prikazuju promene toplotnog fluksa u zavisnosti od temperature, analizirani su i određene su entalpije prelaza za sve tipove ispitivanih emulzija. *DSC* profili emulgatora predstavljeni su na slici 27.



Slika 27. DSC profili emulgatora korišćenih za pripremu uzoraka ispitivanih emulzija

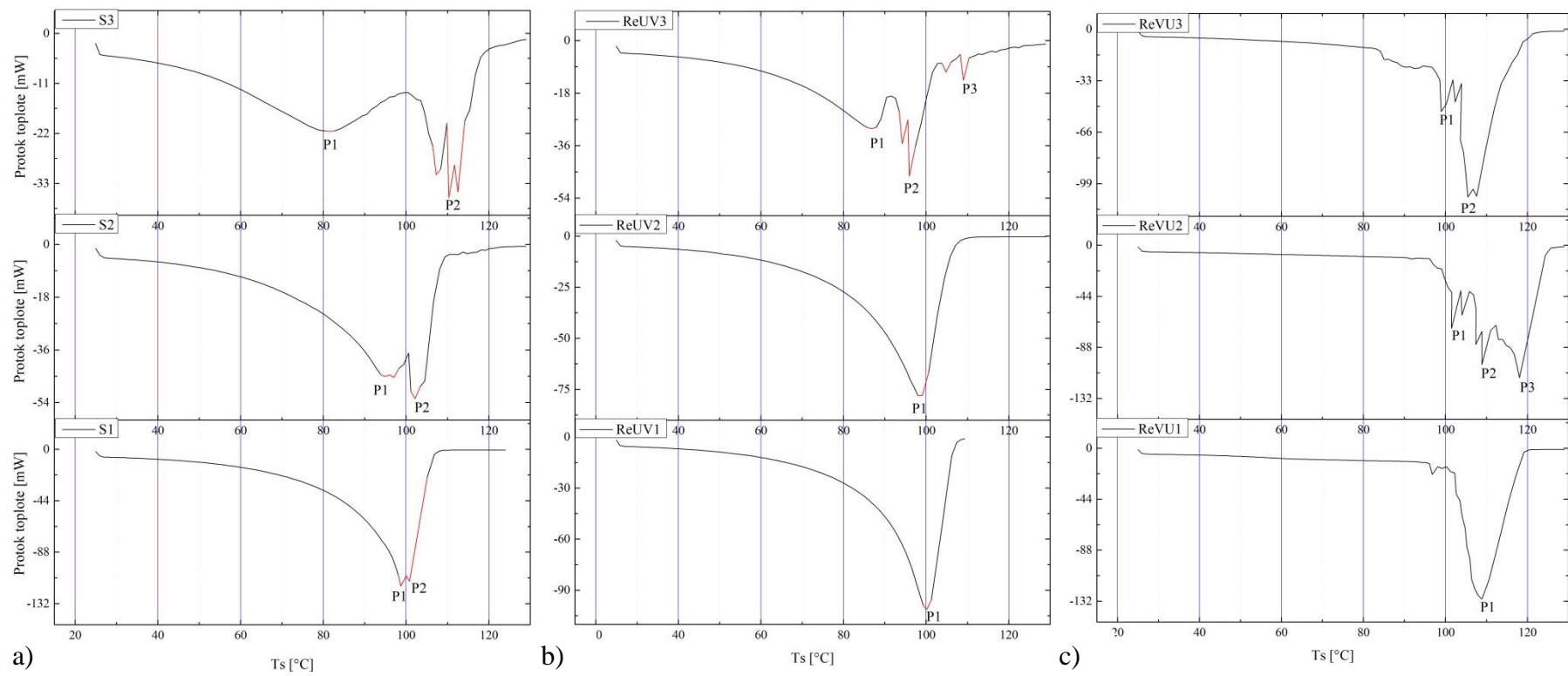
Entalpije prelaza su niže za višekomponentne uzorke, što ukazuje da svaka komponenta doprinosi stabilnosti emulzija (slika 27). Da bi se dobila još potpunija slika o koloidnoj strukturi emulzija, uobičajeno je da se zajedno sa analizom DSC rezultata, posmatraju i upoređuju rezultati termogravimetrijske analize. TGA je još jedna metoda koja služi za procenu distribucije vode u ispitivanim uzorcima kao i njihove potencijalne koloidne strukture i njihovog potencijala za vlaženje kože (Jaksic i sar., 2012; Savic i sar., 2011). U tabeli 19 su prikazani gubici vode u uzorku u odnosu na određene temperaturne opsege. Poređenjem DSC termograma binarnih sistema S1 i ReUV1 (slika 28a i 28b), primećena je mala razlika u obliku širokog endotermnog pika (Thermal Analysis UserCom 11, 2000). Zapravo, kod uzorka S1 veliki pik je podeljen na dva pika (na 98,7 °C i 100,8 °C), što ukazuje da voda isparava u dve faze, a najverovatniji razlog za to je interakcija sa sistemom emulgator/surfaktant (poligliceril-2 dipolihidroksistearat/natrijum laurilglukozkarboksilat, lauril glukozid). Nasuprot tome, kod uzorka ReUV1 pik je na 100,1 °C, što odgovara tački ključanja vode (100 °C) ukazujući da nema značajne interakcije između vode i emulgatora koji je smeša poligliceril-2 dipolihidroksistearata i lauril glukozida u glicerolu.

Masna faza, koju čini tečni parafin, je dispergovana u vidu kapi u uzorcima emulzija S2 i ReUV2, što je rezultovalo u promeni temperature i/ili obliku pikova koji su prethodno uočeni u uzorcima S1 i ReUV1. Tako uzorak ReUV2 ima pik koji je pomeren ka nižim temperaturama (maksimum pika je između 98 °C i 99 °C) bez promene u obliku. Ipak treba uzeti u obzir i to da je došlo do odvajanja faza u uzorku ReUV2 tokom merenja i da pored prisustva masne faze (tečni parafin), razdvajanje faza takođe može biti uzrok pomeranja pika.

Nasuprot tome, uzorak S2 je bio stabilan i njegov pik je imao značajno izmenjen oblik u prisustvu masne faze. Poređenjem sa odgovarajućim binarnim sistemom S1, u emulziji S2, prvi podeljen pik je bio pomeren ka nižoj temperaturi sa maksimumom između 94,9 °C i 97 °C, dok je drugi bio pomeren ka višoj temperaturi od 102,1 °C (slika 28a).

Navedeni rezultati se dobro slažu sa rezultatima TGA (tabela 19), koji pokazuju da je procenat gubitka mase u temperaturnom opsegu od 100 °C do 110 °C bio dva puta veći za uzorak S2 nego za uzorak S1. Očigledno da je prisustvo masne faze u uzorku S2 promenilo ponašanje sistema emulgator/surfaktant, što je tipično za *SWOP* emulziju, a to je dalje dovelo do opadanja količine vode koja isparava ispod 100 °C, odnosno do povećanja količine vode koja se gubi iznad 100 °C.

Maksimum prvog širokog pika primećenog u rasponu temperatura od 78 °C do 84 °C i od 85 °C do 88 °C za uzorak S3 i ReUV3 (slika 28a i 28b) najverovatnije odgovara isparavanju vode (Csizmazia i sar., 2010) vezane polimernim stabilizatorom natrijum poliakrilatom.



Uzorci	SWOP						u/v					v/u						
	binarni sistem		emulzija				binarni sistem		emulzija			emulzija						
	S1	S2	P1	P2	P1	P2	ReUV1	ReUV2	P1	P2	P3	ReVU1	P1	P1	P2	P3	P1	P2
Entalpija (10 ³ mJ/mg)	-2,10	-1,81	-1,32				-2,16	-2,02	-1,31			-1,51	-1,52	-1,48				
Pik - max (°C)	98,7	100,8	94,9	102,1	81,7	110,3	100,1	99,1	86,8	95,9	109,0	108,9	101,4	108,8	118,0	98,9	105,5	

Slika 28. DSC termogrami za a) SWOP binarni sistem (S1) i SWOP emulzije (S2, S3), b) u/v binarni sistem (ReUV1) i u/v emulzije (ReUV2, ReUV3); c) v/u emulzije (ReVU1, ReVU2, ReVU3), sa prikazom prelaznih entalpija i karakterističnih pikova.

Tabela 19. Vrednosti gubitka mase izražene u procentima u funkciji promene temperature pri specificiranim temperaturnim opsezima dobijene nakon termogravimetrijske analize uzoraka binarnih sistema i *SWOP*, u/v i v/u emulzija

Temperaturni opseg	S1	S2	S3	SE	ReUV1	ReUV3	ReVU1	ReVU2	ReVU3
30 °C – 40 °C	5,93	5,94	2,66	3,54	12,75	0,39	1,22	0,75	0,66
40 °C – 60 °C	25,08	13,05	8,32	13,05	46,15	1,18	4,81	2,67	4,82
60 °C – 80 °C	38,63	13,55	10,25	11,93	10,08	1,45	4,97	3,68	13,95
80 °C – 100 °C	12,04	11,89	12,09	0,19	0,13	1,58	5,41	4,99	27,54
100 °C – 110 °C	3,23	6,78	4,49	0,17	0,09	0,54	3,06	5,10	12,89
Zaostala voda ¹	4,09	5,56	27,67	29,96	9,58	64,90	73,14	77,52	10,37
Zaostale neisparljive komponente ²	5,67	26,72	31,96	32,82	2,86	31,75	5,39	6,58	32,30

¹ Procenat zaostale vode zarobljene u sistemu računat na ukupnu masu uzorka

² Procenat zaostalih neisparljivih komponenti računato na ukupnu masu uzorka

Kod uzoraka S3 i ReUV3 primećuje se nekoliko pikova na višim temperaturama iznad 90 °C. U poređenju sa uzorkom S2 ovi pikovi za uzorak S3 su pomereni ka višim

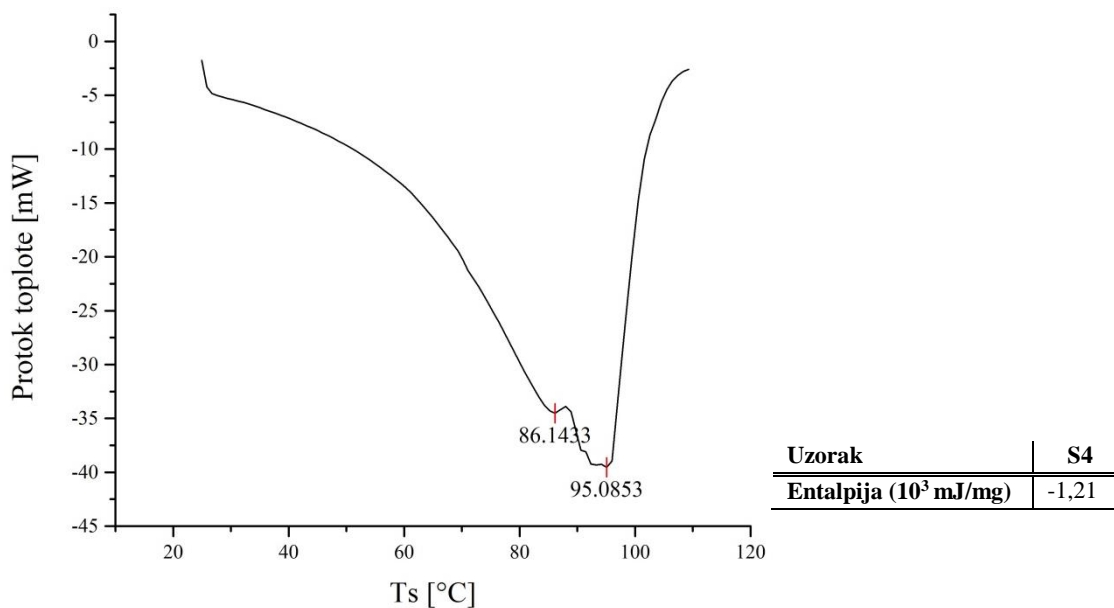
temperaturama (107,2 °C, 110,3 °C i 112,5 °C), što ukazuje da oko 60% mase, odnosno oko 27% ukupne mase uzorka računato kao voda će biti izgubljeno iznad 110 °C (tabela 19).

Suprotno tome, u uzorku ReUV3 (slika 28b), nekoliko pikova je pomerenom ka nižim temperaturama (94,2 °C i 95,9 °C) u poređenju sa uzorkom ReUV2 (slika 28b), što najverovatnije odgovara promeni u strukturi emulzije, ali nije praćeno velikim gubitkom u masi (samo 1,58%) kod uzorka ReUV3. Značajan gubitak mase odigrao se iznad 110 °C gde je gubitak oko 96 % odnosno, oko 65% ukupne mase uzorka računato kao voda. Poređenjem uzoraka S3 i ReUV3, može se zaključiti da *SWOP* emulzija S3 pokazuje znatno brže isparavanje vode u odnosu na emulziju tipa u/v ReUV3.

Ipak, treba primetiti da značajan procenat vode ostaje zarobljen u emulzionim sistemima S3 i ReUV3, što ukazuje na prisustvo vezane vode različitim vezama i na strukturnu kompleksnost ispitivanih uzoraka emulzija (Csizmazia i sar., 2010).

DSC termogrami za uzorke emulzija tipa v/u, ReVU1, ReVU2 i ReVU3 uglavnom imaju pikove iznad 100 °C (slika 28c), što se može povezati sa jednim od sledeća dva razloga: 1) u njima nema polimernog stabilizatora natrijum poliakrilata; 2) molekuli vode su kompletno zatvoreni unutar kapi dispergovane faze i da bi se desile promene u strukturi potrebne su više temperature. Ustanovljeno je da uzorci sa *DCS* termogramima koji su više diferencirani (S3, ReUV3 i ReVU3) oslobađaju različito vezanu vodu u nekoliko faza, što ukazuje na mogućnost očekivanog produženog efekta vlaženja (Csizmazia i sar., 2010).

Na kraju, promene u sastavu masne faze kod *SWOP* emulzije (uzorak S4), koje podrazumevaju dodatak faktora konzistencije cetearil alkohola, pomeraju krivu ka nižim temperaturama (Jaksic i sar., 2012), što za posledicu ima porast gubitka vode ispod 80 °C (tabela 19, slika 29).

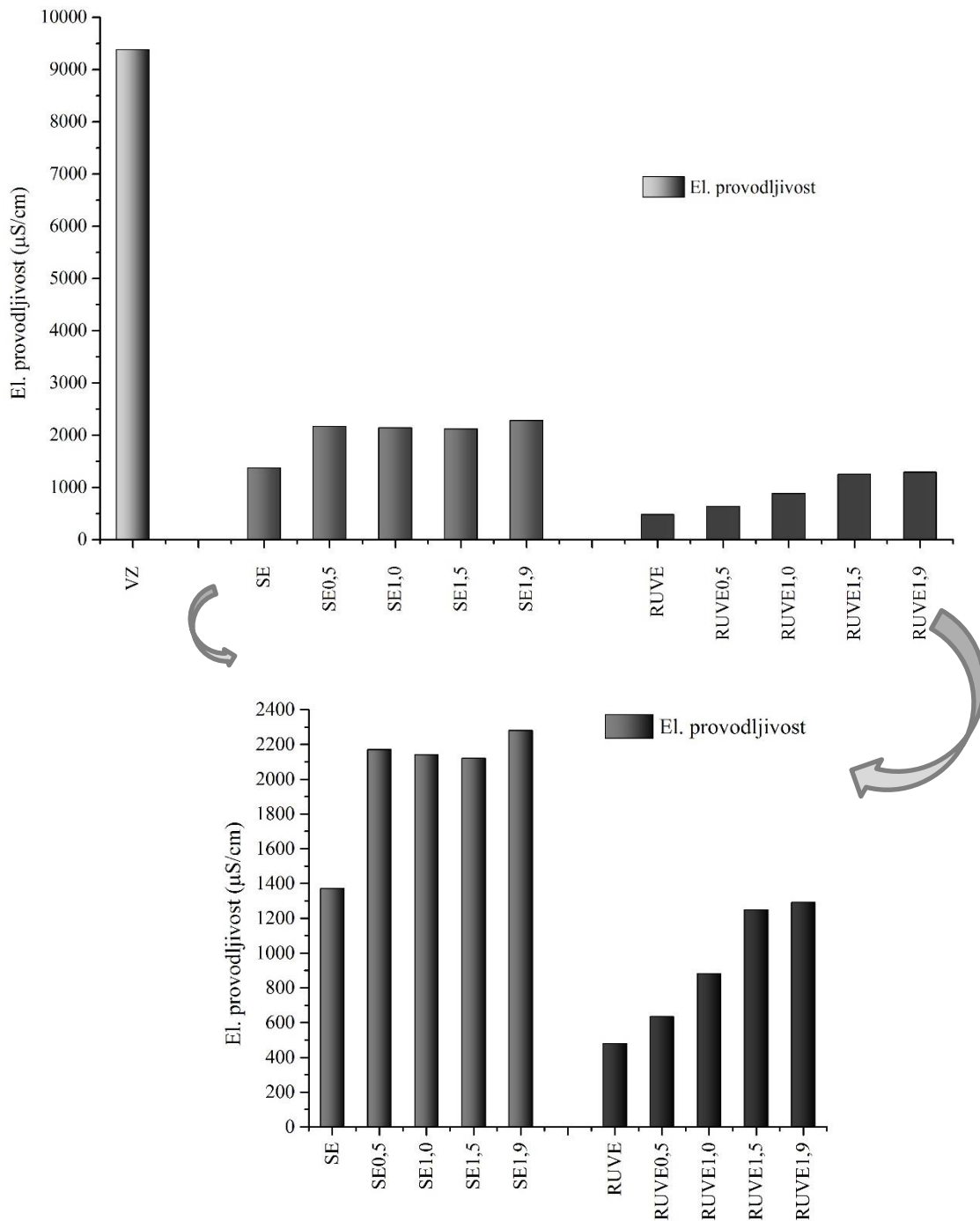


Slika 29. DSC termogram za SWOP emulziju S4.

Na osnovu razmatranja svih rezultata, nameće se zaključak da destabilizacija SWOP emulzije tokom primene na koži, koju uzrokuju prisutni joni, povišena temperatura i primena mehaničke energije ima za posledicu razdvajanje faza i brzo isparavanje vode, ali i pored toga ostaje dovoljno vode u sistemu tako da se ona emulguje sa nejonskim v/u emulgatorom poligliceril-2 dipolihidroksistearatom što dovodi do inverzije emulzije tipa u/v u emulziju tipa v/u na koži (slika 26).

4.2.3. Reološka analiza i određivanje električne provodljivosti izabrane SWOP emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u pod specifičnim uslovima

Određivanje električne provodljivosti ispitivanih uzoraka često se koristi za definisanje tipa emulzije kao i da bi se procenila stabilnost emulzije. Uglavnom, vodena faza sadrži elektrolite dok ih masna faza ne sadrži, pa se merenje električne provodljivosti koristi kako bi se odredio tip emulzije. Visoke vrednosti električne provodljivosti (više od 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$) ukazuju na u/v emulzije, dok niske vrednosti (manje od 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$) ukazuju na emulzije tipa v/u (Jiang i sar., 2013). Uobičajena električna provodljivost masne faze je 100 do 1000 puta manja od provodljivosti vodene faze zbog ograničenog kretanja jona okruženih i ograničenih uljem koje prekida vodenu mrežu (Prieto i Calvo, 2013).



Slika 30. Električna provodljivost emulzija SE, RUVE i RVUE (10 g) bez rastvora sličnog znoju i u njegovom prisustvu (0,5 g, 1,0 g, 1,5 g, 1,9 g). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri nezavisna merenja (sa SD koja je u opsegu od $\pm 2\%$ do $\pm 8\%$).

U ovom istraživanju primenjeno je određivanje električne provodljivosti za tri sveže pripremljene emulziona baze *SWOP*, poredbene emulzije tipa v/u i u/v prema

sastavu datom u odeljku 3.1.2.2. (tabela 7), a obeležene redom kao SE, RVUE i RUVE, kao i njihovih smeša sa rastvorom sličnim znoju u odnosu 5,3:1.

SWOP emulzija (SE) (slika 30) imala je veću vrednost električne provodljivosti (1370 $\mu\text{S}/\text{cm}$) od poredbene emulzije tipa u/v RUVE (479 $\mu\text{S}/\text{cm}$), verovatno zbog prisustva jona iz anjonskog surfaktanta kao i polimernog stabilizatora. Dodatkom rastvora sličnog znoju, električna provodljivost ovih emulzija je porasla, ali je taj porast bio veći za RUVE (čak do 170%) u odnosu na SE (do 67%). Interesantno je da je sa povećavanjem količine dodatog rastvora sličnog znoju, električna provodljivost kod RUVE primetno rasla, dok je dodatak istih količina rastvora sličnog znoju kod SE bio praćen tek neznatnim porastom električne provodljivosti.

Kontinualna faza emulzije RUVE je voda i električna provodljivost emulzije je proporcionalna električnoj provodljivosti kontinualne faze (Kundu i sar., 2013). Sadržaj elektrolita vodene faze se povećao sa dodatkom rastvora sličnog znoju i električna provodljivost spoljašnje faze, odnosno električna provodljivost RUVE je porasla. Emulzija SE sastoji se od anjonskog surfaktanta (natrijum laurilglukozkarboksilat) sa izraženim afinitetom ka vodenoj fazi, pa je i električna provodljivost emulzije SE veoma visoka. Dodatak rastvora sličnog znoju blago povećava električnu provodljivost, verovatno jer je blizina optimalne formulacije (razlika u aktivnosti surfaktanta = 0) postignuta i dalje dodavanje rastvora sličnog znoju bi dovelo do brzog pada električne provodljivosti što bi ukazalo da je emulzija sada suprotnog tipa tj. v/u tipa (Nielloud i Marti-Mestres, 2000).

Nasuprot *SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa u/v, RVUE emulzija ne pokazuje značajne promene u električnoj provodljivosti nakon dodavanja rastvora sličnog znoju (električna provodljivost je bila manja od 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Reološko ponašanje kozmetičkih proizvoda je jedna od najbitnijih osobina ne samo sa tehničke, već i sa estetske tačke gledanja (Karsheva i sar., 2012; Moravkova i Filip, 2013). Reološke osobine su često direktno povezane sa senzornim atributima proizvoda i sa njihovim performansama (Moravkova i Filip, 2013).

Sve emulzije (SE, RUVE i RVUE) pokazuju nenjutnovski tip tečenja sa umerenom tiksotropijom (slika 31), kao što je to već navedeno u odeljku 4.1.1.3.

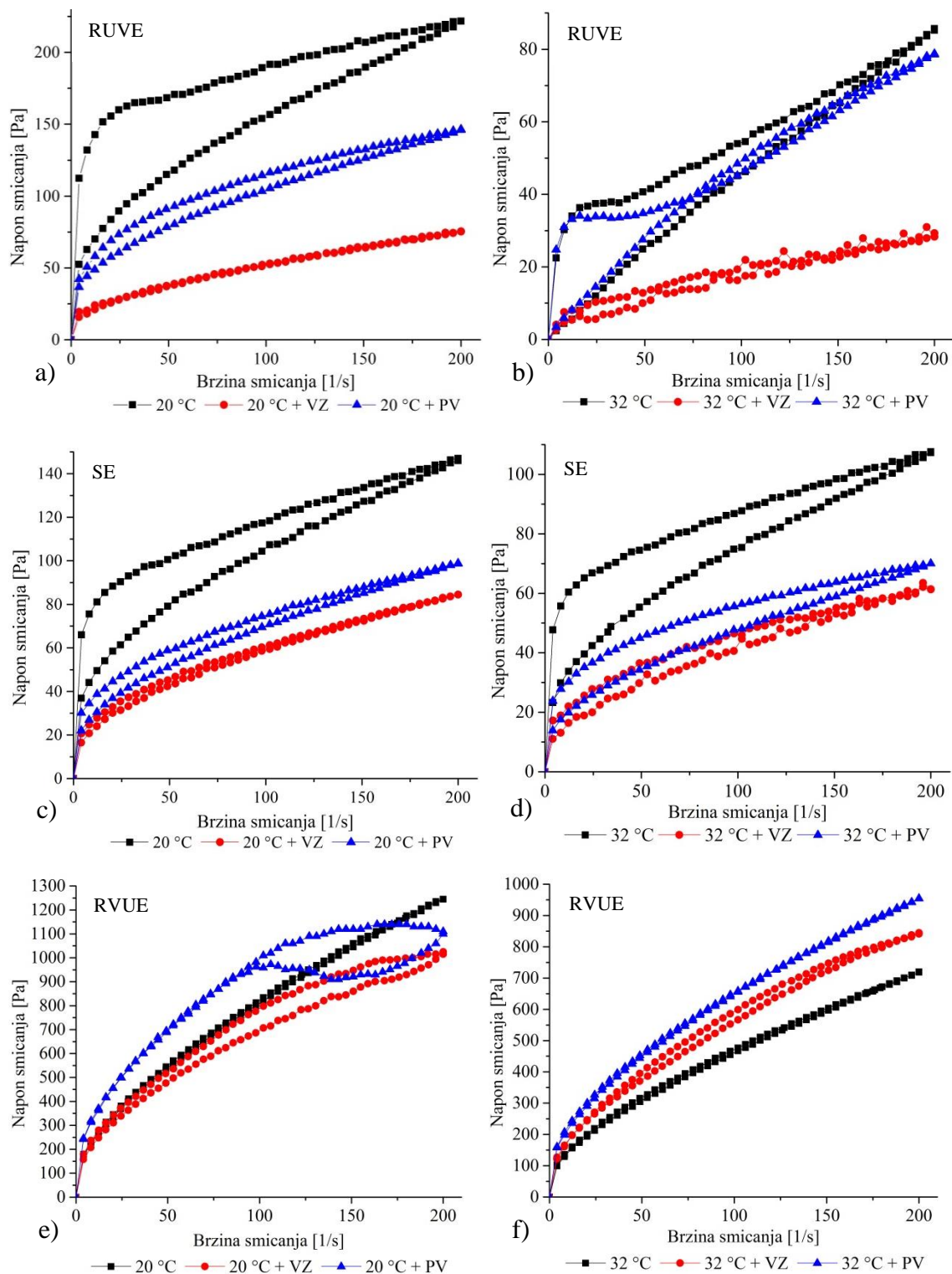
Herschel-Bulkley-ev model (Tadros, 2004) je korišćen za određivanje prinosnog napona (Gilbert i sar., 2013).

Više vrednosti prinosnog napona dobijene su za poredbenu emulziju tipa v/u (100 Pa) i za poredbenu emulziju tipa u/v (94 Pa) na 20 °C.

Dodatak prečišćene vode (na 20 °C) ima veliki uticaj na RUVE emulziju u odnosu na SE emulziju. Zapravo, zbog efekta razblaženja, dodatak prečišćene vode rezultirao je u smanjenju vrednosti prividnog viskoziteta (η_{max} , η_{min}) za obe emulzije SE i RUVE (u opsegu od 28% do 54% odnosno od 36% do 63%), kao i vrednosti histerezne površine (HP) i prinosnog napona (σ_0) (u opsegu od 67% do 70%, odnosno 74% do 89%) (tabela 20, slika 31).

Dodatak rastvora sličnog znoju (na 20 °C) zbog prisustva jona, menja strukturu emulzija dovodeći do *Bingam*-ovog plastičnog tečenja pri većim brzinama smicanja (iznad 50 s⁻¹) (slika 31a i 31c), pri čemu je smanjenje prividnog viskoziteta (η_{max} , η_{min}), histerezne površine (HP) i prinosnog napona (σ_0) bilo izraženije za RUVE emulziju (tabela 20). Pri povišenoj temperaturi (32 °C), promene istih parametara (tabela 20) su manje izražene za SE (u opsegu od 27% do 64% za η_{max} i η_{min} , odnosno od 12% do 88% za HP i σ_0) u poređenju sa RUVE (u opsegu od 63% do 82% za η_{max} i η_{min} , odnosno od 67% do 97% za HP i σ_0) pod svim uslovima testiranja.

Ispitivani parametri za RVUE menjali su se na potpuno drugačiji način u poređenju sa SE i RUVE (tabela 20, slika 31e i 31f). Tokom reološkog ispitivanja RVUE na 20 °C, pri većim brzinama smicanja (slika 31e) primećen je *Weissenberg*-ov efekat (Lukic i sar., 2013). Zbog toga je *Herschel–Bulkley*-ev model za ovu emulziju primenjen samo pri manjim brzinama smicanja (Kindernay i sar., 2001) (ispod 163 s⁻¹ u prisustvu rastvora sličnog znoju, odnosno ispod 114 s⁻¹ u prisustvu prečišćene vode).



Slika 31. Uporedni reogrami za emulzije RUVE, SE i RVUE u različitim uslovima testiranja.

Sve emulzije su pokazale dominantno elastično ponašanje karakteristično za čvrsta tela (elastični (G') modul je dominirao nad viskoznom (G'') modulom) u oblasti primenjenih frekvencija za sve uslove testiranja (slika 32). Pri frekvenciji od 1 Hz (tabela 21), vrednosti G' i G'' opadaju kod obe emulzije SE i RUVE sa dodatkom rastvora sličnog znoju odnosno prečišćene vode, dok kod RVUE opada samo vrednost G'' .

Tabela 20. Prividni viskoziteti η_{max} i η_{min} (pri $4,1 \text{ s}^{-1}$ i pri 200 s^{-1}), histerezna površina (HP) i prinosni napon (σ_0) za emulzije SE, RUVE i RVUE (rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti tri ponovljena merenja \pm standardna devijacija. Srednja vrednost označena sa slovom u koloni je značajno različita pri nivou značajnosti od od $p < 0,05$).

Emulzija SE				
Parametri	η_{max} (Pa s)	η_{min} (Pa s)	HA (Pa/s)	σ_0 (Pa)
Uslovi				
20 °C	16±2 ^a	0,7±3,0·10 ⁻² b	2882±600	61±8
20 °C + VZ	5,0±0,2	0,4±4,0·10 ⁻³	380±70	14±2
20 °C + PV	7,4±0,2 ^a	0,5±3,0·10 ⁻³ b	940±40	19±2 ^d
32 °C	11,6±0,3 ^a	0,5±1,0·10 ⁻² b	2530±60	43±3 ^d
32 °C + VZ	6,7±0,5	0,3±3,0·10 ⁻² b	794,5±36,5	7,8±0,9
32 °C + PV	5,8±3,0·10 ⁻³	0,4±3,5·10 ⁻⁴	1430±40	10,8±0,5
Emulzija RUVE				
Uslovi				
20 °C	27±2 ^a	1,1±4,0·10 ⁻² b	7010±600 ^c	94±30
20 °C + VZ	5±2	0,4±3,0·10 ⁻²	69,2±13,7	14±8
20 °C + PV	10,3±5,0·10 ⁻² a	0,7±5,0·10 ⁻³ b	1754±20	10,4±0,5 ^d
32 °C	5,5±0,6 ^a	0,4±1,0·10 ⁻² b	2110±300	29,7±0,8 ^d
32 °C + VZ	9±4	0,2±2,0·10 ⁻² b	436,7±10,5	3±1
32 °C + PV	6,1±0,3	0,4±1,0·10 ⁻²	623±70	30±2
Emulzija RVUE				
Uslovi				
20 °C	43,2±4,0·10 ⁻² a	6,2±3,0·10 ⁻² b	2097±600	100±20
20 °C + VZ	43,8±0,4 ^a	5,1±5,0·10 ⁻² b	12600±400 ^c	60±8 ^d
20 °C + PV	59,6±0,7 ^a	5,5±3,0·10 ⁻³ b	13620±500 ^c	108±6 ^d
32 °C	25,1±0,1 ^a	3,6±2,0·10 ⁻² b	1520±200 ^c	58,3±0,4 ^d
32 °C + VZ	31,0±0,4 ^a	4,2±7,1·10 ⁻⁴ b	-3900±50 ^c	78,9±0,8 ^d
32 °C + PV	39,4±0,4 ^a	4,8±4,0·10 ⁻² b	1160±600	90±20 ^d

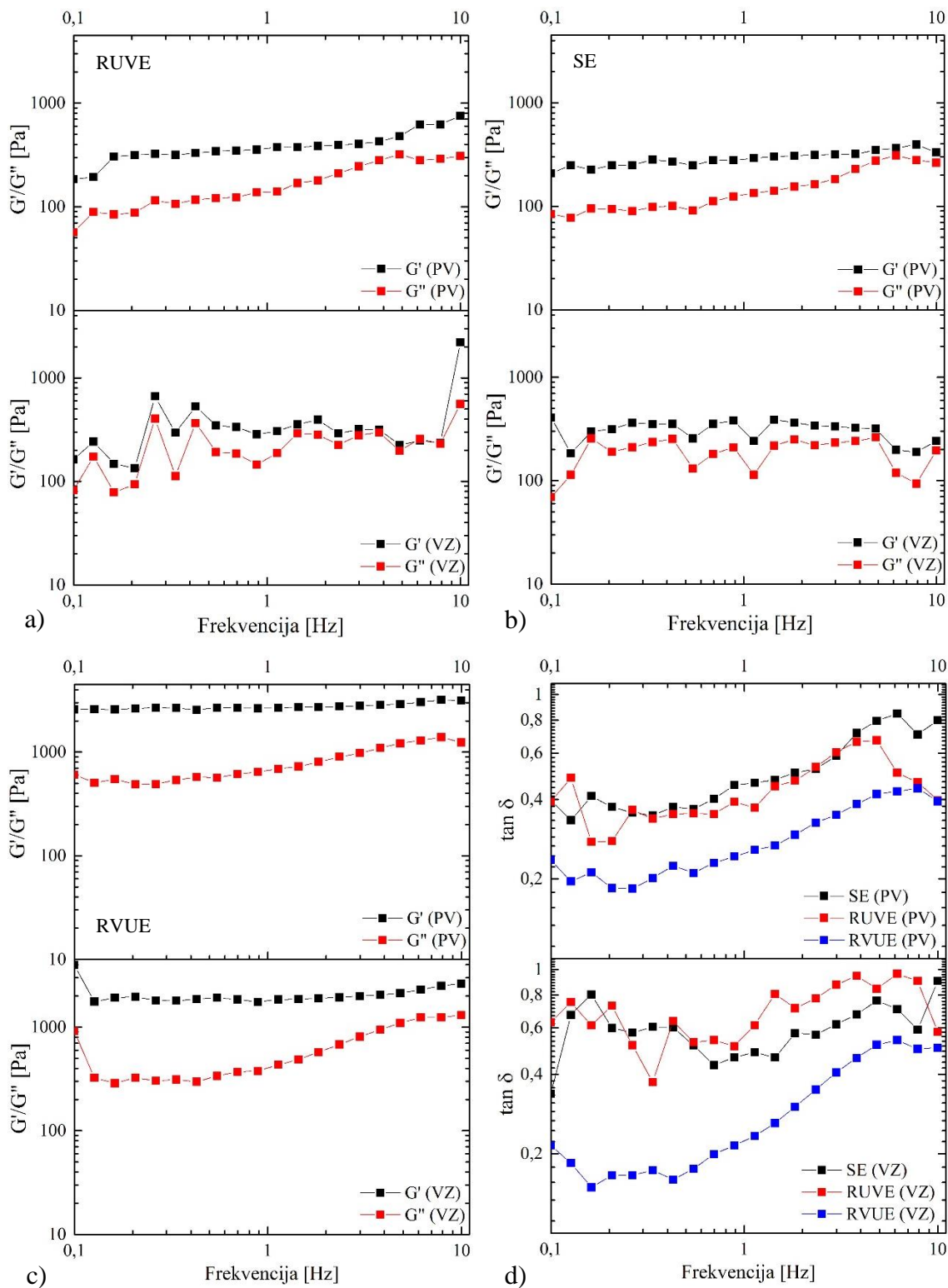
U prisustvu prečišćene vode promene G' i G'' za SE su više izražene nego u prisustvu rastvora sličnog znoju. Prisustvo rastvora sličnog znoju, odnosno prečišćene vode, pokazalo je veliki uticaj na vrednosti G' i G'' kod RUVE (52% i 41% odnosno 41% i 51%).

Tabela 21. Elastični modul (G'), viskozni modul (G'') i $\tan \delta$ ispitivanih uzoraka dobijeni oscilatornim merenjima pri 1 Hz i različitim uslovima (rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti tri ponovljena merenja \pm standardna devijacija. Srednja vrednost označena sa slovom u koloni je značajno različita pri nivou značajnosti od $p < 0,05$).

Emulzija		SE		
	G' (Pa)	G'' (Pa)	$\tan \delta$	
Uslovi				
20 °C	520±20	200±20	0,38±0,02	
20 °C + VZ	320±20	162±35	0,47±0,02	
20 °C + PV	290±50	129±6	0,46±0,05	
Emulzija		RUVE		
Uslovi				
20 °C	615±40	281±8	0,46±0,04	
20 °C + VZ	295±20	167±8	0,563±0,005	
20 °C + PV	366±40	139±1	0,38±0,05	
Emulzija		RVUE		
Uslovi				
20 °C	1590±20 ^a	1100±60 ^b	0,69±0,04 ^c	
20 °C + VZ	1800±100 ^a	405±39	0,22±0,05	
20 °C + PV	2670±30 ^a	670±70 ^b	0,25±0,03 ^c	

Vrednosti za $\tan \delta$ rasle su slično za obe emulzije SE i RVUE u prisustvu rastvora sličnog znoju (25% i 23%) dok je $\tan \delta$ opadao u prisustvu prečišćene vode kod RUVE. Prisustvo rastvora sličnog znoju odnosno prečišćene vode uticalo je na vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ kod RVUE potpuno drugačije u odnosu na SE i RUVE.

U prisustvu prečišćene vode, vrednosti G' i G'' su bile uglavnom konstantne na nižim frekvencijama (slika 32a, 32b i 32c) i $\tan \delta$ je iznosio oko 0,38, 0,36 i 0,2 redom za SE, RUVE i RVUE. Vrednost G'' rasla je brže od G' sa porastom primenjenih frekvencija, a kao posledica toga porastao je i $\tan \delta$ (0,79, 0,5, i 0,42 redom za SE, RUVE i RVUE).



Slika 32. Zavisnost elastičnog (G'), viskoznog (G'') modula i $\tan \delta$ od frekvencije za emulzije RUVE, SE i RVUE.

Prisustvo rastvora sličnog znoju imalo je sličan uticaj na vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ kod RVUE kao kod prečišćene vode.

Vrednost $\tan \delta$ kod RVUE je najmanja, ukazujući da je RVUE bila najstabilnija emulzija, sa izraženim elastičnim osobinama, najverovatnije kao posledica njene kompaktne strukture koju su činile mnoštvo malih kapi unutrašnje (vodene) faze i kontinuirani sloj emulgatora koji je dodatno stabilizovan sa elektrolitima (magnezijum sulfat, pa čak i natrijum hlorid iz rastvora sličnog znoju).

U prisustvu rastvora sličnog znoju, na nižim frekvencijama promena G' je bila praćena promenom G'' , što je rezultiralo da vrednost $\tan \delta$ varira između 0,3 i 0,8 kod obe emulzije SE i RUVE. Primećeno je i da se vrednost $\tan \delta$ kod SE naglo povećava pri frekvenciji od oko 0,16 Hz, što ukazuje na smanjenje elastičnosti i destabilizaciju sistema (Masmoudi i sar., 2006; Diftis i sar., 2005). To se može povezati sa mogućom inverzijom faza *SWOP* (SE) emulzije. Vrednost $\tan \delta$ je nastavila da se povećava sa porastom primenjene frekvencije dostižući najvišu vrednost od 0,96 kod RUVE brže od SE ($\tan \delta$ dostiže vrednost 0,9 tek na 10 Hz) (slika 32d), što navodi na zaključak da je SE stabilnija u odnosu na RUVE.

Jednofaktorska ANOVA korišćena je za testiranje ispitivanih parametara odnosno prividnog viskoziteta (η_{max} , η_{min}), histerezne površine (*HP*), prinosnog napona (σ_0), elastičnog modula (G'), viskoznog modula (G'') i $\tan \delta$. Statistička analiza je dala potvrdu da je RVUE (η_{max} , η_{min}) značajno različita u odnosu na RUVE i SE ako se u obzir uzmu pomenuti reološki parametru pri ispitivanim uslovima. Značajna razlika između RUVE i SE je uočena kod obe vrednosti prividnog viskoziteta η_{max} i η_{min} pri 20 °C, 20 °C u prisustvu prečišćene vode i 32 °C. Slično, značajna razlika je uočena za prividni viskozitet η_{min} kod RUVE i SE u prisustvu rastvora sličnog znoju na 32 °C, dok nije bilo značajne razlike između vrednosti prividnih viskoziteta η_{max} i η_{min} na 32°C u prisustvu prečišćene vode i na 20 °C u prisustvu rastvora sličnog znoju. Statistička analiza srednjih vrednosti prinosnog napona ukazuje da postoji značajna razlika između ispitivanih emulzija na 32 °C, dok nije bilo uočene značajne razlike između SE i RUVE u odnosu na prinosni napon pod svim drugim uslovima ispitivanja. Razmatrajući srednje vrednosti histerezne površine, može se zaključiti da nema značajnih razlika između ispitivanih emulzija na 32 °C u prisustvu prečišćene vode, dok je na 20 °C, histerezna površina za

RUVE značajno različita. Na kraju, statistička analiza oscilatornih reoloških parametara potvrdila je da je elastični modul G' za RVUE značajno drugačiji u poređenju sa onim za SE i RUVE u slučaju svih uslova ispitivanja.

4.2.4. Senzorna analiza izabrane SWOP emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u

Dvadeset senzornih atributa je procenjivano od strane panela, ali je deset atributa odabrano (*konzistencija, adhezija, klizanje, tekstura, razmazivost, rastečnjavanje, gustina, lepljivost, apsorpcija i zaostali film*) za analizu pomoću ANOVA.

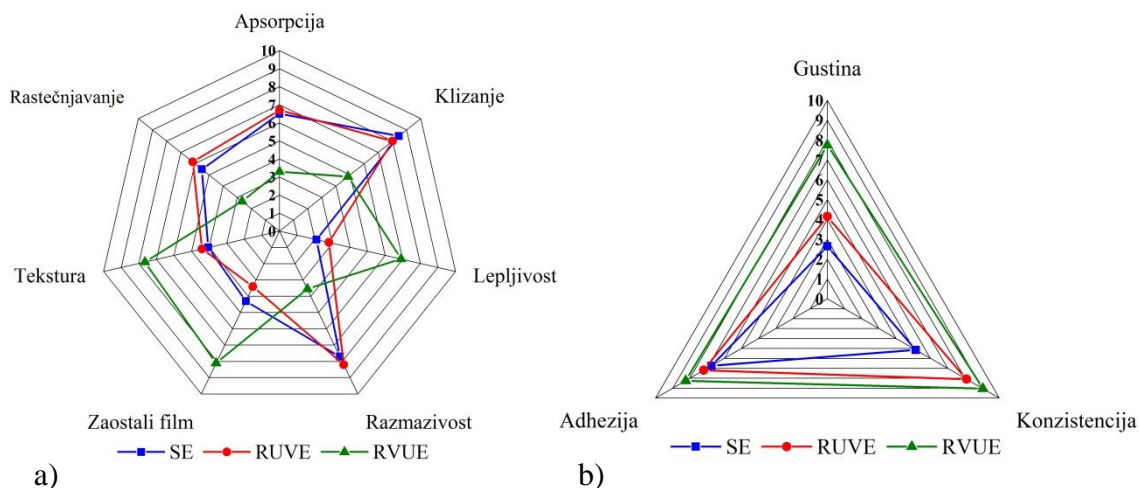
Tabela 22. Srednja vrednost rezultata senzorne procene atributa za emulzije SE, RUVE i RVUE (rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti dvadeset rezultata dodeljenih od strane panelista \pm standardna devijacija. Srednja vrednost označena sa slovom u redu je značajno različita pri nivou značajnosti od $p < 0,05$).

<i>Senzorni atributi</i>	<i>Emulzije</i>		
	<i>SE</i>	<i>RUVE</i>	<i>RVUE</i>
<i>Apsorpcija</i>	6,5 \pm 1,7	6,7 \pm 2,4	3,3 \pm 2,5 ^a
<i>Klizanje</i>	8,4 \pm 1,7	8 \pm 2	4,8 \pm 2,0 ^a
<i>Lepljivost</i>	2,1 \pm 1,4	2,8 \pm 1,6	6,9 \pm 2,2 ^a
<i>Razmazivost</i>	7,7 \pm 2,4	8,2 \pm 1,8	3,6 \pm 2,3 ^a
<i>Zaostali film</i>	4,3 \pm 2,6	3,4 \pm 1,9	8,1 \pm 2,0
<i>Tekstura</i>	4 \pm 2	4,4 \pm 1,7	7,6 \pm 2,3 ^a
<i>Rastečnjavanje</i>	5,5 \pm 2,8	6,2 \pm 2,7	2,6 \pm 2,1 ^a
<i>Gustina</i>	2,6 \pm 1,4	4,2 \pm 1,6	7,8 \pm 1,5 ^a
<i>Konzistencija</i>	5,2 \pm 2,4 ^a	8,1 \pm 1,4	9 \pm 1
<i>Adhezija</i>	6,8 \pm 2,2	7,2 \pm 2,2	8,2 \pm 2,1

Jednofaktorskom ANOVA utvrđen je značajan efekat/uticaj tipa emulzije na sve odabrane attribute osim atributa *adhezija* (redom 6,75, 7,2 i 8,25) (nivo značajnosti $p < 0,05$; tabela 22, slika 33b).

Na osnovu rezultata Tukey-evog testa, može se zaključiti da je RVUE uglavnom značajno drugačija po procenjenim atributima u poređenju sa RUVE i SE (slika 33), što

se može pripisati jednom od sledeća dva razloga: 1) strukturi emulzije tipa v/u gde su molekuli vode potpuno zatvoreni unutar kapi disperzne faze; 2) razlici u sastavu emulzija. Naime, za pripremu ovog tipa (v/u) emulzije bilo je neophodno kombinovati emulgator (poligliceril-2 dipolihidroksi stearat) sa koemulgatorom (poligliceril-3 diizostearat) i stabilizatorima (magneziju sulfat i cink stearat). Dodatno, kako bi se emulzija tipa v/u održala stabilnom, masna faza se sastojala samo od jedne komponente (tečni parafin).



Slika 33. Senzorne mape emulzija SE, RUVE i RVUE sa atributima: a) koji su u finoj korelaciji sa reološkim parametrima; b) koji nisu u finoj korelaciji sa reološkim parametrima.

Emulzije SE i RUVE su emulzije tipa u/v sličnog sastava, ali uprkos tome, dva atributa (*gustina* sa srednjom vrednosti za SE i RUVE 2,65 i 4,15 i *konzistencija* sa srednjom vrednosti za SE i RUVE 5,15 i 8,1) (tabela 22, slika 33b) ukazuju da se ove emulzije tipa u/v značajno razlikuju, što se može objasniti prethodno navedenim razlikama u njihovoj koloidnoj strukturi (odeljak 4.2.2.)

Uzimajući u obzir sve rezultate koji su dobijeni statističkom analizom, primećeno je da i senzorna i reološka karakterizacija ukazuju na isti zaključak, odnosno da se RVUE značajno razlikuje od SE i RUVE, što ukazuje da se između ova dva pristupa mogu uspostaviti određene korelacije. Dodatno, reološka karakterizacija je dala potvrdu da se SE i RUVE značajno razlikuju ukazujući preciznije na razliku u prividnom viskozitetu η_{min} na 32°C u prisustvu rastvora sličnog znoju (slika 33b). Slično, iako

senzorni atribut *adhezija* nije ukazao na postojanje značajne razlike među ispitivanim emulzijama (slika 33b), reološki parametar prinosni napon ukazao je da se RVUE statistički značajno razlikuje.

Spearman-ov koeficijent korelacije je određen za sva poređenja. Atributi *tekstura*, *lepljivost*, *konzistencija*, *gustina* i *adhezija*, jedan u odnosu na drugi, stajali su u potpuno pozitivnom odnosu ($\rho = 1$). Atribut *klizanje* bio je u inverznom odnosu sa prethodno pomenutim atributima, pokazujući potpuno negativan koeficijent korelacije ($\rho = -1$). Slično, pronađen je potpuno pozitivan odnos i između reoloških parametara: η_{max} na 32 °C i G' , G'' na 20 °C u prisustvu rastvora sličnog znoju i η_{min} i η_{max} na 20 °C bez prisustva rastvora sličnog znoju. Pored toga, svi ovi reološki parametri pokazali su pozitivnu korelaciju sa atributima *tekstura*, *lepljivost*, *konzistencija*, *gustina* i *adhezija* dok je negativan koeficijent korelacije bio uspostavljen sa atributom *klizanje*. Dodatno, reološki parametar *HP* na 32 °C bez prisustva rastvora sličnog znoju bio je u inverznom odnosu sa prethodno navedenim reološkim parametrima i atributima.

Negativni koeficijent korelacije ($\rho = -1$) bio je uspostavljen između atributa *razmazivost*, *rastečnjavanje* i *apsorpcija*, dok je atribut *zaostali film* bio u inverznom odnosu pokazujući potpuno pozitivnu korelaciju ($\rho = 1$). Reološki parametri η_{min} , η_{max} , σ_0 , *HP* na 20 °C i η_{min} , σ_0 , *HP* na 32 °C u prisustvu jona i η_{min} , η_{max} , σ_0 na 32 °C bez prisustva rastvora sličnog znoju, jedan u odnosu na drugi, bili su u potpuno pozitivnom odnosu ($\rho = 1$). Uz to, navedeni parametri su pokazali negativnu korelaciju sa atributima *razmazivost*, *rastečnjavanje* i *apsorpcija*, i pozitivnu korelaciju sa atributom *zaostali film*. Dodatno, navedeni reološki parametri su bili u inverznom odnosu sa parametrima *HP* na 20 °C bez prisustva rastvora sličnog znoju i $\tan \delta$ na 20 °C u prisustvu rastvora sličnog znoju, koji je pokazao pozitivan koeficijent korelacije sa atributima *razmazivost*, *rastečnjavanje* i *apsorpcija*.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je atribut *konzistencija* koji se procenjuje na početku, u prvoj fazi senzorne analize i opisuje izgled ispitivanih emulzija, u pozitivnoj korelaciji sa reološkim parametrima η_{min} i η_{max} na 20 °C bez prisustva rastvora sličnog znoju (tabala 20). Merenja ovih parametara pod definisanim uslovima mogu se koristiti sa predviđanje konzistencije emulzija tako da što je veća izmerena vrednost, može se očekivati da atribut bude više rangiran.

Tabela 23. Odnosi između atributa i reoloških parametara bitnih za predviđanje senzornih karakteristika emulzija (reološki parametri označeni podebljanim slovom pokazuju negativnu korelaciju sa odgovarajućim atributima).

Atributi	Reološki parametri
<i>Konzistencija</i>	η_{min}, η_{max} (20 °C bez rastvora sličnog znoju)
<i>Adhezija</i>	η_{min}, η_{max} (20 °C bez rastvora sličnog znoju)
<i>Tekstura</i>	η_{max} (32 °C sa rastvorom sličnim znoju)
<i>Lepljivost</i>	G', G'' (20 °C sa rastvorom sličnim znoju)
<i>Gustina</i>	HP (32 °C sa rastvorom sličnim znoju)
<i>Klizanje</i>	η_{min}, η_{max} (20 °C bez rastvora sličnog znoju) η_{max} (32 °C sa rastvorom sličnim znoju) G', G'' (20 °C sa rastvorom sličnim znoju) HP (32 °C sa rastvorom sličnim znoju)
<i>Razmazivost</i>	η_{min} (32 °C sa rastvorom sličnim znoju)
<i>Rastečnjavanje</i>	η_{min}, η_{max} (32 °C bez rastvora sličnog znoju)
<i>Apsorpcija</i>	σ_0 (20 °C i 32 °C sa rastvorom sličnim znoju) HP (20 °C bez rastvora sličnog znoju) $\tan \delta$ (20 °C sa rastvorom sličnim znoju)
<i>Zaostali film</i>	η_{min} (32 °C sa rastvorom sličnim znoju) η_{min}, η_{max} (32 °C bez rastvora sličnog znoju) σ_0 (20 °C i 32 °C sa rastvorom sličnim znoju) HP (20 °C bez rastvora sličnog znoju) $\tan \delta$ (20 °C sa rastvorom sličnim znoju)

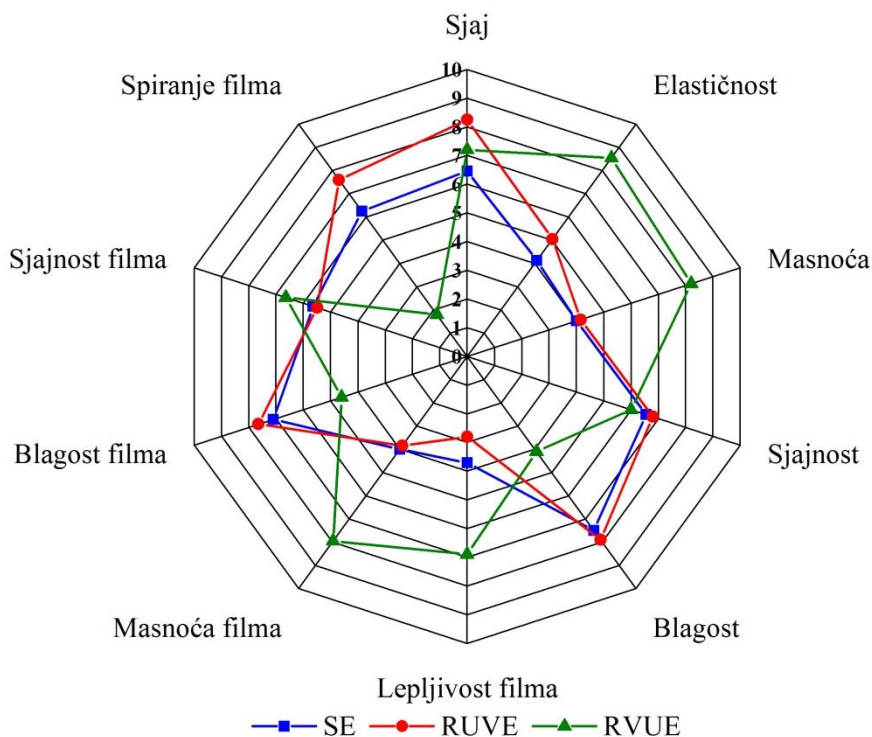
Slično, atributi *adhezija*, *tekstura*, *lepljivost* i *gustina* koji se procenjuju u drugoj fazi senzorne analize mogu se predvideti merenjem η_{min} i η_{max} na 20 °C bez prisustva rastvora sličnog znoju i η_{max} na 32 °C u prisustvu rastvora sličnog znoju (tabela 23). Suprotno, pravilo što je veća izmerena vrednost, biće i više rangiran atribut ne može se primeniti na atribut *klizanje*, koji stoji u obrnutom odnosu sa prethodno pomenutim atributima. Uopšteno, može se reći da je prvi osećaj na koži koji opisuje utisak prilikom primene emulzija, u korelaciji sa naponom smicanja na početku tečenja emulzija i sa dinamičkim viskozitetom (Moravkova i Filip, 2013).

Ostali atributi *razmazivost*, *rastečnjavanje* i *apsorpcija* mogu se predvideti merenjem η_{min} na 32 °C u prisustvu jona i η_{min}, η_{max} na 32 °C bez rastvora sličnog znoju,

u kombinaciji sa određenim parametrima σ_0 na 20 °C i 32 °C u prisustvu jona (tabela 23) i to tako da će atributi imati više rangiranje ako izmereni i određeni parametri imaju niže vrednosti.

Na kraju, osećaj nakon nanošenja emulzija koji opisuje atribut *zaostali film* pokazuje obrnut odnos sa atributima *razmazivost*, *rastečnjavanje* i *apsorpcija*, ali isti reološki parametri mogu da se iskoriste i za njegovo predviđanje.

Dobijeni rezultati pokazali su da su rezultati većine odabranih senzornih atributa (slika 33a) u saglasnosti sa rezultatima reoloških ispitivanja, pa se može zaključiti da je moguće koristiti reološka merenja pod definisanim uslovima za predviđanje određenih senzornih osobina kod *SWOP* emulzija.



Slika 34. Senzorna mapa emulzija SE, RUVE i RVUE sa atributima koji su pod jakim uticajem hedonizma.

Preostalih deset atributa (*sjaj uzorka*, *elastičnost*, *masnoća*, *blagost*, *lepljivost filma*, *masnoća filma*, *sjaj filma* i *spiranje filma*) dosta su pod uticajem sastava masne faze i upotrebljenih emolijenasa, pa je i bilo očekivano da pokažu da se emulzija RVUE

ponaša drugačije (tabela 22, slika 34). Dodatno, dobijeni rezultati potvrdili su poželjne osobine *SWOP* emulzije SE. Atribut *spiranje filma* bio je od velike važnosti i potvrdio je bolju vodootpornost SE u odnosu na RUVE. Ipak treba uzeti u obzir da su ovi atributi pod snažnim subjektivnim hedonističkim uticajem (Gilbert i sar., 2013; Kilcast i Clegg, 2002), ali se uspešno mogu koristiti za poređenje testiranih emulzija i predviđanje očekivanja/percepcije i potražnje kupaca/korisnika.

4.3. Rezultati i diskusija III faze eksperimentalnog rada

4.3.1. Inkorporiranje kozmetički aktivne supstance dihidrokvercetina u SWOP emulziju

U ovoj fazi eksperimentalnog rada cilj je bio da se ispita mogućnost inkorporiranja aktivne supstance dihidrokvercetina u odabranu model formulaciju *SWOP* emulzije i pogodnosti ovog nosača s aspekta stabilnosti i ostvarivanja planiranog efekta na koži. Na pripremljenim uzorcima izvršena je fizičko-hemijska karakterizacija u toku prirodnog starenja u trajanju od 30 dana radi procene uticaja DHK na stabilnost *SWOP* emulzionog sistema. Dodatno, za tri odabrana uzorka od posebnog interesa izvršena je fizičko-hemijska karakterizacija u toku prirodnog starenja u trajanju od godinu dana. Istovremeno su pripremljeni uzorci *SWOP* i poredbenih emulzija tipa u/v sa različitim koncentracijama aktivne supstance DHK za ispitivanje fotoprotektivne aktivnosti dihidrokvercetina, kao i njegovog uticaja na aktivnost odabranog UV filtera homosalata primenom *in vitro* spektrofotometrijske metode. Primenom metoda bioinženjeringa kože u dve kratkotrajne studije ispitani su efekti uzoraka sa 5% m/m aktivne supstance DHK na koži.

Test centrifugiranja i određivanje pH vrednosti i električne provodljivosti

Vrednosti pH i električne provodljivosti izmerene su 24 h i 30 dana nakon izrade praznih i aktivnih uzoraka (uzorci sa DHK) u cilju provere stabilnosti emulzija. Svi rezultati su navedeni u tabeli 24.

Vrednosti pH i električne provodljivosti nisu se značajno razlikovale kod uzoraka sa dihidrokvercetinom u odnosu na prazne uzorke, bez aktivne supstance. Takođe, različite koncentracije dihidrokvercetina u emulziji nisu uopšte uticale na vrednosti pH i električne provodljivosti. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da kozmetički aktivna supstanca (DHK) nema značajnijeg uticaja na stabilnost *SWOP* emulzije.

Tabela 24. Vrednosti pH i električne provodljivosti *SWOP* emulzije sa kozmetički aktivnom supstancom, 24 h i 30 dana nakon izrade

Uzorak	Centrifugiranje ^a		Centrifugiranje		pH		El. provodljivost	
	I (15 minuta)		II (15 minuta)		24 h	30 dana	(μS/cm)	
	24 h	30 dana	24 h	30 dana	24 h	30 dana	24 h	30 dana
<i>SDHKx</i>	N ^b	N	N	N	5,82	5,80	1682-1698	1598-1686
<i>SDHK10,0</i>	N	O ^c	N	O	5,82	5,80	1720	1685
<i>SHD</i>	N	O	N	O	5,76	5,75	1702	1716
<i>STPGx</i>	N	N	N	N	5,82	5,80	1641-1708	1623-1715
<i>RDHKx</i>	N	N	N	N	6,01	5,99	287-305	283-297
<i>RDHK10,0</i>	N	O	N	O	6,01	5,86	296	271
<i>RTPGx</i>	N	N	N	N	6,01	6,00	274-336	271-298

^atest centrifugiranja detaljno je opisan u odeljku 3.1.2.1.2.

^bN – nema odvajanja faza; ^cO – odvajanje faza

Međutim, u testu centrifugiranja kod emulzija sa 10% m/m DHK kao i *SWOP* emulzija u kojoj se nalazi homosalat (8% m/m) i dihidrokvercetin (5% m/m) došlo je do odvajanja faza nakon 30 dana. Očigledno, veće količine aktivnih supstanci ($\geq 10\%$) dovode do destabilizacije emulzija (*SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa u/v), verovatno jer je odnos masne i vodene faze, neophodan za emulgovanje, narušen zbog prisustva novih sastojaka.

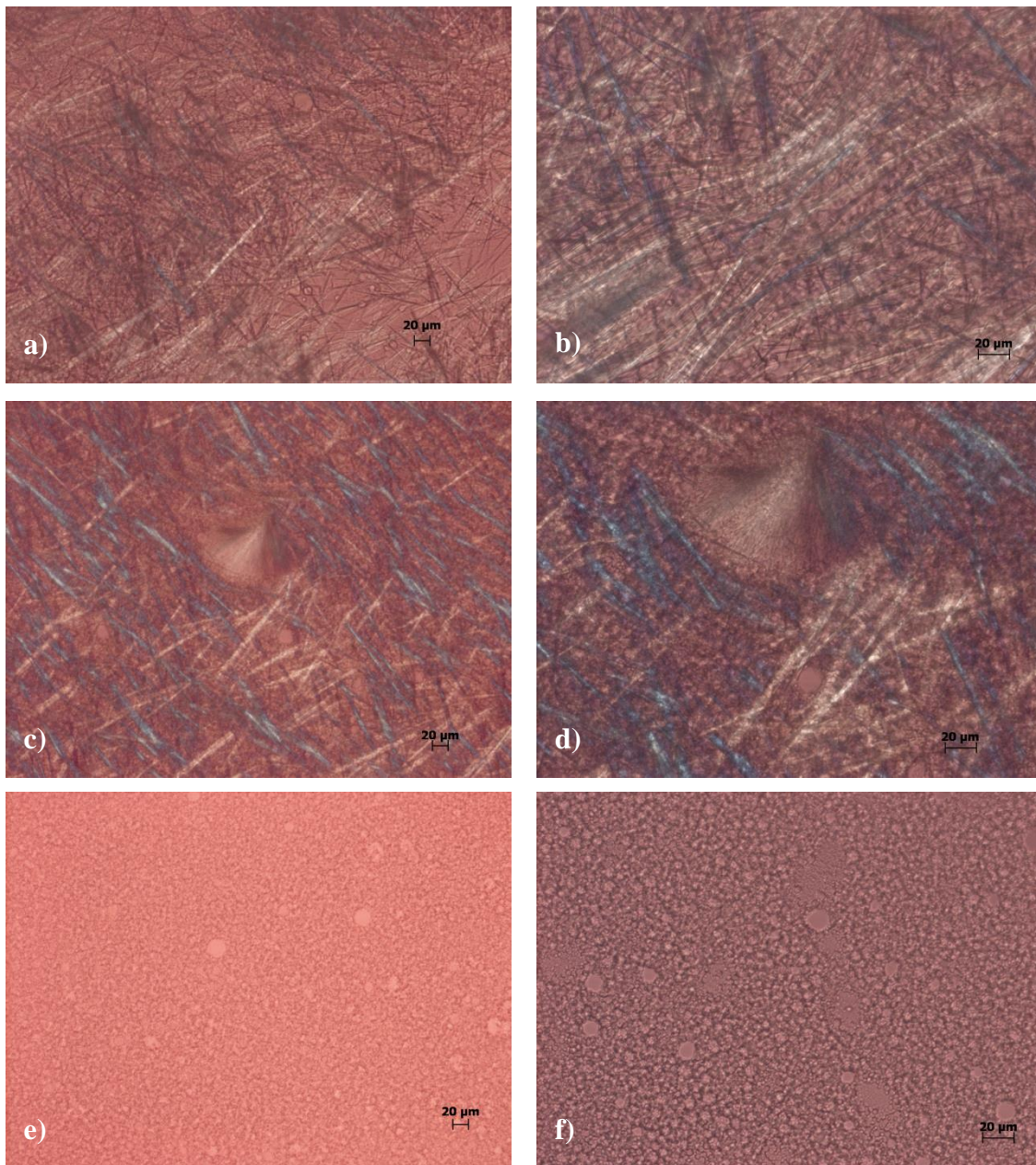
Na osnovu rezultata mikroskopske analize, za testiranje stabilnosti u toku prirodnog starenja u trajanju od godinu dana, posebno su izdvojene tri emulzije od interesa: prazna *SWOP* emulzija bez kozmetički aktivne supstance sa propilenglikolom (S), aktivne *SWOP* emulzije sa 0,5% m/m DHK ($S_{TPG0,5}$) i sa 1% m/m DHK (S_{TPG1}). Nakon godinu dana pH vrednosti za emulzije S, $S_{TPG0,5}$ i S_{TPG1} su iznosile redom: 5,89, 5,87 i 5,84. Za razliku od pH vrednosti, koje su se samo neznatno izmenile, vrednosti električne provodljivosti su značajno odstupale od početnih za obe aktivne emulzije $S_{TPG0,5}$ i S_{TPG1} i iznosile su redom: 1060 $\mu\text{S}/\text{cm}$ i 832 $\mu\text{S}/\text{cm}$, dok za praznu emulziju S nije zabeležena značajna promena vrednosti električne provodljivosti koja je nakon godinu dana iznosila 1612 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Rezultati dobijeni za električnu provodljivost ispitivanih emulzija nakon godinu dana ukazuju da supstanca DHK ima značajan uticaj na dugoročnu stabilnost *SWOP* emulzije.

Mikroskopska analiza uzoraka

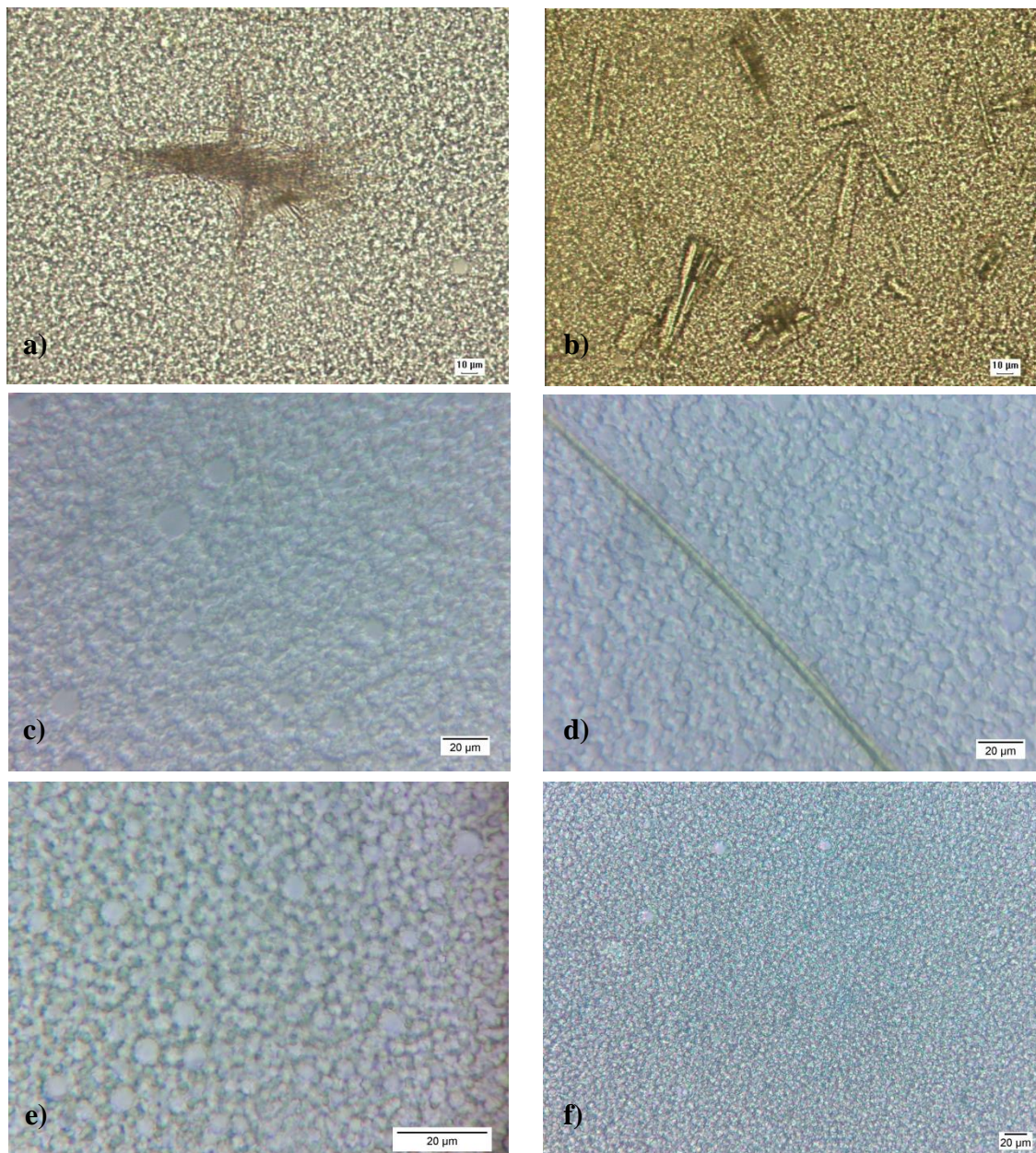
Na mikrografijama uzoraka *SWOP* emulzije sa 10% m/m DHK, 7 dana nakon izrade, uočava se velika količina kristala kozmetički aktivne supstance DHK (slika 35). Ispod kristala naziru se elementi *SWOP* emulzije čija struktura nije narušena.

Mikrografije uzorka *SWOP* emulzije sa 8% m/m HMS (S_{HMS}) su slične mikrografiji prazne *SWOP* emulzije (odjeljak 4.2.2.) što potvrđuje njenu stabilnost u prisustvu UVB filtera HMS.

Mikroskopskom analizom uzoraka *SWOP* emulzije sa 5% m/m DHK (S_{DHK5}), 24 h nakon izrade, uočavaju se isti kristali samo u nešto manjoj količini (mikrografije nisu prikazane). Kozmetički aktivna supstanca dihidrokvercetin dodata je u emulziju u obliku alkoholnog/etanalnog rastvora, ali je došlo do formiranja njenih kristala u emulzionom sistemu. Za rastvaranje DHK mogla se uvesti veće količine alkohola (etanola, 96% v/v) što bi sprečilo njenu kristalizaciju, ali je poznato da alkohol utiče na stabilnost emulzija.



Slika 35. Mikrografija *SWOP* emulzije sa 10% m/m *DHK* (S_{DHK10}) pri uvećanju: a) 100x, b) 400x; Mikrografija *SWOP* emulzije sa 5% m/m *DHK* i 8% m/m *HMS* (S_{HD}) pri uvećanju: c) 100x, d) 400x; Mikrografija *SWOP* emulzije sa 8% m/m *HMS* (S_{HMS}) pri uvećanju: e) 100x, f) 400x.



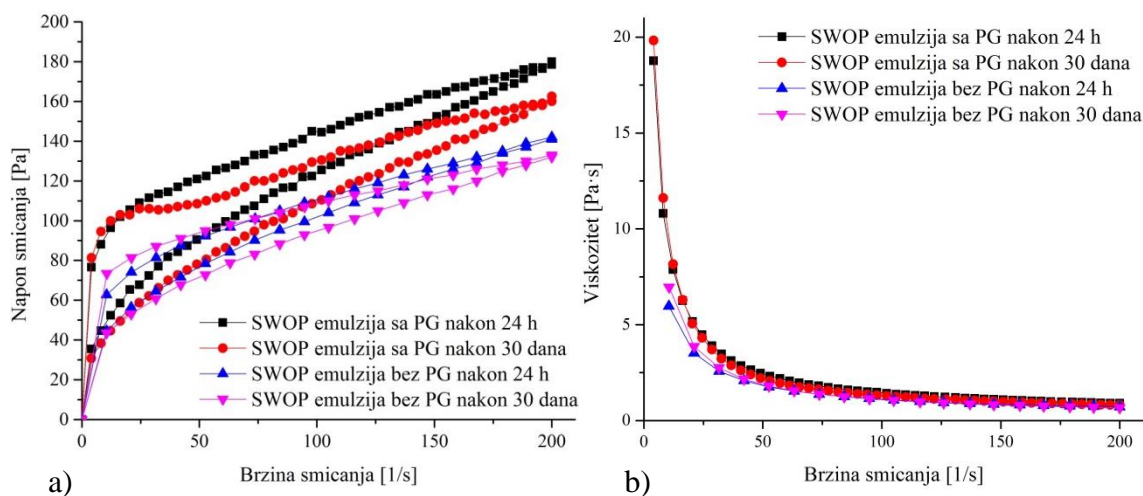
Slika 36. a) Mikrografija (400x) *SWOP* emulzije sa 3% m/m DHK (S_{DHK3}) 24 h nakon izrade; b) mikrografija (400x) *SWOP* emulzije sa 1% m/m DHK (S_{DHK1}) 30 dana nakon izrade. Mikrografija (400x) *SWOP* emulzije sa 0,5% m/m DHK i etanolom, 96% v/v ($S_{DHK0,5}$): c) 24 h i d) 30 dana nakon izrade; e) mikrografija (800x) *SWOP* emulzije sa 0,5% m/m DHK i propilenglikolom ($S_{TPG0,5}$) 24 h nakon izrade; f) mikrografija (400x) *SWOP* emulzije sa 0,5% m/m DHK i propilenglikolom ($S_{TPG0,5}$) 30 dana nakon izrade.

Uzorci *SWOP* emulzije sa 3% m/m, 1% m/m i 0,5% m/m DHK i alkoholom, kao i sa 0,5% m/m DHK i propilenglikolom praćeni/posmatrani su svetlosnim mikroskopom u periodu 24 h i 30 dana nakon izrade (slika 36). U uzorku *SWOP* emulzije sa dihidrokvercetinom (3% m/m) (S_{DHK3}) već nakon 24 h zapažena je pojava kristalizacije DHK (slika 36a). Kristalizacija je manje izražena u odnosu na uzorke sa 10% m/m DHK (slika 35a i 35b). Kod *SWOP* emulzija sa 1% m/m DHK (S_{DHK1} i S_{TPG1}) 24 h nakon izrade nije bilo uočljivih kristala aktivne supstance (mikrografija nije prikazana), ali 30 dana nakon izrade jasno su se mogli videti kristali aktivne supstance (slika 36b). Interesantni rezultati dobijeni su za *SWOP* emulziju sa 0,5% m/m DHK ($S_{DHK0,5}$ i $S_{TPG0,5}$). Naime, uočeno je da upotrebljeni rastvarač (etanol, 96% v/v ili propilenglikol) ima bitnu ulogu u kristalizaciji aktivne supstance. Tako, *SWOP* emulzija u kojoj je rastvarač etanol, 96% v/v nakon 30 dana (slika 36d) sadrži kristale kozmetički aktivne supstance, dok kod *SWOP* emulzije sa 0,5% m/m DHK i rastvaračem propilenglikolom ($S_{TPG0,5}$) 24 h odnosno 30 dana nakon izrade (slika 36e i 36f) nisu bili uočljivi kristali DHK, a struktura emulzije ostala je potpuno očuvana, ukazujući na njenu stabilnost.

Pojava kristalizacije DHK u emulziji u slučaju kada se koristi etanol, 96% v/v za njeno rastvaranje, mogla bi se objasniti delimičnim isparavanjem alkohola tokom izrade. Tako se njegova koncentracija u uzorku smanjuje, što direktno utiče na stvaranje kristala DHK, ali i šalje poruku formulatoru kozmetičke emulzije da nije izabrao odgovarajući rastvarač za kozmetički aktivnu supstancu.

Reološka karakterizacija

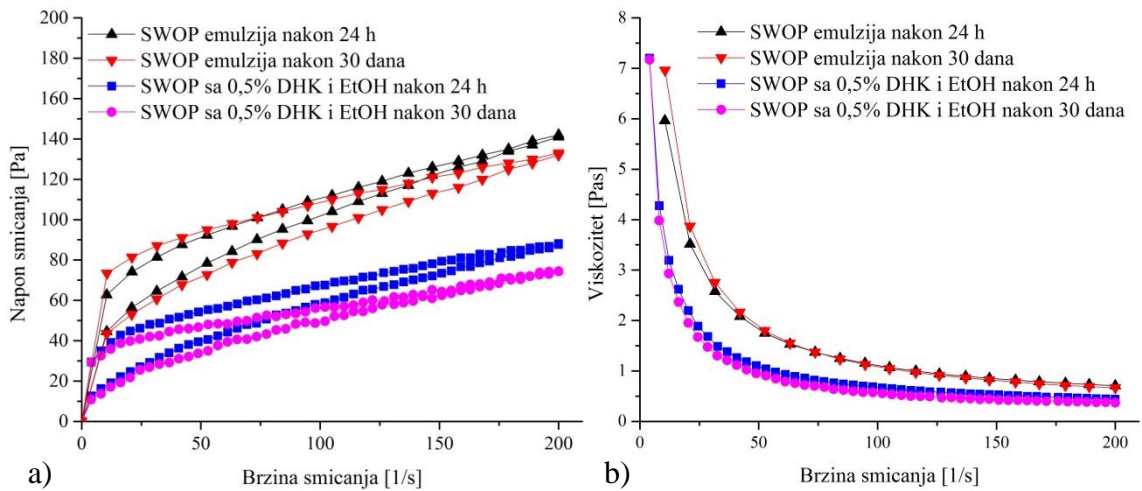
Kontinualna reološka karakterizacija je sprovedena u ovom delu studije kako bi se ispitalo da li inkorporirana supstanca DHK utiče na ponašanje *SWOP* emulzije tokom proticanja. Merenja su sprovedena 24 h i 30 dana nakon izrade emulzija. Dodatno, za tri odabrana uzorka od posebnog interesa (S , $S_{TPG0,5}$ i S_{TPG1}) izvršena su merenja nakon prirodnog starenja u trajanju od godinu dana.



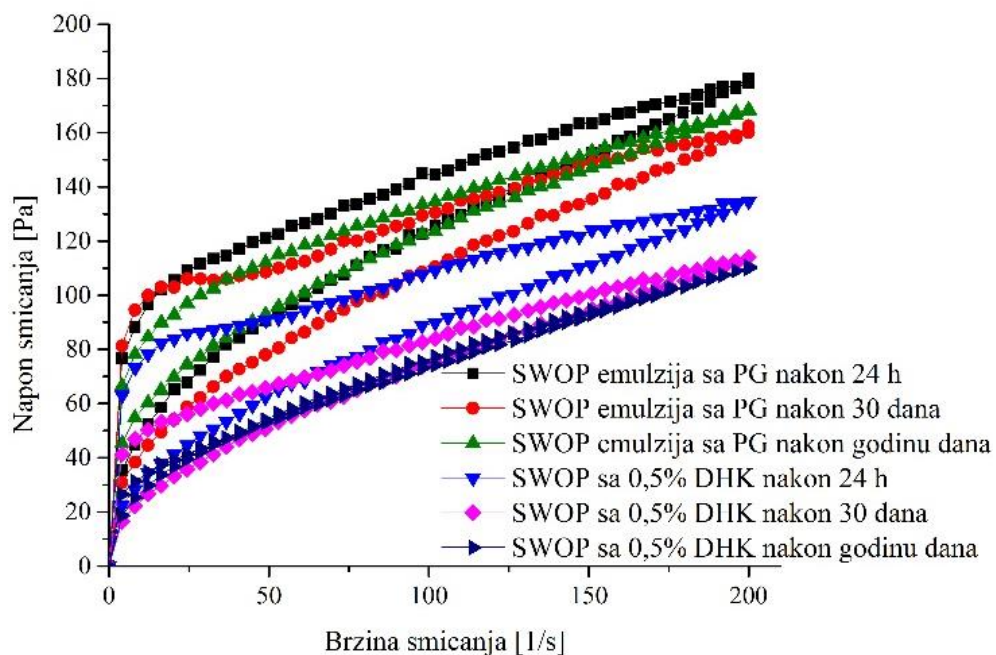
Slika 37. a) Uporedni reogrami sa prikazom zavisnosti napona smicanja od brzine smicanja i b) krive viskoziteta optimalne formulacije *SWOP* emulzije sa i bez propilenglikola, 24 h i 30 dana nakon izrade

Na svim reogramima može se videti da dolazi do neznatnog pada viskoziteta nakon 30 dana, ali su svi uzorci emulzija zadržali vremenski zavisno (engl. *shear thinning*) proticanje sa umerenom tiksotropijom. Uzorci optimalne formulacije *SWOP* emulzije sa inkorporiranih 10% m/m propilenglikola (slika 37a i 37b) pokazuju nešto viši viskozitet u odnosu na uzorke optimalne formulacije *SWOP* emulzije koja ne sadrži propilenglikol.

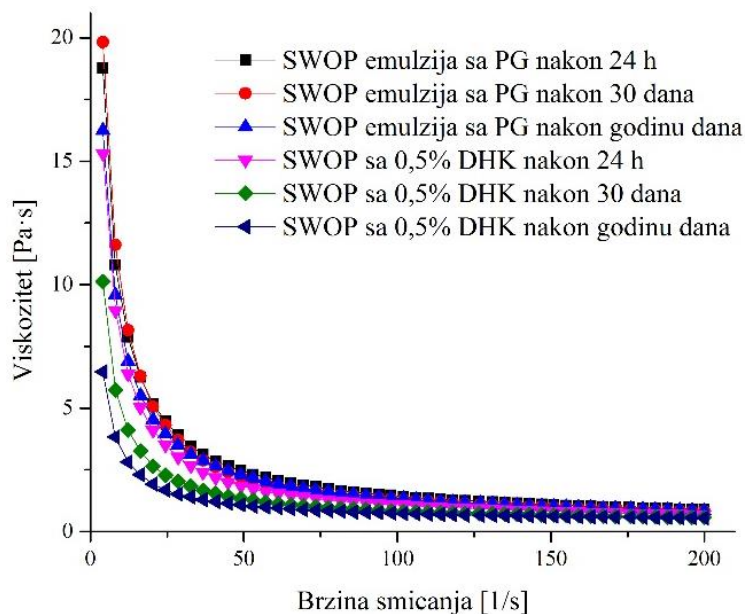
Suprotno tome, prisustvo etanola, 96% v/v i niže koncentracije (0,5% m/m) DHK (slika 38a i 38b) u optimalnoj formulaciji *SWOP* emulzije, manifestuje se nešto nižim viskozitetom.



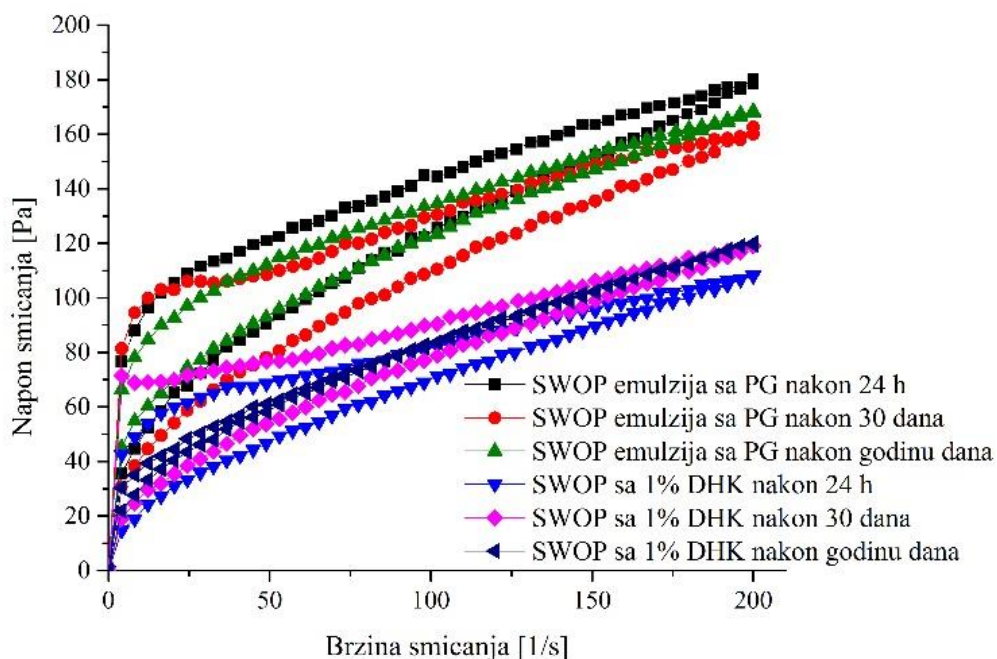
Slika 38. a) Uporedni reogrami sa prikazom zavisnosti napona smicanja od brzine smicanja i b) krive viskoziteta optimalne formulacije *SWOP* emulzije bez i sa 0,5% DHK (dodatkom kao rastvor u etanolu, 96% v/v), 24 h i 30 dana nakon izrade



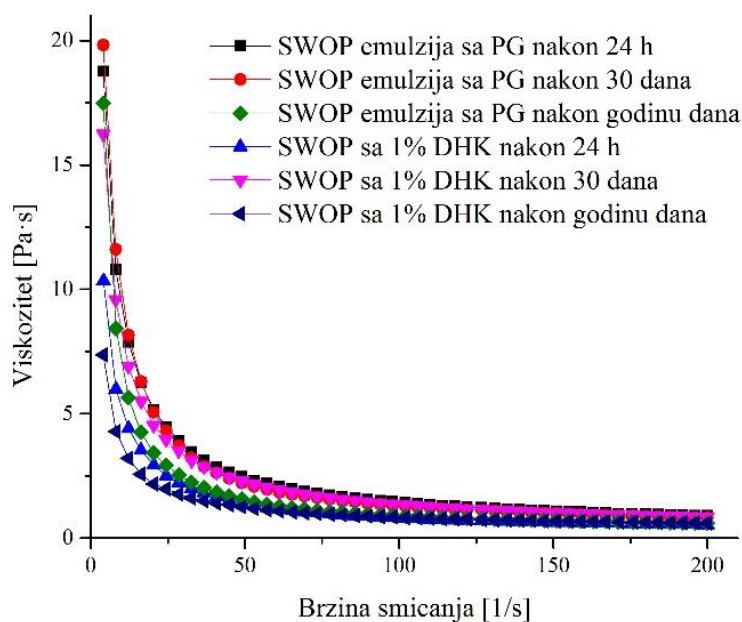
Slika 39. Uporedni reogrami sa prikazom zavisnosti napona smicanja od brzine smicanja optimalne formulacije *SWOP* emulzije sa propilenglikolom sa i bez 0,5% m/m DHK (*STPG_{0,5}* i *S*), 24 h, 30 dana i godinu dana nakon izrade



Slika 40. Krive viskoziteta optimalne formulacije *SWOP* emulzije sa propilenglikolom sa i bez 0,5% m/m DHK ($S_{TPG0,5}$ i S), 24 h, 30 dana i godinu dana nakon izrade



Slika 41. Uporedni reogrami sa prikazom zavisnosti napona smicanja od brzine smicanja optimalne formulacije *SWOP* emulzije sa propilenglikolom sa i bez 1% DHK (S_{TPG1} i S), 24 h, 30 dana i godinu dana nakon izrade



Slika 42. Krive viskoziteta optimalne formulacije *SWOP* emulzije sa propilenglikolom sa i bez 1% DHK (S_{TPGI} i S), 24 h, 30 dana i godinu dana nakon izrade

Kod uzoraka *SWOP* emulzija sa propilenglikolom i različitim koncentracijama DHK (0,5% m/m i 1% m/m) (slika 39, 40, 41 i 42), može se uočiti razlika između emulzija po vrednostima svih reoloških parametara (η_{max} , η_{min} , HA i σ_0) (tabela 25) izmerenim 24 h nakon izrade, međutim 30 dana i godinu dana nakon izrade, vrednosti parametara (η_{max} , η_{min} i σ_0) se samo neznatno razlikuju. Prisustvo supstance u različitim koncentracijama utiče na reološko ponašanje emulzije odmah nakon izrade (nakon 24 h), što bi moglo biti posledica razlika u vremenu potrebnom da emulzije postignu konačnu strukturu.

Iako prisustvo DHK i odgovarajućeg rastvarača imaju uticaja na promenu viskoziteta optimalne model formulacije *SWOP* emulzije, ipak ne narušavaju emulzionu strukturu u periodu od 30 dana, što su potvrdili i rezultati određivanja pH i električne provodljivosti kao i rezultati testa centrifugiranja prikazani u tabeli 24. Kod odabranih emulzija (S , $S_{TPG0.5}$ i S_{TPGI}) čuvanim godinu dana na temperaturi ispod 30 °C, uočene su promene u vrednostima reoloških parametara kao i u izgledu reograma. Reogrami ukazuju na strukturne promene u emulzionom sistemu, koje su dovele, skoro do potpunog gubitka tiksotropnog ponašanja ispitivanih emulzija i pada vrednosti posmatranih parametara (tabela 25).

Tabela 25. Prividni viskoziteti η_{max} i η_{min} (pri $4,1 \text{ s}^{-1}$ i pri 200 s^{-1}), histerezna površina (HP) i prinosni napon (σ_0) za ispitivane uzorke *SWOP* emulzija (rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti tri ponovljena merenja \pm standardna devijacija).

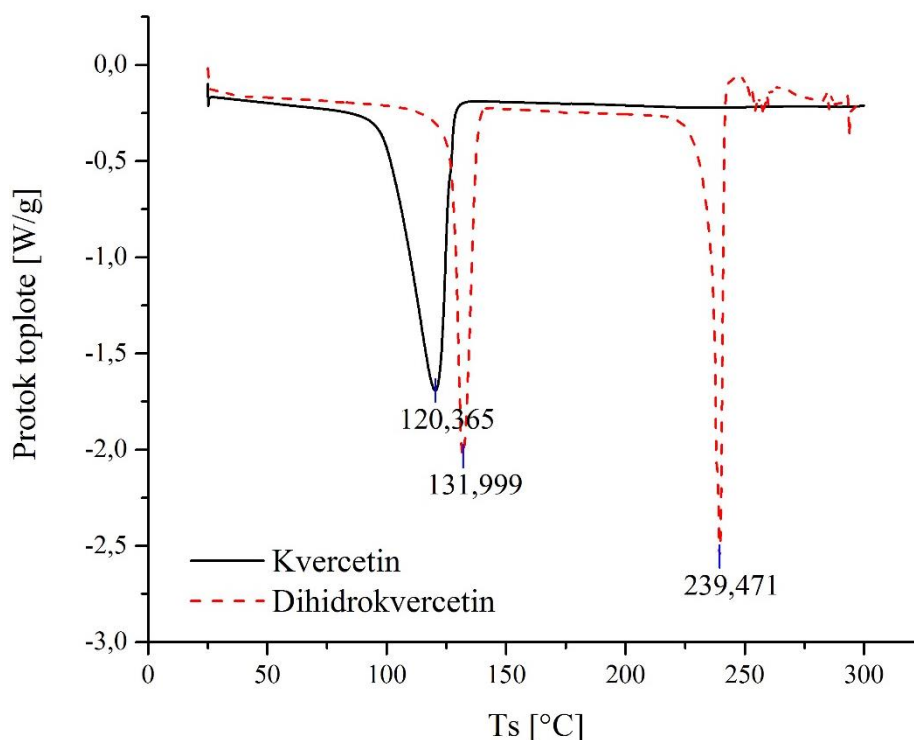
Emulzija <i>SWOP</i> baza bez PG				
Parametri	η_{max} (Pa s)	η_{min} (Pa s)	HA (Pa/s)	σ_0 (Pa)
Vreme				
24 h	5,96 \pm 0,12	0,708 \pm 0,007	1736,98 \pm 135,43	42,7 \pm 3,9
30 dana	7,8 \pm 1,4	0,67 \pm 0,01	2796,5 \pm 78,5	62,3 \pm 3,5
Emulzija <i>SWOP</i> baza sa PG (S)				
Vreme				
24 h	18,8 \pm 0,3	0,9 \pm 0,01	4162 \pm 73,4	69,5 \pm 2,8
30 dana	19,8 \pm 0,4	0,81 \pm 0,01	4485,1 \pm 74,0	88,5 \pm 0,7
godinu dana	16,25 \pm 0,4	0,84 \pm 0,01	2342,1 \pm 195,0	52,8 \pm 1,7
Emulzija <i>SWOP</i> emulzija sa 0,5% DHK (u etanolu, 96% v/v) ($S_{DHK0,5}$)				
Vreme				
24 h	7,20 \pm 0,06	0,44 \pm 0,01	1908,4 \pm 39,0	25,4 \pm 1,5
30 dana	7,17 \pm 0,25	0,372 \pm 0,006	1438,5 \pm 24,6	29,6 \pm 3,1
Emulzija <i>SWOP</i> emulzija sa 0,5% DHK ($S_{TPG0,5}$)				
Vreme				
24 h	15,31 \pm 0,75	0,674 \pm 0,005	4120,02 \pm 264,28	66,2 \pm 3,5
30 dana	10,1 \pm 0,5	0,57 \pm 0,01	2081,5 \pm 176,3	40,5 \pm 1,7
godinu dana	6,47 \pm 0,03	0,550 \pm 0,003	-152,6 \pm 1,8	24,9 \pm 0,5
Emulzija <i>SWOP</i> emulzija sa 1% DHK (S_{TPG1})				
Vreme				
24 h	10,34 \pm 0,08	0,54 \pm 0,007	2715,8 \pm 182,6	44,8 \pm 2,2
30 dana	11,9 \pm 0,3	0,58 \pm 0,02	2426,3 \pm 187,5	51,8 \pm 1,9
godinu dana	7,4 \pm 0,4	0,60 \pm 0,01	305,5 \pm 154,4	25,3 \pm 1,7

Na osnovu rezultata II faze, gde je urađeno poređenje rezultata senzorne analize i reoloških parametara, i s obzirom da nema značajnih promena u reološkim parametrima optimalne model formulacije sa aktivnom supstancom nakon 30 dana, može se zaključiti da kozmetički aktivna supstanca (DHK) i njen rastvarač propilenglikol ne utiču značajno na aplikativne osobine emulzije, tj. očekuje se da *SWOP* emulzija sa DHK pokaže iste ili slične efekte na koži korisnika.

Termalna analiza

U ovom delu eksperimenta urađen je deo termalne analize odnosno *DSC* analiza uzoraka optimalne model formulacije *SWOP* emulzije sa *DHK* i odgovarajućim rastvaračem (etanol, 96% v/v ili propilenglikol). Pošto je mikroskopska analiza ukazala da *DHK* nakon izvesnog vremena podleže kristalizaciji, primenjena je *DSC* metoda sa ciljem da se utvrdi da li odabrana supstanca ima uticaj na strukturu *SWOP* emulzije.

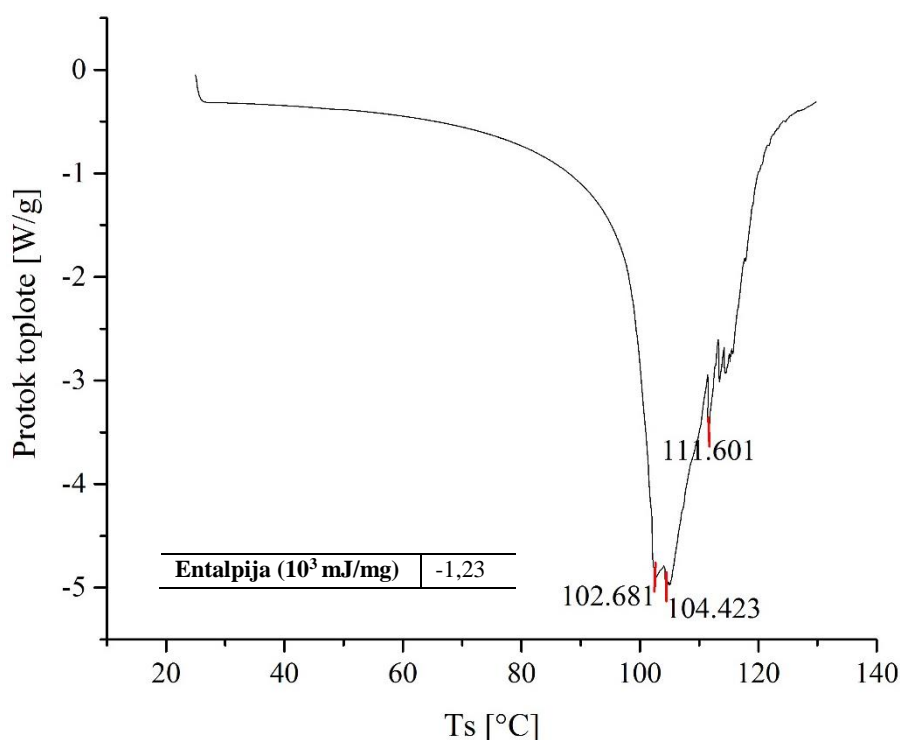
Na *DSC* profilima čistih supstanci, dihidrokvercetina i kvercetina, uočavaju se pikovi na višim temperaturama. Za dihidrokvercetin karakteristična su dva oštra pika na 132 °C i 239,5 °C, dok je za kvercetin karakterističan jedan, nešto širi pik na 120,4 °C (slika 43).



Slika 43. *DSC* profili čistih supstanci

Na *DSC* termogramu optimalne model formulacije *SWOP* emulzije (slika 44) uočava se jedan pik podeljen na dva vrha (102,7 °C i 104,4 °C). Sledeći karakterističan,

ali manji pik javlja se pri temperaturi od 111,6 °C. Detaljna objašnjenja *DSC* termograma optimalne model formulacije *SWOP* emulzije data su u odeljku 4.2.2.2.

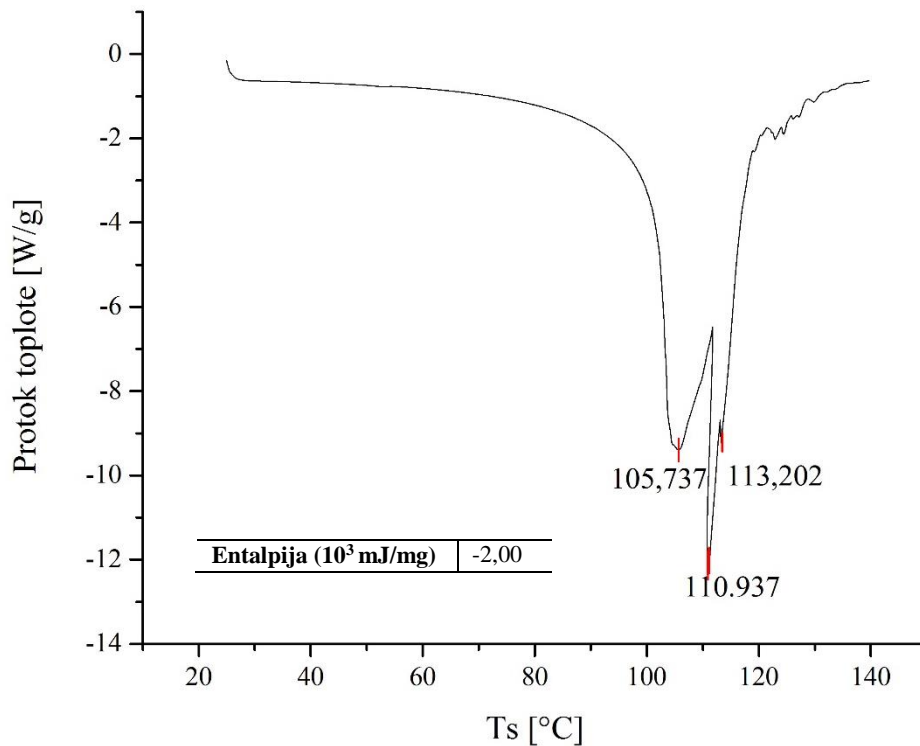


Slika 44. *DSC* termogram optimalne model formulacije *SWOP* emulzije

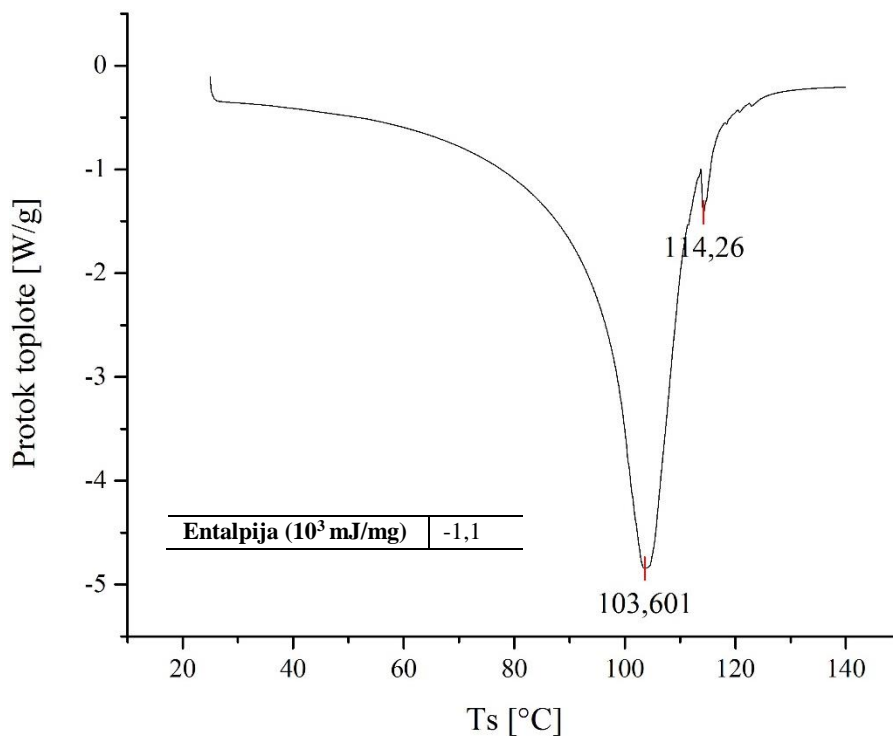
Prisustvo aktivne supstance DHK (0,5% m/m) i propilenglikola u optimalnoj model formulaciji *SWOP* emulzije (*S_{TPG0,5}*) neznatno pomera karakteristične pikove ka višim temperaturama, za nekoliko stepeni.

Na slici 45 se uočavaju dva karakteristična pika, od kojih prvi nije podeljen, već samo blago zaravnjen sa maksimumom na temperaturi od 105,7 °C, dok je drugi pik još izraženiji i dostiže svoj maksimum na temperaturi od 110,9 °C.

Kada se aktivna supstanca DHK (0,5% m/m) doda u obliku etanolnog rastvora (*S_{DHK0,5}*) (slika 46) na *DSC* termogramu javlja se širi pik na 103,6 °C i mali pik na 114,3 °C. Proširenje pika na nižim temperaturama verovatno je posledica isparavanja alkohola.

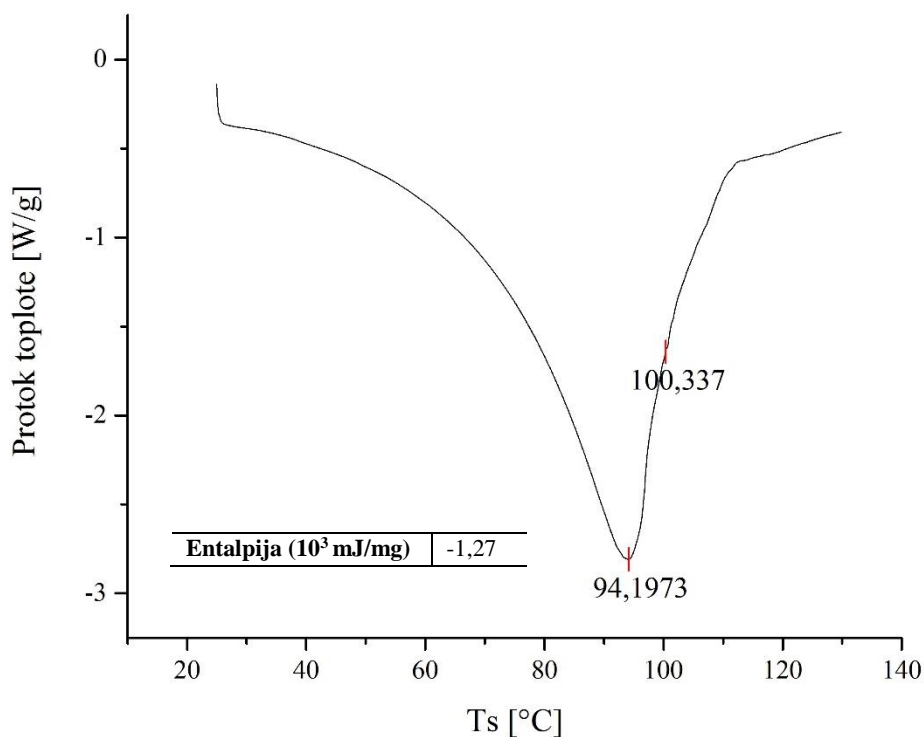


Slika 45. DSC termogram optimalne model formulacije SWOP emulzije sa 0,5% m/m DHK ($S_{TPG0,5}$)



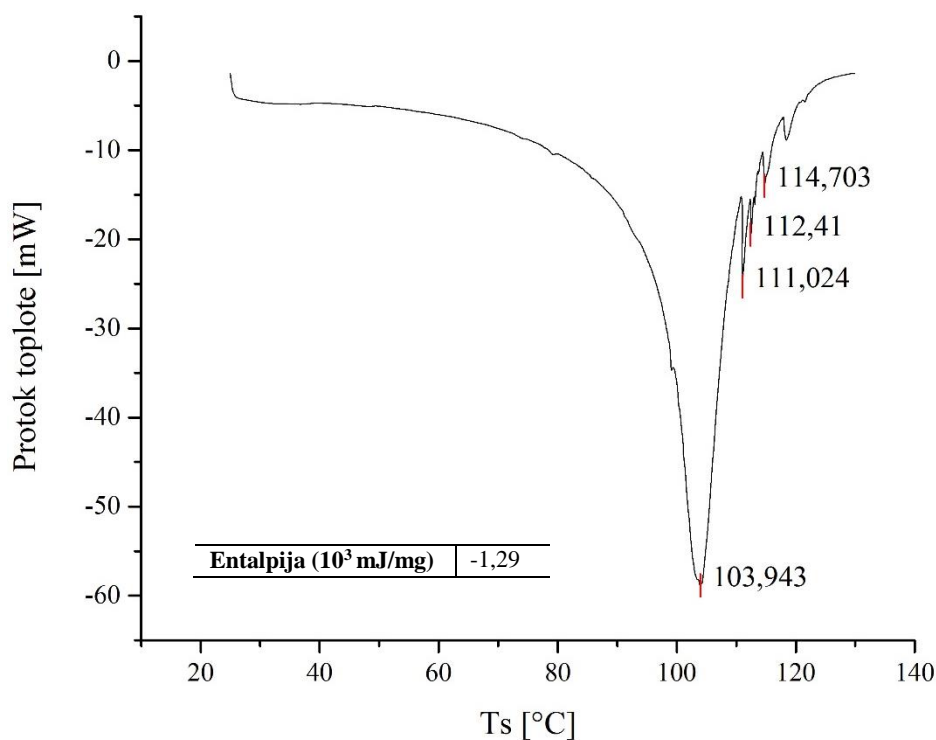
Slika 46. DSC termogram optimalne model formulacije SWOP emulzije sa 0,5% m/m DHK u etanolu, 96% v/v ($S_{DHK0,5}$)

Međutim, dodatak 1% m/m DHK menja DSC krivu (slika 47). Na njoj se uočava samo jedan široki pik sa maksimumom na 94,2 °C, dok se drugi pik ne može jasno uočiti. Postoji slaba naznaka da se drugi pik manifestuje sa maksimumom na oko 100,3 °C, ali je najverovatnije zbog proširenja prvog pika potpuno preklopljen.



Slika 47. DSC termogram optimalne model formulacije SWOP emulzije sa 1% m/m DHK (STPG1)

Proširenje prvog pika kao i pomeranje njegovog maksimuma ka nižoj temperaturi moglo bi se objasniti prisustvom aktivne supstance. Naime, DHK je flavonoid, derivat flavanona i sadrži 5 –OH grupa koje usled formiranja slabih vodoničnih veza privlače molekule vode, čime se smanjuje količina vode u geliranim strukturama. Na ovaj način povećava se količina vode koja se na nižim temperaturama lakše oslobađa i brže isparava.



Slika 48. DSC termogram optimalne model formulacije *SWOP* emulzije sa 0,8% m/m HMS (S_{HMS})

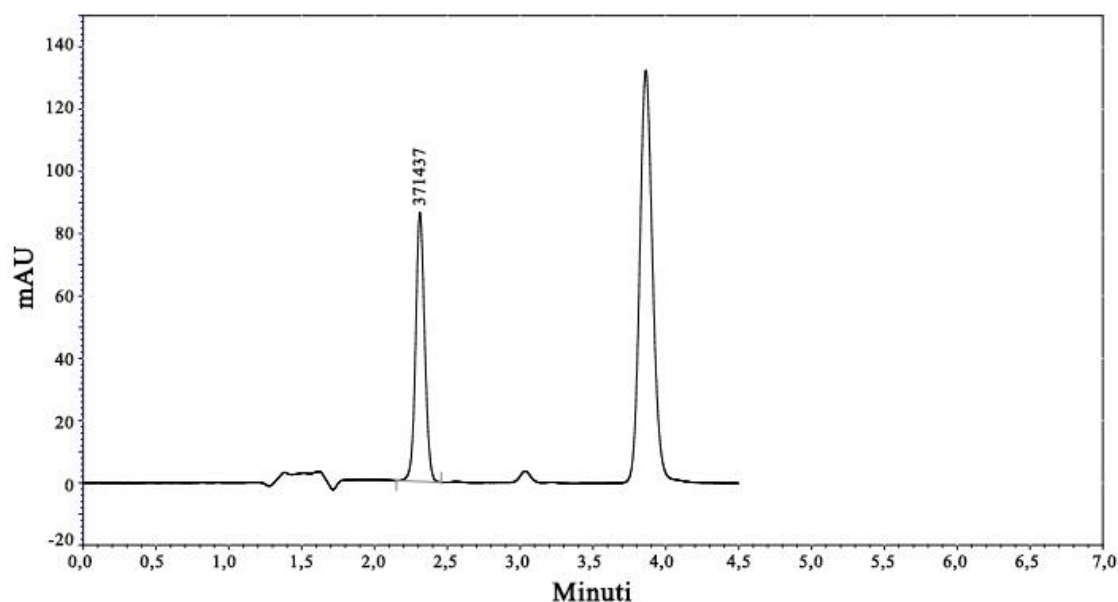
Prisustvo UV filtera HMS (8% m/m) u *SWOP* emulziji, ne utiče na strukturu emulzije što se može videti sa DSC termograma S_{HMS} (slika 48), gde se uočava prvi pik na 104 °C i niz manjih pikova iznad 111 °C.

4.3.2. Određivanje sadržaja dihidrokvercetina sa aspekta procene stabilnosti

Prethodna ispitivanja koja su obuhvatila mikroskopsku i termalnu analizu, kontinualnu reološku karakterizaciju, određivanje pH i električne provodljivosti potvrdila su stabilnost *SWOP* emulzije kao nosača u kraćem vremenskom periodu čuvanja od 30 dana, ali su istovremeno ukazala na nestabilnost aktivne supstance DHK. DHK je antioksidans i očekivalo se da će, zbog svoje prirode, ispoljiti nestabilnost u manjoj meri. Ispitivanjima je pokazano da je prilikom inkorporiranja DHK u emulzioni nosač bitan izbor rastvarača. DHK je teško rastvoran u vodi, dok se rastvara u etanolu i propilenglikolu. Izbor propilenglikola kao rastvarača za DHK pokazao se boljim, tj. u

SWOP emulziji sa inkorporiranim rastvorom DHK u propilenglikolu nije dolazilo do kristalizaciju DHK, u toku 30 dana od izrade. Međutim, posmatranjem izgleda uzoraka u toku 30 dana, primećena je promena boje uzorka. Sveži uzorci *SWOP* emulzija sa aktivnom supstancom su bili blago žućkasti, meki kremovi, a tokom vremena su postajali tamno žuti (boja senfa). Na osnovu ovoga moglo se zaključiti da DHK ispoljava svoju antioksidantnu aktivnost i da se sama (zbog svoje prirode) oksidiše do kvercetina. Kako bi bila potvrđena transformacija dihidrokvercetina u kvercetin usled oksidacije, urađeno je određivanje sadržaja DHK i njenog oksidacionog proizvoda kvercetina u uzorcima, tokom vremena.

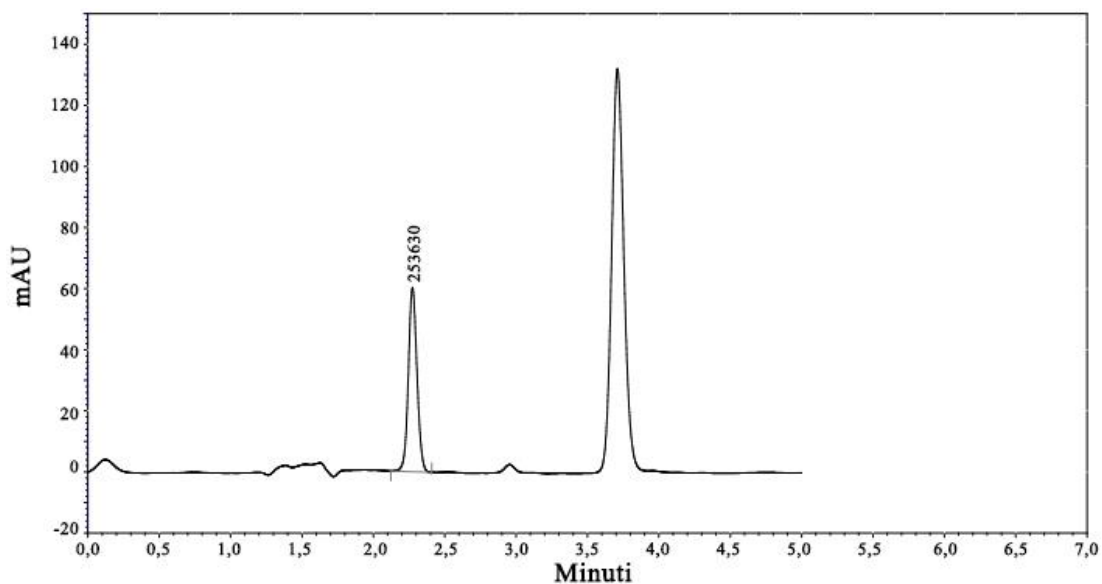
U te svrhe razvijena je i korišćena *RP-HPLC* metoda.



Slika 49. *HPLC* hromatogrami za praćenje stabilnosti DHK u uzorku *SWOP* emulzije sa 1% m/m DHK, 48 h nakon pripreme

Rezultati dobijeni *RP-HPLC* analizom uzorka $S_{TPG0,5}$ i S_{TPG1} (slika 49) nakon 48 h pokazali su da je sadržaj DHK čak viši (oko 135%, odnosno oko 120%) u odnosu na deklarisan, što je verovatno posledica isparavanja vode tokom pripreme emulzije. Nakon mesec dana čuvanja na temperaturi do 30 °C, sadržaj DHK se smanjio (70% odnosno 100%) i nastavio je da opada do 67% odnosno 79% (slika 50) koliko je određeno nakon

dva meseca, tj. 26%, odnosno 36% nakon godinu dana. Na ovaj način potvrđeno je da se DHK „troši“ i da se njen sadržaj u emulziji smanjuje tokom vremena.



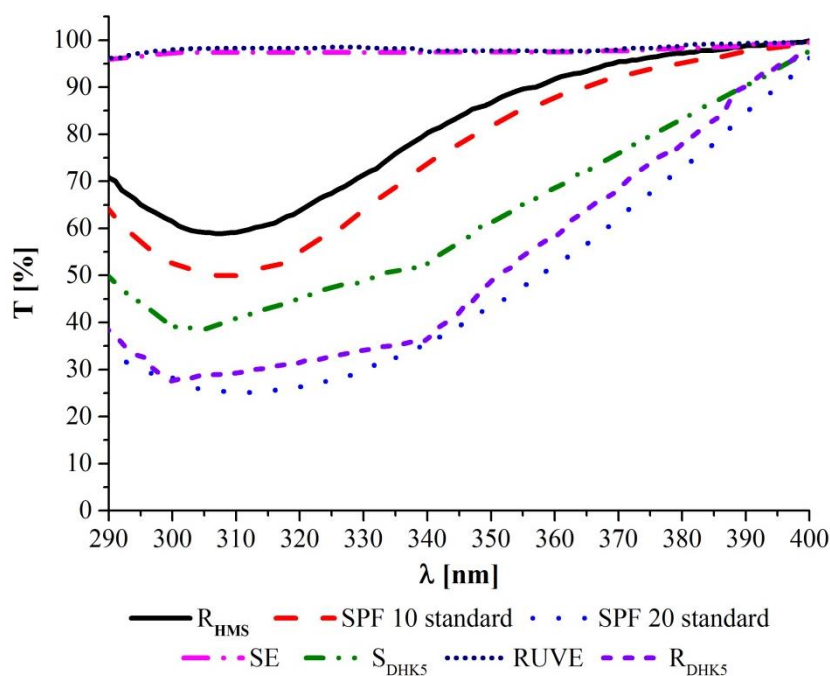
Slika 50. HPLC hromatogrami za praćenje stabilnosti DHK u uzorku *SWOP* emulzije sa 1% m/m DHK, mesec dana nakon pripreme

Istovremeno, urađeno je i određivanje sadržaja kvercetina u istim uzorcima *STPG0,5* i *STPG1* i zabeležen je porast njegovog sadržaja (sa 5,2% koliko je izmereno nakon mesec dana, na 11,7% koliko je izmereno nakon dva meseca i 36,7% izmereno nakon godinu dana, odnosno sa 4,1% nakon mesec dana, na 5,9% nakon dva meseca do 22,5% nakon godinu dana), čime je potvrđena pretpostavka da se DHK tokom vremena oksidiše u kvercetin. Kvercetin je antioksidans koji takođe ispoljava fotoprotektivnu aktivnost (Choquet i sar., 2008), pa oksidacija dihidrokvercetina u kvercetin, iako nije poželjna, ne utiče negativno na efikasnost emulzije. S druge strane, ovom metodom je potvrđena nestabilnost aktivne supstance DHK kao i nemogućnost ispitivane *SWOP* emulzije da zaštiti supstancu od promena. Pad koncentracije DHK nije praćen srazmernim porastom kvercetina, što navodi na zaključak da se tokom vremena izvesna količina aktivne supstance degradira. Interesantno je da je pad koncentracije DHK veći kod uzorka sa inkorporiranim manjom količinom DHK (0,5% m/m) *STPG0,5* u odnosu na uzorak *STPG1*, što se može objasniti mnogobrojnim faktorima koji utiču prilikom odmeravanja sastojaka i izrade emulzije, ali i činjenicom da je u uzorku *STPG0,5* aktivna supstanca bolje

rastvorena, odnosno nema pojave kristala DHK. Tome u prilog ide i činjenica da je povećanje sadržaja kvercetina veće u uzorku $S_{TPG0,5}$, što ukazuje da je u ovom uzorku izraženija oksidacija DHK u kvercetin. U cilju sprečavanja degradacije kozmetički aktivne supstance trebalo bi razmotriti mogućnost uvođenja dodatnih antioksidanasa, jer je poznato da se kombinovanjem antioksidanasa produžava njihova aktivnost, posebno vezano za DHK za koga je ispitivana fotoprotektivna sposobnost na koži.

4.3.3. *In vitro* određivanje fotoprotektivnih osobina ispitivanih uzoraka emulzija

U okviru ove eksperimentalne faze sprovedena su *in vitro* spektrofotometrijska merenja i određivanje *SPF* i *UVA-PF* kako bi se procenile potencijalne fotoprotektivne osobine DHK inkorporiranog u *SWOP* i poredbenu emulziju tipa u/v (S_{DHK5} i R_{DHK5}). Takođe, ispitivana je mogućnost aktivne supstance DHK da pojača fotoprotektivnu aktivnost UVB filtera homosalata, kada su obe inkorporirane u istu *SWOP* emulziju (S_{HD}). Sva merenja sprovedena su na pripremljenim uzorcima 48 h nakon njihove izrade.



Slika 51. UV spektri standarda i testiranih uzoraka SE, S_{DHK5} , RUVE i R_{DHK5}

Dobijeni rezultati (slika 51, tabela 26) ukazali su da su *SPF* optimalne model formulacije *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v (SE i RUVE) približno iste, dok je *UVA-PF* bio različit. Emulzije koje sadrže DHK, S_{DHK5} i R_{DHK5} , imaju značajno više vrednosti i *SPF* i *UVA-PF*, što navodi na zaključak da DHK ispoljava visoku fotoprotektivnu aktivnost. Uzorak *SWOP* emulzije sa 10% m/m DHK (S_{DHK10}) imao je neznatno višu *SPF* vrednost (17,9) u odnosu na uzorak S_{DHK5} , što ukazuje da dvostruko povećanje koncentracije aktivne supstance ne utiče značajno na povećanje *SPF* vrednosti.

UVA-PF/SPF odnos prikazan u tabeli 26 je viši od 0,33 za oba testirana uzorka, što *Cosmetics Europe (COLIPA Guidelines - Method for in vitro Determination of UVA protection, 2011)* preporučuje kako bi bila postignuta UVA zaštita (Osterwalder i sar., 2009), pa se na osnovu toga DHK može razmatrati kao UV filter sa potencijalnim fotoprotektivnim efektom u UVB i UVA oblasti. *SWOP* emulzija sa 8% m/m HMS (S_{HMS}) pokazala je nešto višu *SPF* u odnosu na standardnu emulziju homosalata (R_{HMS}) čiji je *SPF* $4,47 \pm 1,279$ (prema propisu FDA – *Office of The Federal Register EILLC. Title 21 Food and Drugs Parts 300 to 499 (Revised as of April 1, 2014): 21-CFR-Vol-5: U.S. Government Printing Office; 2014*).

Tabela 26. Vrednosti *SPF* i *UVA-PF* testiranih uzoraka *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v sa aktivnim supstancama DHK i/ili HMS

Uzorak	<i>SPF</i> ± SD	<i>UVA-PF</i> ± SD	<i>UVA-PF/SPF</i>
SE	2,3 ± 0,2	3,8 ± 0,2	1,65
S_{HMS}	5,3 ± 0,2	7,4 ± 0,2	1,40
S_{DHK5}	17,1 ± 0,2	15,2 ± 0,2	0,89
S_{HD}	17,8 ± 0,2	21,3 ± 0,2	1,20
RUVE	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,2	1,22
R_{DHK5}	19,5 ± 0,2	20,1 ± 0,2	1,03

Poređenjem emulzija S_{HMS} , S_{DHK5} i S_{HD} (*SWOP* emulzije sa inkorporiranim HMS i DHK) nije uočena značajna razlika između *SPF* vrednosti uzoraka S_{DHK5} i S_{HD} i može se zaključiti da je samo aktivna supstanca DHK odgovorna za visoku *SPF* vrednost

uzorka S_{HD} . Suprotno tome, poređenjem $UVA-PF$ vrednosti uzoraka S_{HMS} , S_{DHK5} i S_{HD} , prikazanih u tabeli 26, primećen je sinergistički efekat kombinacije HMS i DHK u uzorku S_{HD} , čija je vrednost $UVA-PF$ najviša i iznosi $21,3 \pm 0,2$.

Očigledno, $SWOP$ emulzije se mogu koristiti kao nosač za aktivnu supstancu DHK koja je pokazala dobar fotoprotektivni potencijal (SPF 17,1 i $UVA-PF$ 15,2), i kombinovanu sa homosalatom (8% m/m), koji u našim ispitivanjima predstavlja uzorak sa višim vrednostima SPF i $UVA-PF$ (17,8, odnosno 21,3) (tabela 26).

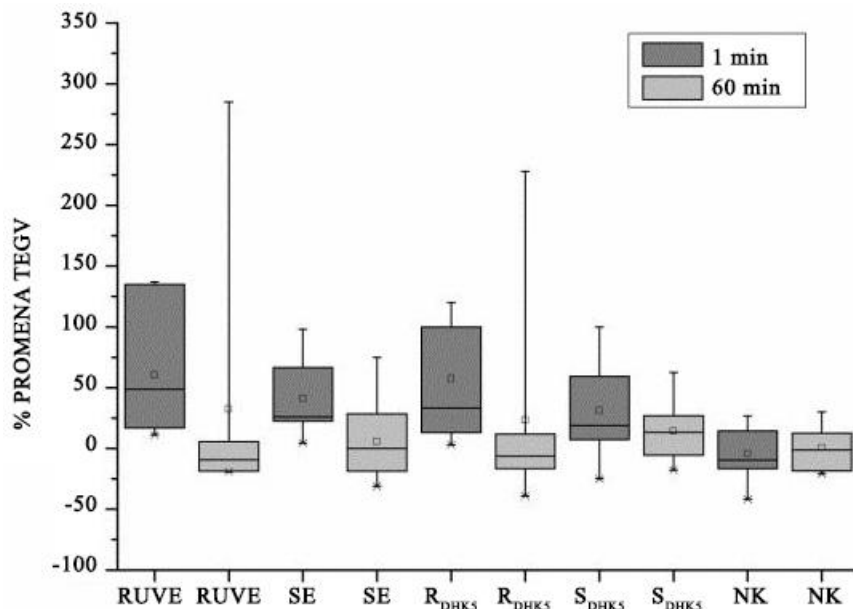
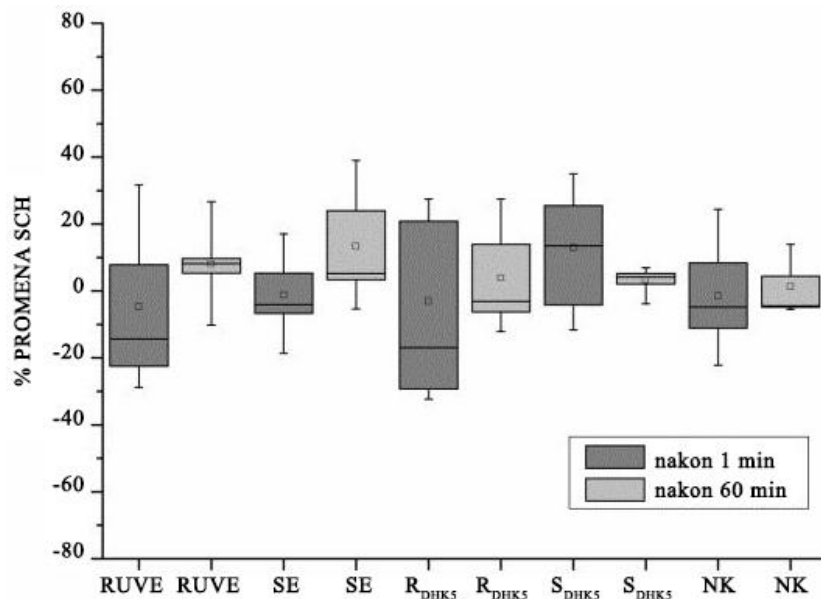
4.3.4. *In vivo* preliminarna procena efikasnosti i bezbednosnog profila

U ovom delu ispitivanja sprovedena je samo kratkotrajna *in vivo* studija u trajanju od jednog sata kako bi se procenile moguće razlike između $SWOP$ i poredbene emulzije tipa u/v kada je u pitanju njihov efekat na koži.

Rezultati dobijeni za hidrataciju *stratum corneum*-a (SCH) i transepidermalni gubitak vode (TEGV) nakon primene RUVE, SE, S_{DHK5} i R_{DHK5} uzoraka su predstavljeni na slici 52 kao promene vrednosti SCH i TEGV izražene u procentima nakon jednog minuta i jednog sata u odnosu na bazalnu vrednost.

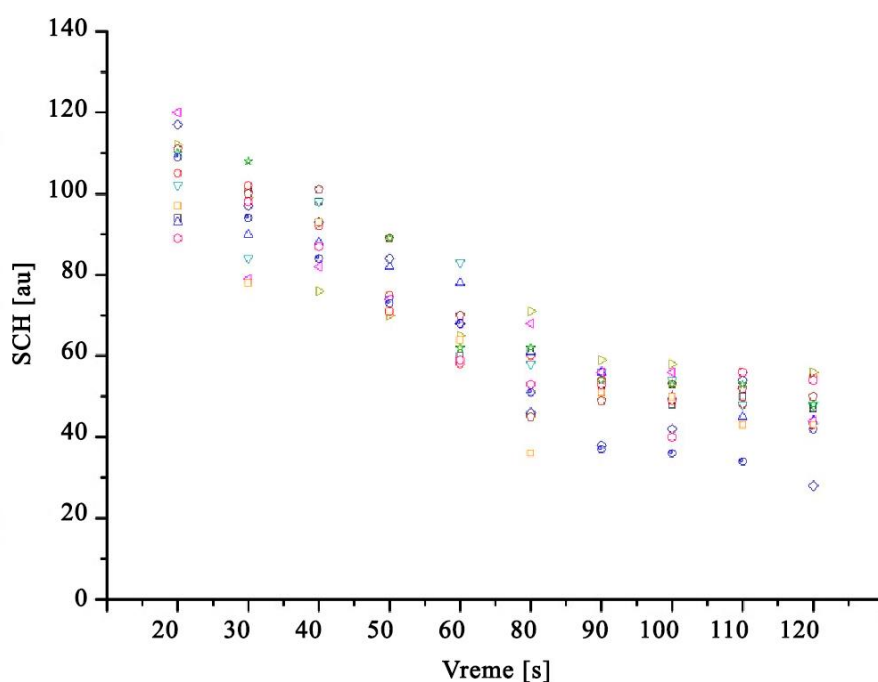
Za hidratacioni nivo *stratum corneum*-a i TEGV, nije bilo statistički značajnih promena u bilo kom vremenskom trenutku i za bilo koji uzorak. Međutim, nakon jednog sata od primene, $SWOP$ emulzija bez aktivne supstance (SE) pokazala je najviši trend porasta SCH, ukazujući na bolji hidratacioni potencijal $SWOP$ emulzije u odnosu na emulziju tipa u/v. Dodatno, trend povećanja TEGV primećen je nakon primene emulzije tipa u/v dok su rezultati za SE i S_{DHK5} uzorak ($SWOP$ emulzije) bili slični netretiranoj kontroli (NK). Izostanak promena pH i vrednosti eritem indeksa (EI) nakon primene $SWOP$ emulzije, zajedno sa rezultatima za TEGV, ukazuju na zadovoljavajući preliminarni iritacioni potencijal ispitivanih $SWOP$ uzoraka.

Posebno dizajnirana dvominutna kratkotrajna studija je sprovedena na uzorku S_{DHK5} kako bi se posmatrao mogući efekat na SCH, što je bilo očekivano nakon utrljavanja $SWOP$ emulzije u kožu zbog inverzije iz u/v u emulzije tipa v/u.



Slika 52. Procentualne promene vrednosti SCH i TEGV u različitim vremenskim tačkama (u poređenju sa bazalnom vrednošću); Prikazani pravougaonici se kreću od 25-og do 75-og percentila, 50-ti percentil je unutar pravougaonika, a uspravnim linijama su predstavljene minimalne i maksimalne vrednosti dok kvadrati predstavljaju srednje vrednosti.

Nivo SCH za svakog volontera u različitim vremenskim tačkama predstavljen je na slici 53.



Slika 53. SCH u različitim vremenskim tačkama dobijenim nakon primene uzorka S_{DHK5} ; na početku (u vremenskoj tački 0s) i u vremenskoj tački 60 s uzorak je bio utrljavan 10 s.

Dvadeset sekundi nakon primene (od čega je utrljavanje trajalo 10 s) emulzije, SCH se statistički povećao u odnosu na bazalnu vrednost, a onda je SCH nivo počeo da opada pa je jedan minut nakon primene, dostigao bazalnu vrednost i ostao konstantan do kraja merenja. Dobijeni rezultati ukazuju na inverziju faza emulzija što je u saglasnosti sa rezultatima određivanja tačke inverzije merenjem promena vrednosti SCH (Beuché *i sar.* 2008).

5. ZAKLJUČAK

Prva faza eksperimentalnog rada

➤ Tokom formulisanja *SWOP* emulzije korišćena su ulja različita po polarnosti i poreklu. Najbolju kompatibilnost sa nejonskim emulgatorom (poligliceril-2 dipolihidroksistearat) i anjonskim surfaktantom (natrijum laurilglukozkarboksilat) pokazao je tečni parafin (43,7 mN/m), potom ulje semenki suncokreta (19,3 mN/m) i kaprilno/kaprinski trigliceridi (21,3 mN/m).

➤ Na osnovu fizičko-hemijske karakterizacije u toku prirodnog starenja/čuvanje bez posebnih uslova od 30 dana, zaključeno je da je za izradu stabilne *SWOP* emulzije pored nejonskog emulgatora (poligliceril-2 dipolihidroksistearat) i anjonskog surfaktanta (natrijum laurilglukozkarboksilat) u odnosu 4:1,5 neophodno i prisustvo polimernog ugušćivača.

➤ Od dva ugušćivača (ksantan guma i natrijum poliakrilat) koji su predloženi u evropskom patentu EP1917954 A1, utvrđeno je da za stabilnost *SWOP* emulzije ključnu ulogu ima natrijum poliakrilat.

➤ Postupak izrade *SWOP* emulzije je sličan postupku izrade konvencionalnih emulzija tipa u/v, pri čemu je dovoljno primeniti samo jednu homogenizaciju.

➤ Ispitivanjem stabilnosti uzoraka *SWOP* emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u u uslovima prirodnog starenja u toku 30 dana, utvrđeno je da je poredbena emulzija tipa v/u nestabilna.

➤ Ispitivanjem stabilnosti uzoraka *SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa u/v u uslovima prirodnog starenja u toku 90 dana, potvrđena je stabilnost obe emulzije.

➤ Ispitivanjem stabilnosti uzoraka *SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa u/v u uslovima cikličnog temperaturnog stres testa potvrđeno je da obe emulzije pokazuju zadovoljavajuću stabilnost pa se na osnovu toga može predvideti njihova stabilnost u toku dužeg vremena čuvanja.

Druga faza eksperimentalnog rada

➤ Merenjem kontaktnog ugla između kapi prečišćene vode i kože, na kojoj je primenjena emulzija, potvrđeno je specifično ponašanje *SWOP* emulzije koja nakon primene u toku od 6 do 15 minuta podleže inverziji faza i prelazi u emulziju tipa v/u. Za razliku od nje, poredbena emulzija tipa u/v ni nakon 30 minuta ne podleže inverziji.

➤ Kod uzoraka *SWOP* emulzije izmereni su kontaktni uglovi od 30° i veći, što ih kategorizuje kao voodoporne, i ne bi trebalo da se dodatno testiraju *COLIPA* metodom za određivanje voodopornosti.

➤ Ispitivanjem koloidne strukture emulzija mikroskopiranjem, uočene su značajne razlike između *SWOP* emulzija i emulzija tipa u/v i v/u, pri čemu je emulzija tipa v/u strukturno potpuno različita u odnosu na *SWOP* i emulziju tipa u/v.

➤ Kod *SWOP* emulzije uočen je diskontinuirani sloj (verovatno nejonskog emulgatora (poligliceril-2 dipolihidroksistearat) i anjonskog surfaktanta (natrijum laurilglukozkarboksilat, lauril glukozid) oko vode gelirane polimerom. Ovi prekidi emulgator/surfaktant slojeva mogli bi biti razlog curenja vode iz narušene gel strukture prilikom primene emulzije na koži i njene brze inverzije u emulziju tipa v/u.

➤ Kod emulzije tipa u/v gelirana voda je kompletno zatvorena u pravilno oblikovane strukture bez znakova „curenja“ vode iz gela i izgleda da ima pravilniju/konzistentniju i čvršću strukturu od *SWOP* emulzije.

➤ Primenom termalnih analiza, *DSC* i *TGA*, može se zaključiti da *SWOP* emulzija pokazuje znatno brže isparavanje vode u odnosu na poredbenu emulziju tipa u/v. Primećeno je i da značajan procenat vode ostaje zarobljen u emulzionim sistemima *SWOP* i emulzije tipa u/v, što ukazuje na prisustvo vezane vode različitim vezama i na strukturnu kompleksnost ispitivanih uzoraka emulzija.

➤ Određivanjem električne provodljivosti potvrđena je razlika između *SWOP* emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u, pri čemu su vrednosti električne provodljivosti za *SWOP* emulziju bile veoma visoke (preko 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$), dok su za poredbenu emulziju tipa u/v bile do 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a za emulziju tipa v/u ispod 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

➤ Dodatkom rastvora sličnog znoju (prisutni joni) u ispitivane emulzije, električna provodljivost se znatno povećala kod poredbene emulzije tipa u/v, dok je kod poredbene emulzije tipa v/u ostala ispod 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Kod *SWOP* emulzije primećeno je neznatno povećanje električne provodljivosti, što ukazuje na dobru karakteristiku ispitivane formulacije *SWOP* emulzije u pogledu prisustva jona. Dalje dodavanje jona dovelo bi do brzog pada električne provodljivosti zbog inverzije u emulziju tipa v/u.

➤ Kontinualna reološka analiza ukazala je da *SWOP* emulzija pokazuje nenjutnovski tip tečenja sa umerenom tiksotropijom, dok je oscilatorna reološka karakterizacija ukazala na dominantno elastično ponašanje karakteristično za čvrsta tela (elastični (G') modul je dominirao nad viskozim (G'') modulom) u oblasti primenjenih frekvencija.

➤ Jednofaktorska ANOVA korišćena je za testiranje izmerenih reoloških parametara pri čemu je potvrđeno da se poredbena emulzija tipa v/u značajno razlikuje od *SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa u/v. *SWOP* emulzija i poredbena emulzija tipa u/v značajno se razlikuju po prividnim viskozitetima η_{max} i η_{min} merenim na 32 °C u prisustvu rastvora sličnog znoju, kao i po prinosnom naponu merenom na 32 °C.

➤ Rezultati senzorne studije analizirani jednofaktorskom ANOVA potvrdili su da se poredbena emulzija tipa v/u značajno razlikuje od *SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa u/v.

➤ Atributi *gustina* i *konzistencija* ukazali su da se *SWOP* emulzija i poredbena emulzija tipa u/v značajno razlikuju.

➤ Atribut *konzistencija* koji se procenjuje u prvoj fazi senzorne analize je u pozitivnoj korelaciji sa reološkim parametrima η_{min} i η_{max} na 20 °C bez prisustva rastvora sličnog znoju.

➤ Atributi *adhezija*, *tekstura*, *lepljivost* i *gustina*, koji se procenjuju u drugoj fazi senzorne analize, mogu se predvideti merenjem η_{min} i η_{max} na 20 °C bez prisustva rastvora sličnog znoju i η_{max} na 32 °C u prisustvu rastvora sličnog znoju.

➤ Atributi *razmazivost*, *rastečnjavanje* i *apsorpcija* mogu se predvideti merenjem η_{min} na 32 °C u prisustvu jona i η_{min} , η_{max} na 32 °C bez rastvora sličnog znoju, u

kombinaciji sa određenim prinosnim naponom σ_0 na 20 °C i 32 °C u prisustvu jona. Atribut *zaostali film* pokazuje obrnut odnos sa atributima *razmazivost*, *rastečnjavanje* i *apsorpcija*, ali isti reološki parametri mogu da se iskoriste i za njegovo predviđanje.

➤ Rezultati većine odabranih senzornih atributa su u saglasnosti sa rezultatima reoloških ispitivanja, pa je moguće koristiti reološka merenja pod definisanim uslovima za predviđanje određenih senzornih osobina kod *SWOP* emulzija.

➤ Atributi *sjaj uzorka*, *elastičnost*, *masnoća*, *blagost*, *lepljivost filma*, *masnoća filma*, *sjaj filma* i *spiranje filma* znatno zavise od sastava masne faze i upotrebljenih emolijenasa, ali su nalazi testiranja potvrdili poželjne osobine *SWOP* emulzije SE. Atribut *spiranje filma* potvrdio je bolju vodootpornost *SWOP* emulzije u odnosu na poredbenu emulziju tipa u/v.

Treća faza eksperimentalnog rada

➤ Različite koncentracije kozmetički aktivne supstance dihidrokvercetina koje su inkorporirane u *SWOP* emulziju, nisu uticale na pH i električnu provodljivost. Na osnovu ovih rezultata i rezultata testa centrifugiranja, može se zaključiti da DHK nema uticaja na stabilnost *SWOP* emulzije.

➤ Reološka kontinualna analiza pokazala je da dodatak DHK i korastvarača (etanol i/ili propilenglikol), delimično utiču na promenu viskoziteta optimalne model formulacije *SWOP* emulzije, ali ne narušavaju emulzionu strukturu *SWOP* emulzije.

➤ Mikroskopskom analizom aktivnih uzoraka *SWOP* emulzije (uzorci sa DHK) zabeležena je pojava kristala aktivne supstance, kod uzoraka sa koncentracijom DHK većom od 0,5% m/m, bez obzira na korastvarač (etanol ili propilenglikol) koji je upotrebljen za rastvaranje.

➤ U uzorcima *SWOP* emulzije sa 0,5% m/m DHK i propilenglikolom (10% m/m) nisu nastajali kristali DHK ni nakon 30 dana od izrade uzoraka.

➤ Termalna analiza, *DSC*, potvrdila je da prisustvo DHK i korastvarača u aktivnom uzorku ne narušava strukturu *SWOP* emulzije.

➤ Primenom reverzno fazne *HPLC* metode potvrđeno je da se sadržaj DHK u aktivnim uzorcima *SWOP* emulzije smanjuje (antioksidans se „troši“) tokom vremena, što se videlo u promeni boje uzorka od svetlo žuto do tamno žute tokom godinu dana čuvanja na temperaturi ispod 30 °C. Istovremeno, praćen je i sadržaj kvercetina u uzorcima *SWOP* emulzije sa inkorporiranom DHK i zabeležen je porast njegovog sadržaja, čime je potvrđena pretpostavka da aktivna supstanca DHK tokom vremena oksidiše u kvercetin.

➤ Ispitivana *SWOP* emulzija kao nosač za DHK nije bila dovoljna zaštita za aktivnu supstancu DHK. U nastavku istraživanja, bilo bi značajno ispitati koji bi antioksidanasi mogli pozitivno uticati na stabilnost aktivne supstance DHK u formulaciji *SWOP* emulzije za zaštitu kože od UV zračenja.

➤ *In vitro* određen *SPF* optimalne model formulacije *SWOP* (obeležene kao SE) i poredbene emulzije tipa u/v (obeležene kao RUVE) bio je isti (2,3) ali su izmereni *UVA-PF* bili različiti (redom 3,8, odnosno 2,8)

➤ Emulzije (*SWOP* i poredbena emulzija tipa u/v) sa 5% m/m DHK, imaju značajno više, *in vitro* određene vrednosti i *SPF* i *UVA-PF*, što navodi na zaključak da DHK pokazuje potencijalnu fotoprotektivnu aktivnost.

➤ *UVA-PF/SPF* odnos je viši od 0,33 za testirane aktivne uzorke *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v, što ukazuje da se DHK može razmatrati kao UV filter sa potencijalnim efektom u UVA i UVB oblasti.

➤ Na osnovu određenih vrednosti *UVA-PF* (21,3 za uzorak *S_{HD}* u odnosu na 7,4 za uzorak *S_{HMS}*) za ispitivane aktivne uzorke *SWOP* emulzije primećen je sinergistički efekat odobrenog UV filtera – homosalata i DHK.

➤ Rezultati *in vivo* studije performansi ukazali su na bolji hidratacioni potencijal *SWOP* emulzije u odnosu na poredbenu emulziju tipa u/v. Izostanak promena pH kože i vrednosti eritem indeksa nakon primene *SWOP* emulzije, zajedno sa rezultatima za TEGV, ukazuju na zadovoljavajući preliminarni iritacioni potencijal ispitivanih *SWOP* uzoraka.

➤ Posebno dizajnirana, dvominutna kratkotrajna studija praćenja promena hidratacije *stratum corneum*-a (SCH) ukazala je na inverziju faza kod *SWOP* emulzije, što se manifestovalo padom vrednosti SCH u toku 2 minuta.

6. LITERATURA

Abels C, Reich H, Knie U, Werdier D, Lemmnitz G. Significant improvement in mild acne following a twice daily application for 6 weeks of an acidic cleansing product (pH 4). *J Cosmet Dermatol* 2014;13:103—8.

Ada S, Sahin S, Boztepe G, Karaduman A, Kolemen F. No additional effect of topical calcipotriol on narrow-band UVB phototherapy in patients with generaliyed vitiligo. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2005;21:79–83.

Adeyeye M, Jain A, Ghorab MM, Reilly W. Viscoelastic evaluation of topical creams containing microcrystalline cellulose/sodium carboxymethyl celluloseas stabilizer. *AAPS PharmSciTech* 2002;3:16–25.

Albuszies M, Müller S. High-factor sunscreen – A balancing act between cosmetic elegance and efficiency. *SÖFW-Journal* 2016;142(3):10–7.

Albuszies M, Müller S. Sun care – A challenge in emulsion development. *SÖFW-Journal* 2014;140(7):2–10.

Ali MS, Alam MS, Alam N, Siddiquic MR. Preparation, Characterization and stability study of dutasteride loaded nanoemulsion for treatment of benign prostatic hypertrophy, *Iran J Pharm Res* 2014;13(4):1125–40.

Almeida IF, Bahia MF. Comparison of the mechanical properties of two oleogels. *e-Rheo Pt* 2005;5:12–8.

Almeida IF, Bahia MF. Evaluation of the physical stability of two oleogels. *Int J Pharm* 2006;327:73–7.

Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui MS, Yarosh DB, Ichihashi M. Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packing, release, uptake, and dispersion. *J Invest Dermatol* 2012;132:1222–9.

Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:129–57.

Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 2001;20:2413–23.

Ansmann A, Kawa R, Koester J, Strauss G. DEHYMULS® PGPH stable formulations for cosmetic w/o emulsions, *Information Cosmetic* 1995;2:1–4. (Rev 1/2000).

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

Balk SJ. Ultraviolet radiation: a hazard to children and adolescents. *Pediatrics* 2011;127(3):e791–817.

Balogh TS, Velasco MV, Pedriali CA, Kaneko TM, Baby AR. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. *An Bras Dermatol* 2011;86:732–42.

Bamann L, Avashia N, Castanedo-Tardan MP. Sunscreens, U: Baumann L. *Cosmetic dermatology: principles and practice*, 2nd ed, New York: The McGraw-Hill Companies, Inc. 2008:245–56.

Bandow GD, Koo JY. Narrow-band ultraviolet B radiation: a review of the current literature. *Int J Dermatol* 2004;43:555–61.

Barreiro-Iglesias R, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Poly(acrylic acid) micro-gels (carbopol 934)/surfactant interactions in aqueous media. Part II: Ionicsurfactants. *Int J Pharm* 2003;258:179–91.

Bartels NG, Lünemann L, Stroux A, Kottner J, Serrano J, Blume-Peytavi U. Effect of diaper cream and wet wipes on skin barrier properties in infants: a prospective randomized controlled trial. *Pediatr Dermatol* 2014;31(6):683–91.

BASF. Products approved or certified by ECOCERT for natural and organic cosmetics, 2014.

Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and pro-inflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *J Invest Dermatol* 2009;129(4):994–1001.

Bendová H, Krejčí A, Kubác L, Jírová D, Kejlová K, Kolárová H, Brabec M, Malý M. *In vitro* approaches to evaluation of sun protection factor. *Toxicol In Vitro* 2007;21(7):1268–75.

Bensouilah J, Buck P. Skin structure and function, U: Aromadermatology: aromatherapy in the treatment and care of common skin conditions, Oxford: Radcliffe Publishing, 2006:1–11.

Berardesca E. EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods. *Skin Res Technol* 1997;3(2):126–32.

Berg RJ, Ruven HJ, Sands AT, de Gruijl FR, and L.H. Mullenders LH. Defective global genome repair in XPC mice is associated with skin cancer susceptibility but not with sensitivity to UVB induced erythema and edema. *J Invest Dermatol* 1998;110:405–9.

Berker DD, Rees JL. Normal sweat secretion rate in patients with alopecia areata. *Br J Dermatol* 1995;132:402–4.

Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Krickler A, Eberle C, Barnhill R. Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(3):195–9.

Beuché M, Amela CC, Domingo M. Aqueous meta-stable oil-in-water emulsions, EP1917954 A1, 2008.

Bilia AR, Benedetta Isacchi B, Chiara Righeschi C, Clizia Guccione C, Maria Camilla Bergonzi MC. Flavonoids loaded in nanocarriers: an opportunity to increase oral bioavailability and bioefficacy. *Food Nutr Sci* 2014;5:1212–27.

Bito T, Roy S, Sen CK, Shirakawa T, Gotoh A, Ueda M, Ichihashi M, Packer L. Flavonoids differentially regulate IFN γ -induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action. *FEBS Lett* 2002;520(1–3):145–52.

Boer M, Duchnik E, Maleszka R, Marchlewicz M. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postepy Dermatol Alergol* 2016;33(1):1–5.

Borkowska B. Localization of melanoma depends of sun exposure and preventive behavior. *J Am Acad Dermatol* 2014;70(5),Supp 1:AB128.

Brand R, Jendrzewski J. Topical treatment with (–)-epigallocatechin-3-gallate and genistein after a single UV exposure can reduce skin damage. *J Dermatol Sci* 2008;50:69–72.

Breuckmann F, von Kobyletzki G, Avemaete A, Kreuter A, Altmeyer P. Efficacy of ultraviolet A1 phototherapy on the expression of bcl-2 in atopic dermatitis and cutaneous T-cell lymphoma *in vivo*: a comparison study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002;18:217–22.

Bruynzeel I, Nickoloff BJ, vanderRaaij EM, Boorsma DM, Stoof TJ, Willemze R. Induction of ICAM-a expression by epidermal keratinocytes via a paracrine pathway possibly involving dermal dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 1992;284:250–2.

Cai Y, Chen T, Xu Q. Astilbin suppresses delayed-type hypersensitivity by inhibiting lymphocyte migration. *J Pharm Pharmacol* 2003;55(5):691–6.

Camouse MM, Domingo DS, Swain FR, Conrad EP, Matsui MS, Maes D, Declercq L, Cooper KD, Stevens SR, Baron ED. Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin. *Exp Dermatol* 2009;18:522–6.

Chang NB, Feng R, Gao Z, Gao W. Skin cancer incidence is highly associated with ultraviolet-B radiation history. *Int J Hyg Environ Health* 2010;213:359–68.

Chernukha YL, Kononenko VA. Test report – solubility of dihydroquercetin in different types of solutions. *Ametis Joint Stock Company*, internal report 2009.

Chiarelli-Neto O, Ferreira AS, Martins WK, Pavani C, Severino D, Faião-Flores F, Maria-Engler SS, Aliprandini E, Martinez GR, Di Mascio P, Medeiros MHG, Baptista MS. Melanin photosensitization and the effect of visible light on epithelial cells. *PLoS One* 2014;9(11):e113266.

Choquet B, Couteau C, Papis E, Coiffard IJ. Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an *in vitro* method. *J Nat Prod* 2008;71:1117–8.

Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol* 2013;30(1):30–41.

CIR Expert Panel. Final safety assessment crosslinked alkyl acrylates as used in cosmetics, November 17, 2011.

Clarys P, Barel AO. New european legislation concerning efficacy claims of cosmetic products – an overview of different methods of evaluation, U: Barel AO, Paye M, Maibach HI. (eds). Handbook of cosmetic science and technology, 4th ed, Boca Raton: CRC Press, Taylor&Francis Group, 2014:637–47.

Clydesdale GJ, Dandie GW, Muller HK. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* 2001;79:547–68.

Cognis. Customer Information, Plantapon[®] LGC Sorb, next generation APG. *Information Cosmetic* No. VIII/04 Skin Care, October 2004.

COLIPA Guidelines – Method for *in vitro* determination of UVA protection, March 2011.

COLIPA Guidelines for evaluating sun product water resistance, December 2005.

COLIPA Guidelines for the evaluation of the efficacy of cosmetic products, Third Edition, May 2008.

COLIPA Guidelines on stability testing of cosmetic products, March 2004.

COLIPA Guidelines – Method for the *in vitro* determination of UVA protection provided by sunscreen products, 2007.

COLIPA, CTFA SA, JCIA, CTFA International Sun Protection Factor (*SPF*) Test Method, May 2006.

Cranney A, Horsley T, O'Donnell S, Weiler H, Puil L, Ooi D, Atkinson S, Ward L, Moher D, Hanley D, Fang M, Yazdi F, Garritty C, Sampson M, Barrowman N, Tsertsvadze A, Mamaladze V. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evid Rep Technol Assess* 2007;158:1–235.

Crosera M, Prodi A, Mauro M, Pelin M, Florio C, Bellomo F, Adami G, Apostoli P, De Palma G, Bovenzi M, Campanini M, Filon FL. Titanium Dioxide nanoparticle penetration into the skin and effects on HaCaT cells. *Int J Environ Res Public Health* 2015, 12, 9282–97.

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 Therm Anal Calorim* 2010;102:313–6.

- da S. Souza ID, Almeida DL, Takahashi VP. Proposal of a classification system for opportunities to innovate in skin care products. *Int J Cosmet Sci* 2015;37:479–88.
- Dall'Acqua S, Miolo G, Innocenti G, Caffieri S. The photodegradation of quercetin: relation to oxidation. *Molecules* 2012;17:8898–907.
- Damiani E, Astolfi P, Cionna L, Ippoliti F, Greci L. Synthesis and application of a novel sunscreen-antioxidant. *Free Radic Res* 2006;40:485–94.
- Davies NM, Yáñez JA. Flavonoid pharmacokinetics: methods of analysis, preclinical and clinical pharmacokinetics, safety, and toxicology, New Jersey: John Wiley & Sons; 2012.
- Dawe RS, Ultraviolet A1 phototherapy. *Br J Dermatol* 2003;148:626–37.
- de la Roche HM, Seagrove S, Mehta A, Divekar P, Campbell S, Curnow A. Using natural dietary sources of antioxidants to protect against ultraviolet and visible radiation-induced DNA damage: an investigation of human green tea ingestion. *J Photochem Photobiol B* 2010;101:169–73.
- DeLeo VA, Horlick H, Hanson D, Eisinger M, Harber LC. Ultraviolet radiation induces changes in membrane metabolism of human keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 1984;83:323–6.
- Delevoeye C. Melanin transfer: the keratinocytes are more than gluttons. *J Invest Dermatol* 2014;134(4):877–9.
- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC. Inhibition of ultraviolet B-induced skin erythema by N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine. *J Dermatol Sci* 1997;15:23–35.
- Diao DY, Lee TK. Sun-protective behaviors in populations at high risk for skin cancer. *Psychol Res Behav Manag* 2014;7:9–18.
- Diffey B, Robson J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. *J Soc Cosmet Chem* 1989;40(3):127–33.
- Diffey BL, Tanner PR, Matts PJ, Nash JF. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. *J Am Acad Dermatol* 2000;43(6):1024–35.

Diftis NG, Biliaderis CG, Kiosseoglou VD. Rheological properties and stability of model salad dressing emulsions prepared with a dry-heated soybean protein isolate– dextran mixture. *Food Hydrocoll* 2005;19:1025–31.

Dinkova-Kostova A. Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: versatility of effects and mechanisms. *Planta Med* 2008;74:1548–59.

Dobrev H. Ethical Aspects of Cosmetic Testing, U: Fluhr J. (ed). Practical aspects of cosmetic testing: how to set up a scientific study in skin physiology, Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011:15–25.

Dukhin SS, Sjöblom J, Sæther Ø. An experimental and theoretical approach to dynamic behavior of emulsions U: J. Sjöblom (ed). Emulsions and emulsion stability surfactant science series/61, 2nd ed, Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2005:1–107.

Dupont E, Gomez J, Bilodeau D. Beyond UV radiation: A skin under challenge. *Int J Cosmet Sci* 2013;1–9.

Editorial. Solar radiation and human health. *J Photochem Photobiol B* 2010;101:109–10.

Eichhorn S, Kawa R, Sorns J, Urban A. Lotioned tissue paper having a short water absorption time. US 8118972 B2;2012.

El-Boury S, Couteau C, Boulande L, Papis E, Coiffard LJM. Effect of the combination of organic and inorganic filters on the sun protection factor (*SPF*) determined by *in vitro* method. *Int J Pharm* 2007;340(1–2):1–5.

El-ofty M, El-Darouty M, Salonas M, Bosseila M, Sobeih S, Lehata T, Nada H, Tawdy A, Amin I, El-Enany G. Narrow band UVB (311 nm), psoralen UVB (311 nm) and PUVA therapy in the treatment of early–stage mycosis fungoides: a right-left comparative study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2005;21:281–6.

Epstein H. Skin care products, U: Barel AO, Paye M, Maibach HI (eds). Handbook of cosmetic science and technology, 4th ed, Boca Raton: CRC Press; 2014, 103–14.

Epstein H. Skin care products, U: Barel AO, Paye M, Maibach HI (eds). Handbook of cosmetic science and technology, 3th ed, Boca Raton: CRC Press; 2009, 121–34.

Estanqueiro M, Conceição J, Amaral MH, Santos D, Silva JB, Lobo JMS. Characterization and stability studies of emulsion systems containing pumice. *Braz J Pharm Sci* 2014;50(2):361–9.

Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer Jose de Alencar Goes da Silva, 2014.

Fei M, Wu X, Xu Q. Astilbin inhibits contact hypersensitivity through negative cytokine regulation distinct from cyclosporin A. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(6):1350–6.

Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Lin P, McPhillips F, Wang Z, Li X, Wan Y, Kang S, Voorhees JJ. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*. *J Clin Invest* 1998;101:1432–40.

Forslind B, Lindberg M. (eds) Structure and function of the skin barrier: an introduction, U: Skin, hair, and nails: structure and function, New York: Marcel Dekker Inc., 2014:9–20.

Foster KW, Katiyar SK, Yusuf N, Elmetts CA. Inflammation after solar radiation, U: Giacomoni PU (ed). Biophysical and physiological effects of solar radiation on human skin-comprehensive series in photochemistry & photobiology, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007:25–65.

Fourneron JD, Faraud F, Fauneron A. Sur la mesure *in vitro* de la protection solaire de crèmes cosmétiques. *C R Acad Sci II*, Paris, 1999;2:421–7.

Garoli D, Pelizzo MG, Bernardini B, Nicolosi P, Alaibac M. Sunscreen tests: correspondence between *in vitro* data and values reported by the manufacture. *J Dermatol Sci* 2008;52(3):193–204.

Garoli D, Pelizzo MG, Nicolosi P, Peserico A, Tonin E, Alaibac M. Effectiveness of different substrate materials for *in vitro* sunscreen tests. *J Dermatol Sci* 2009;56(2):89–98.

Gartland LM. Heat islands: understanding and mitigating heat in urban areas, London: Earthscan, 2012.

- Gaspar LR, Campos PM. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. *Int J Pharm* 2007;343(1–2):181–9.
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109:S81–96.
- Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Gonzàles-Paramàs AM, Santos-Buelga C, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M. Photoprotective potential of strawberry (*Fragaria × ananassa*) extract against UVA irradiation damage on human fibroblasts. *J Agric Food Chem* 2012;60:2322–7.
- Gilaberte Y, González S. Update on photoprotection. *Actas Dermosifiliogr* 2010;101(8):659–72.
- Gilbert L, Loisel V, Savary G, Grisel M, Picard C. Stretching properties of xanthan, carob, modified guar and celluloses in cosmetic emulsions. *Carbohydr Polym* 2013;93:644–50.
- Gilbert L, Picard C, Savary G, Grisel M. Rheological and textural characterization of cosmetic emulsions containing natural and synthetic polymers:relationships between both data. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp* 2013;421:150–63.
- Ginn ME, Dunn S, Jungermann E. Contact angle studies on viable human skin:II. Effect of surfactant ionic type in pretreatment. *J Am Oil Chem Soc* 1970;47:83–5.
- Ginn ME, Noyes CM, Jungermann E. The contact angle of water on viable human skin. *J Colloid Interface Sci* 1986;26:146–51.
- Gonzalez S, Fernandez-Lorente M, Calzada Y. The latest on skin photoprotection. *Clin Dermatol* 2008;26:614–26.
- Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 1990;346:274–6.
- Gordon VC. Evaluation du facteur de protection solaire. *Parfum Cosmet Arom* 1993;112:62–5.
- Grant WB. Relation between prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D level and incidence of breast, colorectal, and other cancers. *J Photochem Photobiol B* 2010;101:130–6.

Greinert R, de Vries E, Erdmann F, Espina C, Auvinen A, Kesminiene A, Schüz J. European code against cancer 4th edition: ultraviolet radiation and cancer. *Cancer Epidemiology* 2015;39S:S75–S83.

Grether-Beck S, Timmer A, Felsner I, Brenden H, Brammertz D, Krutmann J. Ultraviolet A-induced signaling involves a ceramide-mediated autocrine loop leading to ceramide de novo synthesis. *J Invest Dermatol* 2005;125:545–53.

Haake A, Scott GA, Holbrook KA. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis, U: Freinkel RK, Woodley DT (eds). *The biology of the skin*, New York: The Parthenon Publishing Group Inc., 2001:19–47.

Hagens R, Mann T, Schreiner V, Barlag HG, Wenck H, Wittern KP, Mei W. Contact angle measurement - a reliable supportive method for screening water-resistance of ultraviolet-protecting products *in vivo*. *Int J Cosmet Sci* 2007;29:283–91.

Hall BJ, Hall JC. *Sauer's manual of skin diseases*, 10th ed, Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

Haraguchi H, Mochida Y, Sakai S, Amsuda H, Tamura Y, Mizutani M, Tanaka O, Chou WH. Protection against oxidative damage by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60:945–8.

Heinrich U, Tronnier H, Kockott D, Kuckuk R, Heise HM. Comparison of sun protection factors determined by an *in vivo* and different *in vitro* methodologies: a study with 58 different commercially available sunscreen products. *Int J Cosmet Sci* 2004;26(2):79–89.

Henning K. Security – Quality – Impact. *SÖFW-Journal* 2015;141(8):36–43.

Herzog B, Wehrle M, Quass K. Photostability of UV absorber systems in sunscreens. *Photochem Photobiol* 2009;85:869–78.

Hinrichs WLJ, Dreijer-van der Glas SM. Physical chemistry, U: Bouwman-Boer Y, Fenton-May V, Le Brun P. (eds). *Practical pharmaceuticals: an international guideline for the preparation, care and use of medicinal products*, Cham: Springer International Publishing Switzerland, 2015:357–83.

Humble MB. Vitamin D and mental disorders. *J Photochem Photobiol B* 2010;101:142–9.

IARC. A review of human carcinogens. (D). Solar and UV radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012;100:35–101.

Iwata H, Shimada K. Formulas, ingredients and production of cosmetics: technology of skin- and hair-care products in Japan, Tokyo: Springer Science & Business Media, 2012.

Jaksic A, Finlay-Jones JJ, Watson CJ, Spencer LK, Santucci I, Hart PH. *Cis*-urocanic acid synergizes with histamine for increased PGE2 production by pression. *Photochem Photobiol* 1995;61:303–9.

Jaksic I, Lukic M, Malenovic A, Reichl S, Hoffmann C, Müller-Goymann C, Daniels R, Savić 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(1):164–75.

Janjua N, Kongshoj B, Andersson A, Wulf H. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22:456–61.

Jeong CB, Han JY, Cho JC, Suh KD, Nam GW. Analysis of electrical property changes of skin by oil-in-water emulsion components. *Int J Cosmet Sci* 2013;35(4):402–10.

Jiang J, Mei Z, Xu J, Sun D. Effect of inorganic electrolytes on the formation and the stability of water-in-oil (W/O) emulsions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2013;429:82–90.

Junginger HE. Pharmaceutical emulsion and creams, U: Sjöblom J. (ed). Emulsions: a fundamental and practical approach, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992, 189–205. (reprint 2012).

Juzeniene A, Moan J. Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production. *Dermatoendocrinol* 2012;4(2):109–17.

Kam PC, See AU. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharma-cological role. *Anaesthesia* 2000;55:442–9.

Kampman MT, Steffensen LH. The role of vitamin D in multiple sclerosis. *J Photochem Photobiol B* 2010;101:137–41.

- Kaneko K, Walker SL, Lai-Cheong J, Matsui MS, Norval M, Young AR. *cis*-Urocanic acid enhances prostaglandin e₂ release and apoptotic cell death via reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2011;131:1262–71.
- Karsheva M, Georgieva S, Alexandrova S. Rheological behavior of sun protection compositions during formulation. *Korean J Chem Eng* 2012;29:1806–11.
- Kelechi E Nnoaham KE, Aileen Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2008;37:113–9.
- Kiehlmann E, Edmond PM. Isomerisation of dihydroquercetin. *J Nat Prod* 1995;58:450–5.
- Kilcast D, Clegg S. Sensory perception of creaminess and its relationship with food structure. *Food Qual Prefer* 2002;13:609–23.
- Kindernay J, Panak J, Mikula M. Rheoviscometry of offset inks and their emulsions with water. *Chem Pap* 2001;55:1–57 (2001).
- Koch F, Heufler C, Kampgen E, Schneeweiss D, Bock G, Schuler G. Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhas cells in culture but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor without inducing their functional maturation. *J Exp Med* 1990;171:159–71.
- Kondo S, Kono T, Sauder DN, McKenzie RC. IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. *J Invest Dermatol* 1993;101:690–4.
- Korać RR, Khambholja KM. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacogn Rev* 2011;5(10):164–73.
- Krakowski AC, Kaplan LA. Exposure to radiation from the sun, U: Auerbach PS (ed). *Wilderness medicine: expert consult premium edition - enhanced online features*, Philadelphia: Elsevier Inc., 2012.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991;266: 12866–72.

- Kumar R, Parsad D. Melanocyte, U: Lahiri K, Chatterjee M, Sarkar R. (eds) Pigmentary disorders: a comprehensive compendium, New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publisher (P) Ltd., 2014:13–22.
- Kundu P, Agrawal A, Mateen H, Mishra I.M. Stability of oil-in-water macroemulsion with anionic surfactant: effect of electrolytes and temperature. *Chem Eng Sci* 2013;102:176–85.
- Kurth EF, Chan FL. Dihydroquercetin as an antioxidant. *J Am Oil Chem Soc* 1951;28:433–6.
- Lapidot N, Gans O, Biagini F, Sosonkin L, Rottman C. Advanced sunscreens: UV absorbers encapsulated in sol-gel glass microcapsules. *JSST* 2003;26:67–72.
- Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1586–91.
- Larrick JW, Morhenn V, Chiang YL, Shi T. Activated Langerhans cells release tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol* 1989;45:429–33.
- Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 1989;243:1464–6.
- Leitlinien für die Bewertung der Wirksamkeit von kosmetischen Mitteln, Hrsg. IKW. (Industrieverband für Körperpflege und Waschmittel). Frankfurt/Main, 2001.
- Lewis T. The blood vessels of the human skin and their responses, London: Shaw & Sons, 1927.
- Ley RD, Reeve VE, Kusewitt DF. Photobiology of *Monodelphis domestica*. *Dev Comp Immunol* 2000;24:503–16.
- Lin J, Tournas J, Burch J, Monteiro-Riviere N, Zielinski J. Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2008;24:61–6.

Lin SW, Wheeler DC, Park Y, Spriggs M, Hollenbeck AR, Freedman DM, Abnet CC. Prospective study of ultraviolet radiation exposure and mortality risk in the United States. *Am J Epidemiol* 2013;178:521–33.

Littorin B, Blom P, Schölin A, Arnqvist HJ, Blohmé G, Bolinder J, Ekbom-Schnell A, Eriksson JW, Gudbjörnsdóttir S, Nyström L, Östman J, Sundkvist G. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia* 2006;49:2847–52.

Lorencinia M, Brohem CA, Dieamanta GC, Zanchinb NIT, Maibach HI. Active ingredients against human epidermal aging. *Ageing Research Reviews* 2014;15:100–15.

Luger TA, Schwarz T. Effects of UV light on cytokines and neurendocrine hormones. U: Krutmann J, Elmets CA. (eds.). *Photoimmunology*, Cambridge: Blackwell Science Ltd, 1995.

Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Dokic L, Savic S. Effect of small change in oil phase composition on rheological and textural properties of w/o emulsion. *J Texture Stud* 2013;44:34–44.

Lukić M. Formulaciona istraživanja dermokozmetičkih emulzija za vlaženje kože: koncept uporedne reološke, teksturne i senzorne procene. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu. 2014.

Lutz D, Miksa S, Timplamai B. *In Vitro/In Vivo SPF*, a substitution for ethical reasons or a real evolution of the pertinence of the test? *SÖFW-Journal* 2015;141(7);20–4.

Maalouf S, El-Sabban M, Darwiche N, Gali-Muhtasib H. Protective effect of vitamin E on ultraviolet B light-induced damage in keratinocytes. *Mol Carcinog* 2002;34:121–30.

Magcwebeba T, Riedel S, Swanevelder S, Bouic P, Swart P, Gelderblom W. Interleukin-1 α induction in human keratinocytes (HaCaT): an *in vitro* model for chemoprevention in skin. *J Skin Cancer* 2012;2012.

Magnoni C, Euclidi E, Benassi L, Bertazzoni G, Cossarizza A, Seidenari S, Giannetti A. Ultraviolet B radiation induces activation of neutral and acidic sphingomyelinases and

ceramide generation in cultured normal human keratinocytes. *Toxicol In vitro* 2002;16:349–55.

Mahmoud BH, Hexsel CL, Hamzavi IH, Lim HW. Effects of visible light on skin. *Photochem Photobiol* 2008;84:450–62.

Mansur JS, Breder MNR, Mansur MCA, Azulay RD. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An Bras Dermatol* 1986;61:121–4.

Mantena SK, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappa B signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Rad Biol Med* 2006;40:1603–14.

Marathe GK, Johnson C, Billings SD, Southall MD, Pei Y, Spandau D, Murphy RC, Zimmerman GA, McIntyre TM, Travers JB. Ultraviolet B radiation generates platelet-activating factor-like phospholipids underlying cutaneous damage. *J Biol Chem* 2005;280:35448–57.

Marrot L, Meunier JR. Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:S139–S148.

Marsh-Wakefield F, Byrne SN. Photoimmunology and multiple sclerosis, U: La Flamme AC, Orian JM (eds). Emerging and evolving topics in multiple sclerosis pathogenesis and treatments, Cham: Springer, 2015:117–43.

Martínez-Flórez SG-GJ, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 2002;17:271–8.

Masmoudi H, Piccerelle P, Dréau Y, Kister J. A rheological method to evaluate the physical stability of highly viscous pharmaceutical oil-in-water emulsions. *Pharm Res* 2006;23:1937–47.

Matas AJ, Sanz MJ, Heredia A. Studies on the structure of the plant wax nonacosan-10-ol, the main component of epicuticular wax conifers. *Int J Biol Macromol* 2003;33:31–5.

Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin, *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;195:298–308.

- Matts PJ, Alard V, Brown MW, Ferrero L, Gers-Barlag H, Issachar N, Moyar D, Wolber R. The COLIPA *in vitro* UVA method: a standard and reproducible measure of sunscreen UVA protection. *Int J Cosmet Sci* 2010;32(1):35–46.
- Mayumi N, Watanabe E, Norose Y, Watari E, Kawana S, Geijtenbeek TB, Takahashi H. E-cadherin interactions are required for Langerhans cell differentiation. *Eur J Immunol* 2013;43(1):270–80.
- Mead MN. Benefits of sunlight: a bright spot for human health. *Environ Health Perspect* 2008;116(4):pA160–A167.
- Medina-Torres L, Calderas F, Sanchez-Olivares G, Nuñez-Ramirez DM. Rheology of sodium polyacrylate as an emulsifier employed in cosmetic emulsions. *Ind Eng Chem Res* 2014;53:18346–51.
- Mehling A, Kleber M, Hensen H. Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. *Food Chem Toxicol* 2007;45:747–58.
- Meyer J, Allef P, Fötsch H. A novel PEG-free emulsifier designed for formulating w/o lotions with a light skin feel. *SÖFW-Journal* 2005;131(11):20–6.
- Midander K, Pan J, Wallinder IO, Heim K, Leygraf C. Nickel release from nickel particles in artificial sweat. *Contact Dermatitis* 2007;56:325–30.
- Moatter T, Gerritsen ME. Fibroblast growth factor upregulates PGG/H synthase in rabbit microvascular endothelial cells by a glucocorticoid independent mechanism. *J Cell Physiol* 1992;151:571–8.
- Moravkova T, Filip P. The influence of emulsifier on rheological and sensory properties of cosmetic lotions. *Adv Mater Sci Eng* 2013;2013:7.
- Morison WL, Paul BS, Parrish JA. The effects of indomethacin on long-wave ultraviolet-induced delayed erythema. *J Invest Dermatol* 1977;68:130–3.
- Moyal D, Fourtanier A. Broad-spectrum sunscreens provide better protection from solar ultraviolet-simulated radiation and natural sunlight-induced immunosuppression in human beings. *J Am Acad Dermatol* 2008;58(5 Suppl 2):S149–54.

Murakami M, Masuda S, Kudo I. Arachidonate release and prostaglandin production by group IVC phospholipase A2 (cytosolic phospholipase A2gamma). *Biochem J* 2003;372:695–702.

National Industrial Chemicals Notification And Assessment Scheme (NICNAS). Dehymuls PGPH. Full Public Report, PLC/96, 2000.

National Industrial Chemicals Notification And Assessment Scheme (NICNAS). Chemical in Plantapon LGC, Full Public Report, File No: STD/1186, July 10, 2006.

Neale R, Williams G, Green A. Application patterns among participants randomized to daily sunscreen use in a skin cancer prevention trial. *Arch Dermatol* 2002;138:1319–25.

Newton-Bishop JA, Chang Y-M, Elliott F, Chan M, Leake S, Karpavicius B, Haynes S, Fitzgibbon E, Kukulizch K, Randerson-Moor J, Elder DE, Bishop DT, Barrett JH. Relationship between sun exposure and melanoma risk for tumours in different body sites in a large case-control study in a temperate climate. *Eur J Cancer* 2011;47(5):732–41.

Nielloud F, Marti-Mestres G. Pharmaceutical emulsions and suspensions: second edition, revised and expanded, New York: Marcel Dekker, 2000.

Nifant'ev EE, Koroteev MP, Kaziev GZ, Uminskii AA, Grachev AA, Men'shov VM, Tsvetkov YE, Nifant'ev NE, Bel'skii VK, Stash AI. On the problem of identification of the dihydroquercetin flavonoid. *Russ J Gen Chem* 2006;76:161–3.

Niizeki H, Inoko H, Wayne Streilein J. Polymorphisms in the TNF region confer susceptibility to UVB-induced impairment of contact hypersensitivity induction in mice and humans. *Methods* 2002;28:46–54.

Noonan FP, Kripke ML, Pedersen GM, Greene MI. Suppression of contact hypersensitivity in mice by ultraviolet irradiation is associated with defective antigen presentation. *Immunology* 1981;43:527–33.

O'Banion MK, Miller JC, Chang JW, Kaplan MD, Coleman PD. Interleukin-1 beta induces prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) in primary murine astrocyte cultures. *J Neurochem* 1996;66:2532–40.

Office of The Federal Register EILLC. Title 21 Food and Drugs Parts 300 to 499 (Revised as of April 1, 2014): 21-CFR-Vol-5: U.S. Government Printing Office; 2014.

Oi N, Chen H, Ok Kim M, Lubet RA, Bode AM, Dong Z. Taxifolin suppresses UV-induced skin carcinogenesis by targeting EGFR and PI3K. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012;5(9):1103–14.

Oldenhove de Guertechin L. Surfactants: classification, U: Barel AO, Paye M, Maibach HI (eds). *Handbook of cosmetic science and technology*, 3th ed, New York: Informa Healthcare USA, 2009:769–86.

Oresajo C, Yatskayer M, Galdi A, Peter Foltis P, Pillai S. Complementary effects of antioxidants and sunscreens in reducing UV-induced skin damage as demonstrated by skin biomarker expression. *J Cosmet Laser Ther* 2010;12:157–62.

Osawa M. Melanocyte stem cells, U: StemBook [Internet], Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27077/>

Osterwalder U, Jung K, Seifert M, Herrling T. Importance of UVA sun protection: a comparative analysis of different quality control methods. *SOFW-Journal* 2009;135(9):2–13.

O'Sullivan MG, Huggins Jr EM, Meade EA, DeWitt DL, McCall CE. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 in alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1123–7.

Otto A, du Plessis J, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci* 2009;31:1–19.

Owen DF, Poy E, Woodward DF, Daniel D. Evaluation of the role of histamine H1- and H2-receptors in cutaneous inflammation in the guinea-pig produced by histamine and mast cell degranulation. *Br J Pharmacol* 1980;69:615–23.

Oxholm A, Oxholm P, Staberg B, Bendtzen K. Immunohistological detection of interleukin I-like molecules and tumour necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation *in vivo*. *Br J Dermatol* 1988;118:369–76.

Pal R. Rheology of simple and multiple emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2011;16:41–60.

Panyushin S, Sakharov B, Chubatova S, Bolshakova O. Sun defensive and anti-radical properties of plant biological actives. *Cosmetic & Medicine* 1999(5–6):56–61.

Pareek TK. Impact of ultraviolet radiation (UVR) exposure on skin cancer: an emphasis on pediatric and adolescent young adult (AYA) population, Public Health Management & Policy. Term paper-MPHP-429, 2014. (Dostupno na: <http://www.cwru.edu/med/epidbio/mphp439>).

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;56:175–82.

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(1):141–50.

Parsad D, Kanwar AJ, Kumar B. Psoralen-ultraviolet A vs. narrow-band ultraviolet B phototherapy for the treatment of vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006; 20:175–7.

Patil VV, Patil SB, Kondawar MS, Naikwade NS, Magdum CS. Study of methanolic extract of flower of *Spathodea campanulata* L. as an antisolar. *Int J Green Pharm* 2009;3:248–9.

Paunel AN, Dejam A, Thelen S, Kirsch M, Horstjann M, Gharini P, Murtz M, Kelm M, de Groot H, Kolb-Bachofen V, Suschek CV. Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization molecular sources and mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2005;38:606–15.

Pernet I, Sagot V, Schmitt D, Viac J. UVA1 and UVB radiation but not PGE2 stimulate IL-8 release in normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1999;291:527–9.

Peryam DR. Field testing of armed forces rations, U: Peryam DR, Pilgrim FJ, Peterson MS (eds). Food acceptance testing methodology, Chicago: Advisory Board on Quartermaster Research and Development, Committee on Foods; and Natl. Acad. Sci., Natl. Research Council, 1954:75–85.

Pew JC. A flavonone from Douglas-fir heartwood. *J Am Chem Soc* 1948;70:3031.

Philippov SV, Bogorodov IM. Method of using wood extracts in cosmetic and hygiene products. US 20130295036 A1; 2013.

Pian V, Beuche M, Jackwerth B (Cognis). Customer Information, Cosmedia®SP, High Sensorial Precision. *Information Cosmetic*, No.VI/02 Skin Care, August 2002.

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

Pinnagoda J, Tupkek RA, Agner T, Serup J. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. *Contact Dermatitis* 1990;22(3):164–78.

Pinnell S. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:1–19.

Pissavini M, Ferrero L, Alaro V, Heinrich U, Tronnier H, Kockott D, Lutz D, Tournier V, Zambonin M, Meloni M. Determination of the *in vitro* SPF. *Cosmet Toiletries* 2003;118(10):63–72.

Ponsonby AL, McMichael A, van der Mei I. Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research. *Toxicology* 2002;181–182:71–8.

Prasad R, Katiyar SK. Prostaglandin E2 promotes UV radiation–induced immune suppression through DNA hypermethylation. *Neoplasia* 2013;15(7):795–804.

Prieto C, Calvo L. Performance of the biocompatible surfactant Tween 80, for the formation of microemulsions suitable for new pharmaceutical processing. *J Appl Chem*.2013;2013:10.

Radaeva IA, Shulkina SM, Kalugin VV. Development of a perspective trend for the production of parapharmaceutical products with dihydroquercetin. Proceedings from the International Conference, Scientific and Practical Aspects in the Improvement of Quality of Products for Children and Gero-Dietetic Nutrition, Moscow: the Russian Federation. 1997;207–13.

Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast) (Text with EEA relevance), OJEU, L 342/59, 2009.

Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27th January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients - taxifolin from dahurian larch - application for the approval as novel food.

- Reichrath J. Dermatologic management, sun avoidance and vitamin D status in organ transplant recipients (OTR). *J Photochem Photobiol B* 2010;101:150–9.
- Rieger MM. Stability testing of macroemulsions. *Cosmet Toiletries* 1991;106:59–67.
- Rittie L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 2002;1:705–20.
- Rogiers V, Pauwels M. Safety assessment of cosmetics in Europe, Basel: Karger, 2008.
- Rogozhin VV, Peretolchin DV. Kinetic regulation of dihydroquercetin oxidation with horseradish peroxide. *Russ J Bioorg Chem* 2009;35:576–80.
- Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002;40:158–68.
- Romanhole RC, Ataide JA, Moriel P, Mazzola PG. Update on ultraviolet A and B radiation generated by the sun and artificial lamps and their effects on skin. *Int J Cosmet Sci* 2015;37:366–70.
- Ross J, Kasum C. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002;22:19–34.
- Russo PA, Halliday GM. Inhibition of nitric oxide and reactive oxygen species production improves the ability of a sunscreen to protect from sunburn, immunosuppression and photocarcinogenesis. *Br J Dermatol* 2006;155:408–15.
- Sachdeva MK, Katyal T. Abatement of detrimental effects of photoaging by *Prunus amygdalus* skin extract. *Int J Curr Pharm Res* 2011;3:57–9.
- Saewan N, Jimtaisong A. Natural products as photoprotection. *J Cosmet Dermatol* 2015;14:47–63.
- Salah N, Miller J, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chainbreaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 1995;322:339–46.
- Saliou C, Kitazawa M, McLaughlin L, Yang JP, Lodge JK, Tetsuka T, Iwasaki K, Cillard J, Okamoto T, Packer L. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced

NF-kappa B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radic Biol Med* 1999;26:174–83.

Saliou C, Rimbach G, Moini H, McLaughlin L, Hosseini S, Lee J, Watson RR, Packer L. Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-B-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract. *Free Radic Biol Med* 2001;30:154–60.

Salvador A, Chisvert A. Analysis of cosmetic products, Amsterdam: Elsevier Science; 2011.

Saraf S, Chhabra SK, Kaur CD, Saraf S. Development of photochemoprotective herbs containing cosmetic formulations for improving skin properties. *J Cosmet Sci* 2012;63:119–31.

Sauder DN. Biologic properties of epidermal cell thymocyte-activating factor (ETAF). *J Invest Dermatol* 1985;85:176s-9s.

Savic S, Lukic M, Jaksic I, Reichl S, Tamburic S, Müller-Goymann C. An alkylpolyglucoside mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: the influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. *J Colloid Interface Sci* 2011;358:182–91.

Sayre RM, Agin PP, Levee GJ, Marlowe E. A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas. *Photochem Photobiol* 1979;29(3):559–66.

Schauss AG, Tselyico SS, Kuznetsova VA, Yegorova I. Toxicological and Genotoxicity Assessment of a dihydroquercetin-rich Dahurian Larch tree (*Larix gmelinii* Rupr) extract (Lavitol). *Int J Toxicol* 2015;34(2):162–81.

Schliemann S, Petri M, Elsner P. Preventing irritant contact dermatitis with protective creams: influence of the application dose. *Contact Dermatitis* 2013;70:19–26.

Schmitt A, Hauser C, Jaunin F, Dayer JM, Saurat JH. Normal epidermis contains high amounts of natural tissue IL-1 biochemical analysis by HPLC identifies a MW approximately 17 kD form with a PI 5.7 and a MW approximately 30 kD form. *Lymphokine Res* 1986;5:105–18.

Schramm LL. Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and applications, Weinheim:Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006:155–201.

Schwarz A, Bhardwaj R, Aragane Y, Mahnke K, Riemann H, Metze D, Luger TA, Schwarz T. Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. *J Invest Dermatol* 1995;104:922–7.

Seité S, Christiaens F, Bredoux C, Compan D, Zucchi H, Lombard D, Fourtanier A, Young AR. A broad-spectrum sunscreen prevents cumulative damage from repeated exposure to suberythemal solar ultraviolet radiation representative of temperate latitudes. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24:219–22.

Seneschal J, Clark RA, Gehad A, Baecher-Allan CM, Kupper TS. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity* 2012;36(5):873–84.

Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure–activity scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* 2006;67:2058–70.

Shinoda S, Kameyoshi Y, Hide M, Morita E, Yamamoto S. Histamine enhances UVB-induced IL-6 production by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1998;290:429–34.

Sies H, Stahl W. Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu Rev Nutr* 2004;24:173–200.

Sime S, Reeve V. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol. *Photochem Photobiol* 2004;79:193–8.

Sleijffers A, Yucesoy B, Kashon M, Garssen J, DeGrujil FR, Boland GJ, VanHattum J, Luster MI, VanLoveren H. Cytokine polymorphisms play a role in susceptibility to ultraviolet B-induced modulation of immune responses after hepatitis B vaccination. *J Immunol* 2003;170:3423–8.

Slimestad R, Fossen T, Vagen IM. Onions: a source of unique dietary flavonoids. *J Agric Food Chem* 2007;55:10067–80.

- Sobolewski PS, Krzyścin JW, Jarosławski J, Wink J, Lesiak A, Narbutt J. Controlling adverse and beneficial effects of solar UV radiation by wearing suitable clothes – Spectral transmission of different kinds of fabrics. *J Photochem Photobiol B* 2014;140:105–10.
- Sorns J, Kawa R, Eichhorn S, Urban A. Oil-in-water emulsions based on special emulsifiers. WO 2007059888 A2;2007.
- Sprincsteen C, Yurek R, Frazier M, Carr KF. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Anal Chim Acta* 1999;380(2-3):155–64.
- Springbett P, Buglass S, Young AR. Photoprotection and vitamin D status. *J Photochem Photobiol B* 2010;101:160–8.
- Stalder AF, Kulik G, Sage D, Barbieri L, Hoffmann P. A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp* 2006;286:92–103.
- Stalder AF, Melchior T, Müller M, Sage D, Blu T, Unser M. Low-bond axisymmetric drop shape analysis for surface tension and contact angle measurements of sessile drops. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp* 2010;364:72–81.
- Standard EN ISO 24444:2010 Cosmetics - Sun protection test methods - *In vivo* determination of the sun protection factor (SPF), 2010.
- Stokes RP, Diffey BL. A novel *ex vivo* technique to assess the sand/rub resistance of sunscreen products. *Int J Cosmet Sci* 2000;22:329–34.
- Svobodová A, Rambousková J, Walterová D, Vostalová J. Bilberry extract reduces UVA-induced oxidative stress in HaCaT keratinocytes: a pilot study. *BioFactors* 2008;33:249–66.
- Tadros T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Adv Colloid Interface Sci* 2004;108–109:227–58.
- Tadros T. Emulsion formation and stability, Weinheim: John Wiley & Sons, 2013.
- Taylor H. Instruments for measuring skin toxicity, U: Chilcott R, Price S. (eds). Principles and practice of skin toxicology, Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2008: 201–20.

Teskin IuO, Zhambalova BA, Babenkova IV, Tiukavkina NA. Antioxidant properties of dihydroquercetin. *Biofizika* 1996;41:620–4.

Thermal Analysis UserCom 11, A. Mettler Toledo GmbH, 2000 Dostupno na: <http://us.mt.com/us/en/home/supportivecontent/usercom.2.html>

Thompson S, Jolley D, Marks R. Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *N Engl J Med* 1993;329:1147–51.

Tong X, Van Dross R, Abu-Yousif A, Morrison A, Pelling J. Apigenin prevents UV-B-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition. *Mol Cell Biol* 2007;27:283–96.

Toskić-Radojčić MD, Pavlović MD, Kovačević A, Milosavljević I. Recrystallization in different sunscreen formulations after cutaneous application. *J Cosmet Dermatol* 2004;3(3):126–30.

Tundis R, Loizzo MR, Bonesi M, Menichini F. Potential role of natural compounds against skin aging. *Curr Med Chem* 2015;22:1515–38.

Tyukavkina NA, Lapteva KI, Latina VA, Devyatko NG. Extractive substances of *Larix Dahurica*. II. Quantitative contents of quercetin and dihydroquercetin. *Khimya Prirodnykh Soedinenii* 1967;3(5):298–301.

Van der Pols J, Williams G, Pandeya N, Logan V, Green A. Prolonged prevention of squamous cell carcinoma of the skin by regular sunscreen use. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2546–8.

Velasco MVR, Balogh TS, Pedriali CA, Sarruf FD, Pinto CASO, Kaneko TM, Baby AR. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) – revisão. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2011;32(1):27–34.

Venditti E, Spadoni T, Tiano L, Astolfi P, Greci L, Littarru GP, Damiani E. *In vitro* photostability and photoprotection studies of a novel ‘multi-active’ UV-absorber. *Free Radic Biol Med* 2008;45:345–54.

Vile GF, Tanew-Ilitschew A, Tyrrell RM. Activation of NF-kappa B in human skin fibroblasts by the oxidative stress generated by UVA radiation. *Photochem Photobiol* 1995;62:463–8.

- Villalobos-Hernández J., Müller-Goymann C. *In vitro* erythematous UV-A protection factors of inorganic sunscreens distributed in aqueous media using carnauba wax-decyl oleate nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;65:122–5.
- Vroman I, Tighzert L. Biodegradable Polymers. *Materials* 2009;2:307–44.
- Vuleta G, Milić J, Primorac M, Savić S. Farmaceutska tehnologija I, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Beograd; 2012.
- Vuong K, McGeechan K, Armstrong BK; AMFS Investigators; GEM Investigators, Cust AE. Occupational sun exposure and risk of melanoma according to anatomical site. *Int J Cancer* 2014;134(11):2735–41.
- Wallace SN, Carrier DJ, Clausen EC. Batch solvent extraction of flavonolignans from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertner). *Phytochem Anal* 2007;16:7–16.
- Walters C, Keeney A, Wigal CT, Johnstom CR, Cornelius RD. The spectrophotometric analysis and modeling of sunscreens. *J Chem Educ* 1997;74:99–102.
- Walters KA. (ed). Dermatological and transdermal formulations, Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2002.
- Weber F, Schmuth M, Sepp N, Fritsch P. Bath-water PUVA therapy with 8-methoxypsoralen in mycosis fungoides. *Acta Derm Venereol* 2005;85:329–32.
- Weber MB, Ponzio HA, Costa FB, Camini L. Eritema ab igne: relato de um caso. *An Bras Dermatol* 2005;80:187–8.
- Wei H, Saladi R, Lu Y, Wang Y, Palep SR, Moore J, Phelps R, Shyong E, Lebwohl MG. Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. *J Nutr* 2003;133(Suppl 1):3811S–9S.
- Weidmann AE. Dihydroquercetin: more than just an impurity?. *Eur J Pharmacol* 2012;684:19–26.
- Weller R, Hunter H, Mann MW. The function and structure of the skin, U: Clinical Dermatology, 5th ed, Oxford: John Wiley & Sons, 2015:7–30.

- Widyarini S, Spinks N, Husband A, Reeve V. Isoflavonoid compounds from red clover (*Trifolium pratense*) protect from inflammation and immune suppression induced by UV radiation. *Photochem Photobiol* 2001;74:465–70.
- Widyarini S. Protective effect of the isoflavone equol against DNA damage induced by ultraviolet radiation to hairless mouse skin. *J Vet Sci* 2006;7:217–23.
- Wilgus TA, Parrett ML, Ross MS, Tober KL, Robertson FM, Oberyshyn TM. Inhibition of ultraviolet light B-induced cutaneous inflammation by a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Adv Exp Med Biol* 2002;507:85–92.
- Wilgus TA, Ross MS, Parrett ML, Oberyshyn TM. Topical application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000;62:367–84.
- Williams A. Structure and function of human skin, U: Transdermal and topical drug delivery from theory to clinical practice, London: Pharmaceutical Press, 2003:1–13.
- Wlaschek M, Heinen G, Poswig A, Schwarz A, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K. UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/ MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem Photobiol* 1994;59:550–6.
- Wrightb F, Weller RB. Risks and benefits of UV radiation in older people: more of a friend than a foe? *Maturitas* 2015;81:425–31.
- Xia J, Song X, Bi Z, Chu W, Wan Y. UV-induced NF-kappa B activation and expression of IL-6 is attenuated by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes *in vitro*. *Int J Mol Med* 2005;16:943–50.
- Yones SS, Palmer RA, Garibaldinos TT, Hawk JL. Randomized double-blind trial of the treatment of chronic plaque psoriasis: efficacy of psoralen-UV-A therapy vs. narrowband UV-B therapy. *Arch Dermatol* 2006;142:836–42.
- Yuan Y, Lee TR. Contact angle, wetting properties, U: G. Bracco, B. Holst (Eds.), Surface science techniques, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013:3–34.
- Yusuf N, Irby C, Katiyar S, Elmetts CA. Photoprotective effects of green tea polyphenols. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007;23:48–56.

Zhang W, Liu L. Study on the formation and properties of liquid crystal emulsion in cosmetic. *JCDSA* 2013;3(2):139–44.

Zillich OV, Schweiggert-Weisz U, Eisner P, Kersch M. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int J Cosmet Sci* 2015;37:455–64.

Zittermann A, J.F. Gummert JF. Sun, vitamin D, and cardiovascular disease. *J Photochem Photobiol B* 2010;101:124–9.

7. PRILOZI

7.1. Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Rad objavljen u istaknutom međunarodnom časopisu – M22

Korać R, Krajišnik D, Savić S, Pantelić I, Jovančić P, Cekić N, Milić J. A new class of emulsion systems – Fast inverted o/w emulsions: Formulation approach, physical stability and colloidal structure. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2014;461:267-278. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.08.005

Rad objavljen u međunarodnom časopisu – M23

Korać R, Krajišnik D, Milić J. Sensory and instrumental characterization of fast inverting oil-in water emulsions for cosmetic application. *International Journal of Cosmetic Science* 2016;38:246–256. doi: 10.1111/ics.12282

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini – M33

Korać R, Krajišnik D, Jakšić I, Milić J. *SWOP* emulsion – the influence of the formulation factors on physico-chemical properties. Second Congress of Pharmacists of Bosnia and Herzegovina with International Participation. Banja Luka; 2011; Book of abstracts, 262–264.

Korać R, Krajišnik D, Janićijević J, Milić J. The influence of various testing conditions on rheological properties of *SWOP* emulsion. 10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Portorož, Slovenia, 2014.

Korać R, Krajišnik D, Dragičević-Ćurić N, Milić J. Setting a correlation between sensory and rheological properties of *SWOP* emulsion. 23. IFSCC Conference Zurich 2015 Swiss Society of Cosmetic Chemists 2015, Zürich, Switzerland; 2015.

Saopštenje sa međunarodnog skupa, štampano u izvodu – M34

Korać R, Krajišnik D, Vuleta G, Milić J. Evaluation of *SWOP* emulsion: rheological and contact angle measurements view point. Skin and Formulation 4th Symposium, APGI. Lyon, France; 2012: Book of abstracts, N° 010.

Korać R, Krajišnik D, Savić S, Pantelić I, Milić J. *SWOP* and conventional u/v emulsion: comparison of physicochemical properties and stability. 3rd Conference Innovation in Drug Delivery. Pisa, Italy, 2013: Book of abstracts, 109.

Korać R, Krajišnik D, Radulović V, Milić J. Accelerated stability testing of *SWOP* emulsions. CESIO 2013. 9th World Surfactant Congress, Barcelona, Spain, 2013.

Korać R, Krajišnik D, Todosijević M, Milić J. Sun protection factor of dihydroquercetin in *SWOP* emulsions - *in vitro* determination. Skin Forum 14th Annual Meeting, Prague, Czech Republic, 2014.

Korać R, Krajišnik D, Čolović J, Malenović A, Čalija B, Milić J. An investigation of dihydroquercetin stability in fast inverted oil-in-water emulsion by *RP-HPLC* method. The Second Congress of Pharmacists of Montenegro with International Participation. Bečići, Montenegro; 2015.

7.2. Biografija autora

Radava Martić rođena je 1983. godine u Užicu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Požegi. Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je školske 2002/2003. godine, a diplomirala je 07. marta 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,19 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Doktorske akademske studije studijski program (modul) Kozmetologija na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisala je 2008/2009. godine.

Od 2008.-2011. godine bila je povremeno zaposlena kao saradnik u izvođenju praktične nastave na predmetu Farmaceutska tehnologija sa biofarmacijom i Farmaceutska tehnologija I na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu. U toku 2009/2010. godine obavlja stručni staž u apoteci „1. maj“ u Beogradu, nakon čega polaže struči ispit. Od 2012. godine radi kao stručni saradnik u Istraživačko-razvojnom centru Beohemija poslovnog sistema u Beogradu.

Stipendista je Fonda za mlade talente Ministarstva omladine i sporta Republike Srbije za 2006/2007. godinu.

Bila je učesnik Internacionalne letnje škole za nauku i inženjering (IPL Graduate School of Engineering (ITECH Lion), France) 2007. godine organizovane u Lionu, Francuska (u periodu od 6. juna do 6. jula) gde je radila na naučnom projektu „Sun protection creams-changes in stabilization depend on changes in formulation“.

Učestvovala je 2008. godine u razmeni studenata koju organizuje Internacionalna federacija studenata farmacije (Exchange Programme of International Pharmacy Students' Federation) gde je u periodu od 15. juna do 18. avgusta 2008. radila na Shree S.K. Patel College of Pharmaceutical Education & Research, Univerzitet Ganpat (Mehsana, Gudžarat, Indija) na ekstrakciji flavonoida iz cveta biljke Butea monosperma i proceni ukupnog sadržaja fenola u ekstraktu korišćenjem Folin-Ciocalteu metode.

7.3. Izjava o autorstvu

Potpisana: Radava Martić

Broj indeksa: 28/08

Izjavljujem

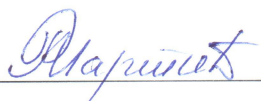
da je doktorska disertacija pod naslovom

Emulzije ulje u vodi koje podležu brzom inverziji faza na koži: stabilnost, koloidna struktura i primena kao nosača fotoprotektivnih supstanci

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskom programu drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 25.04.2016.

Potpis doktoranda



7.4. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora: Radava Martić
Broj indeksa: 28/08
Studijski program: Doktorske akademske studije iz Kozmetologije
Naslov rada: Emulzije ulje u vodi koje podležu brznoj inverziji faza na koži: stabilnost, koloidna struktura i primena kao nosača fotoprotektivnih supstanci
Mentor: prof. dr Jela Milić

Potpisana: Radava Martić

Izjavljujem da je štampana verzija mog dokorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portal **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktor 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.

U Beogradu, 25.04.2016.

Potpis doktoranda



7.5. Izjava o korišćenju

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

Emulzije ulje u vodi koje podležu brznoj inverziji faza na koži: stabilnost, koloidna struktura i primena kao nosača fotoprotektivnih supstanci

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala 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 odlučila.

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

U Beogradu, 25.04.2016.

Potpis doktoranda

