

Univerzitet u Beogradu
Farmaceutski fakultet



Mila Đ. Filipović

DOKTORSKA DISERTACIJA

Kozmetičke emulzije na bazi prirodnog alkil
poliglukozidnog emulgatora sa liposom-
inkapsuliranim
biljnim matičnim ćelijama:
proučavanje fenomena na granici faza i biofizička
merenja na koži

Beograd, 2017.

University of Belgrade
Faculty of Pharmacy



Mila Đ. Filipović

DOCTORAL DISSERTATION

Cosmetic emulsion stabilized with a natural alkyl
polyglucoside emulsifier containing
liposome-encapsulated plant stem cells: study of
interfacial phenomena and biophysical
measurements on the skin

Belgrade, 2017.

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

Mentori

Dr Snežana Savić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Gordana Vuleta, redovni profesor u penziji,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

1. _____

Dr Milica Lukić, docent,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

2. _____

Dr Veljko Krstonošić, vanredni profesor,
Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet

Datum odbrane _____

Izuzetnu zahvalnost dugujem mom mentoru, *prof. dr Snežani Savić*, čija su mi stručnost, znanje, nesebična pomoć, iskrena podrška i kreativno usmeravanje omogućili da uspešno prebrodim sve etape u izradi ove doktorske disertacije.

Prof. dr Gordani Vuleta sam veoma zahvalna, ne samo na velikoj stručnoj pomoći prilikom konačnog uobličavanja ove doktorske disertacije, već i na iskrenim savetima i korisnim sugestijama od početka mog bavljenja naučno-istraživačkim i profesionalnim radom, uvek kada je to bilo potrebno.

Istinsku zahvalnost dugujem *doc. dr Milici Lukić* na bezrezervnoj podršci, velikoj pomoći i iskrenom prijateljstvu u svim fazama izrade ove doktorske disertacije.

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

Iskreno se zahvaljujem *dipl. farm. Saneli Dorđević* i *doc. dr Ivani Pantelić*, jer su na različite načine imale udela u toku i izradi ovog doktorata.

Najtoplije se zahvaljujem mojim *roditeljima* na podstreku, razumevanju, ljubavi, bezuslovnoj pomoći, nesebičnoj i bezrezervnoj podršci, uvek kada je to bilo potrebno.

Posebnu, istinsku zahvalnost dugujem mom suprugu *Lazaru* na iskrenoj podršci, razumevanju i beskrajnoj ljubavi koje mi je pružao svih ovih godina tokom mog bavljenja naučno-istraživačkim radom.

Mojoj devojčici Jani

Kozmetičke emulzije na bazi prirodnog alkil poliglukozidnog emulgatora sa liposom-inkapsuliranim biljnim matičnim ćelijama: proučavanje fenomena na granici faza i biofizička merenja na koži

SAŽETAK

Uvod Liposomi, vezikularni nosači koji stabilizuju kozmetički aktivne sastojke, mogu poboljšati njihovu stabilnost i efikasnost, omogućiti da se oni produženo i lokalizovano oslobađaju, ali i doprineti da kozmetički proizvod poveća vlažnost površine kože i popravi kožnu barijeru. Međutim, formulacija stabilnog, estetski prihvatljivog i efikasnog kozmetičkog proizvoda sa liposomima, naročito emulzionog tipa, zahtevan je zadatak. Najveći izazov u formulaciji liposomskog kozmetičkog proizvoda je izbor odgovarajućih sastojaka proizvoda u kome će se očuvati stabilnost ovih vezikula, ali i zadovoljiti očekivanja korisnika u pogledu senzornih karakteristika proizvoda. Fokus savremene kozmetologije je na blagim, neškodljivim, ekološki prihvatljivim, prirodnim surfaktantima kao stabilizatorima emulzionih proizvoda, naročito alkil poliglukozidima (APG), koji još uvek nisu potpuno istraženi, niti ima podataka o njihovoj kompatibilnosti sa liposomima. Ispitivanje novijeg mešanog APG emulgatora, dobijanje podataka koji se odnose na rasvetljavanje njegove kompatibilnosti sa liposomima u emulzionom nosaču, stabilnosti i efikasnosti takvog proizvoda, uz pronalaženje metoda i tehnika ili njihovog kombinovanja, koje bi pojednostavile postupak formulacije i reformulacije kozmetičkih proizvoda, značajan je doprinos savremenim ispitivanjima u oblasti kozmetologije.

Cilj istraživanja Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je: 1) određivanje kritične micelarne koncentracije (KMK) ispitivanog mešanog (dvokomponentnog) emulgatora, procena mehanizma kojim APG emulgator nove generacije stabilizuje emulzioni sistem (procena faznog ponašanja) i praćenje interakcija liposomi - emulgator u jednostavnim sistemima (binarni i ternarni sistemi); 2) razvoj kozmetičkih liposomskih ulje-u-vodi (U/V) emulzija kompleksnog sastava i procena kompatibilnosti emulgatora i liposoma u tim sistemima; 3) ispitivanje uticaja reformulacije razvijenih kremova (dodatak biljnog skvalena; promena procesnih parametara) na njihove reološke, teksturne i senzorne karakteristike, upotrebom eksperimentalnog dizajna; 4) *in*

vivo procena iritacionog potencijala i efikasnosti razvijenih liposomskih kremova u čije su liposome inkapsulirane biljne matične ćelije alpske ruže.

Metode Eksperimentalni rad bio je podeljen u četiri faze: 1) U okviru preformulacionih ispitivanja određena je KMK mešanog APG emulgatora Simulgreen™ 18-2, Seppic, France (INCI: *Hydroxystearyl alcohol and Hydroxystearyl glucoside*) merenjem površinskog napona uz pomoć tenziometra. Uporedo se vršila fizičko-hemijska karakterizacija odabranog kozmetički aktivnog sastojka (KAS) - biljnih matičnih ćelija inkapsuliranih u liposome uz pomoć polarizacione mikroskopije, laserske difrakcije, konduktometrije i merenja pH, kao i fazno ponašanje emulgatora u binarnim i ternarnim sistemima i procena njegove kompatibilnosti sa liposomima 2) Formulirani su model kozmetički emulziji nosači i model liposomske kozmetičke emulzije, stabilisani su ispitivanim emulgatorom, urađena je standardizacija postupka izrade, fizičko-hemijska karakterizacija (polarizaciona mikroskopija, kontinualna i oscilatorna reologija, diferencijalna skenirajuća kalorimetrija, termogravimetrijska analiza), ispitivanje estetskih, aplikativnih i teksturnih karakteristika i procena fizičko-hemijske stabilnosti izrađenih model kozmetičkih emulzija, ubrzanim testom starenja 3) Ispitivan je uticaj faktora reformulacije (promene procesnih parametara i sastava proizvoda) na teksturne, reološke, i posleđično, senzorne karakteristike proizvoda primenom generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna 4) Vršena je procena određenih aspekata bezbednosti i efikasnosti model nosača (placebo) i liposomskih model emulzija sa zadovoljavajućom stabilnošću i prihvatljivim senzornim karakteristikama upotrebom *in vivo* neinvazivnih metoda zasnovanih na biofizičkim merenjima na koži.

Rezultati Upotreba tenziometra pokazala se odgovarajućom metodom za određivanje kritične micelarne koncentracije novijeg APG prirodnog mešanog (dvokomponentnog) emulgatora, pri čemu je dobijen podatak, KMK emulgatora (0,0085%), koji nije dostupan u literaturi i ne navodi se u specifikaciji proizvođača ove kozmetičke sirovine. Disperzija pripremljena iz "suvih" liposoma sa inkapsuliranim biljnim matičnim ćelijama alpske ruže, pokazala se pogodnim izvorom KAS. Ispitivani APG emulgator, hidrosistearil alkohol i hidrosistearil glukozid, nije doveo do solubilizacije i do pucanja dvoslojne membrane pri interakciji sa vezikulama, ni u jednostavnim ternarnim, ni u kompleksnim emulzionim sistemima, već se pokazao kompatibilnim sa liposomima i pogodnim za izradu stabilnih i estetski prihvatljivih kozmetičkih emulzionih nosača

liposoma. Pokazan je mehanizam stabilizacije liposoma u sistemima sa lamelarnom fazom, kao i uticaj izabrane KAS na koloidnu strukturu takvog nosača. Noviji pristup reformulaciji kozmetičkih proizvoda, koji kombinuje generalni faktorijalni eksperimentalni dizajn i instrumentalne metode – teksturna i reološka merenja, pokazao se pogodnim kao prvi korak ka optimizaciji proizvoda prema očekivanjima/zahtevima korisnika. Ispitivane kozmetičke emulzije stabilizovane novijim, prirodnim mešanim APG emulgatorom, bez ili sa liposomima matičnih ćelija alpske ruže ili skvalenom, pokazale su zadovoljavajuću bezbednost prilikom primene na zdravoj i eksperimentalno izazvanoj suvoj koži, kao i efikasnost u pogledu hidracije kože, uticaja na reparaciju kožne barijere i smanjenje znakova iritirane kože. Pokazano je da skvalen maslinovog ulja, u zavisnosti od koncentracije ima uticaj na koloidnu strukturu emulzionog nosača sa lamelarnom fazom, kao i na teksturne, reološke i senzorne karakteristike emulzija koje ga sadrže.

Zaključak Liposomi sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže, kao noviji kozmetički materijal, ostaju intaktni, kako u jednostavnim ternarnim, tako i kompleksnim emulzionim sistemima, stabilizovanim novijim, prirodnim, mešanim emulgatorom - hidroksistearil alkoholom i hidroksistearil glukozidom. Ispitivani kozmetički aktivni sastojak – vodena disperzija liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže, pokazuje uticaj na reološko ponašanje emulzionih nosača stabilizovanih lamelarnom fazom, u zavisnosti od upotrebljene koncentracije, sa posledičnim promenama u koloidnoj strukturi i načinu raspodele vode unutar emulzionog sistema, te je neophodno pažljivo razmotriti koncentraciju ovog aktivnog sastojka prilikom formulacije kozmetičkog proizvoda sa njom. Ispitivani emulgator se može smatrati dovoljno blagim i kompatibilnim sa liposomima (engl. *liposome-friendly*) i pogodnim za izradu stabilnih emulzionih nosača, prihvatljivih karakteristika u koje se mogu inkorporirati kozmetički aktivne supstance inkapsulirane u liposome. U emulzionim sistemima stabilizovanim lamelarnom fazom, liposomi su imobilisani unutar lamelarne faze i na taj način su mehanički stabilisani. Tokom procesa reformulacije emulzionih proizvoda, generalni faktorijalni eksperimentalni dizajn može pružiti značajne informacije, ne samo u vezi pojedinačnih uticaja različitih faktora, već i efekata njihovih interakcija na teksturne, reološke i senzorne karakteristike kozmetičkog proizvoda. Dodatno, generalni faktorijalni eksperimentalni dizajn omogućava

definisanje karakteristika sistema/kozmetičkog proizvoda u zavisnosti od njegovog sastava (odnos i vrsta upotrebljenih sastojaka) ili proizvodnog procesa, te pruža mogućnost izrade velikog broja različitih proizvoda unapređenih osobina, u značajno kraćem vremenskom periodu u odnosu na klasičan proces reformulacije, te bi mogao da bude prvi korak koji štedi i vreme i novac, odnosno alat za unapređenje i optimizaciju finalnih formulacija kozmetičkih proizvoda prema zahtevima/željama korisnika. Utvrđeni pristup koji kombinuje primenu generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna i instrumentalnih metoda, dovoljno je osetljiv i može se koristiti umesto određenih senzornih testova koji se vrše u procesu reformulacije kozmetičkih proizvoda (npr. diskriminativni senzorni testovi). Emulzije stabilisane novijim prirodnim mešanim emulgatorom APG tipa, sa ili bez inkorporiranih kozmetički aktivnih supstanci (liposomi sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže i skvalen) imaju zadovoljavajući bezbednosni profil. Ispitivani kozmetički aktivni sastojak - skvalen maslinovog ulja, je efikasan u kozmetičkim proizvodima namenjenim nezi i vlaženju zdrave kože, a ima pozitivan uticaj i na suhu i iritiranu (popravlja i obnavlja određena stanja kože). Efektu hidracije površine kože doprinosi i koloidna struktura emulzionog nosača, koju obrazuje prirodni mešani emulgator APG tipa, ali i skvalen kao emolijens, koji se ugrađuje u tu unutrašnju strukturu i čiji uticaj zavisi od upotrebene koncentracije u kremu.

Ključne reči: Liposomi, biljne matične ćelije, alkil poliglukozidni emulgatori, kritična micelarna koncentracija, lamelarni tečni kristali, reformulacija kozmetičkih proizvoda, tekstura, reološke osobine, eksperimentalni dizajn, *in vivo* biofizička merenja

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Kozmetologija

UDK broj: 615.49:[615.32:57.085(043.3)]

Cosmetic emulsion stabilized with a natural alkyl polyglucoside emulsifier containing liposome-encapsulated plant stem cells: study of interfacial phenomena and biophysical measurements on the skin

ABSTRACT

Introduction Liposomes, vesicular carriers, may improve cosmetic active ingredients' stability and efficacy, enable their continuous and localized release, but also contribute to increasing of the skin hydration and repairing of the skin barrier. However, the formulation of a stable, aesthetically acceptable and effective product with liposomes, especially product of the emulsion type is a demanding task. The greatest challenge in the formulation of the liposomal cosmetic product is the selection of appropriate carrier ingredients which will preserve the stability of liposomes, but also enable a product to meet consumer expectations in terms of sensory properties. The focus of a modern cosmetology is on mild, harmless, environmentally friendly, natural surfactants as stabilizers of emulsion carriers, like alkyl polyglucosides (APGs). APGs are not fully explored and there is no data on their compatibility with liposomes. Therefore, the investigation of a novel mixed APG emulsifier and especially research related to its compatibility with the liposomes in emulsion carrier, stability and efficacy testing of such product, together with the finding of an adequate methods/techniques, which would simplify the process of formulation and reformulation of these products, is a significant contribution to modern studies in the field of cosmetology.

Aim The aim of this work was: 1) to establish the critical micelle concentration (CMC) of the investigated mixed (two-component) emulsifier, to evaluate the emulsion stabilization mechanism of this new generation APG emulsifier (estimation of its phase behavior) and to monitor interactions between emulsifier and liposomes in the simple binary and ternary systems 2) to develop the liposomal cosmetic oil-in-water (O/W) complex emulsion system and to evaluate the compatibility of the emulsifier and liposomes in these systems; 3) to investigate the impact of the reformulation on developed creams (the addition of the vegetable squalene; change in the preparation method) on their rheological, textural and sensory characteristics using an experimental design; 4) to *in vivo* evaluate the irritation potential and efficacy of the developed liposomal creams.

Methods Experimental work was organized in IV phases: 1) CMC of the investigated mixed APG emulsifier Simulgreen™ 18-2, Seppic, France (INCI: *Hydroxystearyl alcohol and Hydroxystearyl glucoside*) was determined by the surface tension measurements with the use of tensiometer. Alongside, the physico-chemical characterization of selected cosmetic active substances - plant stem cells encapsulated in liposomes, was conducted by means of polarization microscopy, laser diffraction, conductivity and pH measurements, together with the evaluation of the investigated emulsifier phase behavior in binary and ternary systems and assessment of its compatibility with liposomes. 2) Model cosmetic emulsion carriers and model liposomal cosmetic emulsions stabilized with the investigated emulsifier were formulated, preparation procedure standardized, physico-chemical characterization (polarization microscopy, continual and oscillatory rheology, differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis), evaluation of the aesthetic, applicative and texture characteristics and estimation of the physical and chemical stability of cosmetic emulsions through the accelerated aging tests were performed. 3) The impact of reformulation factors (the change of the process parameters and products' composition) on the textural, rheological and consequently, sensory characteristics were evaluated by the means of general factorial experimental design. 4) Certain aspects of safety and efficacy were evaluated for the model carrier (placebo) and the model emulsions using *in vivo* non-invasive biophysical measurements of the skin.

Results Use of the tensiometer prove to be a suitable method to determine the critical micellar concentration of a novel natural APG mixed (two-component) emulsifier. Determined CMC value, 0.0085%, was not available in the scientific literature or manufacturers' specifications. It was confirmed that the dispersion of "dry" liposomes with encapsulated plant stem cells of Alp rose is suitable vehicle for this cosmetic active ingredient. Investigated APG emulsifier, hydroxystearyl alcohol and hydroxystearyl glucoside, did not solubilize or break the vesicles bilayer during their interaction in the simple ternary or in the complex emulsion systems. It was shown that the investigated emulsifier is compatible with liposomes and a suitable for the preparation of stable and aesthetically acceptable liposomal cosmetic emulsion carrier. The mechanism of liposomes stabilization in systems with a lamellar phase was shown as well as the impact of selected active ingredient on these colloidal carriers. A newer approach to

cosmetic products reformulation, which combines general factorial experimental design and instrumental methods - textural and rheological measurements proved to be a suitable first step towards optimization of the cosmetic products according to the requirements/expectations of consumers. The tested cosmetic emulsions stabilized with a novel natural mixed APG emulsifier, with or without Alp rose stem cells or squalene, showed satisfactory safety profile when applied to healthy and experimentally induced dry skin as well as efficacy in terms of hydration of the skin, the impact on skin barrier repairment and reducing signs of irritated skin. It was shown that olive oil squalene has a concentration-dependent impact on textural, rheological and sensorial characteristics of the product, but also on the emulsion carrier colloidal structure with lamellar phase as well as on the hydration potential of such system.

Conclusion Liposomes with Alp rose stem cells, as a newer cosmetic material, remained intact, in both, simple ternary and complex emulsion systems stabilized with a novel natural mixed emulsifier - hydroxystearyl alcohol and hydroxystearyl glucoside. The investigated active ingredient - water dispersion of Alp rose stem cells in liposomes, exhibits the concentration-dependent impact on the rheological behavior of the emulsion carriers stabilized with lamellar phase, with consequent change in the colloidal structure and distribution of water within the system and it is necessary to carefully consider the concentration of the formulation of the product with the aforementioned active substance. Investigated emulsifier can be considered as sufficiently mild and compatible with liposomes (*liposome-friendly*) and suitable for preparation of the stable and aesthetically acceptable emulsion carrier for cosmetic active substances encapsulated in liposomes. In the emulsion systems stabilized with lamellar phase, liposomes are immobilized within the lamellar phase and thus mechanically stabilized. During the emulsion reformulation, general factorial experimental design can provide significant information not only about the individual effects of different factors, but also the effects of their interactions on the textural, rheological and sensory properties of the product. In addition, general factorial experimental design allows defining characteristic of the system depending on its composition (the ratio and type of ingredients) or the production process. With the use of general factorial experimental design it is possible to produce a large number of different products of improved properties in a significantly shorter period of time

compared to the conventional process of reformulating. This could be the first time and money-saving step, that is a tool for improvement and optimization of the final formulation of cosmetic products according to the consumer demands/desires. Established approach that combines the use of general factorial experimental design and instrumental methods is sufficiently sensitive and can be used instead of certain sensory tests that are performed in the process of reformulating cosmetic products (eg. sensory discriminative tests). Emulsions stabilized with a novel natural mixed emulsifier of APG type, with or without cosmetic active substances (Alp rose stem cells in liposomes and squalene) have satisfactory safety profile. The investigated cosmetic active substance - olive oil squalene is efficient as active ingredient in cosmetic products intended for the care and moisturizing of the healthy skin and has a positive influence on dry and irritated skin (contributes to the repair and restoration of certain skin conditions). The emulsion carrier colloidal structure, formed by the natural mixed emulsifier of APG type, contributes to the skin hydration and squalene as an emollient, which is incorporated in the internal structure of the carrier and whose impact in the cream is concentration-dependent.

Keywords Liposomes, plant stem cells, alkyl polyglucoside emulsifiers, critical micelle concentration, lamellar liquid crystals, reformulation, texture, rheology, experimental design, *in vivo* biophysical measurements

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Cosmetology

UDK No: 615.49:[615.32:57.085(043.3)]

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. LIPOSOMI	3
1.1.1. Klasifikacija i karakterizacija liposoma	5
1.1.2. Kozmetički proizvodi sa liposomima.....	7
1.1.3. Problemi u formulaciji kozmetičkih proizvoda sa liposomima	9
1.2. MATIČNE ĆELIJE (ENGL. <i>STEM CELLS</i>).....	12
1.2.1. Biljne matične ćelije (engl. <i>Plant stem cells</i>).....	13
1.2.1.1. Tehnologija uzgajanja biljnih matičnih ćelija	14
1.2.1.2. Korišćenje biljnih matičnih ćelija u kozmetičkim proizvodima.....	16
1.2.1.3. Ekstrakt matičnih ćelija alpske ruže	18
1.2.2. Kozmetički efekti biljnih matičnih ćelija na koži	18
1.3. SURFAKTANTI I FENOMENI NA GRANICI FAZA ZNAČAJNI ZA FORMULACIJU KOZMETIČKIH PROIZVODA	24
1.3.1. Kritična micelarna koncentracija (KMK)	25
1.3.1.1. Određivanje kritične micelarne koncentracije.....	27
1.3.2. Fazno ponašanje i kritična micelarna koncentracija mešanih surfaktanata... 29	
1.3.3. Sposobnost solubilizacije	30
1.3.4. Sposobnost emulgovanja.....	31
1.3.4.1. Višefazni emulzioni sistemi stabilisani fazom tečnih kristala.....	32
1.3.4.1.1. Teorija gelske mreže	32
1.3.4.1.2. Metode za karakterizaciju tečnih kristala	34
1.4. ALKIL POLIGLUKOZIDI U SAVREMENIM KOZMETIČKIM EMULZIJAMA ZA NEGU KOŽE	37
1.4.1. Alkil (poli) glukozidi kao surfaktanti u istraživanjima svojstava ćelijske membrane	37
1.4.2. Alkil poliglukozidi kao emulgatori	41
1.4.2.1. Hydroxystearyl alcohol & Hydroxystearyl glucoside (INCI)	42
1.5. REFORMULACIJA KOZMETIČKIH PROIZVODA - RAZLOZI I PROBLEMI ZA KOZMETOLOGA	43
1.5.1. Eksperimentalni dizajn u procesu reformulacije kozmetičkih proizvoda	44

1.6. BIOFIZIČKE METODE <i>IN VIVO</i> PROCENE ODREĐENIH ASPEKATA BEZBEDNOSTI I EFEKATA KOZMETIČKIH PROIZVODA NA KOŽI	47
1.6.1. Metode za procenu transepidermalnog gubitka vlage iz kože	48
1.6.2. Metode za procenu vlažnosti kože	49
1.6.3. Metode za procenu mehaničkih svojstava kože	50
1.6.4. Metode za procenu boje kože	51
1.7. SENZORNA ANALIZA KOZMETIČKIH PROIZVODA.....	52
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	54
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	57
3.1. MATERIJALI I METODE	57
3.1.1. Materijali	57
3.1.2. Metode i oprema.....	60
3.1.2.1. Preformulaciona ispitivanja novijeg APG mešanog emulgatora i liposom-inkapsuliranih matičnih ćelija alpske ruže	60
3.1.2.1.1. Određivanje kritične micelarne koncentracije ispitivanog emulgatora	60
3.1.2.1.2. Izrada binarnih sistema i praćenje faznog ponašanja emulgatora....	61
3.1.2.1.2.1. Izrada binarnih sistema.....	61
3.1.2.1.2.2. Praćenje faznog ponašanja ispitivanog emulgatora u binarnim sistemima.....	62
3.1.2.1.3. Fizičko-hemijska karakterizacija liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže.....	62
3.1.2.1.4. Izrada ternarnih sistema i praćenje promena usled interakcije emulgator-liposomi	63
3.1.2.1.4.1. Izrada ternarnih sistema	63
3.1.2.1.4.2. Praćenje promena u sistemima zbog interakcije emulgator- liposomi.....	64
3.1.2.2. Formulacija U/V emulzija i ispitivanje kompatibilnosti APG emulgatora i liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže u složenim emulzionim sistemima kroz fizičko-hemijsku karakterizaciju i procenu stabilnosti model kozmetičkih U/V emulzija.....	64

3.1.2.2.1. Formulacija i izrada model APG emulzionih nosača uz dodatak različitih kozmetički značajnih koemulgatora/kostabilizatora	65
3.1.2.2.2. Procena fizičke stabilnosti, estetskih i aplikativnih karakteristika izrađenih model APG emulzionih nosača za liposome.....	66
3.1.2.2.3. Izrada i fizičko-hemijska karakterizacija model kozmetičkih emulzija sa liposomima	67
3.1.2.2.3.1. Izrada model kozmetičkih emulzija sa 0,4 i 1% (m/m) liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže.....	68
3.1.2.2.3.2. Fizičko-hemijska karakterizacija ispitivanih model liposomskih emulzija za negu kože	68
3.1.2.2.4. Procena fizičke stabilnosti izrađenih model liposomskih emulzija za negu kože	71
3.1.2.3. Reformulacija liposomskih emulzija za negu kože i ispitivanje uticaja faktora reformulacije na teksturne, reološke i senzorne karakteristike primenom generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna.....	72
3.1.2.3.1. Reformulacija i izrada kozmetičkih U/V emulzija sa liposomima ..	72
3.1.2.3.2. Generalni faktorijalni eksperimentalni dizajn.....	74
3.1.2.3.3. Teksturna analiza	79
3.1.2.3.4. Reološka merenja.....	79
3.1.2.3.5. Mikroskopska analiza	79
3.1.2.4. <i>In vivo</i> procena određenih aspekata bezbednosti i efikasnosti izabranih model liposomskih emulzija za negu kože	80
3.1.2.4.1. <i>In vivo</i> procena određenih aspekata bezbednosti ispitivanih uzoraka na koži.....	81
3.1.2.4.2. <i>In vivo</i> ispitivanje efikasnosti uzoraka liposomskih emulzija na koži	82
3.1.2.4.2.1. <i>In vivo</i> ispitivanje efikasnosti odabranih uzoraka na zdravoj koži (dugotrajna 21-dnevna studija).....	82
3.1.2.4.2.2. <i>In vivo</i> ispitivanje efikasnosti odabranih uzoraka na eksperimentalno indukovanoj suvoj koži.....	83
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	85
4.1. REZULTATI I DISKUSIJA I FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA.....	85

4.1.1. Preformulaciona ispitivanja kozmetičkih emulzija sa novijim APG mešanim emulgatorom i liposom-inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže	85
4.1.1.1. Preformulaciona procena interakcije liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže i APG mešanog emulgatora	85
4.1.1.2. Određivanje kritične micelarne koncentracije ispitivanog emulgatora i praćenje njegovog faznog ponašanja u binarnim sistemima	86
4.1.1.3. Fizičko-hemijska karakterizacija liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže i procena njihovog ponašanja u ternarnim sistemima (emulgator HSA i HSG - liposomi - prečišćena voda)	90
4.2. REZULTATI I DISKUSIJA II FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA	95
4.2.1. Fizičko-hemijska karakterizacija i procena stabilnosti model emulzionog nosača za liposome sa matičnim ćelijama alpske ruže.....	95
4.2.1.1. Fizičko-hemijska karakterizacija model emulzionog nosača i model kozmetičkih emulzija (kremova) sa liposomima.....	96
4.2.1.2. Procena stabilnosti model emulzionog nosača i model kozmetičkih emulzija (kremova) sa liposomima	105
4.3. REZULTATI I DISKUSIJA III FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA	108
4.3.1. Generalni faktorijalni eksperimentalni dizajn	108
4.3.2. Teksturna analiza.....	111
4.3.3. Kontinualna i oscilatorna reološka merenja	121
4.3.4. Mikroskopska analiza (veličina kapi)	134
4.4. REZULTATI I DISKUSIJA IV FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA	138
4.4.1. <i>In vivo</i> procena određenih aspekata bezbednosti i efikasnosti izabranih uzoraka model liposomskih emulzija za negu kože	139
4.4.1.1. <i>In vivo</i> procena bezbednosnog profila odabranih uzoraka emulzija na koži	139
4.4.1.2. <i>In vivo</i> ispitivanje efikasnosti odabranih uzoraka na koži.....	142
4.4.1.2.1. <i>In vivo</i> ispitivanje efikasnosti odabranih uzoraka na zdravoj koži (dugoročna 21-dnevna studija)	142
4.4.1.2.2. <i>In vivo</i> ispitivanje efikasnosti odabranih uzoraka na eksperimentalno indukovanoj suvoj koži.....	148
5. ZAKLJUČAK.....	153

6. LITERATURA.....	158
7. PRILOZI.....	170

1. UVOD

Liposomi kao vezikularni nosači koji stabilizuju kozmetički i dermatološki aktivne supstance, mogu poboljšati penetraciona svojstva i efikasnost aktivnih supstanci, omogućiti njihovo produženo i lokalizovano oslobađanje, ali i povećati vlažnost kože (Rahimpour i Hamishehkar, 2012), te su permanentno u fokusu formulatora kozmetičkih proizvoda. Međutim, formulacija stabilnog, estetski prihvatljivog i efikasnog proizvoda sa liposomima je i danas izazovan zadatak. Prva prepreka je fizička i hemijska nestabilnost samih vezikula, što može uticati na stabilnost gotovog liposomskog kozmetičkog proizvoda. Tokom izrade, stabilnost liposoma se donekle može povećati izborom odgovarajućih sastojaka (Patel i Panda, 2012; Pierre i Costa, 2011; Kulkarni, 2005), što komplikuje proizvodnju i značajno podiže cenu liposomske disperzije. U proizvodnji kozmetičkih proizvoda, praktičnije je koristiti instant liposome u vidu praška sa inkapsuliranim kozmetički aktivnim sastojcima (KAS), koji se mogu dodati/inkorporirati u izabrani nosač. Primer takvih "gotovih" aktivnih sastojaka jesu liposomi sa biljnim matičnim ćelijama, preciznije ekstraktima biljnih matičnih ćelija, interesantnim, ali nedovoljno ispitanim KAS.

Imajući u vidu važan podatak da u toku roka upotrebe proizvoda sa liposomima može doći do promene njihove veličine (usled agregacije ili fuzije) ili hidrolize, lipidne peroksidacije i curenja aktivnih supstanci iz vezikula (Himanshi i sar., 2015), najveći izazov u formulaciji proizvoda ostaje izbor odgovarajućih sastojaka nosača koji će očuvati stabilnost liposoma. Najčešće tehnološko rešenje jeste izrada hidrofilnih gelova sa liposomima, međutim, ni ovaj pristup nije efikasan u svim slučajevima (Kulkarni, 2005; Elnaggar i sar., 2014). Dodatno, sa aspekta primene, gelovi kao kozmetički proizvodi, nisu pogodni za dugoročnu upotrebu, kao ni za sve tipove kože. Mnogo pogodniji proizvodi u smislu objedinjene efikasnosti, estetskih i senzornih karakteristika, su emulzioni sistemi, odnosno kremovi i mleka (Lukic i sar., 2012), koji i predstavljaju najzastupljenije kozmetičke proizvode za negu kože.

Formulacija kozmetičkih emulzija sa liposomima/kozmetičkih liposomskih emulzija poteže novo pitanje - izbor odgovarajućih emulgatora. Izabrani emulgatori mogu uticati na strukturu liposoma, njihov integritet, stabilnost i permeabilnost, mogu povećati tendenciju ka agregaciji i fuziji ili čak dovesti do potpune solubilizacije

vezikula (Kulkarni, 2005). Imajući u vidu brojne studije koje su se bavile ispitivanjem promena izazvanih solubilizacijom fosfolipidnih liposoma različitim surfaktantima (Maza i sar., 1996; 1997; Ribosa i sar., 1997; López i sar, 2001a; 2001b; 2002), kao najpodesniji emulgatori u formulaciji emulzionih proizvoda sa liposomima, ističu se alkil poliglukozidi, posebno noviji mešani emulgatori, za koje u literaturi još nema rezultata ispitivanja.

Alkil poliglukozidi (APG) su biodegradabilni, nejonski emulgatori niske toksičnosti i ekološki prihvatljivi. Dodatno, APG su blagi za kožu (engl. *skin-friendly*) i imaju sposobnost zadržavanja vode i građenja lamelarne faze slične onoj koja se može videti u najpovršnijem sloju kože, *stratum corneum*-u (Lukic i sar., 2013b; Savic i sar., 2005; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011). Sa druge strane, noviji, prirodni *skin-friendly* APG mešani emulgator, INCI naziva - *Hydroxystearyl alcohol and Hydroxystearyl glucoside*, ima jednu hidroksilnu grupu (-OH) više u strukturi masnog alkohola, što može pozitivno uticati na efekat hidracije i senzorne karakteristike proizvoda (Markovic-Bogdanovic, 2014).

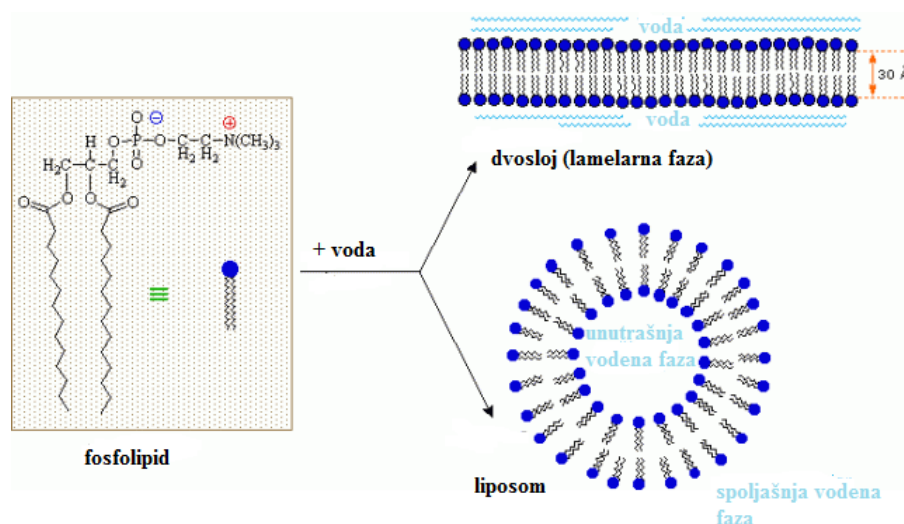
Pored formulacije kozmetičkih proizvoda, usled praćenja trendova, ali i poštovanja zahteva važećih propisa (Uredba EU 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima), koja se kontinuirano dopunjuje i menja, u kozmetičkoj industriji (vrlo) često postoji potreba reformulacije postojećih proizvoda. Čak i mala promena u sastavu ili izradi kozmetičkog proizvoda, može se odraziti na njegove fizičko-hemijske i senzorne karakteristike, te i prihvatljivost od strane korisnika. Brz uvid u to da li će reformulacija proizvoda imati uticaj na senzorne karakteristike može dati senzorna procena (Kempisar., 2009). Međutim, senzorna analiza ima bitne nedostatke - dužina trajanja i cena ovih studija, kao i subjektivna procena dobrovoljaca (Gilbert i sar., 2013a). U cilju prevazilaženja tih nedostataka, značajno je ispitati i mogućnosti upotrebe jeftinijih i jednostavnih instrumentalnih metoda, ali dovoljno preciznih, poput reoloških i teksturnih merenja, čiji se rezultati mogu dovesti u vezu sa određenim senzornim osobinama, te bi potpuno ili bar delimično, mogle zameniti senzornu analizu u procesu reformulacije određenih kozmetičkih proizvoda.

Da bi obezbedila kvalitet, bezbednost i efikasnost funkcionalnih kozmetičkih proizvoda, ali i odgovorila brojnim zahtevima korisnika, kozmetička industrija fokus

stavlja kako na razvoj novih kozmetički aktivnih sastojaka (KAS), tako i na razvoj novih ili kombinovanje postojećih nosača KAS. Dodatno, veliki napor se ulaže na pronalaženje metoda i tehnika ili njihovo kombinovanje, koje bi pojednostavile postupak formulacije i reformulacije kozmetičkih proizvoda uopšte, i istovremeno smanjile troškove tih procesa. Pronalaženje pogodnog stabilizatora (emulgatora) za liposomske emulzije, kao i načina da se proces formulacije i reformulacije takvog proizvoda pojednostavi, što je i predmet ove doktorske disertacije, bio bi značajan doprinos savremenim ispitivanjima u oblasti kozmetologije.

1.1. Liposomi

Liposomi su fosfolipidni, biodegradabilni i biokompatibilni vezikularni sistemi (Rahimpour i Hamishehkar, 2012). Otkriveni su oko 1965. godine kada je britanski hematolog dr Bangham opisao pojavu da tečni kristali lecitina u kontaktu sa vodom obrazuju strukture veoma slične biološkim membranama (Slika 1) (Vanić, 2012; Aparajita i Ravikumar, 2014). Nakon primene na koži povećavaju sadržaj vlage u njenom površinskom sloju, dok se kao koloidni nosači koriste za stabilizaciju kozmetičkih i dermatoloških aktivnih supstanci, ali i za poboljšanje penetracije i permeacije supstanci značajnih za lokalnu dermatoterapiju, ujedno obezbeđujući produženo i lokalizovano otpuštanje lekova i KAS (Rahimpour i Hamishehkar, 2012).



Slika 1. Shematski prikaz obrazovanja liposoma (Vanić, 2012)

Liposomi su sferične strukture sastavljene iz jednog (ili većeg broja) lipidnog dvosloja, koji okružuje jezgro ispunjeno vodom. Specifična struktura ovih vezikula čini ih pogodnim nosačima za jedinjenja različitih fizičko-hemijskih karakteristika - hidrofilne aktivne supstance mogu se inkorporirati u hidrofilnu unutrašnjost, a lipofilna i amfifilna jedinjenja mogu se ugraditi u liposomski lipidni dvosloj (Swami i sar., 2015). Dok se kod prvih generacija liposoma lipidni dvosloj sastojao isključivo od prirodnih lipida, danas se za izradu ovih vezikula koriste i sintetski lipidi i surfaktanti (Bozzuto i Molinari, 2015). Relativna fluidnost i pokretljivost svakog molekula lipida unutar lipidnog dvosloja, čini ove vezikule polupropustljivim, što je i jedna od glavnih karakteristika ćelijske membrane (Monteiro i sar., 2014). Zbog morfološke sličnosti sa ćelijskom membranom, liposomi deluju kao veoma pogodni nosači aktivnih supstanci (Bozzuto i Molinari, 2015) i permanentno su u fokusu istraživača i formulatora različitih proizvoda, uključujući i kozmetičke proizvode.

Liposomi imaju široku primenu, koriste se kao modeli u proučavanju svojstava ćelijske membrane, kao nosači lekovitih supstanci u lokalnoj dermatološkoj terapiji (tretman akni, alopecije, vitiliga, melazme, psorijaze, atopijskog dermatitisa) i farmaceutskoj industriji (liposomski lekovi za sistemska antimikrobna terapija, za terapiju respiratornih oboljenja, malignih oboljenja, kao nosači antigena u vakcinama i u genskoj terapiji), kozmetičkoj industriji i industriji hrane, u istraživanjima u oblasti biohemije i molekularne biologije, u analitici itd. (Monteiro i sar., 2014; Rahimpour i Hamishehkar, 2012; Himanshi i sar., 2015). Tabela 1 daje prikaz prednosti i mana liposoma kao nosača aktivnih supstanci namenjenih nanošenju na koži (Rahimpour i Hamishehkar, 2012).

Tabela 1. Prednosti i nedostaci vezikularnih nosača za primenu na koži (Rahimpour i Hamishehkar, 2012)

Prednosti	Nedostaci
Netoksični, biodegradabilni nosači	Visoki troškovi proizvodnje
Pogodni nosači hidrofilnih i lipofilnih jedinjenja	Curenje aktivne supstance iz liposoma
Zaštita i povećanje stabilnosti inkapsuliranih supstanci	Slaba rastvorljivost
Smanjenje neželjenih efekata inkapsuliranih jedinjenja	Hemijska nestabilnost (oksidacija i hidroliza lipidnog dvosloja)
Produženo i lokalizovano oslobađanje inkapsuliranih supstanci	Fizička nestabilnost (promena veličine liposoma i distribucije po veličini usled agregacije i fuzije)
Povećana penetracija jedinjenja u/kroz kožu	Inkompatibilnost sa većinom surfaktanata koji se koriste u kozmetičkim proizvodima, ali i sa alkoholom
Povećanje hidratisanosti <i>stratum corneum</i> -a usled okluzije od strane lipidnog dvosloja	
Mogućnost da se koži nadoknade fiziološki lipidi i popravi stanje kožne barijere	

1.1.1. Klasifikacija i karakterizacija liposoma

Efikasnost liposoma kao nosača aktivnih supstanci zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika lipidnog dvosloja, prirode sirovina koje ulaze u sastav dvosloja i njihove organizacije, veličine vezikula i površinskog naelektrisanja (Bozzuto i Molinari, 2015), te se liposomi mogu razlikovati po veličini, sastavu, površinskom naelektrisanju, lamelarnosti i načinu izrade (Vishvakrama i sar., 2014). Najznačajnija klasifikacija liposoma (Tabela 2) izvršena je na osnovu strukture, odnosno veličine vezikula i broja lipidnih dvosloja (Rahimpour i Hamishehkar, 2012). Na veličinu liposoma, koja se može kretati od 20 nm do nekoliko μm , kao i na lamelarnost, direktno utiče izabrani metod, odnosno postupak izrade (Swami i sar., 2015).

Tabela 2. Klasifikacija liposoma na osnovu veličine i lamelarnosti vezikula (Rahimpour i Hamishehkar, 2012)

Tip vezikule (liposoma)	Skraćenica u literaturi	Prečnik	Broj lipidnih dvosloja
Unilamelarne vezikule	UV	Širok raspon veličina	Jedan
Male unilamelarne vezikule	SUV	20-100 nm	Jedan
Srednje unilamelarne vezikule	MUV	> 100 nm	Jedan
Velike unilamelarne vezikule	LUV	> 100 nm	Jedan
Gigantske unilamelarne vezikule	GUV	> 1 μm	Jedan
Oligolamelarne vezikule	OLV	0,1-1 μm	Oko 5
Multilamelarne vezikule	MLV	> 0,5 μm	5-25
Multi vezikularne vezikule	MV	> 1 μm	Zavisi od pojedinačnih vezikula

Karakterizacija liposoma može se vršiti uz pomoć fizičkih, hemijskih i bioloških metoda, pri čemu obim karakterizacije svakako zavisi od namene liposoma (Swami i sar., 2015). U Tabeli 3 su prikazani najčešći parametri koji se prate i uređaji koji se koriste prilikom karakterizacije liposoma za primenu na koži (Garg i Goyal, 2014; Pradhan i sar., 2016).

Tabela 3. Metode/tehnike karakterizacije liposoma za primenu na koži (Garg i Goyal, 2014; Pradhan i sar., 2016)

Parametar karakterizacije	Uređaj za karakterizaciju
Fizička karakterizacija	
Oblik i morfologija	Elektronska mikroskopija (TEM, SEM), mikroskopija atomskih sila (AFM), nuklearna magnetna rezonanca (NMR), difrakcija X zraka pod malim uglom, polarizaciona mikroskopija
Lamelarnost	Nuklearna magnetna rezonanca (NMR), difrakcija X zraka pod malim uglom (SAXD), TEM (uz tehniku lomljenja zamrznutog uzorka, engl. <i>freeze fracture technique</i>)
Veličina i distribucija po veličini	Svetlosna mikroskopija, fluorescentna mikroskopija, TEM, SEM, metoda rasipanja svetlosti (DLS), laserska difrakcija (LD)
Efikasnost inkapsulacije	Ultracentrifugiranje, dijaliza, elektronska spinska (paramagnetna) rezonanca
Fazno ponašanje	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC), konfokalna fluorescentna mikroskopija, Raman spektroskopija
Hemijska karakterizacija	
Koncentracija fosfolipida	Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC)
Koncentracija holesterola	Test sa holesterol oksidazom
Oksidacija fosfolipida	Gasnotečna hromatografija (GLC)
pH	pH metar

1.1.2. Kozmetički proizvodi sa liposomima

Liposomi, prazni ili sa inkapsuliranim KAS i liposomski kozmetički proizvodi, dugo su u upotrebi u kozmetičkoj industriji. KAS koje se najčešće inkapsuliraju u liposome su: antioksidansi (vitamin E i C, koenzim Q₁₀, karotenoidi (lutein,

betakaroten, likopen), flavonoidi (kvercetin, hesperidin, naringenin), izoflavoni (genistein, daidzein), glutation, N-acetilcistein, lipoijska kiselina itd.), alfa i beta hidroksi kiseline, depigmentišuća sredstva, UV filteri, peptidi, biljni ekstrakti, biljna ulja itd. Liposomi su permanentno u fokusu formulatora kozmetičkih proizvoda, ne samo kao nosači KAS, već i zbog određenih prednosti i potvrđenih kozmetičkih efekata: stvaraju film na površini kože, smanjuju transepidermalni gubitak vode i povećavaju vlažnost kože, vrše nadoknadu lipida neophodnih za hidraciju kože, "snabdevaju" kožu linolenskom i linolnom kiselinom, popravljaju kožnu barijeru, odlažu/usporeavaju starenje kože (pozitivnim efektom na hidraciju kože) (Laouini i sar., 2012; Aparajita i Ravikumar, 2014; Arsić, 2005).

Prvi liposomski kozmetički proizvod - "*anti-ageing*" gel proizvođača Christian Dior, Francuska pod nazivom Capture®, pojavio se 1986. godine. Danas se na tržištu mogu naći mnogi liposomski kozmetički proizvodi tipa hidrogela, kremova ili losiona, različite namene: kozmetički proizvodi za negu kože, "*anti-ageing*" proizvodi, proizvodi za zaštitu kože od UV zračenja i negu kože nakon sunčanja, proizvodi za negu kose (kondicioneri), parfemi koji se duže zadržavaju na koži (engl. *long lasting perfumes*), proizvodi za negu kože posle brijanja, proizvodi dekorativne kozmetike/make-up proizvodi (ruževi), proizvodi za veštačko tamnjenje kože, anticelulit proizvodi itd. (Laouini i sar., 2012, Li i sar., 2011, Arsić, 2005). Primeri nekih liposomskih kozmetičkih proizvoda sa tržišta dati su u Tabeli 4 (Laouini i sar., 2012; Li i sar., 2011).

Tabela 4. Primeri liposomskih kozmetičkih proizvoda sa tržišta (Laouini i sar., 2012; Li i sar., 2011)

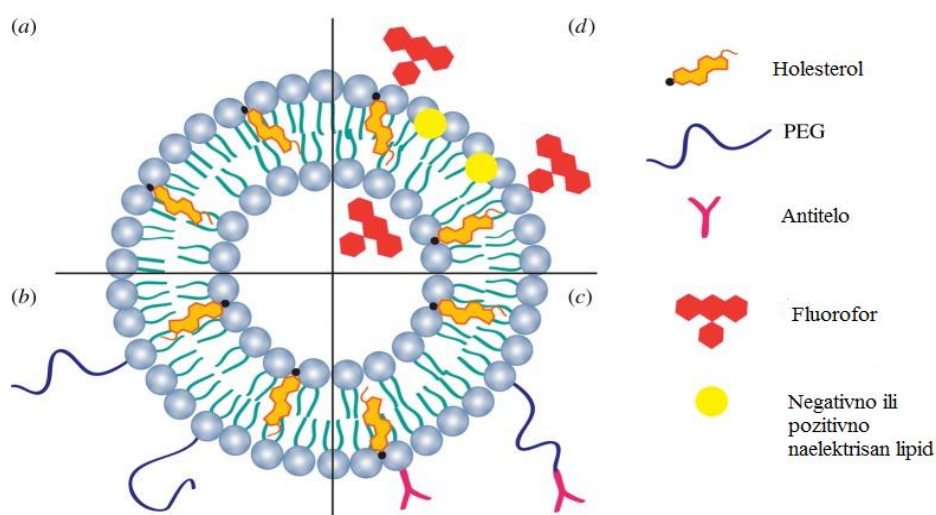
Zaštićeno ime proizvoda	Proizvođač	KAS	Namena
<i>Capture®</i>	Christian Dior, Francuska	Prazni liposomi	"Anti-ageing"
<i>Future Perfect Skin Gel®</i>	Estée Lauder, SAD	Vitamin E, A, cerebrosid, ceramidi	"Anti-ageing"
<i>Advanced Night Repair Synchronized Recovery Complex®</i>	Estée Lauder, SAD	Liposomi sa ekstraktom biljke <i>Arabidopsis thaliana</i>	"Anti-ageing"
<i>Flawless Finish®</i>	Elisabeth Arden, SAD	Prazni liposomi	Dekoratívna kozmetika (tečni puder)
<i>Clearly It!® Complexion Mist</i>	Kara Vita, SAD	Liposomi sa biljnim uljima	Nega kože sklone aknama
<i>Royal Jelly Lift Concentrate</i>	Jafra cosmetics, SAD	Liposomi sa matičnim mlečom	"Anti-ageing"
<i>Formule® Liposome Gel</i>	Payot, Francuska	Liposomi sa hijaluronskom kiselinom	"Anti-ageing"
<i>Revitalift®</i>	L'Oréal, Francuska	Liposomi sa retinolom	"Anti-ageing"
<i>Daylong™</i>	Galderma-Spirig, Švajcarska	Prazni liposomi	Zaštita kože od sunca, nega kože nakon sunčanja
<i>"C" Complexe with Oxyzomes</i>	Pevonia Botanica, Velika Britanija	Liposomi sa vitaminom C	"Anti-ageing"

1.1.3. Problemi u formulaciji kozmetičkih proizvoda sa liposomima

Glavni problem formulacije stabilnog proizvoda sa liposomima jeste njihova fizička i hemijska nestabilnost. Fizička stabilnost samih vezikula može se popraviti tokom izrade izborom odgovarajućih, dodatnih, sastojaka potrebnih za izgradnju

lipidnih dvosloja (npr. holesterol, sintetski fosfolipidi, polimerizovani lipidi) (Patel i Panda, 2012) ili vezivanjem velikih polimera za površinu vezikula (Pierre i Costa, 2011; Kulkarni, 2005). Sa druge strane, hemijska stabilnost se donekle može povećati dodavanjem antioksidanasa (npr. tokoferol, BHT) i kompleksirajućih sredstava (npr. EDTA) u disperziju vezikula, čuvanjem disperzije u atmosferi inertnog azota ili u praškastom stanju (liofilizacija liposoma uz korišćenje krioprotektanta, engl. *freeze drying*) (Monteiro i sar., 2014). Međutim, sve navedeno dodatno komplikuje proizvodnju i značajno podiže cenu liposomske disperzije.

Na Slici 2 prikazana su tehnološka rešenja povećanja stabilnosti prilikom izrade liposoma (preuzeto iz Monteiro i sar., 2014).



Slika 2. Prikaz tehnoloških pristupa u izradi liposoma (a) konvencionalni (fosfolipidni) liposomi sa holesterolom; (b) sterno stabilizovani (tzv. stelt liposomi, engl. *stealth*) liposomi; (c) ligand-vezani liposomi; (d) fluorescentni i naelektrisani liposomi (Monteiro i sar., 2014)

Izneti podaci govore o rešavanju problema fizičke i hemijske nestabilnosti liposoma, što rešavaju proizvođači kozmetičkih sirovina - nude "suve"/instant liposome/proliposome, komercijalne, jeftinije i dovoljno stabilne, konvencionalne fosfolipidne liposome sa inkapsuliranim kozmetički aktivnim supstancama (KAS), koji se mogu dodati u izabrani nosač i koje je ipak praktičnije koristiti u proizvodnji

kozmetičkih proizvoda. **Primer takvih "gotovih" aktivnih sastojaka jesu liposomi sa biljnim matičnim ćelijama, interesantnim, ali nedovoljno ispitanim KAS.**

Poseban problem u formulaciji liposomskih kozmetičkih proizvoda je očuvati liposome u kozmetičkom proizvodu, koji često sadrži surfaktante (emulgatore), a nestabilnost membrana liposoma je izražena i u prisustvu alkohola, kao sastojka nekih kozmetičkih proizvoda.

Problem koji se može javiti tokom izrade kozmetičkog proizvoda, čak i sa inicijalno stabilnim liposomima, jeste stabilnost vezikula u gotovom proizvodu. U toku roka upotrebe proizvoda sa liposomima, može doći do promene njihove veličine usled agregacije ili fuzije. Takođe, može doći do oksidacije i hidrolize lipidnih dvosloja, te i curenja aktivnih supstanci iz liposoma (Himanshi i sar., 2015).

Iz tog razloga, postoje stalni pokušaji da se unapredi stabilnost gotovih proizvoda sa liposomima. Najveći formulacioni izazov ostaje izbor odgovarajućih sastojaka, posebno surfaktanta/surfaktanata kao i adekvatnog nosača koji će očuvati strukturu liposoma (neće narušiti stabilnost dvoslojnih membrana vezikula).

Najčešće tehnološko rešenje koje se koristi u cilju izbegavanja neželjene fuzije vezikula u finalnom proizvodu jeste inkorporiranje disperzije liposoma u prethodno izrađen hidrofilni gel ili dodavanje sredstva za geliranje direktno u disperziju (Kulkarni, 2005; Elnaggar i sar., 2014). Na ovaj način odgovarajući ugušćivač gradi umreženu koloidnu strukturu u tečnoj fazi proizvoda koja imobilizuje liposome i sprečava ili smanjuje mogućnost njihove interakcije koja bi vodila ka fuziji, te posledično produžava rok trajanja liposoma (Elnaggar i sar., 2014). Premda, u nekim slučajevima ovaj pristup može biti neuspešan (ne može se uvek efikasno sprečiti fuzija; neželjena interakcija na nivou ugušćivač-liposomi može takođe dovesti do povećanja veličine vezikula) (Kulkarni, 2005; Elnaggar i sar., 2014), geli se ipak smatraju najpodesnijim nosačima liposoma. **Međutim, sa aspekta primene, ova vrsta nosača uglavnom nije pogodna za dugotrajnu negu, kao ni za sve tipove kože.** Mnogo podesniji nosači u smislu objedinjene efikasnosti, estetskih i aplikativnih karakteristika jesu emulzioni sistemi (Lukic i sar., 2012).

Pored problema vezanih za izbor odgovarajućih masnih komponenata (primena više različitih komponenata), sredstava za povećanje viskoziteta, humektansa (najčešće glicerol), konzervansa, antioksidansa (BHT, BHA, tokoferol) i mirisa (Adamović, 2016), formulacija emulzionih proizvoda sa liposomima povlači dodatno pitanje - izbor odgovarajućeg emulgatora neophodnog za stabilizaciju emulzionog sistema. S obzirom na to da se stabilizacija uglavnom postiže upotrebom jednog ili češće nekoliko surfaktanata, oni mogu imati izraziti uticaj na strukturu, integritet, stabilnost i permeabilnost liposoma, mogu povećati tendenciju ka agregaciji i fuziji ili čak dovesti do kompletne solubilizacije ovih vezikula (Kulkarni, 2005).

Dostupne su brojne studije koje se bave ispitivanjem promena izazvanih solubilizacijom fosfolipidnih liposoma (pojednostavljenih modela ćelijske membrane u proučavanju njenih svojstava) različitim surfaktantima (Maza i sar., 1996; 1997; Ribosa i sar., 1997; López i sar, 2001a; 2001b; 2002), koje pružaju dobru perspektivu kada je u pitanju izbor odgovarajućeg stabilizatora za emulzione sisteme sa liposomima. Navedeni autori su vršili ispitivanja sa sledećim surfaktantima iz grupe alkil (poli) glukozida: oktil glukozid, nonil glukozid, decil glukozid, undecil glukozid, dodecil glukozid, APG A (C9-C11, stepen polimerizacije 1,3), APG B (C8-C16, stepen polimerizacije 1,4), dodecil maltozid. Ispitivani nejonski surfaktanti su često korišćene površinski aktivne materije u studijama koje se bave proučavanjem svojstava membrane jer su opisani kao blagi surfaktanti koji ne izazivaju denaturaciju proteina, netoksični i ekološki prihvatljivi. **Zbog morfološke sličnosti liposoma sa ćelijskom membranom, može se pretpostaviti da alkil (poli) glukozidi mogu biti pogodni, potencijalni stabilizatori liposomskih emulzionih sistema.**

1.2. Matične ćelije (engl. *Stem cells*)

Matične ćelje (MĆ) su dugo živeće, neprogramirane ćelije sposobne da se diferenciraju do ćelija sa određenom, specifičnom funkcijom. Ono što MĆ čini jedinstvenim jeste sposobnost samoobnavljanja i proliferacije, kao i sposobnost diferenciranja u zrelije, specijalizovane ćelije (Schmid i sar., 2008; Dahl, 2012).

Ljudi i životinje imaju dve vrste matičnih ćelija: embrionalne i odrasle (somatske). Embrionalne MĆ nalaze se u embrionu i imaju ključnu ulogu u prvim fazama razvoja organizma. To su pluripotentne ćelije koje imaju sposobnost stvaranja

svih tkiva i organa u humanom i animalnom organizmu. Odrasle (somatske) ćelije mogu se izolovati iz tela nakon embriogeneze, iz postembrionalnih tkiva. To su nediferencirane, samoobnavljajuće, multipotentne ćelije koje imaju sposobnost stvaranja više tipova diferenciranih ćelija karakterističnih za određeno tkivo, organ ili fiziološki sistem (npr. epidermalne, neuralne, hematopoetske MĆ). Ove ćelije se najčešće dele i diferenciraju kao odgovor na povredu - u cilju obnavljanja i oporavljanja tkiva (Dahl, 2012; Schmid i sar., 2008).

Matične ćelije se nalaze u specijalizovanoj mikrookolini (tzv. "niša", engl. *niche*) okružene diferenciranim ćelijama. Pomenuta mikrookolina stvara određene signale koji utiču na deobu i diferencijaciju MĆ - mogu je ubrzati ili usporiti (Dahl, 2012). Takođe, unutar samih MĆ postoje određeni signali, tzv. epigenetski faktori, koji kontrolišu sudbinu ovih ćelija (Schmid i sar., 2008). Disbalans epigenetskih faktora može dovesti do abnormalnog rasta ili gubitka sposobnosti deobe, kao i abnormalne diferencijacije tkiva, zbog čega je održavanje ravnoteže i zaštita ovih faktora ključno za normalno funkcionisanje i razvoj samog tkiva (Schürch i sar., 2008).

1.2.1. Biljne matične ćelije (engl. *Plant stem cells*)

I biljke poseduju matične ćelije (MĆ): matične ćelije apikalnog meristema izdanka i apikalnog meristema korena. Deoba i diferencijacija biljnih MĆ, kao i kod humanih i animalnih ćelija, pokreće se signalima iz mikrookruženja i epigenetskim faktorima iz samih ćelija. Međutim, razlika u odnosu na humane ili animalne jeste u tome što su biljne odrasle MĆ totipotentne i imaju sposobnost regenerisanja cele biljke. Sa druge strane, diferencirane biljne ćelije imaju i sposobnost ponovnog vraćanja u stanje matične ćelije (sposobnost dediferenciranja) (Schmid i sar., 2008). Biljne MĆ u citozolu sadrže i različite metabolite (šećeri, proteini, aminokiseline, soli, kiseline, polifenolna jedinjenja itd.) koji istovremeno štite i održavaju epigenetske faktore (Schürch i sar., 2008).

Još jedna bitna karakteristika biljaka je i sposobnost menjanja biohemijskih i metaboličkih procesa kao odgovor na promenu uslova sredine, odnosno sposobnost prilagođavanja rasta i razvoja uslovima životne sredine. Biljke imaju sposobnost da iniciraju deobu ćelija svih tkiva i organa, da se regenerišu i da pokrenu različite puteve biosinteze i razvoja kao odgovor na stresne uslove (Barbulova i sar., 2014).

1.2.1.1. Tehnologija uzgajanja biljnih matičnih ćelija

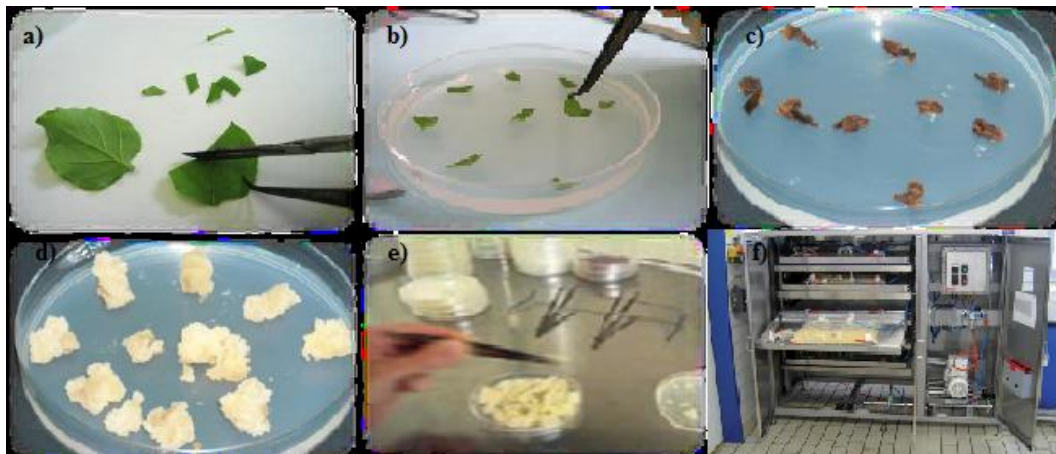
Tehnologija uzgajanja ćelija biljnih tkiva upravo se zasniva na pomenutim prednostima – sposobnosti prilagođavanja uslovima životne sredine i podsticanju biljnih matičnih ćelija (MĆ) da proizvedu celu biljku, određeno biljno tkivo ili samo pojedine ćelije u kulturi, u cilju prikupljanja njihovih sekundarnih metabolita – zaštitnih jedinjenja koja doprinose adaptaciji biljke. Na ovaj način postiže se uzgajanje biljnog materijala u sterilnim i kontrolisanim uslovima, bez ograničavajućih uticaja klime, godišnjeg doba ili zemljišta i uz mogućnost produkcije većih koncentracija metabolita (Schmid i sar., 2008), što kao rezultat ima dobijanje standardizovanih i bioodrživih proizvoda bez kontaminanata čija se proizvodnja lako može podići na industrijski nivo (Barbulova i sar., 2014).

Kultura biljnih matičnih ćelija može biti dobijena iz bilo kog biljnog tkiva (Barbulova i sar., 2014).

Prvi korak uzgajanja ćelija biljnih tkiva jeste odabir odgovarajućeg materijala, nakon čega se vrši njegova sterilizacija, usitnjavanje do mikroskopskih veličina (dobijanje tzv. eksplanta) i postavljanje u petri šolju sa čvrstom hranljivom podlogom (Skotnicka-Graca, 2014). Na Slici 3 prikazan je primer uzgajanja biljnih matičnih ćelija lista biljke. Kao posledica povrede, biljne ćelije na ivicama povređenog lista prolaze fazu dediferenciranja, odnosno vraćanja u stadijum MĆ, nakon čega kreće njihova deoba i nastajanje mase - kalusa totipotentnih MĆ analognih MĆ meristema (Slika 3c) (Schmid i sar., 2008; Schürch i sar., 2008). Dobijeni kalus se prenosi u tečni medijum sa odgovarajućim nutrijentima potrebnim za ćelijski metabolizam (saharoza, biljni hormoni, vitamini i minerali). Uzgajanjem kalusa u tečnom medijumu dobija se suspenzija brzo rastućih kultura pojedinačnih ćelija ili manjih klastera ćelija (Slika 3d) (Barbulova i sar., 2014). Variranjem sastava nutrijenata u medijumu moguće je dobiti različite linije ćelija koje se razlikuju po sastavu metabolita. Dalje se vrši selekcija (Slika 3e), odnosno biraju se linije ćelija najboljih biohemijskih i metaboličkih karakteristika (najproduktivnije ćelije sa najkraćim vremenom deobe) (Skotnicka-Graca, 2014).

Izabrane linije ćelije se mogu upotrebiti za dobijanje ekstrakta kulture matičnih ćelija koji se u kozmetičkoj industriji koriste kao aktivni sastojci ili se dalje uzgajaju

pod sterilnim i kontrolisanim uslovima u cilju povećanja prinosa (engl. *scaling up*) u odgovarajućim bioreaktorima (Slika 3f) (Schürch i sar., 2008).



Slika 3. Uzgajanje biljnih matičnih ćelija: (a) uzorak sterilisanog biljnog materijala, (b) postavljanje uzorka u petri šolju sa čvrstom podlogom i indukcija kalusa, (c) nastajanje kalusa, (d) nastajanje novih ćelijskih linija, (e) selekcija, (f) bioreaktor za proizvodnju na veliko (IRB, 2014)

Ekstrakti kultura biljnih matičnih ćelija za upotrebu u kozmetičkoj industriji se najčešće izrađuju na nekoliko načina (Skotnicka-Graca, 2014):

1. prvo se vrši prehomogenizacija suspenzije kultura ćelija sa gotovim liposomima, odgovarajućim konzervansom i antioksidansom, zatim homogenizacija dobijene suspenzije pod visokim pritiskom prilikom koje dolazi do oštećenja zida biljnih matičnih ćelija, curenja sadržaja i istovremene inkapsulacije liposolubilnih komponenata u dvosloj liposoma, dok hidrosolubilne komponente ostaju rastvorene u vodenoj fazi ekstrakta (dobijanje tečnog ekstrakta);
2. homogenizacija čiste suspenzije kultura ćelija prilikom koje dolazi do curenja sekundarnih metabolita iz ćelija nakon čega se vrši filtriranje i ekstrakcija sadržaja, standardizacija ekstrakta i uparavanje (dobijanje suvog ekstrakta);

3. nakon homogenizacije vrši se dispergovanje kompletne suspenzije kultura matičnih ćelija u glicerinu biljnog porekla, bez dodavanja konzervanasa (dobijanje tečnog ekstrakta).

1.2.1.2. Korišćenje biljnih matičnih ćelija u kozmetičkim proizvodima

Prednosti korišćenja uzgajanih biljnih matičnih ćelija kao izvora aktivnih supstanci, u odnosu na gajene biljke, su brojne: kontinuirano dobijanje svežeg biljnog materijala nezavisno od doba godine i reproduktivne faze biljaka; uslovi uzgajanja se lako mogu standardizovati tako da se izbegnu varijacije između proizvedenih serija; dobijeni biljni materijal ne sadrži patogene, niti kontaminante životne sredine; dobijeni biljni materijal ne sadrži toksična jedinjenja i ne sadrži ili sadrži minimalno potencijalnih alergena, jer ćelije u kulturi nisu izložene biotičkom stresu, te u njima nema sinteze odbrambenih jedinjenja; proizvodni sistem je veoma održiv: nije potrebno poljoprivredno zemljište, što znači manju potrošnju vode i manje otpadnog materijala, sakupljanje biljnog materijala (eksplanta) za iniciranje uzgajanja ne umanjuje prirodne resurse; raznolikost – dobijanje različitih kultura ćelija uzevši da se koncentracija željenih jedinjenja može povećati i optimizovati promenom uslova kultivisanja, fizičkih parametara i različitih inicijatora u medijumu za kultivisanje; proces ekstrakcije je lakši i vremenski manje zahtevan; ekstrakt kulture biljnih matičnih ćelija sadrži širi spektar aktivnih supstanci i u većim koncentracijama od ekstrakta gajenih biljaka; ekstrakt kulture biljnih matičnih ćelija se koriste u manjim koncentracijama, te manje utiču na boju i miris gotovog kozmetičkog proizvoda (Barbulova i sar., 2014; Prhal i sar., 2014).

Potreba da se proces dobijanja kulture optimizuje za svaku biljnu vrstu i svako tkivo posebno, mogla bi biti ograničenje tehnologije uzgajanja biljnih matičnih ćelija (Prhal i sar., 2014).

Zbog navedenih prednosti, tehnologijom uzgajanja biljnih matičnih ćelija razvijene su i proizvedene brojne kozmetički aktivne supstance. Primer biljnih matičnih ćelija i kozmetičkih proizvoda sa tržišta koji ih sadrže, dat je u Tabeli 5 (IRB, Italija, Katalog; Mibelle Biochemistry, 2010).

Kao posebno interesantne i među prvim uzgajanim, ističu se **matične ćelije alpske ruže**.

Tabela 5. Primeri najpoznatijih ekstrakata biljnih matičnih ćelija i kozmetičkih proizvoda sa tržišta (IRB, Italija, Katalog; Mibelle Biochemistry, 2010)

Naziv ekstrakta	INCI naziv	Proizvođač	Očekivani efekat	Kozmetički proizvod sa tržišta
PhytoCellTec™ Alp Rose	Rhododendron Ferrugineum Leaf Cell Culture Extract, Isomalt, Lecithin, Sodium Benzoate, Lactic Acid, Aqua	Mibelle Biochemistry, Švajcarska	Zaštita matičnih ćelija kože od UV zračenja, <i>anti-wrinkle</i> efekat	<i>Hydra perfect day cream</i> , Dahlia, Beograd <i>Skin Booster Anti UV Stress Serum</i> , Biodroga MD, Nemačka
PhytoCellTec™ Malus Domestica	Malus Domestica Fruit Cell Culture, Xanthan Gum, Glycerin, Lecithin, Phenoxyethanol, Aqua	Mibelle Biochemistry, Švajcarska	Pospešuje vitalnost matičnih ćelija kože	<i>MP Anti age</i> , Medical Plants kreativna laboratorija, Požega <i>Apple Brightening Serum</i> , My Chelle dermaticals, SAD
PhytoCellTec™ Argan	Argania Spinosa Callus Culture Extract, Isomalt, Lecithin, Sodium Benzoate, Aqua	Mibelle Biochemistry, Švajcarska	Zaštita i obnavljanje ćelija kože, <i>anti-wrinkle</i> efekat	<i>Rejuvenating face cream</i> , Bielenda professional, Poljska
Gardenia Stems GX™	Glycerin, Gardenia Jasminoides Meristem Cell Culture, Xantan Gum	I.R.B., Italija	Sprečava razgradnju i stimuliše sintezu novog kolagena	<i>Intensely Rejuvenating Eye Cream</i> , Eveline cosmetics, Poljska

1.2.1.3. Ekstrakt matičnih ćelija alpske ruže

Matične ćelije alpske ruže (MĆAR, engl. *Alp Rose stem cells, ARSC*) dobijaju se tehnologijom uzgajanja matičnih ćelija iz listova alpske ruže (lat. *Rhododendron Ferrugineum*). Alpska ruža je zimzelena biljka koja raste na velikim visinama (oko 2000 m) na Alpima i na vrlo kiselom zemljištu koje je siromašno u nutrijentima. Ovaj zimzeleni grm može da živi preko 100 godina i u stanju je da se, zahvaljujući sintezi određenih metabolita, adaptira na izuzetno teške uslove životne sredine kao što su velike varijacije u temperaturi, visoko UV zračenje i smanjen sadržaj vlage u zemljištu. Listovi alpske ruže sadrže različita polifenolna jedinjenja koja deluju antioksidativno i “vezuju” slobodne radikale, dok se proteini dehidriraju sintetišu kao odgovor na niske temperature i smanjen sadržaj vlage (Mibelle Biochemistry, 2010).

Kozmetički aktivan sastojak (KAS) PhytoCellTec™ Alp Rose (proizvođač Mibelle Biochemistry, Švajcarska) predstavlja ekstrakt kulture matičnih ćelija lista alpske ruže koji je naknadno inkapsuliran u lecitinske liposome. Navedena KAS je dostupna u vidu hidrosolubilnog granulata sledećeg sastava (INCI): *Rhododendron Ferrugineum Leaf Cell Culture Extract, Isomalt, Lecithin, Sodium Benzoate, Lactic Acid, Aqua*, preporučene koncentracije za korišćenje u sastavu kozmetičkih i dermokozmetičkih proizvoda od 0,4 do 1% (m/m) (Mibelle Biochemistry, 2010).

Ekstrakt kulture MĆ koristi se za izradu ove KAS dobija se nakon oštećenja zida ćelija postupkom homogenizacije pod visokim pritiskom uz istovremeno inkapsuliranje liposolubilnih komponenata u dvosloj lecitinskih liposoma. Na ovaj način se postiže potpuno korišćenje celokupnog ekstrakta, odnosno dobija se vodena disperzija sa rastvorenim hidrosolubilnim komponentama kulture MĆ koja sadrži liposome u kojima su liposolubilna jedinjenja (Schürch i sar., 2008). Pripremljeni ekstrakt se dalje pažljivo prska na granulatu od izomalta (Mibelle Biochemistry, 2010).

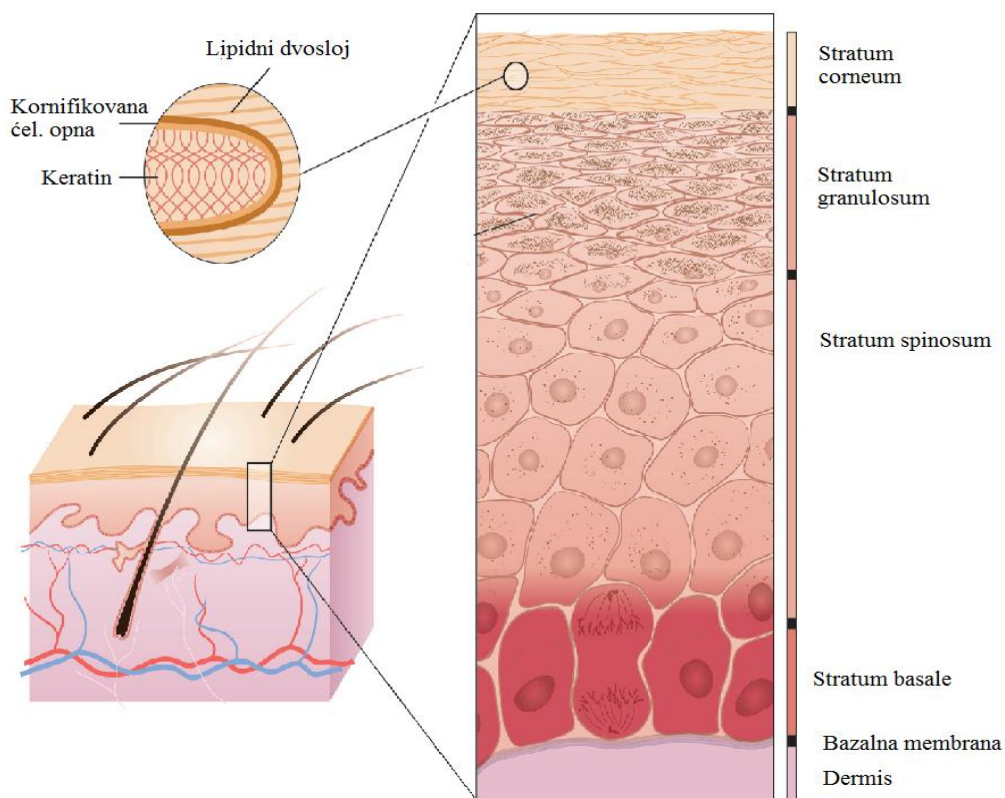
1.2.2. Kozmetički efekti biljnih matičnih ćelija na koži

Koža je najveći organ čovekovog tela i kontinuirano se samoobnavlja. Čine je tri sloja (epidermis, dermis i hipodermis) i obavlja niz funkcija - učestvuje u metabolizmu, termoregulaciji, neuroreceptorni je organ i deo imunološkog sistema (Lalević-Vasić i sar., 2010). Ipak, glavna funkcija kože jeste zaštitna. Stvarajući barijeru prema spoljašnjoj sredini, koža štiti organizam od negativnih spoljašnjih uticaja (hemijska

sredstva, UV zračenje, toplota, hladnoća, infekcije). Ova barijera između organizma i spoljašnje sredine nije jednosmerna, te sprečava i preterano (nekontrolisano) odavanje vode i elektrolita iz organizma (Baroni i sar., 2012).

Prvu liniju odbrane kože čini epidermis, površinski deo kože koji se neprekidno samoobnavlja, izgrađen od nekoliko tipova ćelija raspoređenih u slojevima (Slika 4). Glavna funkcija epidermisa jeste zaštita kože od gubitka vode i elektrolita i od potencijalno štetnih uticaja spoljašnje sredine, stvaranjem fizičke, hemijske, biohemijske i imunološke barijere (Baroni i sar., 2012).

Dominantne ćelije u strukturi epidermisa jesu keratinociti. Ove ćelije prolaze proces diferencijacije i keratinizacije (stvaranja keratina) od bazalnog do granuloznog sloja u kome gube jedro i organele i transformišu se u ćelije *stratum corneum*-a (SC) ispunjene keratinom (korneocite) (Slika 4).



Slika 4. Struktura epidermisa (Serge, 2006)

Fizičku barijeru kože, koja se opire gubitku vode i elektrolita, kao i penetraciji hidrosolubilnih jedinjenja u/kroz kožu, uglavnom obezbeđuje *stratum corneum* (SC), prvi sloj kože i ujedno poslednji stupanj u diferencijaciji epidermisa (Baroni i sar., 2012). SC čini oko 25 redova mrtvih, pljosnatih ćelija, ispunjenih gusto zbijenim keratinskim filamentima. Barijerna svojstva ovog sloja posledica su specifične strukture koja se u literaturi najčešće opisuje modelom "cigle i maltera", gde su korneociti (cigle) uronjeni u intercelularni lipidni matriks (malter) (Slika 5) (Menon i sar., 2012).



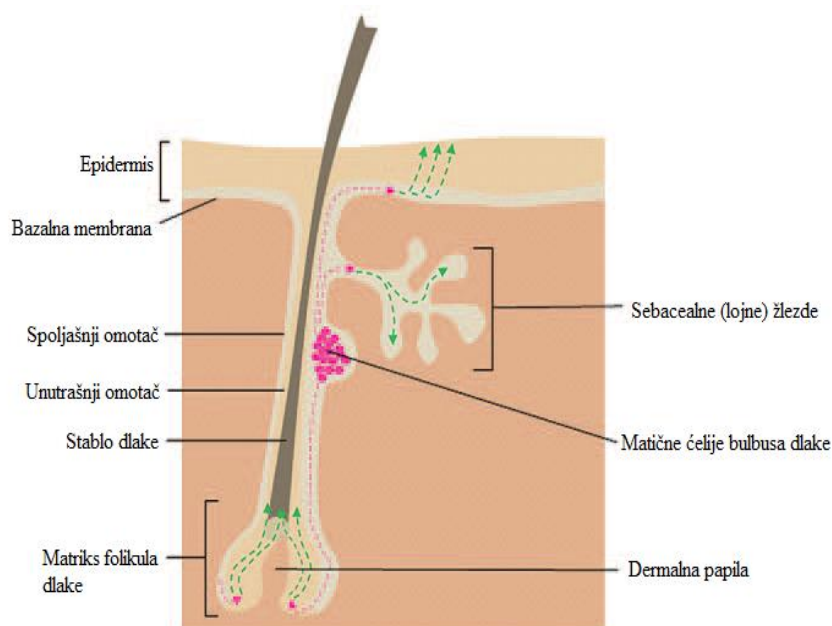
Slika 5. Struktura *stratum corneum*-a model "cigle i maltera" (Menon i sar., 2012)

Lipidni matriks SC je heterogenog sastava i čine ga: ceramidi, holesterol, slobodne masne kiseline, estri holesterola i holesterol-sulfat. Nedostatak bilo kog od lipida ima za posledicu promene u barijernoj funkciji kože koje se manifestuju povećanim odavanjem vode sa njene površine (Menon i sar., 2012).

Pored lipidnog matriksa, barijerna funkcija SC zavisi i od kiselog omotača (hidro-lipidnog filma) na njegovoj površini koji se formira od znoja i sebuma. Ovaj film održava fiziološku bakterijsku floru površine kože i sprečava pojavu infekcija, ali ima i značajnu ulogu u pokretanju određenih enzimski kontrolisanih procesa uključenih u obnavljanje površinskog sloja kože (Baroni i sar., 2012).

Bazalni sloj (*stratum basale*) epidermisa - ciljno mesto delovanja matičnih ćelija alpske ruže

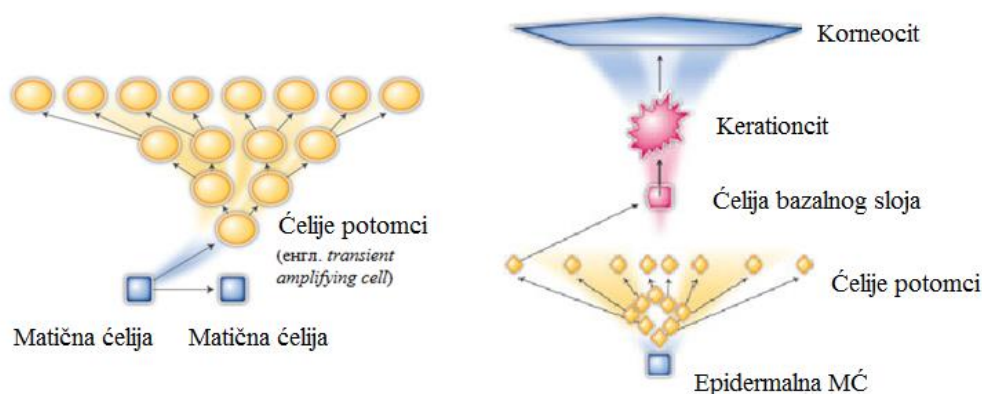
S obzirom na to da se potpuno diferencirane ćelije epidermisa, korneociti, sa površine zdrave kože uklanjaju procesom deskvamacije približno svakih 28 dana, neophodna je njihova zamena novim, diferenciranim ćelijama (Schmid i sar., 2008; Baroni i sar., 2012). Kontinuirano samoobnavljanje i zamena uklonjenih ćelija novim moguće je, zahvaljujući prisustvu epidermalnih matičnih ćelija (MĆ) u bazalnom sloju (*stratum basale*, SB) zone bazalne membrane. Epidermalne MĆ, kao i MĆ folikula dlake i sebacealnih žlezdi, potiču od multipotentnih MĆ bulbosa dlake (Slika 6). Iz bulbosa dlake, matične ćelije periodično migriraju do matriksa folikula dlake, sebacealnih žlezdi i do bazalnog sloja epidermisa (prikazano isprekidanim linijama roze boje), gde stvaraju unipotentne ćelije progenitore koje diferenciraju u ćelije dlake, ćelije sebacealnih žlezdi i ćelije bazalnog sloja interfolikularnog epidermisa – keratinocite (isprekidane linije zelene boje) (Schmid i sar., 2008).



Slika 6. Poreklo epidermalnih matičnih ćelija (Schmid i sar., 2008)

Bazalni sloj epidermisa (Slika 4) sastoji se iz dve različite vste ćelija: 1) unipotentnih sporo-delećih epidermalnih melanocitnih MĆ koje imaju sposobnost samoobnavljanja i diferenciranja u samo jedan tip ćelija (čine do 7% ćelija ovog sloja) i 2) brzo-delećih nematičnih ćelija potomaka (Schmid i sar., 2008; Dahl, 2012).

Epidermalne MĆ bazalnog sloja dele se asimetričnom deobom (Slika 7). Deobom jedne MĆ nastaje nova multipotentna MĆ koja ostaje u bazalnom sloju i jedna nematična - ćelija potomak (engl. *transient amplifying cell*). Ćelija potomak prolazi kroz ograničeni broj simetričnih deoba (maksimalno pet deoba) pre odvajanja od bazalne membrane i diferencijacije do specijalizovanih ćelija SC (korneociti) (Dahl, 2012).



Slika 7. Asimetrična deoba epidermalnih MĆ bazalnog sloja (Dahl, 2012)

Ponekad, uslovi (npr. povreda tkiva) zahtevaju brzo stvaranje diferenciranih ćelija. Tada se matične ćelije bazalnog sloja dele simetričnom (proliferativnom) deobom, odnosno od jedne matične ćelije nastaju dve, zatim od svake matične ćelije nastaju dve ćerke ćelije (dva nematična potomka) koje se dalje dele i diferenciraju u cilju zamene oštećenih ćelija i zarastanja tkiva (Dahl, 2012).

Neodgovarajuća simetrična deoba, smanjena vitalnost, preuranjeno starenje ili apoptoza epidermalnih MĆ je glavni razlog starenja kože (Schmid i sar., 2008; Dahl, 2012). Životni vek MĆ se značajno skraćuje dejstvom negativnih uticaja spoljašnje

sredine, koji mogu dovesti do oštećenja DNK, skraćivanja telomera ili oksidativnog stresa (Baroni i sar., 2012).

Stoga, zaštita i očuvanje epidermalnih MĆ je od velikog značaja.

Uloga matičnih ćelija alpske ruže u zaštiti epidermalnih matičnih ćelija

Odgovarajuća strategija za očuvanje MĆ bi bila očuvanje njihove aktivnosti i zaštita signala, koji odlučuju o sudbini ovih ćelija (epigenetski faktori), od negativnih spoljašnjih uticaja.

Prema proizvođaču ove kozmetičke sirovine, matične ćelije alpske ruže (MĆAR) sadrže specifične epigenetske faktore i sekundarne metabolite poput polifenolnih jedinjenja (hiperozid, miricetin, kemferol, kvercetin, rododendron) i protektivnih proteina bogatih glicinom (dehidrini) zahvaljujući kojima povećavaju otpornost humanih MĆ kože, štite ih od negativnih spoljašnjih uticaja, poboljšavaju regeneraciju epidermalnih ćelija, popravljaju barijernu funkciju kože i imaju određene *anti-aging* efekte (Mibelle Biochemistry, 2010).

Potrebno je istaći da su sve tvrdnje proizvođača o eventualnim efektima pomenute KAS većinom rezultat *in vitro* ispitivanja na izolovanim kulturama humanih ćelija. Da bi pomenuti efekti bili ispoljeni i u *in vivo* uslovima, epigenetski faktori i sekundarni metaboliti MĆAR moraju stići do ciljnih mesta delovanja u bazalnom sloju epidermisa. Stoga, liposomi u koje je ekstrakt kulture MĆAR inkapsuliran, mogli bi biti pogodan primarni nosač za ovu KAS, pod uslovom da u kozmetičkom proizvodu ostanu neoštećeni i neizmenjenih osobina.

Premda vrlo interesantne i dostupne na tržištu, biljne matične ćelije, preciznije njihovi ekstrakti, te i MĆ alpske ruže, slabo su istražene i dalje predstavljaju nepoznanicu.

1.3. Surfaktanti i fenomeni na granici faza značajni za formulaciju kozmetičkih proizvoda

Surfaktantni (engl. *surface-active-agents*; površinski aktivne materije ili tenzidi) su jedinjenja koja zahvaljujući specifičnoj hemijskoj strukturi, kada su prisutna u niskim koncentracijama u sistemima, imaju svojstvo adsorbovanja na graničnim površinama/međupovršinama između čvrste, tečne i gasovite faze i značajnog menjanja površinske/međupovršinske energije (Rosen, 2004; Vuleta i sar., 2012).

Kao amfifilna jedinjenja, surfaktantni se sastoje iz dva dela sa suprotnim osobinama: hidrofobnog – nepolarnog repa (najčešće zasićeni/nezasićeni alkil ili alkilaril lanac) i hidrofilne - polarne glave koja može biti jonska (anjonska ili katjonska), nejonska ili amfoterna (Zana, 2005; Florence i Attwood, 2006). Navedena strukturna različitost surfaktanata utiče na njihovo ponašanje u sistemima, kao i na graničnim površinama/međupovršinama, ali pruža i široke mogućnosti primene ovih jedinjenja (Romsted, 2014).

Rastvaranjem amfifilnog jedinjenja u vodi dolazi do povećanja slobodne energije sistema usled kontakta hidrofobnih delova molekula amfifila i vode. U ovim uslovima, odgovor sistema će biti takav da kontakt između hidrofobnih grupa i vode svede na minimum (Rosen, 2004).

Tako, rastvaranjem surfaktanta u vodi, hidrofobne grupe molekula amfifila narušavaju strukturu vode – dovode do raskidanja vodoničnih veza između molekula vode i njihovog strukturiranja oko hidrofobnih lanaca surfaktanta, što značajno povećava slobodnu energiju sistema (Rosen, 2004). U cilju smanjenja energetske nepovoljnog kontakta između hidrofobnih lanaca surfaktanta i vode, dolazi do adsorbovanja molekula surfaktanta na graničnoj površini voda-vazduh tako da hidrofobni (nepolarni) deo molekule bude usmeren ka vazduhu, a hidrofilni (polarni) ka vodi. Ova adsorpcija monomolekularnog filma surfaktanta na graničnoj površini voda-vazduh dovodi do smanjenja površinskog napona vode (Rosen, 2004; Zana, 2005). S obzirom na to da smanjenje površinskog napona direktno zavisi od zamene molekula rastvarača na graničnoj površini molekulima surfaktanta, te i od koncentracije surfaktanta na tim međupovršinama, smanjenje površinskog napona surfaktantima je jedno od najznačajnijih fenomena na granici faza (Rosen, 2004).

Bitno je istaći da površinska aktivnost surfaktanta značajno zavisi od njegove hemijske strukture – povećanje dužine hidrofobnog (ugljovodoničnog) lanca u molekuli surfaktanta, povećava njegovu površinsku aktivnost. Sa druge strane, povećanje hidrofilnosti molekula surfaktanta dovodi do smanjenja njegove površinske aktivnosti (Florence i Attwood, 2006).

Na sličan način, surfaktanti se adsorbuju na zidovima posude koja sadrži vodeni rastvor surfaktanta (granična površina čvrsto-tečno), pri čemu adsorpcija zavisi od vrste surfaktanta, prirode posude, kao i vodenog rastvora (pH rastvora, prisustva elektrolita, temperature) (Zana, 2005; Rosen, 2004).

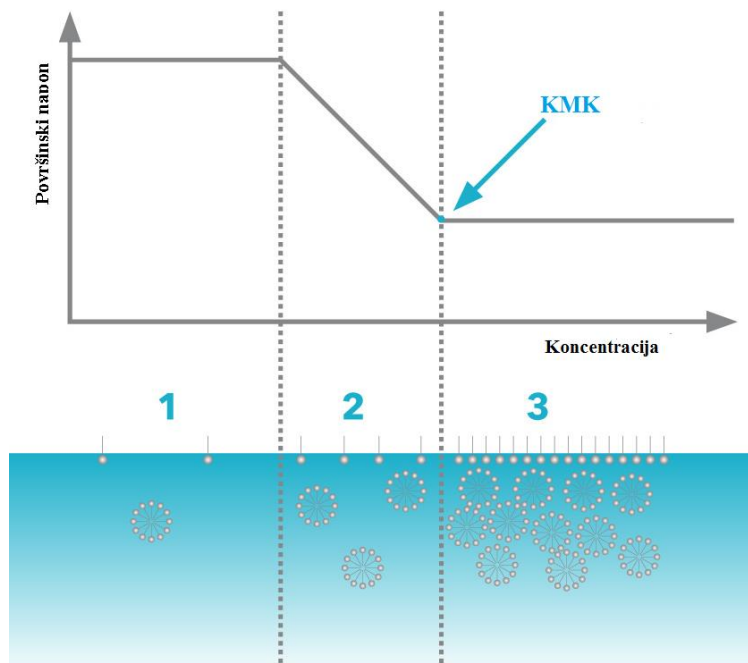
Dalji porast koncentracije surfaktanta u vodenom rastvoru prati zasićenje graničnih površina ovim molekulima i samoorganizovanje surfaktanta u različite strukture u zavisnosti od prisutne koncentracije PAM (Demus i sar., 1998).

1.3.1. Kritična micelarna koncentracija (KMK) (engl. Critical micelle concentration, CMC)

Sa porastom koncentracije surfaktanta u vodenom rastvoru prvo dolazi do porasta njegove koncentracije na obe granične površine/međupovršine (vodeni rastvor-vazduh i zidovi posude-vodeni rastvor), a zatim i do zasićenja ovih površina surfaktantom. Sa daljim porastom koncentracije raste slobodna energija sistema usled energetski nepovoljnih interakcija na relaciji hidrofobni lanci surfaktanta-voda i dostizanjem tzv. kritične micelarne koncentracije (KMK), molekuli surfaktanta u vodenom rastvoru kreću u samoudruživanje i građenje agregata kako bi sprečili dalji porast energije (Slika 8). Ovo samoudruživanje je spontano i reverzibilno i pokreću ga hidrofobne interakcije između lanaca surfaktanta i težnja vode da smanji kontakt sa hidrofobnim lancima (Zana, 2005).

Prvi agregati koji nastaju pomenutim samoorganizovanjem, pri kritičnoj micelarnoj koncentraciji, jesu sferične micle kod kojih su hidrofobni lanci u kontaktu gradeći hidrofobno jezgro, dok su hidrofilni delovi surfaktanta na površini ovih agregata. Ovakva struktura micela sprečava kontakt između hidrofobnih lanaca surfaktanta i vode, te su micle termodinamički stabilni sistemi. Micle su u ravnoteži sa slobodnim molekulima surfaktanta (monomerima) u vodenom rastvoru, te se u

micelarnom rastvoru konstantno vrši razmena između molekula surfaktanta u micelama i monomera surfaktanta u rastvoru (Zana, 2005).



Slika 8. Kriva zavisnosti površinskog napona i koncentracije surfaktanta u rastvoru: (1) pri vrlo niskim koncentracijama surfaktanta može se detektovati zanemarljivo mala promena površinskog napona; (2) sa daljim porastom koncentracije raste koncentracija molekula surfaktanta na graničnoj površini i dolazi do zapaženog smanjenja površinskog napona; (3) pri kritičnoj micelarnoj koncentraciji granična površina voda-vazduh je zasićena i sa daljim porastom koncentracije nema promene površinskog napona (Biolin Scientific, 2016).

Pri koncentraciji bliskoj KMK micide su sferične. Sa porastom koncentracije surfaktanta u vodenom rastvoru, micide rastu i menjaju oblik (postaju štapićaste ili diskoidne) (Zana, 2005), pri čemu oblik direktno zavisi od geometrije molekula surfaktanata (Florence i Attwood, 2006). U koncentrovanim vodenim rastvorima, molekuli određenih surfaktanata grade liotropne tečne kristale – mezofaze koje mogu imati različitu strukturu (heksagonalnu, kubičnu, lamelarnu) (Zana, 2005). Za razliku od sferičnih micela koje su izotropne, lamelarna i heksagonalna mezofaza su anizotropne i mogu se detektovati u sistemima upotrebom polarizacije mikroskopije (Rosen, 2004).

1.3.1.1. Određivanje kritične micelarne koncentracije

Određivanje vrednosti kritične micelarne koncentracije (KMK) može se vršiti merenjem bilo koje merljive fizičke osobine koja zavisi od veličine i broja čestica ili molekula u rastvoru. Ipak, određivanje KMK najčešće se vrši merenjem površinskog napona, provodljivosti, rasipanja svetlosti ili fluorescentnom spektroskopijom, a zatim crtanjem krivih zavisnosti praćenog parametra i koncentracije surfaktanta u rastvoru. Na osnovu oblika krive zavisnosti može se odrediti KMK kao tačka pri kojoj kriva menja oblik (tačka prekida krive) (Rosen, 2004; Vuleta i sar., 2012).

Vrednost KMK u vodenom rastvoru zavisi od prirode (jonski/nejonski surfaktanti) i dužine alkil lanca surfaktanta, prisustva elektrolita, organskih jedinjenja ili druge tečne faze u rastvoru i temperature rastvora (Rosen, 2004; Zana, 2005).

Vrednost kritične micelarne koncentracije u vodenom rastvoru opada sa porastom hidrofobnog karaktera molekula surfaktanta. Tako, sa porastom broja ugljenikovih atoma do 16 u alkil lancu surfaktanta, opada vrednost KMK (Zana, 2005; Rosen, 2004). Kada ugljenikovih atoma u nerazgranatom lancu surfaktanta ima od 16 do 18, vrednost KMK više ne opada toliko izraženo, dok se kod surfaktanata sa preko 18 ugljenikovih atoma u hidrofobnom lancu KMK praktično više ne menja. U pojedinim slučajevima, pogotovo kada hidrofobni lanac surfaktanta ima preko 16 ugljenikovih atoma, moguće je detektovati drugi prekid u krivi zavisnosti, odnosno drugu KMK koja ukazuje na promenu micelarne strukture - oblika micela surfaktanta u vodenom rastvoru (Rosen, 2004).

Uvođenje polarnih grupa, poput –OH (hidroksilne grupe), u hidrofobni lanac molekula surfaktanta dovodi do značajnog povećanja vrednosti KMK u vodenom rastvoru surfaktanta na sobnoj temperaturi (Rosen, 2004).

Određivanje kritične micelarne koncentracije merenjem površinskog napona

Merenje smanjenja površinskog napona je jedno od najčešće merenih svojstava surfaktanata u rastvoru (Rosen, 2004), te i jedna od najkorišćenijih metoda za određivanje kritične micelarne koncentracije (Abe, 2004).

Molekuli na površini tečnosti imaju veću potencijalnu energiju od molekula unutar tečnosti, jer su privlačne sile između molekula na površini i molekula unutar tečnosti veće nego privlačne sile između molekula tečnosti i molekula gasovite faze (vazduha). Zbog ove razlike u potencijalnim energijama neophodno je utrošiti rad, čija je vrednost jednaka razlici potencijalnih energija, da bi molekuli iz unutrašnjosti tečnosti prešli na njenu površinu. Mera tog rada je zapravo površinski napon – minimalna količina rada koja je potrebna da bi dovoljna količina molekula prešla iz unutrašnjosti na površinu tečnosti, po jedinici površine (Rosen, 2004), odnosno sila koja deluje pod pravim uglom na površinu tečnosti dužine 1 m (Florence i Attwood, 2006).

Određivanje KMK merenjem površinskog/međupovršinskog napona najčešće se vrši uz pomoć tenziometra (Slika 9), korišćenjem metode prstena ili ploče. Merenje napona se vrši na osnovu sile kvašenja koja deluje na merni instrument (prsten/ploča) (Krüss, 2016).



Slika 9. Tenziometar (Krüss, 2016)

Prvo se, uranjanjem prstena ili ploče u rastvor surfaktanta, meri površinski napon serije vodenih rastvora surfaktanta rastućih koncentracija, a zatim crta kriva zavisnosti površinskog napona i koncentracije surfaktanta. Na osnovu oblika krive zavisnosti površinskog napona i koncentracije surfaktanta u rastvoru, može se odrediti KMK kao tačka pri kojoj kriva menja oblik (tačka prekida krive) (Abe, 2004). Najniža koncentracija pri kojoj se izgled krive menja, a ne opada sa daljim porastom koncentracije surfaktanta, odgovara kritičnoj micelarnoj koncentraciji.

1.3.2. Fazno ponašanje i kritična micelarna koncentracija mešanih surfaktanata

U praksi, u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, kao sredstva za čišćenje/pranje (deterdženti), emulgatori, kvaseća i peneća sredstva, češće se koriste smeše surfaktanata, nego pojedinačni surfaktanti.

Dva osnovna svojstva smeše surfaktanata jesu građenje mešanog monomolekuskog sloja surfaktana na površini rastvora i mešanih micela unutar rastvora (Rosen, 2004).

Dva surfaktanta u smeši mogu interagovati tako da je kritična micelarna koncentracija (KMK) smeše jednaka srednjoj vrednosti zbira pojedinačnih KMK, da je manja od pojedinačnih KMK (sinergizam) ili da je veća od pojedinačnih KMK (antagonizam) (Rosen, 2004).

I u slučaju mešanih emulgatora koji se sastoje iz surfaktanta i masnog alkohola, fazno ponašanje je drugačije u odnosu na ponašanje pojedinačnih površinski aktivnih materija – dolazi do stvaranja mešanih monoslojeva na međupovršini, kao i mešanih micela u rastvoru (Rosen, 2004). U vodenim rastvorima mešanih surfaktanata koji su slične strukture i ne razlikuju se značajno po dužini hidrofobnih lanaca, dolazi do tzv. idealnog mešanja – ravnomernog raspoređivanja prilikom adsorbovanja na graničnim površinama/međupovršinama, kao i prilikom formiranja mešanih micela (Abe, 2004).

U većini slučajeva, kritična micelarna koncentracija mešanih surfaktanata ima znatno nižu vrednost u odnosu na KMK čistih surfaktanata (Biresaw i Mittal, 2013).

1.3.3. Sposobnost solubilizacije

Jedno od bitnih svojstava surfaktanata, koje je u direktnoj vezi sa sposobnošću građenja micela, jeste solubilizacija (micelizacija). Solubilizacija se može definisati kao proces spontanog rastvaranja jedinjenja (čvrstog, tečnog ili gasovitog) do koga dolazi prilikom kontakta jedinjenja sa micelama surfaktanta u rastvoru. Na ovaj način se smanjuje termodinamička aktivnost jedinjenja koje je solubilizovano i dobija se termodinamički stabilan, izotropni rastvor (Rosen, 2004; Vuleta i sar., 2012).

Ukoliko bi se formirala kriva zavisnosti rastvorljivosti nekog jedinjenja i koncentracije surfaktanta koji dovodi do solubilizacije datog jedinjenja, uočilo bi se da je solubilizacija vrlo mala dok se ne dostigne kritična koncentracija surfaktanta u rastvoru. Ta kritična koncentracija, pri kojoj solubilizacija raste skoro linearno sa koncentracijom surfaktanta, je zapravo kritična micelarna koncentracija (Rosen, 2004).

Sposobnost solubilizacije zavisi od prirode surfaktanta i njegove hemijske strukture, prirode solubilizata (solubilizovanog jedinjenja) i temperature sistema. Generalno, sa porastom hidrofobnog lanca surfaktanta, raste i sposobnost solublizacije. Sposobnost solubilizacije u većini slučajeva raste i sa povećanjem hidrofinitosti molekula surfaktanta (Rosen, 2004).

U većini slučajeva solubilizacija je poželjan proces i ima praktičnu primenu – pre svega omogućava rastvaranje jedinjenja koja su inače nerastvorljiva u vodi (npr. etarska ulja, liposolubilni vitamini) (Florence i Attwood, 2006).

Međutim, solubilizacija može biti i nepoželjna, pogotovo kada utiče na stabilnost ili efikasnost finalnog proizvoda. Najbolji primer jeste situacija u kojoj dolazi do promene u strukturi liposoma izazvane solubilizacijom pod dejstvom surfaktanta u emulzionim liposomskim sistemima. Najprihvaćeniji i najšire korišćeni model koji opisuje proces solubilizacije do kog dolazi tokom interakcije surfaktant-liposomi u ovim sistemima jeste "model tri faze", sumiran na sledeći način: (1) raspoređivanje surfaktanta između dvosloja vezikula i vode; (2) prevođenje dvosloja u mešovite micelle i (3) smanjenje veličine mešanih micela (Lichtenberg i sar., 2013). Odnosno, kada se u vodenu disperziju liposoma doda surfaktant koji može da ošteti liposom, surfaktant se prvo raspoređuje između vodenog medijuma i fosfolipidnih dvoslojeva vezikula. Sa porastom koncentracije surfaktanta u dvoslojevima, oni postaju zasićeni surfaktantom i

nastaju mešane micelle, odnosno dolazi do solubilizacije liposoma. Posledica je nestajanje vezikula.

1.3.4. Sposobnost emulgovanja

Emulgovanje – formiranje emulzija, odnosno disperznih sistema koji se sastoje iz dve tečne faze koje se međusobno ne mešaju, jedno je od najistraženijih svojstava površinski aktivnih materija (PAM) i ujedno svojstvo koje ima najveću praktičnu primenu (Rosen, 2004; Florence i Attwood, 2006).

Emulzije su važna kategorija proizvoda koja se često koristi u različitim oblastima poput kozmetologije i farmacije, industriji hrane, boja, petrohemijskoj industriji itd. (Gilbert i sar., 2013b). U industriji kozmetičkih proizvoda emulzioni sistemi su poželjni i vrlo često birani nosači kozmetički aktivnih supstanci (Estanqueiro i sar., 2016) koji se mogu izrađivati kao kreme, losioni, serumi, gel kreme i za različitu namenu (čišćenje, nega, zaštita) (Rosen, 2005).

Na osnovu strukture, emulzije se mogu podeliti na: makroemulzije (ulje-u-vodi (U/V) i voda-u-ulju (V/U)); nanoemulzije; mikroemulzije; multiple emulzije (voda-u-ulju-u-vodi (V/U/V) i ulje-u-vodi-u-ulju (U/V/U)) i mešane emulzione sisteme (Korać i sar., 2016).

Prilikom nastajanja makroemulzija, koje su ujedno i najzastupljenije vrste kozmetičkih proizvoda, jedna faza se u vidu kapi i /ili tečnih kristala raspoređuje u drugoj tečnoj fazi (Marti-Mestres i Nielloud, 2000). Pošto je površinski napon na granici između dve tečne faze koje se ne mešaju (vodena i uljana faza) veći od nule, dispergovanje unutrašnje faze, koje povećava veličinu granične površine između ove dve faze, dovodi do značajnog povećanja međupovršinske slobodne energije sistema. Disperzija nastala na ovaj način, prostim mešanjem dve faze bez prisustva emulgatora, je termodinamički nestabilna. Iz tog razloga je za izradu (stabilnih) emulzija potrebno prisustvo emulgatora. U toku izrade emulzija, prilikom mešanja, emulgator se adsorbuje na granici između dve tečne faze (granica tečno-tečno), gradeći monomolekulski, međupovršinski film. Film emulgatora oko kapi unutrašnje faze smanjuje međupovršinski napon između dve tečnosti, olakšava dispergovanje unutrašnje faze i povećava termodinamičku stabilnost sistema. Dodatno, ovaj film sprečava koalescenciju

dispergovanih kapi unutrašnje faze formirajući mehaničku, sternu i/ili električnu barijeru (Rosen, 2004; Vuleta i sar., 2012).

Ipak, većina kozmetičkih emulzija, naročito U/V tipa, predstavlja kompleksne polučvrste sisteme koji sadrže veće koncentracije emulgatora od potrebnih za formiranje monomolekulskog filma oko kapi dispergovane faze, kao i mešane emulgatore koji se sastoje od masnih amfifila (najčešće masnih alkohola) i anjonskih/nejonskih PAM. Ovi emulgatori dovode do stvaranja specifičnih struktura oko kapi unutrašnje faze, kao i u spoljašnjoj fazi, pri čemu nastaju kompleksni, polučvrsti višefazni emulzioni sistemi (Florence i Attwood, 2006).

1.3.4.1. Višefazni emulzioni sistemi stabilisani fazom tečnih kristala

Tečno-kristalno stanje definiše se kao stanje materije između tečnosti i čvrstog, koje karakteriše delimičan ili potpun gubitak pozicione uređenosti kristalne strukture uz zadržavanje orijentacione uređenosti sastavnih molekula. Ovakva orijentaciona uređenost može postojati u čvrstom stanju, zbog čega tečni kristali ispoljavaju mehaničku stabilnost i uređenost čvrstog agregatnog stanja, uz izraženu sposobnost tečenja - osnovnu karakteristiku tečnog agregatnog stanja. Tečni kristali (TK) ispoljavaju zapravo strukturne, mehaničke i optičke osobine između čvrstih kristalnih, amorfni i tečnih stanja, zbog čega predstavljaju intermedijerno stanje označeno kao mezofaze (Müller-Goymann, 2004; Orray, 2013).

Na osnovu načina nastajanja/izrade tečni kristali mogu biti termotropni i liotropni. Dok termotropni nastaju zagrevanjem i topljenjem kristalnih supstanci, liotropni, interesantni sa aspekta primene u kozmetologiji i farmaciji, formiraju se u interakciji molekula amfifila i rastvarača. Tri osnovna tipa liotropnih tečnih kristala jesu lamelarni, heksagonalni i kubni (Müller-Goymann, 2004; Orray, 2013).

1.3.4.1.1. Teorija gelske mreže

Kozmetičke emulzije (losioni i kremovi) najčešće su kompleksni višefazni sistemi, odnosno polidisperzije koje sadrže više emulgatora – anjonske/nejonske PAM i masne amfifile (najčešće masni alkoholi) koji zajedno čine tzv. mešane emulgatore. Prilikom izbora mešanih emulgatora za stabilizaciju kozmetičkih višefaznih sistema, zbog povoljnog dermatološkog profila, stabilnosti i kompatibilnosti sa ostalim

sastojcima emulzionih sistema, prednost se ipak daje emulgatorima sastavljenim od nejonskih PAM i masnih alkohola.

Mešani emulgatori sastavljeni od nejonske PAM i masnih alkohola stabilizuju kozmetičke emulzije sisteme složenim mehanizmima opisanom teorijom gelske mreže. Za stabilnost emulzija izrađenih upotrebom ovih emulgatora odgovorno je formiranje lamelarne faze (tečno-kristalne i gel) koja inkorporira velike količine vode (Savić, 2004).

Prilikom izrade emulzija sa mešanim emulgatorima, na temperaturi emulgovanja, unutrašnja uljana faza se disperguje u vidu kapi, pri čemu se oko dispergovanih kapi (granica ulje-voda) formiraju višemolekularni filmovi jednog dela molekula nejonske PAM i molekula masnih alkohola. Navedeni višemolekularni filmovi mešanih emulgatora predstavljaju zapravo lamelarnu tečno-kristalnu fazu. Preostali deo molekula PAM i masnih alkohola prelazi u spoljašnju fazu emulzije. Masni alkoholi, kao slabo rastvorni amfifili sa izraženim kristalnim polimorfizmom, u spoljašnjoj fazi grade hidratizane kristale, kod kojih su slojevi vode inkorporirani između polarnih grupa molekula alkohola. Hidratizani kristali u prisustvu molekula PAM dodatno bubre, obrazujući prvo lamelarnu tečno-kristalnu fazu, koja zatim hlađenjem emulzije (na temperaturi ispod tranzicione tačke, obično ispod 40° C) prelazi u tzv. lamelarnu kristalnu gel fazu. Kristalna gel faza, izgrađena od komponenata mešanih emulgatora organizovanih u dvoslojeve između kojih su slojevi vode, dovodi do strukturiranja spoljašnje faze i povećanja njenog viskoziteta, te i stabilnosti emulzije (Savić 2004; Tasić-Kostov, 2013).

Dodatno strukturiranje (povećanje viskoziteta) do koga dolazi usled dalje interakcije između molekula PAM i hidratizanih kristala masnih alkohola, moguće je i tokom skladištenja emulzija (Savić, 2004).

U emulzijama stabilizovanim mešanim emulgatorima postoje bar četiri faze (dispergovana uljana oko koje su slojevi tečno-kristalne faze; hidrofilna kristalna gel faza; kristalni hidrati masnih alkohola – lipofilna kristalna gel faza i slobodna (engl. *bulk*) voda), zbog čega ove emulzije i nose naziv višefazni sistemi (Savić, 2004).

1.3.4.1.2. Metode za karakterizaciju tečnih kristala

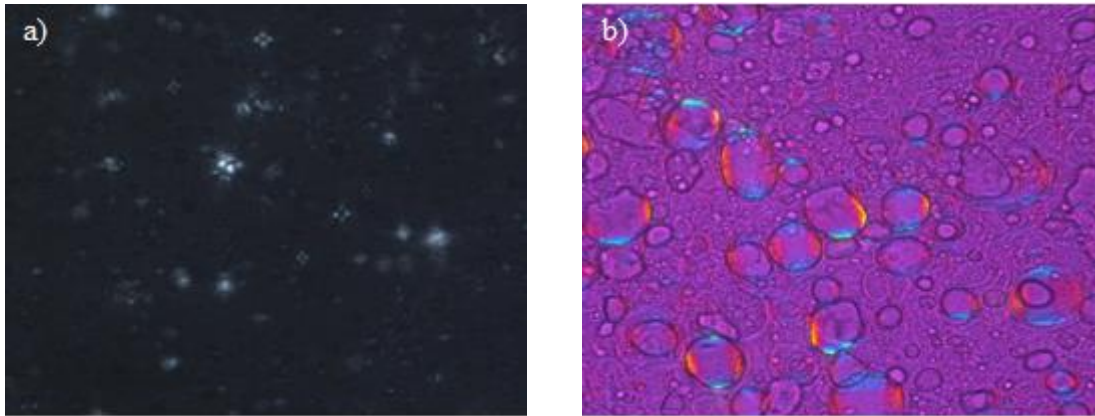
Metode koje se rutinski koriste za identifikaciju i karakterizaciju lamelarnih tečnih kristala jesu:

1. Polarizaciona svetlosna mikroskopija

Tečni kristali izgrađeni su od anizotropnih organskih molekula i upravo njihova orijentaciona uređenost uzrok je sposobnosti dvostrukog prelamanja polarizovane svetlosti.

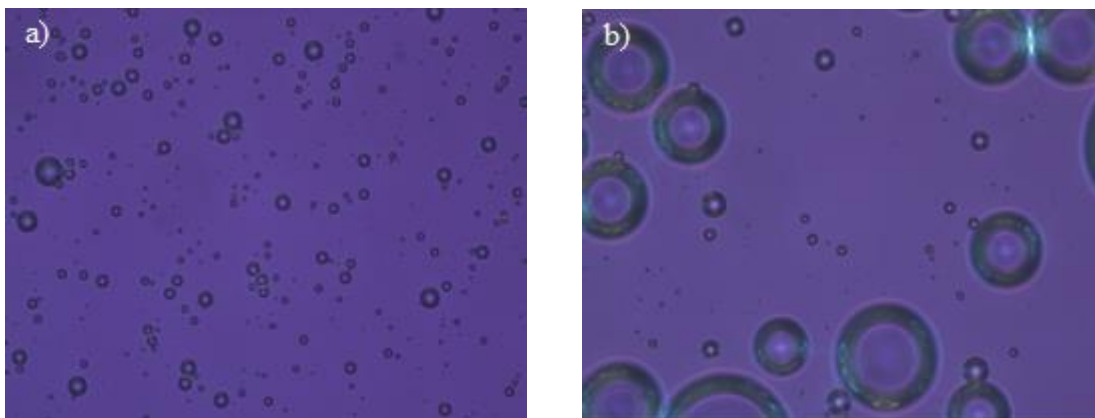
Posmatrani uzorak postavlja se pod mikroskop između dva unakrsno postavljena polarizatora. Unakrsna pozicija polarizatora obezbeđuje da su ravni polarizovanih zraka normalne jedna na drugu. Kod posmatranja anizotropnih uzoraka, kakav je slučaj sa emulzionim sistemima stabilizovanim fazom tečnih kristala, svetlost prvo prolazi kroz polarizator smešten ispod, dok neki delovi svetlosnog snopa prolaze i kroz polarizator pozicioniran iznad posmatranog materijala. Ravan polarizovanog zraka rotira prolaskom kroz anizotropni materijal pod nekim uglom u odnosu na ravan nadolazećeg zraka, što omogućava prolaz rotiranog dela svetlosti do sledećeg polarizatora. Kao posledica anizotropije faze tečnih kristala, u vidnom polju mikroskopa mogu se uočiti tipične crno-bele teksture. Kada se u mikroskop postavi i lambda (λ) pločica sa dodatnim svojstvima prelamanja, moguće je dobiti teksturu obojenu u žuto, tirkizno ili ružičasto (Müller-Goymann, 2004; Savić, 2004; Tasić-Kostov, 2013).

Polarizaciona mikroskopija se koristi za vizuelizaciju i karakterizaciju lamelarne faze u emulzionim sistemima koja ima izgled iskrivljenih malteških krstova (Slika 10a). Malteški krstovi nastaju kao posledica koncentričnog postavljanja ravni slojeva unutar lamelarne faze (Müller-Goymann, 2004; Savić, 2004; Tasić-Kostov, 2013). Slika 10b prikazuje anizotropne slojeve oko uljanih kapi (“*onion rings*”) nakon postavljanja lambda pločice.



Slika 10. Lamelarna faza (tečno-kristalna ili gel) u emulziji stabilizovanoj mešanim APG emulgatorom pod uveličanjem 500 puta: a) iskrivljeni malteški krstovi; b) “onion rings”

Kao što je već pomenuto, polarizaciona mikroskopija je pogodna metoda za vizuelizaciju liposoma i potvrdu njihovog nastajanja i strukturnog integriteta. Specifično uređena organizacija lipidnih dvoslojeva čini liposome anizotropnim i vidljivim u polju polarizacionog mikroskopa (Kulkarni, 2005; Pierre i Costa, 2011; Patel i Panda, 2012). Kada se disperzija liposoma postavi između unakrsno postavljenih polarizatora i analizatora, kao i kod tečnih kristala, vide se tipične crno-bele strukture (malteški krstovi). Kada se u mikroskop postavi lambda pločica, moguće je lipidne dvosloje vezikula videti u boji (Bibi i sar., 2011) (Slika 11).



Slika 11. Mikrografija disperzije liposoma dobijena uz korišćenje λ pločice pod uveličanjem: a) 100 puta, b) 500 puta

2. Termalne analize: diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i termogravimetrijska analiza (TGA)

DSC je metoda kojom se detektuju i karakterišu energetske promene unutar sistema stabilizovanih TK prouzrokovane faznim promenama. Prilikom fazne promene dolazi do promene entalpije (ΔH) ili entropije (ΔS) sistema. Promene entalpije dovode do endotermnih ili egzotermnih signala u zavisnosti od toga da li do tranzicije dolazi usled utroška ili oslobađanja energije. Fazni prelaz iz kristalnog u amorfno stanje je najlakše detektovati, jer ga prati značajan utrošak energije. Sa druge strane, posebna pažnja se pridaje karakterisanju tranzicije iz kristalnog u tečno kristalno ili prelazima iz jednog TK u drugi, jer su praćeni značajno manjim utroškom energije (Müller-Goymann, 2004; Savić, 2004; Tasić-Kostov, 2013).

TGA, komplementarna termalna metoda, omogućava detekciju i kvantifikovanje različitih "tipova" vode unutar emulzionog sistema stabilizovanog fazom TK. Gubitak vode iz sistema određuje se u funkciji temperature, te oslobađanje različitih frakcije vode iz sistema stabilizovanog fazom TK zahteva različitu količinu energije. Diferencijacija između slobodne i interlamelarno vezane vode u ovakvim sistemima primenom TGA uobičajeno se vrši u sledećim temperaturnim opsezima: 20-50°C (temperaturni opseg koji odgovara oslobađanju slobodne – engl. *bulk* vode), 50-70°C (oslobađanje frakcije vode vezane unutar lipofilne gel faze) i 70-110°C (oslobađanje frakcije vode vezane unutar hidrofilne gel faze ili između lamela TK faze) (Savić, 2004; Tasić-Kostov, 2013).

3. Reološka merenja

Emulzije stabilisane fazom TK predstavljaju nenjutnovske sisteme sa pseudoplastičnim tipom tečenja, izraženom tiksotropijom i viskoelastičnim karakteristikama. S obzirom na to da je reološko ponašanje emulzionih sistema direktna posledica brojnih interakcija unutar sistema, parametri koji se dobijaju kontinualnim reološkim merenjem koriste se u tumačenju koloidne strukture sistema i njegovih fizičkih karakteristika. Sa druge strane, oscilatorna reološka merenja metod su izbora za određivanje elastičnosti, te posledično i potvrđivanja prisustva faze TK u ispitivanim emulzionim sistemima. Primenom kontrolisanog stresa moguće je ispitati viskoelastične

karakteristike TK bez narušavanja mikrostrukture (Müller-Goymann, 2004; Savić, 2004; Tasić-Kostov, 2013).

Upotrebljeni emulgator, zajedno sa masnom fazom, definiše strukturu nosača, njegovo ponašanje tokom i nakon aplikacije, ali i ispoljeni efekat na koži. Takođe, određeni aspekti bezbednosti proizvoda bazirani su na izboru emulgujućeg sistema, te se njegov značaj ne treba zanemariti.

1.4. Alkil poliglukozidi u savremenim kozmetičkim emulzijama za negu kože

Alkil poliglukozidi (APG) (engl. *Alkyl polyglucosides, APGs*) predstavljaju grupu nejonskih surfaktanata, bez etoksi grupa u molekulu (engl. *polyethylene glycol (PEG) - free*), dobijenih iz obnovljivih sirovina prirodnog porekla (Holmberg, 2001). Ova jedinjenja, sastavljena od polarnog, hidrofilnog, šećernog (glukoza) i nepolarnog, lipofilnog dela (masni alkohol), nalaze primenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, visoko su cenjeni kao surfaktanti i emulgatori, a predmet su i različitih studija - od membranskih eksperimenata do preformulacionih i formulacionih istraživanja.

1.4.1. Alkil (poli) glukozidi kao surfaktanti u istraživanjima svojstava ćelijske membrane

Alkil poliglukozidi sa 8 do 12 ugljenikovih atoma u alkil lancu (od oktil glukozida do dodecil glukozida), zahvaljujući tome što imaju veliku sposobnost solubilizacije, visoke vrednosti kritične micelarne koncentracije, veliku rastvorljivost u vodi i činjenici da su blagi (engl. *mild*) i ne izazivaju denaturaciju proteina (Hierrezuelo i sar., 2005), glavne su komponente istraživanja svojstava membrane u kojima se procenjuju promene izazvane solubilizacijom fosfatidilholinskih i liposoma izgrađenih od *stratum corneum*-u sličnih lipida, pod dejstvom surfaktanata. Tabela 6 daje prikaz studija objavljenih do danas koje se bave promenama u liposomima izazvanih solubilizacijom pod dejstvom alkil (poli) glukozida.

Iako je posledica svih navedenih liposom-surfaktant interakcija konačna razgradnja (solubilizacija) vezikula i formiranje mešanih micela sastavljenih iz lipida i

surfaktanta (Maza i sar., 1996; 1997; Ribosa i sar., 1997; López i sar., 2001a; 2001b; 2002), ispitivani alkil (poli) glukozidi se jasno razlikuju po sposobnosti solubilizacije i afinitetu prema dvoslojevima liposoma. Sa porastom dužine alkil lanca (od 8 do 12 C atoma) opada kritična micelarna koncentracija (KMK) surfaktanta, solubilizaciona aktivnost i sposobnost građenja mešanih micela, dok raste afinitet prema lipidnim dvoslojevima (Tabela 6). Porast "glukoznog" dela molekule surfaktanta (od stepena polimerizacije 1 do 2) izgleda ima još izraženiji, ali suprotan efekat na kapacitet solubilizacije (Ribosa i sar., 1997; López i sar 2002).

Generalno, sa porastom dužine alkil lanca u molekuli nejonskih surfaktanata, te i alkil (poli) glukozida, opada njihova rastvorljivost u vodi, dolazi do gušćeg "pakovanja" molekula na granici faza, raste težnja surfaktanta da se adsorbuje na granici faza i da formira micelle, raste tačka topljenja surfaktanta, kao i sklonost ka građenju faze tečnih kristala u sistemu (Rosen, 2004).

Tabela 6. Prikaz ispitivanja u kojima su praćene promene u liposomima izazvane solubilizacijom pod dejstvom alkil (poli) glukoziida (Maza i sar., 1996; 1997; Ribosa i sar., 1997; López i sar., 2001a; 2001b; 2002)

Ispitivani alkil (poli)glukoziidi	Napomene	Literatura
Oktil glukoziid (OG)	Promene u permeabilnosti lipidnih dvoslojeva liposoma nastaju dejstvom monomera surfaktanta Solubilizacija dvoslojeva praćena je formiranjem mešanih micela	[Maza i sar., 1996]
Dodecil maltoziid (DM)	DM ima veći kapacitet solubilizacije fosfatidilholinskih (PC) liposoma kao i veći afinitet prema dvoslojevima nego OG	[Maza i sar., 1997]
Oktil glukoziid, nonil glukoziid, decil glukoziid, undecil glukoziid, dodecil glukoziid, DM, APG A (C9-C11, stepen polimerizacije 1.3), APG B (C8-C16, stepen polimerizacije 1.4)	Dužina alkil lanca surfaktanta značajno utiče na njegovu kritičnu micelarnu koncentraciju (KMK), dok glukozna jedinica nema uticaj DM ima veći solubilizacioni potencijal od čistih alkil glukoziida i komerijalnih smeša APG sa 1-1.4 glukozidnom jedinicom Glukozna jedinica ispoljava veći uticaj na kapacitet solubilizacije nego dužina alkil lanca	[Ribosa i sar., 1997]

<p>Oktil glukozid, nonil glukozid, decil glukozid, undecil glukozid, dodecil glukozid</p>	<p>Povećanje dužine alkil lanca surfaktanta drastično smanjuje njegovu KMK, smanjuje sposobnost saturacije/solubilizacije liposoma i formiraja mešanih micela, ali povećava afinitet sufraktanta prema lipidnom dvosloju</p>	<p>[López i sar., 2001a]</p>
<p>Oktil glukozid, nonil glukozid, decil glukozid, undecil glukozid, dodecil glukozid</p>	<p>Što je kraći alkil lanac surfaktanta veća je njegova sposobnost saturacije/solubilizacije liposoma izrađenih od lipida SC Ova sposobnost je manja nego kod PC liposoma Povećanje dužine alkil lanca surfaktanta povećava njegov afinitet prema lipidnim dvoslojevima i smanjuje sposobnost formiranja mešanih micela</p>	<p>[López i sar., 2001b]</p>
<p>Dodecil maltozid (DM)</p>	<p>Solubilizirajuća aktivnost je manja nego kod PC liposoma Afinitet prema dvosloju je veći nego kod PC liposoma U poređenju sa dodecil glukozidom, DM je značajno aktivniji uprkos identičnom alkil lancu, verovatno zbog drugačije strukture hidrofilnog dela molekule (broja glukoznih jedinica)</p>	<p>[López i sar., 2002]</p>

1.4.2. Alkil poliglukozi kao emulgatori

Dugolančani alkil poliglukozi (od 10 do 22 ugljenikova atoma u alkil lancu) privlače veliku pažnju kao "prirodni", biodegradabilni, nisko toksični, ekološki prihvatljivi emulgatori blagi za kožu (Holmbegr, 2001; Lukic i sar., 2013b; Savic i sar., 2005; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011). Ovi emulzioni stabilizatori, zahvaljujući slobodnim hidroksilnim grupama šećernog dela molekule imaju sposobnost vezivanja i zadržavanja vode, te obezbeđuju vlaženje površinskog sloja kože, utiču na permeabilnost *stratum corneum*-a i indirektno na penetracioni potencijal KAS (Savic i sar., 2005). Alkil poliglukozi karakteriše i formiranje lamelarne strukture unutar emulzionog sistema koja je slična organizaciji lipidnog intercelularnog matriksa SC što ih dodatno čini interesantnim kao kozmetičke sirovine (Lukic i sar., 2013b; Savic i sar., 2005; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011).

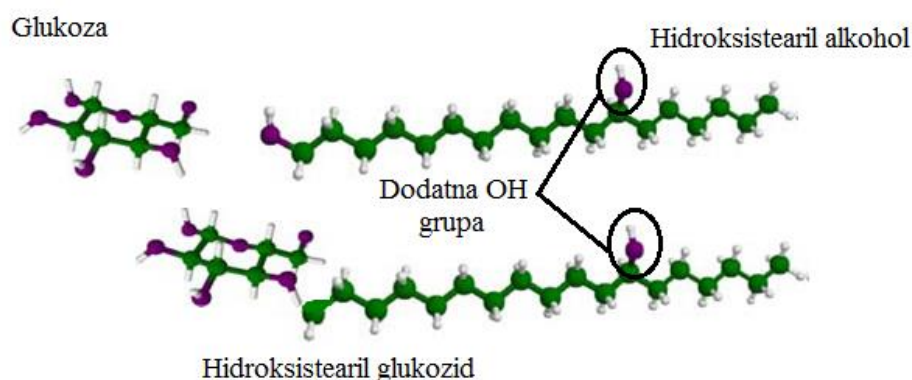
Alkil poliglukozi namenjeni izradi emulzionih nosača kozmetičkih proizvoda na tržištu se nalaze kao mešani emulgatori - komercijalne smeše koji pored alkil poliglukoziidnog emulgatora sadrže i jedan ili više masnih alkohola.

U izveštaju ekspertske tela za procenu bezbednosti kozmetičkih sastojaka, *Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panel*-u, iz 2011. godine, zaključeno je da se 19 alkil (poli) glukozida (decil glukozid, arahidil glukozid, butil glukozid, C10-16 alkil glukozid, C12-18 alkil glukozid, C12-20 alkil glukozid, C20-22 alkil glukozid, kaprilil/kapril glukozid, kaprilil glukozid, cetearil glukozid, koko-glukozid, etil glukozid, heksadecil D-glukozid, izostearil glukozid, lauril glukozid, miristol glukozid, oktadecil D-glukozid, oktildodecil glukozid, undecil glukozid) smatra bezbednim za kozmetičku primenu (CIR, 2011).

Pored dugogodišnjeg prisustva APG na tržištu, mehanizmi stabilizacije i fizičko-hemijske osobine strukturno kompleksnih emulzionih sistema, stabilisanih različitim mešanim emulgatorima ovog tipa i dalje su nedovoljno istraženi. Takođe, postoji objektivna nedostatak informacija vezanih za pogodnost ovih sistema, u smislu objedinjene kompatibilnosti, bezbednosti, efikasnosti i senzornih karakteristika, kao nosača za aktivne supstance različitih fizičko-hemijskih karakteristika, naročito za KAS u liposomima napravljenim da se dodaju u finalni kozmetički proizvod.

1.4.2.1. Hydroxystearyl alcohol & Hydroxystearyl glucoside (INCI)

Noviji dugolančani mešani emulgator APG tipa, Simulgreen™ 18-2, proizvođača Seppic, Francuska (INCI: *Hydroxystearyl alcohol and Hydroxystearyl glucoside*), izgrađen od glukoze poreklom iz pšenice i masnog alkohola dobijenog iz ulja semena ricinusa, ima specifičniju strukturu u odnosu na APG prethodnih generacija (Slika 12), pa samim tim i dodatne prednosti.



Slika 12. Hemijska struktura emulgatora hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid (Markovic Bogdanovic i sar., 2014)

Zahvaljujući hidroksilnoj grupi (-OH) u lipofilnom delu molekule (na dvanaestom ugljovodoniku u strukturi masnog alkohola), prema tvrdnjama proizvođača, ovaj emulgator obezbeđuje dodatnu, produženu hidraciju površinskog sloja kože, ima unapredene senzorne karakteristike bez "soaping" (sapunskog) fenomena i sposobnost emulgovanja svih vrsta ulja (estri, silikoni, biljna i mineralna ulja). Stabilan je u širokom opsegu pH vrednosti (3-10), otporan na dodatak aktivnih supstanci koje sadrže elektrolite i ima mogućnost građenja losiona i "mekših" kremova u koncentraciji od 1 do 3% (m/m), dok je za izradu kremova gušće konzistencije/čvršće teksture potrebna koncentracija od 3% (m/m). Emulgujuće osobine ovog stabilizatora su, prema proizvođaču, praćene formiranjem elastične mreže lamelarne faze u kontinulanoj fazi emulzije, čija vidljivost uz pomoć uređaja za karakterizaciju ovih sistema direktno zavisi od prirode izabranih ulja masne faze (Roso i sar., 2012).

Nedavno su objavljeni podaci da Simulgreen™ 18-2, primenjen u koncentraciji od 3% (m/m) nema potencijal izazivanja lokalnih neželjenih reakcija, te se može pretpostaviti da je bezbedan i blag za kožu (Markovic-Bogdanovic, 2014).

Otvaraju se pitanja: da li je ovaj noviji emulgator kompatibilan sa liposomima (ne utiče na stabilnost njihovih dvoslojnih membrana), da li može obezbediti izradu stabilnih i efikasnih liposomskih kozmetičkih emulzija, da li može doprineti efikasnosti i senzornom profilu proizvoda za negu kože i da li će jedna hidroksilna (-OH) grupa više u strukturi ovog molekula dovesti do povećanja kritične micelarne koncentracije vodenog rastvora surfaktanta u odnosu na vrednosti za nejonske surfaktante sa 18 ugljenikovih atoma.

1.5. Reformulacija kozmetičkih proizvoda - razlozi i problemi za kozmetologa

Razlozi za reformulaciju kozmetičkih proizvoda već prisutnih na tržištu su brojni, gde su neki od njih: inovacija proizvoda i proširenje asortimana (dodavanje novih, atraktivnih sirovina i kozmetički aktivnih sastojaka), dostizanje održivosti (dodavanje novih i zamena već korišćenih sastojaka sirovinama prirodnog porekla dobijenih iz obnovljivih izvora), postizanje biokompatibilnosti, rešavanje odgovarajućih problema (povećanje stabilnosti proizvoda, unapređivanje senzornih karakteristika, promena uređaja za proces proizvodnje, prestanak proizvodnje sirovina, promena proizvođača i dobavljača iste sirovine) ili usklađivanje sa važećim propisima i regulativima (zamena zabranjenih sirovina novim, promena koncentracije sirovina, potvrda tvrdnji o efektima proizvoda, dodavanje odgovarajućih kozmetički aktivnih sastojaka).

Zahtevi korisnika, koji pored efikasnosti i bezbednosti, očekuju i odgovarajuće senzorne karakteristike kozmetičkih proizvoda (Lukic i sar., 2012; Tadros 2004), ali i trendova na tržištu, predstavljaju ključne razloge za reformulaciju proizvoda i vrlo izazovan zadatak za formulatora. Poseban izazov kako u formulaciji, tako i reformulaciji kozmetičkih proizvoda, predstavljaju emulzioni sistemi, zbog niza specifičnosti koje imaju, ali i mogućih problema u stabilnosti.

Iako zvuči jednostavno – „samo“ modifikacija proizvoda, reformulacija emulzionih sistema je skup proces, koji prate brojni problemi. I jedan jedini sastojak formulacije može uticati na složenost reformulacionog pristupa – svaka promena u sastavu, čak i ona najmanja, uticaće na koloidnu strukturu sistema, posledično i stabilnost, kao i na senzorne karakteristike i prihvatljivost od strane korisnika (Lukic i sar., 2013a). Iz tog razloga, svaka promena u formulaciji zahteva, pored ponovnog ispitivanja stabilnosti i određivanja roka upotrebe i/ili PAO (perioda nakon otvaranja, engl. *period after opening, PAO*), bezbednosti i efikasnosti, dodatno i senzornu procenu, koja će dati uvid u to da li će modifikacija proizvoda imati uticaj na senzorne karakteristike i njegovu prihvatljivost (Kemp i sar., 2009).

U oblasti kozmetologije rađene su različite studije u cilju uspostavljanja veze između instrumentalnih metoda i senzornih karakteristika emulzionih kozmetičkih proizvoda. Iako postoje stalni pokušaji istraživača da bar u određenoj meri zamene senzorne studije instrumentalnim metodama kakve su teksturna i reološka merenja, većina studija se ipak bavi uspostavljanjem veze između reoloških merenja i senzornih karakteristika emulzionih sistema (Moravkova i sar., 2011; 2014; 2016; Kulkamp-Guerreiro i sar., 2013; Korać i sar., 2016). Broj studija u kojima je kombinovana upotreba teksturne analize ili teksturne analize i reoloških merenja sa senzornom procenom i dalje je mali (Lukic i sar., 2012; 2013a; Gilbert i sar., 2013c; Estanqueiro i sar., 2016). Kombinovani pristup koji su uspostavili Lukic i saradnici (2012) u kome se reološka, teksturna i modifikovana senzorna analiza koriste u cilju formulacije emulzionog proizvoda adekvatnih karakteristika pokazuje da se određeni senzorni atributi emulzionih sistema mogu predvideti upotrebom teksturnih i reoloških merenja. **Ovaj pristup bi verovatno bio odgovarajući i za proces reformulacije kozmetičkih proizvoda iz grupe emulzija.**

1.5.1. Eksperimentalni dizajn u procesu reformulacije kozmetičkih proizvoda

U bilo kojoj fazi razvoja, proizvodnje ili reformulacije kozmetičkog proizvoda, iz bilo kog razloga, ponekad je potrebno napraviti ne samo jednu već nekoliko promena, a te promene mogu, kao što je već pomenuto, uticati na karakteristike proizvoda. Da bi se ispitali efekti izvršenih promena, tradicionalni pristup bi bio ispitati uticaj promene

svakog faktora na određene karakteristike sistema. Ne samo da je za ovakav pristup potrebno vreme, već on može dati informacije samo o dejstvu jednog faktora u datom trenutku (engl. *one factor-at-a-time method*). Tehnika koja omogućava da se sistemski ispituju efekti svih promena i koja pruža maksimalni broj informacija sprovođenjem minimalnog broja eksperimenata, jeste eksperimentalni dizajn. Upotrebom eksperimentalnog dizajna moguće je istovremeno ispitati efekte više različitih faktora, odrediti statistički značajan glavni efekat, direktni efekat svake pojedinačne varijable (faktora koji se menja) kao i efekat njihovih interakcija na određene karakteristike sistema (Đorđević i sar., 2013, Ryan i Morgan, 2007).

Jedan od često zastupljenih slučajeva u reformulaciji kozmetičkog proizvoda jeste promena ili dodatak novog emolijensa u sastav masne faze kozmetičke emulzije za negu kože, što može imati velikog uticaja na različite aspekte - efikasnost i senzorne karakteristike reformulisanog kozmetičkog proizvoda.

Noviji emolijens i okluziv, interesantan za kozmetičku industriju, je i skvalen maslinovog ulja.

Skvalen maslinovog ulja (INCI: *Olive oil squalene*) - primer novijeg emolijensa

Skvalen je polinezasićeni *all-trans* linearni terpenoid koji sadrži šest dvostrukih veza (šest izoprenskih jedinica). Skvalen je hidrofobno, nisko viskozno ulje, svetlo žute boje i skoro bez mirisa (Wolosik i sar., 2013).

Kod ljudi, skvalen je prekursor u sintezi holesterola i jedan je od glavnih polinezasićenih lipida površine kože. Na površinu kože sekretuje se u velikim količinama preko sebacealnih žlezda, te ga u sebumu ima oko 13% (Huang i sar., 2009).

Glavni i najbogatiji izvor skvalena jeste ulje jetre ajkula *Squalus* vrsta (engl. *shark liver oil*). Međutim, u skladu sa važećim zakonskim regulativima o kozmetičkim proizvodima, ova sirovina se danas izoluje iz biljnih izvora. Najveće količine skvalena biljnog porekla nalaze se kao deo neosaponifikovane frakcije ulja amaranta (oko 8%) i maslinovog ulja (0,6 - 0,7%), dok se manje količine mogu naći u palminom ulju, ulju klice pšenice i ljuske pirinča (Wolosik i sar., 2013; Huang i sar., 2009).

Prema *Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panel*-u, skvalen je bezbedan za primenu u kozmetičkim proizvodima, nije iritans i ne izaziva alergije čak i u koncentraciji od 100% (Wolosik i sar., 2013).

Skvalen se u kozmetičkoj industriji koristi zbog emolijentnog, okluzivnog i hidratišućeg svojstva. Zahvaljujući efektu hidracije smanjuje vidljivost bora i finih linija na koži, lako penetrira u dublje slojeve i kožu čini glatkom i elastičnom, ne ostavljajući mastan film na njenoj površini (Wolosik i sar., 2013). Dodatno, ispoljava antiiritantno delovanje i utiče na popravljjanje stanja kožne barijere. Takođe, skvalen štiti površinu kože od lipidne peroksidacije prouzrokovane UV zracima i visoko je efikasan "hvatač" singlet kiseonika, što objašnjava njegovo antioksidantno svojstvo (Huang i sar., 2009).

Skvalen maslinovog ulja, Olifeel® SQ (INCI: *Squalene*), proizvođača Amedeo Brasca & C. SRL je bistro, žuto ulje, visoko prečišćeno (čistoće 96%) čime je sprečena degradacija i oksidacija ove sirovine. Nakon nanošenja, brzo se upije u kožu, čineći je glatkom i mekom, ne ostavljajući mastan film na njenoj površini (Amedeo Brasca, 2011).

Skvalen maslinovog ulja može ući u sastav svih vrsta kozmetičkih proizvoda u koncentraciji od 0,5 do 10%. Na osnovu specifikacije proizvođača, koncentracija od 1% je minimalna koncentracija primenom koje se uopšte može očekivati bilo koji efekat skvalena, pri čemu se uticaj na popravljjanje stanja kožne barijere može postići koncentracijama višim od 5% (Amedeo Brasca, 2011).

Bilo bi interesantno ispitati da li skvalen maslinovog ulja, kao nepolarno ulje, ima uticaj na koloidnu strukturu sistema stabilizovanih novijim mešanim emulgatorom APG tipa - hidrosistearil alkohol i hidrosistearil glukozid, i na koji način ostvaruje svoj uticaj u strukturi reformulisane kozmetičke emulzije. Dodatno, da li kao emolijens utiče na teksturne, reološke i senzorne karakteristike formulisanih i reformulisanih kozmetičkih emulzija za negu kože. I na kraju, da li ima i kakav uticaj na hidraciju površinskog sloja kože, ali i na barijernu funkciju kože.

1.6. Biofizičke metode *in vivo* procene određenih aspekata bezbednosti i efekata kozmetičkih proizvoda na koži

Pored ispunjenja neophodnih uslova kvaliteta i stabilnosti, kozmetički proizvod treba da zadovolji i zahteve u pogledu bezbednosti i efikasnosti, koji su propisani Uredbom EU 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima (Regulation (EC) No 1223/2009).

Dokazivanje efikasnosti kozmetičkih proizvoda, odnosno procena svih deklariranih efekata, definisano je 1997. godine, stupanjem na snagu 6. amandmana na Kozmetičku direktivu 76/768/EEC., a od 2013. godine, uvedena je zabrana testiranja kozmetičkih proizvoda i kozmetičkih sirovina na životinjama (Regulation (EC) No 1223/2009), te je došlo do razvoja i intenzivnog pronalaženja alternativnih metoda kojima bi se ispitivali bezbednost i efikasnost kozmetičkih proizvoda.

Danas, najveći značaj u ispitivanju efekata i pojedinih aspekata bezbednosti (npr. iritacioni potencijal) kozmetičkih proizvoda imaju neinvazivna *in vivo* ispitivanja na humanim dobrovoljcima, zasnovana na biofizičkim merenjima na zdravoj koži. Pomenutim merenjima na koži prate se promene biofizičkih parametara koji su u direktnoj vezi sa strukturom i funkcijom kože, pre, tokom i nakon nanošenja ispitivanog kozmetičkog proizvoda. Merenja se sprovode upotrebom odgovarajućih uređaja, pod strogo kontrolisanim uslovima, u duplo slepim, randomizovanim studijama, uz primenu velikog broja vodiča i objavljenih rezultata naučnih kliničkih i nekliničkih studija i u skladu sa Helsinškom deklaracijom (Darlenski i sar., 2009; Piérard i sar., 2012).

Prema proizvođaču, matične ćelije alspke ruže (MĆAR) u liposomima štite i povećavaju otpornost humanih matičnih ćelija, pozitivno utiču na regeneraciju epidermalnih ćelija, popravljaju barijernu funkciju kože i ispoljavaju određeni efekat protiv bora (engl. *anti-wrinkle* efekat). Međutim, treba naglasiti da dokazani efekti svake kozmetičke sirovine se ne mogu, bez ispitivanja i dokazivanja, prenositi na gotov kozmetički proizvod sa tom sirovinom i taj proizvod reklamirati, a da nema *in vivo* potvrda o dejstvu kozmetičkog proizvoda. **Ukoliko MĆAR zaista imaju navedene mogućnosti, pojedine efekte, poput uticaja na regeneraciju epidermisa i sadržaja vlage u površinskom sloju kože, popravljanja stanja barijere i uticaja na**

mehaničke karakteristike kože, merenjem adekvatnih biofizičkih parametara na koži je moguće otkriti i kvantifikovati.

1.6.1. Metode za procenu transepidermalnog gubitka vlage iz kože

Transepidermalni gubitak vlage, TEGV, (engl. *transepidermal water loss*, TEWL) predstavlja neosetno/neprimetno odavanje vode zasnovano na pasivnoj difuziji, u pravcu koncentracionog gradijenta, iz dubljih hidriranih slojeva kože (dermis, epidermis) do površine i kroz površinu kože, u spoljašnju sredinu gde je prisutan manji sadržaj vlage. Niske vrednosti ovog parametra su glavna karakteristika zdrave kože i intaktnog stanja njene barijere (Fluhr i Darlenski, 2014). Stoga je TEGV najistaknutiji *in vivo* pokazatelj barijerne funkcije kože, kao i njenih strukturnih promena (Lodén, 2003; Buraczewska-Norin, 2012).

Merenje TEGV je veoma osetljiva i precizna metoda kojom je moguće detektovati iritaciju kao lokalni neželjeni efekat na koži (Arsić i sar., 2011; Friebe i sar., 2003). Iz tog razloga, ova metoda se široko koristi, kako za potvrdu efekata kozmetičkih i dermokozmetičkih preparata i *in vivo* procenu njihovog iritativnog potencijala, tako i za skrining aktivnih sastojaka koji bi mogli imati pozitivan uticaj na barijernu funkciju kože (Rogiers, 2001; Sotoodian i Maibach, 2012, Fluhr i Darlenski, 2014).

Na osnovu iznetog, može se pretpostaviti da merenje TEGV može biti pogodna metoda kako za procenu bezbednosnog profila kozmetičkih proizvoda sa MČAR-liposomima, tako i za proveru njihovog eventualnog uticaja na barijernu funkciju kože.

Merenje TEGV se uglavnom vrši primenom metode sa otvorenom komorom (engl. *open-chamber method*) uz dva najčešća komercijalna uređaja zasnovana na istom principu, Tewameter® i DermaLab®. Merenje se vrši indirektno uz dva para senzora (temperatura i vlažnost vazduha) prema Fikovom zakonu difuzije (masa transportovane vode po jedinici površine u jedinici vremena) uz analizu koju vrši mikroprocesor. Dobijena vrednost TEGV se automatski preračunava i najčešće izražava u $g/m^2/h$ (Fluhr i Darlenski, 2014).

Međutim, iako precizno opisan postupak izvođenja i široko zastupljen, pomenuti metod ima određene nedostatke. Kao osnovni nedostatak pominje se uticaj mikroklimatskih faktora (temperatura i vlažnost) na vrednost TEGV, zbog čega se merenja vrše prema publikovanim protokolima u klimatizovanim prostorijama, bez

direktnog protoka vazduha na mestu ispitivanja i uz strogu kontrolu temperature i relativne vlažnosti vazduha (Rogiers, 2001). Dodatno, kalibracija uređaja koja se vrši po uputstvu proizvođača, pred samu upotrebu od ključnog je značaja za obavljanje adekvatnog merenja (Fluhr i Darlenski, 2014).

1.6.2. Metode za procenu vlažnosti kože

Najvažnija funkcija kože jeste njena sposobnost da kao efikasna barijera sprečava prekomernu difuziju vode, u čemu najveću zaslugu ima površinski sloj - *stratum corneum* (SC). Normalan sadržaj vode u SC ($30 \pm 5\%$) čini osnov njegove permeabilnosti, te značajno utiče na barijernu funkciju kože, ali i na enzimske procese uključene u fiziološko obnavljanje kože (Silva i sar., 2007). Sa druge strane, sadržaj vode u površinskom sloju direktno zavisi od stanja kožne barijere, pa se najpotpunija slika o barijernoj funkciji kože dobija istovremenim merenjem TEGV i sadržaja vode u njenom površinskom sloju (Berardesca i sar., 1990).

Procenjivanje sadržaja vlage u površinskom sloju kože zasniva se na merenju električnih karakteristika kože. Iako su dostupni uređaji zasnovani na različitim metodama, procenjivanje sadržaja vlage u SC najčešće se vrši merenjem kapacitivnosti ili merenjem provodljivosti površinskih slojeva kože (Clarys i sar., 2011). Najšire korišćen uređaj, Corneometer CM825®, zasnovan je na merenju električne kapacitivnosti (EC) kože, odnosno na razlici između dielektrične konstante vode (koja iznosi 81) i drugih supstanci dobijene merenjem dielektričnog medijuma (površinskog sloja kože). Merenja se vrše na dubini od 10-20 μm zbog oblika merne sonde. Uređaj je vrlo osetljiv te detektuje i najmanju promenu dielektrične konstante uz visoku tačnost merenja. Izmerene vrednosti kapacitivnosti kože izražavaju se u arbitrarnim jedinicama (relativne korneometarske jedinice, engl. *relative corneometric units, rcu*), u opsegu 1-130. Prednosti ovog merenja su brojne - kratko vreme merenja, visoka reproduktivnost i osetljivost merenja, lakoća rukovanja (Constantin i sar., 2014).

Ukoliko ispitivana KAS zaista doprinosi popravljanju stanja barijerne funkcije kože, posledično će dovesti i do povećanja sadržaja vlage u SC, što se može detektovati uz pomoć korneometra, posle nanošenja na kožu ispitivanog uzorka koji sadrži taj kozmetički sastojak.

1.6.3. Metode za procenu mehaničkih svojstava kože

Zaštitna (barijerna) funkcija umnogome zavisi od mehaničkih karakteristika kože. Sa druge strane, mehanička svojstva kože zavise od godina starosti, pola i anatomske regije tela (Dobrev, 2014).

Do promene u mehaničkim karakteristikama kože dolazi u nekim patološkim stanjima, ali i kao posledica upotrebe pojedinih kozmetičkih i dermatoloških preparata (Dobrev, 2014).

Proces starenja utiče na mehaničke i strukturne karakteristike kože kroz promene na nivou elastičnih i kolagenih vlakana. Smanjenje elastičnosti kože, uz pojavu plićih, manjih bora, kreće još u ranim dvadesetim godinama. Stoga se merenjem elastičnih svojstava kože može vršiti procena efekata kozmetičkih proizvoda, ali i ispitivanje uticaja KAS na mehaničke karakteristike kože (Lukic i sar., 2013b).

Iako su dostupni uređaji za procenu elastičnosti kože zasnovani na različitim tehnikama merenja, najčešće korišćeni komercijalni uređaj u neinvazivnim *in vivo* ispitivanjima kozmetičkih i dermatoloških preparata jeste kutometar. Princip merenja kutometra zasniva se na sukiji - merenju vertikalne deformacije kože u funkciji vremena uz primenu vakuuma, odnosno uvlačenja kože u kružnu sondu pritiskom na njenu (ispitivanu) površinu (Dobrev, 2014). Merenje se vrši pomoću optičkog mernog sistema unutar sonde uređaja i kao rezultat dobijaju se krive zavisnosti deformacije kože i vremena.

Dobijena kriva nudi dve vrste parametara: direktno merene parametre ili tzv. "U" parametre, od kojih su najčešće korišćeni U_a (oporavak ukupne deformacije), U_f (ukupna ekstenzibilnost - rastegljivost kože), U_e (trenutno elastično rastezanje), U_r (trenutni oporavak elastične deformacije), i tzv "R" parametre koji predstavljaju preračunate parametre. R paramteri kojih ima deset (R0-R9) direktno se preračunavaju korišćenjem softvera odgovarajućeg kutometra. Za procenu viskoelastičnosti kože nisu svi "R" parametri od podjednakog značaja, te se uglavnom koriste sledeći: R2 (U_a/U_f), R5 (U_r/U_e) i R7 (U_r/U_f). Parametar R2 (engl. *gross elasticity*) predstavlja ukupnu elastičnost kože, R5 (engl. *net elasticity*) predstavlja elastičnu komponentu viskoelastičnog odgovora kože (samo elastična vlakna kože utiču na ovaj parametar), dok R7 (engl. *elastic recovery ratio*) predstavlja meru elastičnog oporavka kože na koga

utiču promene kako elastičnosti tako i viskoziteta kože, te je najkorisniji parametar za procenu starenja kože, merenjem njene elastičnosti. Navedeni parametri ujedno ne zavise ni od debljine kože dobrovoljaca, niti od uslova pod kojima se vrši ispitivanje, što je značajno za *in vivo* ispitivanja (Ryu i sar., 2008).

Ukoliko ispitivana KAS utiče na barijernu funkciju kože, sadržaj vlage u površinskom sloju ili pak zaista poseduje određene *anti-aging* efekte, zasigurno će imati određeni uticaj i na mehaničke karakteristike kože, posle nanošenja na kožu ispitivanog uzorka koji sadrži taj kozmetički sastojak.

1.6.4. Metode za procenu boje kože

Neinvazivne metode za merenje biofizičkih parametara na koži široko se koriste i za *in vivo* procenu određenih aspekata bezbednosti aktivnih jedinjenja, kozmetičkih i dermatoloških preparata, odnosno njihovog iritacionog potencijala (Fluhr i sar., 2001). Na boju kože, koja je određena pigmentima hemoglobinom, melaninom, bilirubinom i karotenom, pored UV zračenja, značajno mogu uticati i iritansi. Kvantifikovanje indukovane promene boje kože česta je metoda u dermokozmetičkim ispitivanjima kojom se procenjuju svojstva kožne barijere, odnosno njen integritet i osetljivost, kao i efekti primenjene KAS (Clarys i sar., 2000).

Zahvaljujući svojoj jednostavnosti i pristupačnosti, najčešće korišćen uređaj za procenu boje kože jeste Mexameter®. Meksametar sadrži kružno raspoređene diode koje emituju svetlost tri definisane talasne dužine: 568 nm (zeleno); 660 nm (crveno) i 880 nm (infracrveno). Merenje boje kože uz navedeni uređaj zasniva se na razlici u apsorpciji između melanina i hemoglobina na odabranoj talasnoj dužini. Kada svetlost dopre do površine kože, deo svetlosti se odbija, odnosno reflektuje i intenzitet te reflektovane svetlosti meri fotodetektor uređaja. Na taj način se meri apsorbovana i reflektovana svetlost talasnih dužina u zelenom i crvenom opsegu za hemoglobin i u crvenom i oko infracrvenog opsega za melanin (Clarys i sar., 2000). Efekti potencijalnih iritanasa uglavnom se procenjuju merenjem eritema indeksa (EI) koji se izračunava na osnovu intenziteta apsorbovane i reflektovane svetlosti u zelenom i crvenom opsegu za hemoglobin, odnosno na 568 nm i 660 nm, respektivno (Fluhr i sar., 2001, Clarys i sar., 2000).

Ukoliko ispitivana KAS poseduje određeni iritacioni potencijal, doći će do povećanja vrednosti EI posle nanošenja na kožu ispitivanog uzorka koji sadrži taj kozmetički sastojak.

1.7. Senzorna analiza kozmetičkih proizvoda

Senzorna procena zapravo definiše karakteristike datog proizvoda koje izazivaju čulne reakcije, odnosno svojstva proizvoda koja stimulišu čula (tzv. senzorne karakteristike). Adekvatno osmišljena senzorna studija omogućava povezivanje senzornih karakteristika proizvoda sa njegovim fizičkim i hemijskim osobinama, ali i formulacionim i/ili procesnim parametrima (instrumentalnim metodama) (Kemp i sar., 2009; Lukic i sar., 2013a). Takođe, pruža mogućnost razumevanja očekivanja korisnika u vezi konkretnog proizvoda i omogućava modifikaciju i poboljšanje formulacije u cilju povećanja prihvatljivosti od strane korisnika/potrošača kozmetičkih proizvoda (Parente i sar., 2008).

Postoje dve velike kategorije senzornih testova: objektivni testovi koji se vrše sa odabranim i/ili treniranim panelistima (diskriminativni i deskriptivni) i subjektivni ili tzv. afektivni u kojima učestvuju neobučeni panelisti (Lukić, 2014). Diskriminativnim testovima se utvrđuju razlike u određenim senzornim atributima između uzoraka, dok deskriptivna analiza pruža kompletan senzorni opis, odnosno daje potpune senzorne karakteristike proizvoda. Afektivnim testovima procenjuje se nivo prihvatanja proizvoda fokusirajući se na zahteve potrošača, odnosno procenjuje se subjektivna reakcija korisnika na senzorne karakteristike proizvoda (Külkamp-Guerreiro i sar., 2013, Almeida i sar., 2008). U procesu reformulacije kozmetičkih proizvoda najčešće se radi diskriminativna senzorna analiza koja najčešće podrazumeva procenu atributa u okviru četiri kategorije: "izgled" (engl. *appearance*), "uzimanje sirovine/proizvoda" (engl. *pick-up*), "razmazivanje" (engl. *rub-in*), "osećaj nakon razmazivanja sirovine/proizvoda na koži" (engl. *residual appearance and after feel*) (Gilbert i sar., 2013c).

Treba imati u vidu da senzorna analiza, iako korisna, ima i određene nedostatke - dužina trajanja i cena ovih studija, kao i subjektivna procena dobrovoljaca (Lukic i sar., 2012; Gilbert i sar., 2013a). **Iz tog razloga su proizvođačima kozmetičkih proizvoda potrebni objektivniji, ponovljivi, jeftiniji pristupi koji ujedno i traju**

kraće, kako bi unapredili ili sačuvali određena svojstva proizvoda tokom njegove reformulacije.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj doktorske disertacije je ispitati da li bi prirodni mešani alkil poliglukozidni emulgator - hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid mogao da bude odgovarajući stabilizator kozmetičkih emulzija u koje treba inkorporirati liposom-inkapsulirane biljne matične ćelije alpske ruže (INCI: *Rhododendron Ferrugineum Leaf Cell Culture Extract, Isomalt, Lecithin, Sodium Benzoate, Lactic Acid, Aqua*), a koji bi istovremeno obezbedio zadržavanje liposomskih vezikula u izvornom stanju i formulisanje stabilnih i estetski prihvatljivih kremova za negu zdrave, ali i suve i iritirane kože. Planirano je da se ostvarivanje ovako postavljenog cilja postigne deljenjem u više ciljeva, realizovanih po pojedinačnim fazama eksperimentalnog rada, kako sledi:

1. Ciljevi I faze eksperimentalnog rada

- Određivanje kritične micelarne koncentracije novijeg mešanog (dvokomponentnog) alkil poliglukozidnog emulgatora - INCI: *Hydroxystearyl alcohol and Hydroxystearyl glucoside* (HSA i HSG), kao ključnog parametra za dalja ispitivanja u okviru doktorske disertacije, o kome nema dostupnih podataka, pri kojoj ova površinski aktivna materija može izazvati proces solubilizacije, a time i nepoželjne promene u strukturi liposoma, usled moguće interakcije emulgator - liposomi.
- Procena faznog ponašanja emulgatora u binarnim sistemima, potvrda prisustva i strukturnog integriteta liposoma sa biljnim matičnim ćelijama nakon dispergovanja komercijalnog granulata sa "suvim" liposomima (instant oblici u vidu praška) u prečišćenoj vodi i fizičko-hemijska karakterizacija tih liposoma u vodenoj disperziji.
- Praćenje interakcija emulgator - inkapsulirani liposomi u jednostavnim sistemima (binarni i ternarni sistemi). Na osnovu dobijenih rezultata, planira se razvoj model emulzionog nosača tipa ulje u vodi (U/V) sa ispitivanim emulgatorom, koji će biti kompatibilan sa liposom-inkapsuliranim biljnim matičnim ćelijama alpske ruže i obezbediti stabilan, estetski prihvatljiv krem, optimalnih senzornih osobina i efikasnosti.

2. Ciljevi II faze eksperimentalnog rada

- Razvoj formulacije kozmetičkih liposomskih emulzija kompleksnog sastava tipa U/V, stabilisanih novijim emulgatorom i standardizacija postupka izrade. U tom smislu, vršiće se sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija (polarizaciona mikroskopija, kontinualna i oscilatorna reološka merenja, diferencijalna skenirajuća kalorimetrija, termogravimetrijska analiza), ispitivanje estetskih, aplikativnih i teksturnih karakteristika i ispitivanje fizičke stabilnosti kremova (ubrzanim testom starenja), sa i bez KAS (matične ćelije alpske ruže inkorporirane u liposome).
- Ispitivanje načina stabilizacije liposoma u emulzionom sistemu sa lamelarnom fazom, kao i da li dodatak vezikula utiče na koloidnu strukturu model nosača i distribuciju vode unutar nosača.
- Procena kompatibilnosti ispitivanog emulgatora i liposoma sa biljnim matičnim ćelijama.

3. Ciljevi III faze eksperimentalnog rada

- Reformulacija razvijene formulacije, stabilnog U/V krema, sa prirodnim mešanim APG emulgatorom - HSA i HSG i inkapsuliranim liposomima, vršiće se u cilju procene kompatibilnosti krema kao model nosača sa različitim koncentracijama naknadno uključene kozmetičke sirovine - skvalen poreklom iz maslinovog ulja; ovakav praktičan pristup povezan je sa praksom koja se sprovodi u razvojnim centrima kozmetičke industrije, gde se formulatorima postavi zadatak da urade reformulaciju proizvoda sa tržišta u cilju dodatnih kozmetičkih efekata (popravljanje barijerne funkcije kože, povećanja hidracije suve kože itd.), bez nastajanja problema u izradi i stabilnosti budućih proizvoda.
- Procena uticaja reformulacije (dodatak skvalena, kao model kozmetičke sirovine, u različitim koncentracijama, promena procesnih parametara) razvijenih kremova na njihove teksturne, reološke i senzorne karakteristike upotrebom generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna.

4. Ciljevi IV faze eksperimentalnog rada

- Utvrđivanje iritacionog potencijala (aspekt bezbednosti) i efikasnosti odabranih model liposomskih kozmetičkih emulzija primenom *in vivo* neinvazivnih biofizičkih merenja na zdravoj i eksperimentalno izazvanoj suvoj koži dobrovoljaca. Kao referentna emulzija u pogledu bezbednosti, koja sadrži isti - ispitivani aktivni sastojak (matične ćelije alpske ruže inkorporirane u liposome) biće korišćen komercijalni krem sa tržišta Hydra perfect dnevni krem, proizvođača Dahlia, Beograd.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Materijali

Za izradu binarnih i ternarnih sistema, kao i model kozmetičkih U/V emulzija stabilizovanih APG mešanim emulgatorom, kao potencijalnih nosača za matične ćelije alpske ruže (MĆAR) inkapsulirane u liposome PhytoCellTec™ Alp Rose Mibelle AG Biochemistry, Švajcarska (INCI: *Rhododendron Ferrugineum Leaf Cell Culture Extract (and) Isomalt (and) Lecithin (and) Sodium Benzoate (and) Lactic Acid (and) Aqua*) i skvalen maslinovog ulja (Olifeel® SQ, Amedeo Brasca & C. SRL, Italija), korišćene su sirovine prikazane u Tabeli 7.

Tabela 7. Pregled sastojaka korišćenih za izradu ispitivanih binarnih i ternarnih sistema i kozmetičkih U/V emulzionih sistema

INCI naziv sirovine srpski/engleski	Funkcija u kozmetičkom proizvodu	Trgovački naziv, proizvođač	Kvalitet
Hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid/Hydroxystearyl alcohol and Hydroxystearyl glucoside - HSA i HSG	Primarni emulgator	Simulgreen™ 18-2, Seppic, Francuska	Specifikacija proizvođača
Ksantan guma/Xanthan gum	Hidrofilni kostabilizator prirodnog porekla	Xanthan gum, Gum Technology, Arizona	Specifikacija proizvođača
Gliceril monostearat/ Glyceryl monostearate	Lipofilni koemulgator	Smoothex GMS, Fine organics, Indija	Ph. Eur.
Cetostearil alkohol/Cetearyl alcohol	Lipofilni koemulgator	Lannete O, Cognis, Nemačka	Ph. Eur.
Akrlamid i Natrijum akrilodimetil taurat kopolimer i Izoheksadekan i Polisorbat80	Sintetski kostabilizator	Simulgel™ 600, Seppic, Francuska	Specifikacija proizvođača
Natrijum poliakrilat/Sodium polyacrylate	Sintetski kostabilizator	Cosmedia® SP, BASF, Nemačka	Specifikacija proizvođača
Kaprilno/kaprinski trigliceridi/ Caprylic/Capric Triglyceride	Emolijens	Saboderm TCC, Sabo, Italija	Specifikacija proizvođača
Izopropilmiristat/Isopropyl myristate	Emolijens	PARYOL IPM, A&A Fratelli Parodi, Italija	NF XVII
Laki tečni parafin/Paraffinum perliquidum	Emolijens	Liquid paraffin, RA.M. Oil S.p.A., Italija	Ph. Eur.
Bademovo ulje/Prunus Amygdalus Dulcis (Sweet	Emolijens	PARYOL 480 MR, A&A Fratelli	Specifikacija

Almond) Seed oil		Parodi, Italija	proizvođača
Skvalen maslinovog ulja/Olive oil squalene	Emolijens	Olifeel® SQ, Amedeo Brasca & C. SRL, Italija	Specifikacija proizvođača
Ekstrakt kulture ćelija lista alpske ruže i Izomalt i Lecitin i Natrijum benzoat i Limunska kiselina i Voda/Rhododendron Ferrugineum Leaf Cell Culture Extract (and) Isomalt (and) Lecithin (and) Sodium Benzoate (and) Lactic Acid (and) Aqua	Kozmetički aktivni sastojak	PhytoCellTec™ Alp Rose Mibelle AG Biochemistry, Švajcarska	Specifikacija proizvođača
Tokoferil acetat/Tocopheryl acetate	Antioksidans	Vitamin E-Acetate (DL-alpha-tocopheryl acetate), BASF, Nemačka	Ph. Eur.
Glicerol/Glycerine	Humektans	Glycerine, BASF, Nemačka	Ph. Eur.
Fenoksietanol, metil paraben, etil paraben, propil paraben, butil paraben/Phenoxyethanol, methylparabene, ethylparabene, propylparabene, butylparabene	Konzervans (rastvor parabena u fenoksietanolu)	Gujsol-01, Gujarat Organics LTD, Indija	Specifikacija poizvođača
Prečišćena voda/Purified water	Vodena faza		Ph. Eur.

3.1.2. Metode i oprema

I faza eksperimentalnog rada

3.1.2.1. Preformulaciona ispitivanja novijeg APG mešanog emulgatora i liposom-inkapsuliranih matičnih ćelija alpske ruže

U okviru I faze eksperimentalnog rada određena je kritična micelarna koncentracija (KMK) ispitivanog emulgatora i praćeno je njegovo fazno ponašanje u binarnim sistemima. Uporedo, izvršena je potvrda prisustva i strukturnog integriteta liposoma sa matičnim ćelijama alpske ruže (MĆAR-liposomi) nakon dispergovanja komercijalnog granulata sa "suvim" liposomima (instant oblik kao prašak) u prečišćenoj vodi i fizičko-hemijska karakterizacija tako dobijene disperzije liposoma.

Dotatno, praćene su promene strukture ternarnih sistema i vezikula tokom interakcije APG emulgator-liposomi.

Sastav i oznake binarnih i ternarnih sistema prikazani su u Tabeli 8.

Binarni sistemi (BS1 i BS2) se razlikuju po sadržaju mešanog emulgatora (0,01% i 5% (m/m), respektivno) - prva izabrana koncentracija od 0,01% (m/m) je malo veća od merene KMK, dok je druga koncentracija (5% (m/m)), na osnovu preliminarnih ispitivanja, najpodesnija za izradu polučvrstih emulzionih sistema sa ovim emulgatorom. Ternarni sistemi TS1 i TS1a sadrže 0,01% (m/m) ispitivanog emulgatora, prečišćenu vodu sa konzervansom i 0,4% i 1% (m/m) MĆAR-liposoma, dok ternarni sistemi TS2 i TS2a sadrže veću, izabarnu koncentraciju emulgatora (5% (m/m)), prečišćenu vodu sa konzervansom i 0,4% i 1% (m/m) MĆAR-liposoma, respektivno.

3.1.2.1.1. Određivanje kritične micelarne koncentracije ispitivanog emulgatora

Oprema: Tenziometar (Krüss Easy Dyne, Nemačka)

Određivanje kritične micelarne koncentracije (KMK) vršeno je u vodenim rastvorima rastućih koncentracija ispitivanog emulgatora, uz digitalni tenziometar sa integrisanim Harkins i Jordan metodom za korekciju vrednosti površinskog napona, primenom du Noüy prsten metoda. Pre svakog merenja prsten je uronjen u vodeni

rastvor i ostavljen 10 minuta na konstantnoj temperaturi od $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ kako bi se površina tečnosti umirila. Površinski napon prečišćene vode korišćene za izradu rastvora emulgatora bio je 72,0 mN/m. Merenja su ponavljana pet puta i računane su srednje vrednosti površinskog napona, a zatim crtana kriva zavisnosti površinskog napona i koncentracije ispitivanog emulgatora.

Tabela 8. Sastav ispitivanih binarnih (BS) i ternarnih (TS) sistema (% m/m)

Komponente	Ispitivani uzorci % (m/m)					
	BS1	BS2	TS1	TS1a	TS2	TS2a
Hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid	0,01	5,0	0,01	0,01	5,0	5,0
Prečišćena voda sa 0,5% (m/m) konzervansa (parabeni u fenoksietanolu)	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0
MČAR-liposomi			0,4	1,0	0,4	1,0

3.1.2.1.2. Izrada binarnih sistema i praćenje faznog ponašanja emulgatora

3.1.2.1.2.1. Izrada binarnih sistema

Oprema: Rotaciona mešalica (Heidolph RZR 2020, Nemačka) i magnetna mešalica (IKA Combimag RCH, Nemačka)

Na osnovu rezultata preliminarnih ispitivanja dobijenih variranjem procesnih parametara izrade (brzina mešanja odnosno broj obrtaja po minuti, dužina mešanja), izabran je optimalan način izrade uzoraka.

Binarni sistemi BS1 i BS2 (Tabela 8) izrađeni su zagrevanjem vode koja je sadržala 0,5% (m/m) konzervansa u zatvorenom staklenom sudu do 75°C na termostatnoj grejnoj ploči magnetne mešalice. Vodenoj fazi je dodat emulgator uz mešanje propellerskom laboratorijskom mešalicom 6 minuta (1500 o/min) na konstantnoj temperaturi (75°C). Uzorak je zatim sklonjen sa grejne ploče magnetne

mešalice i postepeno hlađen uz sledeći režim mešanja: 3 min na 1050 o/min, 5 min na 725 o/min i dalje na 1050 o/min do sobne temperature.

3.1.2.1.2.2. Praćenje faznog ponašanja ispitivanog emulgatora u binarnim sistemima

Mikroskopska analiza

Oprema: Polarizacioni mikroskop Leica DMLSP, Leica Microsystems (Wetzlar, Nemačka) integrisan sa digitalnom Leica DFC290 HD kamerom i LAS V4.1 softverskim paketom.

Polarizaciona mikroskopija na uzorcima sprovedena je pod uvećanjem 500 puta između ukrštenih polarizatora i analizatora bez i uz primenu λ -pločice, 7 dana nakon izrade, kao i nakon 30 dana. Uzorci su na polarizacionim mikrografijama zatim analizirani posmatranjem struktura tipičnih za određene vrste tečno-kristalnih faza.

3.1.2.1.3. Fizičko-hemijska karakterizacija liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže

U okviru fizičko-hemijske karakterizacije MČAR-liposoma sprovedena je: vizuelizacija liposoma i potvrda njihovog stuktornog integriteta nakon dispergovanja granulata liposoma sa aktivnom supstancom u prečišćenoj vodi, određivanje srednje veličine vezikula i distribucije po veličini uz pomoć laserske difrakcije i merenje pH i provodljivosti liposomskih disperzija.

I Mikroskopska analiza

Oprema: Polarizacioni mikroskop Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 microscope (Zeiss, Nemačka) integrisan sa AxioCam ICc1 kamerom i Axio-Vision 4.6 softverskim paketom.

Polarizaciona mikroskopija disperzije liposoma izvršena je u određenim vremenskim intervalima (odmah nakon dispergovanja, 30 minuta i 1 čas nakon dsipergovanja granulata liposoma sa aktivnom supstancom u prečišćenoj vodi) pod uvećanjem 400 puta između ukrštenih polarizatora i analizatora uz primenu λ -pločice. Uzorci su na polarizacionim mikrografijama analizirani posmatranjem struktura karakterističnih za ove vezikularne sisteme.

II Određivanje srednje veličine i distribucije po veličini

Oprema: Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., UK).

Određivanje srednje veličine liposoma i distribucije po veličini izvršeno je uz pomoć laserske difrakcije. Disperzija liposoma je pre svakog merenja adekvatno razblažena visoko prečišćenom vodom (u odnosu 1:500) kako bi se oslabila opalescencija uzorka.

III Merenje pH

Oprema: pH metar inoLab pH Level 1, (Weilheim, Nemačka)

Merenje pH disperzija liposoma izvršeno je direktnim uranjanjem odgovarajuće elektrode pH metra u ispitivani uzorak odmah nakon dispergovanja granulata u prečišćenju vodi. Pre početka rada, uređaj je kalibrisan na propisan način upotrebom standardnih pufera pH 4,0 i 7,0.

IV Merenje električne provodljivosti

Oprema: Konduktometar CDM 230, (Radiometer, Copenhagen, Danska)

Merenje električne provodljivosti disperzija liposoma sprovedeno je direktnim uranjanjem sonde konduktometra u ispitivani uzorak. Merna sonda je pre početka rada kalibrisana 0,01 M rastvorom KCl na sobnoj temperaturi ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

3.1.2.1.4. Izrada ternarnih sistema i praćenje promena usled interakcije emulgator-liposomi

3.1.2.1.4.1. Izrada ternarnih sistema

Ternarni sistemi TS1, TS1a, TS i TS2a (Tabela 8) su izrađeni na isti način i upotrebom iste opreme kao što je opisano u delu 3.1.2.1.2.1. Jedina razlika u izradi jeste dodavanje liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže, odmah nakon njihovog dispergovanja u 5 g prečišćene vode (količina vode izabrana na osnovu podataka proizvođača o rastvorljivosti aktivne supstance) što je uzeto u obzir prilikom odmeravanja vodene faze. Disperzija liposoma je dodavana pažljivo, u kapima, u fazi hlađenja na temperaturi ispod 60°C , po preporuci proizvođača kozmetički aktivnog sastojka, u različitim koncentracijama, 0,4% (m/m) i 1% (m/m), respektivno.

3.1.2.1.4.2. Praćenje promena u sistemima zbog interakcije emulgator-liposomi

Promene u koloidnoj strukturi ternarnih sistema u odnosu na binarne, kao i eventualne promene u strukturi samih liposoma, praćene su uz pomoć polarizacione mikroskopije, 7 dana i 30 dana nakon izrade. Polarizaciona mikroskopija sprovedena je na isti način i uz isti uređaj kao u delu 3.1.2.1.2.2., pod uveličanjem 500 puta između ukrštenih polarizatora i analizatora bez i uz primenu λ -pločice. Uzorci su na polarizacionim mikrografijama zatim analizirani posmatranjem struktura tipičnih za vezikularne sisteme, kao i određene vrste tečno-kristalnih faza.

II faza eksperimentalnog rada

3.1.2.2. Formulacija U/V emulzija i ispitivanje kompatibilnosti APG emulgatora i liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže u složenim emulzionim sistemima kroz fizičko-hemijsku karakterizaciju i procenu stabilnosti model kozmetičkih U/V emulzija

Nakon preformulacione faze koja je pokazala kompatibilnost ispitivanog mešanog APG emulgatora i MČAR-liposoma u jednostavnim ternarnim sistemima, formulisan je i izrađen određeni broj U/V emulzija, kao potencijalnih model APG-stabilizovanih nosača za liposome sa biljnim matičnim ćelijama.

Glavni kriterijum u izboru sastojaka model emulzija bio je da budu što sličnije komercijalnim, industrijskim proizvodima po broju komponenata, pri čemu je udeo pojedinačnih komponenata izabran na osnovu preporuka proizvođača ovih sirovina i rezultata preliminarnih ispitivanja. Model emulzije su bile istog sastava masne faze, dok su se razlikovale po tipu primenjenog koemulgatora/sekundarnog stabilizatora, te shodno tome i njegovoj koncentraciji. Nakon toga je izvršena procena fizičke stabilnosti i izbor optimalnog model emulzionog nosača, u koji je naknadno dodata liposomska disperzija aktivne supstance i zatim izvršena sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija i procena njihove fizičke stabilnosti.

3.1.2.2.1. Formulacija i izrada model APG emulzionih nosača uz dodatak različitih kozmetički značajnih koemulgatora/kostabilizatora

Oprema: Rotaciona mešalica (Heidolph RZR 2020, Nemačka) i magnetna mešalica (IKA Combimag RCH, Nemačka)

Izrađeno je sedam model emulzionih nosača tipa U/V, istog složenog sastava masne faze, stabilizovanih sa 5% (m/m) ispitivanog mešanog emulgatora uz variranje koemulgatora (kostabilizatora). Sastav i oznaka uzoraka je data u Tabeli 9.

Izrada uzoraka emulzija sprovedena je na isti način kao kod izrade binarnih sistema opisanom u delu 3.1.2.1.2.1., uz manju izmenu, shodno prisustvu dodatnih sirovina.

Svi uzorci pripremljeni su odvojenim odmeravanjem i zagrevanjem masne i vodene faze. Vodena faza koja je sadržala glicerol i konzervans u zatvorenom sudu zagrevana je na termostatnoj grejnoj ploči magnetne mešalice do 75°C. Vodenoj fazi je zatim dodat emulgator uz mešanje propelerskom laboratorijskom mešalicom 1 minut (1500 o/min) na konstantnoj temperaturi (75°C). Masna faza (sa gliceril monostearatom ili cetostearil alkoholom, u zavisnosti od uzorka) prethodno zagrejana do 70°C dodata je vodenoj fazi i emulgovanje je nastavljeno uz mešanje 5 minuta (1500 o/min) na konstantnoj temperaturi od 75°C. Uzorak je zatim sklonjen sa grejne ploče magnetne mešalice i postepeno hlađen uz sledeći režim mešanja: 3 min na 1050 o/min, 5 min na 725 o/min i dalje na 1050 o/min do sobne temperature. Ksantan guma, natrijum poliakrilat ili Simulgel™ 600 su dodavani tokom faze hlađenja na temperaturi ispod 60°C, dok je tokoferil acetat dodat na temperaturi ispod 40°C.

Tabela 9. Sastav i oznake ispitivanih uzoraka emulzionih nosača

Sastojci	Ispitivani uzorci % (m/m)						
	F	Fkg (Fp)	Fgms	Fca	Fcakg	Fnp	Fsg
A (Masna faza)							
Kaprilno/kaprinski trigliceridi	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Laki tečni parafin	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Izopropilmiristat	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Bademovo ulje	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Gliceril monostearat			1,5				
Cetostearil alkohol				1,5	1,5		
B (Vodena faza)							
Hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Glicerol	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Konzervans (rastvor parabena u fenoksietanolu)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Prečišćena voda	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0
C							
Tokoferil acetat	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Ksantan guma		0,5			0,5		
Natrijum poliakrilat						0,25	
Akrilamid/Natrijum akriloidimetil taurat kopolimer/Izoheksadekan/Polisorbat 80							0,5

3.1.2.2.2. Procena fizičke stabilnosti, estetskih i aplikativnih karakteristika izrađenih model APG emulzionih nosača za liposome

Preliminarna procena fizičke stabilnosti uzoraka vršena je praćenjem njihovog ponašanja nakon centrifugiranja na sobnoj temperaturi (48 časova nakon izrade i čuvanja na sobnoj temperaturi ($20 \pm 0,1^\circ\text{C}$) kako bi se uzorci uravnotežili), merenjem

pH i električne provodljivosti i polarizacionom mikroskopijom, 7 dana nakon izrade i čuvanja na sobnoj temperaturi ($20 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$), nakon uravnoteživanja i eventualnog strukturiranja emulzionih sistema, kao i nakon testova ubrzanog starenja.

Estetske i aplikativne karakteristike uzoraka procenjene su organoleptičkim ispitivanjem emulzija 7 dana nakon izrade i čuvanja na sobnoj temperaturi (izgled, boja, konzistencija, homogenost, pojava razdvajanja faza, lakoća nanošenja na kožu, lakoća upijanja, osećaj na dodir, izgled filma na koži).

Na osnovu procene preliminarne fizičke stabilnosti i organoleptičkih karakteristika, izabran je optimalan emulzioni nosač koji će se koristiti u daljem eksperimentalnom radu.

I Test centrifugiranja

Test centrifugiranja sproveden je 48 časova nakon izrade uzoraka korišćenjem laboratorijske centrifuge (Centrifuge MPW-56, Warsaw, Poljska). 4 g uzorka odmereno je u graduisanoj plastičnoj kiveti od 10 ml i centrifugirano dva puta po 15 min na 3000 o/min.

II Merenje pH

Merenje pH je izvršeno na isti način i upotrebom istog uređaja opisanih u delu 3.1.2.1.3.

III Merenje električne provodljivosti

Merenje električne provodljivosti je izvršeno na isti način i upotrebom istog uređaja opisanih u delu 3.1.2.1.3.

IV Mikroskopska analiza

Polarizaciona mikroskopija izrađenih uzoraka je izvršena na isti način i uz isti uređaj opisanih u delu 3.1.2.1.2.2. pod uveličanjem 500 puta.

3.1.2.2.3. Izrada i fizičko-hemijska karakterizacija model kozmetičkih emulzija sa liposomima

Na osnovu rezultata dobijenih sprovođenjem prethodno navedenih ispitivanja, najbolje karakteristike u smislu preliminarne fizičke stabilnosti i estetskih i aplikativnih

karakteristika pokazao je uzorak Fkg, koji je u cilju lakšeg praćenja uzoraka, preimenovan u uzorak Fp i podvrgnut daljem ispitivanju.

Dodavanjem 0,4% ili 1% (m/m) KAS (MČAR-liposomi) u izabrani nosač Fp, izrađene su dve model kozmetičke emulzije F1a i F2a, respektivno.

Navedeni uzorci ("prazan" emulzioni nosač i dva sa različitim koncentracijama KAS) su dalje podvrgnuti sveobuhvatnoj fizičko-hemijskoj karakterizaciji i ispitivanju estetskih, aplikativnih i teksturnih karakteristika u cilju procene kompatibilnosti izabranog emulgatora i MČAR-liposoma inkorporiranih u emulzione sisteme složenog sastava.

3.1.2.2.3.1. Izrada model kozmetičkih emulzija sa 0,4 i 1% (m/m) liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže

Izrada model kozmetičkih emulzija F1a i F2a sprovedena je na isti način i uz upotrebu istih uređaja opisanih u delu 3.1.2.2.1., s tim što je disperzija MČAR-liposoma (u koncentracijama, 0,4 ili 1% (m/m)), odmah nakon dispergovanja u 5 g prečišćene vode (uzeto u obzir prilikom odmeravanja vodene faze) dodavana u kapima u gotov emulzioni nosač, na temperaturi ispod 60°C, posle dodatog kostabilizatora. Sastav i oznaka sva tri uzorka ("prazan" emulzioni nosač i dva sa različitim koncentracijama KAS) dati su, radi lakšeg pregleda, u Tabeli 10.

3.1.2.2.3.2. Fizičko-hemijska karakterizacija ispitivanih model liposomskih emulzija za negu kože

Sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija ispitivanih model kozmetičkih emulzija Fp, F1a i F2a (Tabela 10) vršena je 7 dana nakon izrade uzoraka uz pomoć polarizacione mikroskopije, kontinualne i oscilatorne reologije, diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), termogravimetrijske analize (TGA) i teksturne analize.

I Mikroskopska analiza

Polarizaciona mikroskopija izrađenih uzoraka je izvršena na isti način i uz isti uređaj kako je opisano u delu 3.1.2.1.3. pod uveličanjem 400 i 1000 puta.

Tabela 10. Sastav ispitivanih uzoraka (% m/m)

Sastojci	Ispitivani uzorci % (m/m)		
	Fp	F1a	F2a
A (Masna faza)			
Kaprilno/kaprinski trigliceridi	7,0	7,0	7,0
Laki tečni parafin	3,5	3,5	3,5
Izopropilmiristat	4,5	4,5	4,5
Bademovo ulje	3,0	3,0	3,0
B (Vodena faza)			
Hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid	5,0	5,0	5,0
Glicerol	2,0	2,0	2,0
Konzervans	0,5	0,5	0,5
Prečišćena voda	do 100,0	do 100,0	do 100,0
C			
Tokoferil acetat	0,3	0,3	0,3
Ksantan guma	0,5	0,5	0,5
MČAR-liposomi		0,4	1,0

II Reološka merenja

Kontinualna i oscilatorna reološka merenja sprovedena su u cilju procene fizičke stabilnosti kao i otkrivanja mogućih promena u koloidnoj strukturi ispitivanih nosača, posle dodatka liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alspke ruže.

Kontinualna reološka merenja uzoraka izvršena su primenom rotacionog reometra (Rheolab MC 120, Paar Physica, Nemačka) uz korišćenje kupa-ploča mernog sistema (prečnik kupe 50 mm, ugao 1°) na debljini uzorka od 0,05 mm i pri temperaturi od $20 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Sva merenja su vršena tri puta. Primenjena je procedura kontrolisane brzine smicanja (brzina je rasla u opsegu $0-200\text{ s}^{-1}$ i nazad na početnu vrednost, pri čemu je svaki stupanj trajao 120 s). Obrada dobijenih rezultata izvršena je upotrebom postojećih softverskih paketa reometra Paar Physica Softwer, kao i odgovarajućih statističkih metoda korišćenjem računarskog programa OriginPro 8 (OriginLab Corporation, SAD). Rezultati su prikazani grafički.

Oscilatorna reološka merenja su korišćena za procenu viskoelastičnog ponašanja uzoraka, pri čemu se, u odnosu na uslove kontinualnih merenja, razlikovao samo prečnik kupe (75 mm). Da bi se odredio viskoelastični region, merenja su vršena pri konstantnoj frekvenciji 1 Hz u opsegu napona smicanja 0,5 do 100 Pa. Kada je linearni viskoelastični region određen, praćena je zavisnost parametara oscilatorne reologije (modul sačuvane energije - elastični modul G' , engl. *storage modulus* i modul izgubljene energije - viskozni modul G'' , engl. *loss modulus*) u funkciji promene frekvence (0,1-10 Hz) pri konstantnom naponu smicanja od 1 Pa. Rezultati merenja prikazani su grafički.

III Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

DSC je sprovedena kako bi se ispitalo i uporedilo ponašanje uzoraka pri faznim promenama i pri tome dobile informacije o njihovim strukturnim karakteristikama. Merenje je sprovedeno uz diferencijalni skenirajući kalorimetar DSC 820 (Mettler Toledo, Nemačka). Mala količina uzorka (10-12 mg), precizno izbalansirana uz uređaj XP205 Delta Range® (Mettler Toledo, Nemačka) u hermetički zatvorenom aluminijumskom lončiću analizirana je uz prazan aluminijumski lončić kao referentni uzorak. Ispitivani uzorci su zagrevani u temperaturnom opsegu od 25 do 120°C i brzinom promene temperature od 2°C/min. Sva merenja su vršena dva puta i rezultati su predstavljeni grafički.

IV Termogravimetrijska analiza (TGA)

Radi dobijanja informacija vezanih za način raspoređivanja vode unutar koloidne strukture ispitivanih uzoraka, sprovedena je termogravimetrijska analiza. Mala količina uzorka je u otvorenom aluminijumskom lončiću zagrevana uz pomoć uređaja Netzsch STA 409PG (Netzsch, Nemačka) u temperaturnom opsegu od 30 do 110°C sa izotermalnim segmentima na početku i kraju merenja. Korišćena brzina zagrevanja je bila 5°C/min. Sva merenja su izvršena dva puta i rezultati su prikazani tabelarno.

V Određivanje teksturnih parametara

Analiza teksture je sprovedena radi dobijanja informacija vezanih za mehaničke karakteristike (teksturu) ispitivanih uzoraka. Analiza je izvršena pomoću teksturnog analizera TE32 (Stable Micro Systems Ltd., UK) uz korišćenje adekvatne metode i sonde (A/BE zadnji ekstruzioni prsten koga čine: nosač, kontejner prečnika 50 mm i

kompresioni disk prečnika 45 mm). Da bi se odredili teksturni parametri ispitivanih uzoraka, sonda (postavljena tako da se nalazi iznad centralnog dela kontejnera) penetrira u uzorak dubine 25 mm brzinom od 2 mm/s i sila koja tom prilikom deluje na sondu se automatski zabeležava. Parametri: čvrstina (engl. *firmness*), konzistencija (engl. *consistency*), kohezivnost (engl. *cohesiveness*) i indeks viskoziteta (engl. *index of viscosity*), za svaki uzorak mereni su tri puta i izmerena srednja vrednost je grafički prikazana. Svi parametri su izraženi kao pozitivne (apsolutne) vrednosti.

3.1.2.2.4. Procena fizičke stabilnosti izrađenih model liposomskih emulzija za negu kože

Procena fizičke stabilnosti ispitivanih uzoraka Fp, F1a i F2a (Tabela 10) vršena je ubrzanim testom starenja, odnosno praćenjem promena pH, električne provodljivosti, reološkog ponašanja i polarizacije mikroskopije pre i posle testa ubrzanog starenja.

Test ubrzanog starenja (engl. *cyclic stress test, CST*) sproveden je dvadeset četvero-časovnim čuvanjem uzoraka na tri različite temperature (4°C, 20 ± 0,1°C i 40°C), tokom 6 ciklusa (18 dana).

I Merenje pH

Merenje pH uzoraka izvršeno je 7 dana nakon izrade i 24 časa nakon završenih CST na isti način i primenom istog uređaja opisanog u delu 3.1.2.2.2.

II Merenje električne provodljivosti

Merenje električne provodljivosti uzoraka izvršeno je 7 dana nakon izrade i 24 časa nakon završenih CST na isti način i primenom istog uređaja opisanog u delu 3.1.2.2.2.

III Reološka merenja

Kontinualna reološka merenja uzoraka sprovedena su u cilju procene fizičke stabilnosti uzoraka na isti način i upotrebom istog uređaja opisanog u delu 3.1.2.2.3.2.

IV Mikroskopska analiza

Polarizaciona mikroskopija uzoraka izvršena je u cilju praćenja promena u koloidnoj strukturi uzoraka nakon cikličnih stres testova. Snimanje mikrografija je urađeno 7 dana nakon izrade i 24 časa nakon CST, na isti način i upotrebom istog uređaja opisanog u delu 3.1.2.1.2.2. uz uveličanje 500 puta.

III faza eksperimentalnog rada

3.1.2.3. Reformulacija liposomskih emulzija za negu kože i ispitivanje uticaja faktora reformulacije na teksturne, reološke i senzorne karakteristike primenom generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna

U ovoj fazi eksperimentalnog rada vršeno je ispitivanje direktnih efekata faktora reformulacije (postupak izrade, dodatak 0,4% (m/m) MČAR-liposoma, dodatak 1% ili 6% (m/m) skvalena), kao i efekata njihovih interakcija, na teksturne i reološke karakteristike kozmetičkih U/V emulzija, gde su pojedini praćeni odgovori (konzistencija, indeks viskoziteta, čvrstina, kohezivnost, maksimalni i minimalni prividni viskozitet, vrednost histerezne površine, G' , G'' , G''/G') povezani sa određenim senzornim karakteristikama. Praćenje efekata je izvršeno upotrebom generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna, u cilju nalaženja optimalnih uslova reformulacije koji omogućavaju izradu emulzija željenih senzornih karakteristika.

3.1.2.3.1. Reformulacija i izrada kozmetičkih U/V emulzija sa liposomima

Oprema: Rotaciona mešalica (Heidolph RZR 2020, Nemačka), magnetna mešalica (IKA Combimag RCH, Nemačka) i rotor-stator homogenizator IKA Ultra Turrax® T25 digital (IKAR® - Werke GmbH & Company KG, Nemačka)

Izrađeno je dvanaest kozmetičkih U/V emulzija, čiji je sastav dat u Tabeli 11. Izrada 6 uzoraka (Fp, FpA, FpS, FpS6, FpAS, FpAS6) sprovedena je na isti način kao kod izrade model kozmetičkih emulzija opisanih u delu 3.1.2.2.3.1, dok je kod preostalih šest (Fut, FutA, FutS, FutS6, FutAS, FutAS6) izrada vršena uz manje izmene, korišćenjem Ultra Turrax-a u fazi emulgovanja. Svi uzorci pripremljeni su odvojenim odmeravanjem i zagrevanjem masne i vodene faze u zatvorenom staklenom sudu. Vodena faza (glicerol i konzervansi) u zatvorenom sudu zagrevana je na termostatnoj grejnoj ploči magnetne mešalice do 75°C. Vodenoj fazi je dodat emulgator uz mešanje Ultra Turrax-om 1 minut (3000 o/mim) na konstantnoj temperaturi (75°C). Masna faza, prethodno zagrejana do 70°C, dodata je vodenoj fazi i emulgovanje je nastavljeno uz mešanje Ultra Turrax-om 5 minuta (3000 o/min) na konstantnoj temperaturi od 75°C.

Uzorak je zatim sklonjen sa grejne ploče magnetne mešalice i postepeno hlađen uz isti, već opisani postupak mešanja propelerskom mešalicom: 3 min na 1050 o/min, 5 min na 725 o/min i dalje na 1050 o/min do sobne temperature. Ostatak izrade tekao je na isti način kao u delu 3.1.2.2.3.1.

Radi lakšeg praćenja, uzorci su obeleženi na sledeći način: uzorci izrađeni uz upotrebu propelerske mešalice u fazi emulgovanja, u nazivu imaju oznaku p; uzorci izrađeni rotor-stator homogenizatorom imaju oznaku ut. Veliko A u nazivu odnosi se na prisutvo 0,4% (m/m) MČAR-liposoma u uzorku, dok S označava prisustvo skvalena. Brojevi 1 i 6 u nazivu uzoraka vezani su za koncentraciju skvalena u datom uzorku (1% (m/m) ili 6% (m/m), respektivno).

Tabela 11. Sastav ispitivanih uzoraka (% m/m)

Sastojci	Ispitivani uzorci % (m/m)					
	F	FA	FS	FS6*	FAS	FAS6*
A (Masna faza)						
Kaprilno/kaprinski trigliceridi	7,0	7,0	7,0	5,0	7,0	5,0
Laki tečni parafin	3,5	3,5	3,5	2,5	3,5	2,5
Izopropilmiristat	4,5	4,5	4,5	3,25	4,5	3,25
Bademovo ulje	3,0	3,0	3,0	2,25	3,0	2,25
Skvalen			1,0	6,0	1,0	6,0
B (Vodena faza)						
Hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Glicerol	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
Prečišćena voda	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0
C						
Tokoferil acetat	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Ksantan guma	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MČAR-liposomi		0,4			0,4	0,4

*Kod uzoraka sa 6% (m/m) skvalena izvršeno je proporcionalno smanjenje količine ostalih komponenata masne faze, kako bi količina masne faze kod svih uzoraka bila ista. Uzorci su u nazivu, shodno načinu emulgovanja tokom izrade, nosili naziv p za propelersku mešalicu ili ut za Ultra Turrax.

3.1.2.3.2. Generalni faktorijalni eksperimentalni dizajn

U cilju utvrđivanja i procene glavnih i efekata interakcije tri različita faktora reformulacije na teksturne i reološke karakteristike emulzija, primenjen je kompjuterski generisani generalni faktorijalni dizajn. Tri nezavisne varijable koje su izabrane za faktorijalnu analizu i njihovi nivoi variranja, bili su: način izrade (A) – propelerska mešalicu/ Ultra Turrax; liposomi sa matičnim ćelijama alpske ruže (B) – 0%/0,4% i skvalen (C) – 0%/1%/6%. Kao odgovori, praćeni su: konzistencija, indeks viskoziteta,

čvrstina, kohezivnost, histerezna površina, maksimalni i minimalni prividni viskozitet, elastični (G') i viskozni modul (G''), G''/G' i veličina kapi.

Prema primenjenom generalnom faktorijskom dizajnu, ukupno je obrađeno 24 eksperimenta, uključujući 2 ponavljanja po seriji. Redosled eksperimenata je bio randomizovan. Matriks faktorijskog dizajna i odgovori svakog eksperimenta su prikazani u Tabelama 12 - 14.

Tabela 12. Matriks generalnog faktorijalnog dizajna

Niz	Formulacija	Varijable					
		Način izrade (A)		Procenat (%) MČAR-liposoma (B)		Procenat (%) skvalena (C)	
		Stvarni nivo	Kodirani nivo	Stvarni nivo	Kodirani nivo	Stvarni nivo	Kodirani nivo
1	Fp	Propelerska mešalica	-1	0	-1	0	{1, 0}
2	Fut	Ultra Turrax	1	0	-1	0	{1, 0}
3	FpA	Propelerska mešalica	-1	0,4	1	0	{1, 0}
4	FutA	Ultra Turrax	1	0,4	1	0	{1, 0}
5	FpS	Propelerska mešalica	-1	0	-1	1	{0, 1}
6	FutS	Ultra Turrax	1	0	-1	1	{0, 1}
7	FpS6	Propelerska mešalica	-1	0	-1	6	{-1, -1}
8	FutS6	Ultra Turrax	1	0	-1	6	{-1, -1}
9	FpAS	Propelerska mešalica	-1	0,4	1	1	{0, 1}
10	FutAS	Ultra Turrax	1	0,4	1	1	{0, 1}
11	FpAS6	Propelerska mešalica	-1	0,4	1	6	{-1, -1}
12	FutAS6	Ultra Turrax	1	0,4	1	6	{-1, -1}

Tabela 13. Teksturni parametri i veličina kapi masne faze u ispitivanim uzorcima (srednja vrednost \pm SD)

Formulacija	Konzistencija (gs)	Indeks viskoziteta (gs)	Čvrstina (g)	Kohezivnost (g)	Veličina kapi (μ m)
Fp	1044,3 \pm 26,7	720,4 \pm 6,8	101,9 \pm 1,2	69,05 \pm 1,2	3,4 \pm 0,1
Fut	981,9 \pm 5,6	665,5 \pm 10,2	94,75 \pm 0,6	63,55 \pm 1,0	1,8 \pm 0,1
FpA	924,8 \pm 6,1	618,4 \pm 11,7	87,8 \pm 0,4	57,4 \pm 1,0	3,85 \pm 0,1
FutA	971,0 \pm 2,1	652,1 \pm 5,2	92,8 \pm 0,1	62,4 \pm 1,1	1,95 \pm 0,1
FpS	1118,2 \pm 21,7	771,8 \pm 6,6	105,1 \pm 1,4	73,7 \pm 2,0	4 \pm 0,1
FutS	1031,9 \pm 7,5	685,1 \pm 13,0	98,7 \pm 1,6	64,5 \pm 1,3	3,45 \pm 0,07
FpS6	923,8 \pm 9,1	639,1 \pm 8,6	88,7 \pm 0,9	73,4 \pm 19,9	8,3 \pm 0,07
FutS6	909,2 \pm 4,9	597,1 \pm 5,9	86,0 \pm 0,7	55,2 \pm 0,9	5,4 \pm 0,3
FpAS	951,0 \pm 1,5	632,2 \pm 7,7	89 \pm 0,2	58 \pm 0,8	4,6 \pm 0,4
FutAS	1044,0 \pm 10,8	730,2 \pm 3,8	101,7 \pm 0,4	68,7 \pm 0,9	4,4 \pm 0,07
FpAS6	960,8 \pm 13,6	647,2 \pm 14,3	92,5 \pm 1	61,6 \pm 1,5	9,9 \pm 0,07
FutAS6	1023,7 \pm 7,3	680,9 \pm 32,5	96,9 \pm 0,9	66,5 \pm 1,4	6,8 \pm 0,07

Tabela 14. Reološki parametri ispitivanih uzoraka (srednja vrednost \pm SD)

Formulacija	Maks. prividni viskozitet (Pa*s)	Min. prividni viskozitet (Pa*s)	Histerezna površina (Pa/s)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G''/G'
Fp	105 \pm 6,4	0,887 \pm 0	3077,5 \pm 4,9	3130,5 \pm 5,7	651,5 \pm 11,2	0,2082 \pm 0
Fut	443,5 \pm 14,3	0,8 \pm 0	3249,5 \pm 5,2	2221 \pm 74,9	425 \pm 7,9	0,191 \pm 0
FpA	458,1 \pm 6,6	0,8015 \pm 0	2741,5 \pm 5,8	1639 \pm 26,9	334,5 \pm 3,9	0,2041 \pm 0
FutA	252,9 \pm 13,6	0,8315 \pm 0	2945 \pm 5,3	2297,5 \pm 6,6	441,3 \pm 2,0	0,1921 \pm 0
FpS	70,1 \pm 2,2	0,972 \pm 0,02	4192,5 \pm 5,0	3229,5 \pm 5,8	679,9 \pm 20,4	0,225 \pm 0
FutS	66,6 \pm 2,8	0,944 \pm 0,01	3371 \pm 5,5	2179,5 \pm 5,7	370,9 \pm 13,3	0,185 \pm 0
FpS6	52,6 \pm 1,0	0,763 \pm 0,01	2122 \pm 9,8	3595 \pm 5,2	865,8 \pm 16,3	0,241 \pm 0
FutS6	71,5 \pm 1,3	0,655 \pm 0,01	3517,5 \pm 12,9	1365 \pm 8,1	252,7 \pm 7,4	0,185 \pm 0
FpAS	118 \pm 18,0	0,936 \pm 0	2888,5 \pm 5,2	1807,5 \pm 5,6	335,7 \pm 16,5	0,1984 \pm 0
FutAS	62,0 \pm 2,0	0,998 \pm 0	2995,0 \pm 5,9	3043,5 \pm 5,3	633,6 \pm 27,2	0,216 \pm 0
FpAS6	85,3 \pm 2,3	0,838 \pm 0	3423 \pm 18,1	1740,5 \pm 5,6	373,9 \pm 9,4	0,208 \pm 0,01
FutAS6	141 \pm 5,7	0,884 \pm 0,01	4034,5 \pm 16,6	2300,5 \pm 12,6	437,8 \pm 16,12	0,199 \pm 0

Opšti oblik faktorijalnog modela opisan je sledećom jednačinom (Jed. (1)):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC + \beta_{123} ABC \quad (1)$$

gde je Y posmatrani odgovor zavisne varijable, β_0 je odsečak; β_1 , β_2 , i β_3 su linearni koeficijenti respektivnih nezavisnih varijabli (A, B, C); β_{12} , β_{13} , β_{23} , i β_{123} su interakcioni koeficijenti koji su povezani sa respektivnim interakcijama faktorijalnog modela (AB, AC, BC, ABC). Za izradu dizajna, obradu podataka i statističku analizu korišćen je Design-Expert® program verzija 7.0.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Minnesota, SAD). Najbolji polinomski modeli za analizu emulzija predloženi su na osnovu značajnih uslova modela ($p < 0,05$), neznačajanog "lack of fit", koeficijenta višestruke korelacije (R^2) i prilagođenog koeficijenta višestruke korelacije (prilagođeni R^2 , engl. *adjusted R^2*). Konstruisani su i grafici interakcija i trodimenzionalni grafici površine odgovora koji prikazuju ispitivane odgovore u funkciji kombinacija različitih nivoa faktora.

3.1.2.3.3. Teksturna analiza

Analiza teksturnih parametara izvršena je u cilju procene uticaja faktora reformulacije na mehaničke karakteristike izrađenih U/V emulzija i dobijanja informacija vezanih za njihove aplikativne karakteristike. Teksturna analiza izvršena je na isti način i uz isti uređaj kao što je opisano u delu 3.1.2.2.3.2.

3.1.2.3.4. Reološka merenja

Kontinualna i oscilatorna reološka merenja sprovedena su u cilju procene uticaja faktora reformulacije na reološke karakteristike emulzionih sistema. Merenja su izvršena na isti način i upotrebom istog uređaja kao što je opisano u delu 3.1.2.2.3.2.

3.1.2.3.5. Mikroskopska analiza

Izvršena je mikroskopska analiza svih uzoraka uz upotrebu Leica mikroskopa (Leica DMLSP, Leica Microsystems Wetzlar, Nemačka) integrisanog sa Leica DFC290 HD kamerom, pod uveličanjem 500 puta. Veličina kapi emulzija određivana je upotrebom LAS V4.1 kompjuterskog softvera. Mala količina uzoraka je nanošena na mikroskopsku pločicu, u što tanjem sloju i prekrivana pokrovnim staklom.

IV faza eksperimentalnog rada

3.1.2.4. *In vivo* procena određenih aspekata bezbednosti i efikasnosti izabranih model liposomskih emulzija za negu kože

U ovoj fazi, vršena je procena bezbednosnog profila i efikasnosti izabranih uzoraka upotrebom *in vivo* neinvazivnih metoda zasnovanih na biofizičkim merenjima na koži. Uzorci su izabarni na osnovu rezultata II i III faze eksperimentalnog rada i to su bile model kozmetičke emulzije sa zadovoljavajućom fizičkom stabilnošću i prihvatljivim estetskim karakteristikama. Kao referentna emulzija koja sadrži ispitivanu aktivnu supstancu (liposome sa matičnim ćelijama alpske ruže) u studiji procene bezbednosti korišćen je komercijalni krem sa tržišta Hydra perfect dnevni krem, proizvođača Dahlia, Beograd.

Uređaji za merenje biofizičkih parametara kože korišćeni u *in vivo* studijama u okviru ove faze doktorske disertacije su sledeći:

✚ **Corneometer® CM 825** za merenje električne kapacitivnosti kože (EC) koja ukazuje na stepen hidratisanosti *stratum corneum*-a, pri čemu je uzimana srednja vrednost tri uzastopna merenja;

✚ **Tewameter® TM 210** za merenje transepidermalnog gubitka vlage (engl. *transepidermal water loss, TEWL*), vršena su po tri merenja za svako tretirano mesto nakon perioda stabilizacije uređaja u trajanju od oko 40s;

✚ **Mexameter® MX 18** za merenje eritema indeksa (EI) kao indikatora iritacije kože usled promene njene boje;

✚ **Cutometer® MPA580** za merenje viskoelastičnosti kože.

Svi navedeni uređaji su proizvođača Courage & Khazaka Electronic GmbH, Nemačka.

Rezultati merenja svih parametara su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD).

In vivo studije u okviru ove faze doktorske disertacije sprovedene su u skladu sa Helsinškom deklaracijom, tek nakon dobijanja dozvole lokalnog Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (broj odobrenja 1583/1), kao i pismenog i informativnog pristanka dobrovoljaca. Svi parametri mereni u studiji su u skladu sa

publikovanim smernicama (Berardesca, 1997; Fullerton i sar., 1996; Rogiers, 2001; Pinnagoda, 1990).

Protokol ispitivanja

Grupa od 76 zdravih ženskih dobrovoljaca, bez istorije ili kliničkih znakova dermatoloških oboljenja, sa normalnom do umereno suvom kožom, učestvovala je u studiji. Tip kože (normalna do umereno suva koža) procenjen je na osnovu izmerenih inicijalnih vrednosti TEWL (kod najmanje 50% dobrovoljaca inicijalna vrednost TEWL ≥ 12 g/m/h) (Tupker i sar., 1997). Dobrovoljci nisu koristili druge kozmetičke proizvode za negu na površinama predviđenim za ispitivanje uzoraka (unutrašnja strana podlaktice obe ruke) 7 dana pre početka studije i tokom trajanja studije. Prema publikovanim vodičima, merenja su vršena pod kontrolisanim uslovima temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) i vlažnosti vazduha ($40 \pm 5\%$), 30 minuta nakon aklimatizacije učesnika studije (Berardesca, 1997; Fullerton i sar., 1996; Rogiers, 2001; Pinnagoda, 1990; Berry i sar., 1999).

Statistika

Svi dobijeni podaci u *in vivo* studijama prikazani su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Podaci dobijeni merenjem mesta tretiranih različitim uzorcima, uključujući i obe neretirane kontrole, u različitim vremenskim intervalima analizirani su jednofaktorskom ANOVA-om, nakon čega je rađen Tukey's *t*-test, gde je to bilo potrebno. Razlike su prihvaćene kao statistički značajne za $p < 0,05$. Statistička analiza je sprovedena uz pomoć komercijalnog statističkog paketa SPSS za Windows 7.0.

3.1.2.4.1. *In vivo* procena određenih aspekata bezbednosti ispitivanih uzoraka na koži

Cilj ovog dela studije bio je procena potencijala ispitivanih uzoraka, pre svega liposoma sa matičnim ćelijama alpske ruže i skvalena maslinovog ulja kao sastojaka emulzije, da izazovu lokalne neželjene reakcije, odnosno da iritiraju kožu i to merenjem određenih biofizičkih parametara pre i nakon nanošenja uzoraka, pod 24 časovnom okluzijom. Mereni parametri, čija će promena dati uvid u iritacioni potencijal uzoraka, jesu: TEWL, EC i EI.

Ovo ispitivanje je rađeno s ciljem da se proceni da li liposomske emulzije sa APG mogu izazvati neku lokalnu reakciju, bez obzira što su za njihovu izradu korišćene sirovine prihvatljivog bezbednosnog profila, kako su tvrdili proizvođači korišćenih sirovina.

Dizajn studije

Studija je bila randomizovana, dvostruko slepa i u njoj je učestvovalo 16 dobrovoljaca prosečne starosti $21,8 \pm 3,6$ godina.

Nakon inicijalnih merenja početnih (bazalnih) vrednosti EC, TEWL i EI, uzorci su nanošeni na volarnim stranama podlaktice obe ruke uz pomoć šablona sa tri kvadratna mesta površine 9 cm^2 ($3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$). Na prva dva mesta od lakta obe ruke nanoseni su uzorci (dva uzorka po ruci). Treće mesto (uz šaku) na obe ruke ostavljeno je kao netretirana kontrola, s tim da je netretirana kontrola na levoj ruci (UCO) bila pod okluzijom. Nakon nanošenja uzoraka, sva mesta, sem netretirane kontrole leve ruke, odmah su prekrivena Parafilm®-om (Pechiney Plastic Packaging, Inc., Menasha, Wisconsin, SAD) i pamučnom adhezivnom trakom Sensifix® (Beograd, Srbija). Završno merenje parametara (EC, TEWL i EI) sprovedeno je 3 časa nakon skidanja okluzije.

U ovom delu studije ispitivani su sledeći uzorci izrađeni uz upotrebu propellerske mešalice u fazi emulgovanja: Fp, FpA, FpS i komercijalni krem Fc.

3.1.2.4.2. *In vivo* ispitivanje efikasnosti uzoraka liposomskih emulzija na koži

In vivo ispitivanje efikasnosti izabranih uzoraka sprovedeno je u dugotrajnoj studiji (21 dan) na zdravoj koži, kao i kratkotrajnoj u trajanju od 6 dana na eksperimentalno izazvanoj suvoj koži.

3.1.2.4.2.1. *In vivo* ispitivanje efikasnosti odabranih uzoraka na zdravoj koži (dugotrajna 21-dnevna studija)

Dizajn studije

Studija je bila randomizovana, dvostruko slepa i u njoj je učestvovalo 36 dobrovoljaca prosečne starosti $20,5 \pm 0,5$ godina.

Nakon inicijalnih merenja početnih (bazalnih) vrednosti EC, TEWL i viskoelastičnih parametara kože, uzorci su nanošeni na volarnim stranama podlaktice

obe ruke uz pomoć istog šablona kao što je opisano u delu 3.1.2.4.1. Mesto uz šaku na obe ruke ostavljeno je kao netretirana kontrola. Dobrovoljci su uzorke razlikovali po boji ambalaže u koju su upakovani i dobili su jasne instrukcije u vezi količine uzorka i načina na koji se uzorci nanose uz pomoć šablona. Dobrovoljci su uzorke nanosili dva puta dnevno (ujutru i uveče). Kontrolno merenje vršeno je nakon 14 dana naošenja uzoraka, a završno merenje parametara (EC, TEWL i viskoelastičnost kože) nakon 21 dana. Dobrovoljci su dobili instrukcije da jutro pre merenja ne nanose uzorke.

U ovom delu studije ispitivani su sledeći uzorci izrađeni uz upotrebu propellerske mešalice u fazi emulgovanja: Fp, FpA, FpS i komercijalni krem Fc.

3.1.2.4.2.2. *In vivo* ispitivanje efikasnosti odabranih uzoraka na eksperimentalno indukovanoj suvoj koži

Dizajn studije

Studija je bila randomizovana, dvostruko slepa i u njoj je učestvovalo 24 dobrovoljca prosečne starosti $29,9 \pm 8,9$ godina.

Nakon inicijalnih merenja početnih vrednosti EC, TEWL i EI ("primarna" bazalna vrednost), na mestima predviđenim za ispitivanje efekata uzoraka, eksperimentalnim putem je iritirana suva koža nanošenjem rastvora natrijum lauril sulfata (NaLS) pod okluzijom, u trajanju od 6 časova u skladu sa publikovanim vodičem (Friebe i sar., 2003) i na način kako su opisali Arsić i sar., 2011: 100 μ L 10% (m/m) vodenog rastvora NaLS (čistoće > 99%, Merck, Nemačka), pipetirano je na šest filter papira. Filter papiri su uz pomoću šablona sa četiri četvorougaoone površine postavljeni na sledeći način: na tri četvorougaoone površine od šake leve ruke i na tri četvorougaoone površine od lakta desne ruke. Preko filter papira odmah je stavljen Parafilm®, a zatim i pamučna adhezivna traka Sensifix®. Četvorougaoona površina uz šaku desne ruke je prekrivena bez indukovanja i predstavljala je netretiranu kontrolu (UC), dok je mesto uz šaku leve ruke predstavljalo indukovanu netretiranu kontrolu (UCO). Dobrovoljci su sa kože skinuli pamučnu adhezivnu traku Sensifix®, Parafilm® i filter papire nakon 6 časova. Nakon izazivanja iritacije, na tom delu kože su nanošeni ispitivani uzorci. Nanošeno je 5 uzoraka - dva na levu i tri uzorka na desnu ruku, dva puta dnevno (ujutru i uveče).

Za ovaj deo studije izabrani su uzorci kod kojih je korišćena propelerska mešalica u fazi emulgovanja tokom izrade i to: Fp, FpA, FpS, FpAS i FpAS6. Drugo merenje praćenih parametara (EC, TEWL i EI) vršeno je 24 časa nakon skidanja okluzije ("sekundarna" bazalna vrednost), a završno merenje nakon 6 dana tretmana uzorcima. Poslednje nanošenje uzoraka od strane dobrovoljaca (kao deo šestodnevnog tretmana) vršeno je 12 časova pre završnog merenja.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog rada

4.1.1. Preformulaciona ispitivanja kozmetičkih emulzija sa novijim APG mešanim emulgatorom i liposom-inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže

4.1.1.1. Preformulaciona procena interakcije liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže i APG mešanog emulgatora

Liposomi kao visoko organizovani vezikularni sistemi, sastavljeni od jednog ili većeg broja koncentričnih lipidnih dvoslojeva koji zatvaraju unutrašnjost ispunjenu vodom, mogu se videti upotrebom polarizacionog mikroskopa (Himanshi i sar., 2015; Kulkarni, 2005; Patel i sar., 2012; Pierre i sar., 2011). Pri kontaktu liposoma sa polarizovanom svetlošću, pod mikroskopom se uočavaju tipične crno-bele teksture (malteški krstovi). Kada se u mikroskop postavi dodatna lambda (λ) pločica sa izraženim svojstvima prelamanja svetlosti, moguće je dobiti teksturu obojenu u žutu, tirkiznu i ružičastu boju, što pruža detaljniji uvid u strukturu ovih sistema (Bibi i sar., 2011).

Takođe, polarizaciona mikroskopija je odgovarajuća metoda za praćenje faznog ponašanja APG emulgatora (Lukic i sar., 2013b; Markovic-Bogdanovic i sar., 2014; Savic i sar., 2005; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011), ali je i pogodna za uočavanje određenih pojava koje se dešavaju pri interakciji surfaktanata sa liposomima (npr. solubilizacija). Najprihvaćeniji i najšire korišćeni model koji opisuje proces solubilizacije, do kog može doći tokom ove interakcije, jeste "model tri faze", sumiran na sledeći način: 1. raspoređivanje surfaktanta između dvosloja vezikula i vode; 2. prevođenje dvosloja u mešovite micle i 3. smanjenje veličine mešanih micela (Lichtenberg i sar., 2013). Druga faza ovog modela (prevođenje dvosloja u mešovite micle) verovatno se može detektovati upotrebom polarizacione mikroskopije kao metode kojom se "vidi" prevođenje anizotropnih vezikula u izotropne mešane micle.

Iz tog razloga, polarizaciona mikroskopija je korišćena sa ciljem da se ispita da li liposomi sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže (MČAR-liposomi) ostaju intaktni u smešama APG emulgatora i ovih vezikula, uzimajući u obzir dve različite

koncentracije korišćenog surfaktanta (prva koncentracija od 0,01% (m/m) malo veća od merene KMK, dok je druga koncentracija (5% (m/m)), na osnovu preliminarnih ispitivanja i preporuka (Roso i sar., 2012), najpodesnija za izradu čvršćih kremova sa ovim emulgatorom.

4.1.1.2. Određivanje kritične micelarne koncentracije ispitivanog emulgatora i praćenje njegovog faznog ponašanja u binarnim sistemima

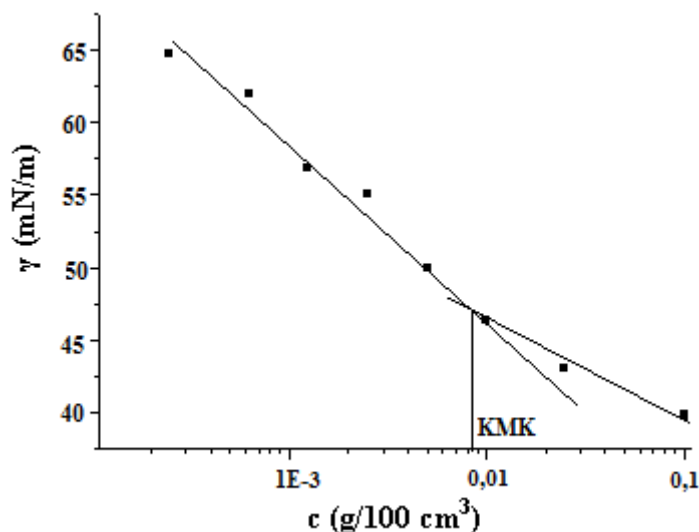
Pre procene da li dolazi do interakcije MČAR-liposoma sa APG emulgatorom i u cilju utvrđivanja optimalne koncentracije emulgatora koja će imati uticaj na stabilnost liposoma, eksperimentalno je određena KMK ispitivanog emulgatora, s obzirom na to da ovaj podatak nije dostupan u specifikaciji proizvođača, niti u dostupnoj literaturi. Dodatno, posmatrano je i fazno ponašanje ispitivanog emulgatora, radi dalje diskusije njegove interakcije sa liposomima.

Kao što je već pomenuto, u vodenim rastvorima površinski aktivne materije (PAM) se spontano samoorganizuju u različite strukture u zavisnosti od koncentracije: vodeni rastvor monomera PAM (pri veoma niskim koncentracijama surfaktanta), formiranje micela (iznad KMK) i na kraju micela (različitog oblika) i liotropne mezofaze (dalje povećanje koncentracije surfaktanta) (Demus i sar., 1998). Međutim, fazno ponašanje mešanih emulgatora koji se sastoje iz surfaktanta i masnog alkohola, kakav je ispitivani emulgator (HSA i HSG), malo je drugačije zbog stvaranja mešanih monoslojeva na međupovršini, kao i mešanih micela u rastvoru (Rosen, 2004).

Kritična micelarna koncentracija ispitivanog mešanog APG emulgatora određena je merenjem površinskog napona i crtanjem krive zavisnosti površinskog napona i koncentracije emulgatora u rastvoru (Slika 13).

Na dobijenoj krivi vidi se da tačka prekida nije toliko oštra i blaga promena u obliku krive može se uočiti pri koncentraciji emulgatora od 0,0085% (m/m). Ovakav rezultat je verovatno posledica nehomogene raspodele komponenata mešanog emulgatora, bez obzira na to što su sastojci ispitivanog emulgatora (HSA i HSG) slične strukture i ne razlikuju se po dužini hidrofobnih lanaca, što je već zabeleženo kod nekih smeša nejonskih emulgatora (Abe, 2004). Takođe, ispitivani emulgator je izgleda jedan od surfaktanata kod kojih se ne dobija jasna promena oblika krive zavisnosti

površinskog napona i koncentracije, verovatno zbog prisutnih nečistoća ili velike molekulske mase (Patist i sar., 2000).



Slika 13. Kriva zavisnosti površinskog napona (γ) i koncentracije (c) ispitivanog emulgatora

Sa druge strane, objašnjenje za dobijenu vrednost KMK, koja je malo veća od očekivane (na osnovu opisanih vrednosti KMK za pojedine dugolančane nejonske emulgatore (Lopez i sar., 2001a; Ribosa i sar., 1997; Rosen, 2004)), verovatno leži u specifičnoj hemijskoj strukturi ispitivanog emulgatora - preciznije dodatnoj hidroksilnoj grupi (-OH) u lancu masnog alkohola mešanog emulgatora. Iako KMK u vodenom rastvoru pojedinih nejonskih emulgatora opada sa povećanjem dužine alkil lanca u strukturi masnog alkohola (Lopez i sar., 2001a; Ribosa i sar., 1997), dodatna polarna grupa (-OH) u lipofilnom delu značajno utiče na povećanje vrednosti KMK (Rosen, 2004).

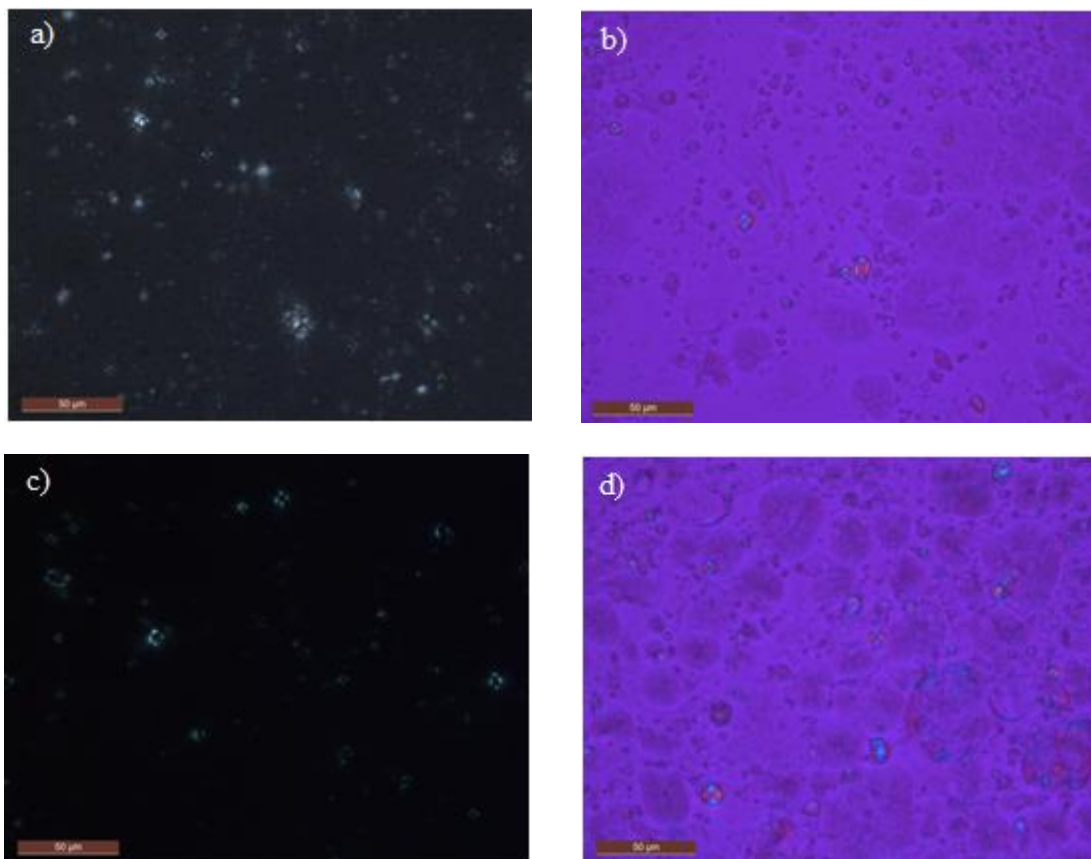
Nakon određivanja KMK, praćeno je fazno ponašanje ispitivanog mešanog emulgatora u binarnim sistemima BS1 i BS2 (sastav binarnih sistema prikazan je u Tabeli 8) uz pomoć polarizacione mikroskopije. Uzevši u obzir da koncentracija surfaktanta u rastvoru mora dostići KMK da bi došlo do solubilizacije prisutnih liposoma (Maza i sar., 1996), malo viša koncentracija od izmerene KMK (0,01%

(m/m)) izabrana je za prvi binarni sistem (BS1). Pri izabranoj koncentraciji, bliskoj KMK, očekivana je interakcija surfaktanta sa liposomima koju je moguće detektovati uz pomoć polarizacione mikroskopije. Uporedo, praćeno je i fazno ponašanje ispitivanog emulgatora u koncentraciji znatno višoj od KMK (5% (m/m)) - drugi binarni sistem (BS2). Navedena koncentracija izabrana je u preliminarnim ispitivanjima, kao najpodesnija za izradu krema za narednu fazu eksperimentalnog rada.

Fazno ponašanje mešanih APG emulgatora je zavisno od koncentracije emulgatora. U koncentrovanim rastvorima, pri koncentraciji znatno višoj od KMK, ovi stabilizatori formiraju liotropne mezofaze - tečne kristale oba tipa (lamelarnu tečnu i lamelarnu gel kristalnu strukturu) kako su utvrdili Lukic i sar. (2013b); Savic i sar. (2005; 2011); Tasic-Kostov i sar.(2011) vršeći ispitivanja na APG kao što su: arahidil alkohol (C20), behenil alkohol (C22) i arahidil glukozid (INCI: *Arachidyl alcohol (C20), behenyl alcohol (C22) and arachidyl glucoside*, Montanov® 202, Seppic, Francuska); koko glukozid i cetearil alkohol (INCI: *Coco glucoside and cetearyl alcohol*, Montanov® 82, Seppic, Francuska), cetearil glukozid i cetearil alkohol (INCI: *Cetearyl glucoside and cetearyl alcohol*, Montanov® 68 PHA) i miristil alkohol i miristil glukozid (INCI: *Myristyl alcohol and myristyl glucoside*, Montanov® 14, Seppic, Francuska). Navedene specifične anizotropne strukture uočene su uz pomoć polarizacione mikroskopije (Lukic i sar., 2013b; Savic i sar., 2005; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011).

U prvom binarnom sistemu (BS1) anizotropno ponašanje nije utvrđeno. Ovaj sistem je bio izotropan rastvor 7 dana nakon izrade i nije došlo do promene ni posle 30 dana. Navedeni uzorak verovatno sadrži izotropne strukture, najverovatnije mešane micide surfaktanata, koje se ne mogu uočiti pod polarizacionim mikroskopom.

Međutim, dobijene mikrografije binarnog sistema BS2 (Slika 14) ukazuju na prisustvo anizotropnih struktura - malteških krstova, koje upućuju na koncentraciono-zavisnu liotropnu interakciju lamelarnog tipa (Lukic i sar., 2013b; Savic i sar., 2005; 2011).



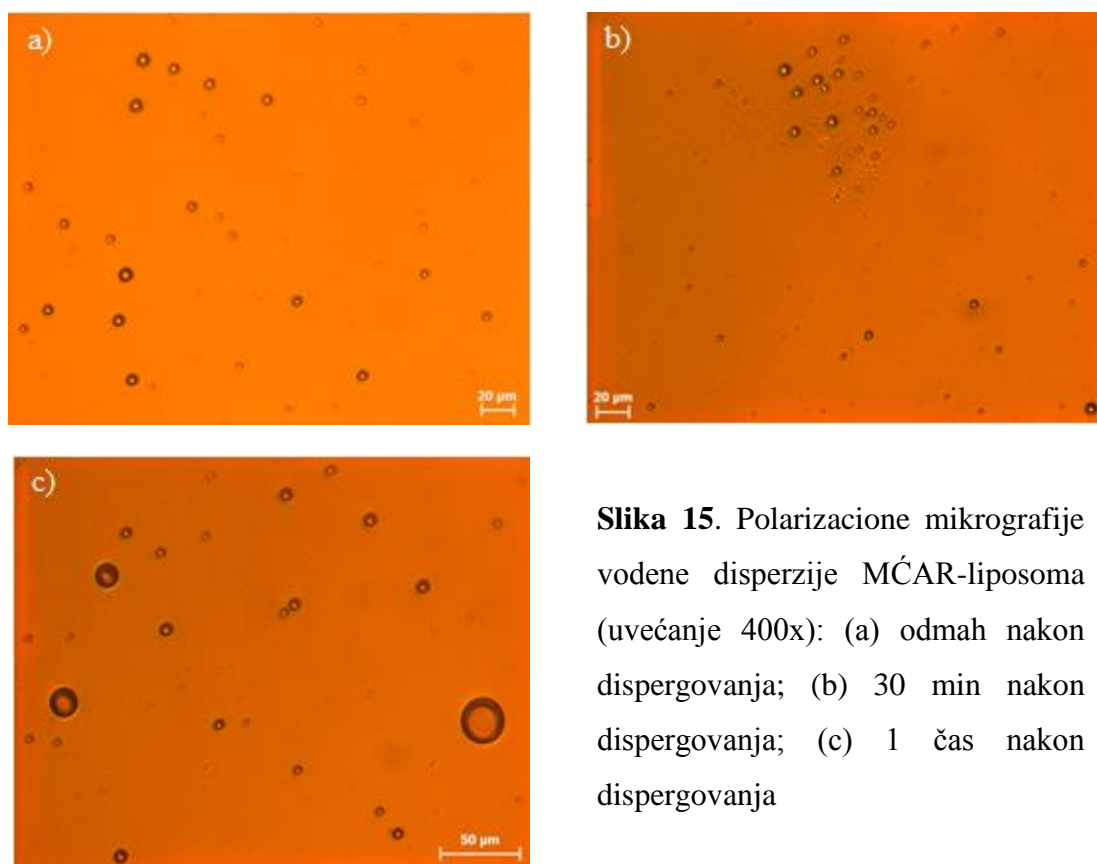
Slika 14. Polarizacione mikrografije binarnog sistema BS2 sa 5% (m/m) HSA i HSG mešanog emulgatora (uvećanje 500x): (a-b) 7 dana nakon izrade; (c-d) 30 dana posle izrade

Na mikrografijama se mogu uočiti i kristali emulgatora, što je očekivano, uzimajući u obzir da binarni sistemi sadrže visoku koncentraciju surfaktanta (5% (m/m)) i nemaju uljanu fazu (Lukic i sar., 2013b). Dalje, kod sistema BS2 može se uočiti razlika u koloidnoj strukturi 30 dana posle izrade (Slika 14 c-d) što se može opisati kao naknadno strukturiranje sistema (formiranja dodatnih lamelarnih faza), što se ogleda u prisustvu dodatnih anizotropnih struktura, kako je opisala Savić (2004) prateći ponašanje binarnih sistema voda i emulgator - cetearil glukozid i cetearil alkohol (INCI: *Cetearyl glucoside and cetearyl alcohol*, Montanov® 68 PHA).

4.1.1.3. Fizičko-hemijska karakterizacija liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže i procena njihovog ponašanja u ternarnim sistemima (emulgator HSA i HSG - liposomi - prečišćena voda)

Pre izrade ternarnih sistema (Tabela 8), izvršena je karakterizacija liposom-inkapsuliranih matičnih ćelija alpske ruže (MĆAR-liposomi).

U cilju vizuelizacije liposoma i potvrde njihovog formiranja i strukturnog integriteta nakon dispergovanja granulata sa vezikulama u prečišćenoj vodi, korišćena je polarizaciona mikroskopija (Bibi i sar., 2011). Mikrografije vezikula su snimljene odmah nakon dispergovanja u vodi, posle 30 min i 1 časa i prikazane su na Slici 15.



Slika 15. Polarizacione mikrografije vodene disperzije MĆAR-liposoma (uvećanje 400x): (a) odmah nakon dispergovanja; (b) 30 min nakon dispergovanja; (c) 1 čas nakon dispergovanja

Kao što se može uočiti (Slika 15), mikrografije potvrđuju prisustvo liposoma nakon dispergovanja granulata sa KAS u prečišćenoj vodi. Mikrografija 15a pokazuje da je veličina liposoma odmah nakon dispergovanja relativno ujednačena. Ovo je potvrđeno i upotrebom laserske difrakcije koja pokazuje uniformnost 0,08 i 668 nm kao srednju veličinu vezikula.

Odmah nakon dispergovanja uočena je homogena distribucija liposoma po veličini (Slika 15a). Međutim, Slika 15b ukazuje da je 30 min nakon dispergovanja došlo do neznatne agregacije pojedinih vezikula, koja je reverzibilna, s obzirom na to da su novonastali agregati i dalje sastavljeni od intaktnih liposoma. Novonastali agregati se mogu vratiti u prethodno stanje (homogena distribucija) blagim mešanjem ili smanjenjem temperature vodene disperzije (Kulkarni i sar., 2011). Sa druge strane, Slika 15c pokazuje da je 1 čas nakon dispergovanja došlo do fuzije pojedinih vezikula, što je ireverzibilna pojava (Kulkarni i sar., 2011), s obzirom na to da su formirani veći liposomi - nove koloidne strukture.

Dodatno, izmereni su pH i električna provodljivost vodene disperzije MČAR-liposoma i prikazani su u Tabeli 15.

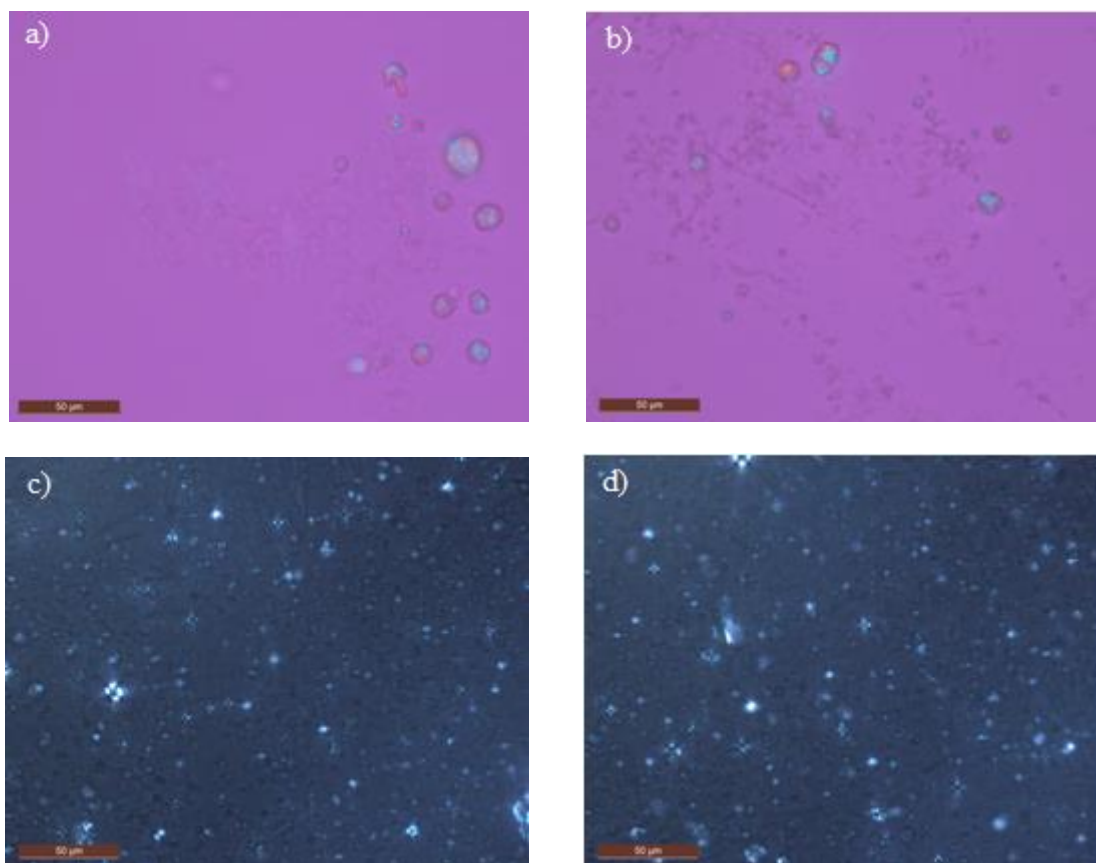
Tabela 15. pH i električna povodljivost 0,4% i 1% (m/m) disperzije liposoma

Disperzija liposoma	pH	Električna provodljivost ($\mu\text{S/cm}$)
0,4% (m/m) MČAR-liposoma	4,82 \pm 0,03	20,0 \pm 0,8
1% (m/m) MČAR-liposoma	4,63 \pm 0,02	42,86 \pm 0,3

Kao što se može videti (Tabela 15), disperzije MČAR-liposoma imaju pH oko 5 koja odgovara fiziološkom pH kože. U pogledu električne provodljivosti - njena vrednost raste sa porastom koncentracije liposoma.

Dalje, sa ciljem da se ispita da li liposomi sa inkapsulirnom KAS ostaju intaktni u prisustvu upotrebljenog mešanog emulgatora, izrađeni su ternarni sistemi (Tabela 8) i posmatrani pod polarizacionim mikroskopom.

Ternarni sistemi TS1 i TS1a (0,01% (m/m) emulgatora i 0,4% i 1% (m/m) MČAR-liposoma, respektivno) su posmatrani 30 min, 7 dana i 30 dana nakon izrade. Mikrografije ternarnih sistema TS2 i TS2a (5% (m/m) emulgatora i 0,4% i 1% (m/m) MČAR-liposoma, respektivno) snimane su nakon strukturiranja sistema 7 dana i nakon 30 dana od izrade. Polarizacione mikrografije ispitivanih ternarnih sistema, dobijene 7 dana nakon izrade, prikazane su na Slici 16.

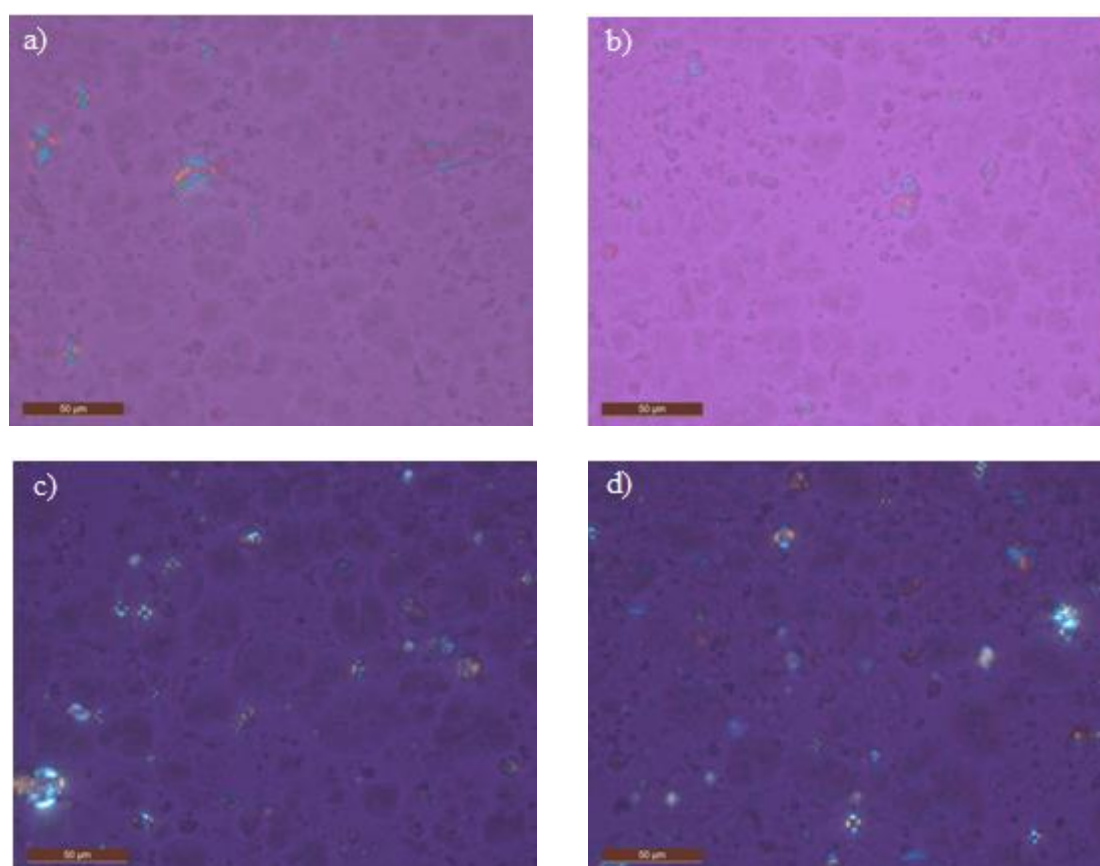


Slika 16. Polarizacione mikrografije ternarnih sistema 7 dana nakon izrade (uvećanje 500x): (a) TS1; (b) TS1a; (c) TS2; (d) TS2a

Za razliku od binarnog sistema BS1, koji je izotropan rastvor, mikrografije ternarnih sistema TS1 i TS1a (BS1 sa 0,4% i 1% (m/m) MČAR-liposoma) 30 min nakon izrade izgledale su isto kao mikrografije vodene disperzije vezikula (Slika 15). Prema tome, liposomi su se u prisustvu emulgatora ponašali na isti način kao u vodenoj disperziji - došlo je do agregacije pojedinih liposoma (vezikule su zadržale lamelarnu

strukturu), pri čemu se agregati novonastalih vezikula nisu razlikovali po veličini u odnosu na agregate nastale u vodenoj disperziji liposoma. Zbog odsustva bilo kakvih promena u odnosu na mikrografije vodene disperzije liposoma (Slika 15), mikrografije ternarnih sistema TS1 i TS1a 30 min nakon izrade nisu prikazane.

Promene u strukturi ternarnih sistema TS1 i TS1a primećene su tek 7 dana nakon izrade (Slika 16 a-b) i nisu se značajno promenile 30 dana nakon izrade (Slika 17 a-b).



Slika 17. Polarizacione mikrografije ternarnih sistema 30 dana nakon izrade (uvećanje 500x): (a) TS1; (b) TS1a; (c) TS2; (d) TS2a

Anizotropne strukture koje se mogu videti na navedenim mikrografijama su iskrivljeni malteški krstovi, koji upućuju na liotropnu interakciju lamelarnog tipa (Lukic i sar., 2013b; Savic i sar., 2005; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011), kao i veliki sferični anizotropni agregati. Navedeno je u skladu sa prethodno opisanim ponašanjem liposoma

u vodenoj disperziji. Formiranje većih koloidnih struktura do kog dolazi vremenom, usled fuzije liposoma, verovatno utiče na fazno ponašanje mešanog emulgatora i vodi nastajanju agregata. Interakcija emulgatora sa liposomima ne dovodi do pojave izotropnog rastvora sa micelarnim strukturama, čak ni nakon 30 dana od izrade.

Kada se u vodenu disperziju liposoma doda surfaktant koji može da ošteti liposom, surfaktant se prvo raspoređuje između vodenog medijuma i fosfolipidnih dvoslojeva vezikula. Sa porastom koncentracije surfaktanta u dvoslojevima, dvoslojevi postaju zasićeni surfaktantom i nastaju mešane micide, odnosno dolazi do solubilizacije liposoma. Posledica je nestajanje vezikula i nastajanje izotropnog rastvora.

Dobijene mikrografije upućuju da liposomi nisu solubilizovani u prisustvu upotrebljenog mešanog emulgatora, već zadržavaju ponašanje slično onom u vodenoj disperziji (formiranje velikih koloidnih struktura usled fuzije vezikula). Novonastale koloidne strukture mogu da interaguju sa emulgatorom što vodi stvaranju lamelarne faze, ali i velikih agregata koji su verovatno sastavljeni iz mešanog emulgatora i lecitina iz liposoma (Slike 16 i 17).

Kao što se i očekivalo, na mikrografijama ternarnih sistema TS2 i TS2a (Slika 16 c-d) zapažaju se malteški krstovi koji upućuju na lamelarnu fazu, verovatno oba tipa (lamelarna tečna i lamelarna gel kristalna faza) (Lukic i sar., 2013b; Savic i sar., 2005; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011). Pored lamelarne faze mešanog emulgatora i kristala emulgatora, intaktni liposomi su takođe vidljivi (tamnije mikrografije su prikazane radi bolje vizuelizacije i poređenja sa binarnim sistemima). Liposomi se generalno nalaze blizu lamelarne faze emulgatora, odnosno izgleda da su imobilisani unutar mreže lamelarne faze sistema, što ih mehanički stabilizuje i ograničava njihovu interakciju i fuziju.

Kada se ternarni sistemi TS2 i TS2a (Slika 16 c-d) uporede sa binarnim sistemom BS2 (Slika 14), uočava se da dodatak MČAR-liposoma utiče na koloidnu strukturu smeše voda-emulgator i dovodi do povećanja broja i veličine anizotropnih struktura. Posle 30 dana od izrade, izgled navedenih ternarnih sistema takođe nije značajno izmenjen (Slika 17 c-d).

Preformulaciona studija je pokazala kompatibilnost ispitivanog mešanog APG emulgatora i MČAR-liposoma u jednostavnim ternarnim sistemima i obezbedila

značajne informacije potrebne za dalju izradu model emulzionog nosača za liposome sa KAS, a stabilizovanog novijim APG mešanim emulgatorom HSA i HSG.

4.2. Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada

4.2.1. Fizičko-hemijska karakterizacija i procena stabilnosti model emulzionog nosača za liposome sa matičnim ćelijama alpske ruže

S obzirom na to da je preformulaciona faza eksperimentalnog rada pokazala da su liposomi sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže (MĆAR-liposomi) i upotrebljeni mešani emulgator kompatibilni, u II fazi rada ispitano je da li je pomenuti mešani emulgator pogodan stabilizator kozmetičkih proizvoda koji sadrže MĆAR-liposome. Prvo je formulisan model emulzioni nosač sa pomenutim sirovinama, zatim je izvršena fizičko-hemijska karakterizacija i na kraju procena stabilnosti dobijenih uzoraka.

Na osnovu rezultata dobijenih procenom preliminarne fizičke stabilnosti, estetskih i aplikativnih karakteristika, najbolje karakteristike model nosača pokazao je uzorak Fkg, koji je u cilju lakšeg praćenja, preimenovan u uzorak Fp i podvrgnut daljem ispitivanju. Sastav uzorka Fp je dat u Tabeli 10.

Navedeni uzorak je bio čvršći krem bele boje, sjajan, homogen, lako se nanosio na kožu, nije bio mastan, blago lepljiv prilikom utrljavanja, umereno brzo se upijao nakon nanošenja, a film koji je ostavljao na koži je bio blago sjajan. Uzorci F, Fgms i Fcakg su imali najlošije procenjene estetske karakteristike - imali su izgled nehomogenih, mekih belih kremova, kod kojih je došlo do razdvajanja faza, što je ukazivalo na fizičku nestabilnost. Sa druge strane, uzorci Fnp i Fsg su bili konzistencije vrlo gustih krem-gelova, bele boje, nehomogenog izgleda uz pojavu grudvica.

Dodavanjem 0,4% i 1% (m/m) liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže (MĆAR-liposomi) u izabrani nosač Fp, izrađene su dve model kozmetičke emulzije, F1a i F2a, a njihov sastav je dat u Tabeli 10.

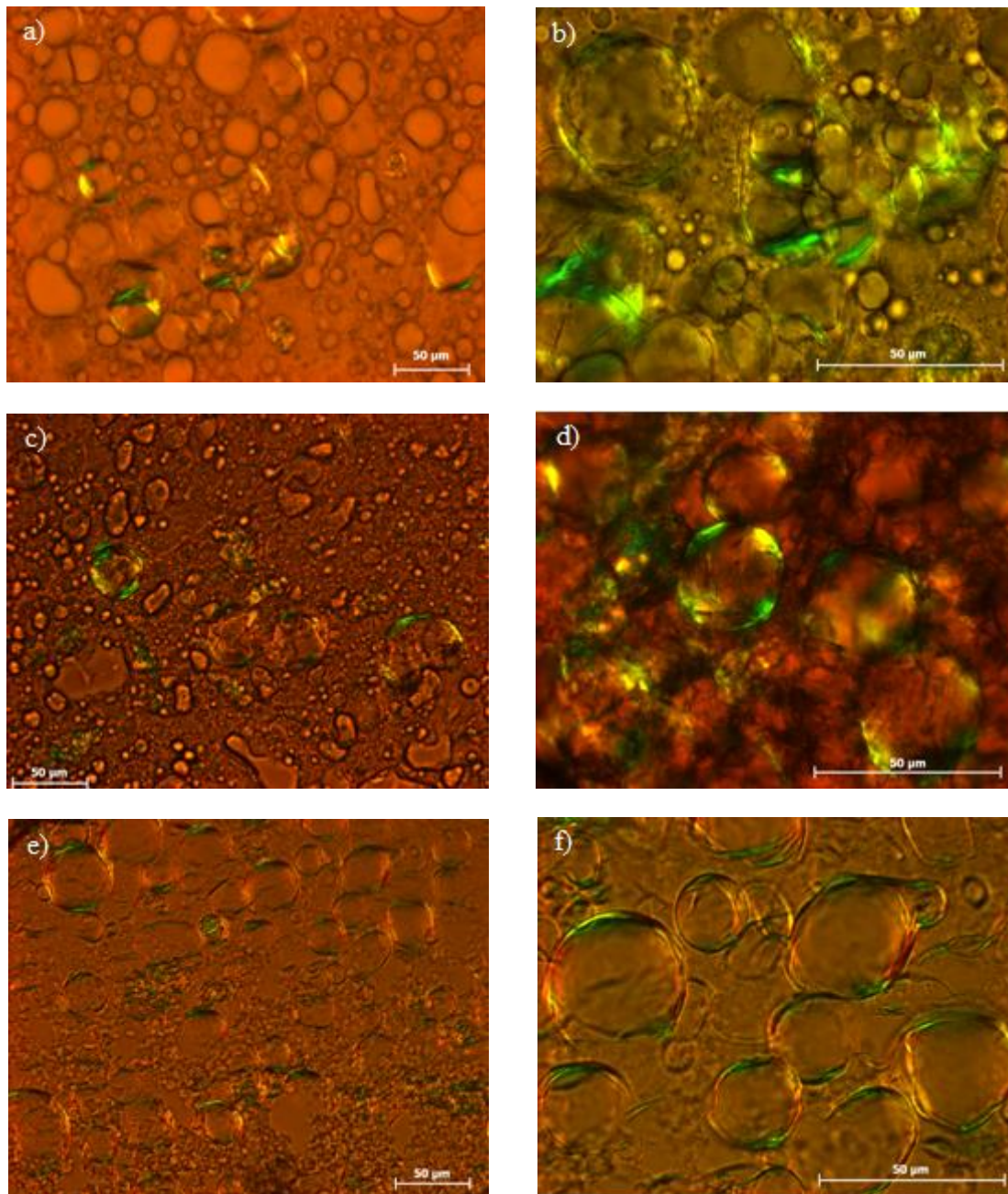
4.2.1.1. Fizičko-hemijska karakterizacija model emulzionog nosača i model kozmetičkih emulzija (kremova) sa liposomima

Karakterizacija ispitivanih uzoraka (nosač – placebo, Fp i kremovi sa KAS - F1a i F2a) izvršena je primenom sledećih metoda: polarizaciona mikroskopija, reološka merenja (kontinualna i oscilatorna), diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC), termogravimetrijska analiza (TGA) i teksturna analiza.

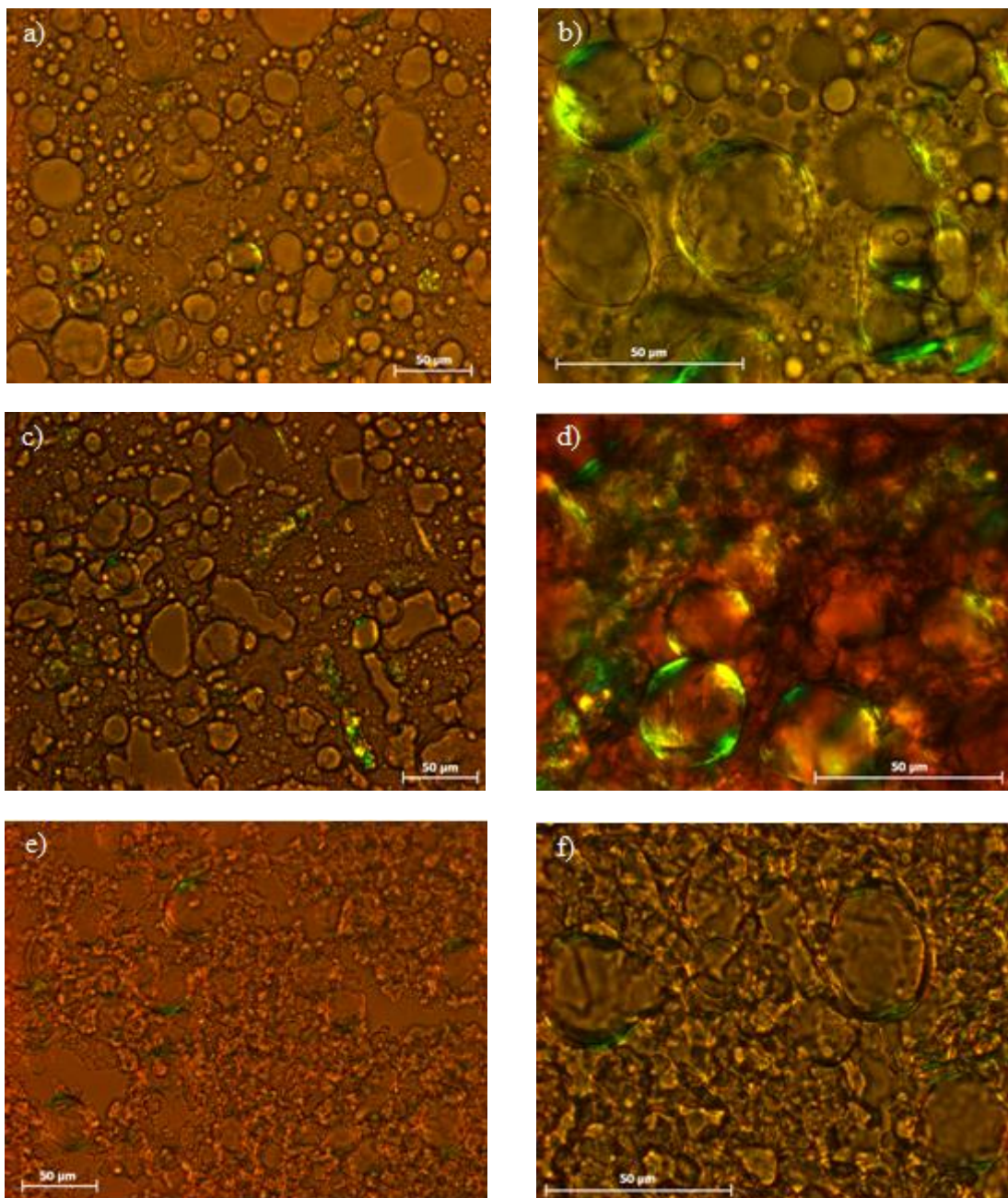
Kao prvi korak u karakterizaciji ispitivanih emulzionih sistema izvršeno je polarizaciono mikroskopiranje uzoraka radi ispitivanja njihove koloidne strukture. Glavni cilj bio je utvrditi da li su prisutne specifične lamelarne faze i nepromenjeni liposomi.

Mikrografije model emulzija (kremova) su snimljene 7 dana i 30 dana nakon izrade. Na Slici 18 prikazane su mikrografije dobijene 7 dana nakon izrade uzoraka.

Na mikrografijama (Slika 18) uočavaju se nasumično raspoređeni iskrivljeni malteški krstovi i prelamanja na ivici uljanih kapi (tzv. "*onion rings*") unutar svih ispitivanih uzoraka, koji upućuju na liotropnu interakciju lamelnog tipa (Lukic i sar., 2013b Savic i sar., 2005; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011). Koloidna struktura se nije značajno promenila čak i nakon 30 dana (Slika 19).



Slika 18. Polarizacione mikrografije dobijene 7 dana nakon izrade uzoraka: (a-b) placebo Fp (uvećanje 400x i 1000x); (c-d) uzorak F1a (uvećanje 400x i 1000x); (e-f) uzorak F2a (uvećanje 400x i 1000x)

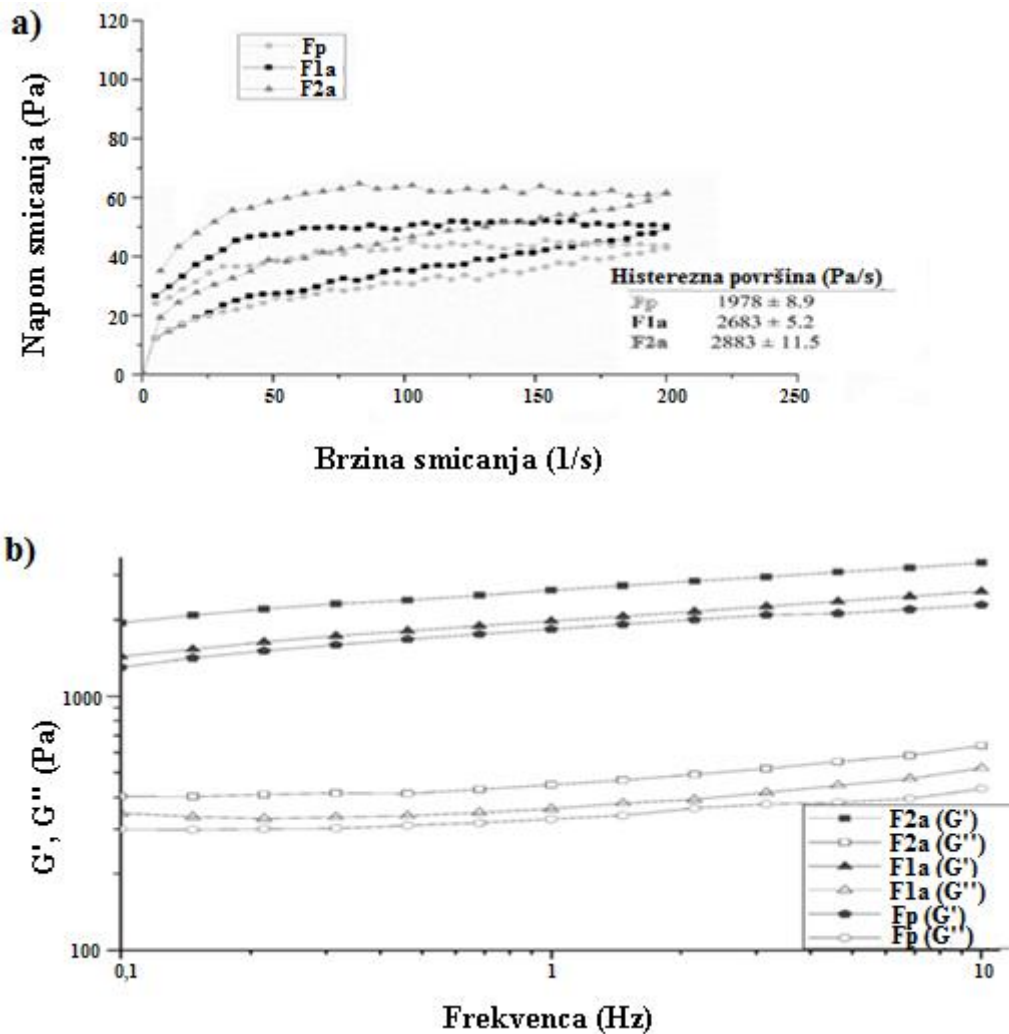


Slika 19. Polarizacione mikrografije dobijene 30 dana nakon izrade uzoraka: (a-b) placebo Fp (uvećanje 400x i 1000x); (c-d) uzorak F1a (uvećanje 400x i 1000x); (e-f) uzorak F2a (uvećanje 400x i 1000x)

Uzimajući u obzir rezultate I faze istraživanja, anizotropija utvrđena u ternarnim sistemima, očekivana je i u uzorcima kremova, kao i primetna razlika u koloidnoj strukturi između placebo uzorka krema (nosača) Fp (Slika 18 a-b) i kremova F1a i F2a (Slika 18 c-f). Poznato je da prisustvo uljane faze komplikuje vizuelizaciju liposoma - anizotropnih struktura u emulzionom sistemu, ali mikrografije pokazuju da se strukture slične liposomima mogu uočiti blizu prelamanja na ivici uljanih kapi ("*onion rings*") u kontinualnoj fazi kremova F1a i F2a (Slika 18 c-f). S obzirom na to da je disperzija MĆAR-liposoma dodata u fazi hlađenja kremova, kada su već formirane određene unutrašnje strukture krema, moglo se očekivati da će se vezikule naći u blizini lamelarne gel mreže u kontinualnoj (vodenoj) fazi sistema.

U daljoj karakterizaciji ispitivanih kremova, izvršena su kontinualna i oscilatorna reološka merenja i krive tečenja/proticanja su prikazane na Slici 20.

Krive tečenja (Slika 20a) pokazuju da svi uzorci ispoljavaju pseudoplastično tečenje (engl. *shear-thinning*) sa izraženom tiksotropijom, što se smatra optimalnom osobinom kremova i ostalih proizvoda namenjenih primeni na koži (Lukic i sar., 2012; 2013b). Na osnovu dobijenih reograma i izračunatih vrednosti histereznih površina (Slika 20a), evidentno je da dodatak MĆAR-liposoma utiče na reološko ponašanje nosača. Iako se može uočiti blago povećanje viskoziteta i ugušćivanje placebo krema (nosača) nakon dodatka niže koncentracije MĆAR-liposoma (0,4% (m/m)), reološko ponašanje uzorka Fp i F1a je vrlo slično. Dodatak 1% (m/m) MĆAR-liposoma (uzorak F2a) značajnije utiče na konzistenciju krema, što se i očekivalo, uzimajući u obzir polarizacione mikrografije ovog uzorka (Slika 18 e-f). Veće vrednosti napona smicanja uzorka F2a u odnosu na placebo Fp, zajedno sa povećanim prinosnim naponom i histereznim površinama, ukazuju na značajnije ugušćivanje sistema kao posledica dodatka 1% (m/m) MĆAR-liposoma.



Slika 20. Rezultati reoloških merenja uzoraka Fp, F1a i F2a: (a) kriva tečenja/proticanja (napon smicanja u funkciji brzine smicanja) i vrednost histereznih površina; (b) viskoelastično ponašanje uzoraka prikazano kao elastični (G') i viskozni (G'') modul u funkciji frekvence

Pored kontinualnog reološkog merenja, sproveden je oscilatorni frekvencioni test u cilju dobijanja informacija vezanih za viskoelastično ponašanje kremova i njihove koloidne strukture (Korhonen i sar., 2000), koje je značajno za procenu stabilnosti i lakoću nanošenja na koži.

Kao što se vidi na Slici 20b, dobijeni elastični modul (G') veći je od viskoznog modula (G'') kod svih ispitivanih uzoraka. Utvrđena prednost elastične komponente nad viskoznom je pokazatelj da su u emulzionim sistemima prisutne lamelarne faze (Lukic i

sar., 2013b; Marković-Bogdanović, 2014; Savic i sar., 2005; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011). Oba uzorka (F1a, F2a) imaju veći elastični i viskozni modul u odnosu na placebo (Fp), pri čemu je veća razlika zabeležena kod uzorka sa većom koncentracijom aktivne supstance (F2a). Dobijeni rezultati su u skladu sa kontinualnim reološkim merenjima.

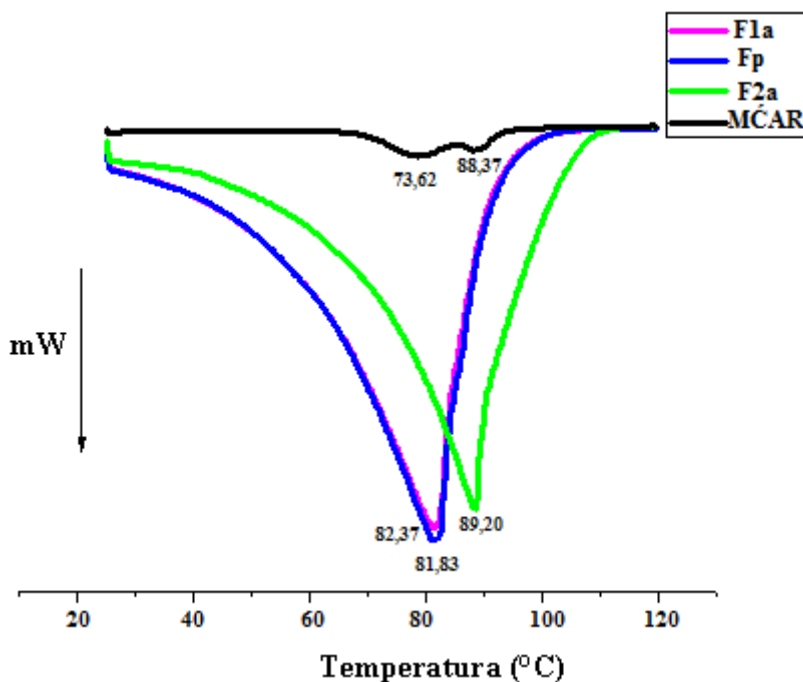
Prema nekim autorima ovaj rezultat može upućivati na koncentraciono-zavisni uticaj kozmetički aktivne supstance na stvaranje lamelarne faze unutar sistema (Tasic-Kostov i sar., 2011). Stoga, povećanje svih reoloških parametara nakon dodavanja MĆAR-liposoma može biti posledica promene u orijentaciji lamela pod uticajem napona smicanja gde, u zavisnosti od domen-domen interakcija, spoljašnji stres definiše viskozitet sistema (Nemeth i sar., 1998). Takođe, može se pretpostaviti da povećanje elastičnosti aktivnih uzoraka nije samo prouzrokovano lamelarnom fazom, već i prisustvom intaktnih liposoma.

Reološke karakteristike uzoraka (F1a, F2a) ukazuju da, prilikom formulacije proizvoda sa MĆAR-liposomima, pažnju treba posvetiti izboru koncentracije aktivne supstance, u odnosu na preporuke proizvođača tih sirovina. Dodatak MĆAR-liposoma placebo dovodi do koncentraciono-zavisnog ugušćivanja sistema sa posledničnim promenama u koloidnoj strukturi i distribuciji vode unutar nosača, pogotovo dodatak 1% (m/m) MĆAR-liposoma. Ova pretpostavka je u skladu sa dobijenim rezultatima I faze istraživanja za ternarne sisteme sa 5% (m/m) emulgatora (TS2 i TS2a).

Dalje, u cilju poređenja faznog ponašanja uzoraka i ispitivanja načina distribucije vode unutar sistema, imajući u vidu dodatak MĆAR-liposoma, izvedena su DSC i TGA merenja.

DSC termogram je prikazan na Slici 21. Kao što se može videti, termalno ponašanje svih uzoraka (Fp, F1a i F2a) je slično s obzirom na oblik dobijenog termograma, sa po jednim zabeleženim pikom (81,83°C, 82,37°C i 89,20°C, respektivno). Takođe, primetno je da dodatak MĆAR-liposoma dovodi do blagog pomeranja pika krive kod uzorka F1a i nešto izraženijeg pomeranja kod uzorka F2a, ka višim temperaturnim vrednostima. Prema pojedinim autorima, zabeleženo pomeranje pika krive može ukazivati na pomeranje vode unutar sistema ka lipidnim lamelama (lipidnim dvoslojevima) i ovo pomeranje uglavnom prati promocija lamelarne faze (Lukic i sar., 2013b; Savic i sar., 2005; Tasic-Kostov i sar., 2011). Međutim, uzevši u

obzir polarizacione mikrofografije ispitivanih uzoraka (Slika 18), veća je verovatnoća da je zabeleženo termalno ponašanje aktivnih uzoraka posledica prisustva samih intaktnih liposoma, pre nego dodatne lamelarne faze sistema. Pretpostavka je u skladu sa rezultatima reoloških merenja.



Slika 21. DSC termogram MČAR-liposoma i ispitivanih uzoraka kremova Fp, F1a i F2a

TGA je odgovarajuća metoda ispitivanja načina distribucije vode unutar sistema i razlikovanja slobodne (engl. *bulk*) vode od interlamelarno vezane vode unutar emulzionog sistema (Savic i sar., 2011). Rezultati TGA su prikazani u Tabeli 16.

Tabela 16. Gubitak vode iz ispitivanih uzoraka izražen u procentima u određenim temperaturnim intervalima

Uzorak	Gubitak vode 25-50°C (%)	Gubitak vode 50-70°C (%)	Gubitak vode 70-110°C (%)
Fp	56,05 ± 1,89	13,43 ± 0,08	18,22 ± 0,56
F1a	47,32 ± 0,71	13,57 ± 2,00	21,03 ± 1,03
F2a	41,12 ± 0,57	14,84 ± 0,89	25,16 ± 2,37

Procentualni gubitak vode je meren u odnosu na ukupan sadržaj vode u emulzionom sistemu

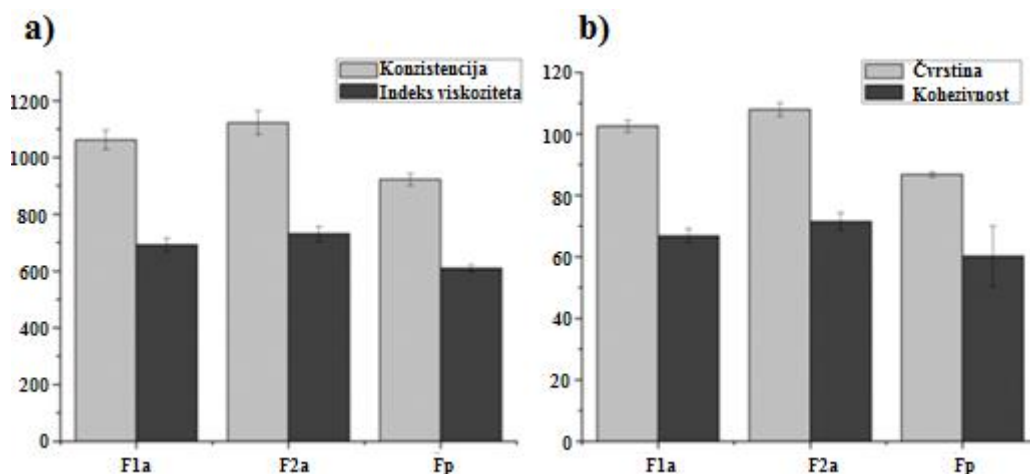
Dobijeni rezultati (Tabela 16) pokazuju izvesnu razliku u distribuciji vode u sistemu nakon dodatak MČAR-liposoma. Razlika je primećena u prvom temperaturnom intervalu (25-50°C), koji odgovara slobodnoj (engl. *bulk*) vodi u sistemu i u trećem temperaturnom intervalu (70-110°C) koji odgovara interlamelarno vezanoj vodi - frakciji vode potencijalno vezanoj između lamela tečne kristalne faze (Savic i sar., 2011; Tasic-Kostov i sar, 2011) i/ili vodi unutar liposoma. Nakon dodatka aktivne supstance, količina izgubljene vode se smanjuje u prvom temperaturnom intervalu, a raste u trećem. Procentualni sadržaj vode koja je isparila u drugom temperaturnom intervalu (50-70°C), koji odgovara vodi vezanoj za lipofilnu gel fazu, ostaje sličan pre i nakon dodavanja aktivne supstance.

Iako dobijeni rezultati TGA upućuju da je došlo do pomeranja slobodne vode u sistemu u korist interlamelarno vezane vode nakon dodavanja MČAR-liposoma, uzimajući u obzir sve prethodne rezultate, kao i ovaj rezultat, može se pretpostaviti da je ipak nešto drugo u pitanju. Verovatnije je da liposomi pozicionirani blizu lamelarne kristalne faze oko uljanih kapi, usled određenog kapaciteta vezivanja vode, dovode do pomeranja vode unutar sistema.

Na kraju ove faze ispitivanja, urađena je i teksturna analiza kako bi se procenile mehaničke karakteristike kremova i dobile informacije o teksturi model liposomskih kozmetičkih emulzija (Lukic i sar., 2012) na čijoj je formulaciji rađeno u ovoj doktorskoj disertaciji. Kao što se može videti na Slici 22 iako uzorak F2a ima najveću vrednost svih teksturnih parametara, rezultati ipak upućuju da dodatak MČAR-liposoma

(u koncentraciji 0,4% i 1% (m/m), respektivno) ne dovode do statistički značajne razlike u mehaničkim karakteristikama sistema. Prema tome, može se očekivati da svi ispitivani uzorci kremova imaju iste karakteristike u pogledu kohezivnosti, čvrstoće, konzistencije i viskoziteta.

Dodatno, imajući u vidu da je pokazano postojanje korelacije između reoloških i teksturnih parametara sa jedne strane i određenih senzornih atributa sa druge (Lukic i sar., 2012), dobijeni rezultati će se tumačiti i sa aspekta potencijalne primene na koži.



Slika 22. Parametri teksture kremova Fp, F1a i F2a: (a) konzistencija (g s-1) i indeks viskoziteta (g s-1); (b) čvrstina (g) i kohezivnost (g)

Kao što je pokazano na Slici 20a svi uzorci ispoljavaju pseudoplastično tečenje sa izraženom tiksotropijom. S obzirom na to da na aplikativne karakteristike kozmetičkog proizvoda utiču njegova svojstva tečenja, kontinualna reološka merenja mogu u određenoj meri predvideti ponašanje proizvoda tokom nanošenja na koži (Lukic i sar., 2012). U pogledu nanošenja kremova, tiksotropija je poželjna osobina - kremovi se lako nanose na kožu (Korhonen i sar., 2000; Nemeth i sar., 1998), što je i očekivanje korisnika. Uzevši da je izgled krivih proticanja i vrednost histereznih površina (Slika 20a) kod svih uzoraka sličan i činjenice da se lakoća nanošenja proizvoda na regiju kože može kvantifikovati vrednošću histerezne površine (Lukic i sar., 2013a), njihovo

ponašanje tokom primene ne bi trebalo značajno da se razlikuje. Pretpostavka je u skladu sa činjenicom da ispitivani kremovi imaju slične mehaničke i teksturne karakteristike.

4.2.1.2. Procena stabilnosti model emulzionog nosača i model kozmetičkih emulzija (kremova) sa liposomima

Kremovi, iako najčešće korišćene vrste kozmetičkih proizvoda za negu, termodinamički su nestabilni sistemi (Korhonen i sar., 2001). Njihova fizička stabilnost se najčešće procenjuje izvođenjem testova ubrzanog starenja i testova pod stres uslovima (npr. ciklični stres testovi, CST). Ovi testovi pružaju brz uvid u stabilnost proizvoda i daju podatke o daljim ispitivanjima roka upotrebe i PAO kozmetičkih proizvoda. Parametri koji se uglavnom prate tokom ovih testova jesu: pH, električna provodljivost i reološki parametri (Markovic-Bogdanovic i sar., 2014), ali i drugi (sadržaj konzervansa i "challenge" test itd.).

Imajući navedeno u vidu, ispitivani uzorci su podvrgnuti cikličnim stres testovima, pri čemu su pH, električna provodljivost i reološki parametri praćeni 7 dana nakon izrade (inicijalna merenja) i nakon CST. Ciklični stres testovi su izvedeni 24 časovnim čuvanjem uzoraka na tri različite temperature (4°C, 20 ± 0,1°C i 40°C), tokom 6 ciklusa (18 dana).

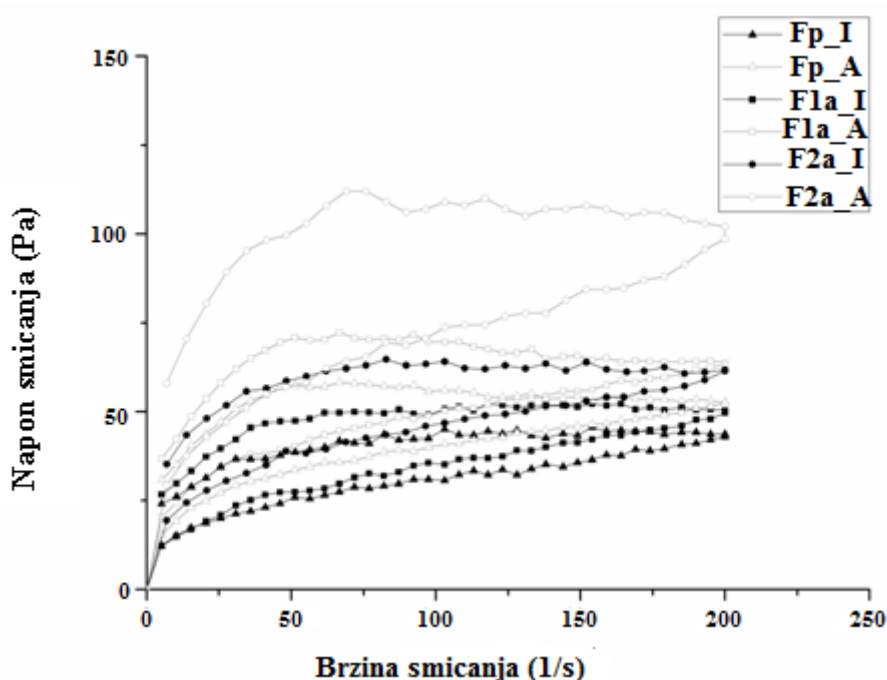
Električna provodljivost i pH su prikazane u Tabeli 17, dok su rezultati kontinulne reologije prikazani na Slici 23.

Tabela 17. pH i električna provodljivost uzoraka 7 dana nakon izrade (inicijalna merenja) i nakon CST (*)

Uzorak	pH	Električna provodljivost (μS/cm)	pH*	Električna provodljivost* (μS/cm)
Fp	5,80 ± 0,01	289,0 ± 0,3	5,39 ± 0,01	228,3 ± 1,2
F1a	5,68 ± 0,02	257,5 ± 1,1	5,48 ± 0,01	225,5 ± 0,3
F2a	5,75 ± 0,01	241,3 ± 2,2	5,67 ± 0,02	206,8 ± 1,1

Što se tiče pH, sve izmerene vrednosti (Tabela 17) su bliske fiziološkoj vrednosti zdrave kože i kreću se u intervalu od 5,7 do 5,8, kao što je preporučeno za proizvode namenjene za kožu (Lodén, 2003) i nisu značajno promenjene nakon CST - pH kod sva tri uzorka je opao ka nešto kiselijim vrednostima, ali je najveća promena od 0,4 pH jedinice kod uzorka Fp.

Ispitivani uzorci su imali slične vrednosti električne provodljivosti (Tabela 17), koja je blago opala nakon CST. Kada se uzorci F1a i F2a uporede sa placebo uzorkom Fp, može se uočiti da dodatak MČAR-liposoma dovodi do blagog smanjenja vrednosti električne provodljivosti.



Slika 23. Krive tečenja/proticanja uzoraka Fp, F1a i F2a snimljene inicijalno (I) i nakon CST (A)

Za sisteme koji su stabilizovani lamelarnom fazom karakteristično je da vremenom dolazi do opadanja električne provodljivosti usled naknadnog pakovanja vode unutar lamelarne faze sistema (Savić, 2004). S obzirom na to da je jedan od znakova nestabilnosti emulzija povećanje vrednosti električne provodljivosti (Korhonen i sar., 2001), rezultati pH i električne provodljivosti upućuju na zadovoljavajuću stabilnost ispitivanih uzoraka.

Međutim, da bi ispitivanje stabilnosti kozmetičkih proizvoda bilo potpunije, neophodno je u razmatranje uzeti i reološke profile uzoraka, zbog čega su izvršena kontinualna reološka merenja, pre i nakon CST (Slika 23).

Nakon CST (Slika 23) kod svih uzoraka došlo je do povećanja viskoziteta, što se može smatrati značajnim samo za uzorak F2a. Ugušćivanje uzorka F2a nakon CST jasno ukazuje da je tokom stres testova došlo do određenih promena u koloidnoj strukturi ovog uzorka. Ovo se može objasniti odloženim strukturiranjem sistema do kog dolazi usled interakcije MĆAR-liposoma sa specifičnim strukturama unutar nosača stabilizovanog APG emulgatorom. Iako ovo upućuje da bi uzorak sa 1% (m/m) MĆAR-liposoma mogao vremenom ispoljiti nestabilnost, uzevši u obzir sve rezultate studije stabilnosti (pH, električna provodljivost, reološki parametri), može se pretpostaviti da će uzorak F2a ipak biti stabilan, ali bi rok trajanja morao biti detaljnije ispitan shodno preporukama/protokolima za procenu stabilnosti kozmetičkih emulzija. Sa druge strane, naknado strukturiranje sistema se smatra nepoželjnom osobinom kozmetičkih proizvoda, a da bi se formulisao stabilan liposomski proizvod sa prihvatljivim estetskim karakteristikama, ovakve rezultate je neophodno pažljivo razmotriti.

Rezultati reoloških merenja potvrđuju prethodnu pretpostavku u pogledu zadovoljavajuće preliminarne fizičke stabilnosti ispitivanih uzoraka.

4.3. Rezultati i diskusija III faze eksperimentalnog rada

4.3.1. Generalni faktorijalni eksperimentalni dizajn

U skladu sa primenjenim dizajnom čiji je matriks dat u Tabeli 12, napravljeno je 12 uzoraka emulzija koje su se razlikovale po sastavu (dodatak različitih aktivnih supstanci) i prema načinu izrade (promena uređaja za mešanje, te i brzina mešanja u fazi emulgovanja). Sastav izrađenih uzoraka prikazan je u Tabeli 11.

Vrednosti praćenih odgovora emulzija koje su bile deo generalnog faktorijalnog dizajna prikazani su u Tabeli 13 i 14. Za svaki praćeni odgovor (konzistencija, indeks viskoziteta, čvrstina, kohezivnost, maksimalni i minimalni prividni viskozitet, vrednost histerezne površine, G' , G'' , G''/G' i veličina kapi) računati su efekti pojedinačnih faktora reformulacije (način izrade, MČAR-liposomi, skvalen), kao i efekti njihovih interakcija. Faktori i interakcija za koje je izračunata vrednost p bila manja od 0,05 ($p < 0,05$) smatrani su značajnim. S druge strane, članovi koji nisu imali značajan uticaj na ispitivane odgovore eliminisani su, osim onih koji su bili neophodni da se očuva hijerarhija, te su za odgovarajuće parametre emulzija generisani redukovani faktorski modeli. Finalne jednačine, izračunate na osnovu nivoa variranja faktora reformulacije, prikazane su u nastavku:

$$\text{Konzistencija (gs)} = 990.40 + 3.24A - 11.17B - 9.89C[1] + 45.91C[2] + 30.45AB - 7.27AC[1] - 1.55AC[2] - 21.44BC[1] - 27.60BC[2] - 3.29ABC[1] + 14.39ABC[2] \quad (2)$$

$$\text{Indeks viskoziteta (gs)} = 671.13 - 0.38A - 8.71B - 7.03C[1] + 33.71C[2] + 30.20AB - 4.91AC[1] + 3.19AC[2] - 20.16BC[1] - 14.94BC[2] - 8.06ABC[1] + 15.95ABC[2] \quad (3)$$

$$\text{Čvrstina (g)} = 94.66 + 0.48A - 1.21B - 0.34C[1] + 3.99C[2] + 3.19AB - 1.04AC[1] - 1.10AC[2] - 2.81BC[1] - 2.08BC[2] - 0.16ABC[1] + 1.59ABC[2] \quad (4)$$

$$\text{Kohezivnost (g)} = 63.25 + 0.23A - 0.81B - 0.14C[1] + 3.00C[2] + 3.22AB - 0.35AC[1] + 0.16AC[2] - 2.38BC[1] - 2.07BC[2] - 0.6ABC[1] + 1.77ABC[2] \quad (5)$$

$$\text{Maksimalni prividni viskozitet (1/s)} = 160.54 + 12.38A + 25.87B + 154.34C[1] - 81.37C[2] + 48.62AB + 20.97AC[1] - 27.24AC[2] + 14.93BC[1] - 14.83BC[2] - 89.31ABC[1] + 33.48ABC[2] \quad (6)$$

$$\text{Minimalni prividni viskozitet (1/s)} = 0.86 - 0.00700A + 0.22B - 0.29C[1] + 0.10C[2] + 0.030AB - 0.007250AC[1] + 0.016AC[2] - 0.036BC[1] - 0.018BC[2] - 0.0008333ABC[1] - 0.007583ABC[2] \quad (7)$$

$$\text{Histerezna površina (Pa/s)} = 3213.13 + 138.96A - 41.88B - 209.75C[1] + 148.62C[2] + 14.63AB - 45.08AC[1] - 317.71AC[2] - 118.25BC[1] - 378.12BC[2] - 6.75ABC[1] + 217.37ABC[2] \quad (8)$$

$$G' \text{ (Pa)} = 2379.08 - 144.58A - 241.00B - 57.08C[1] + 185.92C[2] + 553.67AB + 81.83AC[1] + 191.08AC[2] - 112.75BC[1] + 101.50BC[2] - 161.67ABC[1] + 17.83ABC[2] \quad (9)$$

$$G'' \text{ (Pa)} = 483.55 - 56.67A - 57.42B - 20.45C[1] + 21.44C[2] + 134.78AB + 26.75AC[1] + 53.91AC[2] - 17.73BC[1] + 37.03BC[2] - 51.45ABC[1] + 16.93ABC[2] \quad (10)$$

$$G''/G' = 0.2 - 0.009658A - 0.001467B - 0.005542C[1] + 0.001621C[2] + 0.009108AB + 0.002483AC[1] + 0.004146AC[2] + 0.0006167BC[1] + 0.002679BC[2] - 0.007908ABC[1] + 0.005404ABC[2] \quad (11)$$

$$\text{Veličina kapi } (\mu\text{m}) = 4.83 - 0.88A + 0.45B - 2.08C[1] - 0.67C[2] - 0.050AB + 0.00833AC[1] + 0.62AC[2] - 0.30BC[1] - 0.012BC[2] \quad (12)$$

Statistička obrada podataka (ANOVA) je pokazala da su generisani faktorijalni modeli za sve praćene odgovore (konzistencija, indeks viskoziteta, čvrstina, kohezivnost, maksimalni i minimalni prividni viskozitet, vrednost histerezne površine, G', G'', G''/G' i veličina kapi) bili značajni ($p < 0,0001$ za sve F vrednosti modela). Modeli su imali visoke vrednosti za R^2 , prilagođeni R^2 (engl. *adjusted R²*) i odgovarajuće vrednosti preciznosti (engl. *adequate precision values*) (prikazano u Tabeli 18) što ukazuje da su svi odgovori dobro opisani predloženim modelom. Dodatno, generisani faktorijalni modeli (jednačine (2)-(12)) su pokazali da značajan uticaj na sve praćene karakteristike emulzija (odgovore) imaju kako faktori, tako i njihove interakcije. Iz tog razloga su dobijeni rezultati dalje analizirani i fokus je bio na proceni relativnog značaja faktora i njihovih interakcija uključenih u predložene modele poređenjem odgovarajućih koeficijenata (jednačine (2)-(12)). Što je bila veća vrednost koeficijenta određenog faktora, odnosno manja p vrednost, veći je bio uticaj tog faktora na praćeni odgovor. Faktori i interakcije koji su imali značajan efekat na praćeni odgovor su podebljani u prikazanim jednačinama (jednačine (2)-(12)).

Tabela 18. Vrednosti za R^2 , prilagođeni R^2 i odgovarajuće vrednosti preciznosti za svaki odgovor

Odgovor	R^2	Prilagođeni R^2	Odgovarajuće vrednosti preciznosti
Konzistencija	0,9798	0,9612	24,251
Indeks viskoziteta	0,9812	0,9639	25,860
Čvrstina	0,9882	0,9774	29,181
Kohezivnost	0,9732	0,9487	21,059
Maksimalni prividni viskozitet	0,9982	0,9965	67,967
Minimalni prividni viskozitet	0,9945	0,9894	49,125
Histerezna površina	0,9762	0,9545	24,739
G' (Pa)	0,9865	0,9742	27,952
G'' (Pa)	0,9966	0,9935	60,362
G''/G'	0,9193	0,8453	11,856
Veličina kapi	0,9983	0,9971	98,894

4.3.2. Teksturna analiza

U kozmetologiji, teksturna analiza je jedna od značajnih kvantitativnih metoda za procenu emulzija koja pruža mogućnost merenja mehaničkih karakteristika sistema, odnosno njegove teksture (Lukic i sar., 2013a; Tai i sar., 2014), što obuhvata više osobina kozmetičkih proizvoda. Dodatno, ona je korisna i za razvoj emulzionih sistema prihvatljivih od strane potrošača/korisnika (Lukic i sar., 2012; 2013a), sa aspekta primene na koži.

Imajući ovo u vidu, izvršena je teksturna analiza svih ispitivanih uzoraka tokom koje su praćeni sledeći parametri: konzistencija, indeks viskoziteta, čvrstina i kohezivnost. Konzistencija i indeks viskoziteta su važne karakteristike emulzionih sistema koje značajno utiču na prihvatljivost emulzija od strane korisnika (Zhao i sar., 2009). Kohezivnost je stopa do koje sistem može da se deformiše pre nego što se sruši (Szczeniak, 2002), dok je čvrstina kozmetičkog proizvoda sila potrebna za postizanje date deformacije i ova teksturna osobina se dovodi u vezu sa lakoćom primene proizvoda na koži (Estanqueiro i sar., 2016). Sa druge strane, čvrstina i konzistencija su povezani sa tvrdoćom proizvoda, a indeks viskoziteta i kohezivnost sa adhezivnošću proizvoda (Lukic i sar., 2013a), odnosno prijanjanjem za kožu.

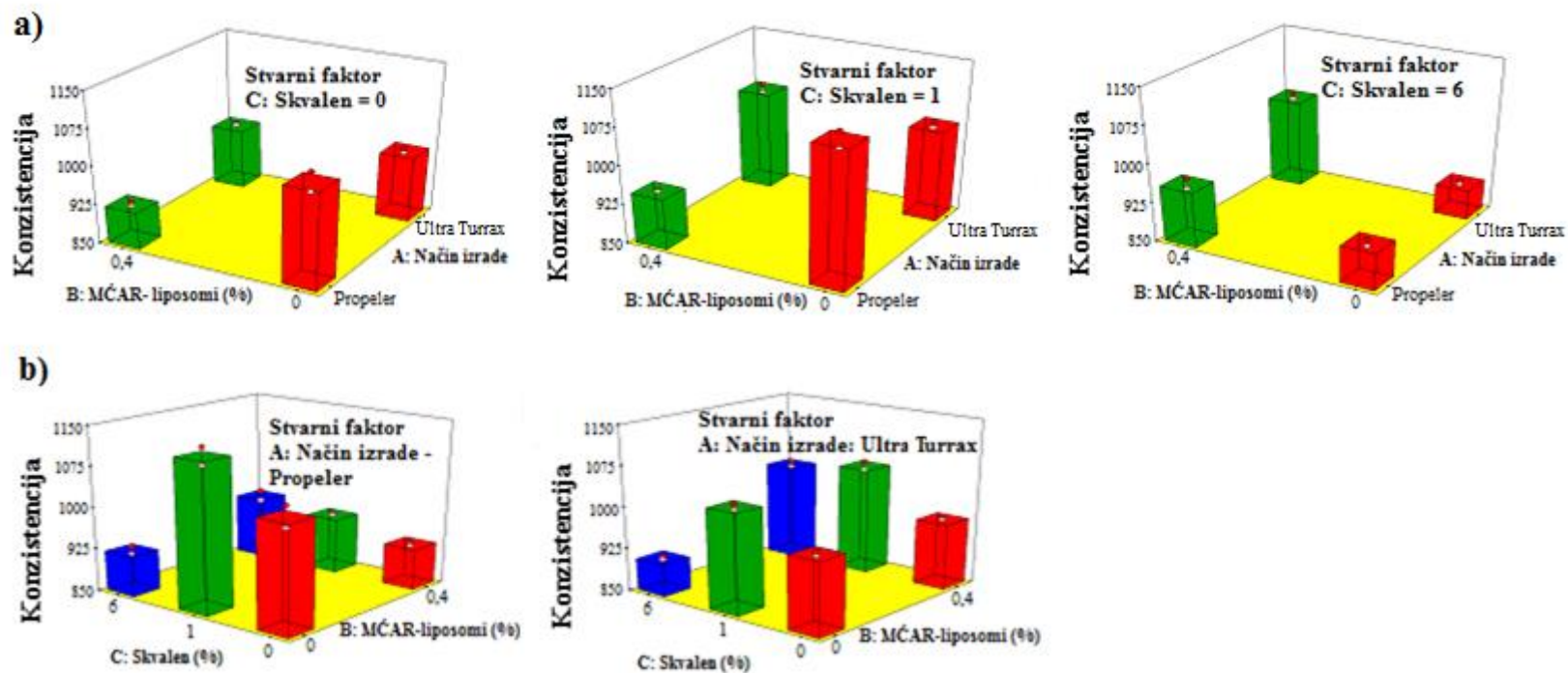
Kozmetički proizvodi treba da imaju prihvatljive mehaničke karakteristike – manju/smanjenu čvrstinu, prihvatljivu adhezivnost i lakoću nanošenja na kožu. Stoga su čvrstina, indeks viskoziteta i kohezivnost vrlo bitne karakteristike sistema, sa aspekta njegovog nanošenja na kožu (Estanqueiro i sar., 2016).

Vrednosti (srednja vrednost \pm SD) merenih teksturnih parametara svih ispitivanih emulzija koje su bile deo generalnog faktorijskog dizajna prikazane su u Tabeli 13. Kao što se može videti iz jednačina (2),(3) i (5), značajni efekti (podebljani u jednačini) i nivoi njihovog uticaja na konzistenciju, indeks viskoziteta i kohezivnost emulzija, bili su slični, dok su za čvrstinu emulzija (jednačina (4)) bili malo drugačiji.

Na sve teksturne parametre značajno je uticalo prisustvo MĆAR-liposoma (faktor B) i skvalena (faktor C), dok je samo čvrstina emulzija bila pod značajnim uticajem načina izrade (faktor A). Negativni znak ispred koeficijenta za MĆAR-liposome (faktor B) u jednačinama (2)–(5) predstavlja antagonistički efekat ovog faktora na teksturne karakteristike ispitivanih emulzija, što znači da su konzistencija,

indeks viskoziteta, čvrstina i kohezivnost emulzija sa MĆAR-liposomima bile niže u odnosu na prazne emulzije (emulzije bez liposoma-placebo kremove). Dobijeni rezultat je verovatno posledica uticaja liposoma na koloidnu strukturu emulzionog nosača, preciznije na lamelarnu fazu (tečno-kristalnu i gel) koja je jedna od glavnih karakteristika emulzionih sistema stabilisanih alkil poliglukozidnim (APG) emulgatorima (Savic i sar., 2011). Za razliku od praznih emulzija, može se pretpostaviti da se kod uzoraka sa liposomima vezikule ugrađuju u lamelarne dvoslojeve i ometaju "pakovanje" alkil lanaca emulgatora unutar slojeva (Lukic i sar, 2013b). Dodatno, voda iz disperzije liposoma koja se dodaje u fazi hlađenja krema, prilikom njegove izrade, može ometati raspodelu vode unutar lamelarnih dvoslojeva, kako je pokazano u II fazi eksperimentalnog rada, zbog čega ima određeni uticaj i na teksturne karakteristike emulzija. Što je još važnije, prisustvo MĆAR-liposoma je bilo u značajnoj interakciji sa preostala dva faktora: načinom izrade i dodatkom skvalena – AB i BC interakcija (Slike 24a i 24b, respektivno).

Kao što se može videti u jednačini (4), promena načina izrade (faktor A) imala je pozitivan uticaj na čvrstinu izrađenih emulzija: ukoliko se u fazi emulgovanja koristi propelerska mešalica, izrađene emulzije su manje čvrste u odnosu na emulzije kod kojih se u istoj fazi koristi rotor-stator homogenizator (Ultra Turrax), što je očekivano. Poznato je da se pri izradi emulzionih sistema sa mešalicama propelerskog tipa dobijaju manje homogeni sistemi, manje čvrstine zbog krupnijih kapi unutrašnje faze, u odnosu na sisteme izrađene uz upotrebu rotor-stator homogenizatora (Ultra Turrax), kojim se dobijaju sistemi sa sitnijim kapima unutrašnje faze i homogenijom raspodelom po veličini, zbog čega je sistem homogeniji, čvršći i ima veći viskozitet. Ipak, sistemi stabilisani lamelarnom fazom ponekad pokazuju određeno odstupanje zbog uticaja homogenizatora na stvaranje lamelarne faze. Osim toga, dodatak skvalena imao je potpuno drugačiji uticaj na teksturne karakteristike emulzionih sistema (Tabela 13) i njegov uticaj na konzistenciju, indeks viskoziteta, čvrstinu i kohezivnost se može detaljnije objasniti tumačenjem dvofaktorskih interakcija (Slike 24- 27).



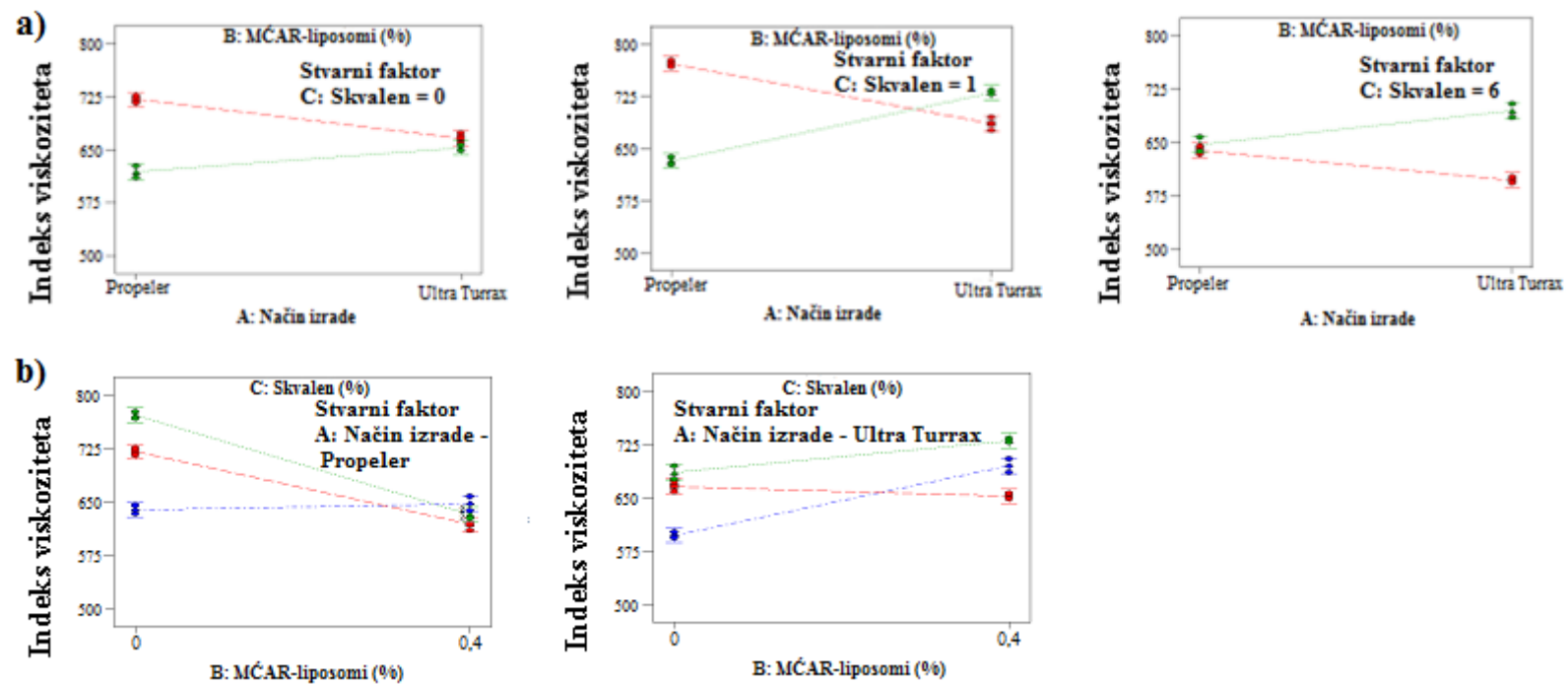
Slika 24. Površina odgovora prikazuje efekte: (a) A i B (AB interakcija) na konzistenciju bez skvalena/C (C = 0% (m/m)), pri nižem sadržaju (C = 1% (m/m)) i pri višem sadržaju (C = 6% (m/m)); (b) B i C (BC interakcija) na konzistenciju uz korišćenje propelerske mešalice ili Ultra Turrax-a u fazi emulgovanja

Efekti načina izrade (faktor A) i prisustva MĆAR-liposoma (faktor B) kao i njihovih interakcija, na konzistenciju emulzija bez skvalena ($C = 0\%$ (m/m)), u prisustvu niže koncentracije skvalena ($C = 1\%$ (m/m)) i u prisustvu više koncentracije skvalena ($C = 6\%$ (m/m)), prikazani su na Slici 24a. Kada se u fazi emulgovanja koristi Ultra Turrax umesto propellerske mešalice, dolazi do smanjenja konzistencije praznih emulzija (uzoraka bez MĆAR-liposoma), nezavisno od prisustva skvalena u uzorku. Prilikom izrade emulzija sa mešanim emulgatorima APG tipa, kakav je emulgator HSA i HSG sa kojim su izrađeni reformulisani uzorci, na temperaturi emulgovanja, unutrašnja (uljana) faza se disperguje u vidu kapi, pri čemu se oko dispergovanih kapi formiraju višemolekularni filmovi jednog dela molekula nejonske PAM i molekula masnih alkohola koji predstavljaju lamelarnu tečno-kristalnu fazu. Preostali deo molekula PAM i masnih alkohola prelazi u spoljašnju fazu emulzije. Masni alkoholi u spoljašnjoj fazi grade hidratizane kristale, kod kojih su slojevi vode inkorporirani između polarnih grupa molekula alkohola i u prisustvu molekula PAM dodatno bubre, obrazujući prvo lamelarnu tečno-kristalnu fazu, koja zatim hlađenjem emulzije prelazi u tzv. lamelarnu kristalnu gel fazu. Kristalna gel faza dovodi do strukturiranja spoljašnje faze i povećanja njenog viskoziteta (Savić 2004; Tasić-Kostov, 2013). Upotrebom Ultra Turrax-a dobijaju se homogeniji sistemi sa sitnijim kapima unutrašnje faze u odnosu na sisteme izrađene propellerskom mešalicom. Ovo verovatno utiče na formiranje lamelarne tečno-kristalne i gel faze, debljinu slojeva i njenu raspodelu oko uljanih kapi u spoljašnjoj fazi emulzije, pa i na konzistenciju emulzija. Sa druge strane, kada se emulziji dodaju MĆAR-liposomi, korišćenje Ultra Turrax-a umesto propellerske mešalice u fazi emulgovanja, dovodi do povećanja konzistencije emulzija, nezavisno od dodatka skvalena. Iako se na osnovu prethodnih rezultata može očekivati da će istovremeni dodatak MĆAR-liposoma uz upotrebu Ultra Turrax-a dovesti do smanjenja konzistencije, izgleda da promene u koloidnoj strukturi sistema, prouzrokovane rotor-stator homogenizatorom, utiču na ugrađivanje vezikula u emulzioni nosač. Može se pretpostaviti da promene u koloidnoj strukturi, koje su posledica prisustva MĆAR-liposoma u sistemima, smanjuju uticaj koji Ultra Turrax ima na stvaranje lamelarne faze. Zbog toga se dobijeni rezultati mogu objasniti zajedničkim uticajem rotor-stator homogenizatora i MĆAR-liposoma na koloidnu strukturu ispitivanih emulzija.

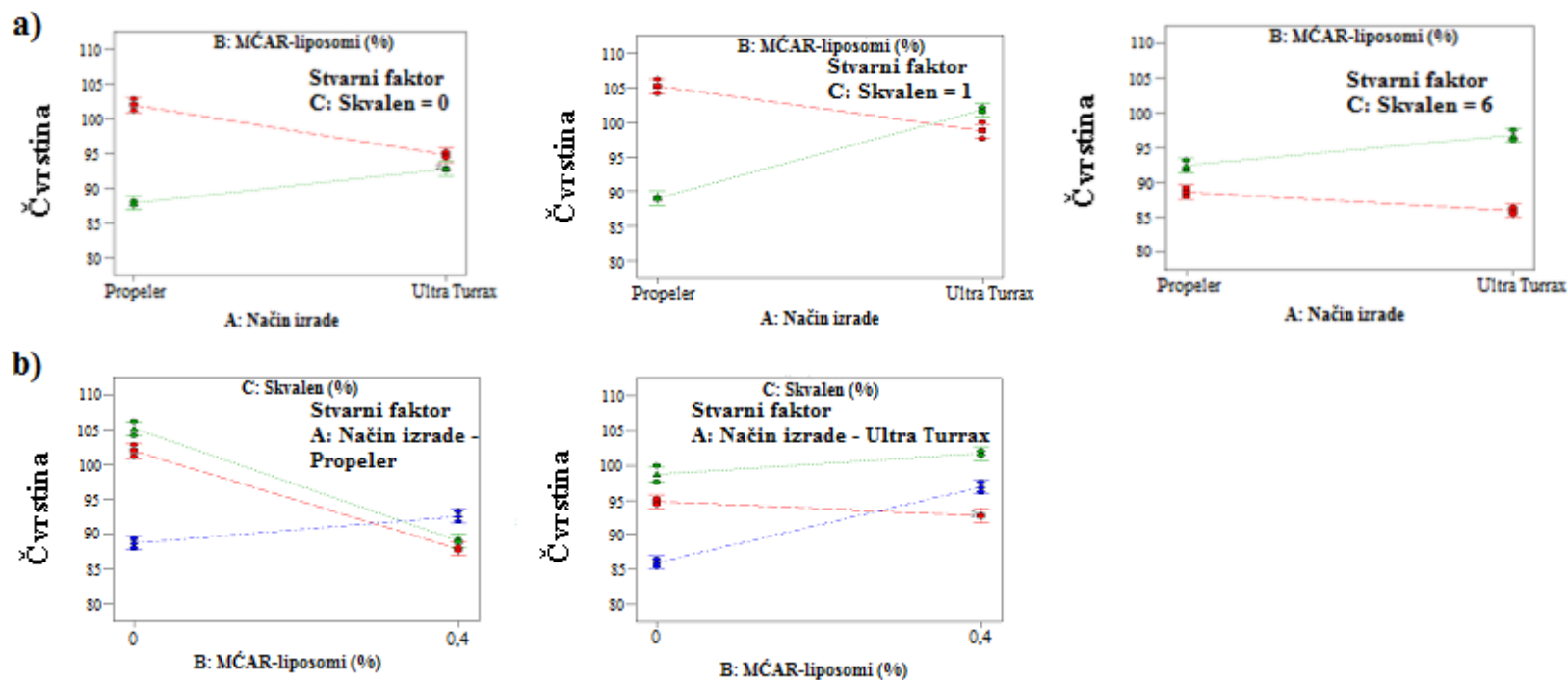
Kada se analiziraju efekti prisustva MĆAR-liposoma (B) i skvalena (C), kao i njihovih interakcija, na konzistenciju emulzija (Slika 24b), može se uočiti da dodatak MĆAR-liposoma u emulzije bez skvalena, dovodi do smanjenja konzistencije i ova promena u konzistenciji je izraženija ukoliko se u fazi emulgovanja koristi propelerska mešalica umesto Ultra Turrax-a. Smanjenje konzistencije uzoraka je takođe zabeleženo nakon dodatka MĆAR-liposoma u emulzije sa 1% (m/m) skvalena, kod kojih je u fazi emulgovanja korišćena propelerska mešalica. Međutim, ukoliko se u fazi emulgovanja koristi homogenizator (Ultra Turrax), može se konstatovati blago povećanje vrednosti ovog parametra.

Što se tiče emulzija sa 6% (m/m) skvalena, nakon dodatka MĆAR-liposoma ovim sistemima, vrednost konzistencije raste, nezavisno od izbora uređaja u fazi emulgovanja. Dobijeni rezultati upućuju da kada se u uljanu fazu sistema doda skvalen - nepolarno ulje i nezasićeni derivat skvalana, u koncentraciji koja će imati uticaj na mikrostrukturu sistema stabilisanog sa HSA i HSG (Roso, 2012) i povećati njegovu gustinu, uticaj ostalih faktora, kao što su dodatak MĆAR-liposoma i/ili promena načina izrade, na strukturu emulzionih sistema, postaje nebitan. Povećanje konzistencije je verovatno posledica udruženog uticaja skvalena i MĆAR-liposoma na koloidnu strukturu emulzija. Skvalen podstiče formiranje lamelarne faze unutar unutrašnje strukture sistema, u zavisnosti od koncentracije, što je potvrđeno polarizacionom mikroskopijom (Slika 35), dok se MĆAR-liposomi nalaze u blizini lamelarne faze. Posledica promocije lamelarne faze i prisustva MĆAR-liposoma jeste dodatno strukturiranje sistema i povećanje konzistencije.

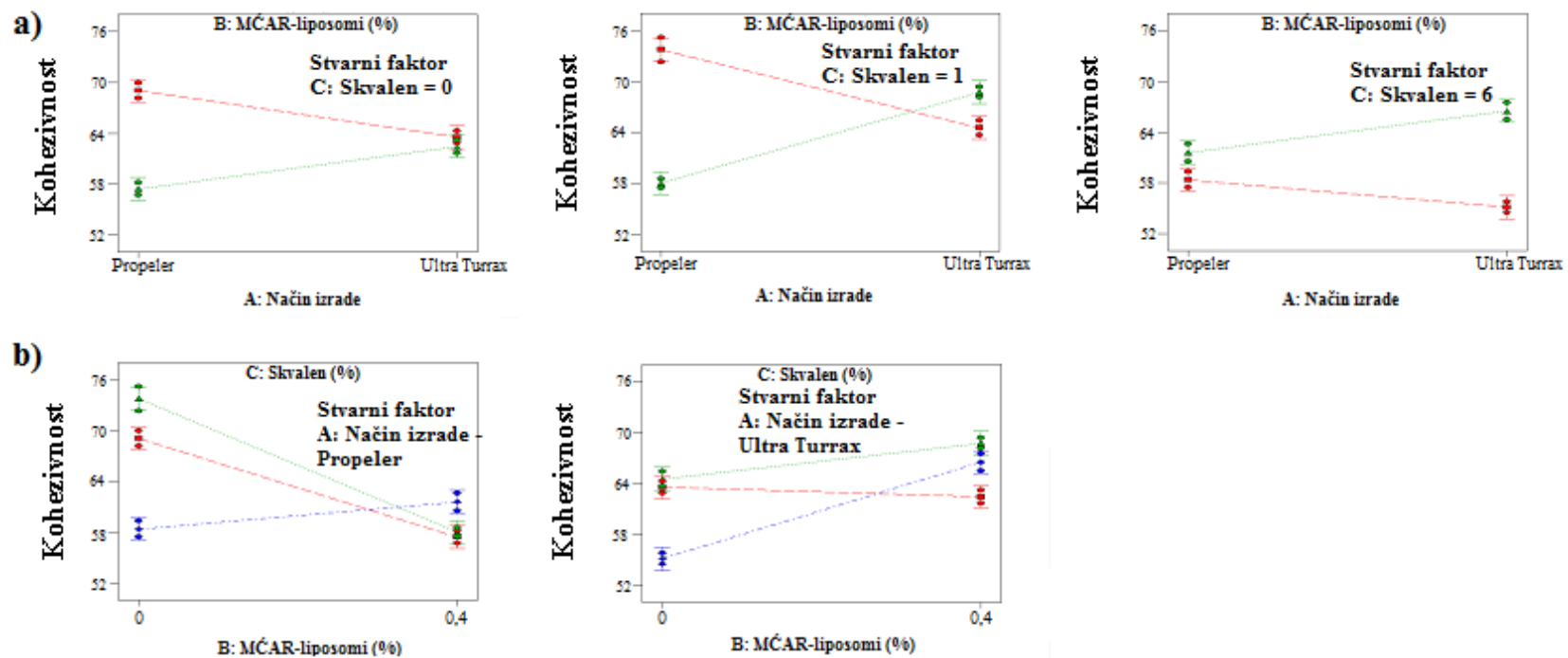
Efekti AB (način izrade/MĆAR-liposomi) i BC (MĆAR-liposomi/skvalen) interakcija na ostale praćene parametre (indeks viskoziteta, čvrstina, kohezivnost) se mogu tumačiti na isti način kao i rezultati dobijeni za konzistenciju. Navedeni efekti su prikazani na Slikama 25, 26 i 27.



Slika 25. Grafici interakcija koji pokazuju efekte (a) A i B (AB interakcija) na indeks viskoziteta bez prisustva skvalena/C (C = 0% (m/m)), pri nižoj koncentraciji (C = 1% (m/m)) i pri višoj koncentraciji (C = 6% (m/m)); (b) B i C (BC interakcija) na indeks viskoziteta ukoliko se u fazi emulgovanja (način izrade) koristi propelerska mešalica ili Ultra Turrax

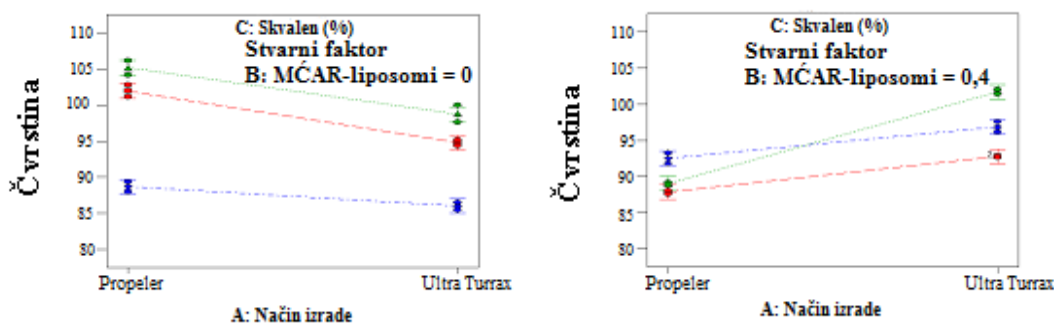


Slika 26. Grafici interakcija koji pokazuju efekte (a) A i B (AB interakcija) na čvrstinu bez prisustva skvalena/C (C = 0% (m/m)), pri nižoj koncentraciji (C = 1% (m/m)) i pri višoj koncentraciji (C = 6% (m/m)); (b) B i C (BC interakcija) na čvrstinu emulzija ukoliko se u fazi emulgovanja (način izrade) koristi propelerska mešalica ili Ultra Turrax



Slika 27. Grafici interakcija koji pokazuju efekte (a) A i B (AB interakcija) na kohezivnost emulzija bez prisustva skvalena/C (C = 0% (m/m)), pri nižoj koncentraciji (C = 1% (m/m)) i pri višoj koncentraciji (C = 6% (m/m)); (b) B i C (BC interakcija) na kohezivnost emulzija ukoliko se u fazi emulgovanja (način izrade) upotrebi propellerska mešalica ili Ultra Turrax

Kada je u pitanju čvrstina emulzija (Slika 28), značajna interakcija se može primetiti između načina izrade (faktor A) i prisustva skvalena (faktor C). Evidentno je da kod emulzija bez MČAR-liposoma, koje ne sadrže skvalen ili sadrže 1 ili 6% (m/m) skvalena, dolazi do smanjenja čvrstine, ukoliko se u fazi emulgovanja prilikom izrade upotrebi homogenizator (Ultra Turrax) umesto propelerske mešalice. Suprotno, kod emulzija koje sadrže MČAR-liposome, ovaj parametar raste, ukoliko se u fazi emulgovanja koristi Ultra Turrax umesto propelerske mešalice, nezavisno od prisustva skvalena i njegove koncentracije. Dobijeni rezultati su očekivani, uzevši u obzir prethodno objašnjenje vezano za uticaj upotrebe rotor-stator homogenizatora na strukturu sistema stabilisanih lamelarnom fazom.



Slika 28. Grafik interakcija koji pokazuje efekte A i C (AC interakcija) na čvrstinu emulzija bez (levo) i sa (desno) prisustvom MČAR-liposoma

Na osnovu iznetog, uočava se da eksperimentalni dizajn pruža sledeće značajne informacije o uticaju faktora reformulacije na teksturne karakteristike ispitivanih emulzionih sistema:

1. dodatak skvalena (1 i 6% (m/m)) i MČAR-liposoma (0,4% (m/m)), kao i njihove interakcije, značajno utiču na sve praćene teksturne parametre, dok način izrade, značajno utiče samo na čvrstinu emulzija;
2. promena u načinu izrade može imati uticaj na konzistenciju, indeks viskoziteta ili kohezivnost emulzija samo ako se istovremeno promeni i sastav emulzija (dodatak novih sastojaka - skvalen, MČAR-liposomi);

3. ako se sastav i način izrade istovremeno menjaju, koncentracija dodatih sastojaka utiče na to kako će se vrednosti teksturnih parametara menjati;
4. promena u sastavu uzoraka dodatkom 0,4% (m/m) MČAR-liposoma ili 1% (m/m) skvalena, može izazvati očigledne promene u teksturnim karakteristikama emulzionih sistema, što se vidi na Slikama 24-28;
5. promena čvrstine (teksturnog parametra) emulzija do koje dolazi promenom načina izrade (upotrebom drugačijeg uređaja u fazi emulgovanja) može se izbeći neznatnom promenom sastava uzoraka - dodatkom odgovarajuće kombinacije novih sastojaka (MČAR-liposomi i skvalen);
6. uticaj dodatka skvalena kao emolijensa na teksturne karakteristike emulzionih sistema, zavisi od njegove koncentracije;
7. teksturna analiza je osetljiva metoda za poređenje mehaničkih karakteristika ispitivanih emulzionih sistema sa HSA i HSG tokom procesa reformulacije emulzija.

Uzevši u obzir dobijene rezultate i utvrđenu korelaciju između određenih senzornih atributa i teksturnih parametara (Lukic i sar., 2012, Estanqueiro i sar., 2016), može se pretpostaviti da će praćeni faktori reformulacije emulzija, kao i njihove interakcije, imati uticaj i na senzorne karakteristike ispitivanih uzoraka.

Iz tog razloga, na osnovu objavljenih (Estanqueiro i sar., 2016; Lukic i sar., 2012) i prethodno razmatranih rezultata, može se pretpostaviti da će dodatak MČAR-liposoma i skvalena imati uticaj na određene senzorne osobine u fazi uzimanja (engl. *pick up*) uzorka iz ambalaže (tekstura i čvrstina proizvoda) i u fazi utrljavanja (engl. *rub in*) uzorka (ramazivost, engl. *slipperiness* i rasprostiranje, engl. *spreadability*), dok će način izrade (propelerska mešalica/Ultra Turrrax) uticati na teksturu, čvrstinu i rasprostiranje. Treba naglasiti da se u slučaju skvalena (emolijens) može očekivati uticaj na senzorne karakteristike emulzionih sistema, u zavisnosti od dodate koncentracije. Dodatno, uzevši da interakcije faktora reformulacije imaju značajan uticaj na sve praćene teksturne parametre ispitivanih emulzija, posledično će imati uticaj i na pomenute senzorne attribute.

Sa aspekta primene dobijenih rezultata u praksi, ukoliko je jedini interes formulatora da obogati inicijalnu placebo formulaciju (Fp) dodatkom MČAR-liposoma i da u isto vreme zadrži nepromenjenu čvrstinu, teksturu i razmazivost uzorka,

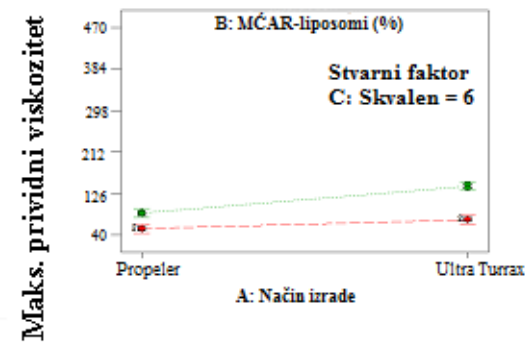
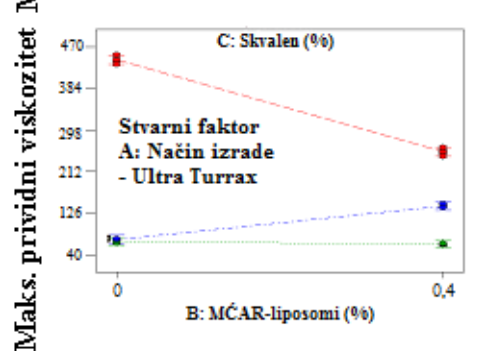
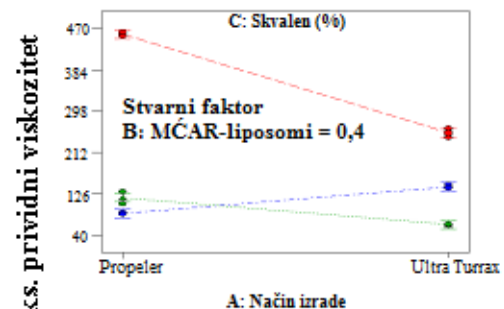
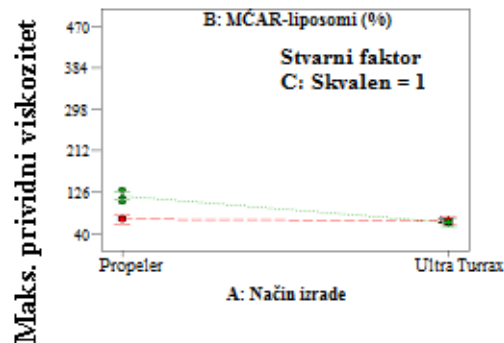
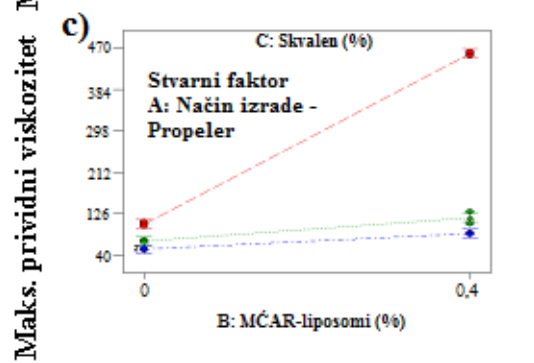
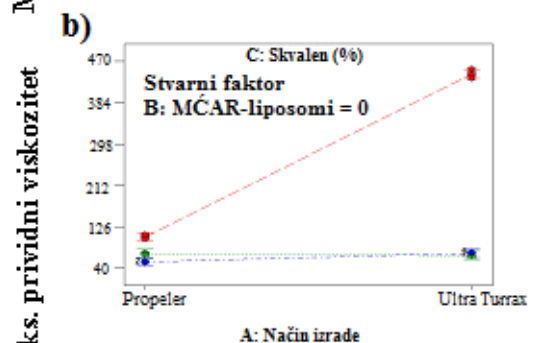
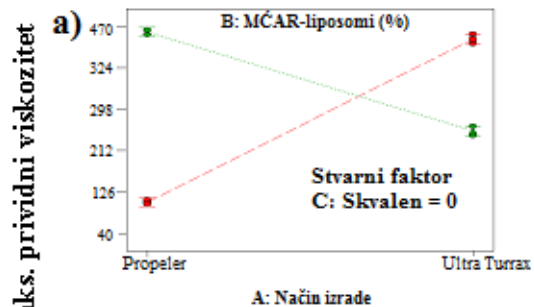
neophodno je da promeni način izrade, odnosno da u fazi emulgovanja koristi Ultra Turrax, umesto propelerske mešalice. Takođe, ukoliko dodatak MČAR-liposoma prati i dodatak skvalena, moguće je izbeći promene u teksturnim karakteristikama izrađenih uzoraka, nezavisno od načina izrade, odnosno uređaja koji se koristi u fazi emulgovanja. Dalje, istovremenim dodavanjem MČAR-liposoma i odgovarajuće koncentracije skvalena, kao i adekvatnim izborom načina izrade, moguće je sačuvati tačno određeno teksturno svojstvo uzorka, te i posledično senzorne attribute koji su u korelaciji sa datom teksturnom karakteristikom unapređene formulacije (npr. razmazivost – senzorni atribut koji je značajan sa aspekta nanošenja proizvoda na velike površine na koži). Ipak, treba imati u vidu da u slučaju dodatka emolijensa (skvalena) određene senzorne karakteristike u fazi utrljavanja i u fazi osećaja nakon nanošenja (engl. *after feel*) proizvoda (naročito senzorne karakteristike koje se odnose na hedonistički, subjektivni odgovor korisnika proizvoda) mogu biti izmenjene. Dodatno, dobijeni rezultati se mogu koristiti za poređenje teksturnih karakteristika početnog (inicijalnog) i novih, izmenjenih/reformulisanih uzoraka, kao i za podešavanje optimalne formulacije (optimizaciju formulacije), naročito u slučaju istovremenog variranja nekoliko faktora tokom procesa reformulacije.

4.3.3. Kontinualna i oscilatorna reološka merenja

Reološka merenja se generalno koriste za dobijanje informacija o uticaju različitih parametara na kvalitet gotovog kozmetičkog proizvoda, ali i za procenu ponašanja proizvoda tokom njegove upotrebe (Tadros, 2004). Dodatno, kada se koristi u kombinaciji sa teksturnom analizom, ova tehnika može omogućiti bolje sagledavanje određenih senzornih atributa proizvoda (Gilbert i sar., 2013c; Estanqueiro i sar., 2016; Lukić i sar., 2012; 2013). Sa aspekta primene na koži, viskozitet (maksimalni i minimalni prividni viskozitet), kao mera otpora sistema tečenju/proticanju, može obezbediti korisne informacije o razmazivosti i rasprostiranju proizvoda (Lukic i sar., 2012).

Sprovedena kontinualna reološka merenja pružaju informacije u vezi maksimalnog (η_{\max}) i minimalnog (η_{\min}) prividnog viskoziteta i omogućavaju izračunavanje vrednosti histerezne površine. Vrednosti reoloških parametara svih uzoraka koji su bili deo generalnog eksperimentalnog dizajna, dati su u Tabeli 14.

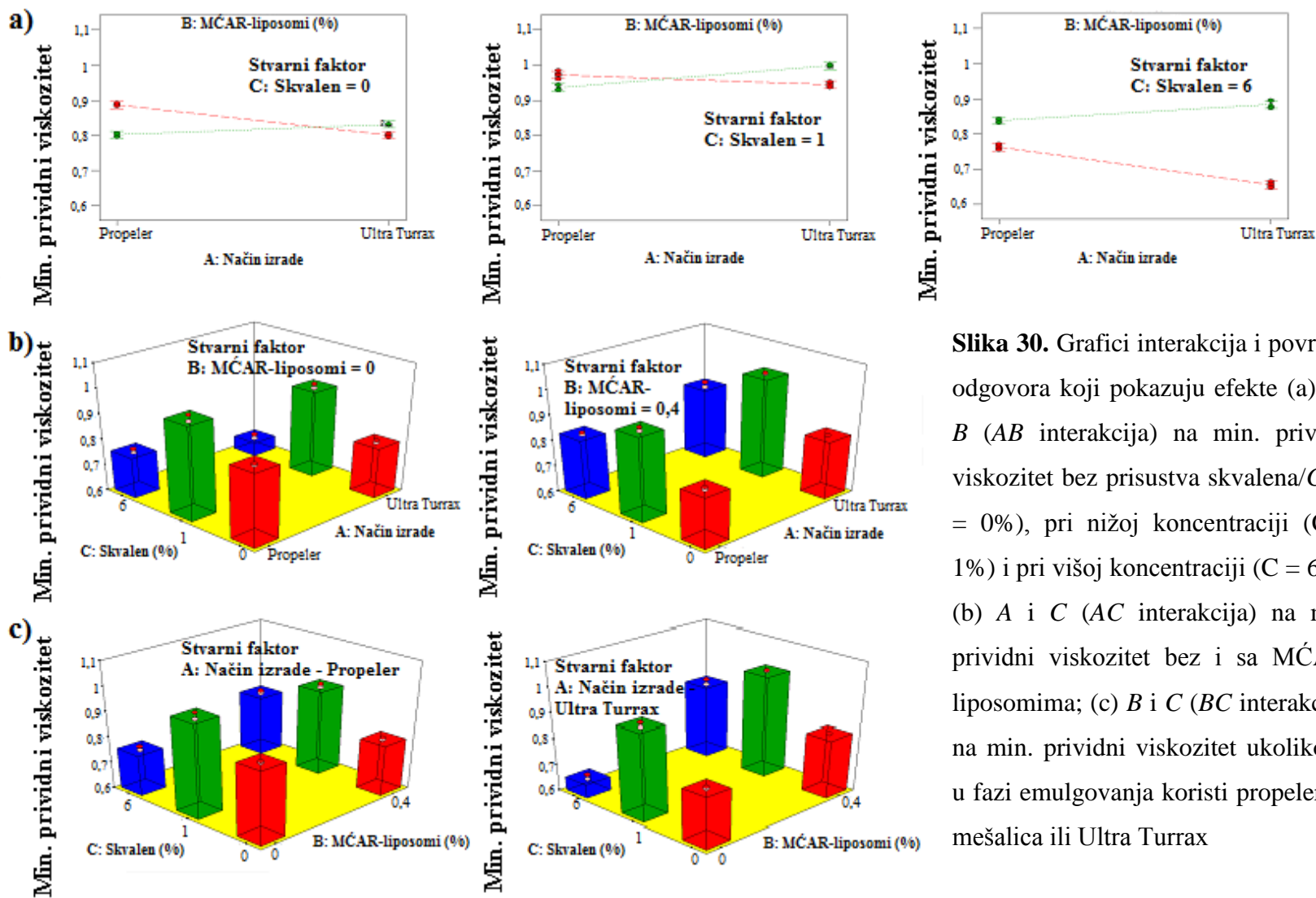
Maksimalni i minimalni prividni viskozitet su bili pod značajnim uticajem svih faktora reformulacije. Redosled uticaja je bio sledeći: skvalen (C) > MĆAR-liposomi (B) > način izrade (A) (jednačine (6) i (7)). Na osnovu veličine odgovarajućih koeficijenata, oba viskoziteta su bila pod najmanjim uticajem načina izrade (faktora A), koji je imao sinergistički efekat na η_{\max} i antagonistički efekat na η_{\min} izrađenih emulzija. Dalje, za razliku od teksturnih parametara čije su se vrednosti smanjile dodatkom MĆAR-liposoma (faktor B), njihov dodatak je doveo do povećanja vrednosti oba prividna viskoziteta. Povrh toga, interakcije između ispitivanih faktora (način izrade/MĆAR-liposomi – AB; način izrade/skvalen – AC; MĆAR-liposomi/skvalen – BC) su takođe značajno uticale na viskozitet emulzija ($p < 0,0001$), pri čemu je AB interakcija imala najizraženiji efekat (Slika 29).



Slika 29. Grafici interakcija koji prikazuju efekte: (a) A i B (AB interakcija) na maksimalni prividni viskozitet emulzija bez prisustva skvalena/C (C = 0% (m/m)), pri nižoj koncentraciji (C = 1% (m/m)) i pri višoj koncentraciji (C = 6% (m/m)); (b) A i C (AC interakcija) na maksimalni prividni viskozitet bez MČAR-liposoma i sa MČAR-liposomima; (c) B i C (BC interakcija) na maksimalni prividni viskozitet ukoliko se u fazi emulgovanja (način izrade) koristi propelerska mešalica ili Ultra Turrax

Analiziranjem efekata AB interakcija na parametar kontinualne reologije (Slika 29a), može se uočiti da η_{\max} emulzija bez skvalena, kao i onih sa 1% (m/m) skvalena, raste, dok vrednost ovog parametra opada po dodatku MĆAR-liposoma, kada se u fazi emulgovanja koristi Ultra Turrax umesto propellerske mešalice. Međutim, kada se emulzijama doda 6% (m/m) skvalena, vrednost ovog reološkog parametra kod emulzija i sa i bez prisustva MĆAR-liposoma raste, kada se kao uređaj za emulgovanje koristi Ultra Turrax. Što se tiče AC interakcija (slika 29b), maksimalni prividni viskozitet emulzija bez skvalena, koje ne sadrže liposome, raste, dok se vrednost ovog parametra kod emulzija sa liposomima smanjuje, kada se u fazi emulgovanja koristi Ultra Turrax umesto propellerske mešalice, što je već objašnjeno uticajem liposoma na koloidnu strukturu emulzionih sistema. Nakon dodatka 1% (m/m) skvalena, može se uočiti neznatno smanjenje η_{\max} kod oba tipa emulzija, sa i bez MĆAR-liposoma, kada se kao uređaj za mešanje u fazi emulgovanja koristi Ultra Turrax umesto propellerske mešalice, što je očekivano zbog dodatka tečne komponente koja treba da se dodatno emulguje. Sa druge strane, u prisustvu 6% (m/m) skvalena, maksimalni prividni viskozitet raste kada se u fazi emulgovanja koristi Ultra Turrax, nezavisno od prisustva liposoma. Kada se poredi uticaj prisustva MĆAR-liposoma na maksimalni prividni viskozitet emulzija izrađenih uz upotrebu propellerske mešalice, sa ili bez skvalena (BC interakcija, Slika 29c), može se primetiti da inkorporiranje liposoma dovodi do povećanja vrednosti ovog parametra, nezavisno od koncentracije i prisustva skvalena. Suprotno tome, kada se koristi Ultra Turrax, η_{\max} emulzija sa 1% (m/m) skvalena se ne menja, kod emulzija sa 6% (m/m) skvalena njegova vrednost je očekivano povećana, dok se kod emulzija bez skvalena, vrednost ovog parametra smanjuje nakon dodavanja MĆAR-liposoma, u obliku vodene disperzije što delimično "omekšava" krem sa nagrađenom unutrašnjom strukturom. Kada se uporede rezultati za η_{\max} i čvrstinu, reološki parametar se može smatrati "osetljivijim" na dodavanje lipofilne komponente (skvalena maslinovog ulja) u emulzioni sistem, dok teksturni parametar ima izraženiji uticaj na čvrstinu emulzija.

Što se tiče efekata načina izrade (faktor A) i prisustva MĆAR-liposoma (faktor B) i njihovih interakcija (AB) na minimalni prividni viskozitet emulzija, dodavanje liposoma dovodi do povećanja vrednosti ovog parametra u svim slučajevima (sa ili bez skvalena) kada se Ultra Turrax koristi umesto propellerske mešalice (Slika 30a), što je u skladu sa svim parametrima teksture (Slike 24-28).

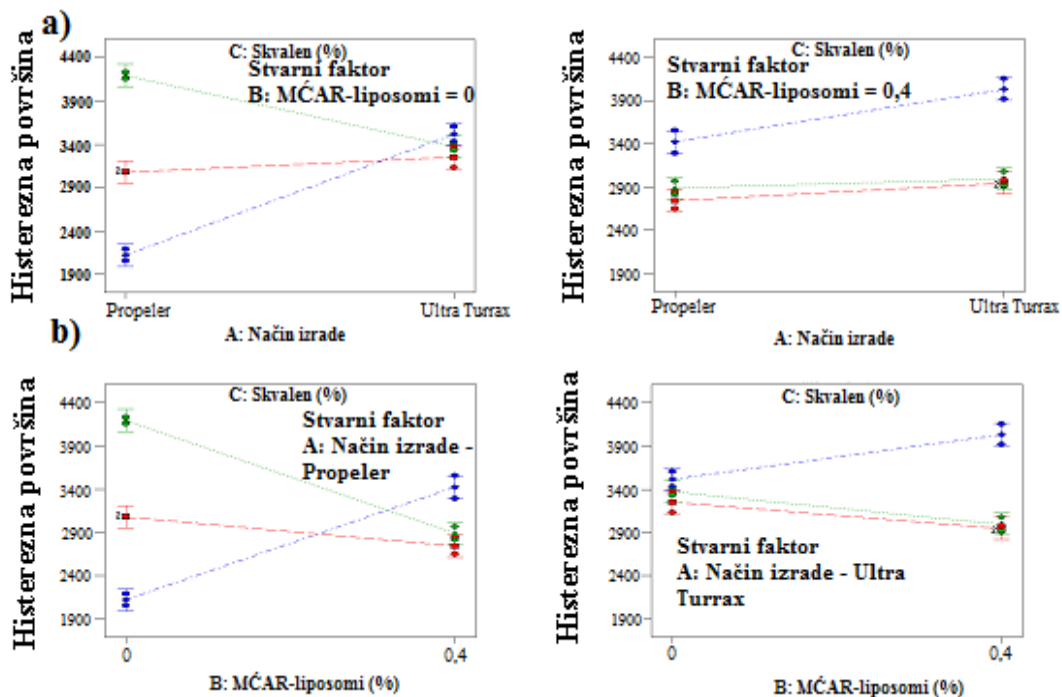


Slika 30. Grafici interakcija i površina odgovora koji pokazuju efekte (a) A i B (AB interakcija) na min. prividni viskozitet bez prisustva skvalena/C (C = 0%), pri nižoj koncentraciji (C = 1%) i pri višoj koncentraciji (C = 6%); (b) A i C (AC interakcija) na min. prividni viskozitet bez i sa MČAR-liposomima; (c) B i C (BC interakcija) na min. prividni viskozitet ukoliko se u fazi emulgovanja koristi propelerska mešalica ili Ultra Turrax

Dalje, η_{\min} svih uzoraka bez liposoma opada, dok kod emulzija sa MČAR-liposomima vrednost ovog parametra raste ukoliko se u fazi emulgovanja koristi Ultra Turrax umesto propelerske mešalice (AC interakcija, Slika 30b). U pogledu BC interakcija, minimalni prividni viskozitet ispitivanih emulzija opada nakon dodavanja MČAR-liposoma u emulzije bez ili sa 1% (m/m) skvalena, kada se u fazi emulgovanja koristi propelerska mešalica, dok vrednost ovog parametra blago raste kod uzoraka pripremljenih sa Ultra Turrax-om. Dobijeni rezultati se mogu objasniti promenama u koloidnoj strukturi sistema i raspodele vode unutar sistema stabilisanog APG emulgatorom, do kojih dolazi usled dodatka liposoma u emulzioni nosač. Međutim, dodatak liposoma u emulzije sa 6% (m/m) skvalena dovodi do povećanja minimalnog prividnog viskoziteta, nezavisno od primenjenog načina izrade (Slika 30c), što je takođe u skladu sa svim parametrima teksture.

Što se tiče vrednosti histerezne površine, pod značajnim je uticajem dva faktora, načina izrade (faktor A) i prisustva skvalena (faktor C) ($p < 0,0001$ i $p = 0,0002$, respektivno), (jednačina (8)). Prema odgovarajućem koeficijentu u jednačini (8), veća vrednost histerezne površine dobija se ukoliko se u fazi emulgovanja koristi propelerska mešalica umesto rotor-stator homogenizatora (Ultra Turrax), što je logično očekivati, jer ovaj tip mešalice daje emulzije sa krupnijim kapima masne faze, manje stabilnosti, zbog čega i imaju veću histereznu površinu, kao pokazatelj da će biti manje stabilne u odnosu na emulzije istog sastava izrađene uz Ultra Turrax. Dodatak skvalena je takođe bitan faktor koji utiče na vrednost histerezne površine uzoraka, i što je još važnije, ovaj faktor značajno interaguje sa preostala dva: načinom izrade (AC interakcija) i prisustvom MČAR-liposoma (BC interakcija).

Za razliku od maksimalnog i minimalnog prividnog viskoziteta, vrednost histerezne površine bila je pod značajnim uticajem dva tipa interakcija, AC i BC (Slika 31).



Slika 31. Grafici interakcija koji prikazuju efekte A i C (AC interakcija) na vrednost histerezne površine bez i u prisustvu MČAR-liposoma; (b) B i C (BC interakcija) na vrednost histerezne površine ukoliko se u fazi emulgovanja (način izrade) koristi propellerska mešalica ili Ultra Turrax

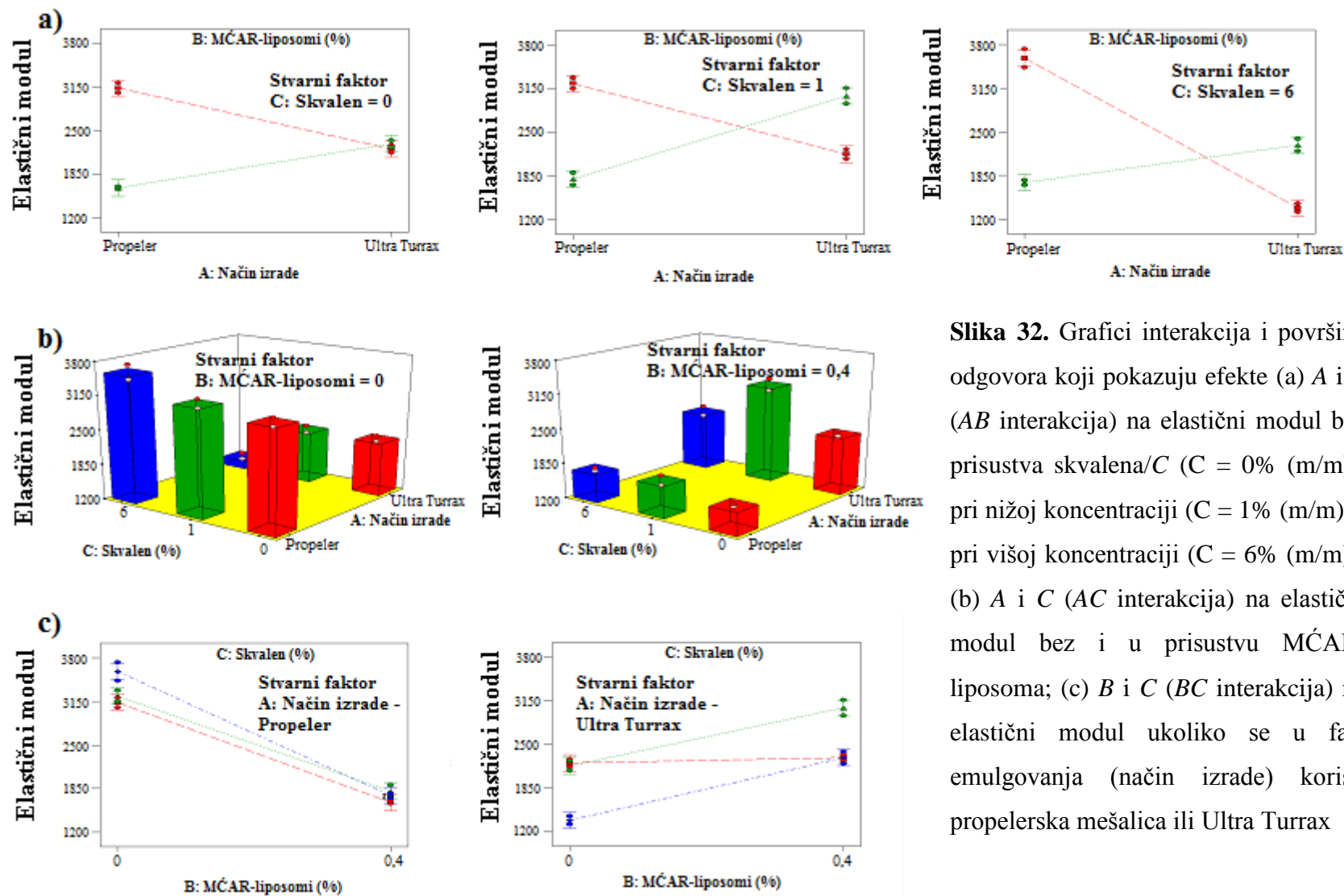
Što se tiče AC interakcija (Slika 31a), kada se Ultra Turrax koristi u fazi emulgovanja umesto propellerske mešalice, vrednost histerezne površine opada samo kod emulzija bez liposoma i sa 1% (m/m) skvalena. Suprotno, kod svih ostalih emulzija (bez/sa 6% (m/m) skvalena, bez/sa MČAR-liposomima), vrednost ovog parametra raste. Analiziranjem BC interakcija (Slika 31b) može se uočiti da dodatak MČAR-liposoma, nezavisno od načina izrade, dovodi do povećanja vrednosti histerezne površine samo kod uzorka sa 6% (m/m) skvalena, što je u skladu sa svim parametrima teksture. Kod emulzija bez ili sa 1% (m/m) skvalena, vrednost ovog parametra opada. Može se zaključiti da, za razliku od teksturnih parametara, dodatak 6% (m/m) i neznatna promena u sastavu masne faze nosača (srazmerno smanjenje komponenata masne faze emulzionog nosača na račun dodatog skvalena) ima uticaj na sve praćene parametre kontinualne reologije, odnosno maksimalni i minimalni prividni viskozitet i histereznu površinu. Rezultati dobijeni kontinualnim reološkim merenjem, koje se uobičajeno

koristi za ispitivanje ponašanja sistema pri proticanju, uglavnom su u korelaciji sa parametrima teksture. Stoga, dobijeni rezultati za reološke i teksturne parametre su u korelaciji, ali određene razlike ukazuju da su reološka merenja ipak osetljivija u odnosu na teksturnu analizu.

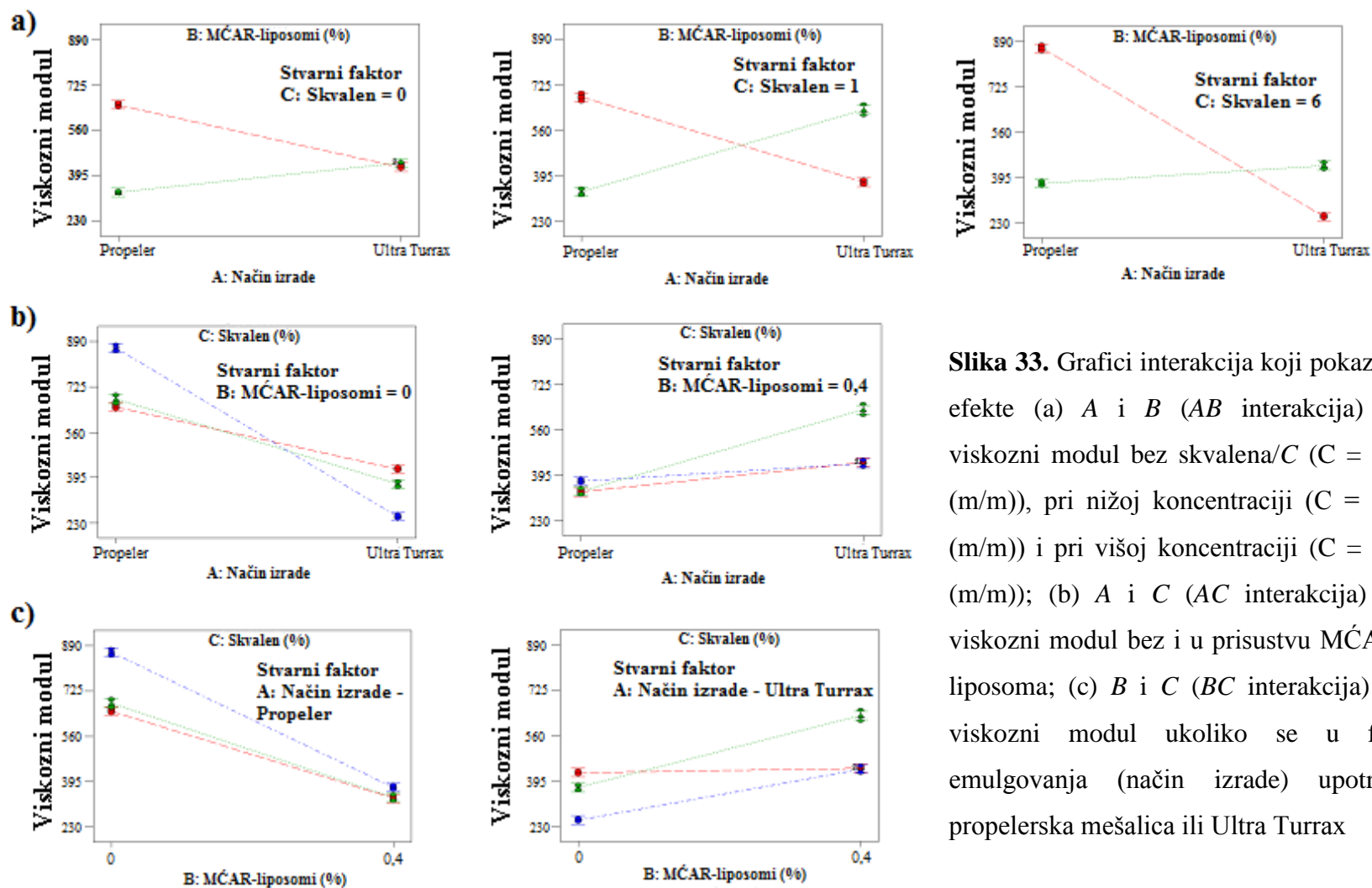
Kada je u pitanju oscilatorna reologija, sledeći parametri su praćeni: elastični modul (G') kao količina energije koja je kao elastičnost sačuvana tokom ciklusa oscilacije, viskozni modul (G'') kao mera energije koja se troši prilikom viskoznog tečenja tokom oscilacije (Lukic i sar., 2013a) i njihov odnos (G''/G'). Vrednosti merenih parametara su prikazane u Tabeli 14, dok su rezultati dobijeni primenom generalnog faktorijalnog dizajna dati u jednačinama (9)-(11) i na Slikama 32, 33 i 34.

Ono što je interesantno jeste da na elastični (G') i viskozni modul (G'') značajno utiču svi ispitivani faktori: MĆAR-liposomi (B) > skvalen (C) > način izrade (A) (kao maksimalni i minimalni prividni viskozitet), dok je njihov odnos (G''/G') pod značajnim uticajem dva faktora: način izrade (A) > skvalen (C) (jednačine (9)-(11)) (kao vrednost histerezne površine). Na osnovu vrednosti koeficijenata, AB interakcija ima najveći uticaj na oba modula, nešto manji zatim ima prisustvo MĆAR-liposoma (faktor B), dok je G''/G' pod najvećim uticajem načina izrade (faktor A).

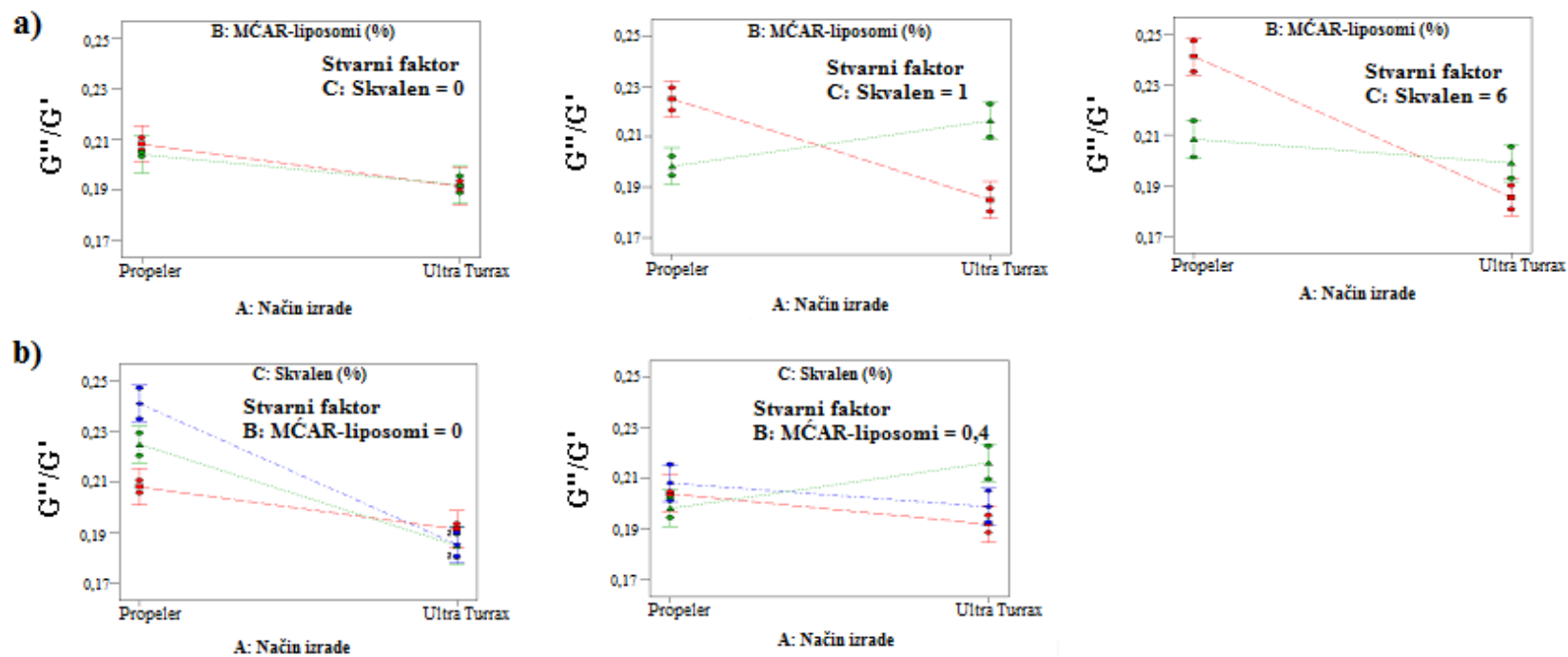
Negativan znak ispred koeficijenata za faktore A i B predstavlja antagonistički efekat ovih faktora na parametre oscilatorne reologije, što znači da su vrednosti G'' , G' i G''/G' emulzija kod kojih je u fazi emulgovanja korišćen Ultra Turrax i koje sadrže MĆAR-liposome, niže u odnosu na emulzije izrađene sa propelerskom mešalicom i bez MĆAR-liposoma. S obzirom na to da se oscilatorna merenja koriste za karakterizaciju strukture emulzionih sistema, dobijeni rezultati opet ukazuju na uticaj načina izrade na koloidnu strukturu ispitivanih sistema, tj. na obrazovanje lamelarne tečno-kristalne i gel faze. Kada se posmatraju AB interakcije (Slike 32a i 33a), može se primetiti da u svim slučajevima (emulzije bez/sa skvalenom), elastični (G') i viskozni modul (G'') praznih emulzija opada, dok vrednost ovih parametara u prisustvu MĆAR-liposoma raste kada se Ultra Turrax koristi u fazi emulgovanja, umesto propelerske mešalice, što je u skladu sa rezultatima teksturne analize, kao i minimalnim prividnim viskozitetom.



Slika 32. Grafici interakcija i površine odgovora koji pokazuju efekte (a) A i B (AB interakcija) na elastični modul bez prisustva skvalena/C (C = 0% (m/m)), pri nižoj koncentraciji (C = 1% (m/m)) i pri višoj koncentraciji (C = 6% (m/m)); (b) A i C (AC interakcija) na elastični modul bez i u prisustvu MČAR-liposoma; (c) B i C (BC interakcija) na elastični modul ukoliko se u fazi emulgovanja (način izrade) koristi propelerska mešalica ili Ultra Turrax



Slika 33. Grafici interakcija koji pokazuju efekte (a) A i B (AB interakcija) na viskozni modul bez skvalena/C (C = 0% (m/m)), pri nižoj koncentraciji (C = 1% (m/m)) i pri višoj koncentraciji (C = 6% (m/m)); (b) A i C (AC interakcija) na viskozni modul bez i u prisustvu MČAR-liposoma; (c) B i C (BC interakcija) na viskozni modul ukoliko se u fazi emulgovanja (način izrade) upotrebi propellerska mešalica ili Ultra Turrax



Slika 34. Grafici interakcija koji pokazuju efekte (a) A i B (AB interakcija) na G''/G' bez skvalena/C ($C = 0\%$ (m/m)), pri nižim koncentracijama ($C = 1\%$ (m/m)) i pri višim koncentracijama ($C = 6\%$ (m/m)); (b) A i C (AC interakcija) na G''/G' bez i u prisustvu MČAR-liposoma

Kada su u pitanju AC interakcije (Slike 32b i 33b), G' i G'' emulzija bez liposoma opadaju u sva tri slučaja (bez skvalena/sa 1 i sa 6% (m/m) skvalena) kada se Ultra Turrax koristi umesto propellerske mešalice. Suprotno tome, u prisustvu MČAR-liposoma, u gore pomenutim uslovima, vrednost ovih parametara raste, što je u skladu sa rezultatima dobijenim za čvrstinu emulzija i minimalni prividni viskozitet. U slučaju BC interakcija (Slike 32c i 33c), dodavanje MČAR-liposoma dovodi do smanjenja vrednosti oba modula kod svih emulzija sa/bez skvalena) kada se propellerska mešalice koristi u fazi emulgovanja, dok kod primene Ultra Turrax-a vrednost ovih parametara raste kod emulzija sa 1% i 6% (m/m) skvalena i ostaje praktično nepromenjena kod emulzija koje ne sadrže skvalen.

Za razliku od elastičnog i viskoznog modula, na G''/G' ($\tan\delta$), parametar jačine koloidnih sila unutar sistema, značajno su uticala dva tipa interakcija, AB i AC, respektivno (Slika 34). U pogledu AB interakcija (Slika 34a), smanjenje vrednosti G''/G' se može uočiti kod emulzija sa ili bez MČAR-liposoma koje ne sadrže skvalen ili sadrže 6% (m/m) skvalena, kada se u fazi emulgovanja koristi Ultra Turrax umesto propellerske mešalice. Kod emulzija sa 1% (m/m) skvalena, vrednost G''/G' opada ukoliko emulzije ne sadrže i liposome, a raste kod emulzija i sa MČAR-liposomima, kada se u fazi emulgovanja promeni uređaj (Ultra Turrax umesto propellerske mešalice). Analiziranjem AC interakcija (Slika 34b) uočava se da dolazi do smanjenja vrednosti ovog parametra kod emulzija bez liposoma, sa/bez skvalena, kao i kod emulzija sa MČAR-liposomima, bez skvalena i sa 6% (m/m) skvalena, dok se G''/G' kod emulzija sa liposomima i 1% (m/m) skvalena vrednost povećava, kada se u fazi emulgovanja koristi Ultra Turrax umesto propellerske mešalice. Iako dobijeni rezultati pokazuju značajan uticaj ispitivanih faktora na vrednost ovog parametra, činjenica je da se dobijene vrednosti kreću u vrlo malom opsegu od 0,185 do 0,225, odnosno da je statistička analiza eksperimentalnog dizajna ponekad sklona da pogrešno detektuje razliku kad su u pitanju veoma male vrednosti, kao što je slučaj sa rezultatima dobijenim za $\tan\delta$.

Što se tiče uticaja faktora reformulacije na reološke karakteristike emulzionih sistema, generalni faktorijalni eksperimentalni dizajn daje sledeće informacije:

1. dodatak skvalena (1 i 6%(m/m)) i primenjeni postupak izrade, kao i njihove interakcije, značajno utiču na sve praćene reološke parametre,

dok prisustvo MĆAR-liposoma (0,4% (m/m)) nema uticaja na vrednost histerezne površine i G''/G' ;

2. promena u postupku izrade (različite mešalice u fazi emulgovanja) ima najmanje izražen efekat na praćene parametre kontinulane reologije, kao i na elastični i viskozni modul, i to nezavisno od sastava emulzije;
3. oba modula su bila pod najvećim uticajem postupka izrade i prisustva MĆAR-liposoma;
4. promena viskoelastičnih osobina emulzije prouzrokovana promenom načina izrade se može izbeći istovremenim dodavanjem odgovarajućih sastojaka;
5. ako se sastav i postupak izrade emulzija istovremeno promene, izbor dodatog sastojka (skvalen ili MĆAR-liposomi) će uticati na to na koji način će se menjati reološki parametri;
6. naizgled manja promena sastojaka emulzija (dodatak 0,4% (m/m) MĆAR-liposoma ili 1% (m/m) skvalena) može dovesti do značajnih promena reoloških karakteristika sistema;
7. uticaj skvalena (emolijens) na reološke karakteristike emulzija je očekivan i zavisi od dodate koncentracije;
8. postoji izvesna sličnost u promenama parametara kontinulane i oscilatorne reologije kod emulzija koje su izrađene reformulacijom – maksimalni i minimalni prividni viskozitet sa jedne strane i elastični i viskozni modul sa druge, kao i histerezna površina i G''/G' .

Uzevši u obzir da je tekstura (senzorni atribut emulzija) u korelaciji sa vrednošću njene histerezne površine, da je razmazivost u korelaciji sa maksimalnim i minimalnim prividnim viskozitetom, elastičnim i viskoznim modulom (Lukic i sar., 2012) i činjenice da su rasprostiranje i konzistencija (senzorni atribut) u korelaciji sa maksimalnim i minimalnim prividnim viskozitetom (Estanqueiro i sar., 2016), dobijeni rezultati sugerišu da bi dodatak skvalena i izabrani postupak izrade mogli imati uticaj na određene senzorne osobine u fazi uzimanja proizvoda (tekstura) i tokom faze utrljavanja proizvoda (razmazivost, rasprostiranje i konzistencija), dok će prisustvo MĆAR-liposoma uticati samo na senzorne attribute tokom faze utrljavanja proizvoda. Dodatno,

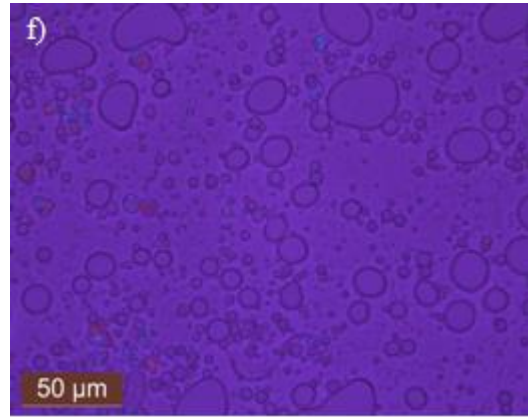
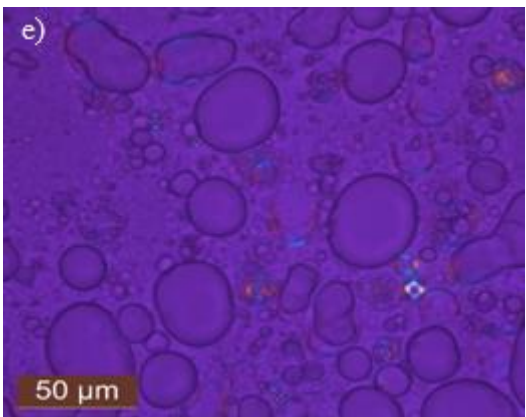
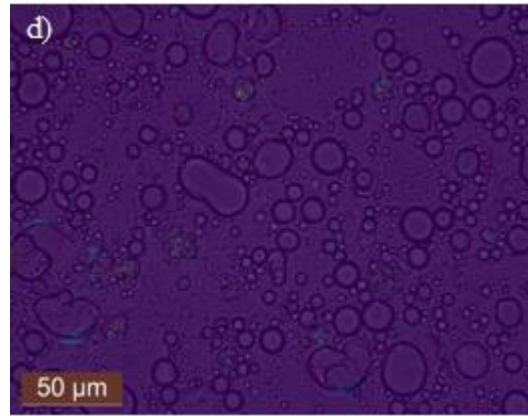
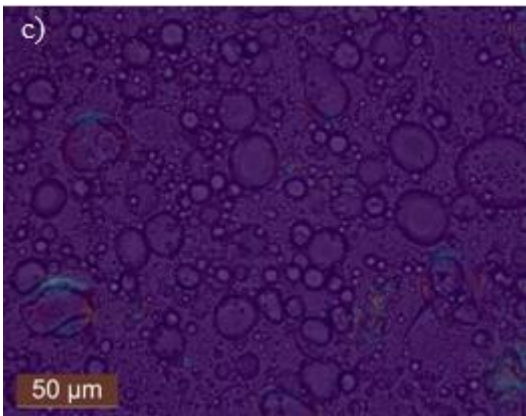
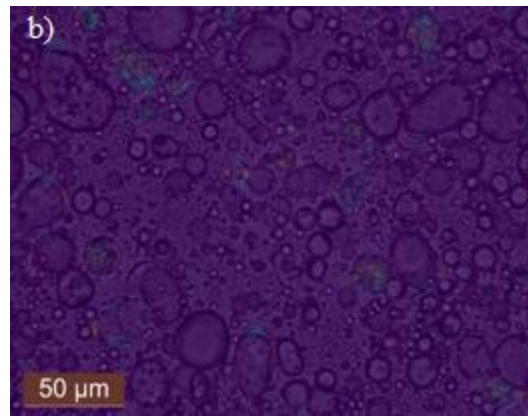
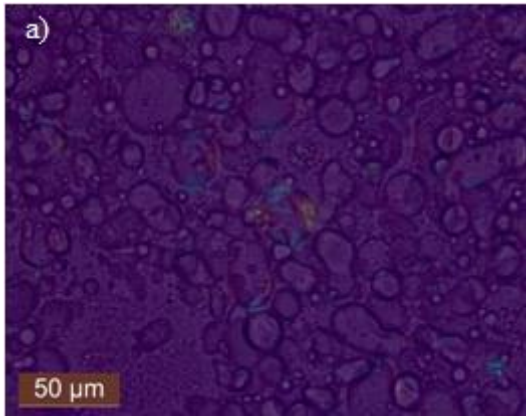
interakcije ispitivanih faktora imaju značajan uticaj na sve praćene reološke parametre, te će imati uticaj i na pomenute senzorne karakteristike.

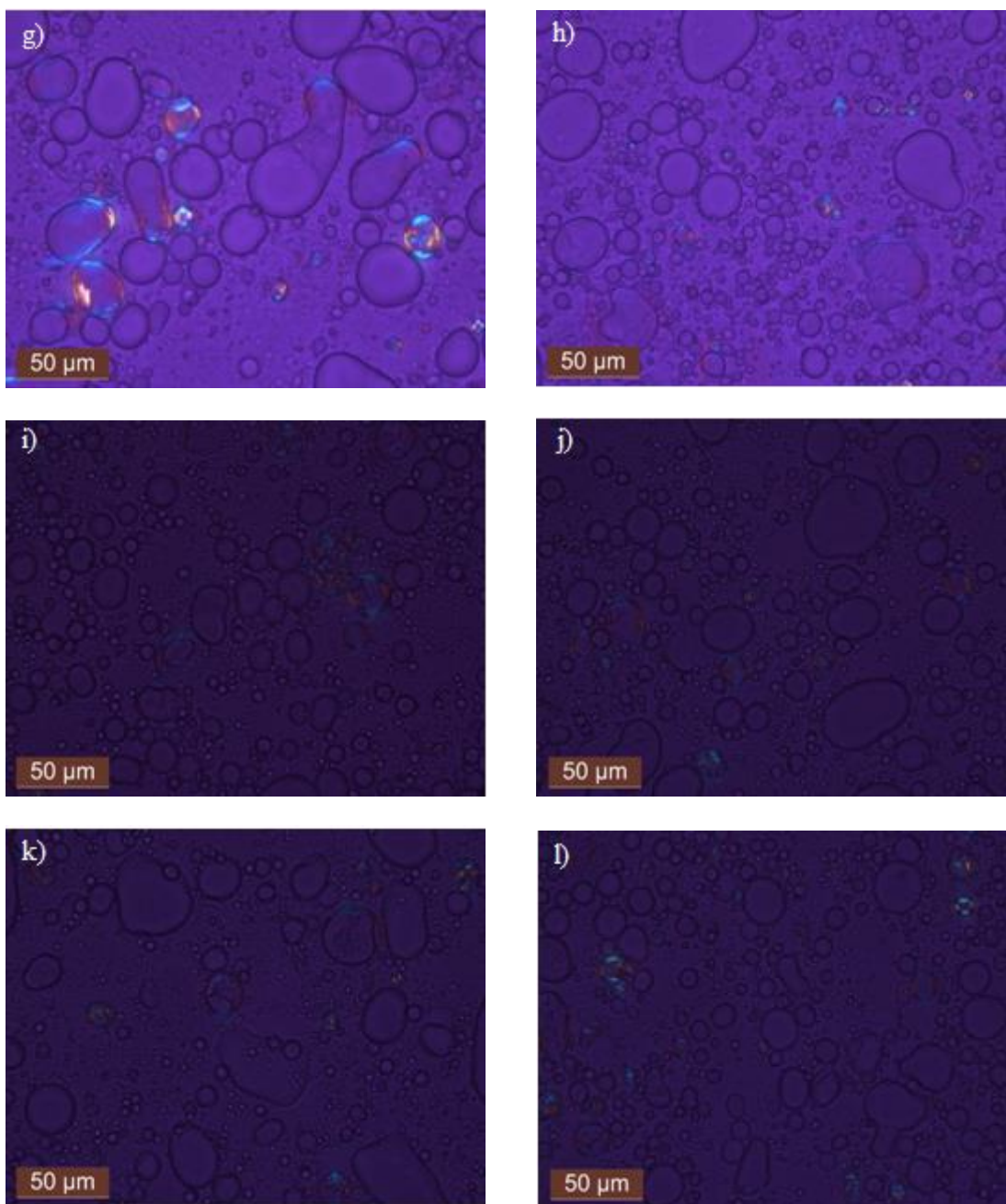
U pogledu praktične primene dobijenih rezultata, ako je interes formulatora da unapredi inicijalnu placebo formulaciju (Fp) istovremenim dodavanjem 1% (m/m) skvalena i 0,4% (m/m) MĆAR-liposoma, a da ujedno zadrži slične reološke karakteristike, te i određene senzorne (razmazivost, rasprostiranje i konzistencija) osobine novoizrađenih emulzija, potrebno je da promeni uređaj u fazi emulgovanja proizvoda (da koristi Ultra Turrax umesto propellerske mešalice). Kao što se može videti u diskusiji vezanoj za parametre teksture, istovremeni dodatak MĆAR-liposoma i skvalena u formulaciju Fp, uz primenjeni postupak izrade sa Ultra Turrax-om u fazi emulgovanja, ne bi doveo do promene teksturnih parametara tog uzorka, što jeste značajno za reformulisani proizvod.

Dobijeni rezultati teksturne analize i reoloških merenja upućuju da kada se kombinovano koriste dovoljno su osetljive, i odgovarajuće za poređenje inicijalnih i novoizrađenih (reformulisanih) uzoraka, jer pružaju mogućnost uočavanja sličnosti i razlika između uzoraka. Ovo znači da opisani pristup može da se koristi kao zamena za određene senzorne analize (npr. diskriminativnu) – pogotovo kada u testiranju učestvuju netrenirani ili vrlo malo trenirani ispitanici ili korisnici proizvoda koji imaju tendenciju da primete razliku između uzoraka, kada je realno nema ili da uopšte ne primete razliku, objektivno drugačijih uzoraka (Külkamp-Guerreiro i sar., 2013).

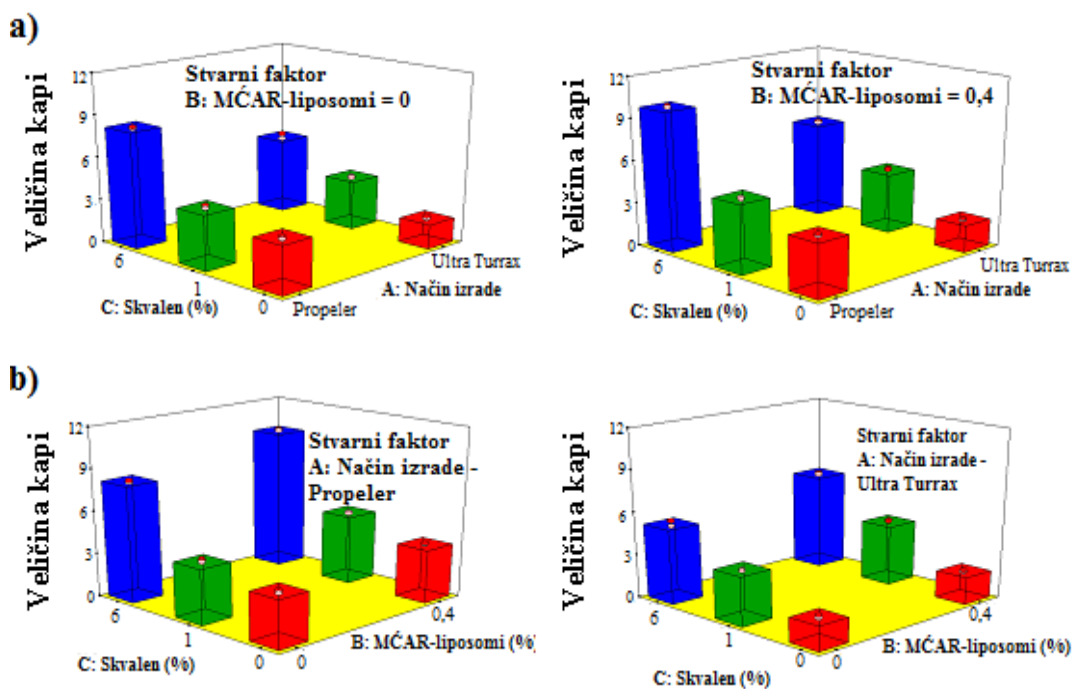
4.3.4. Mikroskopska analiza (veličina kapi)

Uzevši u obzir da reološko ponašanje i mehaničke karakteristike emulzionih sistema značajno zavise od veličine kapi, što je godinama poznato, a ističe i Estanqueiro i sar. (2016), ispitan je i uticaj faktora reformulacije (promena sastava i postupka izrade) na vrednosti ovog parametra. U cilju određivanja veličine kapi unutrašnje faze emulzionih sistema, urađena je mikroskopska analiza (vrednosti su prikazane u Tabeli 13, a mikrografije na Slici 35) i rezultati eksperimentalnog dizajna su prikazani u jednačini (12) i na Slici 36.





Slika 35. Polarizacione mikrografije dobijene 7 dana nakon izrade uzoraka (uvećanje 500x): a) Fp; b) Fut; c) FpA; d) FutA; e) FpS; f) FutS; g) FpS6; h) FutS6; i) FpAS; j) FutAS; k) FpAS6; l) FutAS6



Slika 36. Površine odgovora koje pokazuju efekte (a) A i C (AC interakcije) na veličinu kapi bez i u prisustvu MČAR-liposoma; (b) B i C (BC interakcija) na veličinu kapi ukoliko se u fazi emulgovanja koristi propelerska mešalica ili Ultra Turrax

Veličina kapi emulzija bila je pod značajnim uticajem svih faktora reformulacije ($p < 0,0001$): skvalen (C) > postupak izrade (A) > MČAR-liposomi (B) (jednačina (12)).

Dodatak skvalena (1 i 6% (m/m)) kao i korišćenje Ultra Turrax-a u fazi emulgovanja, doveli su do smanjenja veličine kapi emulzija, što je očekivano kao što je već diskutovano. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim za sve teksturne karakteristike, kao i za parametre oscilatorne reologije. Sa druge strane, prisustvo MČAR-liposoma (0,4% (m/m)), imalo je pozitivan uticaj na veličinu kapi, odnosno dodatak liposoma dovodi do povećanja vrednosti ovog parametra, što je u skladu sa rezultatima kontinulane reologije. Dobijeni rezultati su u skladu i sa polarizacionim mikrofografijama ispitivanih uzoraka (Slika 35).

Dalje, veličina kapi je bila pod značajnim uticajem dva tipa interakcija, AC i BC, respektivno (Slika 36). Kada se analiziraju AC interakcije (Slika 36a), može se primetiti da se u oba slučaja (emulzije sa/bez liposoma) i kod svih uzoraka (sa/bez

skvalena) veličina kapi smanjuje kada se u fazi emulgovanja koristi Ultra Turrax umesto propellerske mešalice, što je i očekivano i poznato u praksi. Što se tiče BC interakcija (Slika 36b) veličina kapi raste nakon dodatka liposoma (0,4% (m/m)) u uzorak sa 6% (m/m) skvalena, nezavisno od postupka izrade, dok kod emulzija bez skvalena i onih sa 1% (m/m) skvalena nema promene u vrednosti ovog parametra ili postoji samo neznanto povećanje u veličini kapi.

Dobijeni rezultati su u skladu sa u praksi potvrđenim slučajevima da se korišćenjem jačeg uređaja sa većim brzinama mešanja (većim brojem obrtaja po minuti) dobijaju emulzioni sistemi sa manjom veličinom kapi unutrašnje faze (Tadros, 2009; 2013). Dodatno, emolijensi imaju uticaj na senzorne karakteristike emulzionog sistema i značajni uticaj skvalena na veličinu kapi, kao i na koloidnu strukturu sistema, što potvrđuju polarizacione mikrografije uzoraka sa skvalenom (Slike 35 e-1), predstavlja i objašnjenje za uticaj ove sirovine i na teksturne i reološke karakteristike ispitivanih emulzija.

4.4. Rezultati i diskusija IV faze eksperimentalnog rada

U ovoj fazi eksperimentalnog rada je primenom *in vivo* neinvazivnih metoda zasnovanih na biofizičkim merenjima na koži dobrovoljaca prvo određen bezbednosni profil uzoraka izabranih na osnovu rezultata II i III faze. Uzorci koji nisu ispoljili lokalne neželjene efekte, smatrani su bezbednim za primenu na koži, te su bili podvrgnuti proceni odabranih aspekata efikasnosti emulzija.

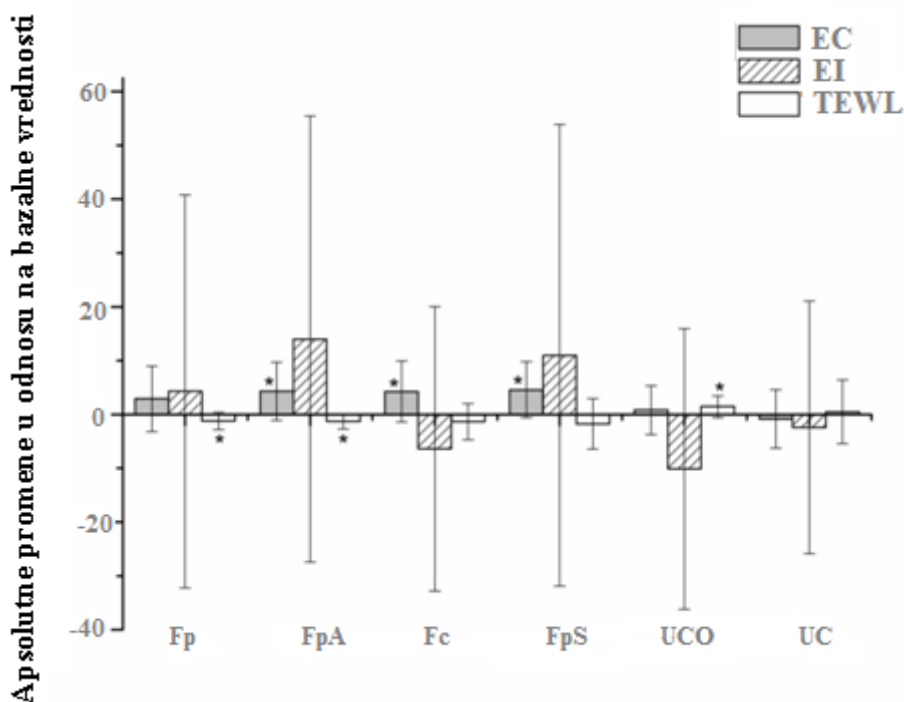
Svi učesnici ispitivanja određenih aspekata bezbednosti i efikasnosti završili su studije do kraja i potvrdili striktno poštovanje upustava datih na početku.

4.4.1. *In vivo* procena određenih aspekata bezbednosti i efikasnosti izabranih uzoraka model liposomskih emulzija za negu kože

4.4.1.1. *In vivo* procena bezbednosnog profila odabranih uzoraka emulzija na koži

Za procenu bezbednosnog profila izabrani su sledeći uzorci: placebo krem (nosač) Fp, FpA krem sa 0,4% (m/m) MČAR-liposoma i FpS krem sa 1% (m/m) skvalena. Kao referentni uzorak u studiji bezbednosti, korišćen je komercijalni krem sa tržišta (Fc) Hydra perfect dnevni krem, proizvođača Dahlia, Beograd.

Na Slici 37 prikazani su grafici apsolutnih promena (Δ vrednosti) *in vivo* merenih parametara (EC, TEWL i EI) u odnosu na bazalnu vrednost nakon nanošenja ispitivanih uzoraka pod okluzijom u trajanju od 24h.



Slika 37. *In vivo* određen iritacioni potencijal ispitivanih uzoraka Fp, FpA, FpS i Fc u odnosu na odgovarajuće bazalne vrednosti. Promene parametara međusobno, kao i u odnosu na odgovarajuće netretirane kontrole (bez okluzije - UC i pod okluzijom -

UCO), analizirane su jednofaktorskom ANOVA-om, nakon čega je rađen Tukey's *t*-test, gde je to bilo potrebno. Statistički značajna razlika označena je sa (*).

Bezbednost i efikasnost kozmetičkog proizvoda zavise od hemijske strukture i toksikološkog profila njihovih sastojaka, količine sastojaka koji će doći u kontakt sa kožom, ali i od ponašanja supstanci pri kontaktu sa kožom. Penetracija sastojaka kozmetičkih proizvoda u/kroz kožu, zavisi od više faktora: fizičko-hemijskih karakteristika sastojaka, stanja kože, tipa formulacije (Duracher i sar., 2015), ali i okluzije (Friebe i sar., 2003; Zhai i sar., 2002). Okluzija sama po sebi može dovesti do oštećenja kožne barijere, bez istovremenog sušenja kože, takođe može povećati penetraciju pojedinih sastojaka lokalno nanetih proizvoda i prouzrokovati iritaciju. Kako bi se procenio iritacioni potencijal ispitivanih uzoraka, kao i njihov potencijal da oštete kožnu barijeru, neophodno je ukloniti uticaj okluzije. Iz tog razloga, poslednje merenje praćenih parametara vršeno je 3 časa nakon skidanja filter papira i Parafilma®, kada je prestao uticaj okluzije kako navode Friebe i sar., (2003).

Nakon okluzije u trajanju od 24 časa, eritema indeks (EI) kao indikator iritacije kože (Fullerton i sar., 1996) nije bio značajno promenjen u odnosu na bazalnu vrednost, ni kod jednog ispitivanog uzorka. Takođe, kod komercijalnog krema Fc, kao i kod okludirane netretirane kontrole (UCO) primećuje se smanjenje ovog parametra u odnosu na bazalnu vrednost, koje nije statistički značajano. Objašnjenje je verovatno zbog produžene okluzije i maceracije kože, usled hiperhidracije *stratum corneum*-a (Fluhr i sar., 1999; Ramsing i sar., 1996).

TEWL, pokazatelj barijerne funkcije kože i njenih strukturnih promena (Buraczewska-Norin, 2012; Lodén, 2003; Zhai i sar., 2002) je pokazao opadajući trend u odnosu na bazalne vrednosti, ali statistički značajan samo za placebo Fp i krem FpA. S obzirom na to da značajne promene vrednosti TEWL nisu zabeležene kod netretirane kontrole (UC), dok je kod okludirane netretirane kontrole (UCO) ovaj parametar ostao značajno povećan čak i 3h nakon skidanja okluzije, može se pretpostaviti da je uočenom smanjenju vrednosti TEWL kod uzorka FpA doprineo efekat same aktivne supstance (MĆAR-liposomi). Sa druge strane, ako se poredе vrednosti placeba Fp sa kremovima koji sadrže istu (ispitivanu) aktivnu supstancu FpA i Fc, može se pretpostaviti da se ovi

rezultati ne mogu pripisati samom nosaču, odnosno njegovim sastojcima, a da se ne uzme u obzir dejstvo na kožu ispitivanog emulgatora - HSA i HSG, koji nije sastojak krema sa tržišta. Objašnjenje je verovatno u sličnosti tečno-kristalne strukture uzoraka stabilizovanih ispitivanim mešanim emulgatorom (Fp i FpA), pokazane u drugoj fazi eksperimentalnog istraživanja (Slika 18) sa lamelarnom strukturnom organizacijom *stratum corneum*-a. Pretpostavka je u skladu sa već objavljenim rezultatima vezanim za povoljne dermatološke osobine emulgatora iz grupe APG (Holmberg, 2001; Lukic i sar., 2013a; Savic i sar., 2011), ali i za ispitivani emulgator sa kojim je radila Markovic-Bogdanovic i sar., (2014).

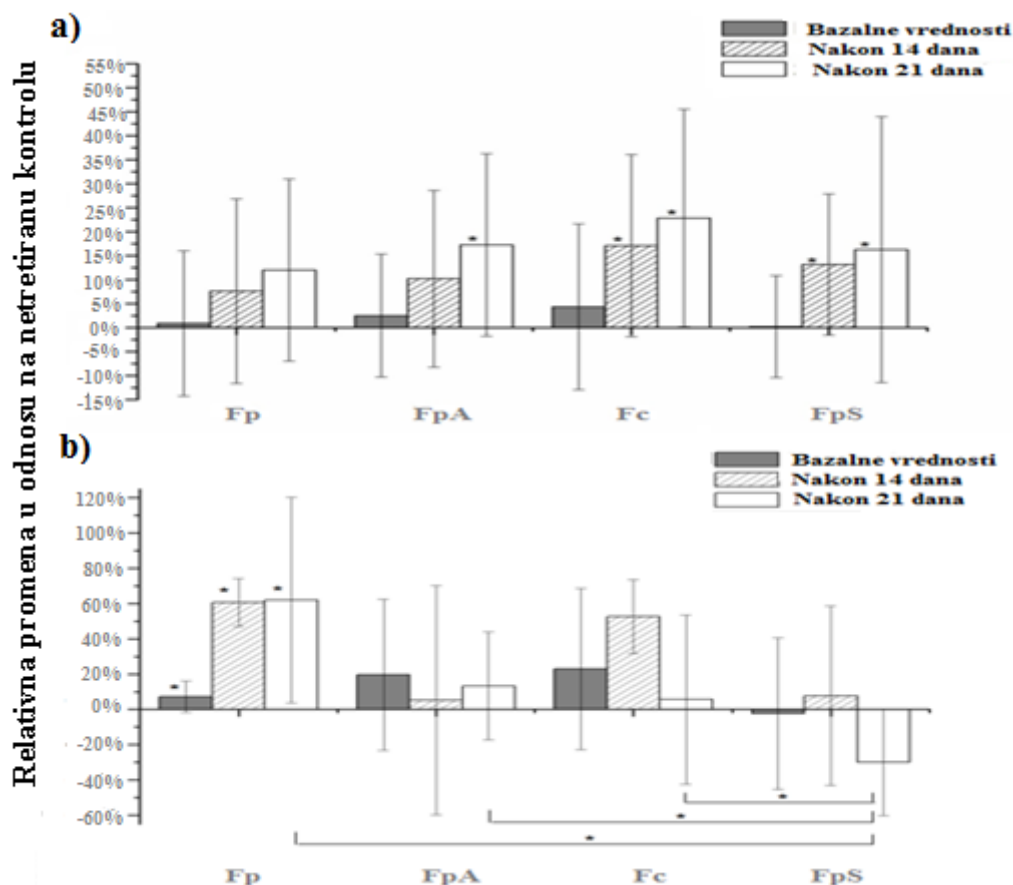
Što se tiče hidracije kože (EC), značajno je porasla u odnosu na bazalnu vrednost kod svih uzoraka sa KAS. Kod placebo Fp je takođe zabeleženo povećanje, ali bez statističke značajnosti. Iako okluzija može značajno povećati hidraciju SC, sprečavajući odavanje vode sa površine kože (Zhai i sar., 2002), dobijeni rezultati se ne mogu pripisati samo okluziji. S obzirom na to da kod okludirane netretirane kontrole (UCO) nije došlo do značajnih promena, kao i činjenice da je ovaj parametar opao (iako bez statističke značajnosti) na mestu netretirane kontrole bez okluzije (UC), zabeleženi rezultati se mogu pripisati efektu ispitivane supstance (MČAR-liposomi), samom emulzionom nosaču (sastojcima masne faze, koji zahvaljujući okluzivnom delovanju povećavaju sadržaj vlage u površinskom sloju kože i humektantnom efektu glicerola (Loden 2003; 2012)), ali i emulgatoru HSA i HSG, odgovornom za nastajanje posebne mikrostrukture nosača i raspodele vode u njemu, a time i njenom uticaju na sadržaj vode u površinskom sloju kože.

Prema dobijenim rezultatima, nije došlo do narušavanja barijerne funkcije kože. Odsustvo eritema (crvenila) kao i znakova bilo kakvog narušavanja barijerne funkcije kože tokom studije okluzije u trajanju od dvadeset četiri časa, preliminarno ukazuje na zadovoljavajući bezbednosni profil ispitivanih uzoraka emulzija sa 0,4% (m/m) MČAR-liposoma, 1% (m/m) skvalena maslinovog ulja i upotrebljenog emulgatora.

4.4.1.2. *In vivo* ispitivanje efikasnosti odabranih uzoraka na koži

4.4.1.2.1. *In vivo* ispitivanje efikasnosti odabranih uzoraka na zdravoj koži (dugoročna 21-dnevna studija)

U cilju procene efikasnosti odabranih uzoraka na koži humanih dobrovoljaca, vršeno je merenje određenih biofizičkih parametara tokom studije koja je trajala 21 dan. Nakon incijalnog merenja bazalnih vrednosti, dobrovoljci su dva puta dnevno nanosili uzorke na normalnu/zdravu kožu poštujući pisano uputstvo. Prvo kontrolno merenje praćenih parametara je izvršeno nakon četrnaestog dana nanošenja, a poslednje, nedelju dana nakon kontrolnog (posle 21 dana). Na Slici 38 prikazani su rezultati merenih parametara (EC, TEWL) kao relativne procentualne promene u odnosu na netretiranu kontrolu, dok Tabela 19 prikazuje parametre viskoelastičnosti kože (R2, R5 i R7) kao srednje vrednosti \pm SD.



Slika 38. Efekti primene uzoraka Fp, FpA, Fc i FpS na vrednosti parametra a) EC i b) TEWL u odnosu na netretiranu kontrolu (procentualna promena). Efekti ispitivanih uzoraka međusobno analizirani su jednofaktorskom ANOVA-om, nakon čega je rađen Tukey's *t*-test, gde je to bilo potrebno. Razlike za isti tretman, ali u odnosu na odgovarajuću netretiranu kontrolu, su proverene nesparenim Student *t*-testom. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) su obeležene sa (*).

Tabela 19. Efekti ispitivanih uzoraka na izabrane viskoelastične parametre kože (kontrolne vrednosti - vrednosti netretiranih kontrola su takođe prikazane). Rezultati mereni inicijalno (bazalne vrednosti) i nakon 21 dana nanošenja uzoraka (*) su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška

Uzorak	R2	R5	R7	R2*	R5*	R7*
Fp	0,843 \pm 0,036	0,995 \pm 0,101	0,649 \pm 0,057	0,833 \pm 0,041	0,950 \pm 0,097	0,621 \pm 0,056
FpA	0,828 \pm 0,026	0,921 \pm 0,078	0,606 \pm 0,039	0,847 \pm 0,033	0,955 \pm 0,077	0,632 \pm 0,046
UC1	0,813 \pm 0,041	0,847 \pm 0,081	0,576 \pm 0,051	0,806 \pm 0,061	0,824 \pm 0,094	0,563 \pm 0,072
Fc	0,842 \pm 0,044	0,972 \pm 0,071	0,641 \pm 0,055	0,856 \pm 0,037	0,996 \pm 0,093	0,650 \pm 0,052
FpS	0,828 \pm 0,030	0,924 \pm 0,071	0,616 \pm 0,041	0,820 \pm 0,036	0,909 \pm 0,065	0,599 \pm 0,036
UC	0,808 \pm 0,057	0,846 \pm 0,092	0,601 \pm 0,064	0,812 \pm 0,042	0,831 \pm 0,076	0,611 \pm 0,050

Kozmetički proizvodi za ovlaživanje kože imaju bitnu ulogu u tretmanu dermatoza praćenih suvom kožom, ali i u nezi zdrave kože. Pored vlaženja i prevencije stanja suve kože, utiču na strukturu i barijernu funkciju zdrave kože (Loden, 2012). Poznato je da proizvodi za ovlaživanje kože povećavaju hidraciju kože nakon kratkotrajne upotrebe (Buraczewska-Norin, 2012; Lodén 2003; 2012). Međutim, usled dugotrajne, svakodnevne upotrebe, ovi proizvodi, u zavisnosti od sastava, mogu i narušiti barijernu funkciju kože, povećati penetraciju sastojaka kozmetičkog proizvoda u/kroz kožu i izazvati (dodatno) isušivanje kože i iritaciju (Loden 2003, 2012). Stoga, merenje EC je izvršeno kako bi se procenio potencijal ispitivanih uzoraka da efikasno povećaju sadržaj vlage u koži, nakon dugotrajne upotrebe u periodu od 21 dana. Nakon 21 dana nanošenja uzoraka, svi uzorci (placebo Fp bez statističke značajnosti) su doveli do povećanja hidracije u površinskom sloju kože (Slika 38a). Treba istaći da su krem sa skvalenom FpS i komercijalni krem Fc, doveli do značajnog povećanja vrednosti ovog parametra već nakon 14 dana primene.

Ukoliko se uporede krem FpA i komercijalni uzorak Fc koji sadrže istu koncentraciju od 0,4% (m/m) ispitivane sirovine (MČAR-liposomi), ali potpuno drugačiji nosač, uključujući i upotrebljeni emulgator, može se pretpostaviti da je uticaj liposoma sa KAS na vlažeći efekat na koži značajan, kao što se i očekivalo. Do slične pretpostavke se može doći ukoliko se uporede uzorci sa istim nosačem - FpA i placebo Fp. Međutim, nije poznat tačan mehanizam vlažećeg efekta liposoma sa matičnim ćelijama dobijenim iz listova alpske ruže (PhytoCellTec™ Alp Rose), niti njihova sposobnost da eventualno penetriraju u/kroz SC nakon nanošenja na zdravu kožu, jer takve podatke ne daje proizvođač ovog kozmetičkog sastojka. Imajući u vidu da ispitivana aktivna supstanca zapravo predstavlja ekstrakt kulture matičnih ćelija koji je inkapsuliran u liposome, može se očekivati da vlažeći efekat na koži potiče od pojedinih sastojaka ekstrakta koji imaju sposobnost vezivanja i zadržavanja vlage i koji se ponašaju kao humektansi, ali se svakako može pripisati i samim liposomima, odnosno fosfolipidima - lecitinu (Rahimpour i sar., 2012), bez kojih nema dvoslojnih membrana ovih vezikula, a ni efekta povećanja hidracije i smanjenja TEWL (Adamović 2016).

Što se tiče uzorka sa 1% (m/m) skvalena FpS, doveo je do značajnog povećanja hidracije, kako nakon 14 dana, tako i nakon 21 dana primene. Ako se vrednosti dobijene za ovaj uzorak uporede sa vrednostima zabeleženim kod placeba Fp, može se reći da

skvalen u koncentraciji od 1% (m/m) značajno doprinosi hidraciji kože. Iako je skvalen poznato sredstvo koje vlaži kožu (Huang i sar., 2009), dobijeni rezultati ukazuju da se hidracija kože može postići čak i sa niskom koncentracijom ove kozmetičke sirovine. Sa druge strane, kod placebo uzorka Fp se uočava rastući trend vrednosti EC u odnosu na netretiranu kontrolu kao i nepostojanje statistički značajne razlike u odnosu na uzorke sa istim nosačem FpA i FpS, što ukazuje da je za postizanje efikasne hidracije značajan efekat nosača, ali i HSA i HSG kao emulgatora. Ovo je u skladu sa već objavljenim rezultatima vezanim za stariju generaciju APG emulgatora (Lukic i sar., 2013b; Savic i sar., 2004; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011), kao i za ispitivani emulgator sa kojim je radila Markovic-Bogdanovic i sar., (2014).

Poznato je da emulgatori APG tipa omogućavaju produženu hidraciju kože, zahvaljujući specifičnoj unutrašnjoj strukturi, koju ostvaruju u kremu, sposobnosti vezivanja vode i građenja lamelarne faze (Lukic i sar., 2013b; Savic i sar., 2004; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011). Nedavno je pokazano da kremovi stabilizovani ispitivanim emulgatorom imaju čak i veću sposobnost vezivanja vode u odnosu na prethodne generacije ovih emulgatora. Sposobnost vezivanja vode i formiranja tečnih kristala, oko uljanih kapi u kremovima stabilizovanim ispitivanim emulgatorom zavisi od prirode izabranih ulja u sastavu masne faze. Tako, izbor nepolarnih ulja (poput skvalana) dovodi do vidljivog formiranja ovih struktura (Markovic-Bogdanovic i sar., 2014). Pošto je skvalan zasićeni nepolarni derivat skvalena, može se pretpostaviti da bi skvalen mogao imati određeni uticaj na koloidnu strukturu ispitivanog uzorka FpS. Skvalen bi mogao da doprinese i formiranju lamelarne faze unutar strukture ovog uzorka, kao i produženom efektu hidracije ovog krema. Polarizaciona mikrografija uzorka sa 1% (m/m) skvalena (Slika 35e i 35f) potvrđuje datu pretpostavku, odnosno na mikrografiji su uočljive anizotropne strukture unutar sistema - iskrivljeni malteški krstovi, koji upućuju na liotropnu interakciju lamelnog tipa, kao i veliki sferični anizotropni agregati (Lukic i sar., 2013b; Savic i sar., 2005; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011).

Kada je u pitanju uticaj ispitivanih uzoraka na TEWL (Slika 38b), rezultati pokazuju da je nakon 21 dana nanošenja kod uzorka FpS došlo do značajnog smanjenja vrednosti ovog parametra u odnosu na sve ostale uzorke. Ako se FpS uporedi sa placebo Fp, koji je doveo do značajnog povećanja TEWL, kako nakon 14, tako i nakon 21 dana nanošenja, čini se opravdanim da se pozitivan efekat uzorka pripiše

skvalenu - sirovini koja je u njegovom sastavu. Uzevši u obzir da se merenje vrednosti TEWL koristi za skrining i objektivno, neinvazivno otkrivanje supstanci koje mogu imati pozitivan efekat na barijernu funkciju kože (Rogiers, 2001), može se pretpostaviti da je skvalen maslinovog ulja čak doveo do popravljivanja stanja barijerne funkcije kože (Lodén, 2003), nakon dugoročnog nanošenja na normalnu/zdravu kožu. Štaviše, rezultati upućuju da čak i relativno niske koncentracije skvalena (1% (m/m)) doprinose vlažećem efektu uzorka FpS.

Kod preostalih uzoraka FpA i Fc sa istom aktivnom supstancom (MĆAR-liposomi), ali drugačijim nosačem, nije došlo do značajne promene TEWL ni u jednoj merenoj vremenskoj tački. Ukratko, nanošenje uzoraka sa ispitivanim supstancama (PhytoCellTec™ Alp Rose i skvalen maslinovog ulja) u trajanju od 21 dana, nije dovelo do narušavanja barijerne funkcije kože.

Sa druge strane, rezultati dobijeni za placebo Fp su donekle zbunjujući. Vrednosti TEWL su bile uvećane u obe vremenske tačke, što upućuje na mogući negativan uticaj nosača na barijernu funkciju kože tokom dugotrajne upotrebe. Međutim, uzevši u obzir da vrednosti ovog parametra nisu povećane kod uzoraka sa istim nosačem (FpA i FpS) i činjenicu da su bazalne vrednosti na ispitivanom mestu kod većine dobrovoljaca bile već uvećane u odnosu na netretiranu kontrolu, uticaj placeba na rezultate TEWL se ipak ne mogu pripisati nosaču. Tome idu u prilog rezultati studije u kojoj je pokazano da TEWL vrednost na dominantnoj ruci može biti znatno viša u odnosu na drugu ruku, kao i da različiti delovi iste anatomske regije mogu imati značajno različite vrednosti ovog parametra (Plessis i sar., 2013). Pretpostavka je u skladu sa rezultatom studije ispitivanja bezbednosnog profila uzoraka pod okluzijom u trajanju od 24 časa za isti uzorak - placebo Fp.

U cilju procene uticaja 21 dnevnog nanošenja uzoraka na biomehničke karakteristike kože, izvršena su merenja viskoelastičnih osobina kože. Proces starenja utiče na mehaničke i strukturne karakteristike kože kroz promene na nivou elastičnih i kolagenih vlakana. Pošto je starenje praćeno smanjenjem elastičnosti kože koje kreće još u ranim dvadesetim godinama, ovo merenje bi moglo biti korisno za procenu uticaja ispitivanih uzoraka na biomehničke karakteristike kože. Iz tog razloga, parametri izabrani za procenu viskoelastičnih karakteristika kože su: R2 (ukupna elastičnost), R5 (elastična komponenta viskoelastičnog odgovora kože) i R7 (koeficijent elastičnog

oporavka kože). Računati su navedeni parametri, koji ne zavise od debljine kože dobrovoljaca i eksperimentalnih uslova studije. Oni su bili najkorisniji za ovaj tip studije, naročito parametar R7 koji je najuže vezan za elastičnost kože i najviše ima smisla da se prati u cilju procene starenja kože, merenjem njene elastičnosti (Akhtar i sar., 2014; Plessis i sar., 2013).

Tabela 19 pokazuje da nakon 21 dana nanošenja ispitivanih uzoraka nije došlo do značajne promene izabranih parametara na koži pod uticajem bilo kog krema. Stoga, dobijeni rezultati upućuju da ispitivani uzorci nemaju uticaj na elastičnost kože, kod dobrovoljaca dvadesetih godina starosti.

Ovaj nalaz sugerise nekoliko mogućih zaključaka: 1) pažljivo treba izabrati odgovarajuće dobrovoljace za što preciznije otkrivanje mogućih kozmetičkih efekata (ako ih ima), a koji bi se mogli što ispravnije prikazati/predstaviti (npr. povećava hidraciju kože, povećava elastičnost kože, itd.); 2) tvrdnje koje proizvođač navodi da biljne matične ćelije alpske ruže imaju *anti-aging* efekat, moraju biti potkrepljene skupom adekvatnih, objektivnih i subjektivnih metoda procene, što nije ponudio proizvođač ispitivane KAS, ali što mora da ima i gotov kozmetički proizvod sa tom KAS, kako se traži prema dosijeu o kozmetičkim proizvodima (Kozmetička uredba EU 1223/2009); 3) pravilan izbor odgovarajućih koncentracija KAS, ali i sastava nosača, prilagođenog izabranoj aktivnoj supstanci je uvek najvažniji zadatak za formulatora koji pokušava da postigne zadovoljavajuće kozmetičke efekte, uz prihvatljiv bezbednosni profil proizvoda za negu kože, pogotovo sa novim KAS ili novim emulgatorom.

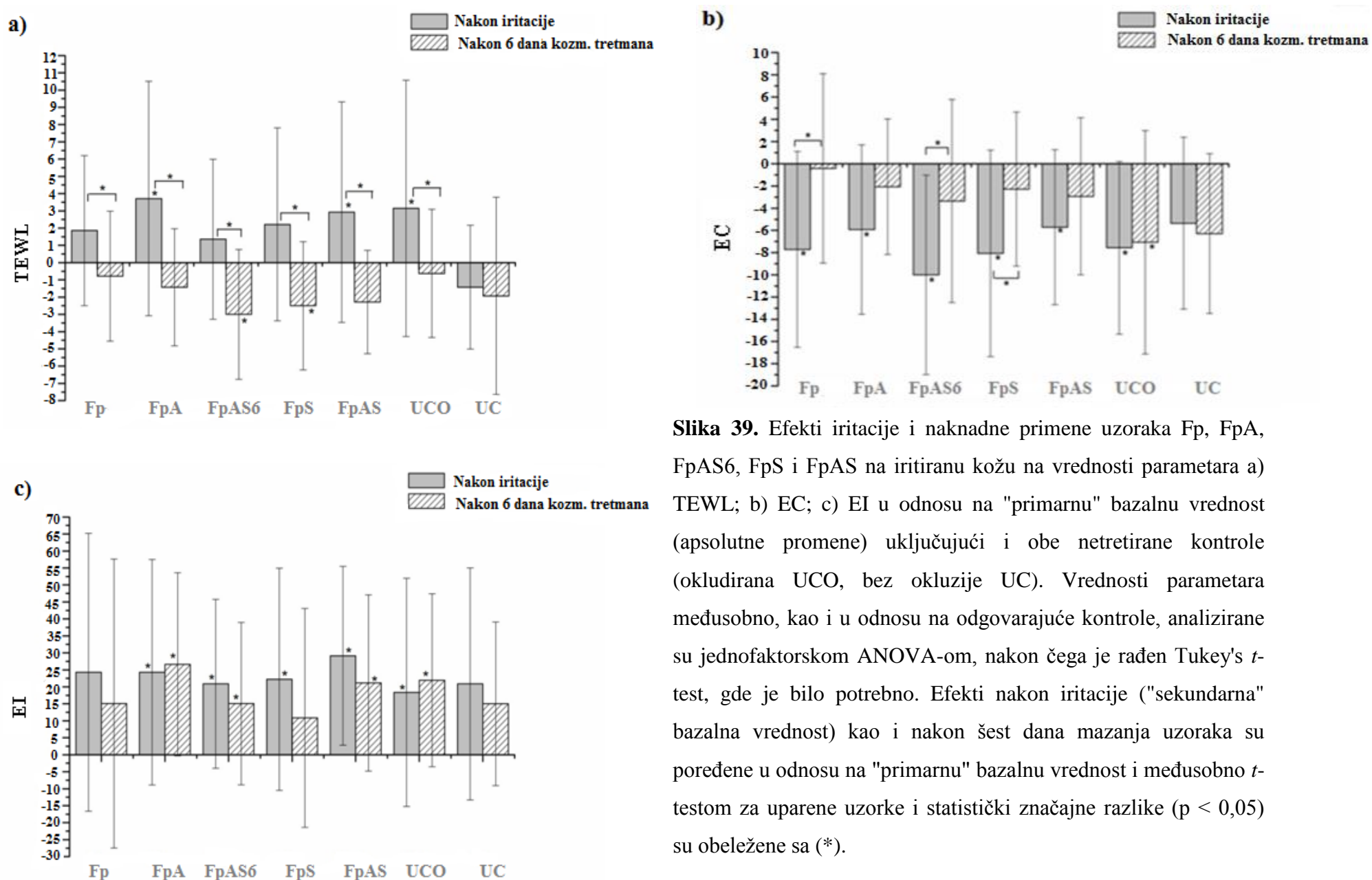
Nakon dugoročne (21 dnevne) upotrebe, ispitivani kremovi su doveli do povećanja hidracije kože, bez narušavanja barijerne funkcije kože, te se emulgator HSA i HSG, upotrebljen u formulaciji i reformulaciji kozmetičkih emulzija za negu kože, zajedno sa skvalenom maslinovog ulja (emolijens) i liposomima sa biljnim matičnim ćelijama alpske ruže, mogu smatrati odgovarajućim za kreme namenjene vlaženju zdrave kože.

4.4.1.2.2. *In vivo* ispitivanje efikasnosti odabranih uzoraka na eksperimentalno indukovanoj suvoj koži

S obzirom na to da je u prethodnoj studiji pokazano da ispitivani kremovi imaju komparabilan bezbednosni profil sa komercijalnim kremom Fc, u studiji ispitivanja

efikasnosti na koži iritiranoj natrijum lauril sulfatom (NaLS), umesto komercijalnog, ispitivana su dva dodatna krema iz III faze eksperimentalnog rada: krem sa 0,4% (m/m) MČAR-liposoma i 1% (m/m) skvalena - FpAS i krem sa 0,4% (m/m) MČAR-liposoma i 6% (m/m) skvalena - FpAS6. Uvođenjem dva nova uzorka, stekla se mogućnost da se proceni sinergistički efekat liposoma i skvalena na iritiranoj suvoj koži, uz istovremenu procenu uticaja koncentracije skvalena u kremovima na praćene parametre.

Na Slici 39 prikazani su praćeni parametri (TEWL, EC, EI) kao apsolutne promene (Δ vrednosti) u odnosu na bazalne vrednosti.



Slika 39. Efekti iritacije i naknadne primene uzoraka Fp, FpA, FpAS6, FpS i FpAS na iritiranu kožu na vrednosti parametara a) TEWL; b) EC; c) EI u odnosu na "primarnu" bazalnu vrednost (apsolutne promene) uključujući i obe netretirane kontrole (okludirana UCO, bez okluzije UC). Vrednosti parametara međusobno, kao i u odnosu na odgovarajuće kontrole, analizirane su jednofaktorskom ANOVA-om, nakon čega je rađen Tukey's *t*-test, gde je bilo potrebno. Efekti nakon iritacije ("sekundarna" bazalna vrednost) kao i nakon šest dana mazanja uzoraka su poređene u odnosu na "primarnu" bazalnu vrednost i međusobno *t*-testom za uparene uzorke i statistički značajne razlike ($p < 0,05$) su obeležene sa (*).

Nanošenje efikasnog ovlaživača može uticati pozitivno na obnavljanje kože iritirane NaLS (Lodén, 2012; Markovic-Bogdanovic i sar., 2014; Savic i sar., 2004). Stoga, u cilju procene efikasnosti uzoraka na suvoj koži, izvršeno je eksperimentalno izazivanje iritacije sa 10% (m/m) rastvorom NaLS pod okluzijom, u trajanju od 6 časova. Bazalne vrednosti su merene pre ("primarna" bazalna vrednost) i nakon izazivanja ("sekundarna" bazalna vrednost). "Sekundarna" bazalna vrednost je merena 24 sata nakon skidanja okluzije kako bi se uklonio njen uticaj na merene parametre (Friebe i sar., 2003). Vrednosti TEWL veće od 12/m²h kod više od polovine dobrovoljaca, su potvrdile da je izazivanje stanja suve kože uspešno izvršeno (Berry i sar., 1999). Poslednje merenje je izvršeno nakon 6 dana nanošenja ispitivanih kremova.

Nakon šestodnevno kozmetičkog tretmana, TEWL, parametar čije merenje je visoko osetljiva i precizna metoda za utvrđivanje efekata iritacije NaLS na koži (Friebe i sar., 2003; Tupker i sar., 1997), bio je značajno smanjen u odnosu na "sekundarnu" bazalnu vrednost kod svih ispitivanih uzoraka (Slika 39a). Dodatno, kod kremova FpAS6 i FpS vrednost ovog parametra je bila značajno smanjena u poređenju i sa "primarnom" bazalnom vrednošću (koža pre iritacije). Iako je TEWL značajno smanjen kod okludirane netretirane kontrole (UCO) u odnosu na "sekundarnu" bazalnu vrednost, dobijeni rezultati se ne mogu pripisati samo fiziološkom obnavljanju kože, pogotovo za uzorke FpS i FpAS6. Kod navedenih uzoraka se zabeleženi efekat može pripisati skvalenu, kao i samom nosaču. Nakon nanošenja, skvalen u zavisnosti od sastava i osobina filma nosača, može ostati na površini kože i zahvaljujući okluziji može smanjiti TEWL ili čak penetrirati kožu i uticati na obnavljanje barijere (Buraczewska-Norin, 2012). Sa druge strane, nosač stabilizovan emulgatorima APG tipa, takođe može doprineti obnavljanju barijere (Savic i sar., 2004), pa se može pretpostaviti da emulgator i skvalen iz krema imaju pozitivan efekat na integritet kožne barijere.

U pogledu hidracije kože, značajna promena EC u odnosu na "sekundarnu" bazalnu vrednost (Slika 39b) zabeležena je kod placebo Fp i aktivnih uzoraka FpAS6 i FpS. Naime, EC vrednosti indukovane netretirane kontrole (UCO) nakon 6 dana ostale su značajno niže u poređenju sa "primarnom" bazalnom vrednošću. Prema tome, trend povećanja hidracije, iako bez statističke značajnosti, prouzrokovan nanošenjem uzoraka FpA i FpAS, može da se protumači kao posledica vlažećeg delovanja aktivnih supstanci

(MĆAR-liposomi i skvalen). Rezultati su u skladu sa rezultatima 21-dnevne studije da nosač sa upotrebljenim emulgatorom, doprinosi vlažnosti kože.

Vrednosti eritema indeksa se nakon 6-dnevnog nanošenja nisu značajno promenile kod placebo uzorka Fp, kao i krema FpA u odnosu na "primarnu" bazalnu vrednost, mada se trend opadanja ove vrednosti može opaziti poređenjem sa "sekundarnom" bazalnom vrednošću (Slika 39c). Kod krema FpA i uzoraka koji sadrže kombinaciju 0,4% (m/m) MĆAR-liposoma i 1 i 6% (m/m) skvalena, FpAS i FpAS6, vrednosti su bile uvećane u odnosu na "primarnu" bazalnu vrednost, dok je kod FpAS i FpAS6 trend opadanja ove vrednosti u odnosu na "sekundarnu" bazalnu vrednost (vrednost merenu nakon iritacije) takođe uočljiv. Rezultati ukazuju na dve mogućnosti: 1) negativan efekat ispitivane sirovine (MĆAR-liposomi) na već iritiranu kožu u smislu dodatne iritacije; 2) (suviše) kratak period ostavljen za regeneraciju iritirane kože mazanjem uzoraka. Sa druge, strane, nakon 6 dana, vrednosti EI su ostale značajno uvećane kod indukovane netretirane kontrole (UCO) u odnosu na "primarnu" bazalnu vrednost i trend povećanja ove vrednosti je čak zabeležen u odnosu na "sekundarnu" bazalnu vrednost. Uzevši u obzir ovaj rezultat, kao i činjenicu da je potvrđen efekat smanjenja znakova iritacije kože, bez neželjenih efekata za MĆAR-liposome (Baghaei i sar., 2013), može se pretpostaviti da je nalaz, ipak posledica iritacije izazvane NaLS i uticaju okluzije same po sebi.

Ispitivani kremovi koji sadrže MĆAR-liposome i skvalen, ispoljili su pozitivan efekat na iritiranu kožu i pokazali određeni pozitivan uticaj na obnavljanje određenih oštećenja kožne barijere, što se vidi na Slici 39.

Dodatno, u pogledu uzoraka koji se razlikuju po koncentraciji skvalena (FpAS i FpAS6 sa 1% i 6% (m/m) skvalena, respektivno), pokazano je da uticaj skvalena na hidraciju kože zavisi od njegove koncentracije u kremu. Iako se skvalen smatra dobrim emolijensom i vlažećim sredstvom (Huang i sar., 2009), rezultati ukazuju da on ima određeni uticaj na specifičnu koloidnu strukturu uzoraka sa HSA i HSG, verovatno na stvaranje lamelarne faze, koja dovodi do dodatnog vlaženja kože. Pretpostavka je u skladu sa polarizacionim mikrografijama na kojima je izražena lamelarna faza u uzorcima sa skvalenom (Slike 35i i 35k).

5. ZAKLJUČAK

I faza eksperimentalnog rada

1. Vodena disperzija MĆAR-liposoma u koje je inkapsuliran ekstrakt matičnih ćelija alpske ruže pogodan je kozmetički aktivni sastojak koga treba, prilikom izrade kozmetičkog proizvoda, dodati u pripremljen kozmetički nosač, odmah nakon dispergovanja izomaltnog granulata (instant oblik liposoma/proliposomi) u vodi, da bi se izbegla agregacija i fuzija liposomskih vezikula.

2. Polarizacionom mikroskopijom je utvrđeno da MĆAR-liposomi ostaju intaktni (nisu solubilizovani) u ternarnim sistemima, odnosno nakon njihovog dodavanja u vodenu disperziju mešanog emulgatora, u laboratorijskim uslovima izrade, što upućuje da se ispitivani nejonski emulgator - hidrosistearil alkohol (HSA) i hidrosistearil glukozid (HSG) može smatrati kompatibilnim sa liposomima i njihovim dvoslojnim fosfolipidnim membranama.

3. MĆAR-liposomi imaju uticaj na koloidnu strukturu, tačnije na lamelarnu fazu unutar jednostavnih ternarnih sistema, sastavljenih iz 5% (m/m) APG emulgatora - HSA i HSG, prečišćene vode i MĆAR-liposoma, a on se ogleda u obrazovanju dodatnih, većih koloidnih struktura, usled fuzije vezikula, koje u kontaktu sa emulgatorom, stvaraju velike agregate sastavljene iz mešanog emulgatora i lecitina iz liposoma, što je ustanovljeno polarizacionom mikroskopijom.

4. Eksperimentalno je određena kritična micelarna koncentracija (KMK = 0,0085%) mešanog emulgatora APG tipa - hidrosistearil alkohol i hidrosistearil glukozid, koja nije bila dostupna u literaturi.

II faza eksperimentalnog rada

5. Intaktni MĆAR-liposomi su uočeni blizu prelamanja na ivici uljanih kapi ("*onion rings*") u kontinualnoj fazi formulisanih kremova, čime je pokazano da se hidrosistearil alkohol i hidrosistearil glukozid u koncentraciji od 5% (m/m), može opisati kao kompatibilan sa 0,4 i 1% (m/m) liposoma u koje je inkapsuliran ekstrakt matičnih ćelija alpske ruže.

6. U emulzionim sistemima stabilisanim lamelarnom fazom koju grade mešani emulgatori tipa APG, kakav je ispitivani emulgator, liposomi su verovatno imobilisani unutar mreže lamelarne faze i na taj način mehanički stabilizovani, čime je ograničena njihova međusobna interakcija, kao i agregacija i fuzija.

7. Sa ispitivanim mešanim emulgatorom (HSA i HSG) moguće je formulisati stabilan emulzioni nosač sa estetski prihvatljivim osobinama za kozmetički aktivnu supstancu - matične ćelije alpske ruže inkapsulirane u liposome koje ostaju unutar dvoslojne membrane; nastali krem je stabilisan lamelarnom fazom, što je potvrđeno polarizacionom mikroskopijom, a ugrađeni liposomi su mehanički stabilizovani unutar lamelarne faze.

8. Liposomi sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže utiču na reološko ponašanje emulzionih nosača stabilisanih lamelarnom fazom - dovode do povećanja prividnog viskoziteta i ugušćivanja ovih kremova, kao i određenih promena u koloidnoj strukturi i pomeranja vode unutar sistema na račun interlamelarno vezane vode; navedene promene zavise od koncentracije MČAR-liposoma i izraženije su pri dodatku veće koncentracije liposoma (1% (m/m)).

9. Ispitivani emulgator HSA i HSG u koncentraciji do 5% (m/m) može se koristiti za izradu kremova sa matičnim ćelijama alpske ruže inkapsuliranim u liposome, ali je potrebno pažljivo odabrati koncentraciju liposoma sa ovom KAS, da ne bi došlo do promena u koloidnoj strukturi krema i ispoljavanja nestabilnosti sistema.

III faza eksperimentalnog rada

10. Pokazano je da generalni faktorijalni eksperimentalni dizajn može da pruži značajne informacije o teksturnim, reološkim i senzornim atributima bitnim za proces reformulacije kozmetičkih emulzija sa HSA i HSG, naročito ukoliko se menja više faktora istovremeno (npr. sastojak/ci, njihova koncentracija, postupak izrade).

11. Dodatak 0,4% (m/m) MČAR-liposoma ispitivanom emulzionom nosaču, ima uticaj na sve praćene parametre teksture – konzistenciju, indeks viskoziteta, čvrstinu i kohezivnost i dovodi do smanjenja vrednosti ovih parametara, kao i pojedinih oscilatornih reoloških parametara (elastični i viskozni modul), ali istovremeno dovodi do rasta minimalnog i maksimalnog prividnog viskoziteta i veličine uljanih kapi u ispitivanim kozmetičkim emulzijama.

12. Dodatak emolijensa (skvalena maslinovog ulja) ima uticaja na sve praćene teksturne i reološke parametre, kao i na veličinu kapi masne faze, u zavisnosti od koncentracije (1 i 6% m/m); uticaj na praćene parametre više je izražen kod uzoraka sa 6% (m/m) skvalena.

13. Promena u postupku izrade ispitivanih uzoraka emulzija - korišćenje rotor-stator homogenizatora umesto propelerske mešalice tokom faze emulgovanja, dovela je do povećanja čvrstine i maksimalnog prividnog viskoziteta uzoraka, ali i do opadanja vrednosti minimalnog prividnog viskoziteta, histerezne površine, svih praćenih parametara oscilatorne reologije (elastični i viskozni modul i njihov odnos), kao i veličine kapi uljane faze.

14. Dodatak 0,4 % (m/m) MČAR-liposoma, skvalena (1% i 6% (m/m)), kao i promena uređaja u fazi emulgovanja uzoraka, imale su uticaj na senzorne osobine emulzija (tekstura, čvrstina, razmazivost, rasprostiranje i konzistencija).

15. Generalni faktorijalni eksperimentalni dizajn, definisanjem karakteristika sistema u zavisnosti od njegovog sastava (vrsta i koncentracija upotrebljenih sastojaka) ili procesa izrade, pruža mogućnost pripreme velikog broja različitih proizvoda unapređenih osobina, u značajno kraćem vremenskom periodu u odnosu na klasičan proces reformulacije kozmetičkih emulzija, pa bi mogao da bude prvi korak koji štedi vreme i novac, odnosno alat za unapređenje i optimizaciju kozmetičkih proizvoda, prema zahtevima/željama korisnika.

16. Dobijeni rezultati takođe upućuju da je u postupku reformulacije kozmetičkog proizvoda poželjno koristiti i reološka i teksturna merenja istovremeno, kako bi se dobile što preciznije informacije i uspostavili što optimalniji uslovi za dobijanje kremova sa prihvatljivim senzornim karakteristikama, koje zahtevaju korisnici.

17. Utvrđeni pristup, kombinovan primenom generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna i instrumentalnih metoda – teksturne analize i reoloških merenja, pokazao se dovoljno osetljivim i može se koristiti umesto određenih senzornih testova, koji se vrše u postupku reformulacije kozmetičkih proizvoda, kao što su (npr.) diskriminativni senzorni testovi.

IV faza eksperimentalnog rada

18. Ispitivane kozmetičke emulzije, izrađene sa novijim prirodnim mešanim emulgatorom APG tipa - HSA i HSG, sa ili bez inkorporiranih kozmetički aktivnih sastojaka (MČAR-liposomi i skvalen) pokazale su zadovoljavajući bezbednosni profil u smislu odsustva eritema (crvenila) kao i znakova bilo kakvog narušavanja barijerne funkcije kože tokom studije pod okluzijom u trajanju od dvadeset četiri časa.

19. Nakon dugoročne primene na zdravoj koži u trajanju od 21 dana, ovi liposomski kremovi dovode do povećanja hidracije površinskog sloja kože, bez negativnog uticaja na barijernu funkciju kože; tako se mešani emulgator HSA i HSG, upotrebljen u ispitivanim formulisanim i reformulisanim kozmetičkim emulzijama za negu kože, zajedno sa skvalenom maslinovog ulja (emolijens) i liposomima sa biljnim matičnim ćelijama alpske ruže, mogu smatrati odgovarajućim sastojcima kreмова za vlaženje površine zdrave kože.

20. Pokazano je da efektu hidracije površine kože doprinose i koloidna struktura emulzionog nosača - konkretno lamelarna faza (tečno-kristalna ili kristalna gel faza), koju obrazuje mešani APG emulgator, ali i skvalen kao emolijens u sastavu kapi masne faze u strukturi krema, za koga je polarizacionom mikroskopijom utvrđeno da, kao nepolarno ulje, utiče na fazno ponašanje upotrebljenog emulgatora, preciznije na obrazovanje lamelarne faze oko kapi masne faze krema i njenu vidljivost pod polarizacionim mikroskopom; uticaj skvalena na koloidnu strukturu krema zavisi od upotrebljene koncentracije (1 i 6% (m/m)) i više je izražen kod uzoraka sa 6% (m/m) skvalena.

21. Utvrđeno je da, osim emulzionog nosača sa HSA i HSG kao "praznog" krema, MČAR-liposomi i skvalen maslinovog ulja imaju pozitivan uticaj na suhu i iritiranu kožu i popravljaju/obnavljaju stanje barijerne funkcije kože, koja je izmenjena pod uticajem 10% (m/m) vodenog rastvor NaLS koji je poznat kao iritans.

22. Na osnovu rezultata sprovedenih studija može se prihvatiti da je prirodni mešani alkil poliglukozidni emulgator - hidrosistearil alkohol i hidrosistearil glukozid u koncentraciji do 5% (m/m), odgovarajući stabilizator kozmetičkih emulzija sa biljnim matičnim ćelijama inkapsuliranim u liposome, sa kojim je moguće formulisati stabilne kremove sa estetski prihvatljivim osobinama za negu zdrave, ali i suve i iritirane kože,

koji dovodi do nastajanja specifične koloidne strukture u kremu i zadržavanja liposomskih vezikula u izvornom stanju.

6. LITERATURA

- Abe M, editor. Mixed surfactant systems, Second Edition CRC Press, New York; 2004.
- Adamović J. Fosfolipidi u kozmetičkim proizvodima: osobine i primena. Specijalistički rad, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, 2016.
- Akhtar N, Shamshad Malik N, Khan A, Gulfishan H, Khan MS. Lactic acid cream: a novel approach to study the effects on skin aging of healthy human volunteers. SOFW. 2014; 140: 40-50.
- Almeida IF, Gaio AR, Bahia MF. Hedonic and descriptive skinfeel analysis of two oleogels: Comparison with other topical formulations. J Sens Stud. 2008; 23(1): 92-113.
- Amedeo Brasca, Italija, Katalog - Olifeel® SQ, 2011 (Dostupno sa <http://abpersonalcare.com/product-lines/olifeel-line/>, pristupljeno 7.6.2017.).
- Aparajita VA, Ravikumar PA. Liposomes as carriers in skin ageing. Int J Curr Pharm Res. 2014; 6(3): 1-7.
- Arsić I. Uticaj inkapsulacije standardizovanih ekstrakata cvasti kamilice *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. (Asteracea) na stabilnost i antiinflamatornu aktivnost preparata za lokalnu primenu. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, 2005.
- Arsić I, Žugić A, Tadić V, Tasić-Kostov M, Mišić D, Primorac M, Runjaić-Antić D. Estimation of Dermatological Application of Creams with St. John's Wort Oil Extracts. Molecules. 2011; 17(12): 275–94.
- Baghaei M, Nateghi MR, Ehsani AH, Zolfaghari HR. The effect of Alpine Rose plant stem cell plus Magnolia extract on skin irritation following skin laser procedures. SOFW J 2013; 139(7): 54–6.
- Barbulova A, Apone F, Colucci G. Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients. Cosmetics. 2014; 1(2): 94-104.
- Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. Clin Dermatol. 2012; 30(3): 257-62.

Berardesca E, Maibach HI. Transepidermal water loss and skin surface hydration in the non invasive assessment of stratum corneum function. *Dermatosen in Beruf und Umwelt. Occupation and Environment* 1990; 38(2): 50-53.

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

Berry N, Charmeil C, Goujon C, Silvy A, Girard P, Corcuff P, et al. A clinical, biometrological and ultrastructural study of xerotic skin. *Int J Cosmet Sci* 1999; 21(4): 241–52.

Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, McNeil SE, Wilkhu J, Lattmann E, Christensen D, Mohammed AR, Perrie Y. Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. *Int J Pharm.* 2011; 417(1): 138-50.

Biolin Scientific, Švedska, Katalog – Critical micelle concentration, 2016 (Dostupno sa <http://www.biolinscientific.com/application/critical-micelle-concentration-measurement/>, pristupljeno 7.6.2017.)

Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10(1): 975-99.

Buraczewska-Norin I. Skin barrier responses to moisturizers: functional and biochemical changes. In: Lodén M, Maibach H, editors. *Treatment of dry skin syndrome.* Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2012. pp. 525-544.

CIR, Izveštaj - Final Safety Assessment Decyl Glucoside and Other Alkyl Glucosides as Used in Cosmetics, 2011 (Dostupno sa <http://www.cir-safety.org/sites/default/files/decylg122011FRx.pdf>, pristupljeno 7.6.2017.)

Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel AO. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter®, the DermaSpectrometer® and the Mexameter®. *Skin Res Tehnol.* 2000; 6(4): 230-8.

Clarys P, Clijssen R, Taeymans J, Barel AO. Hydration measurements of the stratum corneum: comparison between the capacitance method (digital version of the Corneometer CM 825® and the impedance method (Skicon-200EX®). *Skin Res Tehnol.* 2011; 0: 1-8.

Constantin MM, Poenaru E, Poenaru C, Constantin T. Skin hydration assessment through modern non-invasive bioengineering technologies. *Maedica*. 2014; 9(1): 33-38.

Cosmetics Directive 76/768/EEC (1976), 93/35/EEC (1993), 95/17/EEC (1995), 2003/15/EC, 2006/65/EC.

Dahl MV. Stem cells and skin. *J Cosmet Dermatol*. 2012; 11: 297-306.

Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, Fluhr JW. Non-invasive *in vivo* methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009; 72(2): 295-303.

Demus D, Goodby J, Spiess GW, Vill HW: *Handbook of Liquid Crystals*, Vol. 3, Wiley-VCH, Weinheim, 1998.

Dobrev H. Cutometer®, in Berardesca et al. (eds.), *Non Invasive Diagnostic Techniques in Clinical Dermatology*, Springer Berlin Heidelberg, 2014; pp. 315-338.

Duracher L, Visdal-Johnsen L, Mavon A, AB OC. A Novel Explant Model for Skin Delivery Assessment. *Cosm. Toil*. 2015; 130(2): 30-40.

Đorđević SM, Radulović TS, Cekić ND, Randelović DV, Savić MM, Krajišnik DR, Milić JR, Savić SD. Experimental design in formulation of diazepam nanoemulsions: physicochemical and pharmacokinetic performances. *J Pharm Sci*. 2013; 102(11): 4159-72.

Dynamics of Surfactant Self-Assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles, and Lyotropic Phases, In: R. Zana, Ed., *Surfactant Science Series*, CRC Press LLC, Florida, 2005.

Elnaggar YSR, El-Refaie WM, El-Massik MA, Abdallah OY. Lecithin-based nanostructured gels for skin delivery: An update on state of art and recent applications. *J Control Release*. 2014; 180: 10-24.

Estanquero M, Amaral MH, Sousa Lobo JM. Comparison between sensory and instrumental characterization of topical formulations: impact of thickening agents. *Int J Cosmetic Sci*. 2016; 38: 389–398.

Florence AT, Attwood D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*, 4th ed. Pharmaceutical Press, London, 2006.

Fluhr JW, Darlenski R. Transepidermal Water Loss (TEWL), in Berardesca et al. (eds.), *Non Invasive Diagnostic Techniques in Clinical Dermatology*, Springer Berlin Heidelberg, 2014; pp. 353-356.

Fluhr JW, Kuss O, Diepgen T, Lazzerini S, Pelosi A, Gloor M, Berardesca E. Testing for irritation with a multifactorial approach: comparison of eight non-invasive measuring techniques on five different irritation types. *Brit J Dermatol*. 2001; 145(5): 696-703.

Fluhr JW, Lazzerini S, Distante F, Gloor M, Berardesca E. Effects of prolonged occlusion on stratum corneum barrier function and water holding capacity. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 1999; 12(4): 193–8.

Friebe K, Effendy I, Löffler H. Effects of skin occlusion in patch testing with sodium lauryl sulphate. *Br J Dermatol*. 2003; 148(1): 65–9.

Fullerton A, Fischer T, Lahti A, Wilhelm KP, Takiwaki H, Serup J. Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Derm*. 1996; 35(1): 1–10.

Garg T, Goyal K.A. Liposomes: targeted and controlled delivery system. *Drug delivery letters*. 2014; 4(1): 62-71.

Gilbert L, Loisel V, Savary G, Grisel M, Picard C. Stretching properties of xanthan, carob, modified guar and celluloses in cosmetic emulsions. *Carbohydr Polym*. 2013a; 93: 644–650.

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 and Surfaces A*. 2013b; 421: 150-63.

Gilbert L, Savary G, Grisel M, Picard C. Predicting sensory texture properties of cosmetic emulsions by physical measurements. *Chemometr Intell Lab*. 2013c; 124: 21-31.

Hierrezuelo JM, Aguiar J, Ruiz CC. Micellar properties of a mixed surfactant system constituted by n-octyl- β -D-thioglucopyranoside and sodium dodecyl sulphate. *Colloids and Surfaces A*. 2005; 264(1): 29-36.

Himanshi S, Mahesh KK, Ajay B, Prabhjot K, Saroj B. Liposome: An art for drug delivery. *IJPSL* 2015; 5: 523-530.

Holmberg K. Natural surfactants. *Curr Opin Colloid In* 2001; 6: 148-159.

Huang Z, Lin Y, Fang J. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules* 2009; 14(1): 540–54.

Huang, Z., Lin, Y., Fang, J. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*. 2009; 14(1): 540–54.

IRB, Italija, Katalog - Plant Cell Culture HTN™ Technology for High Quality & Sustainable Ingredients, 2014 (Dostupno sa <https://bei.jcu.cz/Bioeconomy%20folders/presentations/ifib-2014/plant-cell-culture-htntm-technology-for-high-quality-sustainable-ingredients>, pristupljeno 7.6.2017.)

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

Korać R, Krajišnik D, Milić J. Sensory and instrumental characterization of fast inverting oil-in-water emulsions for cosmetic application. *Int J Cosmet Sci*. 2016; 38(3): 246-256.

Korhonen, M, Hellen, L, Hirvonen, J. and Yliruusi, J.: Rheological properties of creams with four different surfactant combinations – effect of storage time and conditions. *Int J Pharm*. 2001; 221: 187–196.

Korhonen, M, Niskanen, H, Kiesvaara, J. and Yliruusi, J.: Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements, *Int J Pharm*. 2000; 197: 143–151.

Krüss, Nemačka, Katalog - Force Tensiometer – K20, 2016 (Dostupno sa https://www.kruss.de/fileadmin/user_upload/website/brochures/kruss-bro-k20-en.pdf, pristupljeno 7.6.2017.)

Külkamp-Guerreiro IC, Berlitz SJ, Contri RV, Alves LR, Henrique EG, Barreiros VRM, Guterres SS. Influence of nanoencapsulation on the sensory properties of cosmetic formulations containing lipoic acid. *Int J Cosmet Sci*. 2013; 35(1): 105-111.

Kulkarni VS. Liposomes in personal care products, in Rosen, M.R. (Ed.), *Delivery system handbook for personal care and cosmetic products: Technology, applications and formulations*, William Andrew Inc, New York, 2005.

Kulkarni PK, Yadav JD, Vaidya KA.: Liposomes: A novel drug delivery system, *Int J Curr Pharm Res.* 2011; 3(2): 10–18.

Lalević-Vasić B. i sar. *Dermatovenerologija sa propedeutikom*, VI izdanje. Beograd: Savremena administracija, 2010.

Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. *J Colloid Sci Biotechnol.* 2012; 1(2): 147-68.

Li D, Wu Z, Martini N, Wen J. Advanced carrier systems in cosmetics and cosmeceuticals: a review. *J Cosmet Sci.* 2011; 62(6): 549-63.

Lichtenberg D, Ahyayauch H, Gon FM.: The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers. *Biophys J.* 2013; 105: 289–299.

Lodén M. Effect of moisturizers on epidermal barrier function. *Clin Dermatol* 2012; 30: 286–296.

Lodén M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *Am J Clin Dermatol.* 2003; 4(11): 771-788.

López O, Cócera M, Coderch L, Parra JL, Maza ADL. Dodecyl maltoside as a solubilizing agent of stratum corneum lipid liposomes. *Colloid Polym. Sci.* 2002; 280: 352–357.

López O, Cocera, M, Parra, J.L, Maza, ADL. Influence of the alkyl chain length of alkyl glucosides on their ability to solubilize phosphatidylcholine liposomes. *Colloid Surface A.* 2001a; 193: 221–229.

López, O, Cócera, M, Parra, JL, Maza, ADL. Influence of the hydrophobic tail of alkyl polyglucosides on their ability to solubilize stratum corneum lipid liposomes. *Colloid. Polymer. Sci.* 2001b; 279: 909-915.

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

- Lukic, M, Jaksic, I, Krstonosic, V, Cekic, N, Savic, S. A combined approach in characterization of an effective w/o hand cream: the influence of emollient on textural, sensorial and *in vivo* skin performance. *Int J Cosmetic Sci.* 2012; 34: 140-149.
- Lukic, M, Jaksic, I, Krstonosic, V, Dokic, L. and Savic, S. Effect of small change in oil phase composition on rheological and textural properties of w/o emulsion. *J Texture Stud.* 2013a; 44(1): 34–44.
- Lukic, M, Pantelic, I, Daniels, R, Müller-Goymann, C, Savic, M, Savic, S. Moisturizing emulsion systems based on the novel long-chain alkyl polyglucoside emulsifier. *J Therm Anal Calorim.* 2013b; 11 (3): 2045-2057.
- Markovic Bogdanovic D, Tasic-Kostov M, Lukic M, Isailovic T, Krstonosic V, Daniels R, Savic, S. Physicochemical characterization and *in vivo* skin performance of a novel alkyl polyglucoside emulsifier in natural cosmetic cream-bases. *Tenside Surfact Det.* 2014; 51(2): 133-145.
- Marti-Mestres G, Nielloud F, editors. *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions.* Marcel Dekker, New York; 2000.
- Maza ADL, Parra JL. Solubilizing effects caused by the nonionic surfactant octyl glucoside in phosphatidylcholine liposomes. *J Am Oil Chem Soc.* 1996; 73: 877–883.
- Maza ADL, Parra JL. Solubilizing effects caused by the nonionic surfactant dodecylmaltoside in phosphatidylcholine liposomes. *Biophys J.* 1997; 72: 1668-1675.
- Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm.* 2012; 435(1): 3– 9.
- Mibelle Biochemistry, Švajcarska, Katalog - PhytoCellTec™ Alp Rose, Charges skin stem cell resistance, 2010 (Dostupno sa <https://mibellebiochemistry.com/products/phytocelltec-alp-rose/>, pristupljeno 7.6.2017.)
- Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J. R Soc Interface.* 2014; 11(101): 20140459.
- Moravkova T, Filip P. Relation between sensory analysis and rheology of body lotions. *Int J Cosmetic Sci.* 2016; 38(6): 558-566.
- Moravkova T, Filip P. The influence of stabilizers on the rheological and sensory properties of cosmetic lotions. *Acta Polytech Hung.* 2014; 11(6): 173–186.

Moravkova T, Stern P. Rheological and textural properties of cosmetic emulsions. *Appl Rheol.* 2011; 21(3): 35200-35206

Müller-Goymann CC. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 58(2): 343-56.

Nemeth Z, Halasz L, Palinkas J, Bota A, Horanyi T. Rheological behaviour of a lamellar liquid crystalline surfactant-water system, *Colloid Surface A.* 1998; 145: 107–119.

Omray LK. Liquid crystals as novel vesicular delivery system: a review. *Curr Trends Tech Sci.* 2013; 2: 347-53.

Parente M, Gambaro A, Ares G. Sensory characterization of emollients. *J Sens Stud.* 2008; 23: 149–161.

Patel N, Panda S. Liposome drug delivery system: a critic review. *JPSBR* 2012; 2: 169-175.

Patist A, Bhagwat SS, Penfield KW, Aikens P, Shah DO. On the measurement of critical micelle concentrations of pure and technical-grade nonionic surfactants, *J Surfactants Det.* 2000; 3(1): 53–58.

Piérard GE, Paquet P, Preudhomme L, Noël F, Quatresooz P. Skin bioengineering. *Kanerva's Occupational Dermatology.* 2012: 991-1001.

Pierre MBR, Costa ISM. Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications. *Arc. Dermatol Res.* 2011; 303: 607–621.

Pinnagoda J, Tupker RA, Agner T, Serup J. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Derm.* 1990; 22(3): 164–78.

Plessis JD, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou T, et al. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. Transepidermal water loss and skin hydration. *Skin Res Tech.* 2013; 19(3): 265–78.

Pradhan B, Kumar N, Saha S, Roy A. Liposome: method of preparation, advantages, evaluation and its application. *JOAPR.* 2016; 3(3): 1-8.

- Prhal J, Milić J, Krajišnik D, Vuleta G. Karakteristike i primena biljnih matičnih ćelija u kozmetičkim proizvodima. *Arh farm.* 2014; 64: 26-37.
- Rahimpour Y, Hamishehkar H. Liposomes in cosmeceutics. *Expert Opin Drug Deliv.* 2012; 9: 443-455.
- Ramsing DW, Agner T. Effect of glove occlusion on human skin. (I). short-term experimental exposure. *Contact Derm.* 1996; 34(1): 1–5.
- Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the council of 30 november 2009 on cosmetic products. *Official Journal of the European Union*, L 342/59
- Ribosa I, Sanchez-Leal J, Comelles F, Garcia MT. Solubilization of large unilamellar liposomes by alkyl glycosides. *J Colloid Interf Sci.* 1997; 187: 443–446.
- Rogiers V. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14(2): 117–28.
- Romsted, LS. *Surfactant Science and Technology: Retrospects and Prospects*, CRC Press LLC, Florida, 2014.
- Rosen MJ. *Surfactants and interfacial phenomena*, Third ed., John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey, 2004.
- Rosen MR. *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products: Technology, Applications and Formulations*, William Andrew Inc, 2005.
- Roso A, Clemenceau F, Guilbot J, Kerverdo S. Simulgreen™ 18-2: a New Green Based O/W Emulsifying Structure for Concentrated Performances. *Cosm Sci Techn.* 2012: 1–5.
- Ryan TP, Morgan JP. Modern experimental design. *Journal of Statistical Theory and Practice.* 2007; 1(3-4): 501-6.
- Ryu HS, Joo YH, Kim SO, Park KC, Youn SW. Influence of age and regional differences on skin elasticity as measured by the Cutometer®. *Skin Res Tech* 2008; 14: 354–358.
- Savic S, Tamburic S, Savic M, Cekic N, Milic J, Vuleta G. Vehicle controlled effect of urea on normal and SLS-irritated skin. *Int J Pharm* 2004; 271(1–2): 269–80.

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

Savic S, Lukic M, Jaksic I, Reichl S, Tamburic S, Müller-Goymann C. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: the influence of colloidal structure on emulsion hydration potential. *J Colloid Interf Sci.* 2011; 358: 182-191.

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

Schmid D, Schürch C, Blum P, Belser E, Züllli F. Plant stem cell extract for longevity of skin and hair. *SOFW Journal.* 2008; 5.

Schürch C, Blum P, Züllli F. Potential of plant cells in culture for cosmetic application. *Phytochem Rev.* 2008; 7: 599–605.

Serge JA. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest.* 2006; 116(5): 1150-1158.

Silva CL, Topgaard D, Kocherbitov V, Sousa JJ, Pais AA, Sparr E. Stratum corneum hydration: phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.* 2007; 1768(11): 2647-59.

Skotnicka-Graca UR. Plant stem cells as innovation in cosmetics. *Acta Pol Pharm.* 2014; 71(5): 701.

Sotoodian B, Maibach HI. Noninvasive test methods for epidermal barrier function. *Clin Dermatol.* 2012; 30(3): 301-10.

Surfactants in Tribology, Volume 3. Eds Biresaw G. and Mittal K., CRC Press LLC, Florida, 2013.

Swami H, Kataria MK, Bilandi A, Kour P, Bala S. Liposome: An art for drug delivery. *IJPSL* 2015; 5(2): 523-530.

Szczesniak AS. Texture is a sensory property. *Food Qual Prefer.* 2002; 13: 215–225.

- Tadros, F. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004; 227–258.
- Tadros TF. *Emulsion science and technology: a general introduction.* Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA: Weinheim; 2009.
- Tadros TF, editor. *Emulsion formation and stability.* John Wiley & Sons; 2013.
- Tai A, Bianchini R, Jachowicz J. Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. *Int J Cosmetic Sci.* 2014; 36(4): 291–304.
- Tasic-Kostov MZ, Reichl S, Lukic MZ, Jaksic IN, Savic SD. Does lactobionic acid affect the colloidal structure and skin moisturizing potential of the alkyl polyglucoside-based emulsion systems? *Pharmazie.* 2011; 66: 862–870.
- Tasić-Kostov Marija Ž. *Dermokozmetičke emulzije sa lamelarnom tečno-kristalnom fazom kao nosač za laktobionsku kiselinu - ispitivanje koloidne strukture, efikasnosti i bezbednosti.* Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, 2013.
- Trapp M. Is there room for improvement in the emollients for adjuvant therapy? *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007; 21(s2): 14–18.
- Tupker RA, Willis C, Berardesca E, Lee CH, Fartasch M, Agner T, et al. Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Derm.* 1997; 37(2): 53–69.
- Vanić Ž. Liposomes as drug carriers: Structure properties and classification. *Farmaceutski glasnik: glasilo Hrvatskog farmaceutskog društva.* 2012; 68: 391-400.
- Vishvakrama P, Sharma S. Liposomes: an overview. *J Drug Deliv Ther.* 2014, 47-55.
- Vuleta G, Milić J, Primorac M, Savić S. *Farmaceutska tehnologija I.* Farmaceutski fakultet - Univerzitet u Beogradu, 2012.
- Wołosik K, Knaś M, Zalewska A, Niczyporuk M, Przystupa AW. The importance and perspective of plant-based squalene in cosmetology. *J Cosmet Sci.* 2013; 64(1): 59–66.
- Zhai H, Maibach HI. Occlusion vs. skin barrier function. *Skin Res Tech* 2002; 8(1): 1–6.

Zhao Q, Zhao M, Yang B, Cui C. Effect of xanthan gum on the physical properties and textural characteristics of whipped cream. *Food Chem.* 2009; 116: 624–628.

7. PRILOZI

7.1. Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Radovi u istaknutom međunarodnom časopisu - M22:

M. Filipovic, M. Lukic, S. Djordjevic, V. Krstonosic, I. Pantelic, G. Vuleta and S. Savic. Towards satisfying performance of an O/W cosmetic emulsion: screening of reformulation factors on textural and rheological properties using general experimental design. Int J Cosmetic Sci. DOI: 10.1111/ics.12402

Radovi u međunarodnom časopisu - M23:

Filipović, M., Lukić, M., Krstonošić, V, Đorđević, S., Pantelić, I., Gledović, A., Vuleta, G. and Savić, S. 2016. Feasibility of a natural surfactant as a stabilizer for cosmetics with liposome-encapsulated plant stem cells: pre-formulation and formulation through stability studies. Tenside Surf Det. 53(3): 214-226. doi: 10.3139/113.110426

Filipović M, Gledović A, Lukić M, Tasić-Kostov M, Isailović T, Pantelić I, Vuleta G, Savić S. Alp Rose stem cells, olive oil squalene and a natural alkyl polyglucoside emulsifier: Are they appropriate ingredients of skin moisturizers-*in vivo* efficacy on normal and sodium lauryl sulfate-irritated skin? Vojnosanitetski pregled. 2016; 73(11): 991-1002. doi: 10.2298/VSP150116122F

Predavanja po pozivu sa međunarodnog skupa štampano u izvodu – M32:

Mila Filipović, Milica Lukić, Sanela Đorđević, Gordana Vuleta, Snežana Savić. A novel natural mixed emulsifier of alkyl polyglucoside type as liposome and skin-friendly cosmetic ingredient. Macedonian pharmaceutical bulletin, 62 (suppl) 353-354 (2016)

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu – M34:

Filipović M, Lukić M, Đorđević S, Vuleta G, Savić S. Towards Cosmetic Product of Satisfying Performance: Reformulation Using General Factorial Experimental Design with Replicates. 15th Annual Meeting of Skin Forum, 21-22 June 2016, London; P6

Saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu - M64:

Filipović M, Lukić M, Đorđević S, Vuleta G, Savić S. Screening of reformulation factors impact on creams textural characteristics: application of experimental design; Arhiv za farmaciju 2016; 66: 210-211.

7.2. Biografija autora

Mila Filipović rođena je 08.10.1983. godine u Beogradu. Osnovnu školu i VI beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu. Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je školske 2002/2003. godine; diplomirala je marta 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,65 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Doktorske akademske studije iz Kozmetologije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisala je 2010/11. godine.

U toku 2010/2011 obavlja stručni staž u apoteci „Đuro Đaković“ u Beogradu, nakon čega polaže struči ispit.

Tokom 2011. godine bila je povremeno zaposlena kao saradnik u izvođenju praktične nastave u Visokoj zdravstvenoj školi strukovnih studija u Beogradu.

Od 2012. godine radi u Visokoj zdravstvenoj školi strukovnih studija u Beogradu u zvanju nastavnika praktične nastave.

7.3. Izjava o autorstvu

Potpisana: Mila Filipović

Broj indeksa: 11/10

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Kozmetičke emulzije na bazi prirodnog alkil poliglukoziidnog emulgatora sa liposom-inkapsuliranim biljnim matičnim ćelijama: proučavanje fenomena na granici faza i biofizička merenja na koži

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 9.6.2017. godine

Mila Filipović

7.4. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora: Mila Filipović

Broj indeksa: 11/10

Studijski program: Doktorske akademske studije iz Kozmetologije

Naslov rada: Kozmetičke emulzije na bazi prirodnog alkil poliglukozidnog emulgatora sa liposom-inkapsuliranim biljnim matičnim ćelijama: proučavanje fenomena na granici faza i biofizička merenja na koži

Mentor: prof. dr Snežana Savić

Potpisana: Mila Filipović

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 9.6.2017. godine

Mila Filipović

7.5. Izjava o korišćenju

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

Kozmetičke emulzije na bazi prirodnog alkil poliglukozidnog emulgatora sa liposom-inkapsuliranim biljnim matičnim ćelijama: proučavanje fenomena na granici faza i biofizička merenja na koži

koje je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- ③ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, 9.6.2017. godine

Muna Franjović
