

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, održanoj 24.03.2016. godine imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata diplomiranog farmaceuta Radave Martić (rođene Korać), pod naslovom:

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

Komisija u sastavu:

- 1. Dr Jela Milić**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor i predsednik komisije
- 2. Dr Danina Krajišnik**, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 3. Dr Snežana Savić**, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 4. Dr Gordana Vuleta**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 5. Dr Nebojša Cekić**, vanredni profesor, Univerzitet u Nišu – Tehnološki fakultet, Leskovac.

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija kandidata diplomiranog farmaceuta Radave Martić pod nazivom: „**Emulzije ulje u vodi koje podležu brzom inverziji faza na koži: stabilnost, koloidna struktura i primena kao nosača fotoprotektivnih supstanci**”, napisana je na 185 strana i sadrži sedam poglavlja: Uvod, Cilj istraživanja, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura i Prilozi. Na početku disertacije priložen je rezime na srpskom i engleskom jeziku.

Doktorska disertacija napisana je jasnim i preglednim stilom i sadrži 53 grafička prikaza (12 u opštem delu, 4 u eksperimentalnom delu i 37 u rezultatima i diskusiji), 26 tabela (3 u opštem delu, 7 u eksperimentalnom delu i 16 u rezultatima i diskusiji) i 300 literaturnih navoda koji se tiču razmatrane problematike.

UVODNI DEO obuhvata tri odeljka: *Emulzije kao kozmetički vehikulumi/nosači kozmetički aktivnih supstanci; Sunčevo (solarno) zračenje; Ispitivanje kozmetičkih proizvoda.* Svaki odeljak sadrži informacije koje su od značaja za predmet proučavanja doktorske disertacije. U *prvom odeljku*, izdvojene su najznačajnije informacije o emulzijama kao nosačima kozmetički aktivnih supstanci. U okviru ovog odeljka navedene su najznačajnije osobine različitih tipova „klasičnih“ emulzija, njihove prednosti i nedostaci kao i emulgatori koji se najčešće koriste za njihovu izradu. U ovom delu navedeni su i poznati literaturni podaci o novoj klasi emulzija tipa ulje-u-vodi (u/v) poznatih kao *SWOP* (engl. *SWitch Oil Phase*) emulzije, koje su tema ove disertacije, o njihovom sastavu i karakteristikama bitnim za njihov nastanak, kao i metodama koje se mogu koristiti za karakterizaciju ovih emulzija. Ove emulzije tipa u/v specifične su po brzom inverziji faza koja se odvija na koži prilikom njihove primene, a tehnologija izrade ovih emulzija zaštićena je patentom. Dostupna literatura i patent ne daju podatke o koloidnoj strukturi ovih emulzija, niti daju objašnjenje mehanizma inverzije faza, što kandidat prepoznaje interesantnim za dalje ispitivanje, čemu je posvećena ova doktorska disertacija.

U *drugom odeljku* navedene su informacije o solarnom zračenju, njegovim negativnim i pozitivnim efektima koje ostvaruje u koži, kao i pojedinim strukturama kože i elementima u njima koji se direktno ili indirektno aktiviraju prilikom delovanja UV (engl. *ultraviolet*) zraka. Posebno je istaknut potencijal kozmetički aktivnih supstanci biljnog porekla sa fotoprotektivnim efektom, pre svega iz grupe polifenola (flavonoida). Za kvercetin i rutin postoje brojni literaturni podaci o njihovom antioksidativnom i fotoprotektivnom delovanju. Dihidrokvercetin (taksifolin) koji je prema hemijskoj strukturi sličan kvercetinu i rutinu predstavlja supstancu sa potencijalnom ulogom pomoćnog (sekundarnog) UV filtera u kozmetičkim proizvodima, što bi bilo zanimljivo detaljnije ispitati inkorporiranjem ove supstance u podesan kozmetički vehikulum. Na osnovu dostupnih podataka dihidrokvercetin se, zbog povoljnog toksikološkog profila, dugi niz godina upotrebljava kao antioksidans u industriji hrane, a nalazi se i u bazi podataka Evropske komisije o kozmetičkim materijalima – *CosIng*, takođe sa ulogom antioksidansa.

Treći odeljak posvećen je ispitivanju kozmetičkih proizvoda i najznačajnijim metodama/tehnikama koje su korišćene u eksperimentalnom radu za ispitivanje *SWOP* emulzija. U okviru ovog poglavlja istaknuti su zahtevi regulatornih tela Evropske Unije koji su sadržani u Uredbi EU o kozmetičkim proizvodima (Regulation EC No 1223/2009), vodičima profesionalnih kozmetičkih udruženja iz oblasti industrije kozmetičkih proizvoda

za ličnu negu kao što je profesionalno udruženje evropske industrije za ličnu negu *Cosmetics Europe* (poznato pod ranijim nazivom *COLIPA*) i odbora za proizvode za ličnu negu *Personal Care Product Council – PCPC*, poznat i pod ranijim nazivom udruženje proizvođača za ličnu higijenu i mirise *the Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association – CTFA*. Takođe su navedeni stavovi i preporuke naučnih savetodavnih tela kao što je naučni komitet za bezbednost potrošača *the Scientific Committee on Consumer Safety – SCCS* u pogledu testiranja kozmetičkih proizvoda, beleženju podataka i formiranju posebnog dokumenta o kozmetičkom proizvodu – *Product Information File – PIF*. U poglavlju su istaknuti podaci o prednostima i nedostacima senzorne analize i *in vivo* instrumentalnog ispitivanja u testiranju efikasnosti kozmetičkog proizvoda. Posebno su navedeni podaci o propisima za određivanje SPF (engl. *sun protection factor*) i UVA-PF (engl. *ultraviolet A-protection factor*) kozmetičkih proizvoda za zaštitu od UV zračenja sa osvrtom na dobro dokumentovane prednosti *in vitro* ispitivanja u odnosu na *in vivo* ispitivanja.

Sveukupan CILJ RADA bio je da se izvrši formulisanje i sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija nove klase emulzionih sistema tipa u/v, baziranih na SWOP tehnologiji, ispita stabilizacioni potencijal emulgatorskog sistema, sagleda koloidna struktura ove vrste emulzionog vehikuluma i proceni mogućnost inkorporiranja dihidrokvercetina kao kozmetički aktivne supstance sa fotoprotektivnim potencijalom u ispitivani emulzioni vehikulum (procena fotoprotektivnog potencijala, model uzoraka, biće izvršena *in vitro* određivanjem SPF i UVA-PF).

EKSPERIMENTALNI DEO obuhvata *Materijale* u kome su navedene sirovine koje su korišćene u eksperimentalnom radu i *Metode i oprema*, gde su opisani postupci dobijanja i metode karakterizacije formulacija SWOP emulzija i poredbenih emulzija tipa u/v i voda-u-ulju (v/u) bez i sa kozmetički aktivnom supstancom dihidrokvercetinom i/ili UV filterom homosalom.

Eksperimentalni rad odvijao se u tri faze.

U *prvoj fazi eksperimentalnog rada* formulisana je serija emulzije u/v tipa stabilisanih nejonskim emulgatorom i blagim anjonskim surfaktantom u odnosu 4:1,5, koji je neophodan za dobijanje SWOP emulzije. Korišćene su različite komponente masne faze (ulja) da bi se procenio uticaj polarnosti i porekla ulja na stabilnost emulzija. Emulzije su izrađene sa i bez dodatka polimernog stabilizatora vodene faze da bi se ispitao uticaj različitih stabilizatora na stabilnost emulzionog sistema. Za svaku formulaciju pripremljeno je nekoliko uzoraka različitim postupkom izrade, sa ciljem da se odabere najpogodniji postupak. Preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti u toku perioda čuvanja od 30 dana i izbor optimalne model formulacije SWOP emulzije izvedene su na osnovu sledećih ispitivanja: organoleptičke procene, određivanja električne provodljivosti i pH vrednosti uzoraka, ispitivanja fizičke stabilnosti (test centrifugiranja), procene promene veličine kapi primenom svetlosne mikroskopije i reološka karakterizacija. U nastavku istraživanja u okviru ove faze formulisane su poredbene konvencionalne emulzije tipa u/v i v/u, sa kvalitativno i kvantitativno identičnim komponentama masne faze u odnosu na izabranu optimalnu model formulaciju SWOP emulzije radi njihovog sveobuhvatnog poređenja. Da bi se odabrale najbolje formulacije poredbenih emulzija tipa u/v i v/u, s aspekta fizičko-hemijske stabilnosti, primenjene su iste metode za preliminarnu procenu fizičko-hemijske stabilnosti u toku perioda čuvanja od 30 dana kao kod ispitivanja SWOP emulzije. Dodatno, da bi se izvršilo poređenje i utvrdile razlike 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 testa ubrzanog starenja).

Druga faza eksperimentalnog rada obuhvatila je 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. U okviru ove faze ispitana je koloidna struktura uzoraka, sa posebnim osvrtom na distribuciju vode u sistemu, a za to su pripremljeni binarni sistemi i emulzije uprošćenog sastava – jednostavne emulzije. Njihova fizičko-hemijska karakterizacija obuhvatila je svetlosnu i polarizacionu mikroskopsku analizu i termalne metode (diferencijalna skenirajuća kalorimetrija – DSC i termogravimetrijska analiza – TGA). U nastavku studije sprovedena je procena senzornih osobina odabrane formulacije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u. Procenu određenih i jasno definisanih osobina, bitnih za emulzione sisteme, izvršila je odabrana grupa panelista nakon primene ispitivanih uzoraka. Da bi se uporedili dobijeni rezultati senzorne analize i rezultati merenja sprovedenih u *in vitro* uslovima i uspostavile odgovarajuće korelacije izvršena je fizičko-hemijska karakterizacija koja je obuhvatila 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). Na osnovu literaturnih podataka pripremljen je rastvor sličan znoju i napravljene su smeše emulzionih vehikuluma bez kozmetički aktivne supstance i rastvora sličnog znoju (veštački znoj) u odnosu 5,3:1 (vehikulum:veštački znoj). Da bi se ispitao uticaj efekta razblaženja na viskozitet emulzija, pripremljene su smeše vehikuluma bez kozmetički aktivne supstance sa prečišćenom vodom u istom odnosu.

U okviru *treće faze eksperimentalnog rada* ispitana je mogućnost inkorporiranja alkoholnog/etanolnog rastvora model kozmetičke aktivne supstance dihidrokvercetina u odabranu formulaciju *SWOP* emulzije i uporedno u poredbenu emulziju tipa u/v. Na pripremljenim uzorcima izvršena je preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti u toku perioda čuvanja od 30 dana, a 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 i termalnu analizu. U nastavku studije na uzorcima *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v sa inkorporiranim različitim koncentracijama dihidrokvercetina sprovedeno je određivanje SPF i UVA-PF spektrofotometrijski u *in vitro* uslovima. Dodatno, u *SWOP* emulziju sa dihidrokvercetinom ugrađen je i UVB filter homosalat, a pripremljene su i emulzije za poređenje: *SWOP* emulzija sa inkorporiranim homosalatom i standardna emulzija sa homosalatom kao i *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v bez aktivne supstance. Na osnovu određenog SPF i UVA-PF primenom *in vitro* spektrofotometrijske metode procenjen je uticaj dihidrokvercetina na stabilnost i fotoprotektivni efekat homosalata. Na pripremljenim uzorcima je izvršena preliminarna procena fizičko-hemijske stabilnosti u toku perioda čuvanja od 30 dana, a metode ispitivanja su obuhvatile: organoleptičku procenu, određivanje električne provodljivosti i pH vrednosti uzoraka, ispitivanje fizičke stabilnosti (test centrifugiranja), reološku karakterizaciju primenom kontinualnih reoloških merenja i procenu promene veličine kapi primenom svetlosne mikroskopije. Za potvrdu reproduktivnosti rezultata 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. Na ispitivanim uzorcima *SWOP* emulzije i poredbene emulzija tipa u/v sa inkorporiranim dihidrokvercetinom urađena je *in vivo* preliminarna procena efikasnosti i bezbednosnog profila upotrebom metode bioinženjeringa kože u kratkotrajnoj studiji na zdravoj koži

dobrovoljaca. U nastavku studije, zbog uočene kristalizacije model aktivne supstance dihidrokvercetin, pripremljeni su novi uzorci *SWOP* emulzija sa dihidrokvercetinom prethodno rastvorenim u propilenglikolu, kao i *SWOP* emulzija bez aktivne supstance sa propilenglikolom. Pripremljeni uzorci podvrgnuti su proceni fizičko-hemijske stabilnosti u toku perioda čuvanja od godinu dana, a 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 kontinualne reološke analize, određivanje sadržaja kozmetički aktivne supstance i termalnu analizu.

REZULTATI I DISKUSIJA prikazani su na 62 stranice teksta, kroz 37 grafičkih prikaza i 16 tabela, kroz sledeće odeljke: *Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog*; *Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog* i *Rezultati i diskusija III faze eksperimentalnog rada*.

Na kraju doktorske disertacije dat je **ZAKLJUČAK**, izveden na osnovu dobijenih rezultata istraživanja i njihove analize.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 300 referenci citiranih harvardskim stilom.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati doktorske disertacije podeljeni su u tri celine, shodno postavljenim ciljevima.

U okviru prvog dela prikazani su rezultati preliminarne fizičko-hemijske karakterizacije *SWOP* i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u (organoleptička procena, određivanje električne provodljivosti i pH vrednosti uzoraka, ispitivanje fizičke stabilnosti (test centrifugiranja), procena promene veličine kapi primenom svetlosne mikroskopije i reološka karakterizacija primenom kontinualne reološke analize) na osnovu kojih je izabrana optimalna model formulacija *SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa u/v i v/u, a koje su poslužile za dalja detaljnija ispitivanja fizičko-hemijske stabilnosti u toku prirodnog starenja od 90 dana i ubranog starenja. Na osnovu preliminarne procene fizičko-hemijske stabilnosti ispitivanih uzoraka uočena je neophodnost prisustva određenog polimernog stabilizatora - natrijum poliakrilata u sastavu uzoraka i utvrđeno da sastav/vrsta masne faze ima uticaj na stabilnost *SWOP* emulzije. U pomenutim ispitivanjima utvrđeno je da je poredbena emulziju tipa v/u nestabilna, dok su *SWOP* i poredbena emulzije tipa u/v bile stabilne u uslovima prirodnog starenja u toku 90 dana.

Na osnovu rezultata prve faze, za ispitivanja u drugoj fazi odabrana je model formulacija *SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa v/u. Da bi se potvrdilo specifično ponašanje *SWOP* emulzije koje se ogleda u brznoj inverziji faza prilikom njene primene na koži, korišćena je metoda merenja kontaktnog ugla između kapi prečišćene vode i kože na koju je primenjena emulzija (*SWOP* i poredbena emulzija tipa u/v). Na osnovu podataka merenja dobijena je tačka inverzije za *SWOP* emulziju na koži u rasponu od 6 do 15 minuta, a za poredbenu emulziju tipa u/v nije se mogla dobiti tačka inverzije ni nakon 30 minuta merenja. Na ovaj način potvrđena je razlika između *SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa u/v. Kod uzoraka *SWOP* emulzije izmereni su kontaktni uglovi od 30° i veći, što ispitivanu *SWOP* emulziju svrstava u vodootporne emulzije. Ispitivanjem koloidne strukture emulzija korišćenjem seta pripremljenih binarnih sistema i jednostavnih emulzija mikroskopskom analizom, uočene su značajne strukturne razlike između *SWOP* emulzija i emulzija tipa u/v i v/u. Kod *SWOP* emulzije uočen je diskontinuirani sloj verovatno od nejonskog emulgatora (poligliceril-2 dipolihidroksistearat) i anjonskog surfaktanta (natrijum lauril glukoza karboksilat, 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 metoda termalne analize (DSC i TGA), može se zaključiti da *SWOP* emulzija pokazuje znatno brže isparavanje vode u odnosu na poredbenu emulziju tipa u/v, kao i da značajan procenat vode ostaje zarobljen u emulzionim sistemima *SWOP* i emulzije tipa u/v, što ukazuje na prisustvo vezane vode 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 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Dodatkom rastvora sličnog znoju (prisutni joni) 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 karakterizacija ukazala je da *SWOP* emulzija pokazuje nenjutnovski tip tečenja sa umerenom tiksotropijom što se smatra pogodnom osobinom koja olakšava proizvodnju i primenu emulzije, a oscilatorna reološka karakterizacija ukazuje na dominantno elastično ponašanje karakteristično za čvrsta tela, u oblasti primenjenih deformacija. Testiranjem izmerenih reoloških parametara primenom jednofaktorske ANOVA kao i na osnovu rezultata senzorne studije potvrđeno je da se poredbena emulzija tipa v/u značajno razlikuje od *SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa u/v, dok se *SWOP* emulzija i poredbena emulzija tipa u/v značajno 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, odnosno po analiziranim atributima *gustina* i *konzistencija*. Između analiziranih atributa i reoloških parametara utvrđene su korelacije koje se mogu iskoristiti za predviđanje senzornih karakteristika *SWOP* emulzije u toku formulacije i preformulacije samo na osnovu sprovedenih reoloških merenja pod definisanim uslovima. Utvrđeno je i da određeni atributi (*sjaj uzorka*, *elastičnost*, *masnoća*, *blagost*, *lepljivost filma*, *masnoća filma*, *sjaj filma* i *spiranje filma*) znatno zavise od sastava masne faze i upotrebljenih emolijenasa, pa se ne mogu predvideti samo na osnovu instrumentalnih merenja. Atribut *spiranje filma* potvrdio je bolju vodootpornost *SWOP* emulzije u odnosu na poredbenu emulziju tipa u/v.

Rezultati treće faze eksperimentalnog rada proističu iz formulacije *SWOP* emulzija sa kozmetički aktivnom supstancom dihidrokvercetinom. Različite koncentracije dihidrokvercetina inkorporiranog u *SWOP* emulziju, nisu uticale na pH i električnu provodljivost emulzionog vehikuluma, kao ni na fizičku stabilnost ispitivanih uzoraka. Reološka kontinualna analiza pokazala je da dodatak dihidrokvercetina i korastvarača (etanol i/ili propilenglikol), utiče na promenu viskoziteta optimalne model formulacije *SWOP* emulzije (smanjenje viskoziteta u rasponu 15% - 40% od početne vrednosti), ali ne narušavaju emulzionu strukturu *SWOP* emulzije. Mikroskopskom analizom uzoraka *SWOP* emulzije sa dihidrokvercetinom (čija je koncentracija bila veća od 0,5% m/m, bez obzira na korastvarač (etanol ili propilenglikol) zabeležena je pojava kristala aktivne supstance, dok u uzorcima *SWOP* emulzije sa 0,5% m/m dihidrokvercetina i propilenglikolom (10% m/m) nisu se formirali kristali dihidrokvercetina ni nakon 30 dana od izrade uzoraka. Termalna analiza, DSC, potvrdila je da prisustvo dihidrokvercetina i korastvarača ne narušava strukturu *SWOP* emulzije. Primenom reverzno fazne tečne hromatografije visokih performansi potvrđeno je da se sadržaj dihidrokvercetina u *SWOP* emulziji smanjuje (antioksidans se „troši“) tokom vremena, što se manifestovalo i u promeni boje uzorka tokom godinu dana čuvanja na temperaturi ispod 30 °C. Istovremeno, praćen je i sadržaj kvercetina u uzorcima *SWOP*

emulzije sa inkorporiranim dihidrokvercetinom i zabeležen je porast njegovog sadržaja, čime je potvrđena pretpostavka da se dihidrokvercetin tokom vremena oksidiše u kvercetin. Ispitivana *SWOP* emulzija kao nosač za dihidrokvercetin nije bila dovoljna zaštita za aktivnu supstancu, pa bi bilo značajno ispitati koji bi antioksidanasi mogli pozitivno uticati na stabilnost aktivne supstance dihidrokvercetina u formulaciji *SWOP* emulzije za zaštitu kože od UV zračenja. *In vitro* određen SPF optimalne model formulacije *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v bez aktivne supstance, bio je isti (2,3) dok su izmereni UVA-PF bili različiti (redom 3,8, odnosno 2,8). Emulzije (*SWOP* i poredbena emulzija tipa u/v) sa 5% m/m dihidrokvercetina, imale su više, *in vitro* određene vrednosti i SPF i UVA-PF, što ukazuje na potencijalnu fotoprotektivnu aktivnost dihidrokvercetina. Dobijen UVA-PF/SPF odnos je viši od 0,33 za testirane uzorke *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v sa dihidrokvercetinom, što ukazuje da se dihidrokvercetin može razmatrati kao UV filter sa potencijalnim efektom u UVA i UVB oblasti. Na osnovu dobijenih vrednosti UVA-PF za ispitivane uzorke *SWOP* emulzije sa dihidrokvercetinom i/ili homosalom primećen je sinergistički efekat dihidrokvercetina kada je primenjen/kombinovan sa poznatim UV filtrom homosalom. Rezultati *in vivo* studije performansi ukazali su na bolji hidracioni 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 (transepidermalni gubitak vode), ukazuju na zadovoljavajući preliminarni iritacioni potencijal ispitivanih *SWOP* uzoraka. Posebno dizajnirana, dvominutna kratkotrajna studija praćenja promena hidratacije *stratum corneum*-a ukazala je na inverziju faza kod *SWOP* emulzije, što se manifestovalo padom vrednosti *hidratacije stratum corneum*-a u toku 2 minuta.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Rezultati dobijeni i predstavljeni u okviru prve faze rada potvrdili su navode iz patenta *Beuché i sar.*, (2008) ukazujući na činjenicu da je za izradu stabilnih *SWOP* emulzija neophodno prisustvo polimernog ugušćivača. Dodatno, utvrđeno je da je postupak izrade *SWOP* emulzija jednostavan i sličan postupku izrade emulzija tipa u/v, što je takođe u saglasnosti sa navodima *Beuché i sar.*, (2008). Ispitivanjem stabilnosti uzoraka *SWOP* emulzije i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u u uslovima prirodnog starenja u toku 30 dana, 90 dana i u uslovima cikličnog temperaturnog stres testa potvrđena je zadovoljavajuća stabilnost *SWOP* emulzije i na osnovu ovih rezultata može se predvideti njena stabilnost u toku dužeg vremena čuvanja, što je u saglasnosti sa navodima *Beuché i sar.*, (2008). Metodom merenja kontaktnog ugla između kapi prečišćene vode i kože na kojoj je primenjena emulzija potvrđeno je specifično ponašanje *SWOP* emulzije odnosno inverzija faza i prelazak u emulziju tipa v/u, koji se odvija u toku od 6 do 15 minuta, što je u saglasnosti sa navodima *Beuché i sar.*, (2008). Za razliku od uzorka *SWOP* emulzije, poredbena emulzija tipa u/v ni nakon 30 minuta ne podleže inverziji. Kod uzorka *SWOP* emulzije izmereni su kontaktni uglovi od 30° i veći, što ih prema navodima *Hagens i sar.*, (2007) kategorizuje kao vodootporne bez potrebe za dodatnim testiranjem po COLIPA metodi za određivanje vodootpornosti (*COLIPA Guidelines for Evaluating Sun Product Water Resistance*, 2005).

Do sada, o koloidnoj strukturi *SWOP* emulzija nema publikovanih rezultata, pa se ispitivanjem koloidne strukture *SWOP* emulzija došlo do interesantnih podataka i o mehanizmu inverzije faza *SWOP* emulzije, koji takođe, do sada nije opisan u literaturi. Primenom mikroskopske analize ispitivana je koloidna struktura *SWOP* i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u, pri čemu su uočene značajne razlike između ispitivanih emulzija. Kod

SWOP emulzije uočen je diskontinuirani sloj (verovatno nejonskog emulgatora (poligliceril-2 dipolihidroksistearat) i anjonskog surfaktanta (natrijum lauril glukoza karboksilat, lauril glukozid) oko vode gelirane polimerom. Prema navodima *Barreiro-Iglesias i sar., (2003)* višak natrijumlaurilsufata proizvodi više jona i slobodnih micela u medijumu, izazivajući skupljanje mikrogela karbomera i smanjenje viskoziteta. Slično, uočeni prekidi emulgator/surfaktant slojeva na mikrografijama *SWOP* emulzija mogli bi biti razlog curenja vode iz narušene gel strukture prilikom primene emulzije na koži i njene brze inverzije u emulziju tipa v/u, zbog pretpostavke da prisustvo anjonskog surfaktanta (natrijum lauril glukoza karboksilat) izaziva skupljanje poliakrilatnog gela i kao posledica toga dolazi do curenja vode iz gela. Prema navodima *Jaksic i sar., (2012)* i *Savic i sar., (2011)* termogravimetrijska analiza je jedna od metoda koja služi za procenu distribucije vode u ispitivanim uzorcima kao i njihove potencijalne koloidne strukture i potencijalnog efekta vlaženje kože, pa je primenjena zajedno sa metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije za analizu uzoraka *SWOP* i poredbenih emulzija tipa u/v i v/u. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da *SWOP* emulzija pokazuje znatno brže isparavanje vode u odnosu na poredbenu emulziju tipa u/v, pri čemu maksimum prvog širokog pika primećenog u rasponu temperatura od 78 °C do 84 °C i od 85 °C do 88 °C za ispitivane uzorke *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v najverovatnije odgovara isparavanju vode (vezane polimernim stabilizatorom natrijum poliakrilatom) što je u saglasnosti sa navodima *Csizmazia i sar., (2010)*. 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, a dodatno uzorci na čijim DCS termogramima se uočavaju više diferencirane krive oslobađaju različito vezanu vodu u nekoliko faza, što ukazuje na mogućnost očekivanog produženog efekta vlaženja, a to je takođe, u saglasnosti sa navodima *Csizmazia i sar., (2010)*. 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 $\mu\text{S}/\text{cm}$, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (*Jiang i sar., 2013; Prieto i Calvo, 2013*) po kojima 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 jer je uobičajena električna provodljivost masne faze 100 do 1000 puta manja od provodljivosti vodene faze zbog ograničenog kretanja jona okruženih i ograničenih uljem koje prekida vodenu mrežu. Dodatkom rastvora sličnog znoju, električna provodljivost *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v je porasla, pri čemu je električna provodljivost kod poredbene emulzije tipa u/v приметно rasla, a to se može objasniti navodima *Kundu i sar., (2013)* da je električna provodljivost emulzije proporcionalna električnoj provodljivosti kontinualne faze (odnosno provodljivosti vodene faze). Dodatak istih količina rastvora sličnog znoju *SWOP* emulziji tek blago povećava njenu električnu provodljivost, što bi se moglo objasniti navodima *Nielloud i Marti-Mestres, (2000)* da je postignuta blizina optimalne formulacije (pri čemu je razlika u aktivnosti surfaktanta = 0) 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. Kontinualna reološka analiza ukazala je da *SWOP* emulzija pokazuju nenjutnovski tip tečenja sa umerenom tiksotropijom koji se može opisati Herschel-Buckley-evim modelom, i često se koristi za određivanje prinosnog napona (*Gilbert i sar., 2013; Tadros, 2004*). Ovaj model primenjen je i za reološku analizu poredbenih emulzije tipa u/v i v/u. Međutim, kod poredbene emulzije tipa v/u, ovaj model je bilo moguće primeniti samo pri manjim brzinama smicanja (*Kindernay i sar., 2001*), jer je pri većim brzinama smicanja primećen *Weissenberg*-ov efekat slično zapažanjima *Lukic i sar., (2013)*. Tokom oscilatornih reoloških merenja primećeno je naglo povećanje faznog ugla ($\tan \delta$) kod

SWOP emulzije u prisustvu rastvora sličnog znoju što prema podacima iz literature (*Diftis i sar., 2005; Masmoudi i sar., 2006;*) ukazuje na smanjenje elastičnosti i destabilizaciju sistema i može se povezati sa inverzijom faza SWOP emulzije. Na osnovu podataka iz literature (*Gilbert i sar., 2013; Lukić, 2014; Moravkova i Filip, 2013*) ispitana je mogućnost korišćenja instrumentalnih metoda za predviđanje senzornih osobina kozmetičkih emulzija, pri čemu su dobijeni rezultati većine odabranih senzornih atributa u saglasnosti sa rezultatima reoloških ispitivanja, odnosno potvrđeno je da je moguće koristiti reološka merenja pod definisanim uslovima (povišena temperatura – 32 °C, prisustvo jona) 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, i prema navodima *Gilbert i sar., (2013)* i *Kilcast i Clegg, (2002)* ovi atributi su pod snažnim subjektivnim hedonističkim uticajem, ali se uspešno mogu koristiti za poređenje testiranih emulzija i predviđanje očekivanja/percepcije i potražnje kupaca/korisnika.

Prema podacima iz literature (*Kurth i Chan, 1951; Rogozhin i Peretolchin, 2009; Seyoum i sar., 2006; Weidmann, 2012*) dihidrokvercetin poznat i kao taksifolin je flavonoid koji je strukturno sličan kvercetinu i ispoljava antioksidantni efekat slično antioksidantnom profilu α -tokoferola (*Teskin i sar., 1996; Weidmann, 2012*). Dodatno, poznata je sposobnost dihidrokvercetina da apsorbuje UV zrake u većem delu UV spektra, pri čemu maksimalnu apsorpciju postiže na 225 nm i na 325 nm (*Panyushin i sar., 1999; Philippov i Bogorodov, 2013*). Istraživanje *Choquenot i sar., (2008)* u kome su kvercetin i rutin korišćeni kao filteri UV zraka ukazalo je na njihov potencijal u zaštiti od UVA i UVB zračenja i da bi se mogli koristiti u kozmetičkim proizvodima. Prema literaturi (*Davies i Yáñez, 2012; Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council, 1997*) 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 i kao dijetetski suplement u Švajcarskoj i Sjedinjenim Američkim Državama. Taksifolin je umereno rastvorljiv u alkoholu/etanolu, 96% v/v i prema navodima *Chernukha i Kononenko, (2009)* i *Radaeva i sar., (1997)* njegova rastvorljivost u vodeno-etanolnom rastvoru raste od 0,1% do 18% kako se udeo mase alkohola povećava od 30% do 90%, što je iskorišćeno u postupku izrade emulzija sa dihidrokvercetinom. Do sada, o dihidrokvercetinu i njegovoj upotrebi u kozmetičke svrhe ima veoma malo publikovanih rezultata, pa se ispitivanjem ugradnje dihidrokvercetina u SWOP emulziju došlo do interesantnih podataka o uticaju dihidrokvercetina na SWOP emulziju i njegovoj fotoprotektivnoj ulozi koji do sada nisu opisani u literaturi. Različite koncentracije dihidrokvercetina koje su inkorporirane u SWOP emulziju, nisu uticale na pH i električnu provodljivost. Reološka kontinualna analiza pokazala je da dodatak dihidrokvercetina i korastvarača (etanol ili propilenglikol), utiču na promenu viskoziteta optimalne model formulacije SWOP emulzije smanjujući ga (do 40%) pri čemu ne narušavaju emulzionu strukturu SWOP emulzije, što je u saglasnosti sa navodima *Zillich i sar., (2015)* da polifenoli utiču na smanjenje viskoziteta emulzija. Upotrebom metode tečne hromatografije visokih performansi moguće je pratiti sadržaj dihidrokvercetina u emulziji tokom vremena (*Nifant'ev i sar., 2006; Weidmann, 2012*). Rezultati analize pokazali su da se dihidrokvercetin „troši“ tokom vremena i da mu se sadržaj smanjuje dok se sadržaj njegovog oksidacionog proizvoda kvercetina neproporcionalno povećava. Na osnovu literaturnih podataka o sposobnosti dihidrokvercetina da apsorbuje UV zrake (*Panyushin i sar., 1999; Philippov i Bogorodov, 2013*) kao i njegove sličnosti sa kvercetinom i rutinom (*Kurth i Chan, 1951; Rogozhin i Peretolchin, 2009; Seyoum i sar., 2006; Weidmann, 2012*) za koje je pokazano da se mogu koristiti u kozmetičkim proizvodima za zaštitu od UV zračenja (*Choquenot i sar., 2008*)

sprovedena su *in vitro* spektrofotometrijska merenja i određivanje SPF i UVA-PF kako bi se procenile potencijalne fotoprotektivne osobine dihidrokvercetin inkorporiranog u *SWOP* i poredbenu emulziju tipa u/v, kao i mogućnost dihidrokvercetin da pojača fotoprotektivnu aktivnost UVB filtera homosalata, kada su obe inkorporirane u istu *SWOP* emulziju. Rezultati su ukazali da emulzije koje sadrže dihidrokvercetin, imaju više vrednosti i SPF i UVA-PF, što navodi na zaključak da dihidrokvercetin ispoljava dobru fotoprotektivnu aktivnost. Dodatno, UVA-PF/SPF odnos je viši od 0,33 za testirane uzorke, pa je preporuka *Cosmetics Europe (COLIPA Guidelines - Method for in vitro Determination of UVA protection, 2011)* za UVA zaštitu ispunjena po navodu *Osterwalder i sar., (2009)*, i dihidrokvercetin se može razmatrati kao UV filter sa potencijalnim fotoprotektivnim efektom u UVB i UVA oblasti. Takođe, poređenjem UVA-PF vrednosti ispitivanih uzoraka primećen je sinergistički efekat dihidrokvercetin kada je primenjen/kombinovan sa poznatim UV filtrom homosalatom. Na osnovu merenja nivoa hidratacije *stratum corneum*-a, nakon primene *SWOP* emulzije u toku kratkotrajne, dvominutne studije došlo se do rezultata koji ukazuju na inverziju faza emulzije što je u saglasnosti sa rezultatima određivanja tačke inverzije merenjem promena vrednosti hidratacije *stratum corneum*-a (*Beuché i sar., 2008*).

Literatura:

- 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.
- Beuché M, Amela CC, Domingo M. 2008. Aqueous meta-stable oil-in-water emulsions, *EP1917954 A1*.
- Chernukha YL, Kononenko VA. Test report – solubility of dihydroquercetin in different types of solutions. *Ametis Joint Stock Company*, internal report 2009.
- 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.
- COLIPA Guidelines - Method for *in vitro* Determination of UVA protection, 2011.
- COLIPA Guidelines for Evaluating Sun Product Water Resistance, 2005.
- Csizmazia E, Budai-Szűcs M, Erős I, Makai Z, Szabó-Révész P, Varju G, Csányi E. Thermoanalytical method for predicting the hydration effect perma-nency of dermal semisolid preparations. *J Therm Anal Calorim* 2010;102:313–16.
- Davies NM, Yáñez JA. Flavonoid Pharmacokinetics: Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology. John Wiley & Sons; 2012.
- 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.
- 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.
- Jaksic I, Lukic M, Malenovic A, Reichl S, Hoffmann C, Müller-Goymann C, et al. 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.
- 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.

- 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.
- 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;28:433–36.
- 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.
- Moravkova T, Filip P. The influence of emulsifier on rheological and sensory properties of cosmetic lotions. *Adv Mater Sci Eng* 2013;2013:7.
- 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;76:161–63.
- Osterwalder U, Jung K, Seifert M, Herrling T. Importance of UVA sun protection: a comparative analysis of different quality control methods. *SÖFW-Journal* 2009;135(9):2–13.
- 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.
- Philippov SV, Bogorodov IM. Method of using wood extracts in cosmetic and hygiene products. US 20130295036 A1; 2013.
- 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 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. 1997.
- Rogozhin VV, Peretolchin DV. Kinetic regulation of dihydroquercetin oxidation with horseradish peroxide. *Russ J Bioorg Chem* 2009;35:576–80.
- 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.
- Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure–activity scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* 2006;67:2058–70.

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.

Teskin IuO, Zhambalova BA, Babenkova IV, Tiukavkina NA. Antioxidant properties of dihydroquercetin. *Biofizika* 1996;41:620–24.

Weidmann AE. Dihydroquercetin: More than just an impurity?. *Eur J Pharmacol* 2012;684:19–26.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

A. Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu

1. 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

2. 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* 2015;1–11. doi: 10.1111/ics.12282

B. Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

1. **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.
2. **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.

3. **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.

C. Saopštenja sa međunarodnih skupova, štampano u izvodu – M34

1. **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.
2. **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.
3. **Korać R**, Krajišnik D, Radulović V, Milić J. Accelerated stability testing of *SWOP* emulsions. CESIO 2013. 9th World Surfactant Congress, Barcelona, Spain, 2013.
4. **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.
5. **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.

E. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE

Predmet proučavanja doktorske disertacije bio je ispitivanje stabilnosti i koloidne strukture *SWOP* emulzija kao i razmatranje mehanizma inverzije faza. Takođe je ispitivana mogućnost inkorporiranja fotoprotektivnih supstanci u ispitivanu *SWOP* emulziju i utvrđivanje pogodnosti primene ove vrste emulzija kao vehikuluma za fotoprotektivne supstance.

Utvrđeno je da na stabilnost emulzije utiče izbor sastojaka masne faze odnosno njihova polarnost i poreklo, kao i prisustvo polimernog ugušćivača natrijum poliakrilata. Na osnovu analize fizičke stabilnosti u uslovima prirodnog starenja od 30 dana, utvrđena je nestabilnost poredbene (konvencionalne) emulzije tipa v/u. Analizom uzoraka *SWOP* emulzije i poredbene emulzije tipa u/v u uslovima prirodnog starenja od 90 dana kao i tokom cikličnog temperaturnog stres testa potvrđena je stabilnost obe emulzije.

Potvrđeno je specifično ponašanje *SWOP* emulzije i njena brza inverzija faza u poređenju sa poredbenom emulzijom u/v, merenjem kontaktnog ugla između prečišćene vode i kože na kojoj je primenjena emulzija. Dodatno, kod uzoraka *SWOP* emulzije izmereni su kontaktni uglovi od 30° i veći, što ukazuje na vodootpornost *SWOP* emulzije. Rezultati mikroskopske i termalnih analiza (DSC i TGA) ukazali su na razlike u koloidnoj strukturi *SWOP* i poredbene u/v emulzije.

Na osnovu rezultata kontinualne i reološke analize utvrđeno je da *SWOP* emulzija pokazuje nenjutnovski tip tečenja sa umerenom tiksotropijom što se smatra pogodnom osobinom koja olakšava proizvodnju i primenu emulzije i dominantno elastično ponašanje karakteristično za čvrsta tela (elastični (G') modul je dominirao nad viskozim (G'') modulom) u oblasti primenjenih deformacija. 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 maksimalnom i minimalnom prividnom viskozitetu 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. 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. Atribut *spiranje filma* potvrdio je bolju vodootpornost *SWOP* emulzije u odnosu na poredbenu emulziju tipa u/v.

Kontinualna reološka analiza pokazala je da dodatak dihidrokvercetina i korastvarača (etanol i/ili propilenglikol), utiče na promenu viskoziteta optimalne model formulacije *SWOP* emulzije, ali ne narušavaju emulzionu strukturu *SWOP* emulzije. Rezultati ispitivanja pH vrednosti, električne provodljivosti i sadržaja dihidrokvercetina u uzorcima *SWOP* emulzije ukazali su da dihidrokvercetin ne narušava strukturu emulzije i da je sistem stabilan u toku 30 dana.

Mikroskopskom analizom aktivnih uzoraka *SWOP* emulzije (uzorci sa dihidrokvercetinom) zabeležena je pojava kristala aktivne supstance, kod uzoraka sa koncentracijom dihidrokvercetina 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 dihidrokvercetina i propilenglikolom (10% m/m) nisu nastajali kristali dihidrokvercetina ni nakon 30 dana od izrade uzoraka. Termalna analiza, diferencijalna skenirajuća kalorimetrija, potvrdila je da prisustvo dihidrokvercetina i rastvarača u *SWOP* emulziji ne narušava

strukturu *SWOP* emulzije. Potvrđeno je da se sadržaj dihidrokvercetina u uzorcima *SWOP* emulzije smanjuje (antioksidans se „troši“) tokom vremena, što se manifestovalo i promenom boje uzorka tokom godinu dana čuvanja na temperaturi do 30 °C. Ispitivana *SWOP* emulzija kao nosač za dihidrokvercetin nije bila dovoljna zaštita za aktivnu supstancu.

In vitro određen SPF optimalne model formulacije *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v 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 dihidrokvercetina, imaju znatno više, *in vitro* određene vrednosti i SPF i UVA-PF, što navodi na zaključak da dihidrokvercetin ima potencijal kao fotoprotektivna supstanca. UVA-PF/SPF odnos je viši od 0,33 za testirane aktivne uzorke *SWOP* i poredbene emulzije tipa u/v, što ukazuje da se dihidrokvercetin može razmatrati kao UV filter sa potencijalnim efektom u UVA i UVB oblasti. Na osnovu rezultata za UVA-PF ispitivanih uzoraka *SWOP* emulzije uočen je sinergistički efekat dihidrokvercetina kada je primenjen/kombinovan sa poznatim UV filtrom homosalatom.

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 ukazala je na inverziju faza kod *SWOP* emulzije. Ispitivana *SWOP* emulzija pokazala je u *in vivo* studiji bolji hidratacioni potencijal u odnosu na poredbenu u/v emulziju i prihvatljiv/nizak iritacioni potencijal.

F. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Uvidom u rezultate završene disertacije, može se konstatovati da je kandidat uspešno ostvario postavljene ciljeve, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u dva rada u relevantnim međunarodnim časopisima (*Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* i *International Journal of Cosmetic Science*).

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je kandidat ispunio ciljeve postavljene u okviru doktorske disertacije pod nazivom „**Emulzije ulje u vodi koje podležu brzom inverziji faza na koži: stabilnost, koloidna struktura i primena kao nosača fotoprotektivnih supstanci**”, te predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati Izveštaj i omogući kandidatu dipl. farm. Radavi Martić da pristupi odbrani doktorske disertacije.

Beograd, 25.04.2016.

Članovi Komisije

Dr Jela Milić, redovni profesor, mentor, predsednik komisije
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Danina Krajišnik, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

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

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

Dr Nebojša Cekić, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu – Tehnološki fakultet