

Универзитет у Београду
Фармацеутски факултет

Марија Ж. Тасић-Костов

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Дермокозметичке емулзије са
ламеларном течно-кристалном фазом
као носач за лактобионску киселину –
испитивање колоидне структуре,
ефикасности и безбедности

Београд, 2013.

Универзитет у Београду
Фармацеутски факултет



Марија Ж. Тасић-Костов

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Дермокозметичке емулзије са
ламеларном течно-кристалном фазом
као носач за лактобионску киселину –
испитивање колоидне структуре,
ефикасности и безбедности

Београд, 2013.

University of Belgrade
Faculty of Pharmacy



Marija Ž. Tasić-Kostov

DOCTORAL DISSERTATION

**Dermocosmetic emulsions stabilized with
lamellar liquid-crystalline phase as a
vehicle for lactobionic acid – colloidal
structure, efficacy and safety assessments**

Belgrade, 2013.

Докторска дисертација је урађена на Катедри за фармацеутску технологију и козметологију Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета; део рада урађен је на Институту за биомедицинска истраживања Универзитета у Нишу – Медицинског факултета

Ментор

Др Снежана Савић, ванредни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Чланови комисије

1. _____
Др Гордана Вулета, редовни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

2. _____
Др Ивана Арсић, ванредни професор,
Универзитет у Нишу – Медицински факултет

3. _____
Др Соња Весић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Медицински факултет

4. _____
Др Небојша Цекић, доцент,
Универзитет у Нишу – Технолошки факултет

Датум одбране _____

Захвалница

Огромну захвалност дугујем свом ментору, др Снежани Савић која је стрпљиво и професионално усмеравала мој рад на овој докторској дисертацији од његовог почетка, преносећи ми своје знање, искуство и указујући истовремено на прави пут у професионалном развоју, на чему сам јој нарочито захвална.

Др Гордани Вулета захваљујем се на великој стручној помоћи, корисним саветима и сарадњи приликом израде ове докторске дисертације.

Захваљујем се др Ивани Арсић на разумевању, корисним сугестијама и пријатељским саветима у бројним тренуцима када је то било потребно.

Др Соњи Весић и др Небојши Цекићу захваљујем се на помоћи при оцени ове дисертације као и на учешћу у Комисији.

Захваљујем се својој куми, др Драгани Павловић на дугогодишњој пријатељској подршци и стручној помоћи при реализацији експеримента и тумачењу резултата одређивања антиоксидантне активности у оквиру ове дисертације.

Др Војину Савићу захваљујем се на изузетној предусретљивости и техничкој помоћи пруженој при карактеризацији система употребом поларизационе микроскопије, изведеној на Институту за биомедицинска истраживања Универзитета у Нишу – Медицинског факултета. Такође, продекану Медицинског факултета у Нишу др Горану Николићу захваљујем се на подстреку, разумевању и подршци током свих година рада на овој дисертацији.

Компанији GlobalCalcium, India захваљујем се на бројним донацијама у виду узорака активне супстанце као и на помоћи у одређивању садржаја активне супстанце.

Захваљујем својим родитељима, Животи и Олги и сестри Радмили на разумевању, подстреку и несебичној подршци увек када је то било потребно. Такође, сестри се захваљујем за техничку помоћ у току израде овог рада.

Посебну захвалност дугујем свом супругу Михаелу и кћерки Маши на огромном стрпљењу, разумевању и љубави коју су ми пружили током свих ових година.

Дермокозметичке емулзије са ламеларном течном-кристалном фазом
као носач за лактобионску киселину – испитивање колоидне
структуре, ефикасности и безбедности

САЖЕТАК

Увод Алфа-хидрокси киселине (енг. *alphahydroxyacids*, АНАs) представљају групу активних супстанци у препаратима на граници козметички производ – дерматолошки лек, тзв. дермокозметичким производима/козметоцеутицима. Поред доказане ефикасности и мултифункционалности, АНАs показују неповољан безбедносни профил на кожи, нарочито уколико су инкорпориране у неадекватне носаче. Тврди се да је представник новије генерације АНАs, првенствено лактобионска киселина (ЛК), безбеднија за примену на кожи. Савремена козметологија тежи формулацији ефикасних, нешкодљивих, естетски и еколошки прихватљивих производа. Фокус је посебно на природним сурфактантима као помоћним састојцима емулзионих носача, нарочито на шећерним ПАМ – алкил полиглукозидима (АПГ). Нема података о компатибилности ЛК и АПГ; информације о ефикасности и безбедности ЛК у емулзијама стабилисаним АПГ мешаним емулгаторима (сличним реалним дермокозметичким/ дермофармацеутским системима) оскудне су и нису добијене у складу са релевантним захтевима актуелних законских смерница – Уредбе ЕУ 1223/2009 о козметичким производима.

Циљ истраживања Циљ истраживања ове докторске дисертације био је: 1) формулација физички стабилних мултикомпонентних емулзија стабилисаних АПГ мешаним емулгаторима различитих дужина алкил ланаца, са и без ЛК; 2) процена колоидне структуре ових емулзија; 3) процена и поређење њихове безбедности и ефикасности на кожи у складу са захтевима важећих европских прописа. Тачније, свеобухватна испитивања спроведена су ради процене погодности емулзија са различитим АПГ мешаним емулгаторима да буду носачи за киселу и хигроскопну ЛК, као и ради одређивања и поређења ефикасности и безбедности 6% ЛК у односу на исту концентрацију гликолне киселине (ГК), представника старије генерације АНАs. Крајњи циљ била је свеобухватна процена погодности употребе ЛК и АПГ као алтернативних састојака дермокозметичких производа.

Методе Експериментални рад спроведен је у три фазе: 1) Ради процене физичке стабилности и колоидне структуре емулзија стабилисаних АПГ мешаним емулгаторима различитих дужина алкил ланца (са и без 6% ЛК), вршена је физичкохемијска карактеризација применом светлосне, поларизационе и трансмисионе електронске микроскопије (ТЕМ), континуалне и осцилаторне реологије, диференцијалне скенирајуће калориметрије (ДСЦ), термогравиметријске анализе (ТГА), анализе текстуре и одређивања садржаја ЛК употребом HPLC аналитичке методе. 2) Одређивање безбедности и ефикасности ЛК у носачима вршено је методама *in vitro* (тест цитотоксичности на моделу вештачке коже) и *in vivo* (мерења релевантних биофизичких параметара коже); вршено је и *in vivo* (употребом горе наведених метода) поређење ефеката и безбедности примене испитиваних емулзија са 6% ЛК са одговарајућим аспектима примене истих емулзија са 6% ГК на кожу, као и у случају различитог носача (хидрофилни гел) за ове АНАс. Антиоксидантни потенцијал ЛК *per se* и у носачима стабилисаним АПГ квантификован је 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) тестом, и одређивањем потенцијала инхибиције липидне пероксидације. 3) Такође су вршена испитивања емулзија стабилисаних различитим АПГ, са већим процентом (10%) ЛК, применом претходно наведених метода.

Резултати Испитивани АПГ мешани емулгатори (дужине алкил ланца: C12/C14, C16/C18 или C20/C22) појединачно показују способност стабилизације У/В емулзија уз различите лиотропне интеракције унутар емулзионих система, што зависи од дужине алкил ланца АПГ и присутних костабилизатора (ксантан гуме и/или C14 АПГ); у зависности од истих испитиваних фактора, ЛК након инкорпорације различито утиче на колоидну структуру различитих АПГ емулзионих носача. ЛК *per se* и у емулзијама стабилисаним АПГ показује задовољавајући антиоксидантни потенцијал. Испитивани емулзиони носачи показују повољну безбедност, док емулзије са 6% ЛК поред тога показују задовољавајућу ефикасност на кожи уз изостанак очекиваног синергизма ЛК и АПГ у хидратацији. Повећањем концентрације ЛК (на 10%) у емулзији стабилисаној одговарајућим АПГ мешаним емулгаторима задржана је ефикасност, уз повећан потенцијал за иритацију коже који је зависио и од изабраног АПГ емулгатора. Утврђено је да ЛК показује повољнији профил безбедности него ГК у истој концентрацији, без обзира на тип носача, уз сличну ефикасност.

Закључак ЛК у концентрацији од 6% и мешани емулгатори типа АПГ (дужине алкил ланца C12/C14, C16/C18 и C20/C22) могу се користити као алтернативни састојци дермокозметичких производа. Свеобухватна спроведена испитивања показују да ни 6% ЛК, нити емулзије стабилисане АПГ не поседују недостатке типичне за апликацију њихових старијих представника (што се првенствено односи на иритацију коже, која је основни недостатак примене производа са ГК). ЛК, инкорпорирана у емулзије стабилисане АПГ мешаним емулгаторима (у концентрацијама до 10%) показује на кожи мултифункционалност и ефикасност компарабилну са оном "старијих" АНАs показујући истовремено много повољнији безбедносни профил примене.

Кључне речи Лактобионска киселина, дермокозметички производи /козметоцеутици, алфа-хидрокси киселине (АНАs), алкил полиглукозидни (АПГ) мешани емулгатори, ламеларне течностно-кристалне фазе, биофизичка мерења на кожи, вештачка кожа, антиоксиданси, *in vivo/in vitro* ефикасност и безбедност дермокозметичких производа, Уредба EU 1223/2009 о козметичким производима

Научна област: Фармација

Ужа научна област: Козметологија

УДК 616.5+687.55(043.3)

Dermocosmetic emulsions, stabilized with lamellar liquid-crystalline phase as a vehicle for lactobionic acid – colloidal structure, efficacy and safety assessments

ABSTRACT

Introduction Alphahydroxyacids (AHAs) represent the class of actives in border-line topical products – cosmeceuticals/dermocosmetics. Although AHAs exhibit multiple benefits to the skin, the application of cosmeceuticals containing "old generation" AHAs representatives is often limited due to their compromising safety profile, particularly when they are incorporated into unsuitable vehicle. There is a growing need for research into new skin- and environmentally-friendly actives and surfactants in the field of cosmetics; it is claimed that "new generation" AHAs, particularly lactobionic acid (LA), could be used as safer alternatives to "old" ones, while natural alkyl polyglucoside (APG) emulsifiers are in the focus of current researches as well. There is a lack of studies, complying with the Regulation (EC) No 1223/2009, which clarify the efficacy and safety of topical application of LA *per se* or LA incorporated into APG-based emulsions.

Aim The aim of this study was to 1) formulate physically stable emulsions, similar to real pharmaceuticals/dermocosmetic vehicles, with or without LA, based on different mixed APG surfactants varying in the alkyl chain length; 2) assess the colloidal structure of the emulsions; 3) assess the main aspects of the efficacy and safety of investigated dermocosmetic APG-based emulsions containing LA, and compare them with the same aspects of APG-based emulsions containing glycolic acid (GA, old generation AHA). The appropriate tests were performed according to the requirements of the EC legislation, in order to investigate both LA and APGs as alternative cosmeceutical compounds.

Methods In the first phase, physicochemical properties and colloidal structure of the APG-based emulsions (with and without 6% LA) were assessed using continual and oscillatory rheology, polarization and transmission electron microscopy, pH and conductivity measurements, rheology, thermal (differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis), texture analysis; the LA content was determined by HPLC. In the second phase of the study *in vitro* (skin irritation test - cytotoxicity assay on reconstructed epidermis) and *in vivo* methods (biophysical methods) were employed in safety assessment. The efficacy was determined *in vivo* (biophysical methods) and *in*

vitro (as antioxidant potential using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and lipid peroxidation inhibition assays). In the third phase, physicochemical stability, safety and efficacy aspects of selected APG-based emulsions containing 10% of LA were determined using the above methods.

Results The emulsion vehicles consisted of a complex colloidal structure of different characteristics, depending on alkyl chain length of investigated APG mixed emulsifiers (C12/C14, C16/C18 or C20/C22) and costabilizers used (xantan gum and/or C14 APG); the same factors affected the obvious variations of the colloidal structure of different emulsions after addition of LA. LA *per se* and in APG-based emulsions showed satisfying antioxidant activity. Investigated APG-based vehicles demonstrated good safety profile while, beside that, emulsions with 6% LA also showed satisfying cosmeceutical efficacy with the lack of the expected synergism of skin moisturization potential between LA and APG-based emulsions. Emulsions containing 10% of LA have shown good efficacy, having increased skin irritation potential, depending on APG emulsifier used. 6% LA incorporated into different vehicles has shown better safety profile vs. 6% GA (from the same vehicles), with comparable efficacy on skin.

Conclusion Comprehensive testing showed that neither investigated APG mixed emulsifiers nor LA as cosmeceuticals' ingredients have shown the drawbacks typical of their older-generation representatives, particularly skin irritation and skin barrier impairment potential. LA in APG-based emulsions showed skin performances comparable to those of "old generation" AHAs, while displaying additional benefits-better safety profile on skin and satisfying antioxidant activity. LA (at concentrations up to 10%) could be promoted as a mild multifunctional cosmeceutical active.

Keywords lactobionic acid; cosmeceuticals; alphahydroxyacids (AHAs); alkyl polyglucoside-mixed emulsifiers; lamellar lyotropic liquid crystals; bioengineering of the skin; artificial skin; antioxidants; *in vivo/ in vitro* skin performance of dermocosmetic products; Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the Council.

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Cosmetology

UDC 616.5+687.55(043.3)

САДРЖАЈ

| | |
|--|----|
| 1. УВОД | 1 |
| 1.1. Алфа – хидрокси киселине (АНАs)..... | 1 |
| 1.1.1. АНАs као КАС - деловање и употреба | 1 |
| 1.2. Новије генерације АНАs - РНАs и АВАs као КАС | 5 |
| 1.2.1. Лактобионска киселина..... | 6 |
| 1.3. Дермокозметички производи (козметоцеутици) -дефиниција и законски статус..... | 8 |
| 1.3.1. Дермокозметички производи за влажење коже | 12 |
| 1.3.2. Дермокозметички производи – антиоксиданси | 13 |
| 1.4. Структура коже – циљног места деловања дермокозметичких производа.. | 15 |
| 1.4.1. Структура <i>stratum corneum</i> -а (SC) као баријере | 15 |
| 1.4.1.1. <i>Stratum corneum</i> (SC) као циљно место деловања дермокозметичких производа са АНАs | 17 |
| 1.4.2. Дермис као циљно место деловања дермокозметичких производа са АНАs | 18 |
| 1.4.3. рН коже – улога и значај | 19 |
| 1.5. Носачи за АНАs, РНАs и алдобионске киселине у дермокозметичким производима | 20 |
| 1.5.1. Емулзије стабилисане фазом течних кристала – структура и примена | 23 |
| 1.5.1.1. Методе за карактеризацију течних кристала..... | 25 |
| 1.6. Алкил полиглукозиди..... | 28 |
| 1.6.1. Cetearyl Glucoside&Cetearyl alcohol (INCI) | 30 |
| 1.6.2. Coco glucoside & Cetearyl alcohol (INCI) | 32 |
| 1.6.3. Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol (INCI) | 33 |
| 1.6.4. Myristyl alcohol&myristyl glucoside (INCI) | 34 |
| 1.7. Испитивања козметичких и дермокозметичких производа..... | 34 |
| 1.7.1. <i>In vivo</i> карактеризација ефеката и процена безбедности дермокозметичких производа са АНАs на кожи – биофизичке методе | 36 |
| 1.7.1.1. Методе за процену влажности коже | 36 |
| 1.7.1.2. Методе за испитивања ТЕГВ из коже..... | 38 |
| 1.7.1.3. Методе за процену боје коже | 40 |
| 1.7.1.4. Методе за процену рН коже | 41 |
| 1.7.2. <i>In vitro</i> методе процене безбедности дермокозметичких производа на кожи..... | 41 |
| 1.7.2.1. Употреба реконструисаних еквивалената хумане коже у одређивању иритационог потенцијала козметичких производа | 44 |

| | |
|---|------------|
| 2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА..... | 45 |
| 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО | 48 |
| 3.1. Материјали и методе | 48 |
| 3.1.1. Материјали | 48 |
| 3.1.2. Методе и опрема | 50 |
| 3.1.2.1. <i>Формулација, физичкохемијска карактеризација и процена утицаја ЛК на колоидну структуру емулзија стабилисаних различитим АПГ емулгаторима</i> | <i>50</i> |
| 3.1.2.1.1. <i>Формулација и израда емулзија (са и без ЛК) уз додатак различитих коемулгатора/секундарних стабилизатора</i> | <i>50</i> |
| 3.1.2.1.2. <i>Процена физичке стабилности, естетских и апликативних особина.....</i> | <i>53</i> |
| 3.1.2.1.3. <i>Карактеризација колоидне структуре.....</i> | <i>54</i> |
| 3.1.2.1.4. <i>Одређивање садржаја ЛК.....</i> | <i>56</i> |
| 3.1.2.2. <i>Процена in vitro/in vivo безбедности и ефикасности емулзија са АПГ емулгатором и 6% ЛК.....</i> | <i>58</i> |
| 3.1.2.3. <i>In vivo поређење безбедности и ефикасности ЛК и ГК.....</i> | <i>65</i> |
| 3.1.2.4. <i>Испитивања емулзија са различитим АПГ и 10% (м/м) ЛК</i> | <i>68</i> |
| 3.1.2.4.1. <i>Процена физичке стабилности и апликативних карактеристика</i> | <i>68</i> |
| 3.1.2.4.2. <i>In vivo/in vitro процена безбедности и ефикасности</i> | <i>69</i> |
| 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА | 72 |
| 4.1. Резултати и дискусија I фазе експерименталног рада..... | 72 |
| 4.1.1. <i>Формулација и процена физичке стабилности, естетских и апликативних особина емулзионих узорака</i> | <i>72</i> |
| 4.1.2. <i>Испитивање микроструктуре изабраних серија узорака – процена утицаја ЛК на колоидну структуру емулзија</i> | <i>93</i> |
| 4.1.2.1. <i>Микроскопска анализа (ПМ, ТЕМ).....</i> | <i>94</i> |
| 4.1.2.2. <i>Осцилаторна реолошка мерења.....</i> | <i>97</i> |
| 4.1.2.3. <i>Термална анализа (ДСЦ и ТГ).....</i> | <i>100</i> |
| 4.1.2.4. <i>Одређивање параметара текстуре.....</i> | <i>106</i> |
| 4.1.3. <i>Одређивање садржаја ЛК.....</i> | <i>107</i> |
| 4.2. Резултати и дискусија II фазе експерименталног рада | 108 |
| 4.2.1. <i>In vitro/in vivo процена безбедности и ефикасности емулзија са АПГ и 6% ЛК. 109</i> | <i>109</i> |
| 4.2.1.1. <i>In vitro процена безбедносног профила одабраних узорака</i> | <i>109</i> |
| 4.2.1.2. <i>In vivo процена безбедносног профила одабраних узорака на кожи</i> | <i>110</i> |
| 4.2.1.3. <i>In vivo испитивање ефикасности одабраних узорака на кожи</i> | <i>113</i> |
| 4.2.1.4. <i>In vitro испитивање ефикасности –антиоксидантног потенцијала</i> | <i>119</i> |
| 4.2.2. <i>In vivo поређење безбедности и ефикасности ЛК vs. ГК</i> | <i>125</i> |

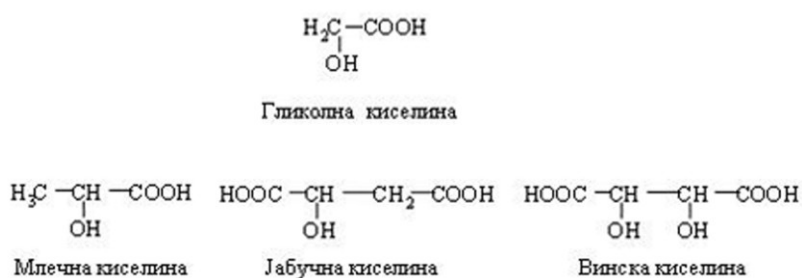
| | |
|---|-----|
| 4.3 Резултати и дискусија III фазе експерименталног рада | 131 |
| 4.3.1. Процена физичке стабилности, естетских и апликативних особина емулзија са АПГ и 10% ЛК | 131 |
| 4.3.2 In vivo/in vitro процена профила безбедности емулзија са 10% ЛК..... | 143 |
| 4.3.2.1. In vitro одређивање безбедносног профила одабраних узорака..... | 143 |
| 4.3.2.2. In vivo одређивање безбедносног профила одабраних узорака на кожи | 145 |
| 4.3.2.3. In vivo процена ефикасности одабраних узорака на кожи | 147 |
| 5. ЗАКЉУЧЦИ | 153 |
| 6. ЛИТЕРАТУРА | 161 |

1. УВОД

1.1. Алфа – хидрокси киселине (АНАs)

1.1.1. АНАs као КАС - деловање и употреба

Алфа–хидрокси киселине (енг. *alphahydroxyacids*, АНАs) хемијски представљају групу органских киселина са -ОН групом на α-угљениковом атому. Ефекти примене различитих АНАs на кожу познати су већ вековима уназад, од када се користе природне сировине богате овим састојцима, ради неге и улепшавања коже (Rogiers, 2004). Америчким дерматолозима, Van Scott и Yu, приписује се да су средином седамдесетих година XX века први доказали да АНАs показују вишеструко позитивно дејство на кожу и промовисали њихову употребу у козметологији, али и у дерматологији (Green, 2005). Од тада, готово да нема произвођача козметичких производа у свету који у своју производну линију нису уврстили препарате различитих намена са козметички активном супстанцом (КАС) типа АНАs. Велики број научних студија бавио се ефектима самих АНАs на кожу, као и различитим аспектима (пре свега формулацијом и механизмима деловања) дермокозметичких и дермофармацеутских препарата са АНАs (Smith, 1994; Ditre и сар., 1996; Altomare и сар., 1997; Berardesca и сар., 1997; Al-Bawab и Friberg, 2004; Briden, 2004).



Слика 1. Структурне формуле представника "старијих" генерација АНАs

Типични представници "старијих" генерација АНАs (мањих димензија молекула), најчешће коришћени као КАС, су гликолна киселина (ГК), млечна, јабучна, лимунска, винска, малеинска киселина; структурне формуле неких од њих приказане су на Слици 1. Ове АНАs имају епитет природних КАС ("воћне" киселине) – већина њих може се наћи у плодовима неких биљака. Гликолна и

млечна су најчешће проучаване и коришћене АНАс у дерматологији и козметологији; доказано је да је величина њиховог молекула таква да омогућава ефективну пенетрацију, пре свега у горње слојеве коже (Smith, 1996a). Раствори (најчешће водени) ових киселина (углавном гликолне у високом проценту – 30%, 40% или 70%) користе се за хемијски пилинг коже. Такви раствори су искључиво намењени професионалној употреби, јер приликом апликације доводе до драматичних последица, пре свега епидермолизе; постпроцедурално наступа обнављање коже на више нивоа уз побољшање њеног изгледа и стања (Briden, 2004).

АНАс се у мањим концентрацијама користе као активне супстанце у козметичким производима. Продужена примена тих препарата има вишеструко позитивно дејство на кожу – убрзану десквамацију, стимулацију синтезе гликозаминогликана (GAGs - хијалуронске киселине и колагених влакана), регулацију рН вредности и пластификацију (бубрење) SC. Као резултат, долази до побољшања општег стања и изгледа здраве коже, јер уједначавањем текстуре, кожа добија здравији, светлији изглед; смањује се интензитет хиперпигментација и број хиперкератотичних лезија, укључујући и оне у изводним каналима лојних (себацеалних) жлезда, долази до смањења дубине бора и "затезања" коже (Yu и Van Scott, 2005). Међутим, механизам дејства АНАс на кожу још увек није у потпуности познат. Тачније, није познато на који начин хистолошке промене у кожи, до којих доказано долази при локалном третману АНАс, утичу на одвијање и нормализацију неких од процеса чије нарушавање проузрокује промене естетског стања коже (Yu и Van Scott, 2004; Green и сар., 2009). Ипак, АНАс се већ више од 40 година користе као КАС, најчешће у "anti-age", тј. производима који умањују видљиве знакове старења коже (боре, лентиго, хиперкератозе) (Ditre и сар., 1996). Посебно треба нагласити способност производа са АНАс да ефикасно хидратишу кожу, нарочито јако суву (Green и сар., 2009). Што се тиче ефекта бељења/посветљивања (како здраве тако и коже са поремећајем пигментације), сматра се да је он последица убрзаног ћелијског "turn-over"-а односно ремоделовања епидермиса. Међутим, нека испитивања су показала да млечна и гликолна киселина ипак могу инхибирати синтезу меланина, тачније

активност ензима тирозиназе која је кључна у процесу синтезе овог пигмента (Usuki и сар., 2003).

Осим у козметологији, производи са АНАс се могу користити уз дерматолошке лекове као адјувантна локална терапија у третману неких патолошких стања коже – акни, фотостарења, стања везаних са патолошки исушеном кожом па чак и у третману псоријазе (Green и сар., 2009; Fluhr и сар., 2008). Производи са нешто већим процентом АНАс дају добре резултате као монотерапија при третману обољења која имају везе са хиперкератинизацијом као што је нпр. ламеларна ихтиоза (Yu и Van Scott, 2005), или се са успехом користе у превенцији настанка дермалне атрофије која прати продужену локалну терапију кортикостероидима (Van Scott и Yu, 2004; Lavker и сар., 1992). Резултати неких *in vivo* студија показали су и да третмани препаратима са ГК, као и са ГК у комбинацији са хидрохиноном ефикасно редукују количину меланина код пацијената са мелазмом (Macedo и сар., 2006). Саме АНАс укључене у дермофармацеутске препарате могу појачати ефекте терапије лековима као што су кортикостероиди, дифенхидрамин, 5 – флуороурацил и неки антимиотици. При томе се сматра да у овом случају АНАс не делују искључиво као пенетрациони инхенсери већ недовољно познатим механизмима доводе до бољег везивања лека за одговарајући рецептор (Yu и Van Scott, 2004).

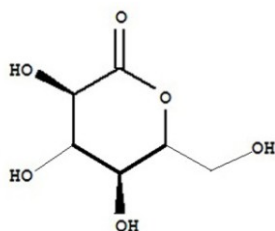
Међутим, и поред многобројних позитивних ефеката које АНАс у различитим концентрацијама показују на кожи, проблеми се могу јавити како при коришћењу, тако и при формулацији стабилних козметичких производа са овим састојцима. Производи са било којом од АНАс "старијих" генерација чак и у јако ниским концентрацијама (испод 10%) често изазивају иритациони одговор након примене, који се огледа у појави еритема и јаке нелагодности у виду пецкања и свраба (енг. *stinging*), нарочито на тзв. "осетљивој" кожи (Kurtzweil, 1998; Yu и Van Scott, 2004) што ограничава њихову употребу. Водени раствор млечне киселине (10%) се чак користи за индуковање иритације на здравој кожи при одређеним испитивањима у дерматологији (Sinaiko и Maibach, 2006). Утврђена је фототоксичност АНАс приликом излагања третиране коже UV зрацима, као и случајеви едематозног иритантног контактеног дерматитиса коже очних капака при индиректном контакту са препаратима који су садржали нижу концентрацију

ових КАС (Altomare и сар., 1997; Kurtzweil, 1998). Киселост, тј. ниска рКа вредност АНАс као и убрзана пенетрација кроз кожу условљена малом величином молекула одговорни су за овакав иритациони одговор (Yu и Van Scott, 1996). Наиме, киселине могу пенетрирати кроз кожу само у недисосованом молекулском облику, па се биолошка расположивост АНАс дефинише као фракција недисосоване киселине на месту примене (Yu и Van Scott, 1996). Недисосовани облик киселине је доминантнији при нижој рН вредности препарата што, последично, доводи до јаче иритације коже на месту апликације. Ако се има у виду да је активни принцип деловања АНАс киселински ањон, ове КАС представљају прави изазов у погледу формулације стабилних козметичких производа. Са једне стране, треба помирити два супротна захтева - обезбедити што више недисосоване киселине ради боље пенетрације и истовремено што више киселинског ањона неопходног за оптимално деловање на кожи, уз чињеницу да може доћи и до иритације. Такође, кисела природа АНАс сужава избор помоћних супстанци у изради стабилних носача за ове КАС.

Што се тиче максималне дозвољене концентрације АНАс у козметичким производима, због недостатка релевантне законске одредбе у оквиру одговарајуће Уредбе ЕУ (Regulation (EC) No 1223/2009) на тржишту се, уколико задовоље одговарајуће прописане захтеве, могу наћи и производи са релативно високим концентрацијама ових КАС. Једино је у Швајцарској посебном одредбом ограничена концентрација на 10% уз минималну рН вредност препарата од 3.5 (Rogiers, 2004). На територији САД поштује се препорука по којој су козметички производи са овим киселинама (пре свега гликолном и млечном) безбедни за примену на кожи, уколико је концентрација АНАс мања од 10%, рН изнад 3.5 и уколико су формулисани на тај начин да штите кожу од повећане осетљивости на сунце. FDA (Америчка агенција за храну и лекове) обавезује да се на амбалажи производа који их садрже означи да повећавају ризик од сунчевих опекотина (FDA, 2005). У САД се често наглашава да су АНАс потенцијално канцерогене КАС. **Имајући у виду захтеве које квалитетан козметички производ треба да задовољи, као и све користи и недостатке примене производа са АНАс, последњих година истражују се потенцијалне алтернативе овим КАС које би имале компарабилну ефикасност уз бољи безбедносни профил на кожи.**

1.2. Новије генерације АНАс - РНАс и АВАс као КАС

Полихидроксидне киселине (енг. *polyhydroxyacids*, РНАс), и алдобионске киселине (енг. *aldobionic acids*, АВАс) представљају тзв. "новије" генерације АНАс, које се последњих десетак година интензивније проучавају и користе као КАС, али и за потребе специфичне дерматолошке терапије (Green, 2005). Структура њихових молекула у основи је слична структури молекула АНАс "старијих" генерација те се тврди да као КАС остварују њима сличне ефекте, уз неколико битних предности које се пре свега односе на повољнији безбедносни профил (Green и сар., 2009). Димензија молекула РНАс неупоредиво је већа у односу на молекуле сваког од представника "старије" генерације АНАс, уз присуство већег броја хидроксилних група (Briden и Green, 2005), те спорије пенетрирају кроз кожу. РНАс су органске карбоксилне киселине са више хидроксилних група у молекулу од којих се бар једна налази на α -С атому. Обично су ови молекули у облику лактона, као што је нпр. глуконолактон (ГЛ), тј. δ – лактон глуконске киселине. Структурна формула ГЛ дата је на Слици 2.



Слика 2. Структурна формула глуконолактона-представника РНАс

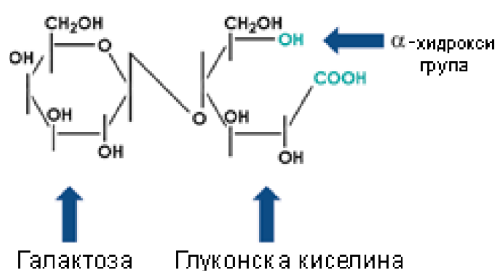
ГЛ је најчешће коришћен представник новијих генерација АНАс у козметичким производима; његови позитивни ефекти на кожу доказани су научним студијама (Briden и Green, 2005). Ефекти које препарати са ГЛ као КАС показују у третману фотоостареле и остареле коже приближни су онима које остварују слични препарати са конвенционалним АНАс. Међутим, ГЛ не показује фототоксичност, већ може да штити кожу од штетног деловања слободних радикала (Bernstein и сар, 2004). ГЛ не нарушава, већ јача баријерну функцију SC (Berardesca и сар, 1997). Због присуства великог броја -ОН група у молекулу добар је хумектанс (Green, 2005). Може се користити у третману суве коже уз одсуство иритације што се приписује успореном проласку молекула кроз кожу

услед његове велике димензије и омогућава коришћење ГЛ као КАС у препаратима намењеним нези оштећене коже (Green и сар., 2001). Локални третман производима са ГЛ даје резултате у побољшању симптома розацеа, дерматитиса, акни и сличних патолошких стања (Hunt и Barnetson, 1992; Draelos и сар, 2006).

Алдобионске (бионске) киселине састоје се од молекула моносахарида који је везан за молекул РНА у лактонском облику и садрже више –ОН група од којих је бар једна на α -С атому. У литератури се још називају и комплексним РНА, а добијају се из дисахарида оксидацијом. Последњих година уочена је потенцијална корист примене ових састојака као КАС – претпоставља се да делују слично конвенционалним АНАс, али уз много повољнији профил безбедности, те се АВАс све више испитују. Нема потпуних података који се тичу различитих аспеката њихове примене. (Yu и Van Scott, 2004). Типичан представник АВАс је лактобионска киселина (енг. *lactobionic acid*).

1.2.1. Лактобионска киселина

Лактобионска киселина (ЛК) хемијски је класификована као олигосахарид алдонска киселина. Молекул лактобионске киселине (4-О- β -D галактопиранозил D-глюконске киселине) састоји се од молекула глукозе који је β -1,4-глукозидном везом везан за молекул глюконске киселине (структурна формула дата је на Слици 3). Монографија супстанце дата је у Merck Index-у (Merck Index, 2007). ЛК је официнална у Ph. Eur. 7.



Слика 3. Структурна формула лактобионске киселине (ЛК)

И поред високе цене производње, ЛК има неколико битних примена у фармацеутској, прехранбеној и индустрији детерџената (Nordkvist и сар., 2007). Лактобионати чине основне компоненте неких од раствора који се користе за перфузију хуманих органа намењених трансплантацији јер имају одличну

способност хелирања прооксидативних метала. На тај начин значајно смањују оксидативно оштећење ткива (Southard и Belzer, 1995). ЛК се у фармацеутској индустрији користи за повећавање растворљивост макролидних антибиотика, пре свега еритромицина. Еритромицин-лактобионат смањује иритацију коју изазива сам еритромицин на месту апликације (када се ради о препаратима намењеним парентералној употреби), а из истог разлога у терапији калцијумом користи се калцијум-лактобионат (Green, 2000). Указано је и на могућност локалне апликације препарата са овом киселином у превенцији настанка неких патолошких промена на оралној и вагиналној слузници (Yu и Van Scott, 2011).

Позитивно дејство козметичких производа са ЛК на кожи доказано је у малобројним научним студијама коришћењем углавном субјективних метода процене ефеката и безбедности од стране дерматолога (Green и сар., 2001). За ЛК у козметологији тврди се (Green и сар., 2001) да остварује сличне ефекте као АНАs старијих генерација, али уз одсуство иритације. Што се тиче потенцијалне примене у дерматолошкој терапији, наводи се да ЛК може убрзати зарастање рана и да је за ово дејство вероватно битна чињеница да се галактоза, настала хидролизом ЛК на кожи, може укључити у биохемијске процесе синтезе, агрегације колагена и епителизације. Из истог разлога, козметички производи који садрже нижи проценат ЛК препоручују се у нези коже након хемијског пилинга (Green и сар., 2009). Нарочита корист примене производа са ЛК потиче од њеног антиоксидантног деловања које остварује помоћу неколико различитих механизма (Green и сар., 2001; Briden и Green, 2005). Међутим, нема поузданих података о антиоксидантној способности ЛК у смислу спречавања оксидативне деградације и "хватања" слободних радикала који најчешће изазивају оштећење ткива и убрзавају старење коже и других органа. Ово, тзв. "примарно" антиоксидантно деловање је само прелиминарно показано одговарајућом скрининг методом (Briden и Green, 2005). Тврди се да се козметички производи који садрже ЛК са успехом могу користити у третману стања као што су: сува кожа, хиперпигментације, фотоостарела кожа и природно остарела тј., остарела кожа код које није дошло до превременог старења услед хроничног излагања УВ зрачењу (Green и сар., 2001; Briden и Green, 2005). Ипак, нема података о томе да су наведени ефекти испитани у *in vivo* студијама на хуманим добровољцима

објективним биофизичким методама мерења релевантних параметара на кожи. Примена ових метода данас се сматра обавезном при добијању валидних доказа о ефикасности козметичких производа према важећој европској законској регулативи (Regulation (EC) No 1223/2009). Безбедносни профил примене ЛК готово уопште није испитиван иако данас, заједно са испитивањем ефеката поменутих методама, представља незаобилазан део студије дермокозметичких производа (Verdier-Sévrain и Bonté, 2007).

Ипак, употреба ЛК као КАС је комерцијализована, и у козметичким производима на тржишту ЛК се налази у релативно малом проценту, најчешће у комбинацији са другим АНАс. ЛК, због своје киселости, али и екстремне хигроскопности представља изазов у формулацији стабилних козметичких препарата. Наиме, ЛК може да веже 14% воде и награди гел матрикс који не дехидрира чак ни у условима јако ниске влажности ваздуха, а по својој киселости ЛК се чак сврстава у класу тзв. "супер киселина" (Elias, 2007). Суперкиселине се дефинишу као оне које имају већу киселост него 0,5 М раствор сумпорне киселине, те из тог разлога након апликације на кожу, чак и у ниском концентрацијама, доводе до смањења рН на њеној површини (Nachem, 2003). Према подацима из експеримента изведеног у прелиминарном делу израде ове докторске дисертације, рН 6% (м/м) воденог раствора ЛК износи 1,68. Све то може да представља проблем при формулацији препарата задовољавајуће стабилности, естетских и апликативних карактеристика, нарочито када се као носачи користе емулзије које су иначе термодинамички нестабилни системи, посебно у киселом подручју рН.

1.3. Дермокозметички производи (козметоцеутици) -дефиниција и законски статус

Према важећим законским прописима на територији ЕУ – Козметичка директива 76/768/ЕЕС и Уредба ЕУ о козметичким производима – Regulation (EC) No 1223/2009, козметички производ је *"било која супстанца или препарат намењен контакту са различитим спољашњим деловима људског тела (епидермис, коса, нокти, усне и спољашњи генитални органи), или са зубима и слузокожом усне дупље, са циљем да их штите, парфимишу, мењају њихов изглед*

и/или коригују мирисе тела и/или штите, односно одржавају их у добром стању". Тачније, иако су неке њене кључне одредбе већ на снази, нова Уредба ЕУ о козметичким производима ступиће на снагу у целини у јулу 2013. године и у потпуности заменити Козметичку директиву 76/768/ЕЕС. На тај начин униформисаће се захтеви који се тичу производње, испитивања и пуштања у промет козметичких производа на територији целе ЕУ. Неке земље дају чак ближе дефиниције козметичког производа – законски пропис у овој области у Италији одговара важећој Козметичкој директиви, али уз напомену да је козметички производ **"било која супстанца или препарат, под условом да није лек или медицинско средство, намењена контакту..."** (Morganti и Paglialunga, 2008). У САД, FDA дефинише козметичке производе као *"производе намењене утрљавању, изливању, посипању или распршивању на и/или у људско тело/делове људског тела са циљем да: чисте, улепшавају, поправљају и/или мењају изглед, или као супстанце које се примењују као састојци било ког козметичког препарата, са изузетком сапуна"* (FDA, 1938).

На основу претходно објашњеног механизма деловања и ефеката АНАs, РНАs и АВАs закључује се да козметички препарати који садрже ове КАС (или неке друге које на кожи доводе до ефеката који се не могу декларисати као стриктно козметички) излазе из оквира дефиниције козметичких производа како у Европи тако и у САД. Из тог разлога, они се данас сврставају, првенствено на територији САД, у групу козметоцеутика (козмецеутика), док се у Европи за производе оваквих карактеристика одомаћио термин дермокозметички производи или медицинска козметика. Код нас се још називају и препаратима функционалне козметике. Међутим, оваква класа производа који се у суштини налазе на граници козметички производ – дерматолошки лек није званично регулисана ни класификована од стране било ког законодавног тела у свету. И поред тога, поменути термини који их означавају активно се користе како у научној тако и у маркетиншкој терминологији (Gendler, 2005). Реч козмецеутици (енг. *cosmeceuticals*) је семантичка мешавина термина козметика (енг. *cosmetics*) и лек (енг. *pharmaceutics*); први га је употребио амерички дерматолог Алберт Клигман 1984. године постављајући нови концепт који је од почетка био предмет контроверзи (Kligman, 2005). Према др. Клигману, козмецеутици се дефинишу

као "препарати који остварују ефекте на кожи, а налазе се на граници дерматолошки лек-козметички производ. Односно, дефиниција њиховог деловања превазилази једноставно "прекривање" коже (с обзиром да ови препарати често делују и на структуру и на функцију коже) али ипак не испуњава оквире дефиниције терапијског деловања дерматолошког лека" (Kligman, 2005). У литератури се још могу наћи и друге сличне дефиниције различитих аутора (Амет и Maged, 2009). Према др. Клигману, оправдање потребе за постављањем овог новог концепта налази се и у чињеници да су реална достигнућа и знања у области функције коже и механизма деловања супстанци које показују потенцијал коришћења у козметичким производима и дермофармацеутицима данас неупоредиво већа него у тренутку постављања законских прописа који су још увек на снази. Поменути прописи су опсолетни и треба их мењати и прилагођавати. Наиме, показало се да бројне активне и помоћне супстанце које се користе у козметичким производима утичу на структуру и функцију коже, па чак и сама вода (Kligman, 2005). Прихватање концепта дермокозметичких производа наилази на велики отпор, пре свега међу дерматолозима, од којих многи сматрају да би то унело велику забуну код пацијената; чак влада мишљење да је концепт непотребан и сувишан (Kligman, 2005).

Међутим, идеја о дермокозметичким производима као новој групи локалних препарата који су "мање од лека али више од козметичког производа" поприма глобалне размере, а терминологија варира. У Јапану се за ову класу производа већ годинама користи термин квази-лекови (енг. *quasi-drugs*). Са практичне стране, извесно је да је дошло време за промену законске регулативе и увођење дермокозметичких производа/козметоцеутика као законски дефинисане, признате класе производа, не само из научних разлога већ и због регулисања њиховог промета између тржишта различитих земаља у којима се они законском регулативом не третирају на исти начин. Тако, производи за заштиту од сунца и антиперспиранси су у ЕУ козметички производи, а у САД се третирају као *over-the-counter* (ОТС) лекови (Draelos, 2008; Kligman, 2005). За сада, козметичка индустрија је сектор који се бави производњом и стављањем у промет производа који одговарају дефиницији дермокозметичких производа. Према прелиминарним подацима, чак 90% козметичких производа на светском тржишту уствари

одговара дефиницији дермокозметичких производа. Само у САД у 2005. години промет производа који би се могли сврстати у козметоцеутике износио је 12,5 милијарди долара уз тенденцију даљег раста (Choi и Berson, 2006).

Дермокозметички производи вероватно представљају најбројнију, најзначајнију и најкоришћенију групу производа која формално није законски регулисана нигде у свету (Draelos, 2009). Ипак, они и без посебних регулаторних одредница морају да у погледу квалитета испуне знатно веће захтеве у односу на конвенционалне козметичке производе (Ditre, 2005; Draelos, 2008; Draelos, 2009), које диктира савремено тржиште. Пошто се од козметичког производа очекује да, по дефиницији, оствари дејство на кожу а да при том не дође до промена њене структуре ни функције, захтеви у погледу квалитета односе се пре свега на безбедност, стабилност (физичкохемијску), као и карактеристике производа које могу бити пресудне код потрошача приликом избора – естетске и апликативне карактеристике, осећај на кожи након примене (енг. *after-feel*), лакоћа којом се производ истукује из контејнера. Код дерматолошких лекова битни су како фармацеутско-технолошки, тако и биофармацеутски критеријуми – компатибилност и стабилности подлоге и лека у подлози, механизам ослобађања лека из подлоге и транспорта кроз кожу до циљног места деловања, као и начин остваривања терапијског ефекта (Smith и сар., 2002). Квалитетан и ефикасан дермокозметички производ, међутим, треба да одговори и једним и другим захтевима. Из тог разлога већина произвођача има веома строге стандарде при развоју формулација, производњи и евалуацији ефеката ових производа, који се готово уопште не разликују у односу на стандарде који се односе на лекове. Маркетиншке тврдње које стоје иза дермокозметичких производа често су поткрепљене клиничким испитивањима која се не разликују од оних која се примењују за испитивања лекова. Wiechers (2007) сматра да су научни принципи и смернице на којима почивају савремена козметологија и дерматологија постали готово идентични, те да између ове две области у том смислу не постоји стриктна граница. У САД је чак покренута иницијатива да се специфично обележавање/означавање које је законски обавезно за лекове који могу испољити озбиљне или чак фатална нежељена дејства примени и у случају козметике који садрже потенцијално канцерогене састојке (Cosmeticsdesign Europe, 2012). У

исто време, у Француској агенцији за лекове постоји одељење за козметовигиланцу (прикупљање података о нежељеним деловањима козметичких производа), а Уредба ЕУ 1223/2009 о козметичким производима у одређеном члану намеће обавезу прикупљања података о козметовигиланци.

У литератури се може наћи неколико различитих могућности класификације потенцијално активних супстанци у дермокозметичким производима, пре свега зато што је ова листа јако бројна. По некима од њих, АНАс чак представљају једну од најефикаснијих група (Ditre, 2005; Choi и Verson, 2006). **Међутим, честе су примедбе у вези нежељених ефеката дермокозметичких производа са АНАс старијих генерација, што такође говори у прилог тези да оне морају бити замењене састојцима компарабилне ефикасности и унапређеног безбедносног профила, чему би могле одговарати новије генерације АНАс.**

1.3.1. Дермокозметички производи за влажење коже

Оптимална количина воде присутна у SC неопходна је за нормално функционисање и зависи од два основна фактора: присуства одређених хигроскопних молекула (који се иначе називају природним влажећим фактором, енг. *natural moisturizing factor, NMF*) и оптималног распореда интерцелуларних липида SC. Поменути липиди треба да буду организовани тако да формирају природну баријеру која спречава претерани трансепидермални губитак влаге (ТЕГВ). Уколико се наруши било који од наведених фактора, долази до исушивања коже различитог интензитета или чак одређених патолошких стања. У оваквом случају, превенција има јако велики значај (Verdier-Sévrain и Bonté, 2007). Сува кожа је често стање које готово увек прати оштећење баријере SC; јављају се бројне субјективне сензације као што је осећај затезања тј. нелагодност, свраб, пецкање; објективно може бити присутно црвенило, перутање, неравна површина, чак и фисуре. Такође, различита патолошка стања као што су атопијски дерматитис, ихтиоза, псоријаза, између осталог се манифестују као сува кожа. Из тог разлога, дермокозметички производи за влажење коже (енг. *moisturizers*) су вероватно најважнија компонента основне неге коже пацијената – корисника свих узраста, и то како код оних са здравом, тако и оних са оболелом кожом или кожом чије се стање сувоће граничи са патолошким (Fluhr и сар.,

2008). Адекватна хидратација неопходна је ради одржавања интактне баријере SC здраве коже, као и у третману дерматоза које су удружене са клиничким знацима и субјективним осећајем сувоће (Loden, 2003).

Из наведених разлога, могућност употребе АНАs као КАС у производима за хидратацију коже треба посебно нагласити. Сматра се да влажеће дејство АНАs на кожу потиче не само од хумектантног деловања, већ и од нормализације кератинизације и пластификације SC коју ове киселине доказано врше након дуготрајније апликације на кожу (Yu и Van Scott, 2004). Обично се као носачи за АНАs у оваквим производима користе емулзије (кремови и емулзиони лосиони) који треба додатно да хидрирају кожу, а такође се често АНАs комбинују и са другим хидратационим агенсима. Ипак, *moisturizers* не смеју имати проблематичан профил безбедности. Са тог аспекта, оправданост употребе АНАs (нарочито припадника старијих генерација) у производима за влажење коже, без обзира на високу ефикасност, може се довести у питање. При том се мисли на бројне нежељене ефекте на кожи који су чести након апликације ових киселина чак и у малој концентрацији, а нарочито када је у питању сува и већ оштећена кожа. Вероватно би припадници АНАs новијих генерација представљали много безбеднију, али и потенцијално ефикаснију алтернативу (због већег броја –ОН група у молекулу) старијим генерацијама као активним састојцима у производима за хидратацију коже; свеобухватном литературном претрагом установљено је да нема научних студија које су такво поређење проучавале.

1.3.2. Дермокозметички производи – антиоксиданси

Упоредо са глобалним старењем хумане популације, дермокозметички производи који се користе у козметичком третману и превенцији старења коже (тзв. *anti-age* препарати) постају све популарнији (Choi и Berson, 2006). Постоји неколико стратегија које се користе у превенцији и третману знакова старења коже, и заснивају се на третману антиоксидансима, апликацији UV-филтера, коришћењу КАС које повећавају еластичност коже, убрзавају ексфолијацију итд. Многе епидемиолошке, клиничке и *in vitro* студије указале су да је првенствено неконтролисано излагање UV зрацима одговорно за убрзано старење коже тзв. фотостарење, али и за настанак болести као што су аутоимуне обољења коже, меланом и други облици канцера коже (Nichols и Katiyar, 2010). Претерано

излагање UV зрацима доводи до појачаног стварања реактивних кисеоничних врста (енг. *reactive oxygen species* - ROS) и смањења инхерентног антиоксидантног капацитета коже што резултује настанком оксидативног стреса (Kaur и сар., 2007). Оксидативни стрес дефинише се као нарушавање равнотеже између брзине стварања слободних радикала (односно ROS) у кожи тј. организму и способности њихове неутрализације (Betteridge, 2000). Различите супстанце са антиоксидантним деловањем могу испољити заштитно дејство у различитим стадијумима процеса оксидације и путем неколико механизма деловања. Зато се деле у две основне групе – "примарне" или тзв. "хватаче слободних радикала" – антиоксидансе са високим афинитетом за ROS, и "секундарне" – који најчешће делују хелирајући прооксидативне јоне метала и регенеришући "примарне" антиоксидансе (Koleva и сар., 2002). Локална апликација антиоксиданаса може представљати ефикасну стратегију одбране коже од оксидативног стреса (Saija и сар., 2000); употреба антиоксидантних дермокозметичких производа није битна само у превенцији знакова фотостарења коже већ је од значаја за глобално здравље популације без обзира на узраст.

Већ је речено да се препарати који садрже неке од АНАs старијих генерација могу ефикасно користити у локалном третману промена на кожи које настају услед фотооштећења. Са успехом се могу чак третирати и актиничне кератозе које се сматрају премалигним лезијама (Yu и Van Scott, 2004; Green и сар., 2009). Ипак, због поменутих нежељених ефеката употреба АНАs у дерматологији и козметологији се ограничава. Са друге стране, научне студије указале су да примена ЛК на кожу делује слично као примена "старијих генерација" АНАs које се ефикасно користе у третману фотооштећене коже (Green и сар., 2001; Briden и Green, 2005) са акцентом на додатном антиоксидантном потенцијалу ЛК и нарочито на њеном повољном безбедносном профилу. **На основу претходних навода, може се претпоставити да би дермокозметички производи са ЛК могли бити ефикасни како у козметичком третману, тако и у превенцији стања коже проузрокованих оксидативним стресом, и то захваљујући јединственој мултифункционалности ове КАС.**

1.4. Структура коже – циљног места деловања дермокозметичких производа

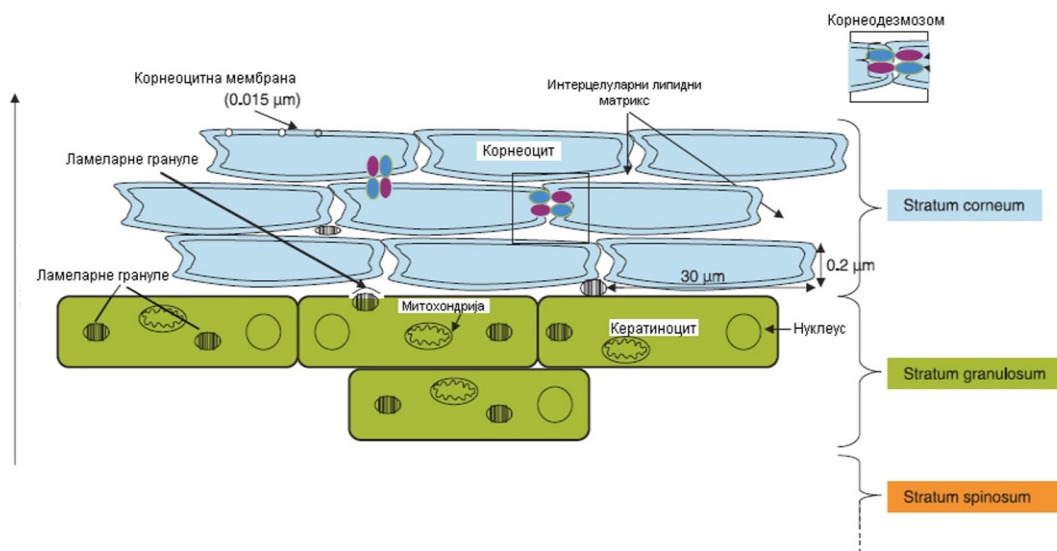
Кожа је највећи орган људског тела и представља омотач који је у непосредном додиру са спољашњом средином. Комплексне је структуре, изграђена од више слојева и представља баријеру према спољашњој средини која обезбеђује интегритет организма истовремено обављајући многе физиолошке функције. Кожа учествује у укупном метаболизму, терморегулацији и екскрецији, представља неурорецепторни орган и део је имунолошког система; има изузетно важан естетски тј. козметски значај (Лалевић-Васић и сар, 2003). Ипак, примарна функција овог органа је да служи као физичка баријера и штити организам од губитка воде, али и уласка токсичних материја, алергена, иританаса и микроорганизама. Кожа се састоји из три слоја: епидермиса (спољашњи, невакуларизовани слој), дермиса (унутрашњи, васкуларизовани слој који належе на епидермис) и хиподермиса (такође васкуларизовани слој који належе на дермис и састоји се претежно од масног ткива). Сам епидермис састоји се од неколико слојева а најповршнији слој, *stratum corneum* (SC), представља главну баријеру за перкутану апсорпцију наведених нокси, али и свих других егзогених супстанци као што су дермофармацеутици и КАС, при чему је одговоран и за одржавање хомеостазе воде у организму. На самој површини коже налази се кисели омотач (McGrath и сар, 2008; Elias, 2007) тј. кисели филм који је уствари мешавина секрета лојних и знојних жлезда, површинских делова *stratum corneum dysjunctum* као и материја које су на површину коже доспеле дифузијом (Вулета, 1983). Треба имати у виду да је киселост SC регулисана и путем неколико ендогених процеса (Elias, 2007).

1.4.1. Структура *stratum corneum*-а (SC) као баријере

Stratum corneum (SC) представља последњи ступањ у диференцијацији епидерма и чини га 10 – 25 слојева изумрлих ћелија, корнеоцита, уроњених у липидни матрикс. SC се непрекидно обнавља - код здраве коже потребно је 4-6 недеља да ћелија прође период од диференцијације у базалном слоју епидермиса па до коначног одстрањивања са површине коже перутањем. У литератури се структура SC представља тзв. моделом "цигле-и-малтера" као двокомпартменски

систем где цигле представљају корнеоцити, а малтер интерцелуларни липидни матрикс који, због свог јединственог састава и структурног уређења, представља одличну баријеру ка спољашњој средини (Elias, 1991; Roberts и сар., 1987). Структура SC и *Stratum granulosum* приказана је на Слици 4.

У састав интерцелуларног липидног матрикса SC улазе: холестерол (27%), церамиди (41%), слободне масне киселине (9%), холестерол сулфат (2%) и холестерол естри (10%). Сматра се да је смеша ових компонената организована у виду липидних ламела које су високоструктуриране и веома стабилне, чинећи тако ефикасну баријеру за пенетрацију и пермеацију супстанци (Roberts сар., 2002). Међутим, тачна структура и физичко стање интерцелуларних липидних ламела још увек нису у потпуности познати, мада се у литератури наводи неколико модела којима се потенцијално објашњава ова структура (Forslind и сар., 1997; Norlén, 2001; Norlén 2003; Bowstra и сар., 2000). У почетку се сматрало да су липиди организовани у виду течно-кристалних двослојева ламеларног типа (Elias, 1991), али се касније дошло до закључка да се липидни матрикс састоји и од ламеларног гела, тј. да се у структури наизменично понављају кристални и течно-кристални слојеви (Norlén, 2003; McIntosh, 2003; Plasencia и сар., 2007).



Слика 4. Структура Stratum corneum и Stratum granulosum

Актуелан је нови предлог истраживачког тима на чијем је челу Norlén (Iwai и сар., 2012) према коме је липидни матрикс рожнатог слоја епидермиса организован у виду кондензованих двослојева потпуно опружених молекула

церамида, док су молекули холестерола везани за церамиде и асиметрично дистрибуирани кроз двослојеве. И поред структуре сличне кристалној, овај матрикс остаје еластичан. Оваквом структуром могла би се у потпуности објаснити јако ниска пермеабилност SC за воду, хидрофилне и липофилне супстанце, као директна последица кондензоване структуре и наизменичног присуства липофилних (алкил ланаца) и хидрофилних група у структури липидних ламела. Тачније, здрав SC показује велики отпор и ка хидратацији и ка дехидратацији, првенствено због тога што нема размене воде између слојева у липидним двослојевима. Такође, оваквом структуром могла би се објаснити и отпорност SC променама температуре и притиска и отпор дејству спољашњих сила (компресији и растезању) (Iwai и сар., 2012).

Иако је решавање спорних момената у разумевању структуре SC неопходно ради добијања фундаменталних знања, али и разјашњавања начина на који одређени лекови и КАС пенетрирају SC и остварују своје дејство, интактан SC у сваком случају доказано представља добру баријеру са ниском пермеабилношћу, добром еластичношћу и отпорношћу према механичком стресу, док његова својства могу бити измењена у неким патолошким стањима коже (Elias, 1991; Roberts и сар., 2002). Све набројано од изузетног је значаја за формулацију савремених облика дермофармацеутика, као и дермокозметичких производа чије је циљно место деловања управо епидермис тј. SC.

1.4.1.1. Stratum corneum (SC) као циљно место деловања дермокозметичких производа са AHAs

Бројна стања коже која се успешно могу третирати производима са AHAs у суштини су углавном повезана са неравномерном десквацијом, ретенцијом корнеоцита или поремећајем епидермалне баријере. Циљно место деловања ових производа, као и већине осталих дермокозметичких производа заправо је SC. Утврђено је да апликација AHAs на нивоу епидермиса слаби кохезионе силе између корнеоцита смањујући број дезмозома. На тај начин долази до модификације кератинизације тј. убрзане десквације и ћелијског "turn-over" у најдубљим слојевима *stratum corneum*-а (SC) (Yu и Van Scott, 2004). Треба, међутим, имати у виду и да истраживања показују да неке од AHAs могу деловати као хидротропи и довести до великих промена и нарушавања структуре фазе

течних кристала (Al-Bawab и Friberg, 2004). С обзиром да је извесно да се у структурној организацији липида SC јављају описани домени (Norlén, 2003; McIntosh, 2003), могуће је да апликација АНАs доводи и до структурних промена у липидном матриксу SC те да је то један од потенцијалних механизма деловања.

Примена дермокозметичких производа са АНАs појачава активност ензима стероид сулфатазе одговорног за хидролизу холестерол-3-сулфата у SC у слободан холестерол, што је неопходно за нормалну десквamacију (Yu и Van Scott, 2004). Истовремено долази до повећања укупне дебљине вијабилног епидермиса, као и дермиса (Yu и Van Scott, 2004). Продужена/дуготрајна примена ових производа доводи до смањења (нормализације) рН вредности коже - нешто нижа рН у дубљим слојевима неопходна је за нормалну ексфолијацију јер повећање рН коже готово увек прати ретенција корнеоцита у SC, и као последица могу се јавити нека патолошка стања (Nachem и сар., 2003). На примеру млечне киселине доказано је да примена козметичких производа са 5% АНАs - припадника "старије" генерације, доводи само до епидермалних промена, док производи са вишом концентрацијом ових киселина (12% и више) изазивају и промене на нивоу дермиса које су јако битне за испољавање њиховог укупног дејства на кожу (Smith, 1996a).

1.4.2. Дермис као циљно место деловања дермокозметичких производа са АНАs

Дермис је васкуларизовани слој коже и представља густо везивно ткиво чију ћелијску компоненту чине првенствено фибробласти, док је екстрацелуларни матрикс састављен од фибрознних протеина уроњених у хидратисани полисахаридни гел (McGrath и сар., 2008). Фибробласти имају интензивну секреторну активност и стварају конституенсе екстрацелуларног матрикса дермиса – протеинска влакна и међућелијску основну супстанцу. Основни протеини дермиса су еластин и колаген који чини чак 80% суве материје овог слоја и кожи даје механичку чврстину, док временом долази до његове појачане разградње услед деловања ензима колагеназе. То је праћено смањењем чврстине коже и појавом знакова кутаног старења. Такође, за изглед и чврстину коже битан је и садржај гликозаминогликана (ГАГ) који због своје изразите хигроскопности везују и задржавају велику количину воде у дермису дајући потребан тургор и

повећавајући дебљину коже (Лалевић-Васић и сар, 2003; McGrath и сар., 2008). Козметички производи, по дефиницији, не продиру до дермиса нити своје дејство остварују у овом слоју коже, али је то често случај када се ради о дермокозметичким производима. Да би се остварио ефекат у дермису неопходно је да након апликације дође до пенетрације активних супстанци кроз кожу до овог слоја. Ефекти које дермокозметички производи са АНАс (у већој концентрацији) остварују на нивоу дермиса уствари су последица стимулације активности фибробласта тј. повећане биосинтезе колагених влакана и ГАГ, пре свега хијалуронске киселине (Van Scott и сар., 1996). То резултује повећањем укупне дебљине коже након дуготрајног третмана, ублажавањем постојећих и спречавањем стварања нових манифестација кутаног старења, пре свега бора (енг. *anti-age* ефекат) (Yu и Van Scott, 2004). За препарате који садрже АНАс већих димензија молекула (у нешто већој концентрацији) тврди се да на нивоу дермиса могу остварити сличне ефекте као и препарати који као активне супстанце имају представнике "старијих" генерација АНАс (Green, 2005).

1.4.3. рН коже – улога и значај

Као што је већ речено, на површини коже налази се кисели омотач, који представља значајан фактор у њеној одбрани од спољних агенаса и индикатор је квалитета епидермиса (Elias, 2007). Још Simons (1962) објашњава да је свако повећање површинске рН вредности коже (алкализација) праћено појавом патолошких феномена.

Различити аутори наводе различите просечне вредности рН здраве коже. Тако, док је у неким студијама измерено да просечна рН коже код жена износи $5,6 \pm 0,4$, а код мушкараца $4,6 \pm 0,4$ (мерено на кожи унутрашње стране подлактице) (Jacobi и сар., 2005; Ohman и Vahlquist, 1994), код других се могу наћи вредности од 5,54 (код жена) и 5,80 код мушкараца (Ehlers и сар., 2001). Разлике у резултатима свакако потичу од чињенице да је у првом случају кожа испирана водом и SC одстрањен *tape-stripping* техником, док је у другом случају испитаницима речено да не перу кожу 12 сати пре мерења.

У суштини, биофизичке технике мерења рН коже које се користе засноване су на мерењу рН детерминисаног волумена воде која се стално депонује на површини коже. Тако, измерена вредност је у суштини сразмерна количини H^+

јона депонованих на површини SC, уколико се пре мерења не врши његово одстрањивање. Кожа поседује добар пуферски капацитет, и када се локално нанесу кисели или базни производи, она може повратити физиолошку рН за свега неколико сати. Утврђено је да локална примена козметичких производа или дермофармацеутика рН вредности између 3 и 4 убрзава десквамацију на површини SC (чиме се делимично објашњава механизам деловања АНАs), док у случају производа високе рН (око 8) чак долази до пролазног оштећења баријерне функције SC (Giacomoni и сар., 2009).

1.5. Носачи за АНАs, РНАs и алдобионске киселине у дермокозметичким производима

Приликом формулације дермокозметичких производа/козмецеутицика и дермофармацеутских препарата нарочиту пажњу треба поклонити избору носача. Носач може да интерагује са активном супстанцом и делује синергистички, али и да умањи њену ефикасност; може да јача баријерну функцију коже, али и да индукује алергијски контактни дерматитис (Klein, 2005; Epstein, 2009). У суштини, оно што треба узети у обзир је чињеница да код дермокозметичких производа уствари нема плацебо ефекта носача; већина супстанци које се користе за њихову формулацију након апликације може утицати на структуру или функцију коже, чак и обична вода (Kligman, 2005). У случају комерцијалних формулација комплекснијег састава ситуација је далеко компликованија. Из тог, али и других бројних разлога о којима ће бити речи, при одабиру и формулацији носача за дермокозметичке производе треба узети у обзир опште захтеве који се тичу безбедности, физичкохемијских карактеристика и евентуалних ефеката самог носача за кожу, али и посебне захтеве који се тичу физичкохемијских карактеристика саме активне супстанце и њене компатибилности са одабраним носачем. Са еколошким освешћивањем широког круга потрошача, у овој, као и у другим областима, јавља се и потреба за "природним", "зеленим", биодеградабилним сировинама (Von Rybinski, 1996).

Формулација и избор носача за дермокозметичке производе са антиоксидантним ефектом на кожи, као и дермокозметичке производе намењене њеној хидратацији, треба да задовољи све захтеве који се односе на

дермокозметичке производе уопште, при чему испитивањима безбедности треба поклонити посебну пажњу. Прегледом релевантних научних студија може се доћи до закључка да је овај аспект често занемарен, иако је познато да ROS могу да погоршају симптоме иритантног контактеног дерматитиса на кожи који често настаје управо због лошег безбедносног профила локално апликованих супстанци или препарата (Krutmann и Yarosh, 2006). Насупрот бројним научним студијама које су испитивале ефикасност различитих антиоксиданаса *per se*, свега неколико студија имало је у фокусу њихову ефикасност након инкорпорације у носаче тј. утицај антиоксиданаса на физичку стабилност носача (Di Mambro и сар., 2003; Di Mambro и Fonseca, 2005; Marquede и сар., 2005). Чак и ове малобројне студије указале су на проблеме који су се тicali оба поменута аспекта. Тако, у случају α -токоферола (витамина Е), једног од нејефикаснијих и најчешће коришћених антиоксиданаса у дермокозметичким производима, долази до драстичног пада антиоксидантног дејства уколико је инкорпоран у неодговарајући носач (Di Mambro и сар., 2003).

И поред великог броја различитих носача који су данас доступни, емулзије остају далеко најпопуларније и најкоришћеније у свим производима намењеним локалном третману коже (Klein, 2005). Разлози су бројни: елегантност производа, лакоћа примене, пријатан осећај на кожи након наношења, позитивна перцепција од стране потрошача-корисника, а као врло битну треба истаћи и инхерентну способност ових система да делују емолијентно и додатно хидрирају кожу (Al-Bawab и Friberg, 2006). Такође, хидратација повољно утиче на дерматитис који је пратећи симптом фотоостареле или коже оштећене утицајем оксидативног стреса. Међутим, набројане позитивне особине емулзија као носача могу се испољити само уколико је задовољена физичкохемијска стабилност. Ако узмемо у обзир чињеницу да су емулзије термодинамички нестабилни системи, формулисање стабилних емулзионих носача претходно наведених особина представља изазов за сваког технолога (Eccleston, 1997).

Осим наведених општих захтева које треба испоштовати при формулисању емулзионих и других носача за дермокозметичке производе, у случају АНАs треба имати у виду њихове особине које могу утицати на квалитет и карактеристике финалне емулзије. Што се тиче аспекта безбедности, козмецеутици који садрже

АНАs су врло често намењени апликацији на кожу са нарушеном баријерном функцијом, те носач мора бити безбедан, не сме додатно да оштећује кожу, шта више пожељно је да смањује TEGV (енг. *transepidermal water loss*, TEWL). Са аспекта физикохемијских карактеристика, кисела природа свих АНАs, тј. садржај недисосоване киселине који је активни састојак неопходан за деловање (Yu и Van Scott, 2001) сужава избор емулгатора који стабилишу емулзије као најчешће носаче за АНАs. У стабилизацији крема са киселим КАС традиционално се користе глицеролмоностеарат самоемулгујући (GMS_{se}) односно комбинације етоксиланих масних алкохола и масних амфифила (Yu и Van Scott, 2001). У суштини, у питању су углавном кисело- стабилни јонски и нејонски емулгујући воскови. Анјонске ПАМ, које су најчешће компоненте јонских емулгујућих воскова, имају изражену способност везивања за протеине коже што доводи до њеног исушивања и оштећења (Bárány, 2000). Мешани емулгатори и емулгујући воскови који се састоје од масних алкохола и нејонских површински активних материја (ПАМ) дуго су представљали први избор при формулисању дерматолошких и козметичких емулзија. Као најчешћи разлог наводи се умањен потенцијал за иритацију у односу на анјонске ПАМ, компатибилност са већином супстанци, стабилности при различитим рН, али и могућност да се, избором погодних компонената, утиче на садржај везане воде у систему и самим тим на контролисану хидратацију коже (Junginger, 1997; Savić 2004).

Од нејонских ПАМ, у поменуте сврхе углавном се користе оне које у свом хидрофилном делу садрже велики број полиоксиетилених (ПОЕ) група. Ланци ПОЕ, због јаке хидрофилности интензивно везују воду и у току складиштења крема, па долази до накнадне структурације (промене конзистенције очвршћавањем) (Eccleston, 1997) што углавном резултује лошим апликативним и естетским особинама емулзија. Емулзије стабилисанае оваквим емулгаторима могу такође иритирати кожу и повећати ТЕГВ (Bárány и сар., 2000), те је потребан велики опрез при формулацији, да би се добио препарат оптималних апликативних особина и прихватљиве безбедности. Емулгатори који у свом молекулу садрже велики број ПОЕ група (енг. *polyethylene glycol*, PEG) углавном су такође кисело-стабилни. Међутим, из набројаних разлога, употреба ових емулгатора као стабилизатора емулзионих носача за КАС или лекове могла би

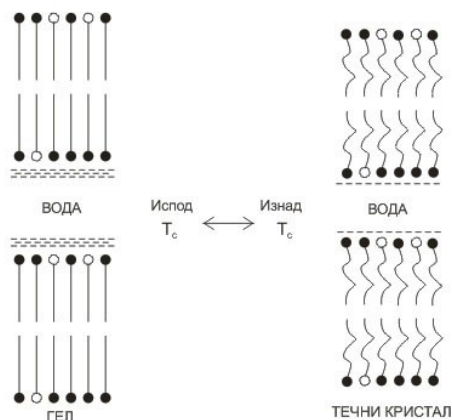
бити неадекватна. Ова чињеница говори у прилог истраживању и промоцији новијих, безбеднијих емулгатора који би имали нарочит значај при формулацији емулзија/емулзионих носача који се користе у третману оштећене као и свих стања коже код којих је индикована употреба АНАs и других супстанци проблематичног профила безбедности.

При формулацији дермофармацеутских и дермокозметичких емулзија, у складу са владајућим трендом дизајнирања носача унапређених карактеристика, велика пажња придаје се колоидним системима као што су дисперзије течних кристала (Савић, 2004). Тако формулисане емулзије стабилисане су фазом течних кристала која је слична и компатибилна структури липида у SC (сматрају се благим за кожу), поседују потенцијал за инкорпорирање и хидрофилних и липофилних супстанци (Makai и сар., 2003) и пружају могућност да се при формулацији емулзија утиче на могућност контролисане хидратације коже (Junginger, 1997; Савић 2004) што такође зависи од типа употребљеног сурфактанта и масног алкохола.

1.5.1. Емулзије стабилисане фазом течних кристала – структура и примена

Модификована IUPAC-ова дефиниција наводи да су емулзије хетерогени дисперзни системи код којих су течне капљице и/или течни кристали дисперговани у другој течности (Nielloud и Marti-Mestnes, 2000). Међутим, **теоријом гелске мреже** објашњава се феномен стабилизације емулзионих система помоћу мешаних емулгатора (Barry и Rowe, 1989; Eccleston 1997, 2001, 2010; Junginger, 1997). С обзиром да су мешани емулгатори, односно емулгујући воскови који се састоје од масних алкохола и нејонских ПАМ емулгатори избора приликом израде дерматолошких и козметичких емулзија типа уље у води (У/В), познавање теорије гелске мреже јако је битно при формулацији нових препарата. Наиме, утврђено је да је за стабилност емулзија стабилисаних наведеним емулгаторима одговорно формирање специфичних ламеларних фаза, (течно-кристалних и гел), које су у стању да инкорпорирају велике количине воде. На микроструктуру ових емулзија, а на тај начин и на њихове особине може се утицати у фази формулације (Junginger, 1997). Из тог разлога, познавање теорије гелске мреже је од фундаменталног значаја за развој формулација пожељних физичкохемијских, апликативних и функционалних карактеристика.

Течно-кристалне (ТК) фазе показују карактеристике и течног и чврстог агрегатног стања, те репрезентују интермедијерно тј. међустање и називају се мезофазе. Заједничко својство са течностима је мање или више изражена способност протицања, а са чврстим телима уређено тј. кристално стање. Разликују се термотропни течни кристали (који настају загревањем и топљењем кристалних супстанци и постоје само у одређеним температурним опсезима) као и лиотропни течни кристали који настају у интеракцији молекула амфифила и одређених растварача. За фармацију углавном значај имају лиотропни течни кристали (Müller-Goymann, 2004). Молекуле које формирају лиотропне мезофазе називају се мезогени, а, као што је напоменуто, основни предуслов за њихово формирање је анизометричан облик молекула. Слабо растворни амфифили који се најчешће користе за израду дермокозметичких емулзија, углавном масни алкохоли, испољавају изражен кристални полиморфизам и под одређеним условима имају тзв α -кристални облик у коме су алкил ланци паковани унутар двослоја ламеларне фазе. Када дође у контакт са водом, овај полиморф ствара хидратисани кристал, у коме је одређена количина воде инкорпорирана између поларних група молекула амфифила у низу. У присуству мале количине јонске или нејонске ПАМ долази до бубрења хидрата и настаје набубрела α -кристална гел фаза (мезофаза), која се карактерише присуством ламеларних двослојева изграђених од компонената емулгујућег воска наизменично одвојених двослојевима воде. Капацитет бубрења амфифила је нешто мањи у присуству нејонских ПАМ. Загревањем, гел фаза има способност да се на одређеној температури (тзв. транзиционој тачки тј. транзиционој температури T_c) трансформише у фазу са алкил ланцима у флуидном тј. неуређеном стању. Ова фаза не бубри тако интензивно као нискотемпературна гел-фаза и назива се ламеларна течно-кристална фаза (Слика 5).

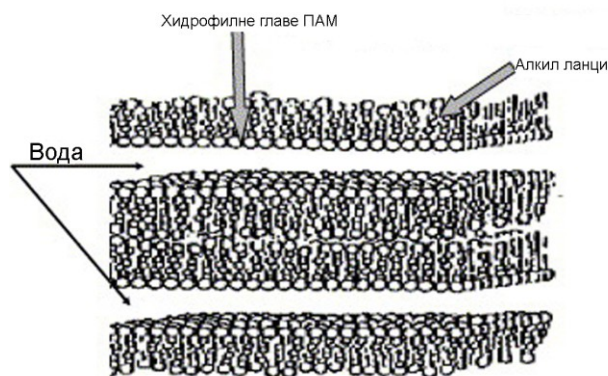


Слика 5. Схематски приказ ламеларне α -кристалне гел фазе тј. ламеларне течно-кристалне фазе на температурама изнад и испод T_c

1.5.1.1. Методе за карактеризацију течних кристала

(Hiltrop 1993; Fairhurst и сар., 1998; Makai и сар., 2003; Müller-Goyman, 2002, 2004; Savic и сар., 2009a)

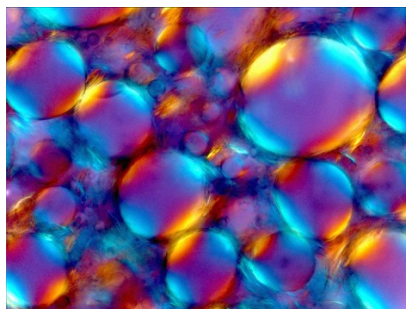
Најчешћа мезофаза када су у питању површински активне материје је лиотропна ламеларна фаза (L_α) код које су молекуле уређене у двослојеве раздвојене слојевима воде, док је двослој основна поновљива структурна целина (Слика 6). Гел фаза (L_β) се састоји од липидних двослојева и слојева воде, али су алкил ланци у уређеној конформацији те она поседује већи вискозитет.



Слика 6. L_α течна ламеларна фаза

Постоји шест врста ТК фаза: ламеларна, хексагонална, кубна, нематична, гел и интермедијерна. За идентификацију и карактеризацију лиотропних ТК користе се следеће методе:

Поларизациона светлосна микроскопија (ПМ) – Лиотропни ТК, изузев кубне мезофазе, као и прави кристали показују својство двоструког преламања поларизоване светлости. Овај феномен може се запазити помоћу поларизационог микроскопа; са постављеном додатном λ -плочицом која поседује изражено својство преламања под микроскопом се добије текстура обојена у жуту, тиркизну и ружичасту боју. Ова врста микроскопије користи се у сврху визуелизације и карактеризације фазе течних кристала у емулзијама. Ламеларна мезофаза има изглед тзв. уљаних пруга са инсертованим малтешким крстовима који настају као последица постојећих дефеката присутних код ламеларне фазе, односно концентричног постављања равни слојева; код неких ламеларних мезофаза дефекти преовладају па на микрографији нема уљаних пруга већ у структури доминирају малтешки крстови (Слика 7). Хексагонална мезофаза препознаје се по типичној структури која подсећа на вентилатор, мада може бити и без одређеног геометријског облика.



Слика 7. Фаза течних кристала ламеларног типа (обојена тиркизно и жуту) у емулзији стабилизованог мешаним АПГ емулгатором- микрографија добијена уз коришћење λ -плочице-увеличање 600 пута

Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ) – Микроструктура течних кристала визуелизује се електронским микроскопом који поседује велику моћ увеличања. У ове сврхе обично се користи увећање 4000X. Емулзиони узорци могу се на овај начин микроскопирати тек након специјалне обраде применом технике ломљења замрзнутог узорка (енг. *freeze fracture technique*) с обзиром да су то системи који садрже воду и не могу опстати под утицајем вакуума електронског микроскопа. Припрема узорка врши се на тај начин што се узорак прво нагло хлади на -196°C или -210°C , а затим насумице ломи на -100°C и сенчи слојем платине што производи контрастацију. Применом поменуте технике

припрема се реплика узорка која се потом посматра ТЕМ-ом, при чему је могуће визуелизовати и квалитативно окарактерисати микроструктуру узорка.

Реологија – Емулзије стабилисане помоћу ТК су генерално нењутновски системи, при чему различити типови ТК испољавају различите реолошке карактеристике. Кубна и хексагонална фаза услед ниске проточности и велике структурне уређености показују пластични тип, док се ламеларна фаза карактерише псеудопластичним типом течења услед релативно велике проточности. Из тог разлога осцилаторна мерења су метод избора за одређивање еластичности ових система, где се применом контролисаног стреса могу испитати и квантификовати њихове вискоеластичне карактеристике.

Диференцијална скенирајућа калориметрија (ДСЦ) – је метода којом се одређује промена ентропије (ΔS) или промена енталпије (ΔH) у систему и која омогућава директно калориметријско мерење енергије реакције и енергије трансформације, специфичне топлоте и сл. Овом методом могуће је, уствари, детектовати и окарактерисати енергетске промене које се унутар система стабилисаних различитим типовима ТК одигравају при фазним променама. Промена енталпије (ΔH) доводи до појаве ендотермних или егзотермних сигнала у зависности од тога да ли се транзиција одиграва услед утроска или је прати ослобађање енергије. Транзиција из кристалног у аморфно стање захтева много енергије, па се применом ДСЦ методологије може релативно лако детектовати и окарактерисати. Међутим, када се ради о фазним прелазима из кристалног у ТК стање или о транзицији између различитих типова ТК, они су праћени знатно мањим енергетским променама; уколико се примењује ова методологија, мора се водити рачуна о осетљивости мерног уређаја и лимиту детекције.

Термогравиметрија (ТГ) – ова метода, као и ДСЦ, спада у методе термичке анализе којима се, уствари, испитују промене одређених физичких параметара система услед промене температуре. ТГ омогућава детекцију и квантификацију различитих "типова" воде тј. воде која је на различите начине инкорпорирана у емулзиони систем па самим тим и присуство одређених структура у њему. Различито везане фракције воде у емулзији стабилисаној фазом ТК захтевају различиту количину енергије ради ослобађања из система. Губитак воде из система одређује се у функцији температуре. Обично се диференцијација врши на

основу гравиметријског одређивања у следећим температурним опсезима: 20-50⁰С (сматра се да се у овом опсегу ослобађа слободна тј. *bulk* вода), 50⁰-70⁰С (ослобађа се вода капиларним силама везана унутар липофилне гел фазе) и 70⁰ - 100⁰С (при овим температурама ослобађа се фракција воде која је најачим силама везана и то унутар хидрофилне гел фазе или између ламела ТК фазе).

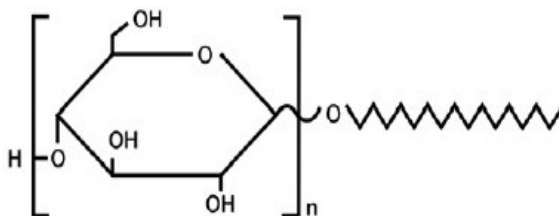
Дифракција X-зрака под малим (SAXD) и великим (WAXD) углом (енг. *X-ray diffraction/scattering*) – ово је најпотпунија техника која се може користити у циљу идентификације и карактеризације течно-кристалних фаза. Наиме, уз помоћ дифракције икс-зрака могу се детектовати карактеристичне интерференције као последица специфично уређене микроструктуре испитиваних система.

Емулзије на бази јонских и нејонских мешаних емулгатора (чија хидрофилна компонента у структури садржи ланце ПОЕ) и поред бројних описаних недостатака и даље су широко распрострањене као носачи за дермокозметичке производе. Највећи број козмецеутика са АНАs, РНАs и АВАs као алтернативама АНАs на тржишту стабилисано је управо наведеним емулгаторима што често доводи у питање њихову примену, нарочито у случају осетљиве коже са нарушеном баријерном функцијом.

1.6. Алкил полиглукозиди

Алкил полиглукозиди (АПГ) (енг. *Alkyl polyglucosides*, APG) представљају новију групу такозваних "природних" нејонских емулгатора без етокси група у молекулу (енг. *PEG-free*). Заправо, оксиетиленске групе које су карактеристика конвенционалних нејонских емулгатора замењене су у АПГ природним холозидима (ОН групама шећера, Слика 8) (Von Rybinski, 1996). Дефиниција "природних" сурфактаната обухвата ПАМ добијене из сировина природног порекла. Уопште, тзв. шећерни сурфактанти, у које осим АПГ спадају још и шећерни естри и алкилглукамиди, последњих година привлаче пажњу истраживача јер поседују много боље особине у односу на стандардне ПАМ. То се пре свега односи на њихову ниску токсичност, могућност добијања из обновљивих природних извора и биодеградабилност. Све те особине, укључујући и мултифункционалност (АПГ се такође користе у производњи детерџената, прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији) условиле су статус АПГ као истакнутог представника шећерних емулгатора (Holmberg, 2001; Stubenrauch,

2001). Истиче се потенцијал примене ових емулгатора у дермофармацији и козметологији с обзиром на нетоксичност тј. "благод" (енг. *mildness*), као и потенцијал да, због присуства великог број хидроксилних група у молекулу, обезбеђују додатно влажење коже (Holmberg, 2001).



Слика 8. Општа структурна формула молекула алкил полиглукозоида

Упоредном студијом још 1998. године испитивани су ефекти које на кожи проузрокују различити шећерни, али и ПОЕ – нејонски емулгатори употребом тзв. корнеосурфаметријске методе на *ex vivo* хуманим корнеоцитима. Овом методом се квантитативно одређује степен оштећења SC до кога могу довести сурфактанти. Показано је да шећерне ПАМ уопште поседују бољи токсиколошки профил (тј. нижи степен потенцијала за иритацију коже), док је мешани емулгатор *Cetearyl Glucoside&Cetearyl alcohol* као представник АПГ показао задовољавајућу компатибилност са кожом, много бољу него ПОЕ- нејонски емулгатори, али и већина осталих шећерних емулгатора (Simon и сар., 1998).

Дисперговање масних алкохола у смеси АПГ и водене фазе загревањем доводи до стварања различитих ламеларних фаза (Tesmann и сар., 1997). Данас се на тржишту налазе комерцијалне смеше АПГ и масних алкохола тзв. мешани емулгатори типа АПГ који су намењени првенствено формулацији емулзионих носача за козметичке производе и дермофармацеутске препарате. Међутим, за разлику од емулзија стабилисаних емулгаторима са ПОЕ групама у молекулу, механизми стабилизације и физичкохемијске особине емулзија стабилисаних самим АПГ и различитим мешаним емулгаторима овог типа недовољно су проучавани и то тек последњих десетак година. Такође, погодности система са различитим АПГ емулгаторима да буду носачи за различите КАС у смислу физичкохемијских карактеристика, компатибилности, ефикасности и безбедности система нису довољно испитане. Док произвођачи тврде да су АПГ кисело-

стабилни емулгатори (Seppic, 2001a), неки аутори наводе да чак и врло мале количине електролита доводе до коацервације у дисперзијама АПГ кратког ланца (Von Rybunski и Hill, 1998), или да додатак киселих супстанци изазива њихову хидролизу (Holmberg, 2001).

Истраживања на пољу козметологије, усмерена су ка формулацији производа који су ефикасни, нешкодљиви и пријатни за кожу, а истовремено естетски и еколошки прихватљиви. Према томе, емулзиони носачи стабилисани АПГ мешаним емулгаторима (као алтернативама конвенционалним јонским и нејонским мешаним емулгаторима) са инкорпорираним ЛА (која би могла бити прихватљивији, али такође је недовољно проучен алтернативни састојак традиционалним АНАс неповољних особина) потенцијално би могле да задовоље све неопходне савремене захтеве који се тичу дермокозметичких производа. Из тих разлога, АПГ мешани емулгатори, и то они различитих дужина алкил ланца АПГ, тачније C12/C14, C16/C18 и C20/C22, биће предмет истраживања ове докторске дисертације.

1.6.1. Cetearyl Glucoside&Cetearyl alcohol (INCI)

АПГ мешани емулгатор INCI/Cetearyl Glucoside&Cetearyl alcohol (C16/18 АПГ) се на тржишту може наћи, између осталих, и под комерцијалним именом Sepineo SETM68 (произвођача Seppic, Француска). Један је од највише проучаваних емулгатора овог типа. Проучавани су физичкохемијска стабилност уз потпун увид у колоидну структуру емулзија стабилисаних овим емулгатором *per se* и након инкорпорирања одређених активних супстанци, естетске и апликативне карактеристике као и *in vivo* и *in vitro* ефекти емулзија на кожу (Савић, 2004). Simon и сар. (1998) наводе да Cetearyl Glucoside&Cetearyl alcohol има ХЛБ вредност 6, али да стабилише емулзије типа У/В.

Мешани емулгатор Sepineo SETM68 пре извесног времена сертификован је од стране америчке Food and Drug Administration (FDA) као ексципијенс за примену у фармацији под именом *Alkyl glucoside*. Истовремено, у Јапану је одобрен од стране Министарства здравља за употребу при изради тзв. квази лекова, што је јапански пандан терминима дермокозметички производи/козмецеутици (Seppic, 2001a). Проучавана је колоидна структура и

потенцијал за контролисану хидратацију коже емулзија стабилисаних овим емулгатором (Savić, 2004). Закључено је да емулгатор остварује лиотропну интеракцију са водом и емолијенсима унутар различитих У/В емулзија задовољавајуће стабилности (у бинарним, тернарним као и у мултикомпонентним системима), што се манифестује присуством ламеларне фазе α -кристалног гела и ламеларне фазе течних кристала доминантно присутне око капи уља код емулзионих система. При томе, тип и удео употребљене масне фазе утицали су на карактеристике ламеларне гел фазе као и обим фракције интерламеларно везане воде. Кремови стабилисани овим емулгатором, због присуства различитих фракција воде које се ослобађају под различитим условима, имају способност продуженог влажења коже што им даје нарочиту препоруку као носача за дермокозметичке производе и дерматолошке лекове. Односно, шећерни емулгатор Sepineo SETM68 значајно доприноси влажећем потенцијалу кремова и повољно делује на репарацију кожне баријере како код нормалне, тако и код оштећене коже. Утврђено је такође да испитиване емулзије поседују добре естетске и апликативне особине, и да се колоидна структура тј. потенцијал да контролисано влаже кожу може мењати варирањем удела и састава масне фазе (Savić, 2004). Такође, додавање неких супстанци као што је уреа у емулзије стабилисане поменути емулгатором може утицати на колоидну структуру система (Savić и сар., 2008).

Произвођач у спецификацији ове сировине даје податак да је емулгатор стабилан при различитим рН вредностима и у средини богатој електролитима, тј. да глукозидна веза између хидрофилног и липофилног дела даје молекулу АПГ стабилност и резистентност на хидролизу. Показан је повољан токсиколошки профил као и одсуство комедогеног ефекта на кожи емулзија стабилисаних помоћу Sepineo SETM68 емулгатора (Seppic, 2001a). Такође, утврђен је и повољан безбедносни профил при локалној примени поменутих емулзија на кожу уз јако добру корелацију између резултата добијених *in vivo* и *in vitro* методама (Savić и сар. 2009a, 2009b). И ова чињеница говори у прилог даљим испитивањима емулгатора Sepineo SETM68 као потенцијалног ексципијенса за примену у дермофармацеутским препаратима и дермокозметичким производима.

1.6.2. Coco glucoside & Cetearyl alcohol (INCI)

У каталошком материјалу (Seppic, 2001b) наводи се да је емулгатор Coco glucoside&Cetearyl alcohol (C12/14 АПГ, комерцијални назив MontanovTM82 Seppic, Француска), вишенаменска емулгујућа база која има способност емулговања различитих типова масних састојака без обзира на њихову концентрацију у формулацији. Овај емулгатор је у целини добијен из сировина биљног порекла и садржи глукозу добијену из биљних извора и масне алкоhole екстраховане из биљних уља (палминог и кокосовог). Такође, наводи се да је компатибилан са већином стандардних КАС и стабилан у присуству електролита, док су емулзије које стабилише отпорне на изразито ниске температуре (и до -25⁰С). Произвођач наводи да глукозидна веза између хидрофилног и липофилног дела даје овом молекулу стабилност и резистентност на хидролизу. MontanovTM82 је, због своје релативно високе хидрофилности, потпуно дисперзибилан у води, тј. спонтано образује стабилне емулзије у концентрацији 1%, без додатка масне фазе. Као ни у случају осталих АПГ мешаних емулгатора који ће овде бити испитивани, произвођач не даје информацију о саставу у смислу тачног односа АПГ и смеше масних алкоhole, нити о његовој ХЛБ вредности. Међутим, на основу претходног навода о дисперзибилности у води, као и на основу дужине ланца алкил глукозида може се претпоставити да ће ХЛБ вредност бити значајно већа у односу на АПГ емулгаторе веће дужине алкил ланца који ће такође бити испитивани у оквиру ове дисертације. Са друге стране, тврди се да овај емулгатор има одлична емулгујућа својства и у емулзијама које имају висок проценат масне фазе (Seppic, 2001b).

Произвођач наводи да овај емулгатор нема потенцијал да иритира кожу, изазива хемолизу еритроцита, ни денатурацију оксихемоглобина; лако је биодеградабилан (Seppic, 2001b). Оскудне су информације о његовим перформансама (у смислу стабилизације емулзија-носача за дермокозметичке и дермофармацеутске препарате). Savić и сар. (2011) испитивали су овај емулгатор у серији бинарних и тернарних система. Испитивана је физичка стабилност емулзија, њихове реолошке и сензоријелне карактеристике и вршена *in vivo* процена способности да хидрирају кожу. Утврђена је лиотропна интеракција емулгатора са водом уз формирање ламеларних структура. Испитивани системи поседовали су добре реолошке особине док се потенцијал за хидратацију коже

мењао у зависности од удела различитих фракција воде у систему слично емулзијама стабилисаним емулгатором Sepineo SE™68. Као недостатак се наводи да је потребна релативно висока концентрација овог емулгатора у циљу израде стабилних емулзионих система задовољавајућих апликативних и естетских особина за примену у козметологији.

1.6.3. Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol (INCI)

Као и у случају претходно наведених АПГ емулгатора, и Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol (C20/22 АПГ, комерцијални назив Montanov™202, Seppic, Француска) је добијен у целини из биљних сировина и то из глукозе екстраховане из пшенице, док је масни део екстрахован из семена уљане репице. Као што се и може закључити на основу различитих дужина алкил ланаца АПГ, Montanov™202 је липофилнији у односу на Sepineo SE™68. Нарочито је погодан за израду емулзија намењених нези и третману масне коже, са дугоделујућим хидратишућим ефектом. Произвођач тврди да сам АПГ емулгатор појачава деловање влажећих састојака који су у традиционалној употреби (глицерин, уреа, хијалуронска киселина) (Seppic, 2001c).

In vitro испитивањима доказано је да овај емулгатор не изазива примарну или кумулативну иритацију коже, па се Montanov™202 препоручује за производе за негу и третман осетљиве, дехидриране коже склоне акнама. Произвођач тврди да је хемијски стабилан и да има способност емулговања у јако киселој и јако алкалној средини. Компатибилан је са оксидационим средствима, базама и киселинама па се и препоручује у изради емулзионих носача за АНАs (Seppic, 2001c). Висока тачка топљења овог емулгатора условљава да се емулзије морају израђивати на температури од 80-85⁰С. Произвођач препоручује да однос емулгатора и масне фазе буде минимум 1:4, и да се обавезно употребљавају костабиллизатори као што је нпр. ксантан гума (око 0,5%) (Seppic, 2001c). Проучавана је колоидна структура и потенцијал за контролисану хидратацију коже бинарних и тернарних емулзионих система стабилисаним овим емулгатором (Lukić и сар., у штампи). При томе је утврђено да су стабилисани синергизмом течно-кристалне и гел кристалне фазе. *In vivo* испитивања показала су да емулзије стабилисане овим емулгатором поседују одличан потенцијал за хидратацију коже, као и да након апликације могу смањити ТЕГВ. На основу резултата ове студије

претпоставља се да системи стабилисани овим АПГ мешаним емулгатором могу утицати на продужено ослобађање инкорпорираних активних супстанци, без обзира да ли су оне хидрофилне или липофилне.

1.6.4. Myristyl alcohol&myristyl glucoside (INCI)

Myristyl alcohol&Myristyl glucoside (C14 АПГ, комерцијални назив MontanovTM14, Seppic, Француска) поседује сличан токсиколошки профил и биодеградабилност као и остали АПГ емулгатори (Seppic, 2001d). Препорука је да се ова ПАМ користи као коемулгатор у концентрацији 0,5-2% за У/В системе зависно од жељене конзистенције. Као ни у случају осталих АПГ који ће се испитивати у оквиру ове докторске дисертације, произвођач не даје информације о његовој ХЛБ вредности, већ наводи да се ради о У/В емулгатору (Seppic, 2001d). MontanovTM14, употребљен као коемулгатор (1% м/м) значајно повећава конзистенцију емулзије (и до 4 пута) без обзира на употребљен емулгатор, стабилишући је током времена чак и на вишим температурама; вискозитет емулзије остаје непромењен у условима складиштења (на 40-50⁰С) шест месеци након израде (Seppic, 2001d). За емулзије са овим коемулгатором се наводи да имају јако повољне естетске и апликативне карактеристике у поређењу са емулзијама са традиционалним коемулгаторима каква је нпр. стеаринска киселина, која даје масну храпаву текстуру кад се нанесе на кожу (Seppic, 2001d).

1.7. Испитивања козметичких и дермокозметичких производа

Доношењем 6. амандмана 1993., а потом 2003. године и 7. амандмана на Козметичку директиву 76/768/ЕЕС године намеће се јасна потреба за валидном, објективном и стручно верификованом проценом свих декларисаних ефеката козметичких производа (eng. *claim substantiation*), као и њихове безбедности. Уредба ЕУ 1223/2009 о козметичким производима наводи и неопходност испитивања токсиколошког профила супстанци које улазе у састав козметичког производа. Посебно се наглашава значај процене локалне токсичности, потенцијала за сензибилизацију коже и фотоиндуковане токсичности (Regulation EC No 1223/2009). Потреба увођења дермокозметичких производа/козмеутика, као нове категорије која представља прелаз између дерматолошког лека и козметичког производа још више наглашава потребу за пружањем доказа о

ефикасности и безбедности, али и потребу за валидним и ефикасним методама процене наведених аспеката (Rieger, 2002). Студије процене ефеката козметичких производа раније су се углавном заснивале на примени метода визуелних скорова тј. субјективној процени одређених параметара од стране квалификованог лица (дерматолога) на основу прихваћене скале. Користиле су се (и још увек се користе где је то неопходно) инванзивне методе биопсије коже и *in vitro* методе на ћелијама у култури. Испитивања на животињама такође су коришћена за процену одређених аспеката ефикасности, мада су животиње углавном коришћене за процену безбедности козметичких производа. 7. амандманом Козметичке директиве забрањују се испитивања на животињама, осим у случајевима где не постоје алтернативе, што се односи на испитивања одређених токсиколошких аспеката (Regulation EC No 1223/2009). Научни и комерцијални интерес да се ефекти козметичких производа процене објективно, и то употребом *in vivo* испитивања на хуманим добровољцима као најмеродавнијег начина квантификације, али и етички разлози употребе неинванзивних испитивања, убрзале су последњих година развој тзв. метода биоинжењеринга коже, тачније метода које се заснивају на биофизичким мерењима на кожи.

Ове биофизичке методе базирају се на физичким принципима које користе одговарајући мерни инструменти, у циљу *in vivo* квантификације одређених параметара коже (Pierard, 2003). На тај начин мере се биофизички параметри који су у директној вези са структуром и функцијом коже - влажност, баријерна функција, еластичност, рН, боја итд., и то једноставним контактом са површином коже употребом адекватне сонде. Праћење промена ових параметара пре и након третмана коже козметичким (дермокозметичким) производима омогућава процену ефеката, као и одређених аспеката њихове безбедности. Често се ове неинванзивне технике користе и у фундаменталним истраживањима у дерматологији нпр. у циљу карактеризације и разумевања поремећаја кератинизације, атопијског дерматитиса, састава липидног матрикса SC и других (Rawlings, 2003; Curdy и сар., 2004). Специфичност и осетљивост већине биофизичких метода је висока, али је основни недостатак у томе што многи фактори спољашње средине могу значајно утицати на резултате мерења (Pierard, 2003). Сваки експеримент треба да поседује протокол студије дизајниран тако да

резултати, уз обраду адекватним статистичким методама, доведу до релевантних одговора на претходно прецизно формулисана питања (Loden, 1995; Serup, 1995; Pierard, 2003).

Ефекти козметичких производа биофизичким мерењима релевантних параметара на кожи процењују се обично у дупло слепим рандомизованим студијама апликацијом испитиваних производа на кожу здравих хуманих добровољаца, и то обично на кожу унутрашње (воларне) стране подлактица, лица или леђа (Marrakchi и Maibach, 2007). Процена се врши поређењем са вредностима измереним на нетретираној кожи (контрола), кожи третираној плацебом или производима са тржишта који показују сличне ефекте (Pierard, 2003). Интерпретација података захтева адекватну експертизу која узима у обзир и техничке аспекте мерних инструмената, као и физиолошке параметре који могу имати утицаја на исход мерења. Параметар који се мери мора бити релевантан за процену одређеног ефекта, јасно дефинисан и објективан. Наиме, неки од биофизичких параметара који се мере у поменуте сврхе често представљају релативне, а не апсолутне вредности мерених величина (Pierard, 2003), те у складу са тим треба изводити закључке који се тичу ефеката испитиваног третмана. Нарочиту пажњу треба поклонити избору добровољаца као и статистичким методама обраде добијених података (Pierard, 2003, Varel и сар., 1999; Waller и Maibach, 2005; Hadgraft и Lane, 2009). Ове студије морају бити изведене у складу са Хелсиншком декларацијом (1964) и ревизијама овог документа (World Medical Association, 1989).

1.7.1. *In vivo* карактеризација ефеката и процена безбедности дермокозметичких производа са АНАs на кожи – биофизичке методе

Као што је већ речено, ефекти примене производа са различитим АНАs су бројни, и већина њих може се квантификовати мерењем адекватних биофизичких параметара на кожи.

1.7.1.1. Методе за процену влажности коже

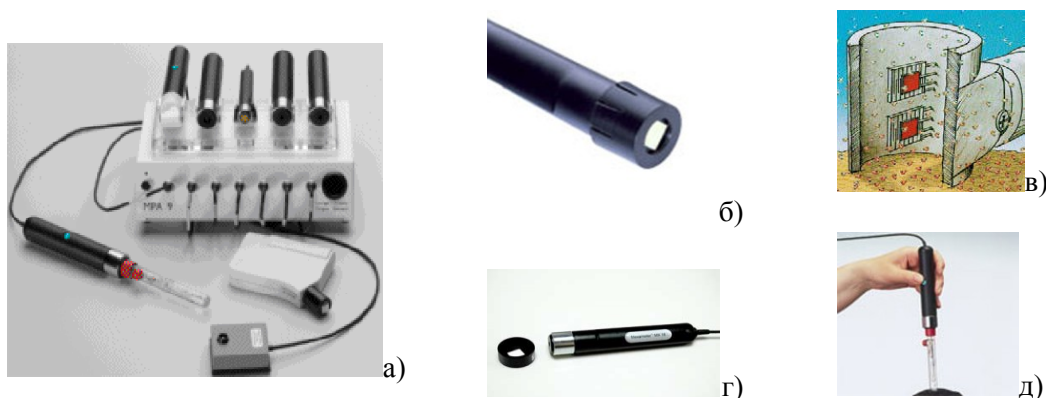
Повећање стања хидратисаности SC применом дермокозметичких производа са АНАs резултат је неколико механизма деловања ових киселина на кожу, о чему је претходно било речи. У циљу процене садржаја воде у кожи развијено је неколико техника које се заснивају на мерењу различитих биофизичких параметара, пре

свега електричних карактеристика коже. Те методе постале су јако популарне и коришћене последњих година захваљујући једноставној употреби, поузданости и релативно ниској цени (Berardesca, 1997). Електричне карактеристике коже повезане су са садржајем воде у SC, тако да се стање хидратисаности посредно може проценити мерењем параметара као што су: импеданца (Z), укупни отпор протицању једносмерне струје (R) и капацитивност коже (C). Најчешће коришћени комерцијални уређаји су Corneometer[®]CM825 (Courage&Khazaka), DMP[®]9003 (NOVA) и Skicon[®]-200EX (IBM, Hamamatsu). Ови уређаји користе мерне електроде различитих карактеристика. Заједничко за све је да дају бројне вредности параметара хидратисаности коже у арбитрарним јединицама које нису увек линеарно корелисане са стањем хидратисаности SC. На исход мерења параметара сваким од уређаја могу утицати бројни фактори: фактори спољашње средине, присуство јона из зноја испитаника, присуство супстанци које интерагују са кератин-вода везом у кожи (Clarys и сар., 2011б). Без обзира на употребљени апарат, морају бити задовољени одређени општи критеријуми при мерењу (Berardesca, 1997; Barel и сар., 1999; Fischer и сар., 2001; Heinrich и сар., 2003; Clarys и сар., 2011а):

- испитивања треба спроводити у климатизованим просторијама константне собне температуре (20-23⁰С) и влажности (40-60% RH)
- пре приступања мерењу, добровољци треба да се адаптирају на услове простора у коме се изводи мерење (у трајању од око 30 мин) при чему требају бити физички и психички релаксирани
- испитивања је најбоље изводити апликацијом производа на кожу воларне стране подлактице
- пожељно је да само једна, обучена особа изводи само мерење.

Corneometer[®]CM825 – ова сонда мери капацитивности коже као диелектричног медијума. Сама сонда (Слика 9б) у стању је да детектује и најмању промену диелектричне константе мереног материјала, која се на површини коже јавља као одраз промене стања хидратисаности с обзиром да вода има високу диелектричну константу (ϵ_r). Тачност мерења је висока, а коефицијент варијације иноси 3-11% (Clarys и сар., 2011б). Једна од највећих предности ове методе је да вода из производа минимално утиче на исход мерења. Мерење се изводи

применом електроде (површине 49 mm²) притиском од 1,6N/m² који се контролише уз помоћ уграђене опруге. Садржај воде одређује се на малој дубини SC (10-20µm) чиме се елиминише утицај дубљих слојева коже на исход мерења. Промене у тоталној капацитивности изражавају се у арбитрарним јединицама (релативне корнеометарске јединице енг. *relative corneometric units, rcu*) у опсегу 0-120. Одређивање степена хидратације коже спроводи се у циљу карактеризације њеног физиолошког стања, те се често може користити као додатни параметар при процени аспеката безбедности локално апликованог производа.



Слика 9. а) Комбиновани инструмент за мерење параметара биоинжењеринга коже (Multi Probe Adapter System MPA[®]9, Courage&Khazaka) и сонде: б) Corneometar[®]CM 825; в) TEWA-meter[®]; г) Мехаметер[®] MX18; д) pHmeter[®]900.

1.7.1.2. Методе за испитивања ТЕГВ из коже

Мерење ТЕГВ је врло популарна и често употребљавана техника (Kuss и Diergen, 1998; Rogiers, 2001). Примену је нашла у разним истраживањима у дерматологији. У суштини, ТЕГВ је величина чија вредност рефлектује степен континуалне дифузије воде из унутрашњости коже, кроз SC, ка спољашњој средини. Мерења ТЕГВ у козметологији се углавном обавезно налазе у склопу потврде ефикасности неких производа (производи за чишћење коже, хидратацију, за заштиту од УВ зрака и за третман коже након излагања сунцу; производи који репарирају баријерну функцију коже; производи за бријање) или *in vivo* процене безбедносног профила козметичког производа (Rogiers, 2001). Препарати који садрже АНАс као активне супстанце начелно утичу на смањење кохезионих сила између корнеоцита. Појачана десквамација површинских слојева коже, јако ниска рН вредност формулација и брз продор молекула АНАс малих димензија кроз

кожу доводе до слабљења баријерне функције коже и иритација (Van Scott и Yu, 2004). Истраживања су показала да водени раствори различитих концентрација неких АНАs старије генерације могу значајно оштетити баријерну функцију коже, као и да постоји веза између интензитета еритема на кожи, степена субјективно процењене иритације и пораста ТЕГВ после примене козметичких производа са АНАs (Sinaiko и Maibach, 2006). За мерење ТЕГВ најчешће се користе уређаји: TEWA-meter[®] (Courage&Khazaka, Немачка), Evaporimeter[®] (Servo Med, Шведска) и DermaLab[®] (Cortex, Данска). Њихови мерни принципи у основи су исти и заснивају се на мерењу напона паре. Под равнотежним условима површина људске коже окружена је граничним слојем водене паре унутар кога постоји градијент који је у корелацији са градијентом воде унутар SC. Та корелација је уствари функција квалитета кожне баријере (Barel и сар., 1999).

Tewameter[®] TM 210 (Courage&Khazaka, Немачка) – као и при мерењу осталим наведеним апаратима, мерења се изводе брзо и неинванзивно. Сонда је у облику отвореног цилиндра са два хигро и термосензора која се налазе на одређеном размаку дуж осе нормалне на раван коже (Слика 9в). На обе тачке мери се влага и температура и израчунава напон паре. Разлика између напона паре дуж градијента у директној је вези са брзином губитка воде из коже (Barel и сар., 1999; Courage&Khazaka, 2010). Сонда је јако осетљива на промену услова спољашње средине, и на тачност мерења може утицати велики број различитих параметара. Коришћење овог апарата под прописаним условима је од пресудне важности за добијање поузданих и репродуктивних резултата (Rogiers, 2001). Стандардни протоколи за рад прописани су одговарајућим Водичима издатим испред Групе за стандардизацију Европског друштва за контактни дерматитис (Pinagoda и сар., 1990) тј. као ЕЕМСО водич за процену ТЕГВ у козметологији испред истоимене групе (Европска експертска група за мерење ефикасности козметичких и других топикалних производа) (Rogiers, 2001). Чак и примена неадекватног статистичког метода при обради података мерења ТЕГВ може довести до нетачне интерпретације резултата (Kuss и Diepgen, 1998). Само мерења ТЕГВ изведена под прописаним условима и обрађена на одговарајући начин дају резултате који би се могли користити за одређивања и поређења одређених аспеката ефикасности и безбедности препарата са различитим АНАs.

1.7.1.3. Методе за процену боје коже

Пигментација коже је епидермални феномен (Лалевић-Васић и сар., 2003). Боју првенствено одређују пигменти хемоглобин, меланин, билирубин и каротен (Clarys и сар., 2000). На ове детерминанте може се утицати локалном апликацијом различитих препарата, а неки од њих су и они са АНАс. Квантификација индуковане промене боје коже користи се у циљу: испитивања карактеристика коже (осетљивост и интегритет баријере), испитивања својстава примењеног лека или КАС (концентрација, биорасположивост), карактеристика носача и ефикасности производа за заштиту од сунца (Clarys и сар., 2000). Третман коже препаратима који садрже АНАс доводи до појачане ексфолијације, док неке од њих након апликације спречавају формирање тирозиназе – кључног ензима у синтези меланина. Стога се при третману као пратећи ефекат јавља промена боје коже тј. њено белјење (Smith, 1996б). АНАс такође могу изазвати иритацију која као последицу има црвенило коже тј. еритем (Van Scott и Yu, 2004). Из тог разлога, објективна процена боје коже мерењем одређених биофизичких параметара може се користити за процену и поређење одређених аспеката ефикасности и безбедности козметичких (дермокозметичких) производа са различитим АНАс. Најчешће коришћени апарати за процену боје коже су Mexameter[®] (Courage&Khazaka, Немачка), Chromameter[®] (Minolta, Јапан) и DermaSpectrometer[®] (Cortex Technology, Немачка).

Mexameter[®] MX18 (Courage&Khazaka, Немачка) – сонда (Слика 9г) на кожи симултано мери две вредности: еритема индекс (енг. *erythema index*, EI) и меланина индекс (енг. *melanina index*, MI). Инструмент има LED диоде (енг. *Light Emitting Diode*) које емитују светлост на три различите таласне дужине. Фотодетектор затим мери интензитет светлости која се одбија од коже што подразумева мерења апсорбоване и рефлектоване светлости таласних дужина које одговарају зеленом и црвеном опсегу за хемоглобин (чиме се добијају вредности параметра EI) и црвеном и скоро инфрацрвеном за меланин (чиме се добијају вредности параметра MI) (Clarys и сар., 2000).

1.7.1.4. Методе за процену рН коже

рН вредност здраве коже креће се од 5,0-6,0, и код већине патолошких стања се повећава; код акнозне коже креће се око 7,0 док код екцема износи око 6,5-7,0 (Schmid-Wendtner и Korting, 2006). Апликација козметичких производа са киселим КАС (као што су АНАs) нормализује измењену рН вредност коже враћајући је у физиолошке границе. Тако, продужена примена препарата са 3% млечне киселине доводи до смањења рН вредности SC, док у већој концентрацији утиче на рН вредност дубљих слојева коже (Smith, 1996б). Мерење рН је најпоузданије вршити тзв. потенциометријском методом употребом стаклене планарне електроде (Waller и Maibach, 2005). Рад апарата заснива се на мерењу разлике потенцијала који се ствара између две средине (пуфер унутрашње референтне електроде – кожа) раздвојене стакленом баријером. Створени електрични напон који се мери линеарно је зависан од разлике концентрација H^+ јона између средина (Waller и Maibach, 2005).

рНmeter[®]900 (Courage&Khazaka, Немачка) – је најчешће коришћена сонда (Слика 9д) за мерење рН вредности коже (Waller и Maibach, 2005). Прецизност мерења је 0,1 рН јединица.

Све наведене сонде, које ће се уједно користити у оквиру експерименталног дела ове докторске дисертације, (Corneometer[®]СМ 825, Mexameter[®] МХ18, Tewameter[®]ТМ 210 и рНmeter[®]900) могу бити интегрални делови истоимених појединачних уређаја који читавају измерене вредности на сопственом дисплеју, или прикључне сонде уређаја Multi Probe Adapter System (МРА[®]9, сви произвођача Courage&Khazaka, Немачка) на који се може прикључити више сонди за мерење различитих параметара (Слика 9а). Апарат нема дисплеј, већ ради помоћу компјутера уз одговарајући софтвер (Courage & Khazaka, 2010).

1.7.2. *In vitro* методе процене безбедности дермокозметичких производа на кожи

Произвођачи и увозници козметичких производа на територији ЕУ према важећој законској регулативи морају поседовати досије безбедности за сваки појединачни производ као и за сировине које улазе у његов састав (Regulation EC No 1223/2009). Кључни моменат процене безбедности ових производа и сировина

је процена потенцијала за изазивање локалних (на кожи и очима) и системских нежељених ефеката (Aeby и сар., 2010). Иако се одређени аспекти локалне безбедности козметичких (дермокозметичких) производа могу проценити специфичним биофизичким мерењима на кожи, због поменутих недостатака ових метода та *in vivo* испитивања *per se* не могу се сматрати поузданим. Локална и системска безбедност козметичких производа и сировина процењивана је рутински и поуздано тестовима на животињама, што се увођењем 7. амандмана Козметичке директиве забрањује. Забрана се односи на продају на тржишту ЕУ било којег козметичког производа који је био испитиван тестовима на животињама или неком другом алтернативном методом осим оних које је валидирао Европски центар за валидацију алтернативних метода (ECVAM) или Европска организација за економску сарадњу и развој (OECD) (Aeby и сар., 2010). Забрана је ступила на снагу 2004. године и примењивала се постепено у складу са брзином развоја алтернативних метода и њихове валидације од стране надлежних органа. Коначни рок за примену забране био је март 2009. године када је наведено да тестирања на животињама морају да се прекину без обзира на доступност алтернативних метода; изузетак су три најзахтевније области испитивања, и то одређивања токсичне дозе, репродуктивне токсичности и токсикинетике супстанци и производа. Тренутно, као последњи рок за примену ове забране, без обзира да ли су до тог датума пронађене алтернативне методе, наводи се март 2013. године (Commission of the European Communities, 2004), што је дато и у одређеном члану Уредбе ЕУ 1223/2009 о козметичким производима (Regulation EC No 1223/2009).

Пошто се поменути рок ближи, а за већину наведених испитивања нису валидиране алтернативне методе (мада је неколико предложено) (Adler и сар., 2011), извесно је да ће овај рок бити продужен, јер је ипак интерес за хумано здравље у фокусу свих надлежних регулаторних органа. На развоју и валидацији испитивања која би била алтернатива тестовима на животињама се активно ради и главна покретачка снага која повезује научне, законодавне и друге институције у овој области је организација **Cosmetics Europe** (раније **COLIPA**). Она окупља преко 2000 компанија које се баве производњом козметичких (и дермокозметичких) производа. Тренутно је доступно пет алтернативних метода

којима се могу испитати четири аспекта токсичности, иначе рутински испитиваних на животињама. Четири је валидирао ECVAM, а једну OECD; преглед метода дат је у Табели 1.

Табела 1. Преглед алтернативних метода као замена за испитивања на животињама, тренутно валидираних од стране надлежних институција

| Област | Објашњење | Валидиран алтернативни метод |
|--------------------------------------|--|---|
| Корозија на кожи | Иреверзибилна деструкција ткива након локалне апликације | Transcutaneous electrical resistance (TER) тест на кожи пацова <i>in vitro</i> |
| | | Тестови на моделима реконструисане хумане коже (EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™, EST-1000™) |
| Фототоксичност индукована UV зрацима | Иритација која се јавља искључиво након излагања UV зрацима коже на коју је апликована супстанца која се тестира | 3T3 Тест |
| Перкутана апсорпција | Апсорпција супстанце кроз кожу | <i>In vitro</i> на хуманој, животињској кожи или моделима вештачке коже |
| Иритација коже | Локални ефекти на кожи након апликације-црвенило, субјективни осећај нелагодности | Тестови на моделима реконструисане хумане коже (EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™, кератиноцити у култури) |

Интерес истраживача тренутно је усмерен на алтернативне методе за испитивања потенцијала за иритацију ока, репродуктивне токсичности тј. мутагености, потенцијала за сензитизацију коже и испитивања системске токсичности (Adler и сар., 2011). За неке од ових тестова доступне су алтернативне методе, али нису валидне док их не одобре ECVAM или OECD. Што се тиче испитивања потенцијала за иритацију ока, две методе испитивања валидиране су од стране OECD-а и то Bovine Cornea Opacity Test (BCOP) и Isolated chicken eye test (ICE). Ове методе су једине доступне алтернативе у овој области са ограничењем да могу дати поуздане резултате једино при испитивањима супстанци са изузетно јаким потенцијалом да иритирају око (McNamee и сар., 2009). После интензивног рада на развоју и оптимизацији невалидираних *in vitro* метода на реконструисаној корнеи (SkinEthic Human

Corneal Epithelium-HCE) оне су тренутно у фази валидације од стране ECVAM-а и претпоставља се да ће омогућити поуздана одређивања потенцијала за иритацију ока (Bessou-Touya и сар., 2011).

1.7.2.1. Употреба реконструисаних еквивалената хумане коже у одређивању иритационог потенцијала козметичких производа

Испитивања на реконструисаним еквивалентима хумане коже представљају алтернативну могућност разним тестовима на животињама. Поред евидентних разлика у нативној и реконструисаној ("вештачкој кожи"), квалитет комерцијално доступних еквивалената достигао је такав ниво да су постали сасвим поуздана средства у испитивањима иритационог потенцијала козметичких производа (Alérée и сар., 2010). Последњих година развијени су тестови којима је уз употребу оваквих еквивалената могуће детектовати, пратити и квантификовати промене проузроковане апликацијом одређених супстанци и производа на кожу, као што су промене у интегритету и морфологији епидермиса, отпуштању медијатора инфламације, промени ћелијске вијабилности. Различити маркери користе се у циљу мониторинга индукованих промена (Ponес, 2002). Тренутно су на тржишту доступни комерцијални еквиваленти који се састоје од епидермалних, или и од епидермалних и дермалних делова са присутним различитим врстама ћелија (Ponес, 2002). Међу најкоришћенијим комерцијалним моделима реконструисаног хуманог епидермиса (енг. *Reconstructed Human Epidermis-RHE*) су EpiSkin™ (Tinois и сар., 1991) и SkinEthic™ RHE (Kandárová и сар., 2006).

Испитивање иритационог потенцијала козметичких сировина и производа на моделима реконструисане коже валидирани су од стране ECVAM-а (Spielmann и сар, 2007), изводе се по стандардном протоколу (Skin Irritation Test 42-bis) и прихваћени су као замена стандардном Draiz-овом *in vivo* тесту одређивања иритационог потенцијала на животињама (ECVAM, 2008). Међутим, да би се упоредила вредност овако изведеног *in vitro* теста са стварним исходом обично се у сврху валидације упоредо спроводе и *in vivo* биофизичка испитивања, нпр. мерењем ТЕГВ или EI (Ponес, 2002).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

У контексту изузетног значаја ефикасности и безбедности козметички активне супстанце и носача на укупне ефекте дермокозметичких производа са АНАs, као и дермокозметичких производа уопште, намеће се потреба за детаљнијим испитивањем постојећих и откривањем алтернатива активним супстанцама непознатог или проблематичног профила безбедности, али и алтернативних емулгатора, неопходних за израду безбедних, стабилних и ефикасних козметичких (дермокозметичких) емулзија. Кремови стабилисани мешаним емулгаторима типа АПГ са лактобионском киселином као КАС могли би да представљају безбеднију алтернативу дермокозметичким производима са АНАs старијих генерација уобичајено стабилисаним конвенционалним ПЕГ-емулгаторима. Постоје оскудна сазнања о механизму стабилизације, физикохемијским особинама, естетским, апликативним карактеристикама и безбедности емулзионих носача са различитим АПГ мешаним емулгаторима у мултикомпонентним емулзионим системима, посебно у присуству јако киселих и хигроскопних активних супстанци као што је лактобионска киселина. У литератури се не могу наћи релевантне информације о безбедности и козметичкој ефикасности производа са различитим концентрацијама лактобионске киселине.

Циљ истраживања ове докторске дисертације био је да се сагледа могућност употребе три различита АПГ мешана емулгатора и ЛК (у различитим концентрацијама – 6 и 10%), као алтернативних састојака дермокозметичких производа нове генерације који не показују недостатке типичне за примену њихових традиционалних аналога. У том контексту, требало је и сагледати могућност употребе три АПГ емулгатора различитих ХЛБ вредности, као потенцијалних стабилизатора у формулисању емулзионих носача за лактобионску киселину, узимајући у обзир захтеве које треба да задовоље савремени носачи за дермокозметичке производе *per se*.

У складу са наведеним, експериментални рад у оквиру докторске дисертације подељен је у три фазе; циљеви појединих фаза рада били су:

I фаза експерименталног рада

- да се испита могућност формулације серија физички стабилних У/В козметичких емулзија истог садржаја масне фазе (комплексног састава), стабилисаних помоћу једног од три новија АПГ емулгатора различитих дужина алкил ланаца, са и без 6% лактобионске киселине. Свака серија емулзија стабилисаће се једним од емулгатора: Sepineo SETM68 (INCI/Cetearyl alcohol and Cetearyl glucoside), Montanov[®]82 (INCI/Cetearyl alcohol and coco glucoside) или Montanov[®]202 (INCI/Arachidyl behenyl alcohol and arachidyl glucoside) (сви емулгатори су француског произвођача Seppic) уз употребу различитих коемулгатора/секундарних стабилизатора (ксантан гуме и/или С14 АПГ). При томе ће се испитати да ли и на који начин присуство 6% ЛК, као и присуство коемулгатора/костабилизатора утиче на физичку стабилност испитиваних емулзионих носача;
- да се, испитивањем и поређењем релевантних параметара физичкохемијске стабилности као и естетских и апликативних особина узорака у току одговарајућег времена чувања, изабери серије формулација најбољих карактеристика;
- да се сагледа потенцијал одабраних емулзија да буду носачи за лактобионску киселину, и то увидом у механизме њихове стабилизације, проценом евентуалних интеракција и проценом утицаја лактобионске киселине на колоидну структуру система. То ће се вршити подвргавањем одабраних емулзија специфичној физичкохемијској карактеризацији, испитивањем текстуре, испитивањем садржаја лактобионске киселине у активном узорку и испитивањем колоидне структуре емулзија (са и без лактобионске киселине) применом неколико комплементарних техника.

II фаза експерименталног рада

- да се спроведе студија процене и поређења безбедности (*in vivo* методама и *in vitro* тестом на моделу вештачке коже) и ефикасности (*in vivo* методама и одређивањем антиоксидантне активности *in vitro*) узорака емулзија одабраних на основу резултата I фазе експерименталног рада;

- да се изабере једна серија узорака најповољнијих особина, на основу резултата изведених испитивања. Потом, да се на примеру одабране серије упореде ефекти примене дермокозметичких производа са старијом АНАs у односу на новије генерације, односно да се у *in vivo* студијама изврши поређење безбедности и ефикасности лактобионске (6% м/м) vs. гликолане киселине (6% м/м) из истог одабраног АПГ емулзионог носача, али и да се изврши поређење безбедности и ефикасности на кожи ових киселина у истој концентрацији од 6%, када су инкорпориране у различите носаче (емулзија са АПГ vs. хидрофилни гел).

III фаза експерименталног рада

- да се испита могућност инкорпорирања веће концентрације лактобионске киселине (10% м/м) у одабране емулзионе носаче, и то проценом физичке стабилности узорака, проценом апликативних особина као и *in vivo/in vitro* проценом безбедносног профила и ефикасности емулзија са 10% лактобионске киселине.

Специфична испитивања у оквиру експерименталног дела ове докторске дисертације изведена су у складу са законским смерницама које поставља Уредба ЕУ 1223/2009 о козметичким производима, а тичу се обавезних испитивања безбедности примене на кожи (у смислу процене потенцијала за појаву локалних нежељених ефеката) и потврде декларисаних ефеката (Regulation (EC) No 1223/2009). Тачније, сва *in vivo* (изведена на хуманим добровољцима) и *in vitro* испитивања коришћена у овом раду једини су валидан и легитиман начин процене безбедности и ефикасности козметичких производа. *In vivo* испитивања су одобрена од стране надлежних Етичких Комитета.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Материјали и методе

3.1.1. Материјали

За израду У/В крема са различитим АПГ емулгаторима и костабилизаторима као потенцијалних носача за различите концентрације (6% (м/м) и 10% (м/м)) ЛК (Lactobionic acid, Global Calcium, India; квалитет: Merck Index) и 6% ГК (Glycolic acid, Merck, Germany) коришћене су сировине приказане у Табели 2.

У циљу *in vitro* одређивања цитотоксичности коришћени су реконструисани еквиваленти хумане коже (енг. *skin construct; artificial skin*), добијени од хуманих дермалних фибробласта (Cascade Biologics, Mansfield, Велика Британија), спонтано трансформисаних хуманих епидермалних ћелија пореклом од кератиноцита одрасле особе, у условима ниског садржаја калцијума при повишеној температури (енг. *Human adult, low Calcium, elevated Temperature-HaCaT-cell line*) гајених у култури према модификованој методи (Winkler и Muller-Goymann, 2002; Hoffmann и Muller-Goymann, 2005). У студији цитотоксичности коришћени су и 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma, Steinheim, Немачка), натријум додецилсулфат (Acros, В-Geel, Белгија), изопропанол (RiedeldeHaën, Seelze, Germany) и пречишћена вода (Ph. Eur. 5.0).

У циљу одређивања антиоксидантног потенцијала ЛК *per se* и ЛК након инкорпорације у емулзије (помоћу две различите *in vitro* методе) коришћени су 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, Sigma, Aldrich, USA) као модел слободни радикал, β -karoten (Sigma, Aldrich, USA) као реагенс при одређивању потенцијала инхибиције липидне пероксидације, док је у обе методе као референтна супстанца коришћен α -токоферол (Sigma, Aldrich, USA). За израду реагенаса такође су коришћени линолна киселина, хлороформ и полисорбат 20 (сви Sigma, Aldrich, USA).

Табела 2. Преглед супстанци коришћених за израду испитиваних емулзија

| Супстанца INCI назив- српски/енглески | Функција у козметичком производу | Трговачки назив/произвођач | Квалитет |
|--|--|---|------------------------------|
| Цетеарил глукозид и Цетеарил алкохол/ Cetearyl glucoside &Cetearyl alcohol | Примарни емулгатор | Sepineo SE®68, Seppic, Француска | Спецификација произвођача |
| Коко глукозид и Цетеарил алкохол/ Coco glucoside & Cetearyl alcohol | Примарни емулгатор | Montanov™82, Seppic, Француска | Спецификација произвођача |
| Арахидил глукозид и Арахидилбехенил алкохол/ Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol | Примарни емулгатор | Montanov™202, Seppic, Француска | Спецификација произвођача |
| Миристил алкохол и миристил глукозид/ Myristyl alcohol and myristyl glucoside | АПГкоемулгатор | Montanov™14, Seppic, Француска | Спецификација произвођача |
| Ксантан гума/ Xantan gum | Хидрофилни костабилизатор | Kelltrol, Немачка | Спецификација произвођача |
| Цетостеарил алкохол/ Cetearyl alcohol | Липофилни коемулгатор | Lanette 0, Cognis, Немачка | Ph. Eur. 5.0 |
| | Масна фаза | | |
| Изопропилмиристат/ Isopropylmiristate | Емолијенс | Isopropyl miristate Unichemcom, Аустрија | NF XVII |
| Триглицериди каприлно-капринске киселине/ Caprylic- capric triglycerides | Емолијенс | Myritol™ 318, Henkel, Немачка | DAB 10 |
| Децилолеат/ Decyl oleate | Емолијенс | Saboderm™ DO, SABO, Италија | Спецификација произвођача |
| Течни парафин/ Mineral oil | Емолијенс | Mineral oil, BASF, Немачка | Ph. Eur. 5.0 |
| Диметикон/ Dimethicone | Емолијенс | Abil®100, Cognis, Немачка | Спецификација произвођача |
| | Остали састојци | | |
| Триетаноламин/ Triethanolamine | Средство за неутрализацију | TEA, Sigma, SAD | USP 23 |
| Глицерол/ Glycerol | Хумектанс | Glycerol BASF, Немачка | Ph. Eur. 5.0 |
| Феноксietанол, метил парабен, етил парабен, пропил парабен, бутил парабен, изобутил парабен/ Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, isobutylparaben | Течна мешавина конзерванаса | Euxyl K 300/Schülke Maug, Немачка | Спецификација произвођача |
| Пречишћена вода/ Purified water | Водена фаза | | Ph. Eur. 5.0 |

3.1.2. Методе и опрема

I фаза експерименталног рада

3.1.2.1. Формулација, физичкохемијска карактеризација и процена утицаја ЛК на колоидну структуру емулзија стабилисаних различитим АПГ емулгаторима

У оквиру I фазе експерименталног рада, употребом три различита АПГ мешана емулгатора и варирањем типа примењених коемулгатора/секундарних стабилизатора формулисана је и припремљена већи број узорка У/В емулзија. Ове емулзије биле су истог, комплексног састава масне фазе (појединачне компоненте и њихов удео изабрани на основу препорука произвођача и резултата прелиминарних испитивања). Потом су процењене карактеристике израђених дермокозметичких емулзија и извршен је избор оптималних формулација тј. серија формулација на основу резултата испитивања која су уследила.

3.1.2.1.1. Формулација и израда емулзија (са и без ЛК) уз додаток различитих коемулгатора/секундарних стабилизатора

Опрема: Ротациона мешалица RW16 basic (ИКА®WERKE, Germany) и магнетна мешалица ИКАМАГ (ИКА, Germany).

Израђено је девет серија козметичких емулзија (Ф1-Ф9) комплексног састава масне фазе, при чему је свака серија била стабилисана једним од претходно наведених АПГ мешаних емулгатора уз додаток једног или комбинације коемулгатора (костабилизатора) – ксантан гуме или АПГ коемулгатора Myristyl alcohol&Myristyl glucoside. Свака серија се састојала од три узорка: плацебо (узорка без ЛК), активног узорка са 6% ЛК (на рачун умањивања садржаја пречишћене воде) и активног узорка са 6% ЛК подешене рН вредности (додатком ТЕА након израде) тако да одговара опсегу који је дозвољен за примену на кожи. Састав плацебо узорка сваке од серија дат је у Табели 3.

Табела 3. Састав плацебо крема сваке од формулација (Ф1-Ф9)

| Компонента | Ф1 | Ф2 | Ф3 | Ф4 | Ф5 | Ф6 | Ф7 | Ф8 | Ф9 |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | (%м/м) | (%м/м) | (%м/м) | (%м/м) | (%м/м) | (%м/м) | (%м/м) | (%м/м) | (%м/м) |
| Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol | 7.0 | 7.0 | 7.0 | | | | | | |
| Coco glucoside&cetearyl alcohol | | | | 7.0 | 7.0 | 7.0 | | | |
| Arachidyl behenyl alcohol and arachidyl glucoside | | | | | | | 7.0 | 7.0 | 7.0 |
| Myristyl alcohol&Myristyl glucoside | 1.5 | | 1.5 | 1.5 | | 1.5 | 1.5 | | 1.5 |
| Ксантан гума | | 0.5 | 0.5 | | 0.5 | 0.5 | | 0.5 | 0.5 |
| Масна фаза | 16.0 | 16.0 | 16.0 | 16.0 | 16.0 | 16.0 | 22.0 | 22.0 | 22.0 |
| Глицерол | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Конзерванс | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Пречишћена вода | 73.0 | 74.0 | 72.5 | 73.0 | 73.0 | 73.0 | 67.0 | 67.0 | 67.0 |

Састав, тј. однос појединачних компонената масне фазе у свим узорцима био је исти при чему је садржај у узорцима стабилисаним емулгаторима Cetearyl alcohol&cetearyl glucoside односно Cetearyl alcohol&coco glucoside износио 16% (серије Ф1-Ф6), док је у узорцима стабилисаним употребом Arachidyl behenyl alcohol&arachidyl glucoside (серије Ф7-Ф9) садржај масне фазе износио 22% у складу са препорукама произвођача (Seppic, 2001c). У Табели 4 дат је састав масне фазе по серијама узорака.

Табела 4. Састав масне фазе по серијама узорака Ф1-Ф9

| Сировине/ INCI српски | Серија (% м/м) | |
|--|----------------|-------|
| | Ф1-Ф6 | Ф7-Ф9 |
| Изопропилмиристант | 4.50 | 6.2 |
| Триглицериди каприлно-капринске киселине | 5.0 | 6.9 |
| Децилолеат | 1.5 | 2.05 |
| Течни парафин | 3.0 | 4.10 |
| Диметикон | 1.0 | 1.35 |
| Цетостеарол | 1.0 | 1.35 |

Табела 5. даје ознаке узорака сваке од серија.

Табела 5. Ознаке плацебо и активних крема сваке од серија (Ф1-Ф9)

| Серија | Плацебо | Активни узорак (са 6% (м/м) ЛК) | Активни узорак (са 6% (м/м) ЛК; рН вредности подешене до 3.80) |
|--------|---------|------------------------------------|--|
| Ф1 | M68 | M68L1N | M68L1 |
| Ф2 | M68a | M68aL1N | M68aL1 |
| Ф3 | M68b | M68bL1N | M68bL1 |
| Ф4 | M82 | M82L1N | M82L1 |
| Ф5 | M82a | M82aL1N | M82aL1 |
| Ф6 | M82b | M82bL1N | M82bL1 |
| Ф7 | M202 | M202L1N | M202L1 |
| Ф8 | M202a | M202aL1N | M202aL1 |
| Ф9 | M202b | M202bL1N | M202bL1 |

Сви узорци припремљени су загревањем и мешањем у затвореном стакленом суду, при чему је код плацебо узорака серија Ф1-Ф6 масна фаза (заједно са емулгатором и евентуално присутним АПГ коемулгатором) загрејана (термостатна грејна плоча магнетне мешалице) до 70°C и затим додата у водену фазу (која је садржала конзерванс и глицерол) температуре више за 2-5°C уз мешање (пропелерска лабораторијска мешалица RW16 basic IKA®WERKE, Germany) на константној температури следећих 5мин (800 обртаја (о)/мин), а потом 3мин (500 о/мин). По завршетку фазе емулговања започето је хлађење уз мешање на 300 о/мин до постизања собне температуре. Узорци серија Ф7-Ф9 припремљени су на исти начин уз загревање масне фазе до 80°C (према препоруци произвођача сировине), а затим додавањем у водену фазу (која је садржала конзерванс и глицерол) температуре више за 2-5°C уз мешање.

Сви активни узорци припремани су на исти начин при чему је ЛК растварана у воденој фази непосредно пре мешања фаза. При припремању активних неутралисаних узорака, неутрализација је вршена 24 часа након израде, мерењем рН узорака, у циљу постизања оптималне вредности и то на тај начин да је ТЕА додаван у капима уз мешање (на лабораторијској мешалици) у емулзију све до постизања рН од 3,8.

3.1.2.1.2. Процена физичке стабилности, естетских и апликативних особина

Прелиминарна процена физичке стабилности узорака вршена је у функцији времена, и то мерењем електричне проводљивости узорака, поларизационом и обичном светлосном микроскопијом и спровођењем континуалних реолошких мерења, као и мерењем рН вредности,. Сва мерења вршена су 7, 30 и 60 дана након израде, а затим је вршено поређење одређених добијених параметара у функцији времена. Естетске и апликативне особине кремава процењиване су у функцији одређених параметара континуалне реологије. Циљ је био да се одабере серија(е) формулација која(е) је (су) најпогоднији носач(и) за ЛК са аспекта физичке стабилности, естетских и апликативних карактеристика, која(е) би затим биле подвргнуте даљим анализама тј. дубљем увиду у микроструктуру.

I Мерење рН вредности

Мерење је изведено потенциометријском методом (Ph.Jug.V) директним урањањем електроде рН-метра (HI 8417, Hanna Instruments, Woonsocket, RI) у припремљене узорке. Пре почетка рада апарат је калибрисан на прописан начин калибрацијом у две тачке тј. употребом стандардних пуфера рН вредности 4.0 односно 7.0.

II Мерење електричне проводљивости

Мерење електричне проводљивости узорака у циљу одређивања типа емулзије и праћења евентуалних промена које указују на промене параметара њихове физичке стабилности изведено је кондуктометријски, тј. директним урањањем електроде кондуктометра (CDM 230, Radiometer, Данска) у узорке. Мерна електрода је пре почетка рада калибрисана 0.01М раствором КСI на собној температури ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

III Микроскопска анализа

Поларизациона и светлосна микроскопија узорака спроведена је под увеличањем 400 пута у светлосном пољу, као и између укрштених поларизатора и анализатора уз примену λ -плочице (микроскоп LEICA DMR, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Немачка). Микрографије (по 5 за сваки узорак из три различита дела емулзије – горњег, средњег и доњег) су снимљене помоћу интегрисане дигиталне камере (LEICA DFC425, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Немачка) и затим анализиране проценом величине честица унутрашње фазе и опсервацијом,

на поларизационим микрографијама, структура типичних за одређене врсте течно-кристалних фаза.

III Реолошка мерења

Континуална реолошка мерења спроведена су на узорцима применом ротационог реометра (Rheolab MC 120, Paar Physica, Немачка), уз коришћење купа-плоча мерног система под следећим условима: пречник купе 50 mm, угао 1°, дебљина мерног узорка 0.030 mm на температури $20 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. Примењена је процедура контролисане брзине смицања (брзина је расла у опсегу 0.29–200 1/s, узлазна крива, и затим назад на почетну вредност, силазна крива при чему је сваки ступањ трајао 120 s). Из овако добијених реограма регресионом анализом, уз употребу понуђених математичких модела, одређиване су вредности минималног (η_{\min}) и максималног (η_{\max}) привидног вискозитета као и хистерезне површине (H), као мере тиксотропије препарата (Korhonen и сар., 2005). Анализа добијених резултата обављана је интегрисаним софтверским пакетом. Резултати су приказани табеларно и графички.

3.1.2.1.3. Карактеризација колоидне структуре

На основу резултата добијених након спровођења претходно наведених испитивања, најбоље карактеристике у смислу физичке стабилности и естетских и апликативних карактеристика показале су серије узорака Ф2 и Ф4. Из тог разлога узорци ових серија су у даљем испитивању подвргнути дубљој анализи у циљу утврђивања механизма стабилизације и евентуалног утицаја ЛК на колоидну структуру емулзионог система и то применом следећих метода и опреме:

I Микроскопска анализа

Поларизациона и светлосна микроскопија узорака спроведена је истим методама и употребом исте опреме као у делу 4.1.2.2., у циљу идентификације и квалитативне процене структура типичних за одређене групе течно-кристалних фаза.

II Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ)

Узорци су најпре специјално припремљени за ову врсту микроскопије стандардном "freeze-fracture" техником за израду реплика (као што је описано у

уводном делу). Потом су реплике посматране електронским микроскопом (Leo, Немачка) под увеличањем 4000 пута.

III Реолошка мерења

Осцилаторна реолошка мерења спроведена су употребом истих инструмената и под истим условима као код континуалних реолошких мерења, при чему је коришћена купа дијаметра 50 mm. Осцилаторна мерења спроведена су у циљу одређивања вискоеластичног региона узорка на константној фреквенцији 1Hz у опсегу напона смицања 0.5 до 40 Pa. Вискоеластични регион је подручје напона смицања у којем реолошки параметри, који нам могу послужити за карактеризацију мезофаза унутар колоидне структуре испитиваних узорака, показују константне вредности. Поменути параметри су: модул сачуване енергије (еластични модул G' , енг. *storage modulus*) и модул изгубљене енергије (вискозни модул G'' , енг. *loss modulus*). Вредности деформација или напона смицања у линеарном вискоеластичном региону нису довољне да поремете или сруше структуру система, па је циљ изведених динамичких осцилаторних мерења у ствари да се добије информација о структури испитиваних система у тзв. "стању мировања".

Пошто је одређен линеарни вискоеластични регион, праћена је зависност параметара G' и G'' у функцији промене фреквенце (0.1-10 Hz) при константном напону смицања (6 Pa), који је био унутар претходно одређеног вискоеластичног региона за све испитиване узорке. Резултати мерења приказани су табеларно и графички.

IV Диференцијална скенирајућа калориметрија (ДСЦ)

Ово мерење спроведено је у циљу одређивања енергетског понашања узорака при фазним транзицијама, тј. добијања информација о колоидној структури узорака (плацебо и активних) и евентуалним интеракцијама између ЛК и АПГ емулгатора поређењем параметара добијених за плацебо у односу на активне узорке. Мерење је спроведено коришћењем Диференцијалног скенирајућег калориметра DSC 220 (Seiko, Немачка), са затвореним алуминијумским лончићем уз примену програма загревања у температурном опсегу 20-105°C и брзином промене температуре од 2°C/мин. Празан алуминијумски лончић служио је као референтни узорак. Резултати су представљени графички.

V Термогравиметријска анализа

Ради добијања додатних информација које би могле да укажу на евентуални утицај ЛК на колоидну структуру емулзија стабилисаних АПГ емулгаторима, спроведена је термогравиметријска анализа одабраних узорака. Анализа је спроведена у покушају да се диференцира слободна (енг. *bulk*) фракција воде од фракције воде потенцијално фиксиране између ламела течно-кристалне или гел кристалне фазе, помоћу уређаја TG 220 са диск станицом 5200 Н (Seiko, Јапан). Мерење је обављено у отвореном алуминијумском лончићу, у температурном опсегу 20-100°C и брзином загревања 2°C/мин (сва мерења поновљена су три пута).

VI Одређивање параметара текстуре узорака

Анализа текстуре вршена је ради добијања додатних информација о естетским и апликативним карактеристикама одабраних емулзионих узорака, помоћу уређаја TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, Велика Британија). Уређај за одређивање текстуралних параметара је пенетрометар који се састоји од аналитичке сонде повезане са мотором и омогућава мерење параметара приликом њеног континуалног кретања (пенетрације) кроз испитивани узорак. Као сонда за пенетрацију коришћен је пластични цилиндар пречника 13 mm са почетном брзином пенетрације 5 mm/s а затим 1 mm/s до дубине пенетрације од 5 mm. Детектори мере отпор при кретању сонде кроз узорак при чему се добијају вредности следећих параметара: чврстина (енг. *hardness*, сила потребна да би се постигла деформација), лепљивост (енг. *stickiness*, рад потребан да би се превазишла сила привлачења између сонде и крема), компресибилност (енг. *compressibility*, рад који је потребан да се крем деформише током иницијалне компресије тј. пенетрације сонде) и кохезивност (енг. *cohesiveness*, мера опоравка крема између узастопних пенетрације узорака).

3.1.2.1.4. Одређивање садржаја ЛК

Одређивање садржаја ЛК у активном узорку, у циљу добијања потпуног увида у евентуалне интеракције између емулзија стабилисаних мешаним емулгаторима типа АПГ и ЛК, вршио је произвођач ЛК, Global Calcium, Индија. Као аналитичка

метода коришћена је HPLC, под условима који су заштићени и ексклузивна својима произвођача и као такви не могу бити познати (Прилог Б, страна 139).

II фаза експерименталног рада

У свакој од *in vivo* студија спроведених у оквиру ове докторске дисертације (како у II тако и у III фази испитивања) коришћени су следећи уређаји за одређивање параметара биоинжењеринга коже:

- апарат Tewameter[®]TM 210 коришћен је за мерења ТЕГВ; извршена су по три мерења за свако третирано место (као и за контроле) након периода стабилизације уређаја у трајању од око 40s, а узимана је вредност ТЕГВ (TEWL) са најмањом стандардном девијацијом;
- влажност коже тј. параметар електрична капацитивност (EC) мерен је апаратом Corneometer[®]CM 825 (или истоименом сондом апарата Multi Probe Adapter System MPA[®]9), при чему је мерење понављано по три пута за свако третирано место (као и за контроле); узимана је средња вредност три мерења;
- рН коже мерен је апаратом pHmeter[®]900 (или истоименом сондом апарата Multi Probe Adapter System MPA[®]9);
- апарат Mexameter[®]MX 16 (или сонда Mexameter[®]MX 18 апарата Multi Probe Adapter System MPA[®]9) коришћени су у циљу одређивања боје коже; мерен је меланин индекс (MI) и еритема индекс (EI) у циљу квантификације црвенила на кожи као параметра еритема.

Резултати мерења сваког од параметара су представљени као средња вредност±стандардна девијација (SD). Сви наведени апарати су произвођача Courage & Khazaka, Немачка.

Свака од *in vivo* студија спроведених у оквиру ове докторске дисертације изведена је тек након добијања писменог или информативног пристанка добровољаца, и у складу са Хелсиншком декларацијом уз дозволу локалног етичког комитета (Етички комитет Фармацеутског факултета у Београду; Етички комитет Медицинског факултета у Нишу). Пре почетка мерења у оквиру сваке од изведених студија добровољци су, ради адаптације на амбијеталне услове, проводили 20 минута у климатизованој просторији ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$, влажност ваздуха $50\pm 5\%$) у којој су потом и вршена мерења, односно сви параметри мерени су у складу са публикованим смерницама и документима (Berardesca, 1997; Clarys и

сар., 2000; Rogiers, 2001). Приликом статистичке обраде података из сваке од спроведених *in vivo* студија, ниво статистичке значајности био је $p < 0,05$. Обрада података вршена је употребом софтвера SPSS for Windows 17.0.

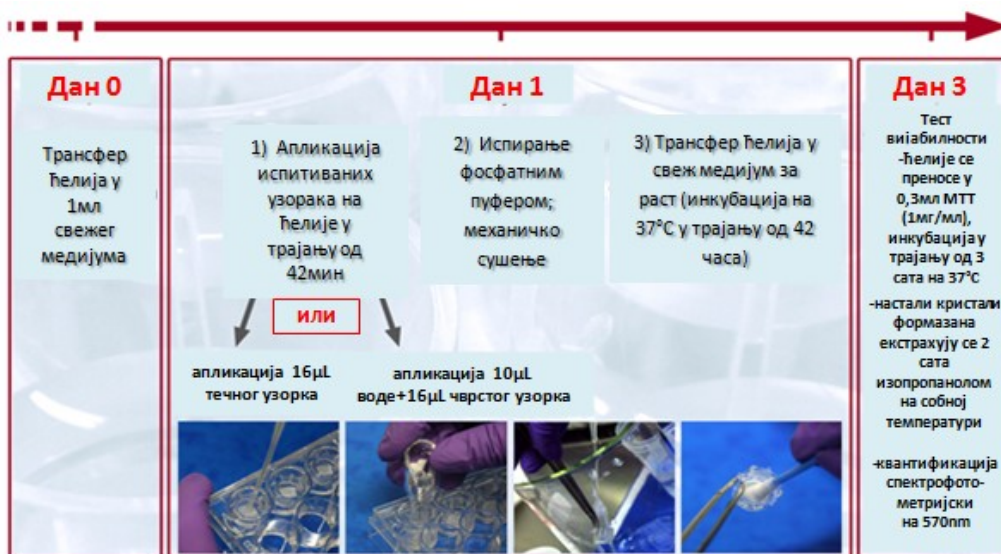
Узорци изабраних серија формулација (Ф2 и Ф4) на основу резултата I фазе експерименталног рада су затим биле подвргнуте студијама процене безбедности и ефикасности, а узорци серије Ф4 још и поређењу ових аспеката примене дермокозметичких препарата са ЛК у односу на препарате који су садржали исти проценат (6%) АНАs старијих генерација (ГК) и то из различитих носача. У овом делу експерименталног рада испитивани су узорци одговарајућих серија који су намењени апликацији на кожу, тј. плацебо и активни неутралисани узорак.

3.1.2.2. In vitro/in vivo процена безбедности и ефикасности емулзија са АПП емулгатором и 6% ЛК

I In vitro испитивање безбедности (иритационог потенцијала) узорака

У циљу *in vitro* одређивања иритационог потенцијала узорака вршен је тест цитотоксичности на ћелијама реконструисане вештачке коже према 42-bis протоколу (ECVAM, 2009) добијене на претходно описан начин. Схематски приказ испитивања цитотоксичности према наведеном протоколу приказан је на Слици 10. Вијабилност ћелија (тј. цитотоксичност) користи се у овом тесту као параметар за одређивање потенцијала за иритацију коже након локалне апликације супстанци и препарата. Као маркер користи се тзв. МТТ тест (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) којим се одређује ћелијска вијабилност као функција њиховог редокс потенцијала. Ћелије код којих постоји респираторна митохондријална активност конвертују жуто обојен водени раствор овог маркера у нерастворну формазан со љубичасте боје, чији се интензитет квантификује након екстракције из третираног реконструисаног ткива и управно је сразмеран вијабилности ћелија тј. обрнуто сразмеран токсичности и иритационим потенцијалу агенса који се испитује (Mosman, 1983). Испитивани узорци (M68a, M68aL1, M82, M82L1) наносени су на ћелије вештачке коже у култури у три различите концентрације (0,25%, 2,5% и 25%, по пет понављања, при чему су разблажења припремана дисперговањем у фосфатном пуферу). Дужина трајања апликације износила је 42 минута на собној температури, а као контрола служио је чист фосфатни пуфер нанет на ћелије у култури. Након тога

ћелије су испиране фосфатним пуфером и инкубиране у прописаном медијуму следећа 42 сата на 37°C. Након тога вијабилност ћелија одређивана је делимично модификованом методом по Mossmann-у (Mossmann, 1983). Наиме, испитивано ткиво је, у трајању од 3 сата, инкубирано раствором МТТ. По 150µl овако добијених раствора преношено је у појединачне отворе плочице за читавање ЕЛИСА теста (апарат Multiskan Ascent No354 ThermoLabsystems, Финска) и на 570 nm је одређивана апсорбанца чији је интензитет у сразмери са вијабилношћу ћелија реконструисане хумане коже.



Слика 10. Схематски приказ испитивања цитотоксичности према 42-bis протоколу (ECVAM)

Квантитативна вијабилност одређена је као проценат негативне контроле и може се користити у циљу предвиђања иритационог потенцијала – уколико је средња вијабилност ћелија мања или једнака 50%, супстанца тј. препарат дефинише се као локални иританс, у супротном се њен безбедносни профил на кожи може окарактерисати као повољан (ECVAM, 2008).

Резултати су затим поређени са резултатима добијеним у *in vivo* студији процене иритационог потенцијала испитиваних узорка.

II *In vivo* испитивање профила безбедности узорка на кожи здравих хуманих добровољаца

Циљ ове, као и свих *in vivo* студија испитивања безбедности узорка спроведених у оквиру експерименталног дела ове докторске дисертације био је одређивање потенцијала испитиваних узорка да иритирају кожу, и то мерењем одговарајућих

биофизичких параметара на кожи пре и након апликације узорака под оклузијом. Тиме је (на основу промене вредности релевантних мерених параметара) добијен увид у потенцијал узорака да доводе до одређених промена које се везују за иритацију, тј. да утичу на пермеабилност епидермалне баријере, доводе до појаве црвенила или утичу на рН и хидратисаност здраве коже (Fang и сар., 2003).

Дизајн студије

У студији су учествовала 24 добровољаца без знакова дерматолошких обољења или јако суве коже (подељена у две групе). Испитивање је спроведено у месецу децембру. Испитивани су узорци М68а, М68аL1, М82, М82L1 и мерена четири биофизичка параметра: TEWL, EI, рН коже и ЕС као одраз стања хидратисаности најповршнијег слоја епидермиса (енг. *stratum corneum* hydration, SCH).

I група (10 добровољаца оба пола просечне старости 25.4±1.6 година): узорци М82 и М82L1 наносени су у количини 0.016 g/cm² на по једно место на унутрашњој страни леве подлактице употребом картонског лењира (са два празна места квадратног облика површине 9 cm²), утрљани на означену површину, покривени оклузивном филмом Parafilm[®] (American National Can. Co., Chicago, Illinois, САД) а затим памучном самолепљивом траком Sensifix[®] (Галеника, Србија) (Слика 11).

II група (14 добровољаца оба пола просечне старости 27.4±1.1 година): узорци М68а и М68аL1 наносени су у количини 0.016 g/cm² на по једно место на унутрашњој страни леве подлактице употребом картонског лењира (истог као у I групи), утрљани на означену површину, а затим покривени на начин описан код третмана I групе добровољаца (Слика 11).



а)



б)

Слика 11. *In vivo* испитивање безбедности: а) постављање оклузивног филма и б) оклузија након апликације испитиваних узорака на кожу хуманих добровољаца

У обе групе добровољаца, два места на кожи истог облика површине 16 cm² остављена су нетретирана; место на подлактици леве руке служило је као нетретирана контрола под оклузијом (НКО) при чему је вршена оклузија нетретиране коже на описан начин, а место на подлактици десне руке је служило као нетретирана контрола без оклузије (НК). Мерења параметара вршила су се базално, као и 60 минута након одстрањивања оклузије која је трајала 24 часа.

Статистика

Сви добијени подаци приказани су као средња вредност +/- стандардна девијација (СД). *In vivo* мерени параметри (ЕС, TEWL, EI, pH) приказани су као апсолутне промене у односу на одговарајућу базалну вредност (Δ). Приликом обраде података, у циљу одређивања и међусобног поређења безбедности испитиваних узорака на кожи, следећи позитиван тест нормалности, коришћени су параметарски тестови. Ефекти узорака међусобно, као и у односу на одговарајуће контроле (НК и НКО) унутар сваке од појединачних испитиваних група анализирани су једнофакторском АНОВОМ, након чега је рађен Tukey's *t*-test, где је то било потребно (Kuss и Diepgen, 1998; Fluhr и сар., 2001). Разлике за исти третман, али у различитим временским тачкама (односно базално мерење vs. мерење након оклузије) проверене су Студент т-тестом за неспарене узорке.

III *In vivo* испитивање ефикасности

In vivo испитивање ефикасности узорака одабраних серија вршено је у дуготрајној душло слепој студији мерењем биофизичких параметара – ЕС, TEWL, EI и MI.

Протокол испитивања

У студији је учествовало 40 здравих испитаника са умерено сувом кожом (услов за учествовање у експерименту, субјективна процена), без историје или клиничких знакова дерматолошких обољења. Испитивање је спроведено у периоду новембар-децембар. Испитаници су насумично подељени у две групе и наглашено им је да у току трајања, као ни једну седмицу пре почетка студије, не користе било каква средства за негу коже у испитиваном пределу.

I група (20 испитаника просечне старости 31.4 ± 7.9 година): воларна страна леве подлактице третирана је узорком M82, док је иста страна десне подлактице третирана узорком M82L1, и то у пределу маркираних површина облика квадрата

површине 9 cm² употребом картонског лењира са празним површинама. На свакој подлактици један квадрат остављан је као нетретирана контрола (НК).

II група (20 испитаника просечне старости 30.4 ± 5.4 година): воларна страна леве подлактице третирана је узорком M68, док је иста страна десне подлактице третирана узорком M68L1, на исти начин и уз нетретиране контроле као у I групи.

Након извршеног иницијалног мерења (пре почетка студије, базалне вредности) добровољцима су дате инструкције да узорке (означене стикерима различитих боја) апликују код куће два пута дневно, ујутру и увече након туширања у пределима маркираних површина (узорак одређене боје на одређено место на кожи) уз употребу наведеног картонског лењира у току 4 недеље. Мерења су вршена након 2 и 4 недеље ујутру, пре јутарње примене узорака.

Статистика

Сви добијени подаци приказани су као средња вредност +/- стандардна девијација (СД). *In vivo* мерени параметри (ЕС, TEWL, EI, MI) приказани су као апсолутне промене у односу на одговарајућу базалну вредност (Δ). Приликом обраде података, у циљу одређивања и међусобног поређења ефеката испитиваних узорака на кожу, следећи негативан тест нормалности, коришћени су непараметарски тестови. Добијене вредности мерених параметара за одређене узорке (као и за одговарајућу НК) унутар групне су упоређивани међусобно Mann-Whitney тестом; поређење вредности параметара измерених за исти узорак у различитим временским интервалима (базално vs. 2 недеље vs. 4 недеље) анализирани су употребом Wilcoxon теста за спарене узорке.

IV *In vitro* испитивање ефикасности – одређивање антиоксидантног потенцијала

Антиоксидантни потенцијал ЛК *per se*, ЛК инкорпориране у емулзионе носаче са АПГ емулгатором (серије узорака Ф2 и Ф4), као и емулзионих узорака у којима је у исте носаче инкорпорирано 2% α -токоферола, вршено је у циљу карактеризације антиоксидантне ефикасности ЛК. Тачније, вршена је процена и поређење антиоксидантног потенцијала ЛК (*per se* и у емулзији) са истом способношћу α -токоферола (*per se* и у истим емулзионим носачима са АПГ емулгатором). α -токоферол изабран је ради поређења као најчешће коришћена антиоксидантна КАС доказане ефикасности у комерцијалним козметичким производима (Di Mambro и сар., 2003). Најзад, вршена је процена утицаја

испитиваних емулзија као носача на антиоксидантни потенцијал ЛК (и α -токоферола), тј. погодности ових емулзионих носача за инкорпорацију испитиваних КАС у смислу утицаја на њихов антиоксидантни потенцијал.

Као што је речено, карактеризација и промоција одређених супстанци као антиоксиданаса – активних састојака у дермокозметичким производима, последњих година налази се у фокусу многих научних студија и маркетиншких кампања (Gregoris и сар., 2011; Kato и сар., 2009). У складу са тим, развијене су методе за одређивање ефикасности локалних антиоксиданаса. У овом раду, одређивање антиоксидантне активности је вршено применом две комплементарне *in vitro* методе – одређивањем способности инхибиције обезбојавања β -каротена и одређивањем способности неутрализације слободних радикала (DPPH тестом).

Антиоксидантна активност ЛК *per se* одређивана је из воденог раствора различитих концентрација (24-100 mg/ml), имајући у виду да се у козметичким препаратима различите АНАs као КАС најчешће примењују управо у тим концентрацијама. Као контрола служио је раствор α -токоферола у етанолу у концентрацијама 5.5, 11, 22, 44 и 66 μ g/ml.

Што се тиче одређивања антиоксидантне активности емулзионих узорак (M68, M68L1N, M68L1, M82, M82L1N, M82L1) формулације су најпре разблаживане екстракционим медијумом (који се састојао од смеше полисорбат 20/H₂O 1:5, м/м) ради бољег растварања активних супстанци. Разблаживање је вршено недељу дана након припреме емулзија. Као контрола сваком од испитиваних емулзионих узорак користио се узорак који је садржао 2% α -токоферола у истом емулзионом носачу (M68E тј. M82E). Ова концентрација α -токоферола у емулзијама које су служиле за поређење антиоксидантне активности је изабрана као најчешће коришћена концентрација у комерцијалним козметичким производима (Di Mambro и сар., 2003).

Одређивање способности инхибиције обезбојавања β -каротена

Ова метода базира се на компетитивном обезбојавању β -каротена током аутооксидације линолне киселине у воденим емулзијама при чему се прати опадање апсорбанце. Додатак узорак који садрже антиоксидансе резултира у заустављању даљег распадања β -каротена. Реакциона емулзија припремана је на следећи начин – 1 mg β -каротена растворен је у 5 ml хлороформа и у 1 ml овог раствора додато је 25

μl линолне киселине и 200 mg солубилизатора полисорбат 20 а затим је смеша упарена под вакуумом на температури од 40°C; у остатак је додато 50ml свеже воде засићене кисеоником (увођењем кисеоника под притиском у трајању од 30 минута). Добијена реакциона емулзија је затим мућкана до бистрења.

Поступак:

У поље микротитарске плоче са 96 места за узорке унето је по 25μl раствора ЛК, тј. α-токоферола различитих концентрација односно иста количина испитиваних емулзија разблажених на претходно описан начин. Потом је додато 200μl реакционе емулзије. Као негативна контрола користио се одговарајући растварач (при одређивању антиоксидантног потенцијала ЛК тј. α-токоферола) односно екстракт одговарајуће плацебо емулзије (добитен екстракцијом са описаним екстракционим медијумом) при одређивању антиоксидантног потенцијала узорака. Апсорбанца је читавана на ELISA читачу (Multiskan Ascent No354 ThermoLabsystems, Финска) на таласној дужини 450nm након мућкања плоче на микроплејт-шејкеру (Vibramix 30, Tehnica, Словенија). Плоча се смешта у инкубатор (Incuberm® Раура, Шпанија) на 55°C а потом се апсорбанца читава на сваких 30 минута до истека 120 минута. Антиоксидантна активност уствари представља способност инхибиције обезбојавања β-каротена, изражава се у процентима инхибиције и рачуна према следећој формули:

$$\% \text{ инхибиције} = (A_{120} / A_0) \times 100.$$

Одређивање способности неутрализације слободних радикала – DPPH тест

Способност испитиваних узорака да неутралишу слободне радикале испитана је у тесту са 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) у форми слободног радикала (DPPH[•]) – након реакције са антиоксидансима, формира се DPPH-H при чему долази до обезбојавања DPPH[•] што се може квантификовати спектрофотометријски.

Поступак:

У појединачна поља микротитарске плоче пипетирано је 40μl испитиваног узорка (раствори ЛК различитих концентрација или екстракти емулзионих узорака), 120μl одговарајућег растварача и по 40μl DPPH реагенса (који се састоји од 9,86 mg 0,05mmol/l DPPH допуњено до 50ml етанолом или метанолом). Плоча је остављена 30 минута у мраку и након тога је читавана апсорбанца (ELISA читач Multiskan Ascent No354 ThermoLabsystems, Финска) на 540nm. Контрола је

садржала 40µl DPPH реагенса и 160µl одговарајућег растварача (уколико се одређивао антиоксидантни потенцијал ЛК тј. α-токоферола) односно 160µl екстракта одговарајуће плацебо емулзије (при одређивању антиоксидантног потенцијала узорака).

Антиоксидантна активност испитиваног узорка изражена је као проценат инхибиције слободног радикала, а израчуната према следећој формули:

$$\%DPPH^{\bullet} = (A_c - A_s) / A_c \times 100,$$

где је A_c апсорбанца контроле, а A_s апсорбанца испитиваног узорка.

С обзиром да је антиоксидантна активност ЛК и α-токоферола одређивана за различите концентрације раствора ових антиоксиданаса, конструисана је крива са које је (регресионом анализом) одређена концентрација испитиване супстанце која неутралише 50 % слободног радикала и та вредност представљена је као IC₅₀.

Статистика

Вредности антиоксидантних активности емулзионих узорака (добитених одређивањем употребом обе методе) међусобно су поређени једнофакторском АНОВОМ након чега је рађен Tukey's *t*-test, где је то било потребно. Ниво статистичке значајности био је $p < 0.05$. Обрада података вршена је употребом софтвера SPSS for Windows 17.0.

3.1.2.3 In vivo поређење безбедности и ефикасности ЛК и ГК

У циљу поређења различитих аспеката примене представника старијих (на примеру ГК) и новијих генерација АНАs (на примеру ЛК) на кожу, из различитих носача, вршено је *in vivo* поређење параметара безбедности и ефикасности добијених биофизичким мерењима. Емулзија која садржи 6% ЛК поређена је са емулзијом истог састава у коју је инкорпорирано 6% ГК. Извршено је и поређење безбедности и ефикасности истих концентрација ЛК и ГК када су инкорпориране у хидрофилни гел. За ову студију изабрани су узорци серије Ф4 због нешто повољније ефикасности и безбедности након примене на кожу коју су показали у испитивањима која су претходила.

Узорци – за студију су коришћене емулзије серије Ф4 – М82, М82L1, хидрофилни гели чије су ознаке и састав дате у Табели 6 и емулзиони узорак означен као Е-ГК исте основне формулације и начина израде као М82L1, али је уместо ЛК инкорпорирано 6% ГК. *Узорак М82L1 је овде, ради једноставнијег увида у*

результате и поређења ефеката различитих КАС из истог носача означен као Е-ЛК. Израда узорка Е-ГК вршена је на исти начин као што је описано за узорак М82Л1, такође подешене рН 3.8 додатком ТЕА. Физичка стабилност овог узорка прелиминарно је потврђена спровођењем истих тестова као при испитивању физичке стабилности узорака са ЛК (резултати нису приказани).

Табела 6. Састав узорака типа хидрофилног гела: Г, Г-ЛК и Г-ГА

| Супстанца INCI назив-српски | Узорак % (м/м) | | |
|---|----------------|---------|---------|
| | Г | Г-ЛК | Г-ГА |
| Ксантан гума | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| Глицерол | | | |
| Лактобионска киселина | | 6.00 | |
| Гликолна киселина | | | 6.00 |
| Феноксиетанол, метил-, етил-, пропил-,бутил- и изобутил естри парахидрокси бензојеве киселине | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Триетаноламин qs. | до рН 4 | до рН 4 | до рН 4 |
| Пречишћена вода | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

Плацебо узорак - хидрофилни гел (Г) израђиван је на тај начин што је у смеши пречишћене воде, глицерола и конзерванса у хемијској чаши диспергована одмерена количина ксантан гуме као средства за гелирање уз постепено додавање на лабораторијској мешалици (на 800 о/мин, а затим након њеног додатка мешање је настављено на 500 о/мин још 10 минута). Активни узорци израђивани су на исти начин при чему је ЛК (при изради узорка Г-ЛК) односно ГК (при изради узорка Г-ГК) растварана у води пре додатка ксантан гуме, а потом су ови узорци неутралисани до рН 4, додатком ТЕА уз мешање.

Протокол испитивања

У студији су учествовала 52 здрава добровољца оба пола, без историје или клиничких знакова дерматолошких обољења, са нормалном до умерено сувом кожом. Студија је спроведена у периоду октобар-новембар. Добровољци су били подељени у две групе.

I група – (26 добровољаца оба пола просечне старости 26,8±2,8 година) – у овој групи вршено је *in vivo* поређење безбедности испитиваних узорака. Означена места површине 9 cm² на воларној страни подлактице леве руке третирана су узорцима Г-ГК тј. Г-ЛК, док су места исте површине воларне стране подлактице десне руке третирана

узорцима М82L1 и Е-ГК. Сви узорци апликовани су у количини од по $0.016\text{g}/\text{cm}^2$, размазани по кожи гуменом рукавицом, а затим су места стављана под оклузију и мерења параметара вршена на исти начин као што је описано у 4.1.2.3.1. (I *In vivo* испитивање безбедносног профила узорака на кожи здравих хуманих добровољаца). По једно место на кожи, истог облика и површине 16 cm^2 остављено је нетретирано; место на подлактици леве руке служило је као нетретирана контрола под оклузијом (НКО), а место на подлактици десне руке је служило као нетретирана контрола без оклузије (НК).

II група – (26 добровољаца оба пола просечне старости $25,1\pm 2,1$ година) – у овој групи вршено је *in vivo* испитивање и поређење ефеката дуготрајне апликације испитиваних узорака. Воларне стране обе подлактице добровољаца третиране су узорцима (Г-ГК и Г-ЛК на левој, М82L1 и Е-ГК на десној) у пределу маркираних површина облика квадрата (површине 9 cm^2 , употребом претходно описаног картонског лењира). На свакој подлактици један квадрат остављан је као нетретирана контрола.

Испитаници су примењивали узорке код куће у току 14 дана, два пута дневно ујутру и увече након туширања, а мерени параметри били су EI, TEWL, EC и pH. Мерења су вршена базално, након три и након 14 дана апликације и то ујутру, пре прве дневне апликације узорка. Узорци су били означено стикерима различитих боја у циљу давања прецизних инструкција испитаницима.

Статистика

Сви добијени подаци приказани су као средња вредност +/- стандардна девијација (СД). *In vivo* мерени параметри (EC, TEWL, EI, pH) приказани су као апсолутне промене у односу на одговарајућу базалну вредност (Δ).

Приликом обраде података који су добијени у обе групе добровољаца у циљу одређивања и међусобног поређења иритационог потенцијала и ефикасности испитиваних узорака, следећи позитиван тест нормалности, коришћени су параметарски тестови. Добијене вредности мерених параметара (TEWL, EC, EI и pH) на подлактицама, које су третиране испитиваним узорцима, као и одговарајуће контроле НК и НКО, у одређеним временским тачкама, у свакој од појединачних испитиваних група анализирани су једнофакторском АНОВОМ, након чега је рађен Tukey's *t*-test, где је то било потребно (Kuss и Diepgen, 1998; Fluhr и сар., 2001).

III фаза експерименталног рада

3.1.2.4. Испитивања емулзија са различитим АПГ и 10% (м/м) ЛК

Циљ ове фазе експерименталног рада био је процена могућности инкорпорирања веће концентрације ЛК (тј. 10% као највеће концентрације АНАс која се може користити у козметичким производа као што је објашњено у Уводу овог рада) у испитиване емулзије (у смислу адекватне физичкохемијске стабилности), а потом и процена различитих аспеката примене на кожу емулзија са АПГ и 10% (м/м) ЛК. Као потенцијални носачи изабране су оне плацебо формулације које су у I фази експерименталног рада показале најбоље естетске и апликативне особине, и то M82, M68a и M202b.

Узорци – ознаке узорака испитиваних у III фази експерименталног рада дате су у Табели 7. Плацебо формулације биле су идентичног састава и начина израде као што је претходно описано у I фази, са том разликом што је у активне формулације додато 10% уместо 6% ЛК (на рачун дела пречишћене воде). Корекција рН активних неутралисаних узорака такође је вршена додавањем ТЕА до вредности која је дозвољена за примену на кожу.

Табела 7. Узорци испитивани у оквиру III фази експерименталног рада и њихове ознаке

| Плацебо | Активни узорак (са 10% (м/м) ЛК) | Активни узорак (са 10% (м/м) ЛК; рН подешен до 3.80) |
|----------------|---|---|
| M68a | M68aL2N | M68aL2 |
| M82 | M82L2N | M82L2 |
| M202b | M202bL2N | M202bL2 |

3.1.2.4.1. Процена физичке стабилности и апликативних карактеристика

Процена физичке стабилности свих узорака вршена је у функцији времена, и то мерењем електричне проводљивости узорака, поларизационом и обичном светлосном микроскопијом и спровођењем континуалних реолошких мерења 7 и 60 дана након израде, а потом поређењем добијених вредности. Вршена су и мерења рН узорака у функцији времена. Апликативне особине кремава процењиване су у функцији одређених параметара континуалне реологије.

I Мерење рН вредности

Мерење је изведено потенциометријском методом (Ph.Jug.V) директним урањањем електроде рН-метра у припремљене узорке.

II Мерење електричне проводљивости

Мерење електричне проводљивости узорака изведено је кондуктометријски на исти начин и под истим условима као у I фази испитивања.

III Микроскопска анализа

Поларизациона и светлосна микроскопија узорака спроведена је на исти начин и под истим условима као у I фази испитивања.

Сва коришћена опрема била је иста као у I фази експерименталног рада.

3.1.2.4.2. In vivo/in vitro процена безбедности и ефикасности

На основу резултата добијених проценом физичке стабилности емулзија са АПГ и 10% ЛК, узорци који су показали задовољавајућу стабилност, а намењени су примени на кожу, изабрани су за даље испитивање, и то узорци M82L2 и M202L2; испитивање је извршено такође са одговарајућим плацебо узорцима у циљу поређења.

I In vivo испитивање безбедносног профила узорака на кожи здравих хуманих добровољаца

У циљу *in vivo* одређивања потенцијала испитиваних узорака да иритирају кожу, употребљене су неинванзивне биофизичке методе мерења одговарајућих параметара коже (TEWL, EI, рН и EC) пре и након апликације узорака. Тако је добијен увид у аспекте иритације који се могу одредити *in vivo*, као што је претходно описано.

Дизајн студије

У студији је учествовало 10 добровољаца женског пола, без знакова дерматолошких обољења или изражено суве коже. Испитивање је спроведено у месецу децембру. Воларне стране леве подлактице третиране су узорцима M82 и M82L2 у пределу маркираних површина (9cm², количина 0.016g/cm²), док су места исте површине воларне стране десне подлактице третирана истим количинама узорака M202б тј. M202бL2. Једно место на унутрашњој страни леве подлактице остављено је као нетретирана контрола на којој је вршена оклузија (НКО) док је једно место на унутрашњој страни десне подлактице остављено као

нетретирана контрола на којој није вршена оклузија (НК). Након апликације, места су стављана под оклузију (осим НК) и мерења вршена на исти начин као што је описано у 3.1.2.2.1. (Слика 11).

II In vitro испитивање безбедности (иритационог потенцијала) узорака

Вршено је са претходно наведеним узорцима на исти начин као што је описано у делу 3.1.2.2.1.

III In vivo испитивање ефикасности

У студији су учествовала 54 здрава испитаника са умерено сувом кожом (услов за учествовање у експерименту, субјективна процена), без историје или клиничких знакова дерматолошких обољења. Испитивање је спроведено у периоду новембар-децембар. Испитаници су насумично подељени у две групе и наглашено им је да у току трајања, као ни једну седмицу пре почетка студије, не користе било каква средства за негу коже у испитиваном пределу.

I група (27 испитаника просечне старости 24.2±1.6) – воларна страна леве подлактице третирана је узорком М82, док је иста страна десне подлактице третирана узорком М2026, и то у пределу маркираних површина облика квадрата површине 9cm² употребом картонског лењира са празним површинама. На свакој подлактици један квадрат остављан је као нетретирана контрола (НК).

II група (27 испитаника просечне старости 25.2±1.8 година) – воларна страна леве подлактице третирана је узорком М82L2, док је иста страна десне подлактице третирана узорком М2026L2, на исти начин и уз нетретиране контроле као у I групи.

Након извршеног иницијалног мерења (пре почетка студије, базалне вредности) добровољцима су дате инструкције да узорке (који су били означени стикерима различитих боја) апликују код куће два пута дневно, ујутру и увече након туширања у пределима маркираних површина (узорак одређене боје на одређено место на кожи) уз употребу описаног картонског лењира у току 4 недеље. Мерења су вршена након 2 и након 4 недеље ујутру, пре јутарње апликације узорака, као и три дана након завршетка третмана. Мерени су параметри: TEWL, EC, EI, MI.

Статистика

Сви добијени подаци приказани су као средња вредност \pm стандардна девијација (СД). *In vivo* мерени параметри приказани су као апсолутне промене у односу на одговарајућу базалну вредност (Δ). Приликом обраде података, у циљу одређивања и међусобног поређења ефикасности испитиваних узорака, следећи позитиван тест нормалности, коришћени су параметарски тестови. Добијене вредности мерених параметара на подлактицама, које су третиране узорцима М82, М82L2, М2026, М2026L2, као и вредности одговарајућих контрола (НК), у одређеним временским тачкама, у свакој од појединачних испитиваних група анализирани су једнофакторском АНОВОМ, након чега је рађен Tukey's *t*-test, где је то било потребно (Kuss и Diepgen, 1998; Fluhr и сар., 2001).

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Резултати и дискусија I фазе експерименталног рада

4.1.1. Формулација и процена физичке стабилности, естетских и апликативних особина емулзионих узорака

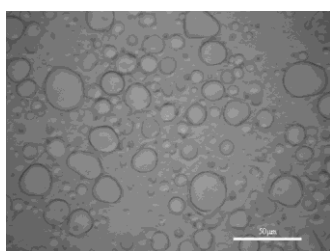
Израђено је 9 серија од укупно 27 узорака емулзија типа У/В. Узорци (Табела 5) су били конзистенције меких до јако вискозних кремова (у зависности од употребљеног емулгатора и коемулгатора тј. костабилизатора као и додатка ЛК и њене неутрализације), бели, сјајни. Конзистенција различитих узорака у оквиру једне серије варирала је у зависности од додатка ЛК – у оквиру неких је додаток ЛК доводио до повећања, а негде до видљивог смањења конзистенције у односу на одговарајуће плацебо узорке. И неутрализација, тј. додаток ТЕА доприносио је разлици у конзистенцијама активних узорака у оквиру исте серије и углавном доводио до њеног смањења. Сви кремови стабилисани емулгатором INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol (емулгатор највеће дужине алкил ланца АПГ, C20/22) имали су видно чвршћу конзистенцију у односу на аналогне кремове израђене помоћу друга два емулгатора. Најконзистентнији од свих израђених узорака су били плацебо кремови серија Ф7, Ф8 и Ф9; они су имали међусобно сличне конзистенције.

Већ приликом израде активних узорака серије Ф1 уочена је нешто ређа конзистенција у односу на одговарајући плацебо узорак, док је и код неутрализованог узорка (М68L1), а нарочито оног у коме није вршена неутрализација (М68L1N) дошло до видног истискивања слоја воде по површини и то пре првог мерења које је требало извршити након 7 дана од израде. Ова нехомогеност је даљим чувањем узорка на собној температури била све израженија. Услед испољене нестабилности, серија узорака Ф1 елиминисана је из даљих испитивања, а емулзиони носач са C16/C18 мешаним АПГ емулгатором, стабилисан АПГ коемулгатором, окарактерисан као неодговарајући за инкорпорацију 6% ЛК.

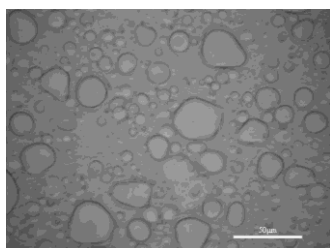
Приликом процене физичке стабилности емулзионих система, пожељно је изводити студије природног старења на собној температури, и то у трајању од неколико месеци (USP 26). При томе, физичкохемијски параметри који се могу узети као релевантни за процену физичке стабилности су следећи: рН вредност,

електрична проводљивост, величина капи, дистрибуција величине капи као и реолошки параметри (минимални и максимални привидни вискозитет, хистерезна површина, еластични и вискозни модул...) (Rieger, 1991). Прелиминарна процена физичке стабилности серија узорака који су били подвргнути даљим испитивањима извршена је кроз реолошку карактеризацију (континуална реолошка мерења), микроскопирањем (поларизациона и светлосна микроскопија) и увидом у рН вредности и вредности електричне проводљивости узорака чуваних на собној температури, измерених након 7 као и након 60 дана од израде.

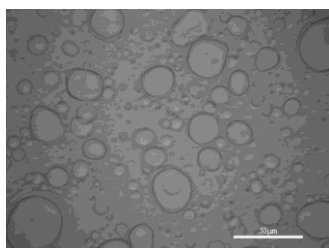
На Слици 12 приказане су светлосне микрографије испитиваних узорака 7 дана након израде, док Слика 14 приказује светлосне микрографије истих узорака (осим оних који су испољили неки вид нестабилности) након 60 дана. Слика 13 приказује поларизационе микрографије узорака 7 дана након израде дајући увид у микроструктуру крема и омогућава процену колоидне структуре, али и расветљавање одређених аспеката релевантних за процену физичке стабилности испитиваних узорака. На Сликама 12 и 13 нису приказане микрографије оба узорка серије Ф1 са ЛК због нестабилности испољене пре истека 7 дана од израде. Поларизационе микрографије узорака након 60 дана приказане су на Слици 15; на овој као и на Слици 14 нису приказане микрографије активних узорака серија Ф1, Ф5, Ф7 и Ф8 с обзиром да су ове серије из претходно наведених разлога, као и разлога који ће бити објашњени у наставку ове дискусије, елиминисане из даљих испитивања. Све микрографије начињене су при увећању 400 пута.



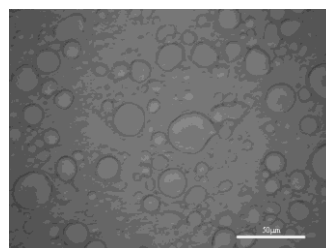
а)



б)

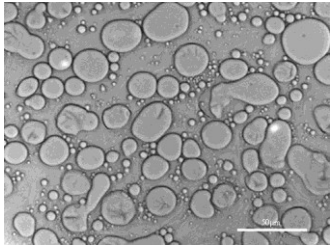


в)

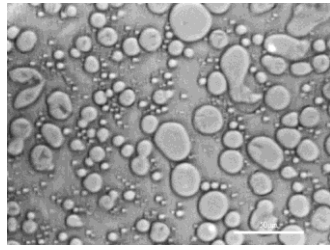


г)

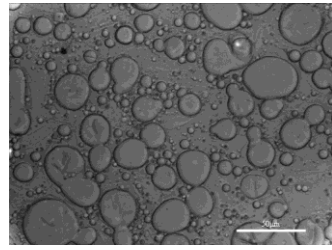
Слика 12. (легенда на страни 75)



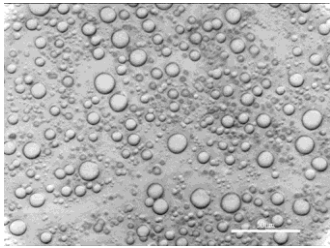
д)



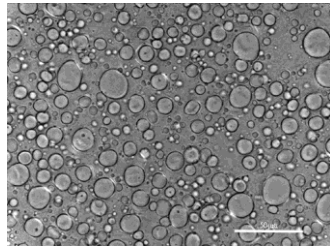
ђ)



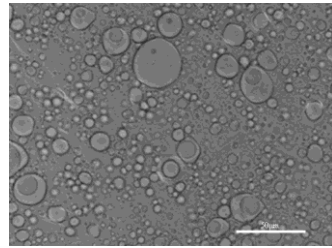
е)



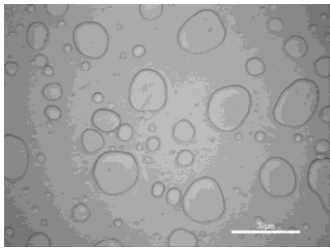
ж)



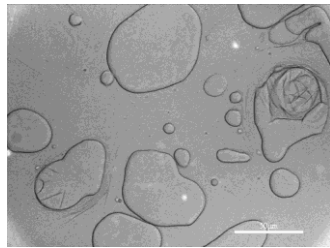
з)



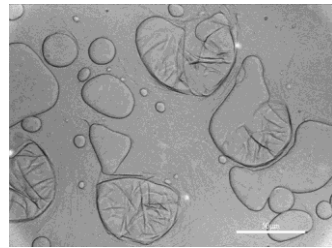
и)



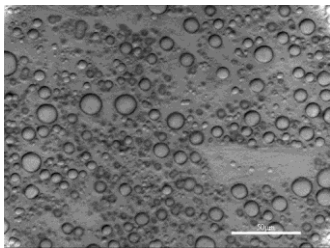
ј)



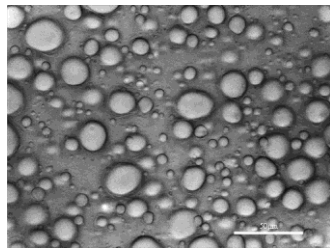
к)



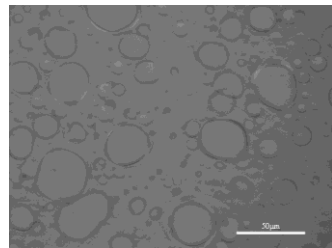
л)



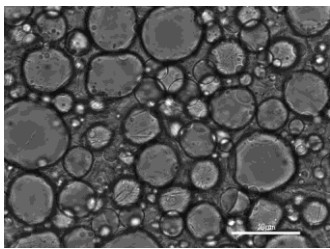
љ)



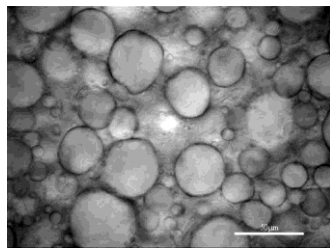
м)



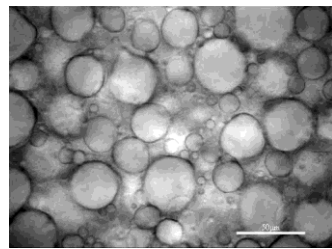
н)



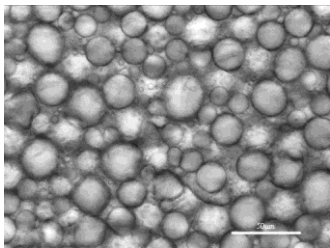
њ)



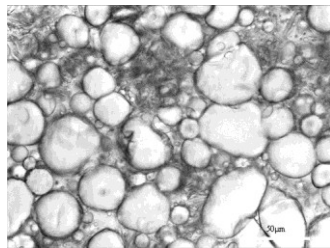
о)



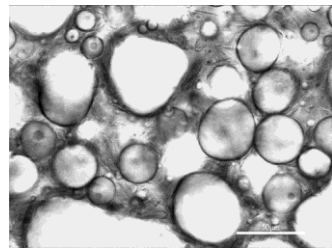
п)



р)

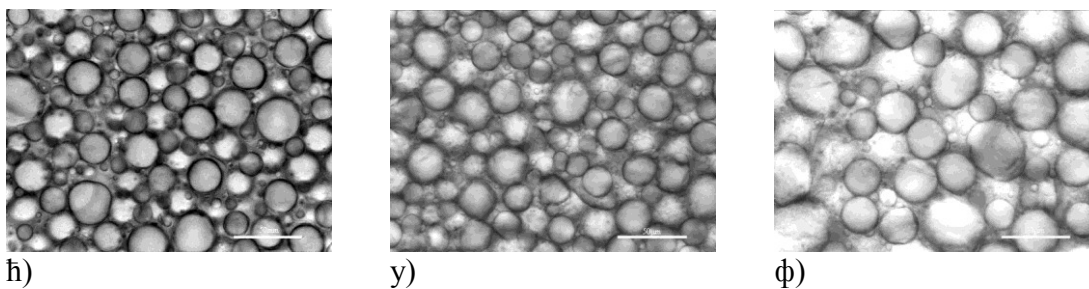


с)



т)

Слика 12. (легенда на следећој страни)

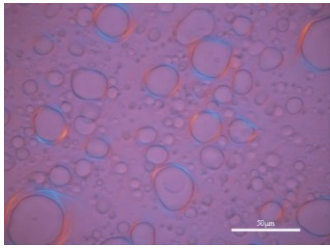


Слика 12. Светлосне микрографије узорака 7 дана након израде под увеличањем 400 пута: а) M68; б) M68a; в) M68aL1N; г) M68aL1; д) M68b; њ) M68bL1N; е) M68bL1; ж) M82; з) M82L1N; и) M82L1; ј) M82a; к) M82aL1N; л) M82aL1; љ) M82b; м) M82bL1N; н) M82bL1; њ) M202; о) M202L1N; п) M202L1; р) M202a; с) M202aL1N; т) M202aL1; ђ) M202b; у) M202bL1N; ф) M202bL1; бар 50 μ m.

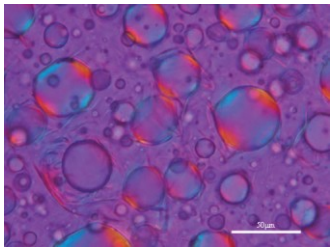
На поларизационим микрографијама готово свих узорака (Слика 13) уочава се присуство анизотропије различитог типа и интензитета, карактеристичне за присуство одређених мезофаза. Раније се сматрало да је управо ламеларна ТК фаза (која се поларизационом микроскопијом визуелизује као малтешки крст или "*onion ring*" око капи унутрашње фазе) доминантна у већини дермокозметичких емулзија. Међутим, теорија гелске мреже чије је основе поставило неколико истраживача, утврђује да структура, капацитет за формирање и стабилност емулзија типа У/В стабилисаних мешаним емулгаторима зависи од капацитета α -кристалне гел фазе да интерагује са континуираном, тј. воденом фазом и бубри (Eccleston, 2010). α -кристална гел фаза се формира у вишку мешаног емулгатора који преостаје након формирања мономолекуларног филма на граници капи уљане фазе; управо је поменута гел фаза (која се на поларизационим микрографијама види у облику пруга у спољашњој фази емулзије) доминантна ламеларна фаза у већини дермокозметичких емулзија стабилизованих мешаним емулгаторима (Eccleston 1997). Тачније, у овим системима идентификују се бар четири фазе, и то (Junginger 1997):

- 1) Диспергована уљана фаза
- 2) Кристална гел фаза састављена од двослојева ПАМ и амфифила одвојених дебелим слојевима интерламеларно фиксиране воде
- 3) Кристални хидрати амфифила
- 4) Цепови (енг. *bulk*) слободне воде.

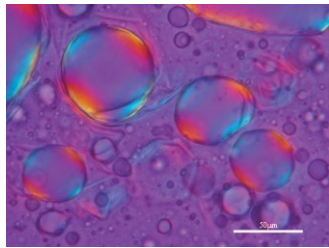
На основу поларизационих микрографија испитиваних узорака може се видети да у структури неких од њих преовладава ламеларни гел у односу на ламеларну ТК фазу. Ипак, код плацебо узорка серије Ф5 (Слика 13ј) анизотропија потпуно изостаје, док је на микрографијама узорака исте серије који су садржали ЛК (Слика 13к, л) уочљива парцијална анизотропија, али без карактеристика које би указале на било који од типова мезофаза. Осим тога, и светлосне и поларизационе микрографије (Слике 12 и 13) указују на присуство диспергованих капи унутрашње фазе уједначених димензија код готово свих узорака (свих серија), осим код М82аL1N и М82аL1 (серија Ф5, Слика 12к и 12л односно 13к и 13л). С обзиром да се на микрографијама ова два узорка уочава присуство флокула мањих капи унутрашње фазе емулзије као и капи знатно увећаних димензија, у односу на оне присутне код микрографија плацебо узорка М82а (Слика 12ј и 13ј), вероватно је да долази до процеса коалесценције у овом емулзионом носачу након додатка ЛК тј. нарушавања филма насталог у присуству мешаног АПГ емулгатора на граници капи унутрашње тј. уљане фазе. Ово указује на одређени вид инкомпатибилности између ЛК и употребљеног АПГ емулгатора - INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol. Парцијална анизотропија која се уочава на микрографијама активних узорака серије Ф5 (Слике 13к и 13л) највероватније потиче од рекристалисаних липида или кристала ЛК присутних у емулзији, мада није искључено и да су то неке анизотропне структуре (сличне ламеларним ТК) које настају додавањем ЛК у емулзију. Иако је слична појава (промоција формирања ламеларних ТК услед додатка ЛК у емулзију) уочена и касније доказана у серији узорака Ф4, у случају активних узорака М82аL1N и М82аL1, поменуте структуре немају неки значај јер дефинитивно не стабилишу узорак. Узорци М82аL1N и М82аL1 несумњиво су испољили физичку нестабилност, што је било у складу и са органолептичким налазом (дошло је до промене конзистенције емулзије од меког крема до лосиона већ након неколико дана од израде), као и резултатима мерења електричне проводљивости поменутих емулзија (Табела 8, узорци М82аL1N и М82аL1) – забележене су релативно високе иницијалне вредности.



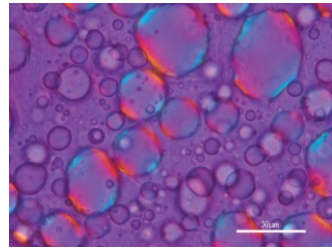
а)



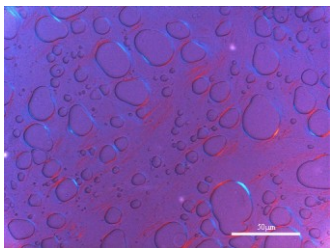
б)



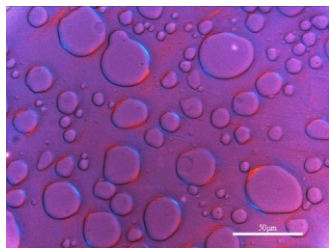
в)



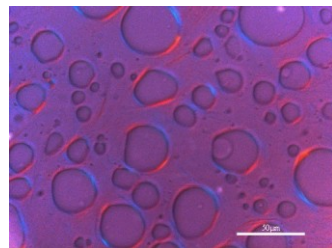
г)



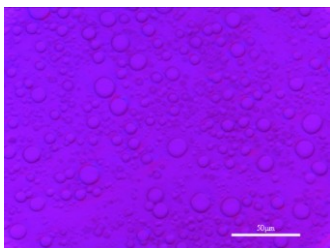
д)



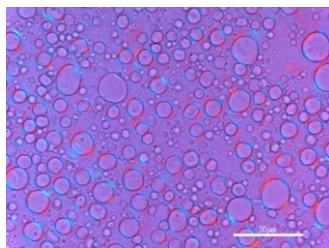
е)



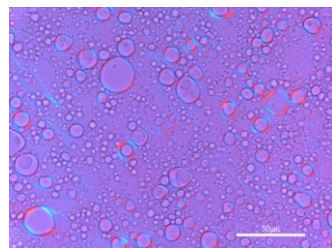
ж)



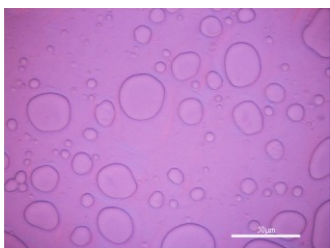
з)



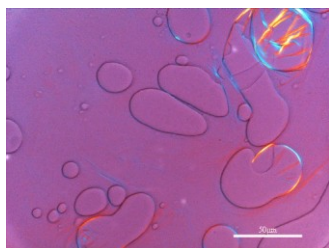
и)



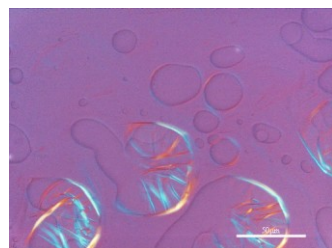
й)



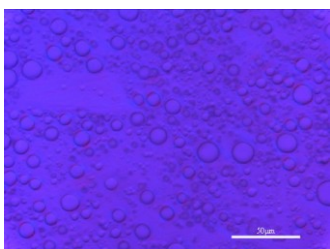
ј)



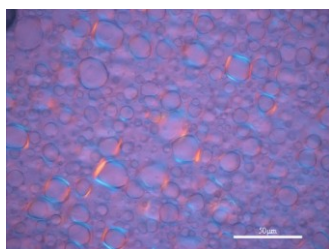
к)



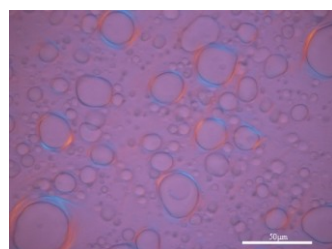
л)



љ)

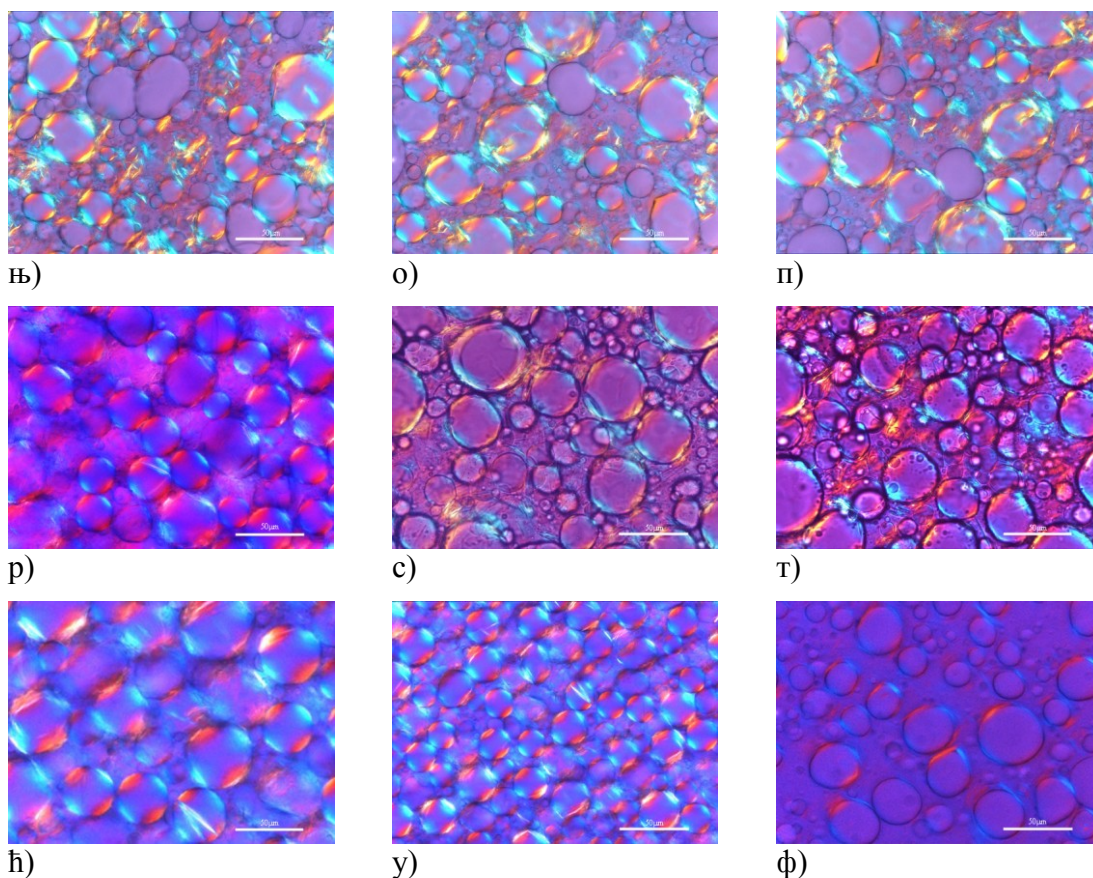


м)



н)

Слика 13. (легенда на следећој страни)



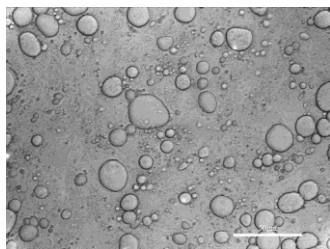
Слика 13. Поларизационе микрографије узорка 7 дана након израде под увеличањем 400 пута: а) M68; б) M68a; в) M68aL1N; г) M68aL1; д) M68b; е) M68bL1N; ж) M68bL1; з) M82; и) M82L1N; я) M82L1; к) M82a; л) M82aL1N; м) M82aL1; н) M82b; о) M82bL1N; п) M82bL1; р) M202; с) M202L1N; т) M202L1; у) M202a; ф) M202aL1N; х) M202aL1; ц) M202b; ч) M202bL1N; ш) M202bL1; бар 50 μ m.

Након 60 дана чувања на собној температури дошло је до потпуног распадања активних крема серије $\Phi 5$ (M82aL1N и M82aL1) те није било могуће направити њихове микрографије нити измерити друге параметре. Плацебо узорак серије $\Phi 5$ 60 дана након израде добија нешто течнију конзистенцију, његова светлосна микрографија приказана је на Слици 14j; иако на њој није уочљив пораст дијаметра капи унутрашње фазе (у односу на дијаметар капи на микрографији направљеној након 7 дана лагеревања), ипак је евидентан пораст вредности електричне проводљивости овог узорка након 60 дана (Табела 8), што свакако не говори у прилог његовој физичкој стабилности.

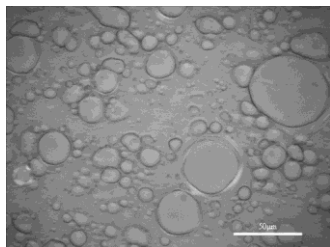
Табела 8. Вредности рН и проводљивости узорака након 7 и 60* дана од израде

| Узорак | рН | Проводљивост (μS/cm) | Узорак | рН | Проводљивост (μS/cm) | Узорак | рН | Проводљивост (μS/cm) |
|---------|-------|----------------------|---------|-------|----------------------|----------|-------|----------------------|
| M68 | 6,05 | 40,40 | M82 | 6.54 | 72.80 | M202 | 6,00 | 30,90 |
| | 5,55 | 60,60 | | 6.14* | 74.50* | | 5,20 | 40,00 |
| M68L1N | - | - | M82L1N | 2.48 | 101.00 | M202L1N | 2,20 | 195,50 |
| | - | - | | 2.45* | 124.00* | | - | - |
| M68L1 | - | - | M82L1 | 3.80 | 118.70 | M202L1 | 3,80 | 260,70 |
| | - | - | | 3.55* | 128.17* | | - | - |
| M68a | 6.00 | 44.20 | M82a | 6.15 | 152.50 | M202a | 6,05 | 38,90 |
| | 5.05* | 43.40* | | 5.81* | 253.00* | | 5,40 | 45,50 |
| M68aL1N | 2.57 | 257.00 | M82aL1N | 2.90 | 137.60 | M202aL1N | 2,25 | 244,89 |
| | 2.50* | 105.20* | | - | - | | - | - |
| M68aL1 | 3.80 | 514.00 | M82aL1 | 3.80 | 192.20 | M202aL1 | 3,80 | 290,00 |
| | 3.60* | 545.00* | | - | - | | - | - |
| M68b | 5.99 | 45.89 | M82b | 6.12 | 105.50 | M202b | 5.90 | 79.67 |
| | 5.05* | 85.0* | | 6.11* | 99.30* | | 4.90* | 86.40* |
| M68bL1N | 2.28 | 193.0 | M82bL1N | 2.90 | 300.00 | M202bL1N | 2.17 | 92.1* |
| | 2.0* | 220.5* | | 2.61* | 144.90* | | 2.11* | 122.5 |
| M68bL1 | 3.80 | 226.2 | M82bL1 | 3.80 | 560.00 | M202bL1 | 3.80 | 105.20 |
| | 3.65* | 270.5* | | 3.49* | 530.00* | | 3.47* | 144.90* |

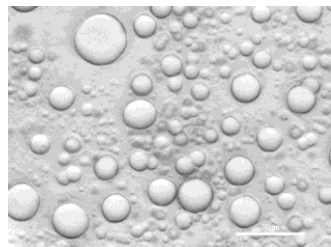
Из претходно наведених разлога, серија узорака Ф5 је елиминисана из даљих испитивања а емулзиони носач М82а (емулзија на бази С12/С14 АПГ емулгатора са хидрофилним костабилизатором ксантан гумом) окарактерисан као неодговарајући за инкорпорацију ЛК. Међутим, друге серије узорака, такође стабилисана овим емулгатором, али уз додатак АПГ коемулгатора показале су знатно бољу физичку стабилност. За разлику од емулгатора INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol, евидентно је да друга два испитивана емулгатора већих дужина алкил ланаца АПГ (С16/18 и С20/22) остварују различите лиотропне интеракције са водом и уљем, тј. масном фазом комплексног састава, и без додатка АПГ коемулгатора.



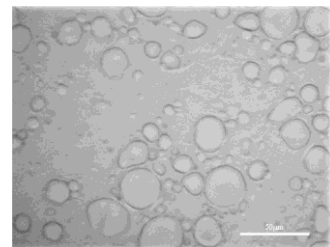
а)



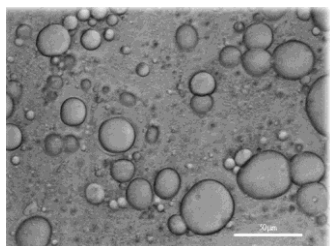
б)



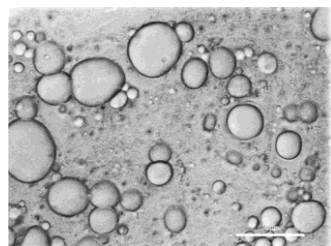
в)



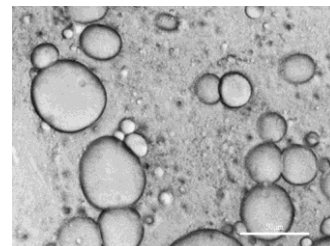
г)



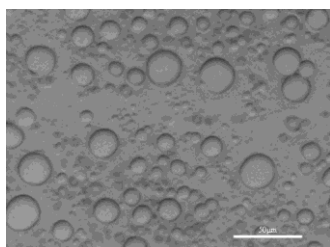
д)



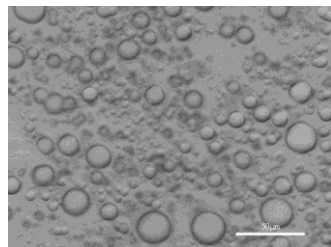
е)



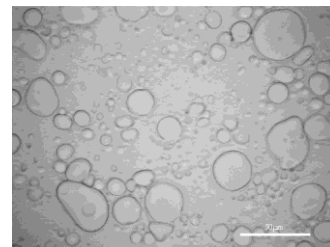
ж)



з)

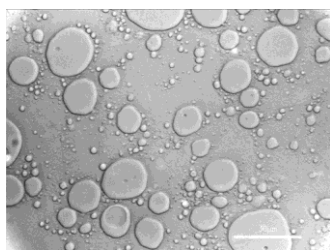


и)



и)

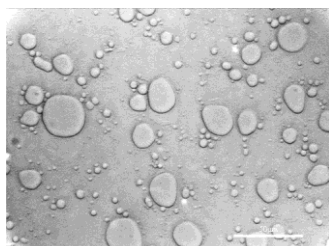
Слика 14. (легенда на следећој страни)



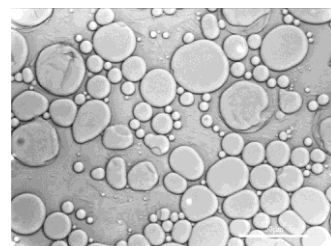
ј)



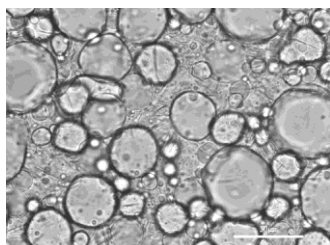
к)



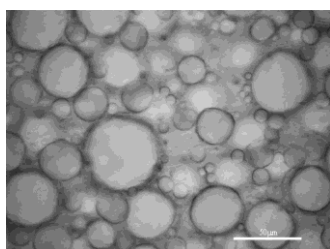
л)



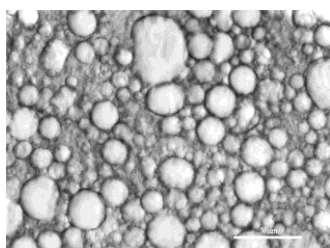
љ)



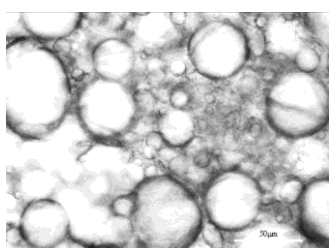
м)



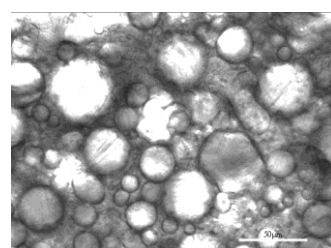
н)



њ)



о)



п)

Слика 14. Светлосне микрографије узорака након 60 дана од израде (увеличање 400 пута) а) М68; б) М68а; в) М68аL1N; г) М68аL1; д) М68б; ђ) М68бL1N; е) М68бL1; ж) М82; з) М82L1N; и) М82L1; ј) М82а; к) М82б; л) М82бL1N; љ) М82бL1; м) М202; н) М202а; њ) М202б; о) М202бL1N; п) М202бL1; бар 50μм.

Иако би изостанак анизотропије на поларизационој микрографији плацебо емулзије стабилисане само емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol без додатка АПГ коемулгатора (серија Ф5, Слика 13љ) могао чак да упути на присуство кубних мезофаза (с обзиром да су то једини лиотропни течни кристали

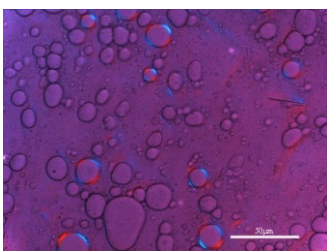
који не поседују својство двоструког преламања поларизоване светлости), ипак пораст вредности проводљивости овог узорка (Табела 8) и средњег дијаметра диспергованих капи 7 vs. 60 дана указују да је одсуство анизотропних домена заправо последица изузетно слабих лиотропних интеракција или чак њиховог одсуства. Наиме, кубна фаза поседује уређеност дугог опсега у три димензије па чак и није прави течни кристал, већ заправо кристал (Fairhurst и сар., 1998). Уколико би у питању била стабилизација присуством кубне фазе лиотропних течних кристала, сасвим је извесно да би се емулзије (пре свега плацебо) одликовале много већом физичком стабилношћу, али би и биле конзистентније. Тачније, оне би се одликовале пластичним типом течења, карактеристичним за кубне мезофазе, што при континуалним реолошким мерењима за овај плацебо узорак (резултати нису приказани) није уочено. Из тог разлога сасвим је јасно да емулгатор INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol у концентрацији 7% остварује јасну лиотропну интеракцију са водом/комплексном мешавином масних емолијенаса, тек уз додатак липофилног коемулгатора-АПГ што се може закључити на основу резултата даљих испитивања узорака серије Ф4 и Ф6.

Разумевање фазног понашања различитих ПАМ типа АПГ у мултикомпонентним емулзионим системима, физичких особина таквих емулзија, као и зависности оба наведена аспекта таквих емулзионих носача од додатка одређених активних супстанци је неопходно да би се проценила могућност употребе различитих АПГ мешаних емулгатора у дермофармацији и козметологији. Још раније је установљено на примеру једноставних бинарних и тернарних система да фазно понашање овог типа емулгатора зависи од дужине алкил ланца АПГ (Von Rybinski, 1996; Tesmann и сар., 1997), што се у емулзионим системима огледа и у утицају на физичкохемијску стабилност саме емулзије. Наиме, бинарни и тернарни емулзиони системи стабилисани АПГ дугог ланца одликовали су се нешто бољом физичком стабилношћу у односу на оне са АПГ мање дужине алкил ланца (Von Rybinski, 1996). Међутим, није сасвим јасно да ли крајња "једноставност" при том испитиваних система ограничава извођење општих закључака који би се односили на емулзије стабилисане помоћу АПГ. Тачније, поставља се питање да ли би у емулзијама комплексног састава које се могу употребити као носачи за лекове или КАС, а које су стабилисане мешаним АПГ емулгатором, дужина АПГ ланца употребљеног емулгатора и додатак КАС

различитих особина (нпр. јако киселих и хигроскопних КАС као што су АНАs) утицала на њихову физичку стабилност и на који начин.

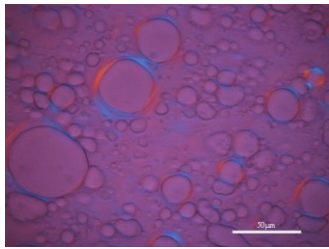
Из наведених разлога, свакако треба напоменути да је интензитет анизотропије на микрографијама свих испитиваних плацебо узорака израђених употребом друга два АПГ емулгатора веће дужине алкил ланца већи у односу на интензитет анизотропије код плацебо узорака стабилисаних емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol (C12/14 АПГ); сви плацебо узорци (три групе од по три узорка) такође се разликују и по карактеристикама присутне анизотропије у зависности од употребљеног емулгатора. Међутим, чак и уколико посматрамо одвојено микрографије плацебо узорака који су стабилисани истим емулгатором, у свакој од ове три групе тип и интензитет присутних анизотропија није исти, већ углавном зависи од типа употребљеног костабилизатора. Анизотропија је израженија код свих плацебо серија стабилисаних емулгатором INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol, нарочито код узорака стабилисаних додатком АПГ коемулгатора (Слика 13њ, 13ћ). Штавише, уочена је разлика у анизотропним структурама визуелизованим под поларизационим микроскопом код свих плацебо узорака (без обзира на емулгатор) у функцији присуства АПГ коемулгатора. Прецизније, додатак овог коемулгатора изазивао је нешто израженију анизотропију у односу на ону код узорака стабилисаних само емулгатором (било којим од испитиваних) уз додатак ксантан гуме, што се донекле и могло очекивати.

И након 7 и након 60 дана чувања плацебо узорак стабилисан емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol уз додатак ксантан гуме показује потпуно одсуство анизотропије (узорак М82а, Слика 13ј, 15ј), али плацебо узорци М82 и М82б, стабилисан истим емулгатором уз додатак АПГ коемулгатора, (Слике 15ж и 15к) показују слабо видљиве анизотропне структуре око капљица унутрашње фазе тј. слабо заступљено присуство трака ламеларних мезофаза које вероватно потичу од коемулгатора.

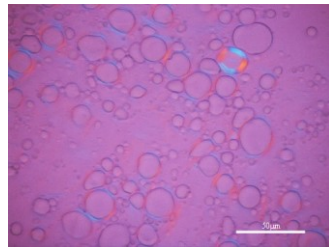


а)

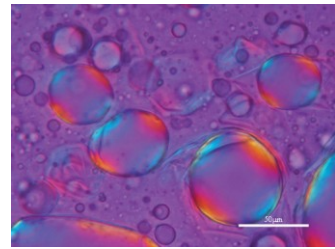
Слика 15. (легенда на страни 86)



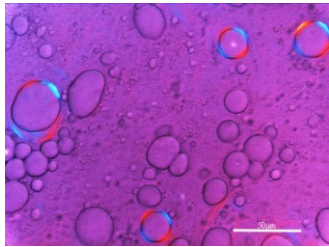
б)



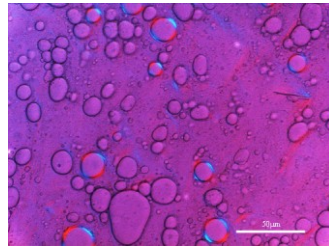
в)



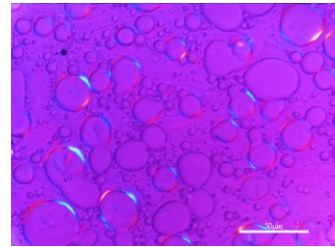
г)



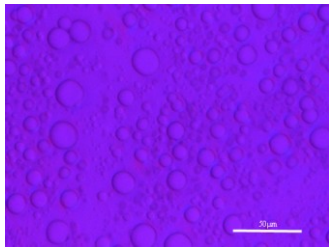
д)



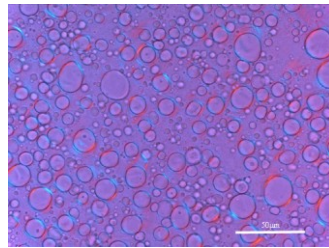
е)



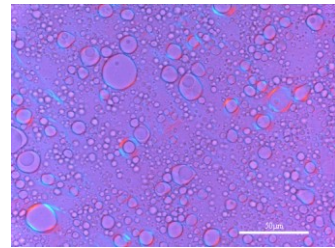
ж)



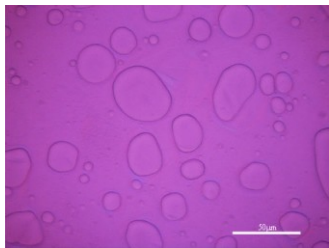
з)



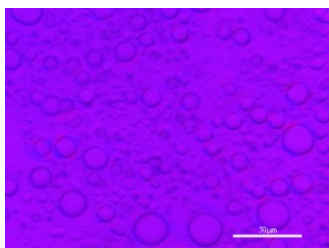
и)



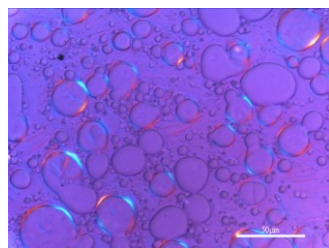
й)



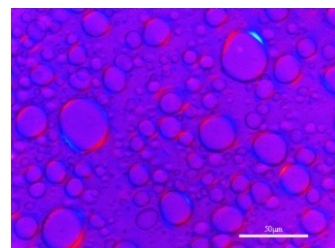
к)



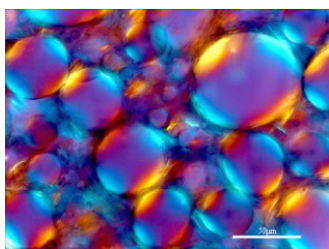
л)



м)

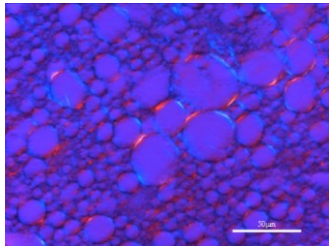


н)

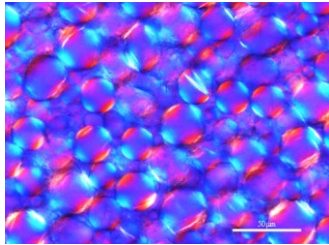


о)

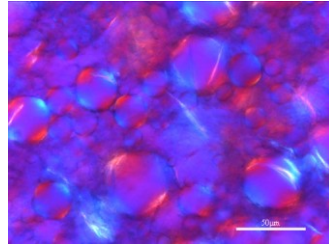
Слика 15. (легенда на следећој страни)



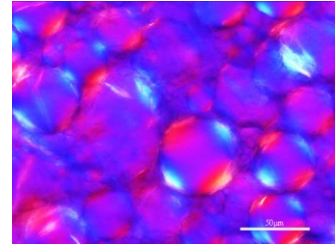
н)



њ)



о)



п)

Слика 15. Поларизационе микрографије узорака након 60 дана лагеревања, увећање 400 пута: а) М68; б) М68а; в) М68аL1N; г) М68аL1; д) М68б; њ) М68бL1N; е) М68бL1; ж) М82; з) М82L1N; и) М82L1; ј) М82а; к) М82б; л) М82бL1N; љ) М82бL1; м) М202; н) М202а; њ) М202б; о) М202бL1N; п) М202бL1; бар 50μm.

На светлосним микрографијама (Слика 12 и Слика 14) може се запазити да додатком ЛК, нарочито у случају неутралисаних узорака, углавном долази до пораста величине капи унутрашње фазе. У складу са тим су и налази поларизационе микроскопије који откривају уочљиву разлику визуелизованих анизотропних структура активних узорака у односу на исте структуре код одговарајућих плацеба, што би указало на јак утицај ЛК на микроструктуру испитиваних емулзионих носача. Тај утицај огледа се у виду појаве лиотропних реакција различитог типа и интензитета по додатку ове КАС и вероватно зависи од употребљеног АПГ емулгатора и коемулгатора. Тачније, по додатку ЛК у емулзију, негде долази до промоције настанка, а негде највероватније до нарушавања анизотропних структура којима је стабилисан одговарајући плацебо. Овај утицај најизраженији је у случају узорака серије Ф4 – М82L1N и М82L1 (Слике 13з, 13и) као и код серије Ф6 - М82бL1N и М82бL1 (Слика 13м, 13н). Код поменутих узорака, насупротив очекиваном нарушавању ионако слабо изражених ламеларних мезофаза код плацеба и смањењу физичке стабилности емулзија, након додатка ЛК уствари долази до даљег структурирања емулзија тј. формирања додатних мезофаза. То се огледа у присуству додатних анизотропних домена код активних узорака у односу на одговарајуће плацебо узорке М82 (Слика 13ж) односно М82б (Слика 13љ). Наиме, сасвим је извесно да долази до накнадног формирања одређених ламеларних течно-кристалних структура у

присуству ЛК које се могу видети као деформисани малтешки крстови тј. „*onion rings*“ којих готово да нема у структури плацебо узорака. Код поменутих узорака са ЛК нешто су израженије и уљане пруге у континуалној фази.

Измерене рН вредности свих испитиваних плацебо узорака (Табела 8) биле су у складу са препорученим вредностима за дермокозметичке производе (које морају бити блиске физиолошким рН коже) (Loden, 2003). рН узорака са ЛК углавном су биле испод 2.5 што се и очекивало услед киселе природе ове КАС. Уочен је пад рН вредности свих узорака у функцији времена (Табела 8). Међутим, с обзиром да је у случају плацеба као и активних узорака овај пад био унутар 1 рН јединице, са хемијског аспекта може се сматрати прихватљивим. Код активних узорака вероватно долази до распадања продуката неутрализације и настанка слободне ЛК, али ове промене могу се занемарити с обзиром да рН вредности плацебо узорака, као и узорака са ЛК подешене рН вредности (Табела 8) остају у опсегу оних које су препоручене код производа намењених апликацији на кожу (Loden, 2003). Промене рН код активних узорака 7 vs. 60 дана износиле су од 0,15 до 0,33 рН јединице.

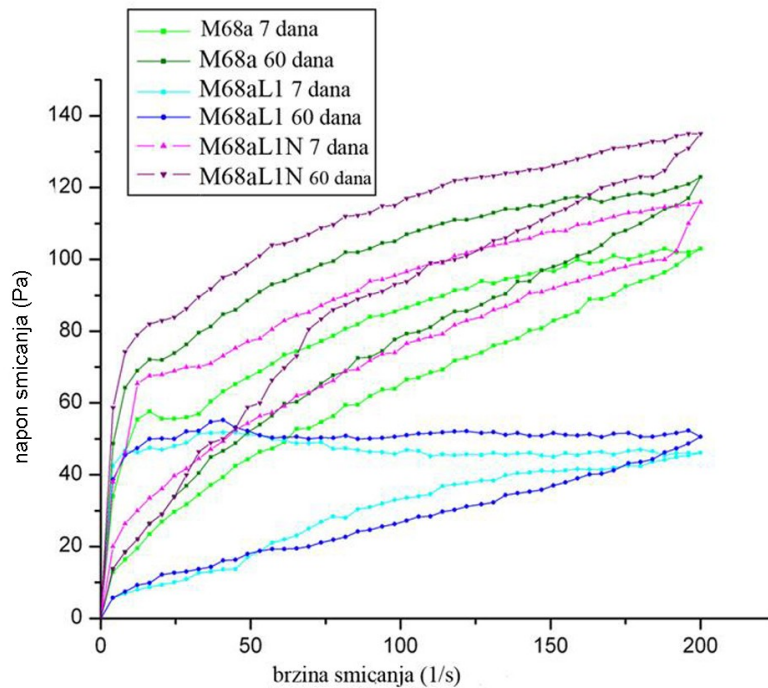
Емулзије код којих долази до највећег пораста проводљивости током времена су и најнестабилније, а сматра се да је мерење вредности електричне проводљивости у функцији времена (или неких других фактора нпр. приликом извођења тестова убрзаног старења емулзија) најосетљивија техника детектовања физичких промена у самој емулзији (Masmoudi и сар., 2005). Код неколико серија узорака код којих је било могуће извршити мерења након 60 дана од израде, долази до пада вредности проводљивости плацебо крема у функцији времена складиштења (7 vs. 60 дана), док код неких плацеба проводљивост расте, негде чак и драстично што би могло указати на нестабилност. Вредности проводљивости плацебо узорака М68, М68а, М68б, М202, и М202а (Табела 8) при иницијалном мерењу износиле су мање од 50 $\mu\text{s}/\text{cm}$ указујући да се ради о мултифазним емулзионим системима (Nielloud и Marti-Mestnes, 2000), док су вредности проводљивости свих плацебо узорака стабилисаних помоћу INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol биле изнад 50 $\mu\text{s}/\text{cm}$, што указује на емулзије типа У/В, и може се објаснити хидрофилнијим карактером молекула овог емулгатора (краћи алкил ланци). Већ након првог мерења спроведеног 7 дана по изради узорака, запажено је да је код узорака серије Ф7 (стабилисаних емулгатором INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol уз АПГ коемулгатор) који су

садржали ЛК дошло до видног издвајања капљица воде на површини узорка, мада су иницијално измерене вредности проводљивости биле ниске. Код узорака стабилисаних истим емулгатором и хидрофилним костабилизатором ксантан гумом (серија Ф8, нешто више иницијалне вредности проводљивости) дошло је до видљивог испољавања нестабилности тј. раслојавања фаза након 60 дана од израде и то у случају узорака који су садржали ЛК. Код плацебо узорка серије Ф8 након 60 дана дошло је до незнатног пада конзистенције.

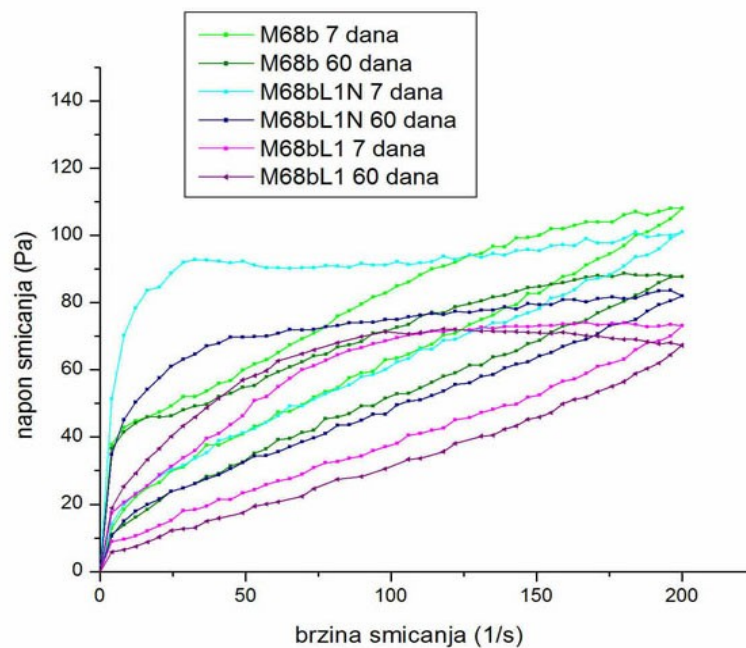
Генерално, проводљивост свих узорака који су садржали ЛК била је знатно виша у односу на одговарајући плацебо, већ при првом мерењу (Табела 8). То се и могло очекивати с обзиром да је још раније показано да су вредности проводљивости мултифазних емулзија у складу са количином слободне воде и јона (у овом случају пореклом од ЛК) у њима (Korhonen et al. 2005). Ипак, изразито велика разлика у вредностима проводљивости узорака који су садржали ЛК (нарочито неутралисаних) у односу на одговарајуће плацебо узорке указује и на евентуалну дестабилизацију емулзионог носача након инкорпорације ове изразито киселе активне супстанце. Било је неопходно узети у обзир и резултате испитивања поларизационом микроскопијом и одређивања реолошких параметара емулзија (континуална реолошка мерења) ради потпуне процене физичке стабилности испитиваних серија узорака и одабира узорака задовољавајуће физичке стабилности који би били подвргнути даљим испитивањима.

Резултати континуалних реолошких мерења изведених на узорцима серија Ф2, Ф3, Ф4, Ф6 и Ф9 (резултати за узорке серија Ф1, Ф5, Ф7 и Ф8 нису приказани с обзиром да су ове серије изостављене из даљих испитивања тј. није било могуће спровести мерења након 60 дана) представљени су кривама течења које показују зависност напона смицања (τ) од брзине смицања (D). Упоредни приказ реограма добијених након 7 односно након 60 дана од израде узорака даје још потпунију слику о њиховој физичкој стабилности (Слика 16а-д). Вредности минималног и максималног привидног вискозитета (η_{\max} , η_{\min}), као и промена хистерезне површине (H , површина испод хистерезне петље) 7 vs. 60 дана дају додатне информације о физичкој стабилности емулзионих система. Треба истаћи да се хистерезна површина генерално сматра мером тиксотропије система. Са Сlike 16 се може видети да су код свих испитиваних узорака профили течења при деловању спољашње силе, која одговара сили потребној да се узорак апликује на кожу слични. Сви узорци испољили су псеудопластично течење (енг. *shear*

thinning) са слабо до умерено израженом тиксотропијом. Овакво реолошко понашање дермокозметичких емулзија (као и у случају дерматолошких лекова намењених локалној примени) је пожељно с обзиром да такви узорци имају добре апликативне особине тј. лакше се размазују и образују континуирани филм који добро адхерира на површину коже (Рена и сар., 1994).

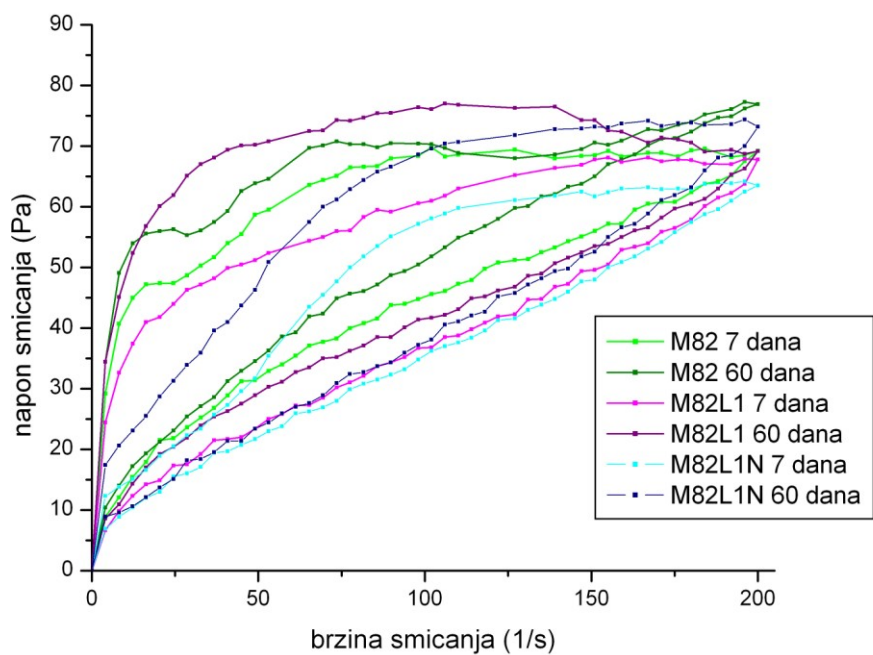


a)

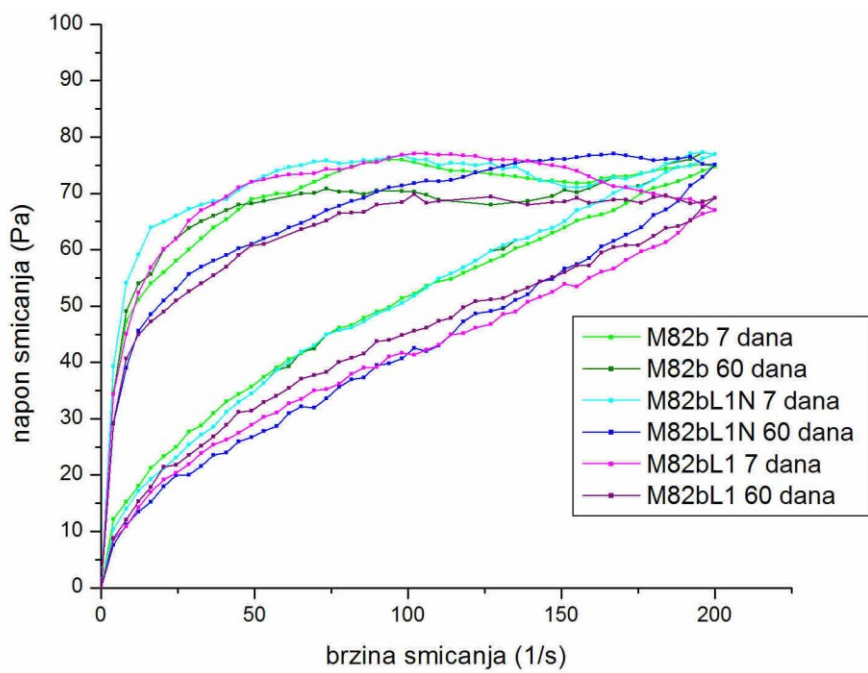


b)

Слика 16. (легенда на страни 91)

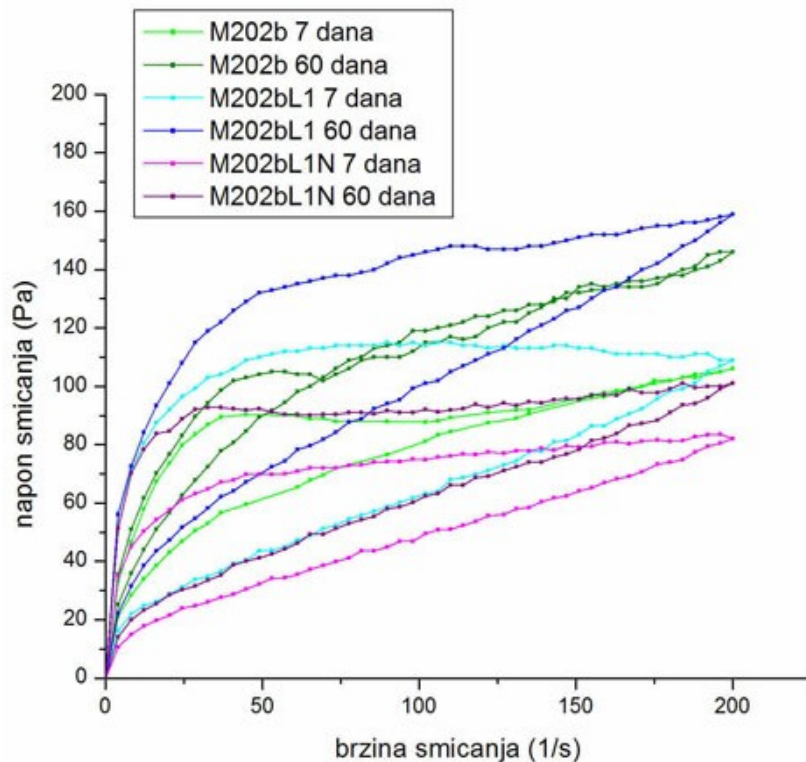


B)



Г)

Слика 16. (легенда на следећој страни)



д)

Слика 16. Упоредни реограми узорака стабилованих са АПГ различите дужине алкил ланца, по серијама: а) Ф2; б) Ф3; в) Ф4; г) Ф6 и д) Ф9

Плацебо узорак M202b (стабилисан АПГ мешаним емулгатором највеће дужине алкил ланца – C20/C22) показао је нешто јачи отпор деловању примењене силе смицања у односу на остале плацебо узорке, док су узорци стабилисани поменути емулгатором, али са 6% неутралисане ЛК, показали такође нешто јачи отпор примењеној сили у односу на аналогне узорке осталих серија (Слика 16д). Треба истаћи да је реограм узорка M202b након 60 дана чувања на собној температури указао на пресецање узлазне и силазне криве; сама сила примењена у циљу реолошког мерења вероватно је довела до накнадног структурирања узорка (Eccleston and Beattie, 1988) што свакако није пожељна апликативна особина емулзије. Код истог узорка дошло је до израженог пораста вредности η_{\max} и незнатног пораста хистерезне површине након 60 дана од израде узорка у односу на вредност која је добијена након 7 дана. Нешто мање изражен пораст поменутих вредности 7 vs. 60 дана забележен је и код узорка M202bL1N и M202bL1 али и M68a и M68aL1N (Слика 14а). Овакав пораст поменутих параметара свакако указује на накнадно стриктурирање узорка током лагеровача, што се сматра неповољном особином и један је од типичних недостатака емулзија стабилисаних ПАМ које у свом хидрофилном делу садрже полиоксиетиленске (ПОЕ) групе.

Узорци серије Ф4 и Ф6 (стабилисани емулгатором најкраћег алкил ланца АПГ, С12/14, Сlike 14в и 14г) као и узорци М68аL1 и М68бL1, који су садржали неутралисану ЛК (Сlike 14а и 14б), нису показали значајнији пораст параметара реологије који указују на накнадно структурирање. Из тог разлога може се претпоставити да евентуална појава накнадног структурирања козметичких емулзија стабилисаних испитиваним емулгаторима, током времена, зависи од дужине алкил ланца АПГ, и да је најизраженија код емулзија стабилисаних емулгатором INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol тј. емулгатором највеће дужине алкил ланца (који је уједно и најлипофилнији од свих других овде испитиваних)

И поред знатне структурираности емулзија стабилисаних АПГ емулгатором INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol, код активних узорка серија Ф7 и Ф8 стабилисаних поменути емулгатором уочене су нехомогености тј. нестабилности које су условиле њихову елиминацију из даљих испитивања. Оно што се може закључити на основу досадашњих резултата је да емулзије стабилисане овим јако липофилним АПГ мешаним емулгатором дужине алкил ланца АПГ С20/22 могу бити носачи за јако хигроскопне супстанце као што је ЛК тек уз додатак АПГ коемулгатора (мање дужине алкил ланца, као што је овде употребљен С14 АПГ који је самим тим хидрофилнији у односу на сам емулгатор) у комбинацији са хидрофилним костабилизатором као што је ксантан гума (серија узорка Ф9 израђена је уз додатак оба костабилизатора).

Досадашња запажања о интеракцији ЛК са емулзијама стабилисаним употребом остала два АПГ мешана емулгатора (дужине алкил ланца С12/14, односно С16/18 АПГ) наводе на закључак да, у случају емулзија са емулгатором највеће дужине алкил ланца (С20/22 АПГ), његова липофилности условљава да хидрофилна ЛК вероватно не може (или само у неком малом проценту може) бити инкорпорирана унутар ламела течно-кристалних и гел фаза присутних у структури ових емулзија (претходно визуелизованих поларизационим микроскопом). Према томе, већа количина ЛК остаје у спољашњој фази емулзије растворена у тзв. слободној води, и не икорпорира се у интерламеларни простор. Вероватно да је ова фракција ЛК, заједно са присутном ксантан гумом, такође раствореном у спољашњој фази емулзије у узорцима серије Ф8. То доводи чак и до привлачења одређене количине интерламеларно везане воде и њеног повлачења из интерламеларног простора (а самим тим и много веће вредности

проводљивости узорка M202aL1 у односу на одговарајући плацебо, Табела 8). Ово вероватно даље доводи до смањења дебљине ламеларних течних кристала око капљица унутрашње фазе (што се на поларизационим микрографијама види као смањење дебљине светлог слоја око капи) које је присутно код узорка M202aL1 (Слика 13с) у односу на структуре које се визуелизују код плацеба (узорак M202a, Слика 13р). То највероватније доводи до испољене нестабилности која је условила елиминацију овог узорка из даљих испитивања. У случају носача стабилизаног поменути емулгатором уз АПГ коемулгатор (серија Ф7), ЛК се (вероватно због нешто повећане хидрофилности ламеларних домена услед додатка знатно хидрофилнијег АПГ коемулгатора у односу на употребљени емулгатор) може делимично инкорпорирати у ламеле, али и даље један део остаје у спољашњој фази и "извлачи" интерламеларно везану воду. Вишак неинкорпорираних воде потом током чувања бива "истиснут" на површину (што је уочено већ након неколико дана). Разумно је претпоставити да тек додатком и ксантан гуме и АПГ коемулгатора (који је хидрофилнији у односу на примарни емулгатор) емулзије код којих је као примарни емулгатор употребљен INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol могу бити стабилни носачи за ЛК. Вероватно је да ксантан гума (растворена у спољашњој фази емулзије) везује део воде "извучене" из интерламеларних простора (након инкорпорације ЛК) и спречава да она "изађе" на површину узорка (што је визуелизовано код серије Ф7 као нехомогеност активних узорака). На тај начин омогућено је да плацебо узорак серије Ф9 (који садржи и АПГ коемулгатор) буде стабилан носач за 6% ЛК.

Реограми плацебо узорака осталих серија нису указали на присуство недостатака (у смислу накнадног структурирања) присутних у реолошком понашању узорка M202b. Што се тиче осталих узорака са ЛК, углавном долази до промене вредности η_{\max} и η_{\min} у односу на одговарајуће плацебо узорке (Слика 16а-д), што је и органолептички уочено као различит вискозитет. Међутим, нису уочене драстичне промена мерених параметара континуалне реологије ни код једног од испитиваних узорака, те се, имајући у виду све претходне анализе, физичка стабилност испитиваних узорака серија Ф2, Ф3, Ф4, Ф6 и Ф9 може дефинисати као задовољавајућа.

Ако се има у виду да су узорци M68aL1 и M68bL1, који су садржали неутрализовану ЛК, показали готово незнатан пораст параметара реологије који указују на накнадно структурирање након 60 дана чувања (што је уочено код

њихових плацеба), добијени резултати указују да реолошке особине емулзија стабилисаних емулгаторима типа АПГ такође зависе и од инкорпориране активне супстанце, тј. да се вероватно мењају при додатку јако киселе и хигроскопне КАС као што је ЛК. Генерално, сви испитивани узорци који су садржали ЛК показали су или незнатан пораст вискозитета и хистерезне површине (H) након 60 дана чувања на собној температури, или чак пад вредности поменутих параметара у односу на вредности измерене након 7 дана (Слика 16а-д). Имајући у виду и налазе поларизационих микрографија (тј. промене анизотропних структура које се код одређених емулзија уочавају 7 vs. 60 дана или у оквиру исте серије од плацеба ка активним неутралисаним узорцима, Сликe 11 и 13), неопходно је установити тип и интензитет интеракције ЛК и одабраних АПГ емулзионих носача (који су показали најбољу физичку стабилност и естетске карактеристике) применом специфичних аналитичких метода. Циљ би био дефинитивна процена компатибилности ЛК и одређених изабраних АПГ као и избор најповољнијег АПГ емулзионог носача за инкорпорацију 6% ЛК. Најбоље карактеристике тј. најбољу физичку стабилности и естетске и апликативне карактеристике показале су серије узорака Ф2 и Ф4. Узорци ових серија су подвргнути даљој анализи. Серија формулација Ф9 тј. емулзије стабилисана емулгатором INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol нису одабране за даљу процену колоидне структуре као потенцијални носач ЛК због неповољних реолошких, тј. естетских и апликативних (сензорних) особина у смислу додатног структурирања, односно очвршћавања (промене конзистенције) током складиштења.

4.1.2. Испитивање микроструктуре изабраних серија узорака – процена утицаја ЛК на колоидну структуру емулзија

Способност различитих емулгатора типа АПГ (дужине ланца C12/C14 и C16/C18, тј. емулгатора INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol и INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol) да стабилишу емулзионе носаче комплексне колоидне структуре типа ламеларних течних кристала и ламеларног гела утврђена је још раније, али углавном за бинарне и тернарне системе (Savic и сар., 2009а; Savic и сар., 2011). Колоидна структура и физичка стабилност емулзија комплексног састава масне фазе стабилисаних поменутих емулгаторима, сличних оним које се употребљавају као носачи или препарати за хидратацију коже у дерматологији и козметологији до сада није била детаљније проучена. Утицај активних супстанци

(лекова или КАС) на колоидну структуру емулзија стабилисаних мешаним АПГ емулгаторима такође није испитиван, осим на примеру урее, супстанце базног карактера инкорпориране у емулзиони носач стабиљан INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol емулгатором (Savic и сар., 2008).

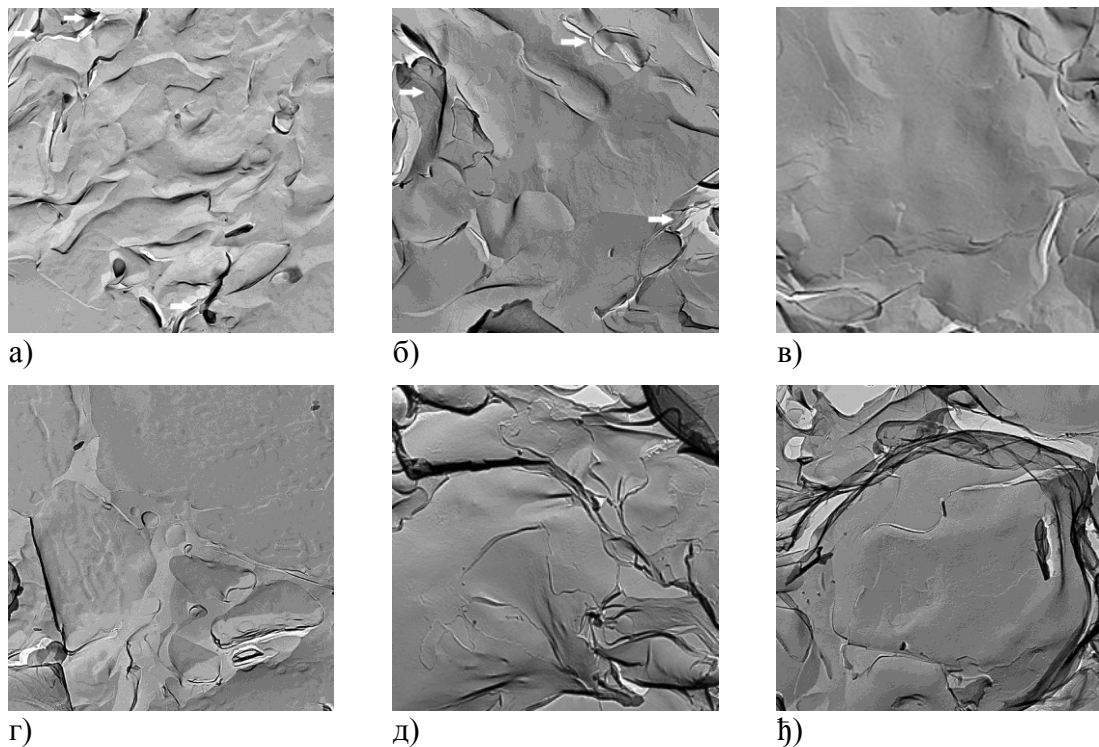
Са аспекта физичкохемијске стабилности носача и препарата испитиваних у овом раду, нарочито је битно нагласити да је још раније, при формулацији емулзија са АНАс уочено да неке од ових киселина "старијих" генерација (првенствено млечна) могу деловати као хидротропи, тј. довести до великих промена микроструктуре емулзионих носача у које се инкорпорирају у смислу њиховог нарушавања. То се пре свега односи на емулзије стабиљане фазом ТК, тј. употребом мешаних емулгатора (Al-Bawab и Friberg, 2004). Зато је дубљи увид у колоидну структуру носача изузетно битан у фази развоја формулација са АНАс (али и другим КАС сличних особина) и може указати на евентуалне инкомпатибилности на нивоу носач-КАС које би могле утицати на дугорочну стабилност препарата као и на његову ефикасност. Није познато да ли ЛК као представник АНАс показује овакав утицај на емулзионе носаче стабиљане фазом ТК, тј. да ли се ова тврдња може генерализовати и односити на све АНАс, без обзира на величину њиховог молекула. Из тог разлога, у оквиру овог рада извршен је дубљи увид у колоидну структуру емулзија са мултикомпонентном масном фазом и једним од два различита АПГ емулгатора (различитих дужина алкил ланца), са и без 6% ЛК као КАС. Ово испитивање вршено је применом специфичних аналитичких метода, и то 7 дана након израде узорка.

4.1.2.1. Микроскопска анализа (ПМ, ТЕМ)

Поларизационе микрографије узорка стабиљаних емулгатором дужине алкил ланца C16/18 АПГ (серија Ф2) приказане су на Слици 13б-г док су поларизационе микрографије узорка серије Ф4 (стабиљаних C12/14 АПГ) приказане на слици 13ж-и. На микрографијама сва три узорка стабиљана емулгатором веће дужине алкил ланца могу се уочити структуре које указују на присуство лиотропне интеракције ламеларног типа; запажају се разбацане анизотропне структуре тј. деформисани малтешки крстови (енг. "onion rings") кроз континуалну фазу емулзије које указују на присуство течно-кристалне фазе као и уљане пруге разбацане између малтешких крстова које указују на присуство гел кристалне фазе ламеларног типа (Eccleston, 1997; Fairhurst и сар., 1998).

Структуре које би се могле дефинисати као остаци гел фазе видљиве су у простору који окружује веће капи унутрашње фазе као и флокуле капи мањих димензија и нешто су израженије на поларизационим микрографијама плацебо узорка М68а (Слика 13б) у односу на микрографије остала два узорка ове серије-М68аL1N (Слика 13в) и М68аL1 (Слика 13г).

Иако поларизациона микроскопија омогућава карактеризацију колоидне микроструктуре емулзија, много прецизније информације могу се добити применом ТЕМ. ТЕМ микрографије узорака након 7 дана од израде приказане су на Слици 17а-ђ и откривају присуство ламеларних мезофаза у микроструктури свих испитиваних узорака, уз присуство слојева ламеларних трака планарног уређења које би могле указати на уређену гел структуру.



Слика 17. ТЕМ микрографије узорака - увеличање 4000 пута: а) М68а; б) М68аL1N; в) М68аL1; г) М82; д) М82L1N; ђ) М82L1.

Што се тиче серије Ф2, постоје разлике у структурама визуелизованим на ТЕМ микрографијама три различита узорка – вероватно услед различите организације ламеларних слојева у присуству ЛК и њених соли, насталих парцијалном неутрализацијом узорака. Тако, код узорака М68а (Слика 17а) и М68аL1N (Слика 17б) видљиви су широки слојеви ламеларних трака местимично оштрих ивица (ове структуре су на ТЕМ микрографијама означене стрелицама) што указује на висок степен структурираности унутрашње фазе ове емулзије, тј.

предоминантно присуство ламеларне гел фазе у континуалној фази система (Макаи и сар., 2003). ТЕМ микрографија узорка М68аL1 (Слика 17в) указује на присуство структура које личе на ламеларне, али су мање видљиве него код друга два узорка исте серије. Имајући у виду јако хигроскопну природу молекула ЛК, могло би се претпоставити да је дошло до дехидратације ламела услед везивања воде од стране ЛК, односно њених соли формираних након неутрализације, тј. да је ЛК (и то нарочито након неутрализације) проузроковала такво нарушавање микроструктуре узорка М68а где је дошло до прерасподеле воде везане на различит начин у емулзији. То би значило да је дошло до повећања садржаја слабо везане тј. слободне воде на рачун смањења удела интерламеларно везане воде, и последично, парцијалног нарушавања ламеларне структуре. Ова претпоставка у складу је са изразито високим вредностима електричне проводљивости измерене за узорак М68аL1 (Табела 8), као и резултатима осцилаторних реолошких мерења (Слика 18).

Што се тиче серије Ф4, поларизационе микрографије узорка М82 (Слика 13ж) указале су на изузетно слабо видљиве структуре које би потицале од ламеларних мезофаза, и то у простору између уљаних капи тј. у континуалној фази емулзије. Такође, на ТЕМ микрографијама овог плацебо узорка (Слика 17г) запажају се структуре које указују на слабу заступљеност ламеларне гел фазе. Налази на које упућују ТЕМ микрографије узорака М82L1 (Слика 17ђ) и М82L1N (Слика 17д) у потпуном су складу са налазима са поларизационих микрографија истих узорака потврђујући значајно присуство ламеларне гел фазе (и фазе ламеларних течних кристала) код активних узорака за разлику од одговарајућег плацеба М82 (Слика 17д). Наиме, јасно се запажа анизотропија на поларизационим микрографијама узорака М82L1 (Слика 13з) и М82L1N (Слика 13и), што се огледа у присуству капи унутрашње фазе уједначених димензија, равномерно распоређених кроз континуалну фазу емулзије и окружених тракама ламеларне течност-кристалне фазе, односно присуству карактеристичних анизотропних облика ("*onion rings*") – деформисаних малтешких крстова који указују на присуство развијене лиотропне интеракције ламеларног типа. Резултати осцилаторних реолошких мерења за узорке стабилисане емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol (C12/14 АПГ) (Слика 18б) потпуно су одговарали налазима са поларизационих и ТЕМ микрографија.

4.1.2.2. Осцилаторна реолошка мерења

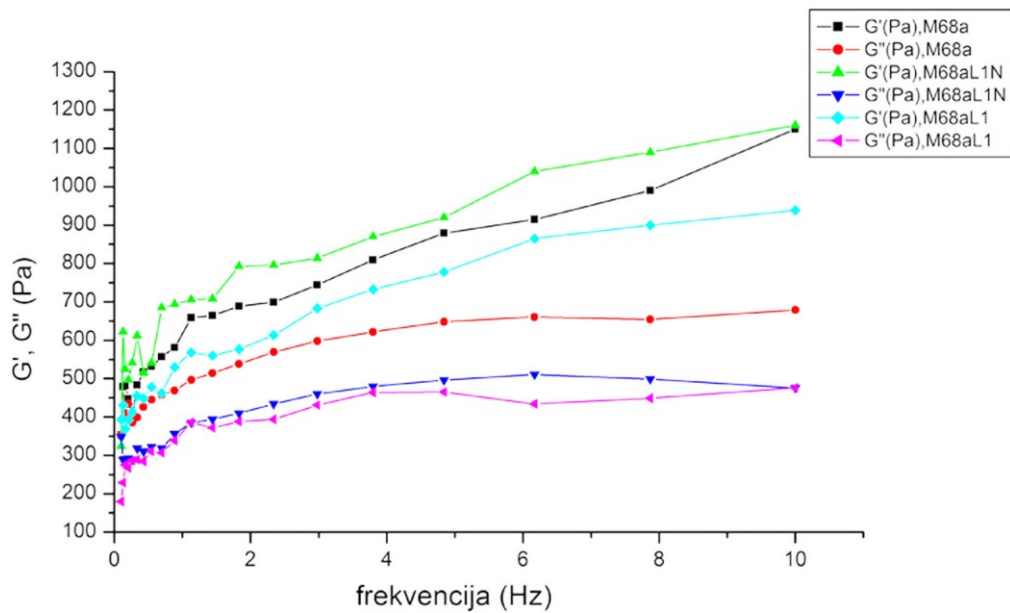
Резултати осцилаторних реолошких мерења приказани су графички (Слика 18) и табеларно (Табела 9). Реолошки параметри (еластични модул G' , вискозни модул G'') од значаја су за процену колоидне структуре система с обзиром да, према једној од основних поставки теорије гелске мреже, набубреле ламеларне двослојне структуре у континуалној фази формирају гелску мрежу која контролоше реолошка својства оваквих вишефазних емулзија (Eccleston, 2001). Вискоеластично реолошко понашање свих испитиваних емулзија указало је да ови системи комбинују вискозне (течне) и еластичне (чврсте) карактеристике у исто време. Међутим, код свих испитиваних узорак вредност еластичног модула G' била је виша у односу на одговарајући вискозни модул (Табела 9) што указује на синергизам ламеларне течно-кристалне и ламеларне гел фазе које их стабилизују (Eccleston, 2001).

Табела 9. Еластични (G') и вискозни модули (G'') узорак (фреквенца 1 Hz)

| Узорак | G' (Pa) | G'' (Pa) |
|---------|-----------|------------|
| M68a | 642 | 450 |
| M68aL1N | 692 | 378 |
| M68aL1 | 511 | 323 |
| M82 | 1110 | 713 |
| M82aL1N | 1390 | 891 |
| M82aL1 | 1530 | 1040 |

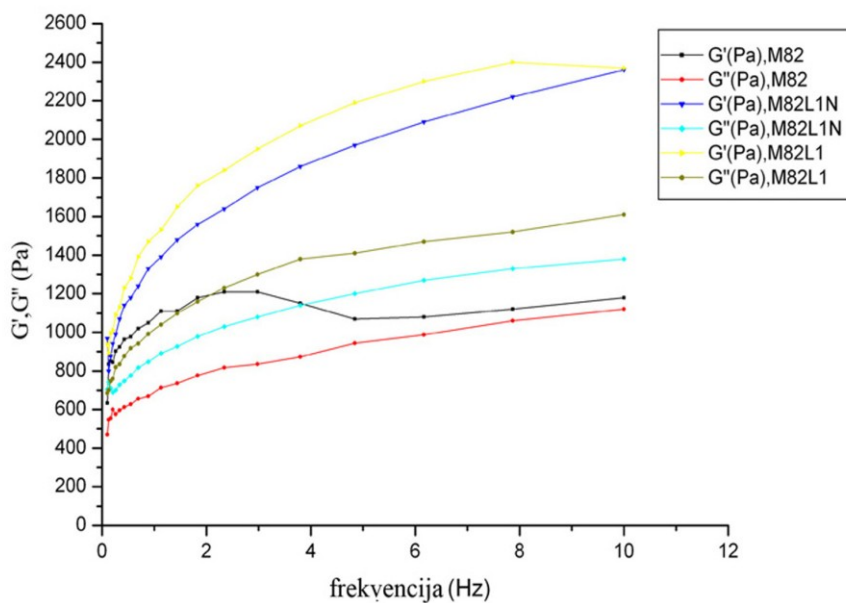
Узорак M68a имао је најнижи однос параметара G'/G'' уз највиши G'' (Табела 9) у односу на остале узорке исте серије, што указује на стабилизацију овог узорка преодоминантно присуством α -кристалног гела. Вредност еластичног модула (параметар G') за узорак M68aL1N била је већа у односу на вредност овог параметра код одговарајућег плацеба што може указати на додатно формирање ламеларних структура у овом узорку које је праћено и везивањем воде унутар поменутих ламеларних фаза. Иако овај налаз не одговара вредностима електричне проводљивости узорка M68aL1N (Табела 8), висока проводљивост би се вероватно могла у овом случају приписати ЛК тј. њеној електролитичкој природи која може бити одговорна за повећане вредности проводљивости емулзионих носача типа У/В након инкорпорације ЛК у исте (Korhonen и сар., 2005).

Вредности еластичног (G') и вискозног модула (G'') узорка M68aL1 и M68aL1N биле су знатно ниже у односу на исте вредности аналогних узорака серије Ф4 (Табела 9). Ово би такође могло указати на утицај ЛК на колоидну структуру носача стабилизованог АПГ емулгатором нешто веће дужине ланца након њене инкорпорације, у смислу нарушавања фазе ламеларних течних кристала и ламеларне гел фазе, нарочито након подешавања рН вредности узорка. Са повећањем фреквенције, оба модула измерена код узорака M68a и M68aL1N показала су пораст вредности, (Слика 18), и то нарочито G' . Ови пораста били су блажи код узорка M68aL1, што би могло да укаже на значајнију заступљеност ламеларних структура код плацеба и узорка M68aL1N насупрот узорку M68aL1, нарочито ако се има у виду да и структуре визуелизоване на ТЕМ микрографијама поменутих узорака (Слика 17а-в) говоре у прилог тој претпоставци.



а)

Слика 18. (легенда на следећој страни)



б)

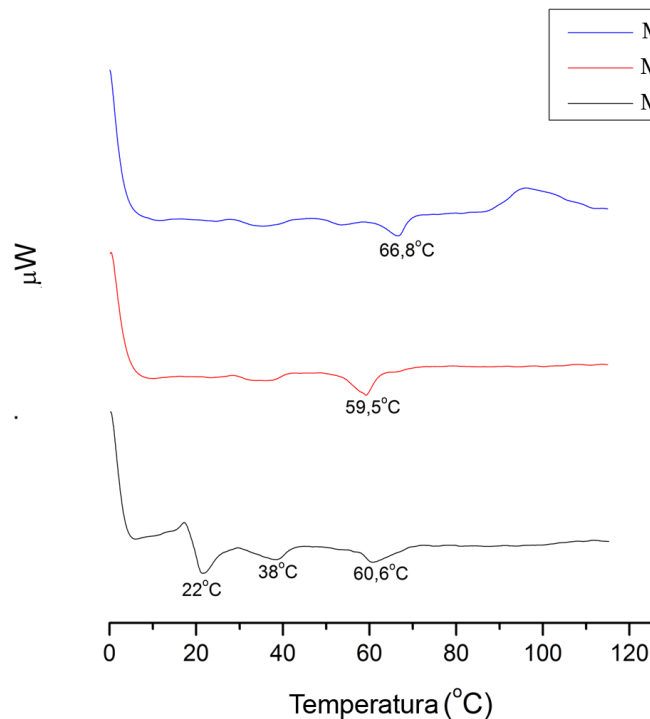
Слика 18. Еластични и вискозни модули узорка у функцији фреквенције (0,1 – 10Hz): а) серије Ф2; б) серије Ф4.

Као и код емулзија стабилисаних С16/18 АПГ мешаним емулгатором, вредност еластичног модула (G') свих узорка са емулгатором краћег алкил ланца АПГ (С12/14) била је изражено виша у односу на вискозни модул. Плацебо узорак (М82) имао је најнижи однос G'/G'' са најнижим G' (Табела 9). Са повећањем примењене фреквенције дошло је наглог пада вредности G' код узорка М82 (Слика 18б), што је у складу са налазима поларизационе микроскопије који су указали на слабо уочљиво присуство ламеларних фаза у микроструктури овог узорка (Слика 12ж). Код узорка ове серије који су садржали ЛК забележена је много виша вредност еластичног модула у односу на G' плацеба (Табела 9). Овакви налази свакако потврђују налазе микроскопије који указују на промоцију формирања одређених ламеларних течно-кристалних структура у присуству ЛК, нарочито у присуству њених соли (које се формирају након неутрализације узорка). Тачније, узорак подешене рН вредности (М82Л1) имао је највећу разлику вредности између еластичног у односу на вискозни модул (Табела 9). Такође, треба нагласити да су параметри G'' оба активна узорка ове серије испољили мале промене вредности са променом фреквенције (Слика 18б), што указује на повољан реолошки профил ових узорка, у смислу задржавања структуре при излагању и екстремнијим условима (Korhonen и сар., 2005). Требало би нагласити да резултати осцилаторних реолошких мерења нису били у потпуном складу са

результатима континуалне реологије који су указали на нешто већи вискозитет узорка M82L1N, али су били у складу са резултатима текстуралне анализе.

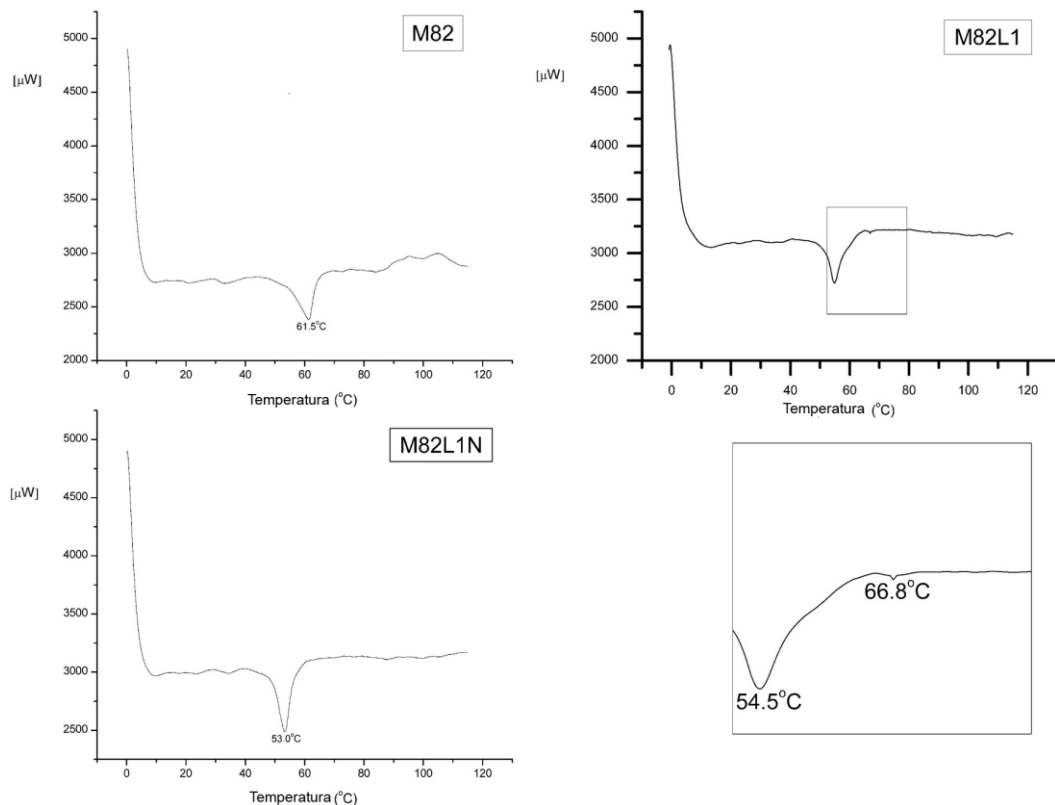
4.1.2.3. Термална анализа (ДСЦ и ТГ)

ДСЦ термално понашање узорака приказано је на Сликама 19 и 20, док су резултати ТГ анализе приказани у Табелама 10 и 11. Испитивања употребом ових аналитичких метода спроведена су у циљу диференцијације различитих типова воде (тј. воде везане на различите начине) у микроструктури узорака, а у циљу одређивања начина дистрибуције воде унутар система и нивоа структурираности самих система (Junginger 1984; Csizmazia и сар., 2010).



Слика 19. ДСЦ профили узорака серије Ф2

Што се тиче ДСЦ анализе, температурни максимуми пикова и енталпије ендотермалних транзиција узети су као свеобухватни параметри за поређење узорака. Узорци M68a и M68aL1N имали су само по један изражен пик (Слика 19) на блиским температурама ($66,8^{\circ}\text{C}$ и $59,5^{\circ}\text{C}$, редом) са релативно високим вредностима енталпија за оба узорка. Слично је уочено и код узорка M82 - плацебо је имао само један изражен пик на температури $61,5^{\circ}\text{C}$ са релативно високом укупном енталпијом од 7.42 mJ/mg (Слика 20). Овакво термално понашање наведених узорака указује на присуство ламеларне гел фазе у структури истих, што вероватно одговара топљењу ламеларног гела и испаравању инкорпорираних воде (Nesseem, 2001).



Слика 20. ДСЦ профили узорка серије Ф4

Очигледно је да је транзициони пик код узорка М68аL1N померен ка нижој температури у односу на носач, М68а (Слика 19). То би могло указати на извесне разлике у колоидним структурама ова два узорка, вероватно изазване инкорпорирањем јако хигроскопних молекула ЛК између ламеларних двослојева у активном узорку. Тако, ово потенцијално инсертовање вероватно је утицало на покретљивост алкил ланаца молекула АПГ и довело до преласка из ригидног, уређеног, тј. гел кристалног стања ламела у течно-кристално стање. У прилог овој претпоставци говоре и резултати осцилаторних реолошких мерења (више вредности G' узорка М68аL1N у односу на плацебо, Табела 9). Са друге стране, на ДСЦ профилу за узорак М68аL1 (Слика 19) уочавају се три пика: два слабије изражена на температурама 60.6°C и 38°C као и један на 22°C са мањом енталпијом. Померање максимума пика овог узорка (у односу на плацебо тј. у односу на неутралисани узорак) ка нижим температурама након неутрализације ЛК, уз истовремено смањење енталпије, указује на прелазак дела воде инкорпориране између ламела течних кристала у слабо везану тј. "слободну" воду, што се карактерише нижим вредностима енталпије у односу на уређену тј. кристалну структуру (Fairhust и сар., 1998). Ови налази у складу су са резултатима

осцилаторне реологије и указују на нарушавање ламеларне гел структуре након додавања ЛК и њених соли у емулзиони носач, док код плацебо узорка вероватно комплексни кристални гел (хидрофилна и липофилна гел фаза) доминира у континуалној фази емулзије.

Узорак М82L1 имао је два изражена пика – на 54.5°C и један јако слабо изражен на 66.8°C (Слика 20, наглашени део ДСЦ профила). Разлика у термалном понашању овог узорка и плацеба вероватно се може објаснити редистрибуцијом воде у систему након додавања ЛК. Померање пика ка нижим температурама (у односу на одговарајући плацебо који је имао само један изражен пик на температури 61.5°C) уз пад укупне енталпије (први температурни пик узорка М82L1) указао би на прелазак дела интерламеларно инкорпориране воде у слабо везану, тј. "слободну" воду, док појава другог пика (са нижом енталпијом, 1mJ/mg) на вишој температури указује на присуство ламела течних кристала које се карактеришу већом покретљивошћу и нижом енталпијом у односу на уређену гел структуру (Fairhurst и сар., 1998). Ово је у складу са осталим налазима I фазе испитивања узорака серије Ф4 и дефинитивно потврђује да након додатка ЛК у емулзиони носач М82 (код кога кристални гел доминира у континуалној фази емулзије) долази до одређене промоције настанка ламеларних течних кристала на граници капи унутрашње фазе. То би могло ићи у прилог тези о погодности ове емулзије да буде носач за јако киселу и хигроскопну ЛК. Сасвим је вероватно да редистрибуција воде, тј. промена микроструктуре након додатка поменуте супстанце позитивно утиче у смислу пораста способности овакве емулзије да ефикасно и континуирано, у дужем временском интервалу након примене влажи кожу. Још раније је потврђено да кремове у чијој структури су заступљени ламеларни течни кристали поседују тај потенцијал (Савић, 2004) услед постепеног ослобађања различитих фракција воде присутних у структури.

Из термогравиметријске анализе (ТГ) добијен је укупан губитак масе (енг. *total weight loss*) узорака при загревању, тј. у одређеним температурним опсезима. Резултати су приказани у Табелама 10 и 11. Може се видети да је укупни губитак масе при загревању код сваког од узорака (вода која испарава услед пораста температуре и последичних фазних транзиција) у складу са укупном количином воде у систему. Да би се разликовале фракције воде које су у системима везане за различите структуре, одабрани су специфични температурни опсези, а резултати представљени као средња вредност $\pm SD$.

Табела 10. Процент укупног и парцијалних губитака масе узорака М68, М68 L1N и М68L1у функцији промене температуре при специфицираним температурним опсезима (представљен као средња вредност ± SD)

| Узорак | Укупан губитак (%) | 25 - 50°C (%) | | 50 - 70°C (%) | | 70 - 100°C (%) | | Резидуална маса (%) |
|---------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------------|
| | | | | | | | | |
| М68а | 75.06 ± 1.40 | 15.66 ± 0.31 | 21.29 ± 0.96* | 34.39 ± 1.12 | 46.78 ± 1.15* | 25.01 ± 0.83 | 34.02 ± 0.81* | 24.88 ± 1.22 |
| М68аL1N | 65.58 ± 1.61 | 8.31 ± 0.88 | 11.31 ± 0.82* | 23.68 ± 1.03 | 32.21 ± 0.99* | 33.59 ± 1.11 | 45.69 ± 0.97* | 34.37 ± 0.85 |
| М68аL1 | 67.96 ± 1.91 | 16.18 ± 0.74 | 22.01 ± 0.91* | 28.08 ± 0.79 | 38.21 ± 0.89* | 23.70 ± 1.03 | 32.25 ± 1.09* | 32.02 ± 1.09 |

* губитак воде у односу на укупни садржај воде у узорку

Табела 11. Процент укупног и парцијалних губитака масе узорака М82, М82L1 и М82L1N у функцији промене температуре при специфицираним температурним опсезима (представљен као средња вредност ± SD)

| Узорак | Укупан губитак (%) | 25 - 50°C (%) | | 50 - 70°C (%) | | 70 - 100°C (%) | | Резидуална маса (%) |
|--------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------------|
| | | | | | | | | |
| М82 | 68.19 ± 1.89 | 14.14 ± 0.29 | 19.49 ± 0.66* | 28.77 ± 1.09 | 39.69 ± 1.02* | 25.28 ± 0.92 | 34.87 ± 0.58* | 31.71 ± 1.11 |
| М82L1 | 57.91 ± 1.74 | 13.68 ± 0.98 | 20.72 ± 0.78* | 23.00 ± 0.87 | 34.86 ± 0.80* | 21.23 ± 1.01 | 32.16 ± 0.91* | 41.98 ± 0.67 |
| М82L1N | 61.77 ± 1.92 | 15.23 ± 0.83 | 22.90 ± 0.93* | 24.08 ± 1.06 | 36.21 ± 1.01* | 22.46 ± 1.21 | 33.78 ± 0.99* | 38.13 ± 1.20 |

* губитак воде у односу на укупни садржај воде у узорку

Параметри ТГ анализе свих испитиваних узорака били су у складу са измереним вредностима проводљивости узорака, осцилаторне реологије и ДСЦ анализе. Узорак М68аL1 садржао је најмању количину везане воде (која испарава на температурама преко 70°C) у односу на остале узорке исте серије, док је губитак воде у односу на њен укупни садржај у емулзији био већи код узорка М68аL1 у односу на М68аL1N и у првом (25°-50°C) и у другом (50°-70°C) температурном опсегу (Табела 10). Иначе, губитак воде који се при ТГ испитивању дешава на температури између 25°-50°C одговара губитку слободне тј. *bulk* воде, док испаравање у другом температурном опсегу (50°-70°C) одговара губитку тзв. "секундарне" воде тј. воде инкорпориране унутар ламела липофилне гел фазе (Junginger, 1997). Што се тиче узорка М68аL1N, јасно је да претходно измерене високе вредности електричне проводљивости (Табела 8) не значе присуство веће количине слободне воде као што би се могло очекивати, већ потичу од јона ЛК. Наиме, овај узорак показује изражен пораст брзине испаравања воде између 70°C и 100°C (Табела 10) указујући да је већа количина воде у емулзији везана или у хидрофилној гел фази или као вода фиксирана између ламела течно-кристалне фазе. Ово би могло да објасни већу вредност параметра G' осцилаторне реологије (Табела 9) за узорак М68аL1N у односу на исту вредност измерену за узорак М68а и укаже на присуство ламеларних течних кристала који се одликују већом покретљивошћу при додатку ЛК (што изостаје код плацебо узорка). Међутим, након неутрализације узорка, вероватно долази до нарушавања структуре ламеларних течних кристала, тј ламеларног гела (узорак М68аL1).

Што се тиче серије узорака стабилисаних мешаним емулгатором краћег алкил ланца АПГ (C12/14), резултати термогравиметријске анализе нису указали на разлику у нивоу структурираности између плацебо и активних узорака (Табела 11). С обзиром да су резултати осталих анализа (поларизациона и ТЕМ микроскопија, осцилаторна реологија) указали на присуство фазе ламеларних течних кристала у микроструктури узорака М82L1 и М82L1N, могло се очекивати да они поседују значајнију фракцију воде која испарава у трећем температурном опсегу (70°C - 100°C) при ТГА анализи, тј. да је тзв фракција "депо" воде значајније заступљена код узорака са ЛК него код плацеба серије Ф4. Такође, могло би се очекивати присуство смањеног садржаја воде која испарава између 50°C и 70°C и одговара води механички везаној унутар липофилне гел фазе

(Junginger, 1997). Међутим, резултати ТГА ових узорака указали су да су сви узорци ове серије поседовали готово исте количине тзв. *bulk* воде (испаривања на температури изнад 50°C) и инкорпорираних воде док је највећи губитак код свих узорака присутан у другом температурном опсегу. Ова појава би се, евентуално, могла објаснити и изузетно хигроскопним карактером молекула ЛК – показано је да водени раствор ове киселине испаравањем на собној температури даје гел матрикс у коме велика количина воде остаје везана и не може испарити (Green и сар., 2009). У складу са тим, извесно је да ЛК веже и задржава велику количину воде и у структурама унутар емулзија те на тај начин вероватно спречава испаравање воде, првенствено везане унутар ламела течностно-кристалне фазе, и то не само на собној (Green и сар., 2009) већ и на повишеним температурама које се користе при ТГА.

Описана појава би вероватно могла утицати на резултате ТГ анализе, нарочито ако се има у виду да је слично задржавање воде унутар ламела течностно-кристалне фазе уочено на примеру уреје, такође јако хигроскопне супстанце, инкорпорираних у емулзије на бази АПГ мешаног емулгатора. Показано је да постоји значајан синергизам влажећег дејства (након апликације испитиваних емулзија на кожу) самог емулзионог носача и уреје као активне супстанце код јако суве коже, док исти ефекат изостаје на нормално хидрираној кожи (Savić и сар., 2008). То би евентуално могло указати да се вода, заробљена заједно са уреом унутар ламела ламеларних ТК изузетно тешко ослобађа из система. Односно, да се због изразито јаких веза воде са молекулима инкорпорираних супстанца (с обзиром да је плацебо показао задовољавајући потенцијал хидратације здраве коже), вода може ослободити тек у присуству изузетно високог концентрационог градијента какав је онај који настаје у контакту са јако сувом кожом.

Вероватно је да и у случају јако хигроскопне ЛК, инкорпорираних у емулзиони носач са С12/14 АПГ, њени молекули везују воду сличним интензитетом, односно на тај начин да вода (без обзира да ли је у питању слободна или интерламеларно везана) не може бити у потпуности ослобођена из система чак и на већим температурама. С обзиром да је претходно установљено да налази ТГ анализе, тј. налази који указују на комплексну колоидну структуру емулзија и присуство инкорпорираних воде, могу бити у корелацији са *in vivo* одређеним потенцијалом емулзије да влажи кожу (Csizmazia и сар., 2010), вероватно је да ће *in vivo* студија ефикасности у смислу одређивања способности

овог узорка да након апликације утиче на хидратисаност коже дати додатне информације које би помогле у расветљавању питања колиоидне структуре узорка M82L1.

4.1.2.4 Одређивање параметара текстуре

Анализа текстуре при испитивању емулзија обично се врши у циљу добијања додатних информација о њиховим естетским и апликативним (сензорним) карактеристикама. У суштини, текстура козметичких препарата је функција хемијских и механичких карактеристика које заједно утичу на изглед, али и на осећај на кожи након апликације емулзије (Vázquez-Araújo и сар., 2006). Међутим, текстура емулзије одређена је њеним реолошким особинама и микроструктуром, те параметри одређени овом аналитичком методом, нарочито уколико се посматрају у светлу резултата реолошких испитивања, могу дати информације које се тичу и структуре саме емулзије.

Текстурални параметри узорака серија Ф2 и Ф4 одређени су након 7 дана чувања и приказани у Табели 12. Што се тиче серије узорака Ф2, не постоји значајна разлика између измерених параметара код различитих узорака. У оквиру серије Ф4 узорак M82aL1 имао је нешто више вредности чврстине и лепљивости што би указивало на већи степен структурираности овог узорка и потврђује налазе осцилаторне реологије, тј. већу вредност вискозног модула овог узорка (Табела 12). Генерално, резултати текстуралне анализе указали су на задовољавајуће апликативне особине свих испитиваних узорака.

Табела 12. Параметри анализе текстуре након 7 дана од израде узорака

| Узорак | Максимална сила (g) | Максимална површина (g·sec) | Минимална сила (g) | Минимална површина (g·sec) | Пут сонде (mm) |
|---------|---------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------------|----------------|
| | Чврстина | Компресибилност | Лепљивост | Адхезивност | Кохезивност |
| M68a | 23.49 | 196.28 | 10.60 | 108.17 | 23.40 |
| M68aL1N | 24.27 | 201.90 | 10.77 | 109.48 | 22.12 |
| M68aL1 | 25.19 | 218.13 | 13.79 | 122.78 | 22.87 |
| M82 | 19.44 | 155.02 | 9.61 | 100.46 | 23.53 |
| M82L1N | 18.21 | 145.43 | 9.38 | 90.87 | 21.29 |
| M82L1 | 42.69 | 326.85 | 19.67 | 209.67 | 23.11 |

4.1.3. Одређивање садржаја ЛК

Садржај ЛК у узорку M82L1 одређен је HPLC аналитичком методом чији су резултати приказани у Прилогу Б на крају рада. Анализу је вршио произвођач супстанце (ЛК) Global Calcium, India. Одређиван је садржај чисте ЛК односно у одређени садржај нису улазили соли нити естри ове киселине.

Дошло је до знатног пада садржаја ЛК у испитиваном узорку те је 60 дана након израде њен садржај износио 3,6%. Велики пад садржаја чисте ЛК је вероватно последица смањења садржаја ЛК у емулзионом носачу стабилисаним АПГ емулгатором на рачун формирања соли приликом неутрализације односно подешавања рН вредности узорка. Према Табели 8, рН узорка M82L1 у након неутрализације био је чак 1,32 рН јединице већи од иницијалне што указује на значајне промене у хемијској структури присутних супстанци, првенствено ЛК.

Генерално, могло би се закључити да у случају оба испитивана АПГ емулзиона носача који су подвргнути дубљем увиду у микроструктуру (M68a и M82), додаток ЛК и њена неутрализација снажно утичу на колоидну структуру истих. У случају емулзије базиране на емулгатору краћег алкил ланца АПГ (C12/14), M82, као потенцијалног носача, ЛК и продукти њене неутрализације подстичу настанак структура типа ламеларних течних кристала унутар саме емулзије. При томе, део ЛК (вероватно и њене соли), који су водоничним везама везане за молекуле воде, извесно је везано у интерламеларне просторе формираних структура и то око диспергованих капи масне фазе емулзије, док је остатак растворен у *bulk* води.

Уколико се узму у обзир свеукупни резултати ове фазе рада, у случају емулзија стабилисаних емулгатором нешто дужег алкил ланца АПГ (C16/18)

додатак ЛК делимично условљава настанак ламеларних течних кристала, али одмах након њене неутрализације додатком ТЕА долази до нарушавања формираних структура и наглог пораста садржаја слободне тј. *bulk* воде. Поменута појава вероватно је последица присуства соли ЛК формираних након неутрализације и могла би да се неповољно одрази на дугорочну стабилност узорка. Ипак, физичка стабилност, апликативне и естетске карактеристике одабраних узорака након 60 дана лагеровања, а првенствено оних чије су рН вредности у опсегу дозвољених за примену на кожи (М68а, М68аL1, М82, М82L1) могу се окарактерисати као прихватљиве. Могло би се закључити да се оба употребљена емулгатора могу окарактерисати погодним за стабилизацију емулзионих носача за изузетно хигроскопне и киселе супстанце као што је ЛК. Међутим, извесна предност би се могла дати узорцима серије Ф4, с обзиром да код емулзија са ЛК базираних на С12/14 АПГ мешаном емулгатору не долази до нарушавања формираних ламеларних структура ни након неутрализације КАС. У складу са неким од претходних навода, активни узорак емулзије подешене рН вредности стабилисан поменутим АПГ емулгатором могао би показати следеће предности:

- ❖ због израженог формирања ламеларних структура након додавања ЛК, може се претпоставити да би, дугорочно, стабилност узорка била боља;
- ❖ због присуства ових структура извесно је да би, приликом апликације на кожу, дошло до синергизма влажећег дејства самог носача и ЛК што би вероватно имало као резултат боље влажеће дејство узорка М82L1 него М68аL1. Ова претпоставка ће бити испитана у оквиру II фазе експерименталног рада ове докторске дисертације.

4.2. Резултати и дискусија II фазе експерименталног рада

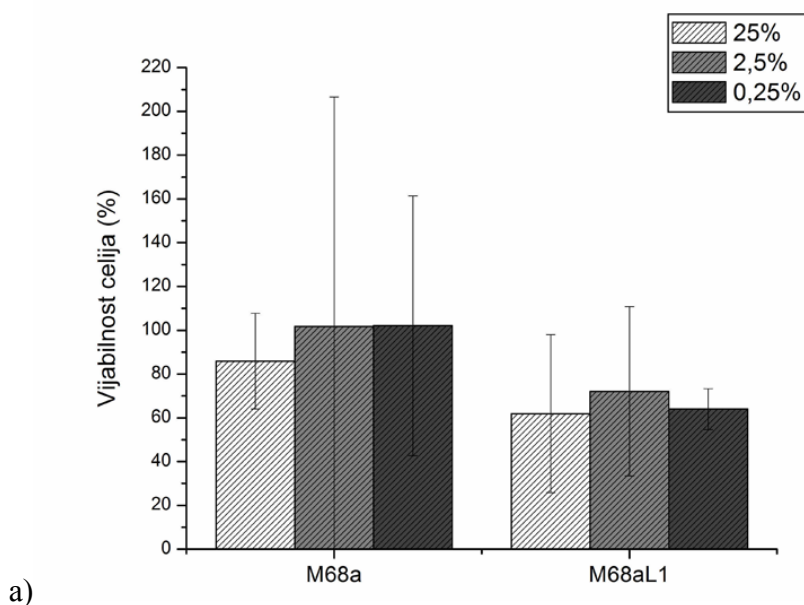
У овој фази експерименталног рада најпре је употребом *in vitro* и *in vivo* метода одређен безбедносни профил узорака изабраних на основу резултата I фазе. Узорци који су задовољили критеријуме безбедности за примену на кожи у смислу изостанка потенцијала за изазивање локалних нежељених ефеката, били су потом подвргнути одређивању и поређењу карактеристичних аспеката ефикасности. На основу добијених резултата одабрана је једна серија узорака те је на њој извршено поређење аспеката ефикасности и безбедности примене дермокозметичких препарата са ЛК у односу на препарате који су садржали АНАs

старијих генерација (у истој концентрацији) на примеру гликолне киселине (ГК) и то из различитих врста носача.

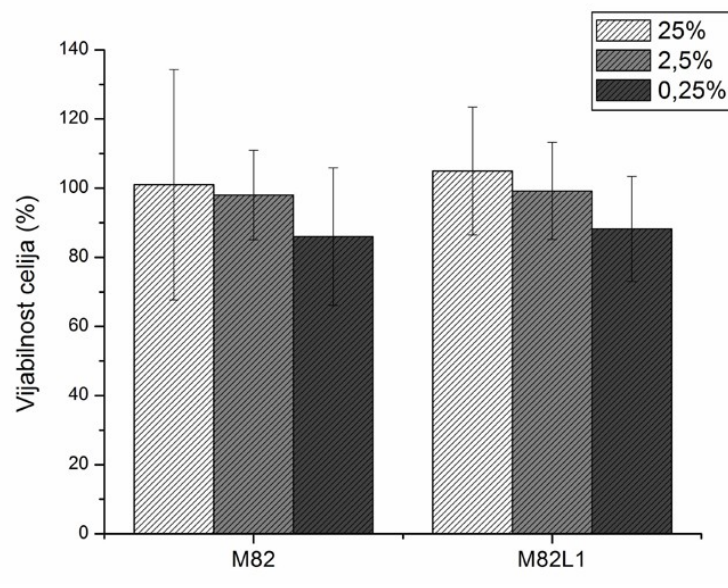
4.2.1. *In vitro/in vivo* процена безбедности и ефикасности емулзија са АПГ и 6% ЛК

4.2.1.1. *In vitro* процена безбедносног профила одабраних узорака

Одређивање иритационог потенцијала је битан део испитивања дермокозметичких производа/дермофармацеутика, али и новијих фармацеутских и козметичких ексципијенаса (Vinardell и Mitjans, 2008). У овој студији, у циљу *in vitro* процене поменутог аспекта испитиваних узорака (M68a, M68aL1, M82, M82L1) коришћен је тродимензионални модел хумане коже који се састојао од реконструисаног епидермиса са функционалним SC. Ефекти узорака на вијабилност ћелија оваквог модела сматрају се мером њиховог потенцијала да иритирају хуману кожу; у овом испитивању вијабилност је квантификована употребом тзв. МТТ теста као маркера ћелијске вијабилности (OECD, 2008). Квантификација је вршена у циљу одређивања и поређења иритационих потенцијала мултикомпонентних емулзија базираних на два различита АПГ емулгатора са и без 6% ЛК као КАС. Резултати су приказани на Слици 21.



Слика 21. (легенда на следећој страни)



b)

Слика 21. *In vitro* одређен иритациони потенцијал узорака а) М68 и М68аL1; б) М82 и М82L1, представљен у виду хистограма зависности вијабилности ћелија (у %) од различитих концентрација узорака

Плацебо узорци М68а (Слика 21а) и М82 (Слика 21б), након апликације на реконструисану хуману кожу нису проузроковали концентрационо зависно нити било какво друго смањење вијабилности ћелија, што указује на чињеницу да се ови мултикомпонентни емулзиони носачи, али и сами АПГ мешани емулгатори који се користе за њихову стабилизацију, могу сматрати безбедним за апликацију на кожу. Што се тиче активних узорака, и они су такође показали прихватљиву вијабилност, чак и за највише концентрације (25%) емулзија које се ионако могу сматрати превише високим у реалним условима примене. Резултати су указали да се може очекивати да сви испитивани узорци показују задовољавајући безбедносни профил *in vivo* што је у следећем кораку студије и испитано.

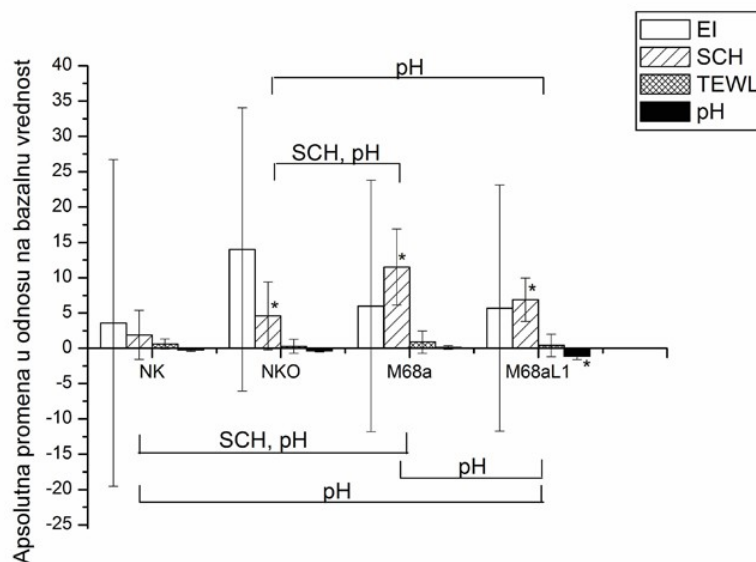
4.2.1.2. *In vivo* процена безбедносног профила одабраних узорака на кожи

Повољан безбедносни профил емулзија (углавном бинарних и тернарних система) на бази оба испитивана емулгатора, INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol и INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol, потврђен је још раније како у *in vivo* тако и у *in vitro* студијама (Savić и сар., 2009а, 2009б; Savić и сар., 2011). У складу са овим резултатима, као и на основу резултата *in vitro* експеримената на испитиваним узорцима претходно изведених у овој студији, могло се претпоставити да ће и комплексни емулзиони носачи (узорци М82 и М68а) показати задовољавајући профил безбедности и у *in vivo* студији. На Слици 22

приказани су графици апсолутних промена мерених параметара након апликације испитиваних узорка под оклузијом у трајању од 24h, у односу на базалну вредност (Δ ЕС, Δ TEWL, Δ ЕI, Δ pH).

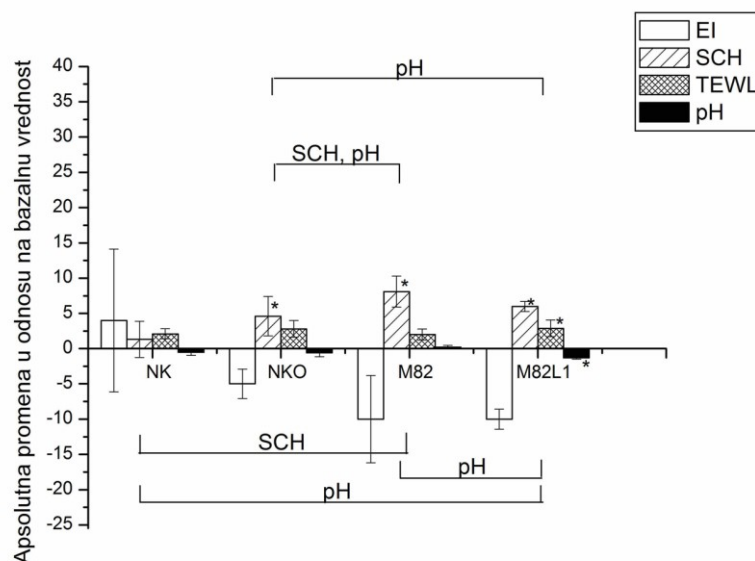
Сви учесници студије потврдили су да су поштовали иницијално дате инструкције. При апликацији узорка M82L1 (Слика 22б) детектовано је статистички значајно повећање вредности TEWL у односу на одговарајућу базалну вредност што, међутим, имајући у виду остале резултате, вероватно није у вези са лошим профилем безбедности овог узорка, већ највероватније са ефектима оклузије *per se*. Наиме, вредности биофизичких параметара EI и TEWL показале су пораст након апликације сваког од испитиваних узорка под оклузијом, али без статистичке значајности у односу на обе одговарајуће контроле (Слика 22). Ови налази били су у складу са резултатима ранијих студија (Savic и сар., 2004) где је показано да, највероватније, оклузија *per se* доводи до смањења баријерне функције SC и самим тим и пораста TEWL. Битно је напоменути и да је дошло до пораста вредности TEWL (али без статистичке значајности) измерене на деловима коже која су служила као нетретирана контрола под оклузијом (НКО) што говори у прилог претходној претпоставци. Вероватно је у случају узорка M82L1 та појава била нешто израженија.

Имајући у виду резултате *in vivo* и *in vitro* студије, испитивани узорци могу се декларисати као безбедни за примену на кожи (Savic и сар., 2009а, 2009б).



a)

Слика 22. (легенда на следећој страни)



б)

Слика 22. *In vivo* одређени иритациони потенцијали узорака а) М68а и М68аL1; б) М82 и М82L1. Апсолутне промене (Δ) параметара ЕС, ТЕWL, ЕИ, и рН након апликације узорака под оклузијом у трајању од 24h, одређене су у односу на одговарајуће базалне вредности. Ефекти узорака међусобно као и у односу на одговарајуће контроле (НК и НКО) анализирани су једнофакторском АНОВОМ, након чега је рађен Tukey's *t*-test, где је то било потребно. Статистички значајне разлике одређених параметра наглашене су означавањем истог на графику. Разлике за исти третман али у различитим временским тачкама (базално мерење vs. мерење након оклузије) проверени су Студент т-тестом за упарене узорке док је статистички значајна разлика означена са (*).

Киселе рН вредности локално апликованих препарата најчешће доводе до иритације коже (често је ова иритација праћена и појавом еритема), смањујући њену физиолошку рН вредност (Smith, 1996a). *In vivo* мерења рН коже користе се у дерматологији и козметологији у циљу процене ефикасности одређених препарата, као и процене њихове безбедности (Ehlers и сар., 2001). Према томе, осим закључака везаних за сам безбедносни профил емулзија, на основу резултата спроведене *in vivo* студије могу се извући и додатни закључци. Наиме, уколико се посматрају промене рН вредности третиране коже (пре и након апликације испитиваних узорака под оклузијом) и упореде са променама исте вредности обе нетретиране контроле (Слика22а и 22б), може се закључити да је дошло до статистички значајног пада рН коже на местима третираним сваким од узорака који су садржали ЛК (М68аL1, М82L1) што се и могло очекивати с обзиром на киселу природу ове КАС. Смањење рН коже, (са физиолошке вредности око рН 5,5 на вредности око рН 3,8), неопходно за испољавање позитивних дејстава АНАs на кожу (Yu Van и Scott, 1996) након апликације испитиваних узорака није довело до њене иритације. Према томе, резултати ове *in vivo* студије потврдили су

повољан безбедносни профил испитиваних узорака (у смислу изостанка локалних нежељених ефеката), али и указали да је вероватно апликација самих емулзионих носача стабилисаних испитиваним АПГ мешаним емулгаторима, за које је и иначе претходно показано да су благи за кожу, деловала тако да је спречила евентуалну појаву иритације до које би вероватно дошло, услед пада рН вредности коже проузроковане апликацијом киселе активне супстанце.

Слични ефекти локалне примене емулзија стабилисаних АПГ, и то у смислу редукције потенцијалне иритације, примећени су у студији која је испитивала утицај апликације натријум лаурил-сулфата (NaLS) на баријерну функцију коже претходно третиране кремове са различитим емулгаторима. Познато је да NaLS после примене на кожи, у одређеном проценту повећава ТЕГВ (и, последично, смањује њену влажност), изазива еритем и инфламацију, те се у експерименталној дерматологији најчешће користи за индуковање иритација и сувоће коже различитог интензитета (Savić и сар., 2004). Резултати поменуте студије показали су да је негативни утицај натријум лаурил-сулфата на баријерну функцију коже био значајно мањи у случају када је она претходно третирана кремом са С16/18 АПГ мешаним емулгатором.

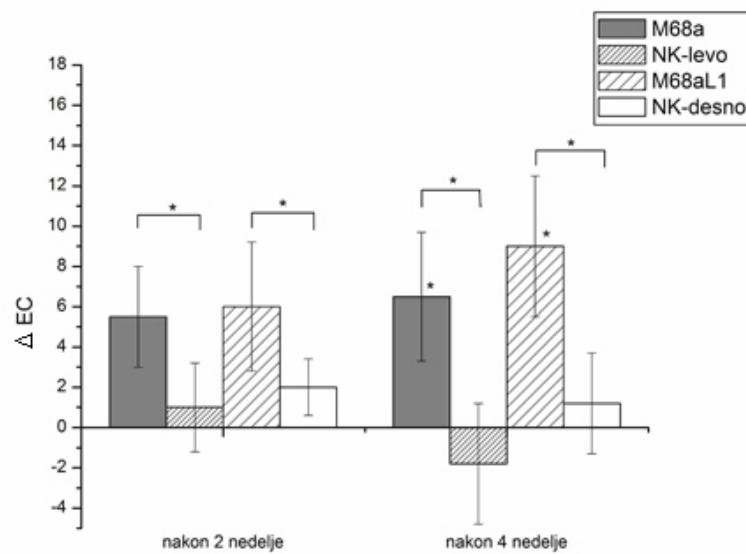
4.2.1.3. In vivo испитивање ефикасности одабраних узорака на кожи

Испитивање ефикасности одабраних формулација узорака са и без 6% ЛК на кожи хуманих добровољаца вршено је мерењем специфичних биофизичких параметара на кожи у студији која је трајала четири недеље. Резултати су приказани на Сликама 23 и 24, као апсолутне промене мерених параметара у односу на одговарајућу базалну вредност.

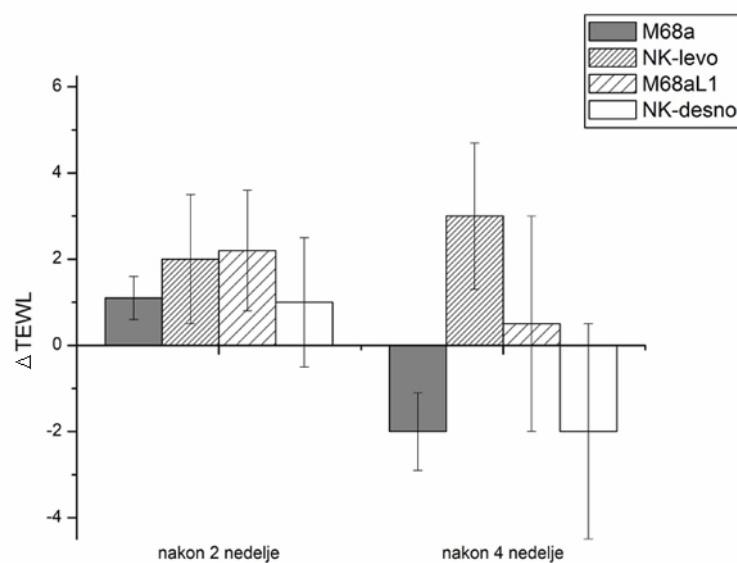
Није било статистички значајних промена вредности ТЕГВ (Слике 23б и 24б) што је потврдило чињеницу да третман ниједним од испитиваних узорака није довео до оштећења баријерне функције коже и у складу је са налазима *in vivo* испитивања безбедности (Слика 22). Апликација сваког од испитиваних узорака такође је довела до значајног пораста влажности коже (параметра ЕС) у односу на обе одговарајуће контроле, као и у односу на одговарајућу базалну вредност (Слике 23а и 24а).

Међутим, резултати нису указали на постојање статистички значајне разлике у апсолутној промени вредности параметра ЕС изазваној одговарајућим узорцима различитих серија (M68a vs. M82 и M68aL1 vs. M82L1) након 2 нити

након 4 недеље студије, као ни између узорака у оквиру исте серије (M68a vs. M68aL1; M82 vs. M82L1). Последње разлике су се свакако могле очекивати, нарочито ако се има у виду чињеница да је ЛК добар хумектанс и да су резултати претходних студија указали да ефикасно влажи кожу (Green, 2000; Green и сар., 2001), премда без тачнијих одредница о каквим се конкретно носачима ради. Наиме, изостао је очекивани синергизам влажећих дејстава ЛК и емулзије стабилисане АПГ (без обзира на тип употребљеног емулгатора), те су оба плацеба у односу на одговарајући активни узорак неочекивано показали готово исти потенцијал хидратације коже (Слике 23а и 24а).

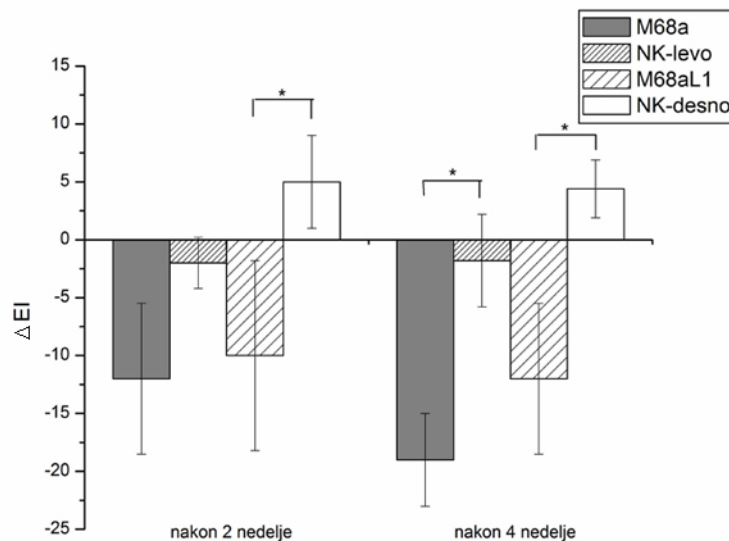


а)

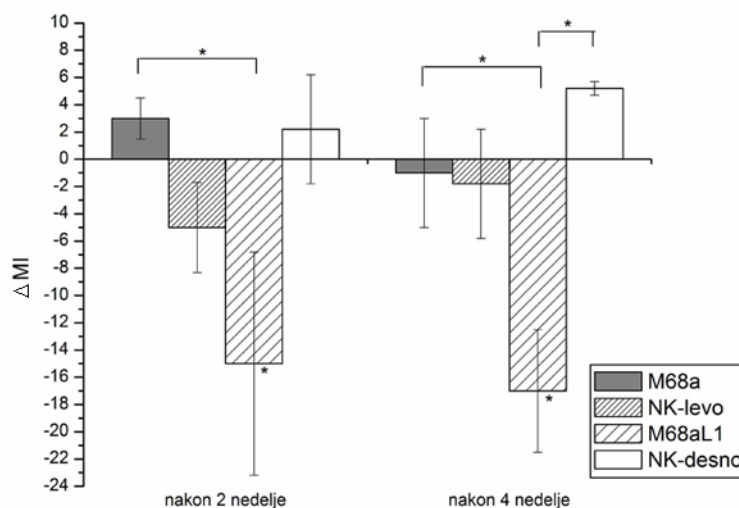


б)

Слика 23. (легенда на следећој страни)



в)

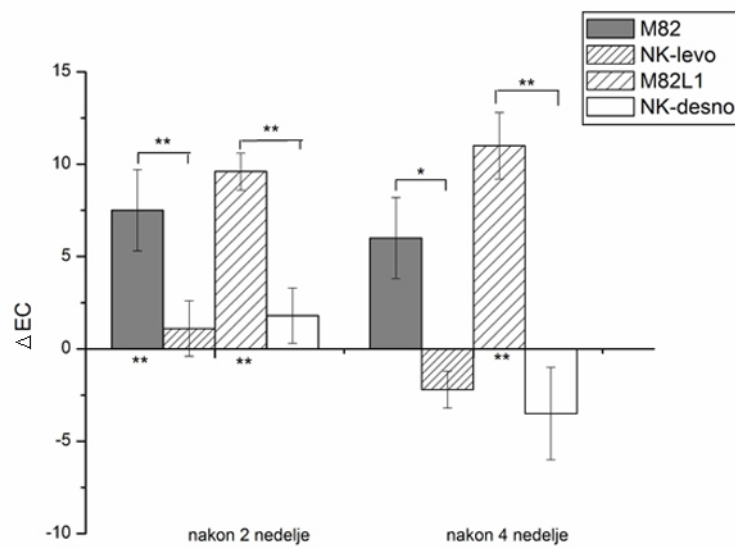


г)

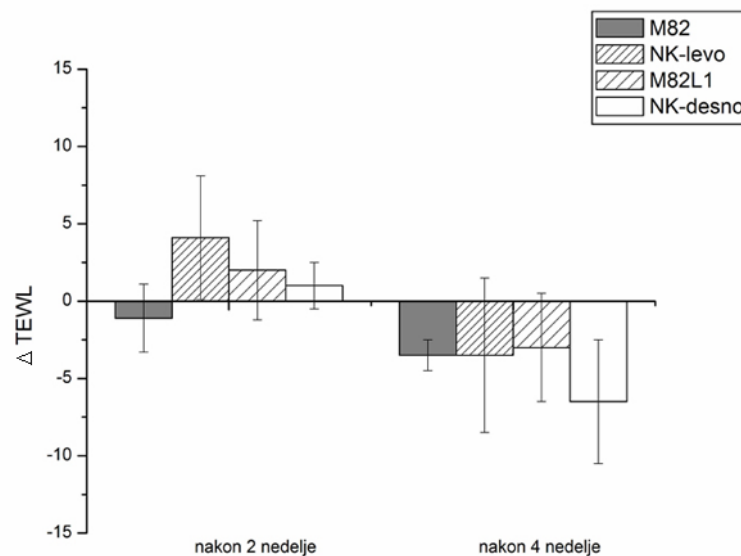
Слика 23. Ефекти апликације узорака М68а и М68аL1 на вредности параметара а) ЕС; б) ТЕГВ; в) ЕИ; г) МИ након 2 и након 4 недеље апликације у односу на њихове базалне вредности (апсолутне промене). Ефекти узорака, међусобно, као и у односу на одговарајуће контроле (НК-лево и НК-десно) анализирани су једнофакторском АНОВОМ, након чега је рађен Tukey's *t*-test, где је то било потребно. Разлике за исти третман, али у различитим временским тачкама проверени су неспареним Студент т-тестом. Статистички значајне разлике означаване су са * $p < 0.05$.

Такође, и на основу резултата добијених увидом у колоидну структуру ових емулзија очекивало се и да би узорак М82L1 због присуства фазе ламеларних течних кристала насупрот плацебу М82 код кога ове структуре нису уочене, морао испољити бољи *in vivo* ефекат хидратације. Изостанак израженијег поменутог ефекта вероватно би се могао довести у везу са резултатима ТГ анализе

за узорак M82L1 о чему је претходно било речи. Могло би се претпоставити да испитивани мешани емулгатори дужине алкил ланца C16/18 (INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol), односно C12/14 АПГ (INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol) (услед присуства великог броја –ОН група у молекулу), односно емулзиони носачи на бази ових емулгатора (услед присуства ламеларних фаза у структури које имобилишу тј. вежу воду интраламеларно) могу смањити биорасположивост јако хигроскопних супстанци као што је ЛК. Описана појава извесно може довести до појаве одређене врсте конкуренције за воду између коже и носача.

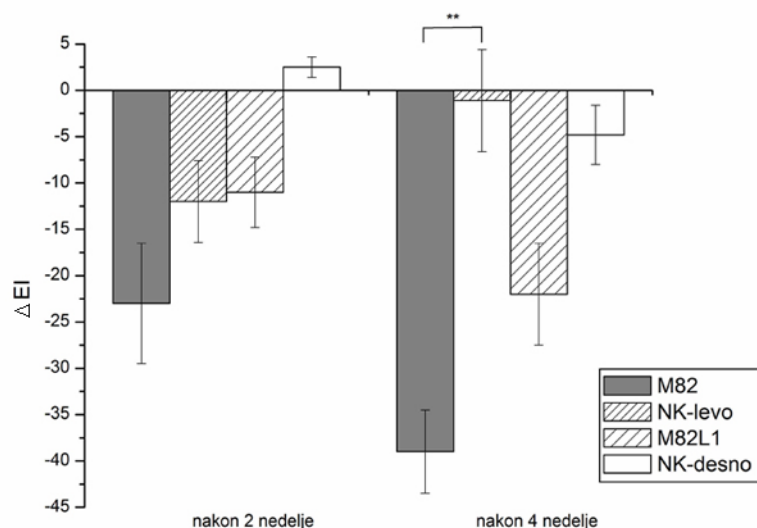


a)

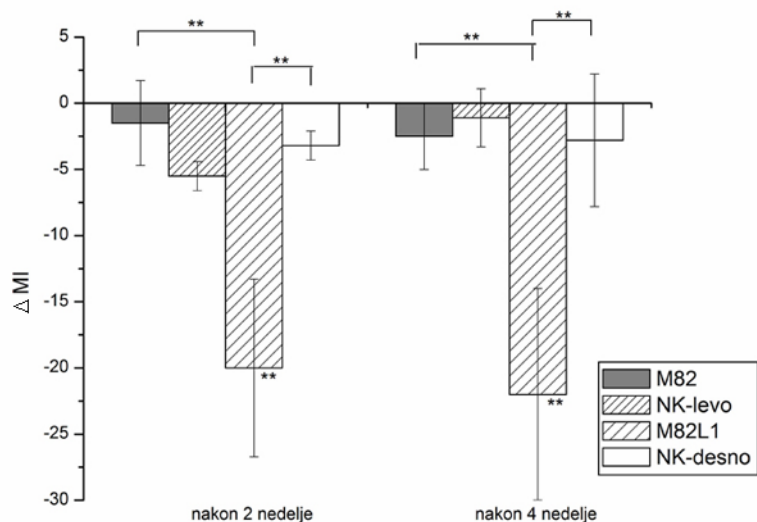


б)

Слика 24. (легенда на следећој страни)



в)



г)

Слика 24. Ефекти апликације узорака М82 и М82Л1 на вредности параметара а) ЕС; б) ТЕГВ; в) ЕИ; г) МИ након 2 и након 4 недеље апликације, у односу на њихове базалне вредности (апсолутне промене). Ефекти узорака међусобно, као и у односу на одговарајуће контроле (НК-лево и НК-десно) анализирани су једнофакторском АНОВОМ, након чега је рађен Tukey's *t*-test, где је то било потребно. Разлике за исти третман, али у различитим временским тачкама проверени су Студент т-тестом за упарене узорке. Статистички значајне разлике означаване су са * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Дошло је до значајног смањења вредност параметра ЕИ након 4 недеље третмана било којим од два плацебо узорка (Слике 23в и 24в), што је било у корелацији са резултатима студија које су такође испитивале *in vivo* ефекте емулзија стабилисаних АПГ емулгатором (Savic et al., 2004), али и амбифилним кремом на бази других врста мешаних емулгатора (Lehmann и сар., 2004). Ови

налази указали су на благу промену боје коже (тј. бељење) која потиче од третмана самим емулзионим носачем и вероватно потиче од засићених масних алкохола присутних у значајном проценту у овим емулзијама (Lehmann и сар., 2004). Благо пад, тачније изостанак пораста вредности параметра EI након третмана активним узорцима (Слике 23в и 24в) у вези је са изостанком иритације коже тј. повољним безбедносним профилем ових узорака као и самих емулгатора што је претходно потврђено.

Промена, тј. пад измерених вредности параметра MI након третмана активним узорцима (Слике 23г и 24г) јасно указују на промену боје третиране коже (односно избељивање коже) већ након 2 недеље апликације узорка M82L1. То би могло да укаже на јако повољан козметички ефекат овог узорка у смислу посветљивања коже (и то много значајнијег интензитета у односу на оно изазвано апликацијом плацеба). Слични резултати, уз мањи пад вредности параметра MI како након 2 тако и након 4 недеље, добијени су и при третману узорком M68aL1, при чему није постојала статистички значајна разлика промене параметра MI између узорака M82L1 и M68aL1. С обзиром да је још раније показано да ЛК испољава ексфолијативно дејство, тј. убрзава тзв. *turn-over* SC (Green и сар., 2001), може се претпоставити да ЛК у емулзионим носачима са АПГ мешаним емулгатором након апликације на кожу доводи до убрзане ексфолијације/десквамације. Имајући такође у виду резултате мерења параметара TEWL и EI, може се закључити да у случају ових емулзионих носача до ексфолијације долази без иритације или оштећења баријерне функције коже (које су честа пратећа појава тј. недостатак третмана козметичким препаратима са ANAs старијих генерација, Yu и Van Scott, 2004), и да је уствари ексфолијација одговорна за ефекат бељења.

Треба истаћи да су у последње време актуелна истраживања и промоција нових КАС које испољавају козметички ефекат бељења на кожи (Draelos, 2008). Ово је пре свега последица чињенице да је у новије време, због токсичности, у козметичким производима строго ограничена употреба хидрохинона, једног од најефикаснијих КАС које испољавају поменути ефекат. ЛК би потенцијално могла да се употреби и као КАС у препаратима намењеним уједначавању боје коже или чак у третману хиперпигментација, што оставља простор за детаљнија испитивања овог ефекта који је на граници козметичког и терапијског.

Као што је већ речено, препарати који могу ефикасно да влаже кожу (енг. *moisturizers*) спадају у најбројнију и најкоришћенију класу дермокозметичких производа. Углавном формулисани као емулзиони лосиони и кремове, најчешће су препоручивани препарати у дерматолошким ординацијама. Користе се ради превенције, као моно или адјувантна терапија намењена третману бројних патолошких стања коже (Loden, 2003), посебно ихтиозе, атопијског дерматитиса и разних дерматоза. Ефекат влажења коже (енг. *moisturization*), није само површинска акција; то је често последица функционалних промена у SC и из тог разлога се ови препарати сврставају у класу дермокозметичких производа (Fendler, 2000). Формулишу се тако да утичу на репарацију оштећеног SC, делују емолијентно и елиминишу субјективне и објективне симптоме суве коже дајући јој здравији изглед (Gao и сар., 2008). Из тог разлога, испитивању и потврди потенцијалних ефеката ЛК и емулзија са АПГ, чијом апликацијом се може побољшати хидратисаност коже, треба посветити нарочиту пажњу.

И поред изостанка очекиваног синергизма хидрирајућег деловања на кожу емулзија са АПГ мешаним емулгаторима и ЛК, оба испитивана емулзиона носача могла би се окарактерисати као прихватљива за инкорпорацију 6% ЛК са аспекта задовољавајуће физичкохемијске стабилности, безбедности примене на кожу, као и ефикасности у смислу испољавања потенцијалног ефекта ексфолијације, што је потребно додатно потврдити применом одговарајућих специфичних метода. Емулзиони носач М82 као и одговарајући узорак са ЛК показали су у претходној фази испитивања нешто боље физичке особине, док је овде евидентирана нешто повољнија козметичка ефикасност на кожи у односу на другу испитивану серију узорака. Што се тиче стабилности и ефикасности, то би се евентуално могло довести у везу са већом хидрофилношћу емулгатора INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol, тј. овај емулгатор би евентуално могао да представља бољи ексципијенс за израду носача намењеног инкорпорацији ЛК, вероватно због чињенице да је сама активна супстанца јако хидрофилна.

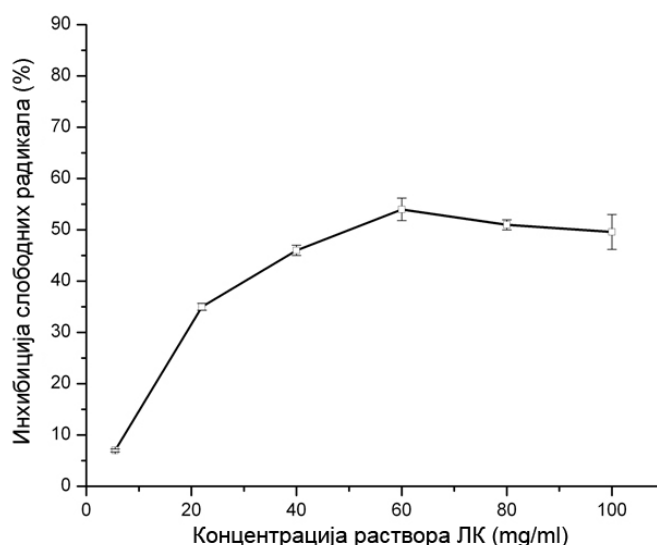
4.2.1.4. In vitro испитивање ефикасности –антиоксидантног потенцијала

ЛК показује способност антиоксидантног деловања путем неколико различитих механизма – поседује способност хелирања прооксидативних метала, спречавања оксидативне деградације и "хватања" слободних радикала, али и инхибиције активности ензима класе матриксних металопроотеиназа (ММР).

Активност ових ензима одговорна је за деградацију екстрацелуларног матрикса коже и нарушавање структурног интегритета, и расте приликом излагања коже UV зрацима. (Green и сар., 2001; Briden и Green, 2005). Као што је већ претходно поменуто, постоје наводи и непрецизни резултати добијени скрининг методама, али нема поузданих литературних података који би се тицали квантитативно одређене "примарне" антиоксидантне активности ЛК. Имајући у виду све наведено, испитивању алтернативне примене ЛК као антиоксиданса - активне супстанце у козметичким/дермокозметичким производима требало би посветити нарочиту пажњу. При том треба имати у виду сваки од аспеката за које је напоменуто да су од значаја за развој наведених производа: ефикасност, безбедност, као и физичкохемијску стабилност препарата са КАС типа потенцијалног антоксиданса.

Најпре је извршено одређивање потенцијала ЛК *per se* да неутралише слободне радикале. Потом је, у оквиру процене погодности испитиваних емулзија на бази АПГ да буду носачи за ЛК, процењиван антиоксидантни потенцијал ЛК инкорпорираних у емулзионе носаче да би се утврдило да ли уграђивање у поменуте носаче смањује њен инхерентни антиоксидантни капацитет (уколико га поседује).

У складу са претходним наводима прво је одређена антиоксидантна активност различитих концентрација воденог раствора ЛК употребом две комплементарне методе: одређивањем способности неутрализације слободних радикала (у DPPH тесту) и одређивањем способности инхибиције липидне пероксидације (као способности инхибиције обезбојавања β -каротена). Испитиване концентрације ЛК налазиле су се у опсегу оних у којима се ова КАС углавном додаје у козметичке препарате тј. 24-100 mg/ml. Као позитивна контрола служио је раствор α -токоферола у етанолу. Резултати су приказани на Слици 25 одакле се може видети да постоји концентрационо-зависна антиоксидантна активност ЛК одређена у тзв. DPPH тесту, и да је највећа за концентрацију супстанце од 60 mg/ml ЛК, а да при повећању њене концентрације ефекат чак опада. Такође је израчунато да је вредност IC_{50} за ЛК износила $52,63 \pm 1,73$ mg/ml.



Слика 25. Антиоксидантна активност различитих концентрација воденог раствора ЛК, изражена као % инхибиције слободних радикала одређена DPPH тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm SD шест узастопних мерења.

Што се тиче антиоксидантне активности ЛК *per se* одређене у виду способности инхибиције обезбојавања β -каротена (као способност инхибиције липидне пероксидације), резултати су дати у Табели 13 и такође су указали на највишу активност раствора ЛК концентрације 60 mg/ml.

Табела 13. Антиоксидантна активност ЛК одређена као способност инхибиције обезбојавања β -каротена; резултати су приказани као средња вредност \pm SD.

| | | Антиоксидантна активност (%) |
|----|-----------------------|------------------------------|
| LK | 37mg/ml ^a | 41,02 \pm 2,23 |
| | 40mg/ml ^a | 46,47 \pm 0,91 |
| | 60mg/ml ^a | 60,93 \pm 1,98 |
| | 80mg/ml ^a | 54,78 \pm 2,28 |
| | 100mg/ml ^a | 52,43 \pm 0,98 |

^a концентрација воденог раствора ЛК

На основу добијених резултата употребом обе методе може се закључити да је ЛК *per se* из водених раствора у испитиваним концентрацијама показала задовољавајућу антиоксидантну активност.

Етанолни раствор витамина Е (α -токоферола) као контроле такође је показао концентрационо-зависну антиоксидантну активност изражену као способност неутрализације слободних радикала (одређене DPPH тестом), у опсегу концентрација 5.5 – 44 μ g/mL (21.4 – 89.8% антиоксидантне активности). Концентрације α -токоферола више од 44 μ g/mL нису показале боље

антиоксидантно дејство. Што се тиче мерења антиоксидантне активности као способности инхибиције обезбојавања β -каротена, тј инхибиције липидне пероксидације, α -токоферол *per se* (у виду етанолног раствора) показао је степен инхибиције 64 – 98% у опсегу концентрација 5.5 – 66 $\mu\text{g/mL}$ (резултати нису приказани табеларно ни графички). Имајући у виду липофилни карактер овог молекула, овако висока антиоксидантна активност одређена методом инхибиције липидне пероксидације (већа у односу на ону одређену DPPH тестом) се и могла очекивати. Наиме, још раније је утврђено да су токофероли антиоксиданси липидне фазе (Young и Woodside, 2001).

Резултати одређивања антиоксидантне активности ЛК након инкорпорације у емулзије са АПГ, као антиоксидантна активност емулзионих узорака M68aL1 и M82L1, приказани су у Табели 14 и на Слици 26. Може се видети да је капацитет 6% ЛК да неутралише слободне радикале односно да инхибира липидну пероксидацију остао готово непромењен и после инкорпорације у носаче и подешавања рН вредности формулације односно парцијалне неутрализације ЛК.

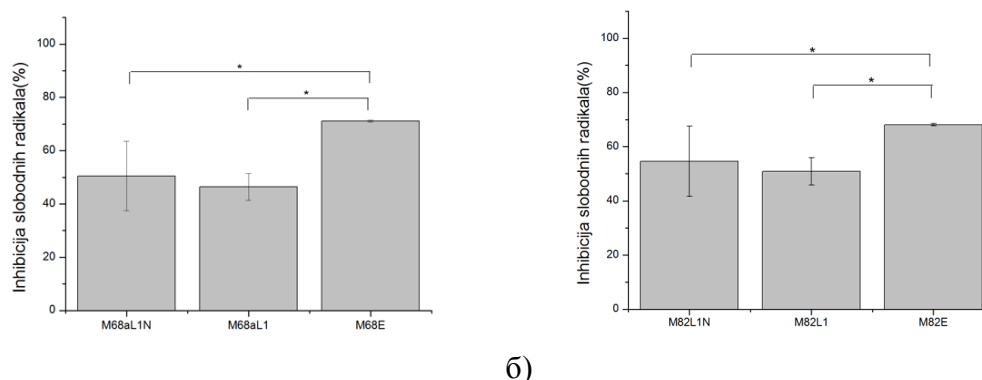
Табела 14. Антиоксидантна активност емулзија одређена као способност инхибиције обезбојавања β -каротена; резултати су приказани у виду средње вредности \pm SD^a

| Узорак | Антиоксидантна активност (%) |
|---------|-----------------------------------|
| M68a | 8,32 \pm 2,21 ^{2,3,4} |
| M68aL1N | 46,36 \pm 9.13 ^{1,4} |
| M68aL1 | 50.64 \pm 8.12 ^{1,4} |
| M68E | 72,22 \pm 0,92 ^{1,2,3} |
| M82 | 11,22 \pm 2,24 ^{6,7,8} |
| M82L1N | 52,22 \pm 8.02 ^{5,8} |
| M82L1 | 56,66 \pm 4.10 ^{5,8} |
| M82E | 70,77 \pm 4.32 ^{5,6,7} |

^a статистички значајне разлике ($p < 0.05$) приказане су у односу на добијене вредности антиоксидантног капацитета узорака M68a, M68aL1N, M68aL1, M68aE (бројеви 1 до 4, у суперскрипту, редом) односно M82, M82L1N, M82L1 и M82E (бројеви 5 до 8 у суперскрипту, редом);

Витамин Е (α -токоферол), као референтни антиоксиданс (Di Mambro и сар., 2003), испољио је *per se* неупоредиво већу антиоксидантну способност у односу на ЛК у смислу способности неутрализације слободних радикала (у DPPH тесту) што потврђују и измерене IC₅₀ вредности (52,63 \pm 1,73 mg/ml за ЛК односно

10.40 ± 1.72 µg/ml за α-токоферол). Ови резултати, добијени мерењем помоћу обе коришћене методе, као и резултати многих претходних студија које се могу наћи у литератури, указали су на јачу антиоксидантну активност α-токоферола *per se*. С обзиром да је α-токоферол додат у емулзионе носаче у много већим концентрацијама него што је његова IC₅₀ (што је случај и у козметичким препаратима на тржишту у којима је он обично заступљен у концентрацији 2%) очекивало се да ће испољити максимум способности неутрализације слободних радикала (око 100%) што, међутим, није евидентирано (Слика 26).



Слика 26. Антиоксидантни капацитети 6% ЛК и 2% α-токоферола инкорпорираних у носаче стабилисане АПГ мешаним емулгаторима а) INCI/Cetearyl glucoside & Cetearyl alcohol и б) INCI/Coco glucoside & Cetearyl alcohol изражени као % инхибиције слободних радикала одређен DPPH тестом. Резултати су приказани као средња вредност ± SD шест узастопних мерења; разлике у антиоксидантним капацитетима појединачних узорака проверене су неспареним Студент т-тестом; статистички значајна разлика означена је са * $p < 0.05$.

Насупрот α-токоферолу који се показао као јачи антиоксиданс, ЛК је након инкорпорације у обе испитиване емулзије задржала своју, иако неупоредиво скромнију, антиоксидантну активност. Резултати мерења употребом обе коришћене комплементарне методе у овој студији указали су да је највероватније дошло до неког вида интеракције између α-токоферола и АПГ (без обзира на дужину њиховог алкил ланца) односно структура које стабилишу емулзије на бази АПГ (имајући у виду да су уочене комплексне ламеларне структуре код оба испитивана носача) што је вероватно довело до знатне инхибиције активности овог антиоксиданса након инкорпорације у поменуте носаче.

Са друге стране, још раније је показано да козметичке емулзије које садрже антиоксидансе испољавају смањену вредност инхибиције оксидативне реакције у експерименталном систему, у односу на очекивану вредност, уколико ове КАС нису биле претходно коректно растворене. Уствари, ефикасно претходно

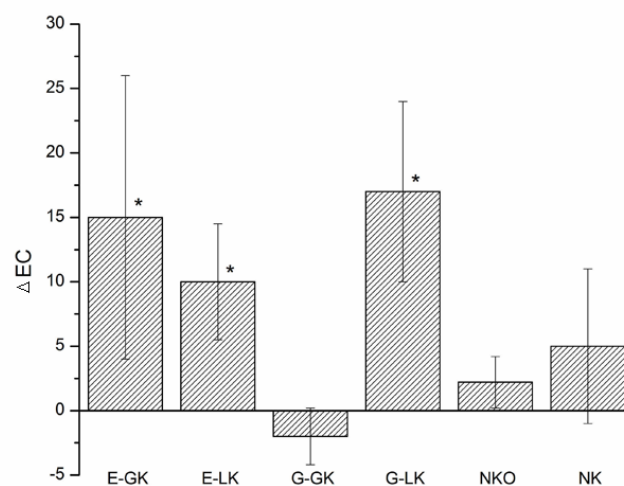
растварање (у циљу потпуног ослобађања испитиваног антиоксиданса из структура унутар емулзије) неопходно је пре спровођења мерења антиоксидантног капацитета оваквих емулзионих узорака (Di Mambro, 2003). Иако је у овој студији у те сврхе коришћен екстракциони медијум (полисорбат-20/H₂O 1:5(м/м)), могло би се претпоставити да је други разлог смањеног антиоксидантног капацитета α -токоферола у емулзијама неадекватно растварање ове КАС пре приступања експерименту, односно, да су молекули α -токоферола остали "заробљени" у комплексним структурама које стабилизују емулзију што је утицало на степен експериментално одређеног антиоксидантног капацитета. Уколико је то заиста случај, поставља се питање да ли овако "заробљен" α -токоферол након апликације узорка у који је инкорпориран, може уопште ефикасно заштити кожу од оксидативног стреса. То оставља простор за нека даља истраживања на ову тему.

Оно што се свакако може закључити из резултата ове студије је да емулзије са 6% ЛК, стабилисана било којим од испитиваних АПГ мешаних емулгатора, показују задовољавајући степен антиоксидантне активности те се зато могу користити као потенцијално ефикасни дермокозметички производи-антиоксиданси у сврхе превенције фотостарења коже. Такође, методе одређивања антиоксидантне активности коришћене у студији адекватне су за одређивање антиоксидантног потенцијала ЛК инкорпориране у испитиване емулзионе носаче. Наиме, и поред тога што је претходна фаза испитивања указала на интеракцију између ЛК и АПГ, која је била нарочито изражена у случају емулзија са С12/14 АПГ мешаним емулгатором, односно интеракцију између ЛК и структура које стабилишу саму емулзију на бази АПГ, те интеракције нису значајније утицале на антиоксидантну активност ове КАС нити на њено одређивање употребом овде коришћених метода. Резултати ове студије потврдили су погодност обе емулзије стабилисана АПГ емулгаторима различитих дужина алкил ланаца АПГ (С12/14, односно С16/18) да буду носачи за 6% ЛК са аспекта антиоксидантне ефикасности КАС.

4.2.2. *In vivo* поређење безбедности и ефикасности ЛК vs. ГК

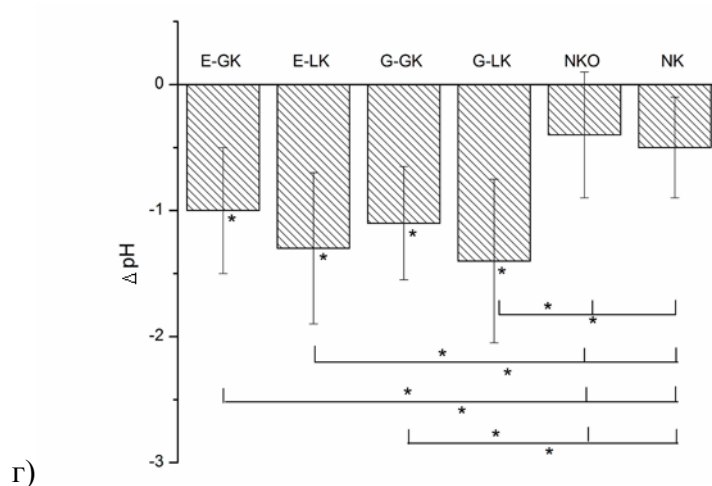
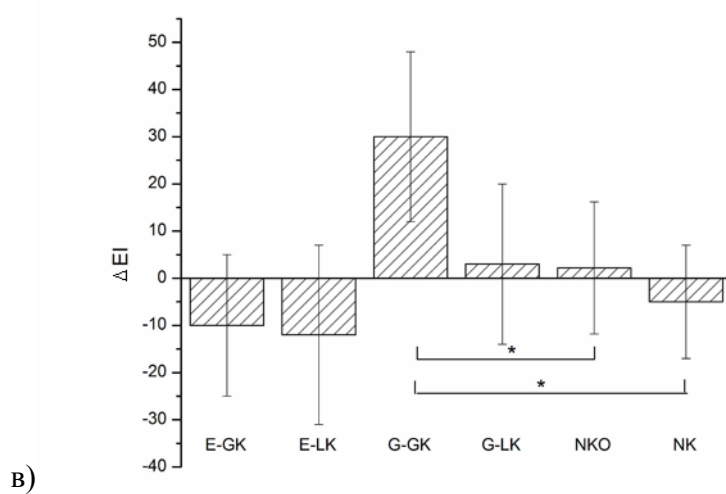
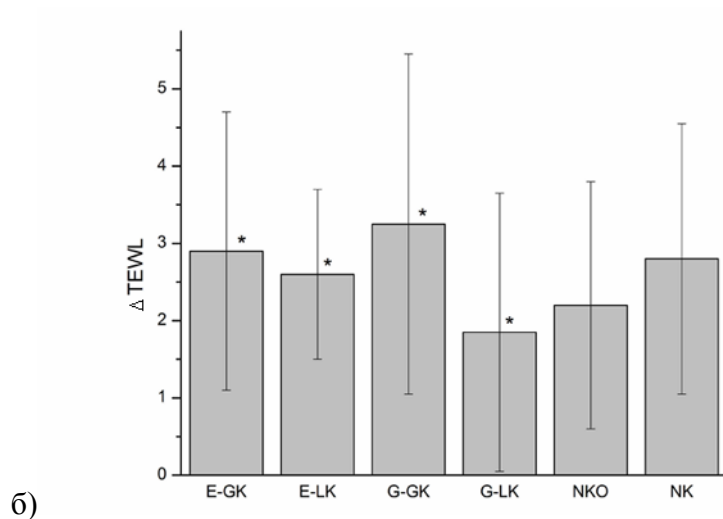
У циљу поређења различитих аспеката примене представника старијих и новијих генерација АНАs као активних састојака дермокозметичких производа на кожу, и то из различитих носача, вршено је *in vivo* поређење безбедности и ефикасности емулзија које садрже 6% ЛК (као представника нове генерације АНАs) са емулзијама које садрже исти проценат ГК (као представника старијих генерација АНАs). У ту сврху, као представник емулзионих носача стабилисаних мешаним емулгатором типа АПГ, изабран је узорак М82 (тј. узорци серије Ф4) због нешто повољније ефикасности и физичкохемијске стабилности у односу на одговарајуће узорке серије Ф2 одређених на основу резултата испитивања која су претходила овој *in vivo* студији.

Резултати испитивања изведених на I групи добровољаца (студија процене безбедности) приказани су на Слици 27а-в. Вредности мерених биофизичких параметара представљене су као апсолутне промене средњих вредности измерених након 24h оклузије у односу на одговарајућу базалну вредност. Може се видети да је дошло до статистички значајног пораста вредности TEWL (Слика 27б) након примене сваког од испитиваних узорака под оклузијом као што се могло претпоставити. Међутим, апликација ниједног од узорака није проузроковала значајније већу промену овог параметара у односу на било коју од контрола.



а)

Слика 27. (легенда на следећој страни)



Слика 27. *In vivo* одређени иритациони потенцијали узорака Е-ГК, Е-ЛК (М82Л1), Г-ГК, Г-ЛК, НКО и НК изражени као апсолутне промене (Δ) параметара: а)ЕС; б)TEWL; в)EI и г)рН након апликације узорака под оклузијом у трајању од 24h, одређене у односу на одговарајуће базалне вредност. Ефекти узорака међусобно као и у односу на одговарајуће контроле (НК и НКО) анализирани су једнофакторском АНОВОМ, након чега је рађен Tukey's *t*-test, где је то било потребно. Статистички значајне разлике одређених параметра наглашене су означавањем истог на графику. Разлике за исти третман али у различитим временским тачкама (базално мерење vs. мерење након оклузије) проверени су Студент т-тестом за упарене узорке; статистички значајна разлика означена је са (*).

И ова студија потврдила је да оклузија сама по себи вероватно доводи до нарушавања баријере SC и пораста TEWL, с обзиром да су апсолутне вредности овог параметра измерене након оклузије у односу на одговарајућу базалну вредност биле веће за НКО него за НК. Резултати мерења параметра EC (као одраза стања хидратисаности SC) за НКО (Слика 27а) такође су били у складу са овим налазом јер су потврдили налазе ранијих студија, да иако сама оклузија доводи до оштећења баријере SC при том не долази до исушивања коже које је пратећа последица пораста TEWL (Fluhr и сар., 1999).

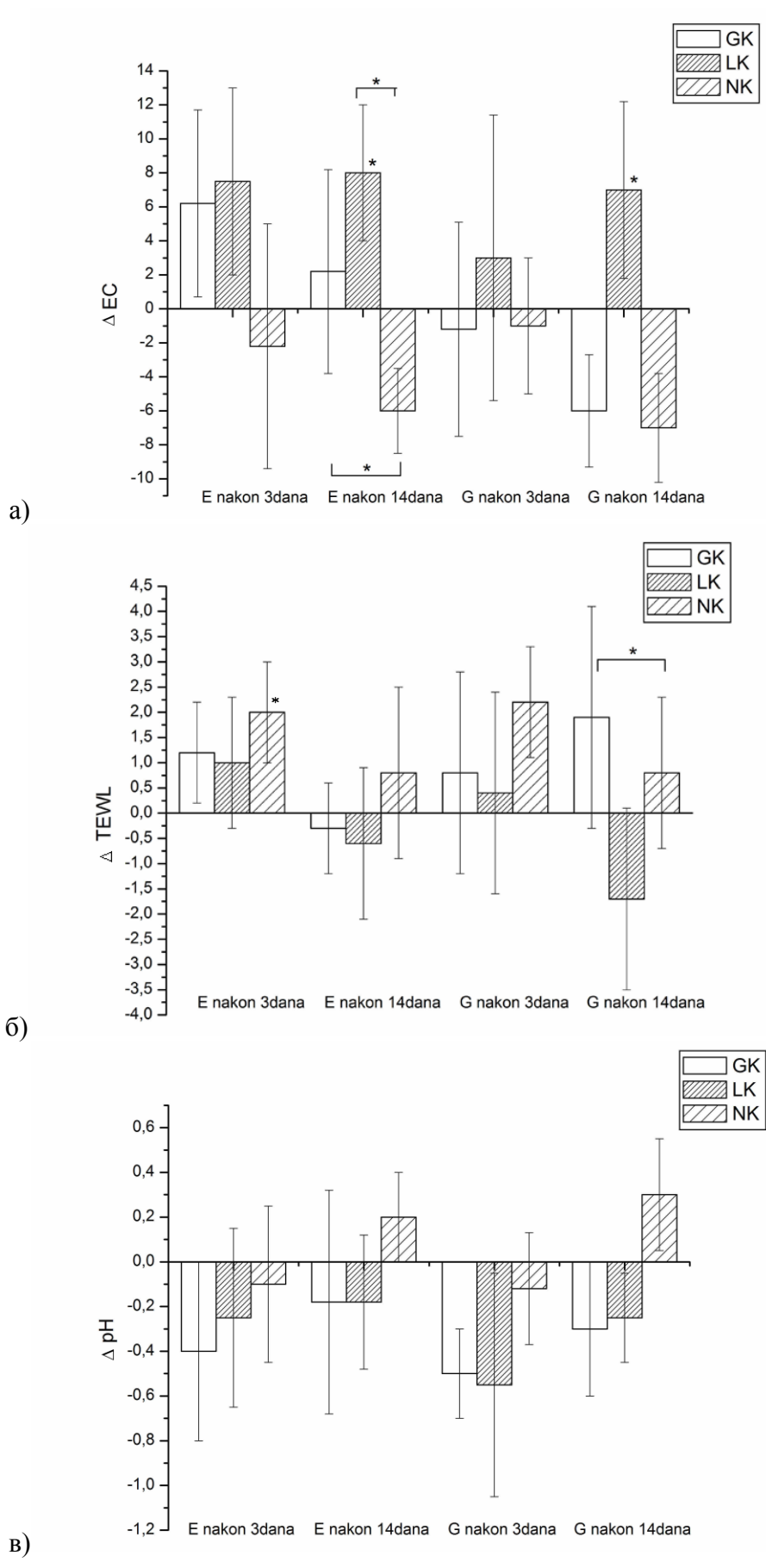
Резултати мерења параметра EI (Слика 27в) били су у складу са онима добијеним у оквиру *in vivo* одређивања ефеката и безбедности одговарајућих узорка – дошло је до пада вредности овог параметра након апликације узорка Е-ЛК (M82L1) под оклузијом, што потврђује претходно изведен закључак о повољном безбедносном профилу овог узорка. До значајнијег пораста вредности овог параметра није дошло ни након апликације узорка Г-ЛК што, заједно са резултатима мерења TEWL указује да сама ЛК не доводи до иритације коже иако се то могло претпоставити с обзиром да апликација 6% ЛК смањује рН вредност коже. Једино је за узорак Г-ГК апсолутна промена вредност EI била значајно већа у односу на исту вредност измерену на НКО што је у складу са мерењима TEWL (апликација овог узорка довела је до највећег пораста TEWL, Слика 27б) и указује на неповољан безбедносни профил тј. извештан иритациони потенцијала овог узорка што се и очекивало.

Измерене рН вредности такође су биле у складу са очекиваним (Слика 27г): након оклузије су сви узорци значајно смањили рН коже у односу на промену забележену код обе контроле (НК и НКО). У контексту налаза мерења параметара TEWL и EI (Слика 27б, в), и овде је показано да ниска рН вредност АПГ емулзија са ЛК као и оних са истим процентом ГК, неопходна за испољавање позитивних дејстава ових активних супстанци након локалне апликације на кожу, доводи до пада рН вредности коже, али не проузрокује пратећу иритацију чак ни под оклузијом. Благи пораст апсолутних разлика параметара EI и TEWL у односу на базалне вредности, добијен је и мерењем на кожи третираној узорком Г-ЛК, док је узорак Г-ГК испољио иритациони потенцијал у смислу значајног пораста оба биофизичка параметра, EI и TEWL (Слика 27б, в).

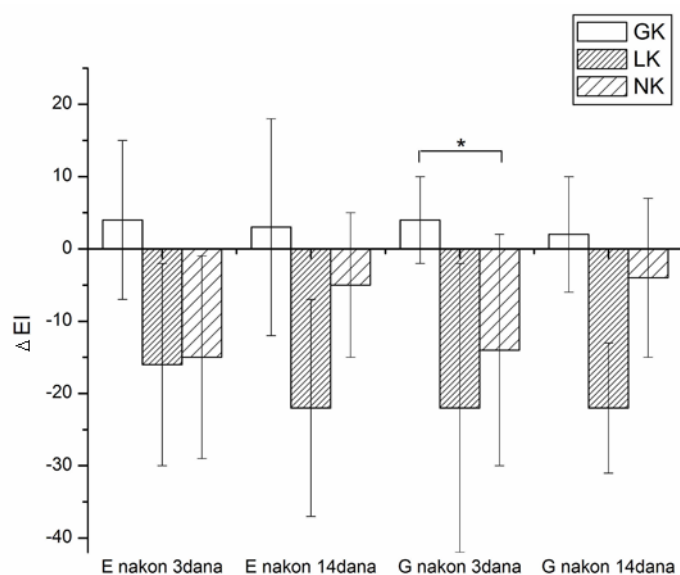
Ова студија указује на значајно мањи потенцијал ЛК да иритира кожу у односу на ГК, али из једноставног носача на бази хидрофилног гела. Што се тиче испитиваних емулзија, могло би се закључити да испитивани емулзиони носач на бази АПГ емулгатора INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol има способност да на неки начин смањи иритацију коже од стране АНАс. Ово је присутно чак и уколико се ради о типичним представницима старијих генерација као што је гликолна киселина, позната по свом проблематичном профилу безбедности при локалној апликацији на кожу чак и у јако ниским концентрацијама, али из стандардних емулзионих носача као што су они стабилисани конвенционалним ПЕГ-емулгаторима (Yu и Van Scott, 2004).

Резултати испитивања изведених на II групи добровољаца (дуготрајна студија) приказани су на Сликама 28а-в, и то као апсолутне промене мерених параметара након 3 и 14 дана студије у односу на одговарајућу иницијалну тј. базалну вредност. Значајнији потенцијал за ефикасну хидратацију коже при третману узорком Г-ГК је изостао и вероватно је у вези са порастом TEWL након 14 дана апликације овог узорка (Слика 28б) и последичним исушивањем коже тј. падом вредности електричне капацитивности коже (EC) третиране овим узорком (Слика 28а). У вези са тим, треба такође напоменути да пораст TEWL није био значајан у односу на вредност истог параметра која је измерена на нетретираној кожи након 3 дана апликације, али се поменута значајност јавила после 14 дана (Слика 28б) апликације. Из овога се може претпоставити да је оштећење баријерне функције SC узорком Г-ГК кумулативно и зависи од дужине трајања његове апликације.

У исто време, апликација емулзије Е-ГК је значајно утицала на пораст нивоа хидратисаности коже што је, имајући у виду налаз за Г-ГК, вероватно ефекат самог емулзионог носача (Слика 28а). Према томе, вероватно је да третман самим плацебом, а не само оклузија, доводи до пораста нивоа хидратисаности коже у студији у којој су ови узорци апликовани под оклузијом. Такође, у дуготрајној студији уочава се враћање на почетне вредности иницијално смањених (након 3 дана апликације) вредности рН коже (Слика 28г) као последице третмана узорцима који су садржали било коју од киселина. Може се претпоставити да до нормализације рН коже долази услед постојања сопственог пуферског капацитета (Вулета, 1983), који после одређеног времена враћа рН коже на ниво физиолошких вредности.



Слика 28. (легенда на следећој страни)



г)

Слика 28. Ефекти гел (G) и емулзионих (E) узорака са 6% лактобионске (ЛК) или гликолне киселине (ГК) на вредности параметара стања коже а) ЕС; б) TEWL; в) рН и г) EI измерених након 3 и након 14 дана третмана и нетретирана контрола (НК). Резултати су приказани као апсолутне промене средњих вредности параметара ± стандардна девијација. Статистички значајне разлике означене су са * $p < 0.05$.

Генерално, у складу са резултатима студије испитивања безбедности која се базирала на *in vivo* апликацији испитиваних узорака под оклузијом, и дуготрајна студија ефикасности могла би да укаже на бољи безбедносни профил дермокозметичких производа са 6% ЛК у односу на оне са истом концентрацијом ГК, без обзира на тип носача, и то уз сличну ефикасност, барем што се тиче параметара који су мерени у овим студијама. Такође, обе активне супстанце (а нарочито ГК која важи за КАС са великим потенцијалом за иритацију коже чак и у нижим процентима од 6%) испољиле су значајно бољи профил безбедности из носача са АПГ емулгаторима, те се може претпоставити да емулзиони носачи стабилисани природним мешаним АПГ емулгаторима поседују способност модификације проблематичног безбедносног профила потенцијалних локалних иританаса (тј. КАС које поседују иритациони потенцијал) као што је ГК.

4.3 Резултати и дискусија III фазе експерименталног рада

4.3.1. Процена физичке стабилности, естетских и апликативних особина емулзија са АПГ и 10% ЛК

Одмах након израде, узорци са 10% ЛК испитивани у овој фази рада (Табела 8) били су бели, сјајни, различитих конзистенција које су се кретале од врло густог (узорци M2026L2 и M2026L2N) до јако меког крема (M68aL2N), док је конзистенција узорка M68aL2 била течнија и одговарала конзистенцији ређег емулзионог лосиона. Као и у I фази испитивања, кремове стабилисани C20/C22 мешаним АПГ емулгатором (INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol) имали су видно гушћу конзистенцију, у односу на кремове стабилисане осталим испитиваним АПГ мешаним емулгаторима. При томе, конзистенција у оквиру једне исте серије узорака такође је варијала у зависности од неутрализације – нешто гушћу конзистенцију имали су кремове са ЛК код којих није извршена корекција рН вредности, у односу на кремове са неутралисаном ЛК (што су потврдили и резултати континуалних реолошких мерења, Слика 31). И једни и други активни узорци били су ређе конзистенције у односу на одговарајући плацебо (што се може видети упоредним увидом у налазе континуалних реолошких мерења која су била изведена у оквиру I фазе односно III фазе експерименталног рада, Слика 16 и Слика 31).

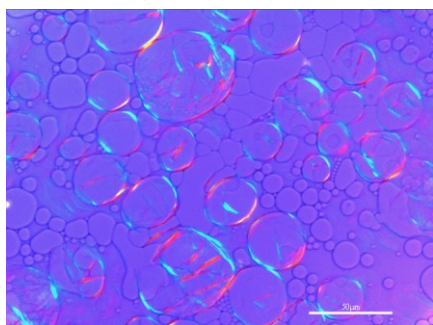
Треба напоменути да је већ током израде узорка M68aL2, након његове неутрализације, уочен драстичан пад конзистенције у односу на одговарајући узорак M68aL2N који није неутралисан. Иако је и код узорака стабилисаних употребом друга два емулгатора (узорци M82L2 и M2026L2) уочена промена, тј. пад конзистенције након неутрализације у односу на одговарајући узорак неподешеног рН, промена конзистенције није била толико изражена као код узорка M68aL2.

Резултати мерења електричне проводљивости потпуно су у складу са наведеним уоченим променама (Табела 15). Иницијално измерене вредности, нарочито код узорка M68aL2 биле су изразито високе у односу на вредности проводљивости плацеба и M68aL2N, што је одговарало великој међусобној разлици у конзистенцијама ових узорака.

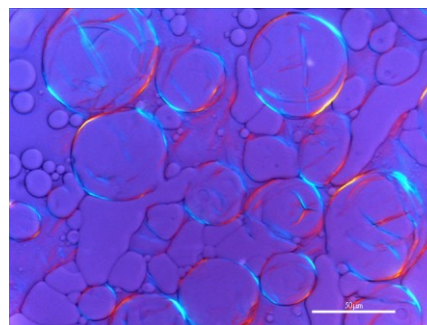
Табела 15. Вредности рН и електричне проводљивости емулзионих узорака са 10% ЛК након 7 и 60* дана од израде

| Узорак | рН | Проводљивост (μS/cm) |
|----------|-------|----------------------|
| M68a | 6.00 | 44.20 |
| | 5.05* | 43.40* |
| M68aL2N | 2.57 | 327.00 |
| | - | - |
| M68aL2 | 3.80 | 614.00 |
| | - | - |
| M82 | 6,54 | 72,80 |
| | 6,14* | 74,50* |
| M82L2N | 2,28 | 99,6 |
| | 2,05* | 147,55* |
| M82L2 | 3,80 | 89,09 |
| | 3,55* | 152,00* |
| M202б | 5,90 | 79,67 |
| | 4,90* | 86,40 |
| M202bL2N | 2,08 | 180,30 |
| | 1,90 | 183,05* |
| M202bL2 | 3,80 | 199,40 |
| | 3,51 | 200,00* |

Током следећих неколико дана након иницијалног мерења испитиваних параметара физичке стабилности дошло је до изразите промене у конзистенцији (растечњавања) узорака M68aL2 и M68aL2N, а потом и видне сепарације фаза. Из тог разлога, нису се могли мерити рН и електрична проводљивост у узорку након 60 дана. Поларизационе микрографије испитиваних узорака након 7 дана од израде приказане су на Слици 29 (увеличање 400 пута).

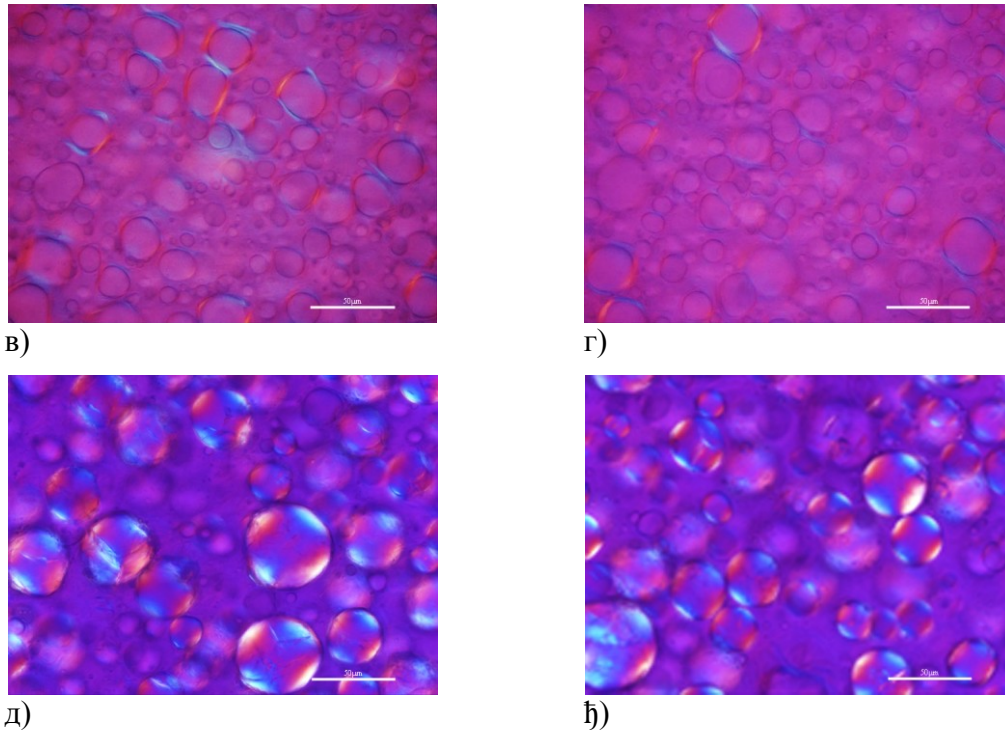


а)



б)

Слика 29. (легенда на следећој страни)



Слика 29. Поларизационе микрографије узорака након 60 дана лагеревања: а) M68L2N; б) M68L2; в) M82L2N; г) M82L2; д) M202L2N; њ) M202L2. Увеличање 400 пута; бар 50 μ m.

Уколико се микрографије узорака M68aL2N и M68aL2 након 7 дана од израде (Слика 29а и 29б, редом) упореде са микрографијама одговарајућег плацеба M68a (Слика 13б) као и микрографијама узорака са нижом концентрацијом ЛК (M68aL1N и M68aL1N, Слика 13в и 13г редом) дефинитивно се може установити неки вид нарушавања структуре емулзионог носача услед инкорпорације 10% ЛК. Наиме, на поларизационим микрографијама узорака M68a, M68aL1N и M68aL1 уочава се присуство добро развијене ламеларне ТК фазе (у простору око капи унутрашње фазе као и у континуалној фази) које вероватно доприносе и физичкој стабилности ових узорака. У исто време, на микрографијама узорака M68aL2N и M68aL2 (Слика 29а, 29б) знатно је слабије заступљено присуство ламеларних структура. Штавише, уочљиво је удруживање капи унутрашње фазе уз присуство капи веома великих димензија насталих коалесценцијом. Напредовање овог процеса у наредних неколико дана довело је до потпуног одвајања фаза уоченог код поменутих емулзија. Микрографије узорака након 60 дана нису приказане с обзиром на поменути испољену нестабилност. Ова појава могла би се објаснити у контексту неких закључака до којих се дошло раније у овом раду.

Резултати I фазе овог рада указали су да при додатку 6% ЛК у емулзију стабилисану емулгатором INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol део ове КАС остаје растворен у континуалној фази емулзије док се други, вероватно мањи део инкорпорира између ламела ламеларних течних кристала којима се стабилише сам носач. Вероватно је да фракција ЛК и њених соли присутна у континуалној фази емулзије привлачи и истискује део интерламеларно везане воде, дестабилишући ламеларне структуре (доводећи до њихове дехидратације), што је вероватно условило потпуну нестабилност узорка M68L1 у I фази испитивања, (узорак са 6% ЛК који није садржао ксантан гуму). Тачније, ЛК (нарочито након неутрализације) вероватно проузрокује такво нарушавање микроструктуре самих носача стабилисаних поменути АПГ мешаним емулгатором дужине алкил ланца C16/18, где долази до прерасподеле воде везане на различит начин у емулзији. При томе, у случају активних узорак серије Ф2 хигроскопна ксантан гума највероватније везује вишак истиснуте воде (у спољашњој фази емулзије) спречавајући да дође до нестабилности емулзије. Активни узорци серије Ф2 (са 6% ЛК) окарактерисани су као физички стабилни. У вези са налазима III фазе рада тј. уоченим драстичним падом конзистенције, а потом и распадања емулзије која је садржала 10% ЛК (узорак M68aL2) могло би се претпоставити да инкорпорирањем већег садржаја хигроскопне ЛК у поменути емулзиони носач, значајна количина ове КАС остаје у спољашњој фази емулзије. Та фракција највероватније привлачи и везује воду која је у самом носачу везана интерламеларно те узрокује рушење ламеларних структура у емулзији што на крају води ка дефинитивном испољавању физичке нестабилности тј., раздвајању фаза. Тачније, при додатку 10% ЛК редистрибуција воде у носачу вероватно је таквог интензитета, да узорак чини потпуно физички нестабилним, без обзира на присуство ксантан гуме у спољашњој фази емулзије.

Иако дефинитивно постоје интеракције између микроструктура које стабилишу саму испитивану емулзију (као носача) и већих садржаја инкорпориране ЛК (10%) (без обзира на тип употребљеног АПГ мешаног емулгатора у стабилизацији емулзионог носача), поставља се питање да ли би само ово одузимање воде од стране ЛК из ламела ламеларних течних кристала могло у тако кратком времену (као што је уочено у овом испитивању) довести до нестабилности која као последицу има потпуно распадање емулзије? При доношењу дефинитивног закључка свакако треба имати у виду да су резултати

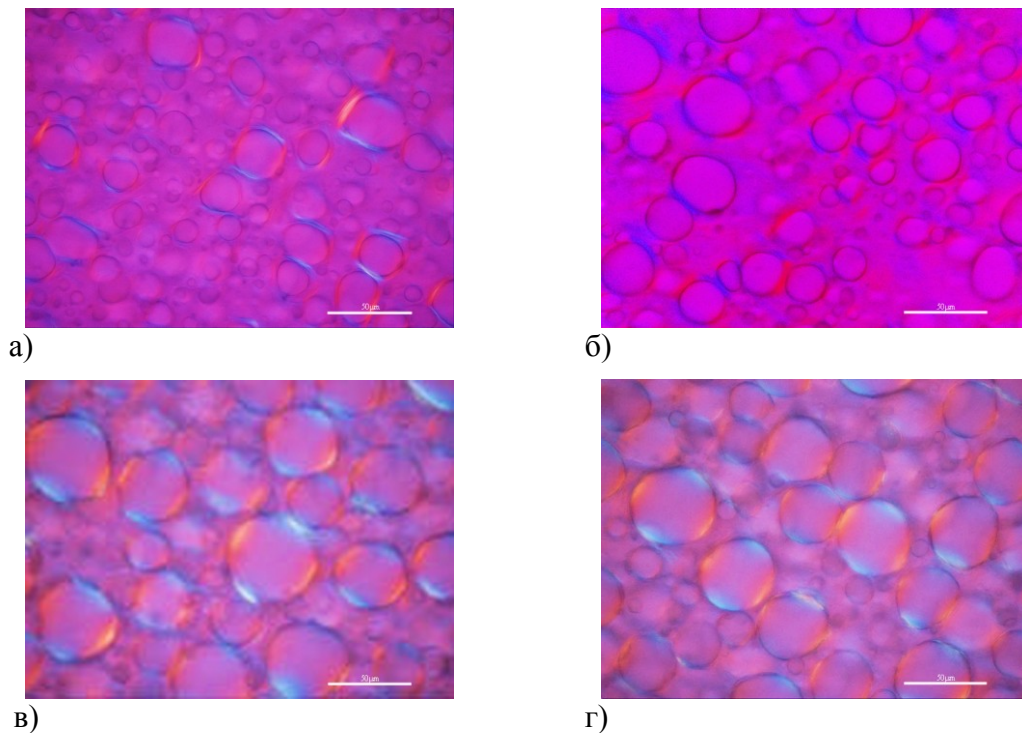
неких ранијих истраживања показали да додаток електролита (већ је напоменуто да је ЛК јак електролит) у дисперзије неких од АПГ краћег ланца доводи до коацервације и нарушавања њихове структуре, као и да додаток супстанци ниске рН вредности у водене дисперзије АПГ као и емулзије стабилисана АПГ емулгаторима доводи до хидролизе ових молекула (Holmberg, 2001). Према томе, с обзиром на интензитет уочене нестабилности тј. брзину којом је дошло до одвајања фаза узорка М68аL2 и М68аL2N, треба узети у обзир и могућност да је, поред интеракција на нивоу структуре саме емулзије, до уочене нестабилности емулзије довела и хидролиза АПГ компоненте мешаног емулгатора INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol у присуству већег процента киселине. Узорци М68аL2 и М68аL2N елиминисани су из даљих испитивања, а емулзиони носач М68а окарактерисан као неодговарајући за инкорпорацију већег процента (10%) ЛК.

Микрографије добијене 7 дана након израде узорка (Слика 29) указују на присуство диспергованих капи унутрашње фазе уједначених димензија у оквиру исте серије узорка. Код узорка стабилисаних емулгатором највеће дужине алкил ланца – С20/22 АПГ (узорци М202L2 и М202L2N) присутне су капи унутрашње фазе знатно већих димензија него код узорка М82L2 и М82L2N, али уз присуство јако добро развијене ламеларне фазе (у виду малтешких крстова) што би, имајући у виду вредности електричне проводљивости измерене након 7 и 60 дана чувања (Табела 15), могло навестити солидну физичку стабилност ових узорка. Не запажају се значајније разлике између поларизационих микрографија два испитивана узорка са 10% ЛК стабилисаних емулгатором најкраћег алкил ланца АПГ (С12/14, узорци М82L2 и М82L2N, Слика 29в, 29г). Ни након 7 vs. 60 дана од израде и чувања на собној температури код оба ова узорка нема значајне разлике у величини капи нити у њиховој дистрибуцији. На овим сликама се може уочити да је присутна анизотропија истог типа и интензитета као анизотропија присутна код претходно испитиваних узорка са 6% ЛК (М82L1 и М82L1N, Слика 13з, и), тј. јасно се виде анизотропни слојеви у виду деформисаних малтешких крстова око капи унутрашње фазе емулзије (тзв. *onion rings*) у континуалној фази крема. Присутне су и структуре које рефлектују светлост у континуалној фази емулзије између диспергованих капи, што вероватно одговара ламеларној гел фази. Поларизационе микрографије свакако потврђују да веће концентрације ЛК не доводе до видљивог нарушавања структура емулзија стабилисаних мешаним емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol, иако

се то евентуално могло претпоставити на основу јако хигроскопне и киселе природе ове активне супстанце, као и индикације да њен додатак у већем проценту узрокује хидролизу цетеарил глукозида (из емулгатора INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol) у емулзијама стабилисаним АПГ мешаним емулгатором. У I фази испитивања у оквиру овог рада закључено је да је утицај додатка 6% ЛК у емулзиони носач стабилисан емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol вероватно потенцирајући у смислу формирања ламеларног гела тј. ламеларних течностно-кристалних структура. Иако би се због додатка веће концентрације електролита (10% ЛК) могао очекивати пораст проводљивости емулзија (Korhonen и сар., 2005), мања вредност иницијално измерене проводљивости (7 дана од израде) узорача стабилисаних емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol са 10% ЛК (Табела 15) у односу на иницијално измерену проводљивост узорача са 6% ЛК (Табела 8) вероватно би се могла објаснити додатним везивањем слободне воде у интерламеларне просторе додатних домена ламеларних фаза које настају повећањем концентрације ЛК тј. услед даљег "уметања" молекула ЛК (заједно са водом коју везују) у интерламеларне просторе. Ово би, практично, значило да се ефекат ЛК да потенцира формирање ламеларних структура (ламеларних течних кристала и ламеларног гела) у емулзионом носачу стабилисаним употребом АПГ емулгатора краћег алкил ланца АПГ (C12/14), и коемулгатора INCI/Myristyl alcohol&Myristyl glucoside интензивира порастом њене концентрације, тј. да је тај ефекат уствари концентрационо-зависан. Међутим, вредности проводљивости измерене након 60 дана чувања узорача M82L2 и M82L2N (Табела 15) знатно су више у односу на вредности измерене код одговарајућих узорача са 6% ЛК (M82L1 и M82L1N), што би могло указати да се лагеровањем вероватно мења односно нарушава формирана микроструктура ових узорача и повећава фракција "слободне" воде тј. воде која није инкорпорирана унутар ламеларних области.

Поларизационе микрографије узорача III фазе испитивања снимљене након 60 дана чувања приказане су на Слици 30 (осим микрографија емулзија M68aL2N и M68aL2 које су се пре тог периода распале). Међутим, поређењем поларизационих микрографија узорача стабилисаних емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol 7 vs. 60 дана (Слика 30а, 30б) не уочавају се разлике. На основу тога би се могло претпоставити да додатак већих концентрација ЛК од 6% свакако не нарушава ламеларне структуре у континуалној фази емулзије (као

што је претходно уочено код емулзија стабилисаних емулгатором INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol – M68aL2 и M68aL2N). Ови налази нису у складу са наведеним променама на које указују мерене вредности електричне проводљивости (које су се за поменуте узорке повећале након 60 дана), технике за коју се сматра да је најосетљивија у детектовању физичких промена у самој емулзији (Masmoudi и сар., 2005). Према томе, вероватно је да до додатног структурирања (формирања ламеларних фаза) услед повећања концентрације инкорпориране ЛК у носач са емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol заиста и долази одмах након израде узорака, као што се може закључити мерењем проводљивости емулзија, иако се та структурирања на поларизационим микрографијама не може визуелизовати, вероватно због слабијег интензитета поменуте лиотропне интеракције (Слика 29в, 29д).



Слика 30. Поларизационе микрографије узорака након 60 дана лагеровања: а) M82L2N; б) M82L2; в) M202L2N; г) M202L2. Увеличање 400 пута; бар 50µm.

Чувањем емулзија ситуација се мења. У Табели 15 дате су вредности рН и електричне проводљивости испитиваних узорака. Ради јаснијег, упоредног увида у измерене вредности ових узорака као и вредности истих параметара одговарајућих емулзионих носача (M82 и M202б, подаци раније приказани у Табели 8) вредности рН и проводљивости плацебо узорака M202б и M82 су поново приказане у Табели 15. Након 60 дана, измерене су знатно више вредности

електричне проводљивости узорак M82L2 и M82L2N у односу на иницијалне. Ипак, поларизационе микрографије (Слика 30а, 30б), не показују ни повећање димензија капи унутрашње фазе емулзије нити присуство коалесценције уљаних капи, које би евентуално могле да укажу на нестабилност емулзије. Након 60 дана лагеровања дошло је до благог пада конзистенције емулзија M82L2 и M82L2N, те би се могло претпоставити да заиста долази до одређене интеракције у систему која доводи до благог нарушавања формираних ламеларних структура (присутних у плацебу и узорку са мањим процентом ЛК). Могуће је, по закључку који смо извели и тиче се нестабилности узорак M68aL2 и M68aL2N, да и у овом случају већа концентрација ЛК доводи до парцијалне хидролизе емулгатора INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol (и/или коемулгатора INCI/Myristyl alcohol&Myristyl glucoside), вероватно у много мањој мери него што то чини у случају АПГ емулгатора INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol. Вероватно је да се поменути интеракција испољава тек након извесног времена лагеровања.

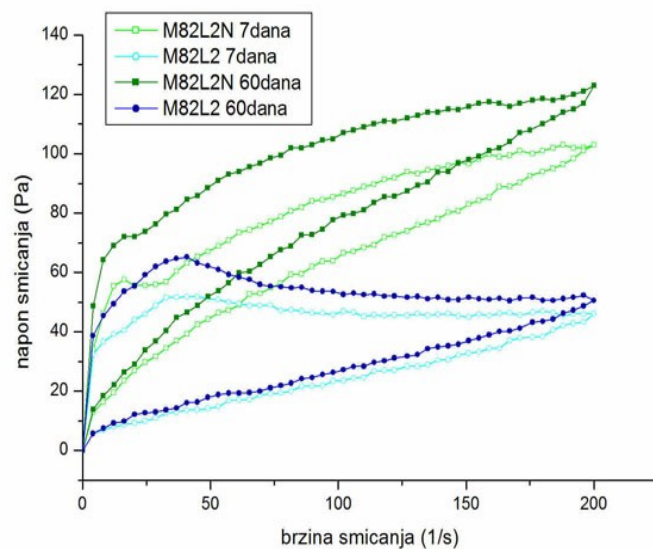
Надаље, не запажају се међусобне разлике у поларизационим микрографијама узорак са 10% ЛК – M2026L2 vs. M2026L2N (Слике 29д и 29ђ) као ни разлике у микрографијама сваког од узорак након 7 vs. 60 дана од израде и чувања на собној температури (Слике 30в и 30г приказују поларизационе микрографије ових узорак након 60 дана). Оне јасно указују на присуство доста добро развијених анизотропних домена око капи унутрашње фазе (деформисаних малтешких крстова) као и на присуство ламеларног гела унутар континуалне фазе код оба испитивана узорка. Поменути анизотропија јасно је наглашена у структури емулзија са 10% ЛК и подсећа на ону присутну код одговарајућег плацебо узорка (Слика 13ђ, дебљи светли слојеви око капи и јасно изражене траке анизотропног слоја у континуалној фази). Као што се већ могло видети из резултата добијених у I фази испитивања, ЛК (у концентрацији 6%), као поларна, хидросолубилна супстанца вероватно ступа у интеракцију са ламелама течнокристалне фазе присутним у структури емулзионог носача на бази поменутог АПГ мешаног емулгатора. Ступајући у поменути интеракцију, молекули ЛК умећу се у просторе између ламела липидних двослојева ламеларних структура, али вероватно не мењају њихову дебљину, већ услед своје јако хигроскопне природе повећавају дебљину слојева интерламеларно фиксиране воде. Ипак, додавањем ЛК у концентрацији већој од 6%, даља промоција формирања поменутих структура изостаје, вероватно јер са повећањем процента ова киселина

остаје растворена у континуалној фази услед јако липофилне природе молекула C20/22 АПГ мешаног емулгатора. На поларизационим микрографијама узорака M2026L2 и M2026L2N (Слика 29д и 29ђ) може се видети да су ламеларне структуре (течно-кристалне и гел) заступљене у нешто мањој мери (и да су капи унутрашње фазе нешто већих димензија) него код емулзионог узорка стабилизованог истим емулгатором уз додаток мање количине (6%) ЛК (Слика 13у, 13ф). Присуство већег садржаја слободне воде могло би се огледати у већим вредностима кондуктометријски измерених вредности проводљивости узорака са 10% ЛК у односу на исте узорке са 6% ЛК (Табела 8 и Табела 15), и говорити у прилог последњој тврдњи.

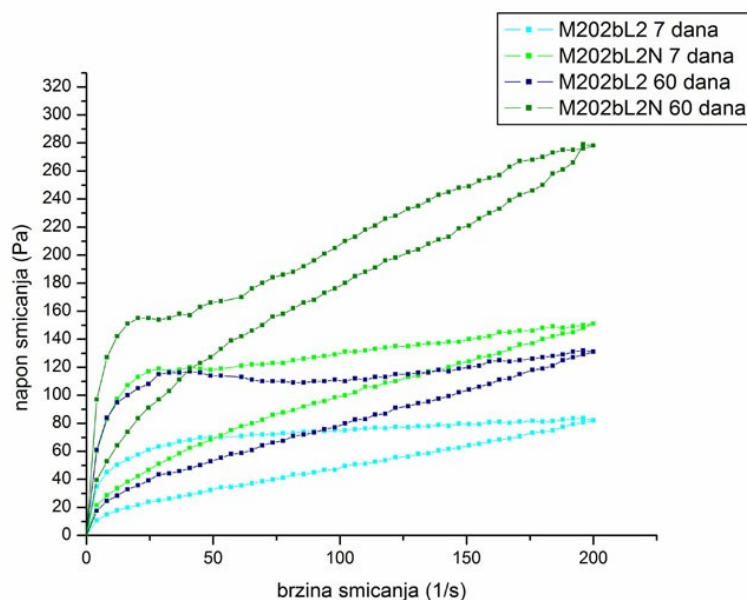
По аналогији са закључцима изведеним у вези узорака M82L2 и M82L2N, могло би се претпоставити да се ЛК, до одређене количине, инкорпорира заједно са везаном водом између ламела течностно-кристалне и гел фазе. Међутим, док је проводљивост узорака M82L2 и M82L2N током лагровања значајно расла указујући на повећање фракције невезане воде, и да је та нестабилност приписана делимичном рушењу ламеларних структура у емулзији као и парцијалној хидролизи емулгатора, у случају узорака M2026L2 и M2026L2N вредности измерених проводљивости након 60 дана чувања готово незнатно су веће у односу на иницијално измерене. То указује да вероватно не долази до значајнијих промена у структури емулзија са 10% ЛК, стабилисаних емулгатором најдужег алкил ланца АПГ (C20/22), током лагровања. Наиме, на основу вредности проводљивости и поларизационих микрографија 7 vs. 60 дана које не указују на физичку нестабилност, мало је вероватно да услед додатка 10% ЛК долази до хидролизе емулгатора INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol. Као што је речено, проводљивост узорака M2026L2 и M2026L2N и након 7 и након 60 дана била је већа у односу на вредности измерене код одговарајућих узорака са 6% ЛК (Табеле 8 и 15), али се свакако може приписати присуству нешто веће количине воде и ЛК као електролита у спољашњој фази емулзија, а не значајнијем нарушавању структуре носача услед повећања концентрације ЛК.

У Табели 15 може се видети да су рН вредности узорака који нису неутралисани нешто ниже у односу на одговарајуће узорке са 6% ЛК (Табела 8), што се може повезати са већим садржајем киселине, односно већом концентрацијом H^+ јона. У складу са тим, при неутрализацији је запажено да је потребна нешто већа количина ТЕА него код узорка у ком је у исти носач

инкорпорирано 6% ЛК. Такође, дошло је до пада измерених рН вредности након 60 дана у односу на вредности измерене након 7 дана од израде код свих испитиваних узорака, али се тај пад не може окарактерисати као значајан. Резултати реолошке анализе испитиваних узорака дати су на Слици 31. Сви узорци испољили су псеудопластично течење (енг. *shear thinning*) са умерено израженом тиксотропијом (израженијом код узорака стабилисаних емулгатором најдуже алкил ланца АПГ), што је већ раније у тексту објашњено као пожељно својство крема.



а)



б)

Слика 31. Криве течења узорака а) M82L2N и M82L2; б) M202L2N и M202L2; након 7 и након 60 дана лагеревања.

Резултати континуалних реолошких испитивања узорка M82L2 и M82L2N приказани су на Слици 31а. Запажа се да код оба узорка долази до незнатног пораста вискозитета (пораста параметра η_{\max}) и повећања хистерезне површине након 60 дана чувања у односу на иницијално одређене вредности што није у потпуном складу са измереним вредностима њихове проводљивости (Табела 15), као и налазима добијеним увидом у поларизационе микрографије. Уколико се криве течења упореде са кривама течења емулзија на бази истог носача са нижим процентом неутралисане ЛК (Слика 16в, узорак M82L1) може се уочити нешто нижи вискозитет узорка M82L2. То се може приписати нарушавању ламеларног гела који је присутан у континуалној фази емулзија при повећању количине инкорпориране КАС.

Упоредном анализом кривих течења може се закључити да је узорак M2026L2 (Слика 31б) показао јачи отпор смицању у односу на узорак M82L2 (Слика 31а), као и узорак M2026L2N у односу на M82L2N. Запажа се да долази до пораста вредности максималног привидног вискозитета (тј. напона смицања у односу на примењену брзину смицања), као и вредности хистерезне површине узорка M2026L2 и M2026L2N измерених након 60 у односу на вредности које су измерене након 7 дана чувања (Слика 30б). Као и код одговарајућег плацеба (M2026) и узорка са 6% ЛК M2026L1 (Слика 16д), та појава указује на додатно структурирање система током лагеровања које је праћено преласком воде из континуалне фазе у просторе између ламела тј. бубрењем ламеларног гела, што се на поларизационим микрографијама не уочава, а знатно је мање изражено него код узорка са 6% ЛК стабилисаних истим емулгатором. Треба такође напоменути и да узорак M2026L2 у односу на M2026L1 пружа мањи отпор примењеном стресу (нарочито након 60 дана чувања), као и M2026L2N у односу на M2026L1N (Слике 16д и 31б), што указује на нешто нижу структурираност, тј. нижу конзистенцију кремова са већим процентом ЛК. Овакав налаз потпуно је у складу са претходно наведеним резултатима добијеним поларизационом микроскопијом и мерењем проводљивости емулзија, а може се објаснити јачим интеракцијама ламеларног типа у узорцима ове серије са нижим процентом ЛК. У случају јако липофилног АПГ емулгатора као што је арахидил глукозид, липофилност вероватно условљава да хидрофилна ЛК може само до неког процента бити инкорпорирана унутар ламела течно-кристалних и гел фаза које настају. Према томе, у узорку са 10% ЛК већа количина активне супстанце, без обзира на

неутрализацију, вероватно остаје у спољашњој фази емулзије растворена у тзв. слободној води, и не икорпорира се у интерламеларне просторе. Извесно је да су ове фракције ЛК, заједно са присутним полимером (ксантан гумом, обе супстанце су јако хигроскопне), довеле чак и до привлачења одређене количине интерламеларно везане воде и њеног повлачења из интерламеларног простора, а самим тим и повећавања електричне проводљивости.

Ова разлика, ипак, нема велики значај. Физичка стабилност узорака M2026L2 и M2026L2N се на основу добијених резултата може окарактерисати као прихватљива. Штавише, може се рећи и да би, вероватно због слабије израженог накнадног структурирања (него узорци стабилисани истим емулгатором без и са 6% ЛК) узорак M2026L2 могао имати боље изражене апликативне и естетске особине. Нема назнака да долази до физичке нестабилности ових узорака током 60 дана чувања на собној температури, а самим тим не може се рећи да ЛК изазива хидролизу (или барем не у значајнијој мери) арахидил глукозода као компоненте мешаног емулгатора INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol, што је највероватније био случај код претходна два мешана алкил полиглукозидна емулгатора.

Према томе, иако је емулзиони носач M2026 у I фази испитивања окарактерисан као непогодан за инкорпорацију 6% ЛК и поред физичке стабилности активних узорака, са повећањем процента инкорпорирание КАС запажају се боље реолошке особине емулзије тј. изостанак значајног накнадног структурирања неутрализованог узорка (који се може апликовати на кожу) током његовог чувања. Тако се може закључити да, у случају емулзионог носача са емулгатором INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol стабилисаног додатком коемулгатора INCI/Myristyl alcohol&Myristyl glucoside и ксантан гуме као костабилизатора, погодност да буде носач за јако киселе и јако хигроскопне КАС (као што је ЛК) расте са повећањем њихове концентрације због бољих физичких особина крема које су, парадоксално, изазване нарушавањем структуре. Рушење структуре у присуству већих концентрација КАС поменутих особина (у овом случају 10% ЛК, неутрализоване) је ипак таквог интензитета да не ремети физичку стабилност крема, а утиче на његове особине.

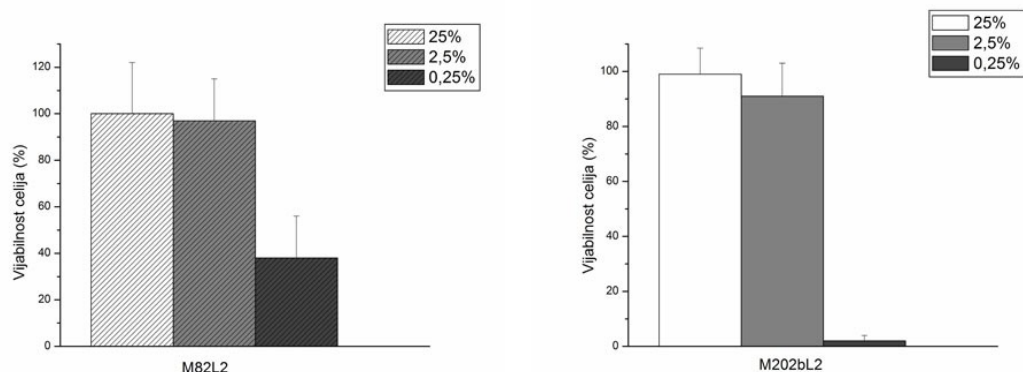
INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol иначе представља АПГ емулгатор који се може окарактерисати као најхидрофилнији (највиша HLB вредност) од свих који су проучавани у оквиру ове докторске дисертације. У складу са тим

могло се претпоставити да ће емулзије стабилисане овим С12/14 АПГ мешаним емулгатором бити потенцијално најприкладнији носачи за веће количине јако хидрофилне ЛК. Међутим, спроведена студија показала је да су и емулзије стабилисане јако липофилним INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol (али искључиво уз додатак и липофилног и хидрофилног костабилизатора) такође прихватљиви носачи за исту намену. ЛК недвосмислено утиче на колоидну структуру емулзија стабилисаних различитим АПГ емулгаторима ступајући са њима у неку врсту интеракције, али није установљено да ли и на који начин тип и интензитет интеракције зависе од HLB вредности емулгатора. Дефинитивно је да пораст концентрације ЛК води рушењу структуре емулзија стабилисаних било којим од АПГ и структуре самог АПГ, и та појава је у различитој мери заступљена код различитих АПГ без уочене зависности од ХЛБ вредности АПГ тј. од дужине његовог алкил ланца.

4.3.2 In vivo/in vitro процена профила безбедности емулзија са 10% ЛК

4.3.2.1. In vitro одређивање безбедносног профила одабраних узорака

Извршена је процена утицаја узорака М82L2 и М202bL2 на вијабилност ћелија реконструисане хумане коже, у циљу одређивања и поређења иритационих потенцијала емулзија са 10% ЛК базираних на два различита АПГ емулгатора. Резултати су приказани на Слици 32 као графици зависности процента вијабилности ћелија од 3 различите концентрације испитиваних формулација (0,25%, 2,5% и 25%).



a)

b)

Слика 32. In vitro одређен иритациони потенцијал узорака а) М82L2; б) М202bL2, представљен у виду хистограма зависности вијабилности ћелија (у %) од три различите концентрације узорака

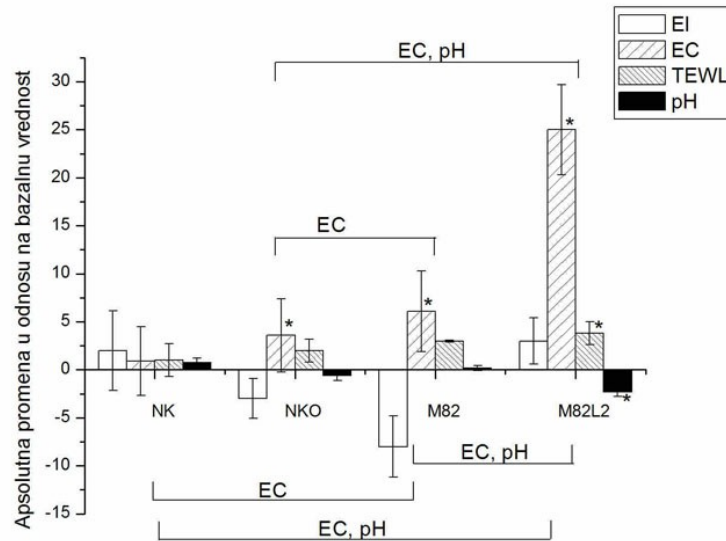
Код узорка M82L2 при највећој испитиваној концентрацији (25%) уочава се неприхватљив пад вијабилности (вредност је мања од 50%) у односу на ефекте друге две концентрације (0,25% и 2,5%, Слика 32а) што би могло указати на потенцијално неповољан безбедносни профил овог узорка. Већ је напоменуто да се као гранична вредност процента вијабилности (процент вијабилности испод кога се иритациони потенцијал узорка третира као неприхватљив) узима вредност 50% (Savic и сар., 2009а). Међутим, концентрација формулације од 25% односно апликација узорка на кожу у тако великој количини није уобичајена у реалном режиму примене дермокозметичких производа нити дермофармацеутика.

Што се тиче узорка M2026L2, он је испољио готово потпуно одсуство вијабилности ћелија реконструисане хумане коже након апликације овог крема у концентрацији 25%, за разлику од друге две концентрације овог узорка на основу чије апликације се може тврдити да овај узорак поседује повољан безбедносни профил (Слика 32б). На основу резултата цитотоксичности узорка M82L2 (Слика 32а), као и на основу резултата *in vivo* и *in vitro* процене безбедносног профила узорака са 6% ЛК, може се претпоставити да, иако је ЛК у мањој концентрацији безбедна за апликацију на кожу, повећање концентрације ове КАС у емулзији стабилисаној емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol условљава лошији безбедносни профил узорка, односно долази до пада вијабилности ћелија реконструисане коже на које се емулзија апликује. Та појава још је израженија у случају емулзија стабилисаних емулгатором INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol, и поред одсуства цитотоксичног потенцијала одговарајућег плацебо узорка (Слика 32б).

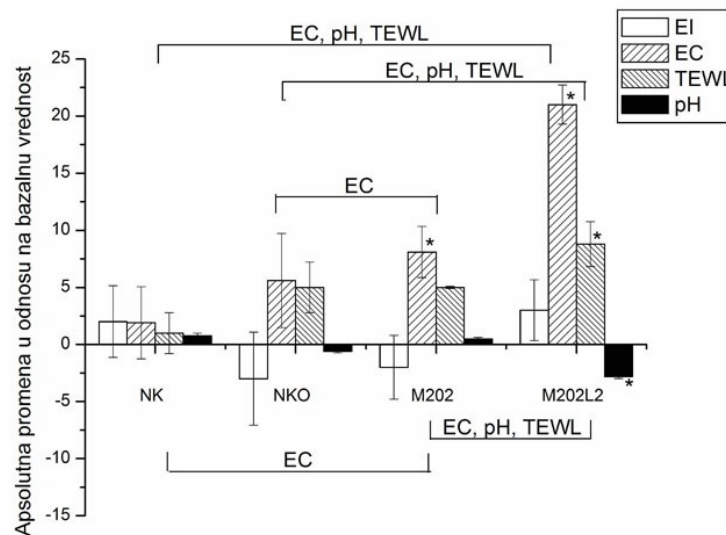
Као што је већ речено, само највеће концентрације (25%) испитиваних узорака са 10% ЛК, иначе превисоке у односу на реалан режим примене, показују негативан утицај на ћелијску вијабилност одређену *in vitro*. Истовремено би се могао очекивати нешто бољи безбедносни профил узорка M82L2 у односу на узорак M2026L2. Готово гранична ћелијска вијабилност измерена након апликације узорка M82L2 наводи на потребу извођења комплементарне *in vivo* студије безбедности у циљу извођења дефинитивног закључака у вези иритационог потенцијала првенствено овог, али и узорка M2026L2.

4.3.2.2. *In vivo* одређивање безбедносног профила одабраних узорака на кожи

На Слици 33 приказани су резултати *in vivo* студије, односно графици апсолутних промена мерених параметара након апликације испитиваних узорака на кожу под оклузијом, у односу на одговарајуће базалне вредности, као и апсолутне промене мерених параметара за обе контроле.



a)



б)

Слика 33. *In vivo* одређени иритациони потенцијали узорака а) М82 и М82Л2; б) М202б и М202бЛ2. Апсолутне промене параметара ЕС, ТЕWL, ЕИ, и рН измерених након апликације узорака под оклузијом, одређене су у односу на одговарајуће базалне вредности. Ефекти узорака међусобно као и у односу на одговарајуће контроле (НК и НКО) анализирани су једнофакторском АНОВОМ, након чега је рађен Tukey's *t*-test, где је то било потребно; статистички значајне разлике за одређене параметре наглашене су означавањем истог на графику. Разлике за исти третман, у различитим временским тачкама (базално мерење vs. након оклузије) проверени су Студент т-тестом за упарене узорке; статистички значајна разлика означена је са (*).

Након 24h оклузије долази до значајног пораста нивоа хидратисаности коже третиране сваким од плацебо и узорка са 10% ЛК, као и на нетретираној контроли под оклузијом, што се и могло претпоставити и приписати оклузији *per se*. Међутим, за разлику од резултата *in vivo* испитивања безбедности емулзија са 6% ЛК, овде се може запазити статистички значајна међусобна разлика у хидратационим потенцијалима плацебо и активног узорка након оклузије (Слика 32а,б), вероватно као последица повећане концентрације ЛК у узорку.

Нарочито треба нагласити изостанак значајне промене параметра EI (у односу на базалну вредност) након третмана сваким од два испитивана узорка са 10% ЛК, имајући у виду да је иритација коже углавном праћена значајним порастом управо овог параметра (Savić и сар., 2009а; 2009б). Што се тиче пораста TEWL након примене, он је значајан код узорка M2026L2, чак је и већи у поређењу са обе контроле, као и у односу на пораст исте вредности изазване апликацијом плацебо узорка, те се не би могао приписати оклузији *per se*. Насупрот томе, статистички значајан пораст истог параметра након апликације узорка M82L2 (Слика 32а) постоји, али се не разликује од пораста забележеног код обе контроле нити плацеба, те се вероватно може приписати самој оклузији.

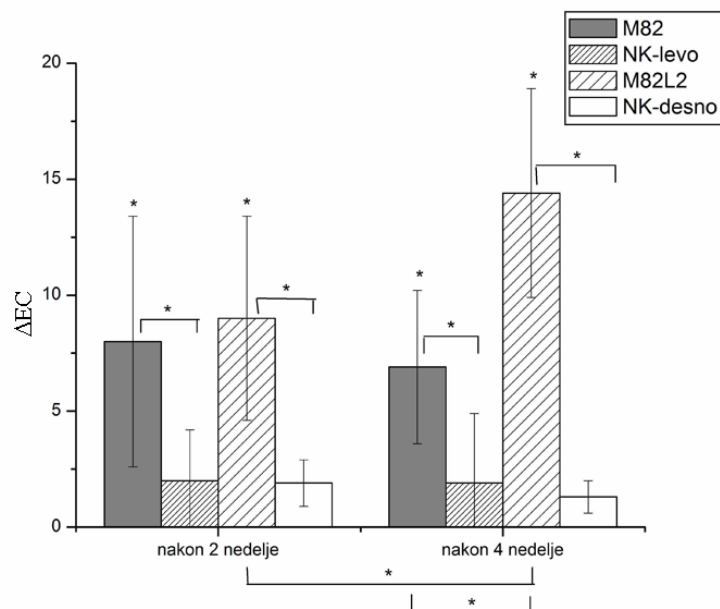
Према томе, овом *in vivo* студијом поткрепљује се закључак *in vitro* студије којом су испитани исти узорци. Вероватно је концентрација од 25% узорка M82L2 која је довела до пада вијабилности ћелија хумане коже (те се самим тим не може декларисати као безбедна за примену на кожи тј. узорак апликован у тој концентрацији извесно доводи до њене иритације) превелика у стварном режиму примене. Количина у којој су узорци апликовани на кожу испитаника у *in vivo* студији, у којој није евидентирана иритација нити оштећење баријере, одговара просечној реалној количини апликованог дермокозметичког производа тј. дермофармацеутика, која износи око $0,016\text{g/cm}^2$ (Savić и сар., 2009а). Узорак M82L2 са 10% ЛК могао би се, на основу претходно наведеног, декларисати као безбедан за примену на кожи (Savić и сар., 2009а, 2009б). И поред изостанка значајног пораста параметра EI за узорак M2026L2 (Слика 33б), због значајног пораста TEWL, тј. нарушавања баријерне функције SC као и због резултата *in vitro* студије безбедности, за овај узорак било би сигурније рећи да поседује дискутабилан безбедносни профил примене на кожи. Тачније, имајући у виду резултате *in vitro* студије безбедности, постоји могућност да при повећању апликоване количине било ког од два узорка са 10% ЛК на кожу дође до

испољвања неког вида нарушавања структуре и функције коже тј. њене иритације, оштећења баријере SC, и евентуално еритема.

4.3.2.3. *In vivo* процена ефикасности одабраних узорака на кожи

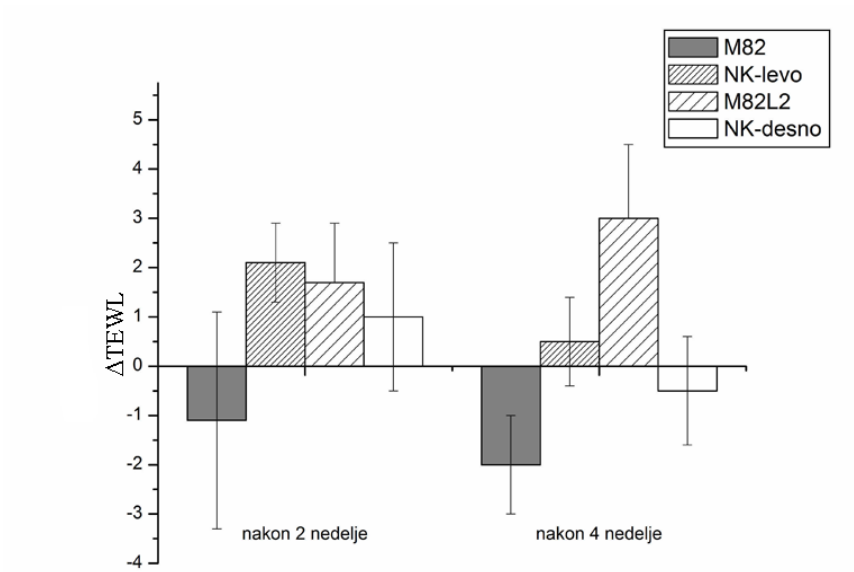
Испитивање ефикасности одабраних формулација емулзија са 10% ЛК на кожи хуманих добровољаца вршено је специфичним биофизичким мерењима, у студији која је трајала четири недеље. Резултати су приказани на Сликама 34 и 35.

Није било значајних промена вредности TEWL у односу на базалну вредност након 2 ни након 4 недеље апликације узорка M2026L2, што се уочава и за узорак M82L2 (Слике 34б и 35б). То указује на чињеницу да дуготрајни третман ниједним од испитиваних узорака са 10% ЛК није довео до оштећења баријерне функције коже, и у складу је са налазима *in vivo* испитивања безбедности узорка M82L2 (Слика 33а), али одступа од налаза исте студије добијених за узорак M2026L2 (Слика 33б). Може се закључити да је вероватно у поменутом случају оклузија *per se* допринела значајнијем утицају овог узорка на оштећење баријерне функције коже (које се огледало у статистички значајном порасту вредности TEWL за узорак M2026L2 у односу на базалну вредност, али и промени вредности TEWL у односу на обе контроле, Слика 33б).

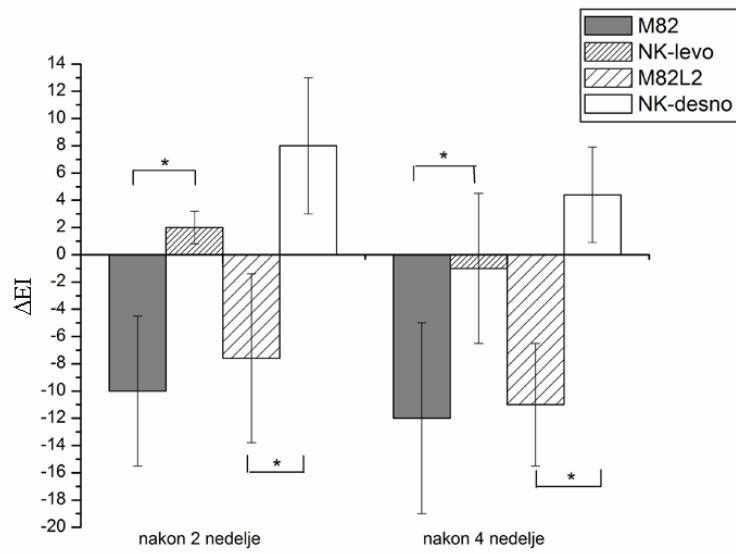


a)

Слика 34. (легенда на следећој страни)

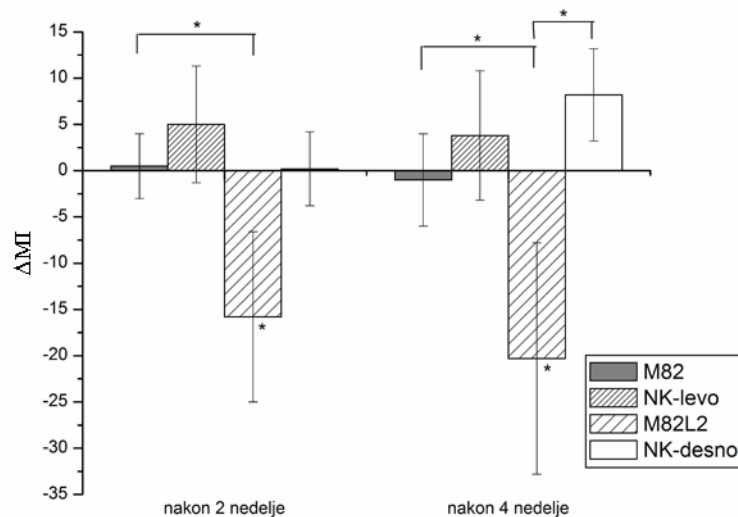


б)



в)

Слика 34. (легенда на следећој страни)



г)

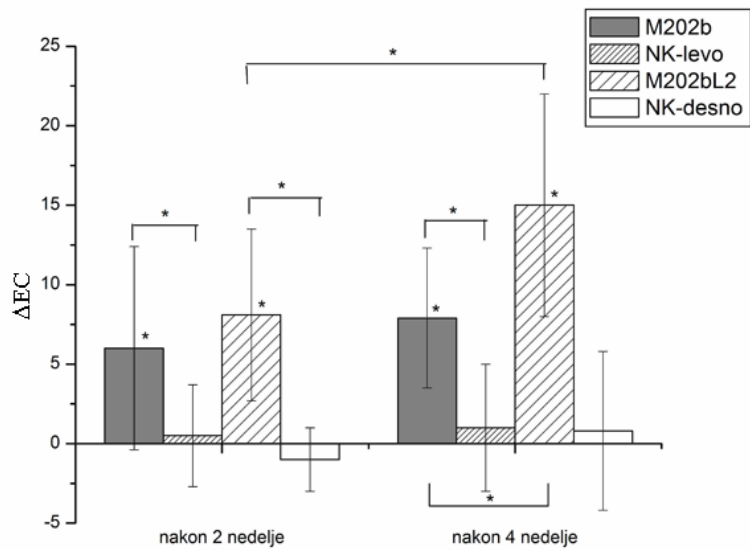
Слика 34. Ефекти примене узорака М82 и М82L2 на вредности параметара а) ЕС; б) TEWL; в) EI; г) MI након 2 и након 4 недеље апликације, у односу на њихове базалне вредности (апсолутне промене). Ефекти узорака, међусобно, као и у односу на одговарајуће контроле (НК-лево и НК-десно) анализирани су једнофакторском АНОВОМ, након чега је рађен Tukey's *t*-test, где је то било потребно. Разлике за исти третман, али у различитим временским тачкама проверени су Студент *t*-тестом за упарене узорке. Статистички значајне разлике означаване су са * $p < 0.05$.

Примена сваког од испитиваних узорака такође је довела до значајног пораста влажности коже (параметра ЕС) у односу на обе одговарајуће контроле као и у односу на одговарајућу базалну вредност (Слике 34а и 35а). Међутим, резултати нису указали на постојање статистички значајне разлике у промени вредности овог параметра између узорака у оквиру исте серије (M82 vs. M82L2; M2026 vs. M2026L2) након 2 недеље студије. Тек након 4 недеље долази до значајно већег пораста вредности хидратисаности коже третиране узорком M82L2 у односу на M82, као и узорком M2026L2 у односу на M202. Између ефеката третмана одговарајућим узорцима различитих серија (M82 vs. M2026 и M2026L2 vs. M82L2) нису уочене значајне разлике. Треба нагласити да је код оба активна узорка са 6% ЛК изостао очекивани синергизам влажећих дејстава ЛК и емулзије са АПГ, те је плацебо узорак поседовао чак бољу способност хидратације (Слике 23а и 23б) иако се очекивало да би узорак M82L1 због присуства фазе ламеларних течних кристала насупрот плацебу M82 морао испољити бољи *in vivo* ефекат хидратације. Изостанак овог очекиваног ефекта приписан је смањеној биолошкој расположивости јако хигроскопних супстанци, као што је ЛК, након

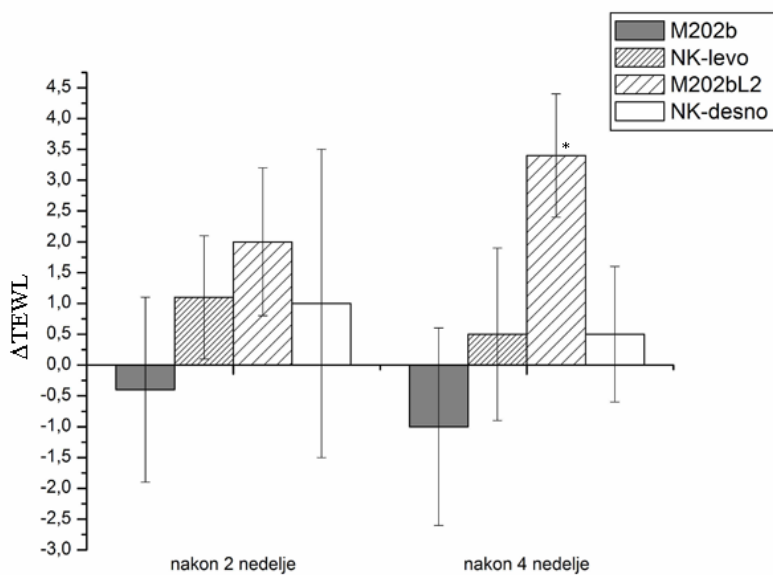
инкорпорације у носаче са АПГ. То доводи до појаве одређене врсте конкуренције за воду између коже и носача. Међутим, са порастом концентрације ЛК уочени ефекат се мења, те узорци M2026L2 и M82L2 поседују потенцијал хидратације коже који је значајно већи од истог потенцијала одговарајућих плацеба. Као што је раније речено у овом раду, код узорака са 6% ЛК већа количина воде јаче је везана за носач, те се знатно теже ослобађа у односу на тзв. "слободну" воду и недоступна је за ефикасну и очекивану хидратацију третиране коже. Код узорака са 10% ЛК, услед извесно другачије колоидне структуре (на шта би могли указати резултати испитивања физичке стабилности) већа количина воде доступна је за ефикасну хидратацију коже.

Дошло је до смањења вредности параметра EI након 4 недеље третмана сваки од плацеба (Слике 34в и 35в) као и при третману узорцима са 10% ЛК. Ови налази указали су на незнатну промену боје коже што вероватно потиче од самог носача. Благо пад, тачније изостанак пораста вредности параметра EI након третмана активним узорцима (Слике 34в и 35в) вероватно је у вези са одсуством иритације коже, тј. повољним безбедносним профилем узорка M82L2.

Промена, тј. пад измерених вредности параметра MI након третмана активним узорцима (Слике 34г и 35г) јасно указују на промену боје третиране коже (односно избељивање коже) већ након 2 недеље примене узорка M82L2 односно M2026L2. То указује на јако повољан козметички ефекат емулзија са 10% ЛК, у смислу бељења/посветљивања коже што је евидентирано и при дуготрајном третману узорком M82L1 који је садржао 6% ЛК. Непостојање статистичких значајности у утицају на овај параметар одговарајућих узорака са различитим процентима ЛК (M82L1 vs. M82L2) указује да пораст концентрације ЛК изнад 6% вероватно не доприноси даље овом ефекту. Имајући у виду и резултате мерења параметара TEWL и EI за узорак M82L2 (као и резултате *in vivo* студије безбедности за исти узорак), може се закључити да до ексфолијације долази без појаве пратеће иритације и оштећења баријерне функције коже (што је типично за третман са ANAs старијих генерација, Yu и Van Scott, 2004). Тачније, као и код узорака са 6% ЛК, вероватно је уствари ексфолијација одговорна за ефекат бељења.

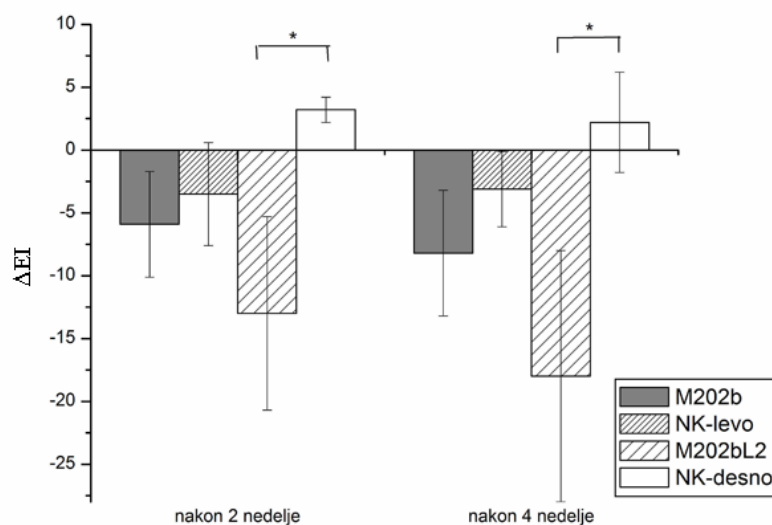


a)

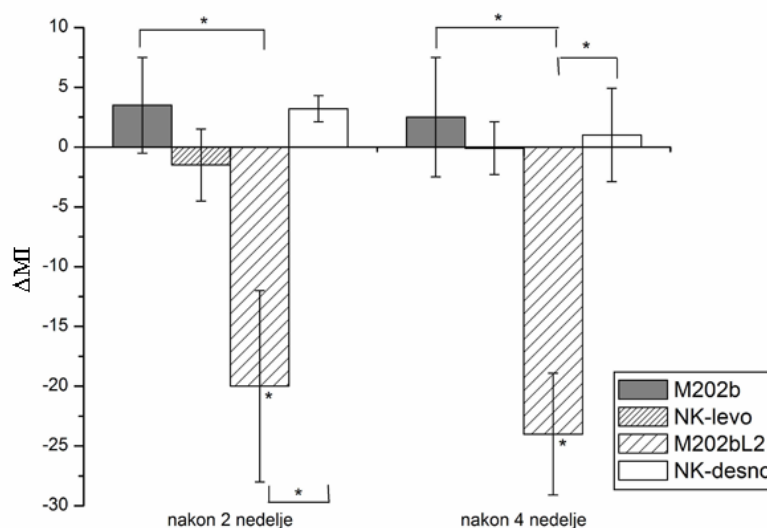


b)

Слика 35. (легенда на следећој страни)



б)



г)

Слика 35. Ефекти примене узорака M202б и M202бL2 на вредности параметара а) ЕС; б) TEWL; в) EI; г) MI након 2 и након 4 недеље апликације, у односу на њихове базалне вредности (апсолутне промене). Ефекти узорака међусобно као и у односу на одговарајуће контроле (НК-лево и НК-десно) анализирани су једнофакторском АНОВОМ, након чега је рађен Tukey's *t*-test, где је то било потребно. Разлике за исти третман, али у различитим временским тачкама проверени су Студент т-тестом за упарене узорке. Статистички значајне разлике означаване су са * $p < 0.05$.

5. ЗАКЉУЧЦИ

I фаза експерименталног рада

1. Сваки од испитиваних алкил полиглюкозидних нејонских мешаних емулгатора различите дужине алкил ланца (и последично различитих ХЛБ вредности), и то: Sepineo SETM68 (INCI/ Cetearyl Glucoside&Cetearyl alcohol), MontanovTM82 (INCI/ Coco glucoside & Cetearyl alcohol) и MontanovTM202 (INCI/ Arachidyl glucoside & arachidyl behenyl alcohol), појединачно у концентрацији од 7% имају способност стабилизације емулзија (емулзионих носача) комплексног састава масне фазе (сличних реалним формулацијама дермокозметичких производа). При том, различити емулгатори у истој концентрацији остварују различите лиотропне интеракције са водом и присутним компонентама унутар У/В емулзија различитих конзистенција.
2. Присуство коемулгатора/костабилизатора типа АПГ MontanovTM14 (INCI/ Myristyl alcohol & myristyl glucoside) има значајан утицај на микроструктуру, а тиме и реолошка својства и физичку стабилност емулзионих носача стабилисаних испитиваним АПГ мешаним емулгаторима.
3. Код свих емулзионих носача, осим оних стабилисаних само емулгатором најмање дужине ланца, тј. највише ХЛБ вредности (INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol) утврђено је присуство ламеларне кристалне гел фазе у континуалној фази емулзије као и слојева течно-кристалне фазе различите дебљине око капљица унутрашње фазе.
4. Емулгатор INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol, у примењеним концентрацијама, не ступа у јасно изражену лиотропну интеракцију са водом/комплексном мешавином масних емолијенаса. До овакве интеракције долази тек када се у емулзиони систем дода липофилни коемулгатор типа АПГ- INCI/Myristyl alcohol&Myristyl glucoside.
5. рН вредности свих емулзионих носача са испитиваним АПГ мешаним емулгаторима (са и без коемулгатора) биле су у складу са препорученим вредностима за дермокозметичке производе и дерматолошке лекове.

6. Кремови стабилисани мешаним АПГ емулгатором највеће дужине ланца и најниже ХЛБ (INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol) имају најгушћу конзистенцију (при истом саставу масне фазе и без обзира на употребљени коемулгатор) и показују појаву накнадног структурирања током чувања на собној температури, што је један од типичних недостатака емулзија стабилисаних ПАМ које у свом хидрофилном делу садрже полиоксиетиленске (ПОЕ) групе. Све наведено сматра се неповољним карактеристикама те се закључује да поменуте емулзије испољавају реолошке и апликативне особине које их чине мање прихватљивим за локалну употребу на кожи. У суштини, појава накнадног структурирања козметичких емулзија стабилисаних испитиваним емулгаторима током времена зависи од дужине АПГ ланца, и израженија је код емулзија стабилисаних емулгатором веће дужине ланца. То би могло да укаже на предности примене АПГ емулгатора нешто краће дужине ланца (C12/C14 и C16/C18) као примарних стабилизатора у изради козметичких емулзија – носача за различите КАС, примарно електролитног типа.
7. Парцијална физичкохемијска карактеризација (светлосна, поларизациона микроскопија и мерења електричне проводљивости узорака) била је довољна да покаже да додаток 6% ЛК (тј. њени неутрализациони продукти настали додатком ТЕА) у емулзије са различитим АПГ емулгатором (без обзира на присутни костабилизатор) доводи до промена у колоидној структури. Дубљим увидом потврђено је да ЛК, као јако кисела и хигроскопна супстанца ступа у интеракције са емулзионим носачима стабилисаним АПГ емулгаторима, утиче на њихову микроструктуру, а тип и интензитет интеракције зависе од дужине АПГ ланца емулгатора као и присуства АПГ коемулгатора.
8. АПГ мешани емулгатори веће дужине алкил ланца као што је INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol *per se* нису емулгатори избора при формулацији носача за изразито хигроскопну и киселу супстанцу као што је ЛК (у концентрацији 6%). Претпоставља се да је то вероватно последица липофилности емулгатора, те такве емулзије могу бити стабилни носачи за хидрофилне супстанце наведених карактеристика тек уз додаток и липофилног и хидрофилног костабилизатора.

9. Додатак 6% ЛК као КАС у емулзије стабилисане АПГ емулгатором и коемулгатором краћег алкил ланца, односно C12/C14 и C14 доводи до образовања фазе ламеларних течних кристала. Тачније, ЛК, као хидрофилна супстанца ступа у лиотропну интеракцију са мешаним емулгатором и коемулгатором и њено присуство повећава садржај фракције интерламеларно везане воде, односно воде везане за течнокристалне липидне ламеле. У случају емулзија стабилисаних АПГ нешто веће дужине ланца тј. C16/C18 (INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol) додатак 6% ЛК делимично нарушава формиране ламеларне структуре, условљавајући нагли пораст садржаја слободне (*bulk*) воде. Према томе, са аспекта физичкохемијске стабилности, при избору АПГ мешаног емулгатора, тј. коемулгатора за израду носача за АНАс и ЛК, предност треба да имају они са мањом дужином алкил ланца, у синергији са коемулгатором типа средњеланчаног АПГ.
10. На основу изнетих резултата, извесно је да се закључак ранијих научних студија да молекули већине АНАс делују као хидротропи, не може генерализовати. Тачније, раније је показано да молекули већине АНАс након инкорпорирања у емулзије стабилисане мешаним емулгаторима доводе до неповратног нарушавања ламеларних фаза (како гел фазе тако и течнокристалних), а самим тим и нарушавања укупне стабилности препарата. Резултати су показали да ЛК, која је представник групе АНАс није показала такав утицај на испитиване носаче. Тачније, није показано да њено инкорпорирање у носач стабилисан C12/14 АПГ мешаним емулгатором и АПГ коемулгатором доводи до нарушавања ламеларних течнокристалних нити гел кристалних структура. Напротив, уградња ЛК у поменути носач промовисала је настанак и једних и других ламеларних структура. Што се тиче носача са друга два испитивана емулгатора, извесно је да долази до парцијалног нарушавања ламеларних мезофаза додатком 6% ЛК, који није утицао на физичку стабилност
11. На основу резултата I фазе експерименталног рада, као најбољи носачи за 6% ЛК, јако киселе и хигроскопне КАС из новије генерације АНАс, у смислу најповољније структуре, физичкохемијске стабилности и најповољнијих реолошких и апликативних особина, изабране су

вишекомпонентне емулзије (комплексног састава масне фазе уз присуство уља различите поларности) стабилисанае емулгаторима мање дужине АПГ ланца тј. а) емулгатором INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol уз додатак хидрофилног костабиллизатора и б) емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol уз додатак коемулгатора АПГ типа. Тачније, за даља *in vivo* и *in vitro* истраживања безбедности и ефикасности одабрани су кремове са и без ЛК стабилисани поменути емулгаторима. При томе је нешто боље укупне особине и потенцијал да буде носач за ЛК испољила емулзија стабилисана емулгатором краће дужине алкил ланца АПГ (C12/14) уз додатак АПГ коемулгатора.

II фаза експерименталног рада

12. Узорци изабрани на основу резултата I фазе експерименталног рада показали су задовољавајући профил безбедности при апликацији на кожу, и то како у *in vivo* тако и у *in vitro* студији. Тако, испитивани носачи са АПГ емулгаторима INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol и INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol, сами АПГ тензиди INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol, INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol и INCI/Myristyl alcohol&Myristyl glucoside, као и ЛК као КАС у проценту 6% у поменути носачима (pH подешене на 3.8), могу се генерално сматрати безбедним за примену на кожи.
13. Емулзиони носачи са АПГ емулгаторима могу смањити потенцијал инкорпорираних јако хигроскопних супстанци као што је 6% ЛК да ефикасно хидрирају кожу. Тачније, јавља се одређена врста конкуренције за воду између коже и носача. Већа количина воде је јако везана за носач, знатно се теже ослобађа у односу на тзв. "слободну" воду што је чини недоступном за ефикасну и очекивану хидратацију третиране коже. Закључује се да емулзије стабилисанае ламеларним течним кристалима вероватно нису погодни носачи за инкорпорацију јако хигроскопних КАС, с обзиром да у том случају ове КАС не могу испољити свој пун потенцијал за ефикасно влажење коже.
14. ЛК у концентracији 6% у емулзионим носачима са АПГ након примене на кожу вероватно доводи до убрзане ексфолијације, што резултује значајним посветљивањем тј. бељењем коже. Убрзана ексфолијација јавља се без

појаве пратеће иритације и оштећења баријерне функције коже (што је типично за третман са АНАs старијих генерација), и говори у прилог употреби ЛК као алтернативног активног састојка у дермокозметичким производима са нпр. гликолном или млечном киселином. Оставља се простор за детаљнија испитивања овог ефекта који је на граници између козметичког и терапијског, и који је тренутно у фокусу разних испитивања у козметологији.

15. Емулзиони носач са емулгатором INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol као и одговарајући узорак са ЛК показали су у I фази испитивања нешто боље физичке особине, док је у II фази евидентирана нешто повољнија козметичка ефикасност на кожи у односу на другу испитивану серију узорака. Што се тиче стабилности и ефикасности, то би се евентуално могло довести у везу са већом хидрофилношћу емулгатора MontanovTM82, тј. овај емулгатор би евентуално могао да представља бољи ексципијенс за израду носача намењеног инкорпорацији ЛК, вероватно због чињенице да је сама активна супстанца јако хидрофилна. Из тог разлога узорак стабилисан C12/14 АПГ изабран је за даља испитивања
16. У литератури се нису могли наћи поуздани подаци који се односе на квантитативно одређену "примарну" антиоксидантну активност ЛК. У овој студији, одређено је да је вредност IC₅₀ за ЛК износила 52,63 ± 1,73 mg/ml. Такође је показано да ЛК *per se*, из водених раствора, у концентрацијама које су погодне за њену примену као КАС, показује скромну, али задовољавајућу антиоксидантну активност.
17. Антиоксидантни капацитет 6% ЛК (тј. капацитет да неутралише слободне радикале или да инхибира липидну пероксидацију) остао је готово непромењен и после инкорпорирања ове КАС у одабрани емулзиони носач са АПГ и подешавања рН вредности емулзије, односно парцијалне неутрализације лактобионске киселине. Насупрот томе, код α-токоферола, неупоредиво јачег антиоксиданса, дошло је до вишеструког смањења инхерентне антиоксидантне активности након уградње у исте носаче, вероватно неког вида интеракције са молекулима C12/14 АПГ, односно са структурама које стабилишу емулзије са INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol и у којима вероватно α-токоферол остаје "заробљен" на такав начин да не испољава своје пуно антиоксидантно дејство.

18. Емулзије са АПГ и ЛК, мултифункционалним антиоксидансом из групе АНАs, могле би се истовремене користити у превенцији и у третману не само фотоостареле коже, већ и коже захваћене неки патолошким стањима изазваним оксидативним стресом. У прилог томе, осим доказане ефикасности примене на кожи у смислу антиоксидантног потенцијала и способности да ефикасно хидратишу кожу говори и одличан профил безбедности поменутих дермокозметичких производа, што је код поменутих стања од великог значаја.
19. ЛК и ГК у истој концентрацији (6%), без обзира на тип носача, показале су сличну ефикасност, барем што се тиче ефеката који се могу квантификовати биофизичким параметрима коже мереним у студији ефикасности (TEWL, ЕС, ЕI и рН) након дуготрајне примене производа са сваком од испитиваних АНАs. Што се тиче безбедности примене ових АНАs на кожу, ЛК је показала много повољнији безбедносни профил у односу на ГК из оба типа носача. Сам безбедносни профил ГК био је бољи у случају инкорпорације ове КАС у емулзиони, него у гел носач.
20. Осим што су благи за кожу, показано је да емулзије са испитиваним АПГ емулгаторима вероватно поседују потенцијал да смањују иритацију коју би одређене КАС могле да испоље на кожи због своје киселости тј. утицаја на рН коже. Ово је присутно чак и уколико се ради о типичним представницима старијих генерација АНАs као што је гликолна киселина, позната по својој способности да иритира кожу чак и у јако ниским концентрацијама, и из стандардних емулзионих носача. Тачније, емулзије са испитиваним АПГ емулгаторима вероватно имају способност да утичу на неповољан безбедносни профил одређених (пре свега јако киселих) КАС, чинећи га прихватљивијим без значајног утицаја на ефикасност коју иста активна супстанца испољава на кожи. Из тог разлога, а имајући у виду и резултате испитивања физичке стабилности, АПГ емулгатори могли би се третирати као високо препоручљиви стабилизатори емулзионих носача намењених за инкорирање киселих супстанци, као и за емулзије које се користе у третману оштећене и упаљене коже (нарочито уколико је такву кожу потребно третирати дермокозметичким производима као што су они са АНАs).

III фаза експерименталног рада

21. Емулзије са емулгатором INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol не могу да буду носачи за високе концентрације јако киселих и хигроскопних КАС из групе АНАs (као што је 10% ЛК), и то услед нарушавања микроструктуре поменутих емулзија од стране инкорпориране КАС, али вероватно и услед парцијалне хидролизе самог АПГ емулгатора изазване већом концентрацијом киселине.
22. Тврдње произвођача да су сви АПГ мешани емулгатори стабилни на киселим/ниским рН вредностима и у присуству електролита, није у потпуности тачна. Резултати испитивања физичке стабилности показују да додаток већих концентрација ЛК несумњиво утиче на структуру емулзија стабилисаних АПГ емулгатором INCI/Cetearyl glucoside&Cetearyl alcohol. Тачније, 10% ЛК не доводи само до дехидратације ламела којима је стабилисана микроструктура ове емулзије већ, због јачине киселине, вероватно долази и до хидролизе АПГ дела мешаног емулгатора, те изостанак ламеларних структура на поларизационим микрографијама емулзионих узорака потиче највероватније и од немогућности њиховог формирања услед распадања АПГ компоненте мешаног емулгатора. ЛК (10%) највероватније доводи и до хидролизе емулгатора INCI/Coco glucoside&Cetearyl alcohol и INCI/Arachidyl glucoside&arachidyl behenyl alcohol, али неупоредиво у мањој мери, што наводи на закључак да стабилност АПГ мешаног емулгатора у присуству јаких електролита и киселих КАС не зависи директно од дужине ланца АПГ компоненте.
23. У случају емулзије са емулгатором дужег алкил ланца (C20/22 АПГ) стабилизованог додатком коемулгатора INCI/Myristyl alcohol&Myristyl glucoside и ксантан гуме као костабилизатора, код кога је претходно уочено да се карактерише неповољним накнадним структурирањем током чувања, погодност да буде носач за јако киселе и јако хигроскопне КАС, као што је ЛК, расте са повећањем њихове концентрације. То је последица бољих апликативних особина крема тј. изостанка очвршћавања ових крема током времена што је, парадоксално, изазвано парцијалним нарушавањем структуре емулзије од стране веће концентрације инкорпориране ЛК.

24. Могуће је да би већа концентрација од 10% ЛК довела до интеракције већег обима и нарушавања физичке стабилности емулзија са било којим од испитиваних емулгатора, али те интеракције нису од значаја за област истраживања ове докторске дисертације с обзиром да је 10% највећа препоручена концентрација АНАs у козметичким производима.
25. Узимајући у обзир све релевантне аспекте, емулзиони носачи са С12/14 АПГ мешаним емулгатором у комбинацији са липофилним АПГ коемулгатором, као и емулзиони носачи са С16/18 АПГ мешаним емулгатором уз додатак хидрофилног костабилизатора могу бити декларисани као погодни козметичке/дермокозметички носачи за ниже концентрације јако киселих и хигроскопних КАС из групе АНАs – специјално за 6% ЛК. Емулзиони носачи са С12/14 АПГ мешаним емулгатором у комбинацији са АПГ коемулгатором, као и емулзиони носачи са С20/22 АПГ мешаним емулгатором уз хидрофилни костабилизатор, могу се сматрати погодним за више концентрације (10%) супстанци наведених карактеристика (специјално за 10% ЛК) које уобичајено представљају проблем при формулацији емулзија. Сами емулзиони носачи са поменутиим емулгаторима као и узорци са 6% односно 10% ЛК, показали су задовољавајући профил безбедности и ефикасности примене на кожи, употребом како *in vivo* тако и *in vitro* метода процене. На основу тога може се тврдити да у овим испитивањима ни различити мешани АПГ емулгатори, ни сама ЛК (у концентрацији до 10%), нису показали нежељене реакције, типичне за употребу њихових старијих представника, као што су иритација коже и оштећење баријерне функције; ЛК је показала задовољавајућу ефикасност, компарабилну са ефикасношћу представника старијих генерација АНАs (посебно гликолне киселине – најпознатије, најкоришћеније и најефикасније КАС из групе АНАs). Из тог разлога, ЛК у емулзионим носачима на бази АПГ може бити декларисана као безбедан и ефикасан дермокозметички производ. ЛК и испитивани АПГ емулгатори и коемулгатор могу се користити као напреднији, алтернативни састојци дермокозметичких производа нове генерације који не показују недостатке типичне за примену њихових традиционалних аналога.

6. ЛИТЕРАТУРА

Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, Van Benthem J, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, Boobis A, Brandon E, Bremer S, Broschard T, Casati S, Coecke S, Corvi R, Cronin M, Daston G, Dekant W, Felter S, Grignard E, Gundert-Remy U, Heinonen T, Kimber I, Kleinjans J, Komulainen H, Kreiling R, Kreysa J, Leite SB, Loizou S, Maxwell G, Mazzatorta P, Munn S, Pfuhler S, Phrakonkham P, Piersma A, Poth A, Prieto P, Repetto G, Rogiers V, Schoeters G, Schwarz M, Serafimova R, Tähti H, Testai E, Van Delft J, Van Loveren H, Vinken M, Worth A, Zaldivar JM. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects – 2010. *Arch Toxicol* 2011; 85:367–485.

Aeby P, Ashikaga T, Bessou-Touya S, Schepky A, Gerberick F, Kern P, Marrec-Fairley M, Maxwell G, Ovigne J-M, Sakaguchi H, Reisinger K, Tailhardat M, Martinozzi-Teissier S, Winkler P. Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program. *Toxicol In Vitro* 2010; 24(6): 1465-1473.

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

Al-Bawab A, Friberg SE. Some pertinent factors in skin care emulsion. *Adv Colloid Interface Sci* 2006; 313: 123-126.

Alépée N, Tornier C, Robert C, Amsellem C, Roux MH, Doucet O, Pachot J, Méloni M, de Brugerolle de Fraissinette A. A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic™ RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test. *Toxicol In Vitro* 2010; 24 (1): 257-266.

Altomare G, Capella GL, Frigerio E, Fracchiolla C. Recurrent oedematous irritant contact dermatitis of the eyelids from indirect application of glycolic acid. *Contact Dermatitis* 1997; 36: 265-279.

Amer M, Maged M. Cosmeceuticals versus pharmaceuticals. *Clin Dermatol* 2009; 27(5): 428-430.

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

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

Barel AO, Clarys P, Gabard B. In vivo evaluation of the hydration state of the skin: Measurements and methods for claim support. Y: Elsner P, Merk HF, Maibach HI (Eds.), *Cosmetics-controlled efficacy studies and regulation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999, pp. 57-81.

Barry MD, Rowe RC. The characterization by small-angle X-ray scattering of a pharmaceutical gel with a lamellar structure. *Int J Pharm.* 1989; 53: 138-143.

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

Berardesca E, Distanto F, Vignoli GP, Oresajo C, Green B. Alpha hydroxyacids modulate stratum corneum barrier function. *Br J Dermatol* 1997; 137: 934-938.

Bernstein EF, Brown DB, Schwartz MD, Kaidbey K, Ksenzenko SM. The polyhydroxy acid gluconolactone protects against ultraviolet radiation in an *in vitro* model of cutaneous photoaging. *Dermatol Surg* 2004; 30: 189-196.

Bessou-Touya S, Alépée N, De Smedt A, De Wever B, Jones P, McNamee P, Marrec-Fairley M, Pfannenbecker U, Tailhardat M, Van Goethem F. COLIPA Eye Irritation Task Force strategy and programme for development of *in vitro* methods: continued developments and status. 8th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Brussels, Belgium, 2011, I-8-394. Доступно са: <<http://www.cosmeticseurope.eu/safety-and-science-cosmeticseurope/alternative-methods/8thworldcongressonalternativeswc8montreal2125august2011.html#COLIPA%20Eye%20Irritation%20Task%20Force%20strategy>>; (приступљено 9.4.2012.).

Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000; 49: 3-8.

Bowstra JA, Dubbelaar FE, Gooris GS, Ponc M. The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm Venereol Suppl* 2000; 208: 23-30.

Briden ME. Alpha-hydroxyacid chemical peeling agents: case studies and rationale for safe and effective use. *Cutis* 2004; 73 (suppl 2): 18-24.

Briden ME, Green B. The next generation hydroxy acids. *V: Draelos ZD (Ed.), Cosmeceuticals*, New York, Elsevier Saunders, 2005, pp. 205-211.

Choi CM, Berson DS. Cosmeceuticals. *Semin Cutan Med Surg* 2006; 25: 163-168.

Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel AO. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter[®], the DermaSpectrometer[®] and the Mexameter[®]. *Skin Res Technol* 2000; 6: 230-238.

Clarys P, Clijsen R, Barel AO. Influence of probe application pressure on *in vitro* and *in vivo* capacitance (Corneometer CM 825[®]) and conductance (Skicon 200EX[®]) measurements. *Skin Res Technol* 2011a; 4: 445-450.

Clarys P, Clijsen 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 Technol* 2011b; 4: 445-450.

Commission of the European communities. Timetables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council

Directive 76/768/EEC), SEC 1210, Brussels 2004. Доступно са: <
http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/sec_2004_1210_en.pdf
>; (приступљено 6.3.2012.)

Cosmeticsdesign Europe, Bird K. Cosmeceutical industry disregard safety according to cancer charity. (Доступно са <http://www.cosmeticsdesign.com/Formulation-Science/Cosmeceutical-industry-disregards-safety-according-to-cancer-charity>; последњи приступ 6.1.2012.).

Courage&Khazaka, Немачка, Каталог- Scientific measurements of skin and hair. 2010, (Доступно са http://www.courage-khazaka.de/download/pdf/scientific_low.pdf; приступљено 4.1.2012.).

Csizmazia E, Budai-Szűcs M, Erős I, Makai Z, Szabó-Révész P, Varju G, Csányi E. Thermoanalytical method for predicting the hydration effect permanency of dermal semisolid preparations. *J Therm Anal Calorim* 2010; 102: 313-316.

Curdy C, Naik A, Kalia YN, Alberti I, Guy RH. Non-invasive assessment of the effects of formulation excipients on stratum corneum barrier function in vivo. *Int J Pharm* 2004; 271: 251-256.

Di Mambro V, Azzolini A, Valim Y, Fonseca M. Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. *Int J Pharm* 2003; 262: 93-99.

Di Mambro V, Fonseca M. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *J Pharm Biomed Anal* 37; 2005: 287-295.

Ditre CM. Exfoliants: AHAs and BHAs. У: Draelos ZD (Ed.), *Cosmeceuticals*, New York, Elsevier Saunders, 2005, pp. 111-118.

Ditre CM, Griffin TD, Murphy GF, Sueki H, Telegan B, Johnson WC, Yu RJ, Van Scott EJ. Effects of alpha- hydroxy acids on photoaged skin: a pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 187-195.

Draelos ZD. The cosmeceutical realm. *Clin Dermatol* 2008; 26: 627-632.

Draelos ZD. Cosmeceuticals: undefined, unclassified, and unregulated. *Clin Dermatol* 2009; 27: 431-434.

Draelos ZD, Green BA, Edison BL. An evaluation of a polyhydroxy acid skin care regimen in combination with azelaic acid 15% gel in rosacea patients. *J Cosmet Dermatol* 2006; 5: 23-29.

Eccleston GM. Formulating cosmetic emulsions. *Cosmet Toiletries* 1997; 112: 65-71.

Eccleston GM. The importance of mesomorphic (lamellar) phases in emulsion stability. *J Cosmet Sci* 2001; 52: 142-143.

Eccleston GM. The microstructure and properties of fluid and semisolid lotions and creams. *IFSCC Magazine* 2010; 3/4: 167-174.

Eccleston GM, Beattie L. Microstructural changes during the storage of systems containing cetostearyl alcohol: polyoxyethylene alkyl ether surfactants. *Drug Dev Ind Pharm* 1988; 14: 2499–2518.

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

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

Ehlers C, Ivens UI, Müller ML, Senderowitz T, Serup J. Females have lower skin surface pH than men. *Skin Res Technol* 2001; 7: 90-94.

Elias M. Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. *J Control Release* 1991; 15: 199-208.

Elias M. The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol* 2007; 29: 3-14.

Epstein H. Cosmeceutical vehicles. *Clin Dermatol* 2009; 27: 453-460.

Fairhurst CE, Fuller S, Gray J, Holmes MC. Lyotropic surfactant liquid crystals. *V: Demus, D., Goodby, J., Gray, G.W., Spiess, H.W., Vill. V. (Eds.), Handbook of Liquid Crystals, vol. 3. Weinheim: Wiley-VCH, 1998. pp. 341–392.*

Fang JY, Leu Y, Fang CL, Chiu HC. In vitro and in vivo evaluations of the efficacy and safety of skin permeation enhancers using flurbiprofen as a model drug. *Int J Pharm.* 2003; 255: 153–166.

Fendler EJ. Physico-chemical consideration. *V: Loden M, Maibach HI (Eds.), Dry Skin and Moisturizers, 1st ed., Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 175-182.*

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

Fluhr JW, Lazzarini S, Distante F, Gloor M, Berardesca E. Effects of prolonged occlusion on stratum corneum barrier function and water holding capacity. *Skin Pharmacol Physiol* 1999; 12: 193-198.

Fluhr JW, Kuss O, Diepgen T, Lazzarini 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. *Br J Dermatol* 2001; 145: 696-703.

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

Food, Drug and Cosmetics Act, FDA, 21 U.S. Code 301, 1938.

Forslind B, Engström S, Engblom J, Norlén L. A novel approach to the understanding of human skin barrier function. *J Dermatol Sci* 1997; 14: 115-125.

FDA (Food and Drug Administration), U.S. Department of Health and Human Services, CFSAN: guidance: labeling for cosmetics containing alpha hydroxy acids, January 2005. (Доступно са: <http://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ucm090816.htm>; приступљено 8.04.2012).

Gao X, Zhang L, Wei H, Chen H. Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals. *Clin Dermatol* 2008; 26: 367-374.

Gendler EC. Cosmeceuticals and the practice of dermatology. У: Draelos ZD. (Ed.), *Cosmeceuticals*, New York, Elsevier Saunders, 2005, 205-211.

Giacomoni PU, Mammone T, Teri M. Gender-linked differences in human skin. *J Dermatol Sci* 2009; 55(3):144-149.

Green B. Lactobionic acid. *Skin Inc. Magazine* 2000; 12: 62-63.

Green B. After 30 years...the future of hydroxyacids. *J Cosmet Dermatol* 2005; 4: 44-45.

Green B, Edison BL, Wildnauer RH, Sigler ML. Lactobionic acid and gluconolactone: PHAs for photoaged skin. *Cosmet Derm* 2001; 26: 24-28.

Green B, Yu RJ, Van Scott EJ. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. *Clin Dermatol* 2009; 27: 495-501.

Gregoris E, Fabris S, Bertelle M, Grassato L, Stevanato R. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *Int J Pharm* 2011; 405: 97-101.

Hachem J, Crumrine D, Fluhr J, Brown BE, Feingold KR, Elias P. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity/cohesion. *J Invest Dermatol* 2003; 121(2): 345-353.

Hadgraft J, Lane ME. Transepidermal water loss and skin site: A hypothesis. *Int J Pharm* 2009; 373: 1-3.

Heinrich U, Koop U, Leneveu-Duchemin MC, Osterrieder S, Bielfeldt S, Chkarnat C, Degwert J, Hantschel D, Jaspers S, Nissen HP, Rohr M, Schneider G, Tronnier H. Multicentre comparison of skin hydration in terms of physical-, physiological- and product-dependent parameters by the capacitance method (Corneometer CM 825). *Int J Cosmet Sci* 2003; 25: 45-51.

Hiltrop K. Lyotropic liquid crystals. Y: Stegemeyer H. (Ed.), Liquid crystals. Steinkopff Darmstadt Springer New York, 1993, 143-170.

Hoffmann C, Mueller-Goymann CC. Use of artificial skin constructs in permeation studies of clindamycin phosphate. *Pharmazie* 2005; 60: 350-353.

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

Hunt MJ, Barnetson R. A comparative study of gluconolactone versus benzoyl peroxide in the treatment of acne. *Australas J Dermatol* 1992; 33: 131-134.

Iwai I, Han HM, den Hollander L, Svensson S, Öfverstedt LG, Anwar J, Brewer J, Bloksgaard M, Laloëuf A, Nosek D, Masich S, Bagatolli L, Skoglund U, Norlén L. The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 2215-2225.

Jacobi U, Gautier J, Sterry W, Lademann J. Gender-related differences in the physiology of the Stratum Corneum. *Dermatology* 2005; 211: 312-317.

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

Junginger HE. Multiphase emulsions. Y: Riegr MM, Rhein LD (Eds.), Surfactants in cosmetics, Marcel Dekker, New York, 1997, 155-182.

Kandárová H, Liebsch M, Spielmann H, Genshow E, Schmidt E, Traue D, Guest R, Whittingham A, Warren N, Gamer AO, Remmele M, Kaufmann T, Wittmer E, De Wever B, Rosdy M. Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemical according to new OECD TG431. *Toxicol In Vitro*. 2006; 20: 547–559.

Kato S, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N. Highly hydroxylated or α -cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: The antioxidant ability assessed by electron spin resonance method and β -carotene bleaching assay. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 5293–5296.

Kaur IP, Kapila M, Agrawal R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. *Ageing Res Rev* 2007; 6: 271–288.

Klein K. Cosmeceutical formulation consideration. Y: Draelos ZD (Ed.), Cosmeceuticals, New York, Elsevier Saunders, 2005, 19-22.

Kligman A. The future of cosmeceuticals. *Dermatol Surg* 2005; 31: 890-891.

Koleva I, Van Beek TA, Linssen JP, De Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal* 2002; 13: 8–17.

- Korhonen M, Hellen L, Hirvonen J, Yliruusi J. Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements. *Int J Pharm.* 2005; 197: 143–151.
- Krutmann J, Yarosh D. Modern photoprotection of human skin. Y: Krutmann J, Gilchrest BA (Eds.), *Skin Aging.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006, pp. 104-112.
- Kurtzweil P. Alpha hydroxy acids for skin care: smooth sailing or rough seas? *FDA Consumer* 1998; 32: 30-35.
- Kuss O, Diepgen TL. Proper statistical analysis of transepidermal water loss (TEWL) measurements in bioengineering studies. *Contact Dermatitis* 1998; 39: 64-67.
- Лалевих-Васић Б, Меденица Љ, Николић М. Дерматовенерологија са пропедевтиком, Савремена администрација, Београд, 2003.
- Lavker RM, Kaidby K, Leyden J. Effects of topical ammonium lactate on cutaneous atrophy from a potent topical corticosteroid. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 535-544.
- Lehmann L, Keipert S, Gloor M. Effects of microemulsion on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 52: 129-136.
- Loden M. Biophysical methods of providing objective documentation of the effects of moisturizing creams. *Skin Res Technol* 1995;1:101-108.
- Loden M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *Am J Clin Dermatol* 2003; 4 (11): 771–778.
- Lukić M, Pantelić I, Daniels R, Müller-Goyman CC, Savic M, Savic S. Moisturizing emulsion systems based on the novel long-chain alkyl polyglucoside emulsifier. *J Therm Anal Calorim* (у штампи), DOI 10.1007/s10973-012-2263-0.
- Macedo FS, Kaminsky SK, Bagatin E, Hassun KM, Talarico S. Melasma: A comparative study of the combination of glycolic acid and hydroquinone in association with glycolic acid peelings. *Med Cutan Ibero Lat Am* 2006; 34: 11-16.
- Makai M, Csanyi E, Nemeth Z, Palinkas J, Erös I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *Int J Pharm* 2003; 256: 95-107.
- Marquele F, Di Mambro V, Georgetti S, Casagrande R, Valim Y, Fonseca M. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 39: 455–462.
- Marrakchi S, Maibach HI. Biophysical parameters of skin: map of human face, regional, and age-related differences. *Contact Dermatitis* 2007; 57: 28-34.
- Masmoudi H, Le Dréau Y, Piccerelle P, Kister J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int J Pharm* 2005; 289: 117–131.

McGrath JA, Eady RAJ, Pope FM. Anatomy and organization of human skin. Y: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C (Eds.), Rook's textbook of dermatology, Seventh Edition, Blackwell Publishing, Inc., Malden, Massachusetts, USA, 2008, pp. 45-128.

McIntosh TJ. Organization of skin stratum corneum extracellular lamellae: diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol. *Biophys J* 2003; 85: 1675–1681.

McNamee P, Hibatallah J, Costabel-Farkas M, Goebel C, Araki D, Dufour E, Hewitt N, Jones P, Kirst A, Le Varlet B, Macfarlane M, Marrec-Fairley M, Rowland J, Schellauf F, Scheel J. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Eye irritation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009; 54: 197-209.

Merck Index. 14th ed. Merck: Whitehouse Station, NJ, 2007; 956, 5356.

Morganti P, Paglialunga S. EU borderline cosmetic products review of current regulatory status. *Clin Dermatol* 2008; 26: 392-397.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55–63.

Müller-Goyman CC. Drug delivery-Liquid crystals. Y: The encyclopedia of pharmaceutical technology Vol 1. Marcel Dekker New York, 2002, 141-167.

Müller-Goyman CC. Physicochemical characteriyation of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 343-356.

Nesseem D. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 26: 387-399.

Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res* 2010; 302(2): 71-83.

Nielloud F., Marti-Mestnes G. Pharmaceutical emulsions and suspensions. Marcel Dekker New York, Basel, 2000.

Nordkvist M, Nielsen PM, Villadsen J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. *Biotechnol Bioeng* 2007; 97: 694–707.

Norlén L. Skin barrier structure and function: The single gel-phase model. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 830-836.

Norlén L. Molecular skin barrier models and some central problems for the understanding of skin barrier structure and function. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003; 16: 203-211.

OECD, 2008. OECD Guideline for the testing of chemicals, draft proposal for a new guideline: *In vitro* skin irritation: human skin model test. Доступно са: <http://www.oecd.org/searchResult/0,3400,en-2649-201185-1-1-1-1-1,00.html>; (приступљено 15.11.2011).

Ohman H, Vahlquist A. In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm Venereol* 1994; 74: 375–379.

Pena LE, Lee BL, Stearns JF. Structural rheology of model ointment. *Pharm Res* 1994; 11: 875–881.

Pierard GE. Guidelines in skin bioengineering: are they useful, are they used? *Skin Res Technol* 2003; 9: 159-164.

Pinagoda 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 Dermatitis* 1990; 22: 164–178.

Plasencia I, Norlén L, Bagatolli LA. Direct visualization of lipid domains in human skin stratum corneum's lipid membranes: effect of pH and temperature. *Biophys J* 2007; 93: 3142-3155.

Ponec M. Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54(Suppl. 1): S19–S30.

Rawlings AV. Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. *Int J Cosmet Sci* 2003;25:63-95.

Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast) (Text with EEA relevance), OJEU, L 342/59, 2009.

Rieger MM. Stability testing of macroemulsions. *Cosmet Toiletries* 1991; 106(5): 59-67.

Rieger MM. Cosmetics and their relation to drugs. *The encyclopedia of pharmaceutical technology Vol 1*. Marcel Dekker New York, 2002, pp. 649-657.

Roberts MS, Cross SE, Pellet MA. Skin transport. Y:Walters KA, Hadgraft J (Eds.), *Dermatological and transdermal formulations*. New York, Marcel Dekker, 2002, pp. 89-195.

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

Rogiers V. Intensive course in dermatocosmetic sciences, Proceedings book 1 of 2, Session 1: Introduction and key issues in safety assessment of cosmetics. Vrije Universiteit Brussel, 13-17. September 2004.

Saija A, Tomaino A, Trombetta D, De Pasquale A, Uccella N, Barbuzzi T, Paolino D, Bonina F. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int J Pharm* 2000; 199: 39–47.

Савић С. Физичкохемијски аспекти и *in vitro/in vivo* карактеризација емулзионих система на нејонским емулгатором типа шећерног етра. Докторска дисертација, Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду, 2004.

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: 269-280.

Savic S, Tamburic S, Jancic B, Milic J, Vuleta, G. The impact of urea on the colloidal structure of alkylpolyglucoside-based emulsions: physicochemical and *in vitro/in vivo* characterization. У: Tadros TF. (Ed.), *Colloids in Cosmetics and Personal Care*, Volume 4. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2008, pp. 139-160.

Savic S, Weber C, Savic M, Muller-Goymann CC. Natural surfactant-based topical vehicles for two model drugs: Influence of different lipophilic excipients on *in vitro/in vivo* skin performance. *Int J Pharm* 2009a; 381: 220-230.

Savic S, Weber C, Tamburic S, Savic M, Muller-Goymann CC. Topical vehicles based on natural surfactant/fatty alcohols mixed emulsifier: the influence of two polyols on the colloidal structure and *in vitro/in vivo* skin performance. *J Pharm Sci.* 2009b; 98(6): 2073-2090.

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 emulsions skin hydration potential. *J Colloid Interface Sci.* 2011; 358 (1): 182-191.

Schmid-Wendtner MH, Korting HC. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19: 296-302.

Seppic, Француска, Каталог – Serineo SETM68, 2001a.

Seppic, Француска, Каталог – MontanovTM82, 2001b.

Seppic, Француска, Каталог – MontanovTM202, 2001c.

Seppic, Француска, Каталог – MontanovTM14, 2001d.

Serup J. Bioengineering and the skin: Standardization. *Clin Dermatol* 1995; 13: 293-297.

Simon P, Veyrat S, Piquemal P, Montastier C, Gofin V, Pierard G. Surfactants and the skin. *Cosmet Toiletries* 1998; 113: 69-72.

Simons RDG. Investigations into Dyshydroforme Eruptions. S. Karger, Basel 1962.

Sinaiko R, Maibach HI. Bioengineering Correlates of the Sensitive Skin Syndrome: The Sensory Irritation Component. U: Chew A-L, Maibach HI. (Eds.), Irritant Dermatitis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006, pp. 223-229.

Smith WP. Hydroxy-acids and skin aging. *Cosmet Toiletries* 1994; 109: 41-47.

Smith WP. Epidermal and dermal effects of topical lactic acid. *J Am Acad Dermatol* 1996a; 35: 388-391.

Smith WP. Comparative effectiveness of α -hydroxy acids on skin properties. *Int J Cosmet Sci* 1996b; 18: 75-83.

Smith EW, Surber C, Tassopoulos T, Maibach H. Topical dermatological vehicles: a holistic approach. Y: Bronaugh RL, Maibach HI. (Eds.), Topical absorption of dermatological products. New York, Marcel Dekker, 2002, pp. 457-463.

Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annu Rev Med* 1995; 46: 235-47.

Spielmann H, Hoffmann S, Liebsch M, Botham P, Fentem J, Eskes C, Roguet R, Cotovió J, Cole T, Worth A, Heylings J, Jones P, Robles C, Kandárová H, Gamer A, Remmele M, Curren R, Raabe H, Cockshott A, Gerner I, Zuang V. The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test. *ATLA*, 2007; 35: 559–601.

Stubenrauch C. Sugar surfactants – aggregation, interfacial and adsorption phenomena. *Cur Opin Colloid Interface Sci* 2001; 6: 160-170.

Tesmann H, Kahre J, Hensen H, Salka BA. Alkyl polyglycosides in personal care products. Y: Hill K, von Rybinski W, Stoll G. (Eds.), Alkyl polyglycosides. Technology, properties and applications. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 1997, pp. 71-87.

Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas X, Tardy M, Thivolet J. In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. *Exp Cell Res* 1991; 193: 310–319.

Usuki A, Ohashi A, Sato H, Ochiai Y, Ichihashi M, Funasaka Y. The inhibitory effect of glycolic acid and lactic acid on melanin synthesis in melanoma cells. *Exp Dermatol* 2003; 12: 43–50.

Van Scott EJ, Ditre CM, Yu RJ. Alpha-hydroxyacids in the treatment of signs of photoageing. *Clin Dermatol* 1996; 14: 217–26.

Van Scott EJ, Yu RJ. Hydroxyacids and their topical use in the elderly. Y: Nall L, Cauwenbergh G, Jacobs P. (Eds.), Skin Diseases in the Elderly, New York: Marcel Dekker, 2004, pp. 76-83.

Vázquez-Araújo L, Verdú A, Murcia R, Burló F, Carbonell-Barrachina AA. Instrumental texture of a typical spanish confectionery product *xixona turron* as affected by commercial category and manufacturing company. *J Texture Stud* 2006; 37: 63–79.

Verdier-Sévrain S, Bonté F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol* 2007; 6(2): 75-82.

Vinardell MP, Mitjans M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *J Pharm Sci* 2008; 97: 46-59.

Von Rybinski W. Alkyl glycosides and polyglycosides. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 1996; 1: 587-597.

Von Rybinski W, Hill K. Alkyl polyglycosides – properties and applications of a new class of surfactants. *Angew Chem Int Ed* 1998; 37: 1328–1345.

Вулета Г. Утицај препарата различитих рН вредности на пуферски капацитет, рН коже и осетљивост коже. Докторска дисертација, Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду, 1983.

Waller JM, Maibach HI. Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Res Technol* 2005; 11: 221-235.

Wiechers JW. Cosmetic delivery: are we crossing the final barrier into dermatology? *J Appl Cosmetol* 2007; 25: 1-10.

Winkler A, Muller-Goymann CC. Comparative permeation studies of delta-aminolevulinic acid and its n-butylester through stratum corneum and artificial skin constructs. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53: 281-287.

World Medical Association, *World Medical Association Declaration of Helsinki*, Fernay, Voltaire, France, 1989.

Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176-186.

Yu RJ, Van Scott EJ. Bioavailability of alpha-hydroxyacids in topical formulations. *Cosmet Dermatol* 1996; 9: 54-62.

Yu RJ, Van Scott EJ. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. *J Cosmet Dermatol* 2004; 3: 76-87.

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

Yu RJ, Van Scott EJ, 2011. United States Patent Application 20110091403 Kind Code A1. (Доступно са: <http://patents.com/us-20110091403.html>; приступљено 18.11.2011).


Прилог А.

Радови са SCI листе у којима су публиковани резултати из докторске дисертације:

- 1) M. Tasić-Kostov, S. Savic, M. Lukic, S. Tamburic, M. Pavlovic, G. Vuleta. Lactobionic acid in a natural alkylpolyglucoside-based vehicle: assessing safety and efficacy aspects in comparison to glycolic acid. *J Cosmet Dermatol* 2010; 9: 3-10.
- 2) M. Tasić-Kostov, S. Reichl, M. Lukić, I. Jakšić, S. Savić. Two alkyl polyglucoside natural surfactants varying in the chain length in stabilization of lactobionic acid containing emulsions: physicochemical characterization and *in vitro* irritation potential assessment. *Riv Ital Sostanze Grasse* 2011; 4: 256-264.
- 3) M. Tasić-Kostov, S. Reichl, M. Lukić, I. Jakšić, S. Savić. Does lactobionic acid affect the colloidal structure and skin moisturizing potential of the alkyl polyglucoside - based emulsion systems? *Pharmazie* 2011; 66 (11): 862-870.
- 4) M. Tasić-Kostov, D. Pavlović, M. Lukić, I. Jakšić, I. Arsić, S. Savić. Lactobionic acid as antioxidant and moisturizing active in alkyl polyglucoside - based topical emulsions: the colloidal structure, stability and efficacy evaluation. *Int J Cosm Sci* 2012; 34, 424–434.

Прилог Б.

Сертификат анализе садржаја ЛК у испитиваном узорку.


Global Calcium
Adding Life to Life

INVESTIGATION REPORT

SUBJECT: Testing by UHPLC for LACTOBIONIC ACID EP in liquid emulsion.
Sample provided in 2 HDPE Jars wrapped in a bubble wrap.

Source
of the Samples has been confirmed to be from Dr Marija Tasic vide shipment number
8229210651

INVESTIGATION:

PART 1


SCREENING

1. The emulsion was opened under a LAF. The same was analyzed using solid phase extraction through HPLC
2. The lactobionic acid was separated from the emulsion by using oil-soluble excipients by washing the cartridge with 1 ml of 10% CH₃CN in WFI.

PART 2

RESULTS




1. Based on the above methodology, the LBA acid content was determined to be 3.2% in Jar 1 and 3.6% in Jar 2



INVESTIGATION CARRIED OUT BY:
Authorized Signatory-QA
Date: 16.07.2009

Email: calindia@touchtelindia.net www.globalcalciumpharma.com

GLOBAL CALCIUM PVT. LTD.

| | | |
|---|---|--|
|   <p>REGD. OFFICE & PLANT: 125 & 126, Sector Industrial Complex, Housr 635 126, India, Tel: 91-4344-276956 / 276959 500685 / 276235 Fax: 91-4344-276359</p> | <p>CORPORATE OFFICE: 711, 6th B Cross, 18 Block, Karamangala, Bangalore 560 034, India Tel: 91-80-25520831 / 25530831 25531752 / 25535374 Fax: 91-80-25530807</p> | <p>BRANCH: 18, Anand Estate, J M C Compound, 189/A, Sane Ganga Marg, Mumbai 400 011, India Tel: 91-22-23073321 / 23080078 / 23080079 Fax: 91-22-23071494</p>   |
|---|---|--|

A - ISO 9001 2000 / ISO 14001 Company

БИОГРАФИЈА

Марија Тасић-Костов рођена је 22.4.1978. године у Нишу. Основну школу и гимназију природно-математичког смера, завршила је у Нишу. Фармацеутски факултет Универзитета у Београду уписала је школске 1997/98. године и дипломирала априла 2004. године, са оценом 10 (десет) на дипломском испиту. Октобра 2004. године уписује последипломске магистарске студије, област Козметологија, а затим 2006. године докторске академске студије из исте области на Фармацеутском факултету у Београду.

Као апсолвент, од 2002. године, а затим и након дипломирања била је запослена у Средњој медицинској школи "Надежда Петровић" у Земуну, Београд, као координатор за практичну наставу а потом и наставник на предмету Козметологија.

По дипломирању, након завршеног стажа за фармацеуте положила је стручни државни испит за фармацеуте 2005. године и била запослена као фармацеут у Здравственој установи Апотека "Дона фарм" у Нишу.

Од октобра 2006. године запослена је на Медицинском факултету Универзитета у Нишу у оквиру Интегрисаних студија Фармације као сарадник у настави, а потом, од октобра 2009. године, као асистент. Тренутно је у радном односу у истој установи у овом звању.

Од 2010. године учествује на пројектима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Аутор је више научних и стручних радова.

Добитник је стипендије Michael Hornstein Memorial Scholarship коју додељује Европска Академија Дерматолога и Венеролога (EADV) у 2011. години и активни члан иностраних стручних – научних асоцијација:

- EADV (Европска Академија Дерматолога и Венеролога) и
- IFSCC (International Federation of Societies of Cosmetic Chemists).

Говори енглески и француски језик.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Тасић-Костов

број индекса 45/06

Изјављујем

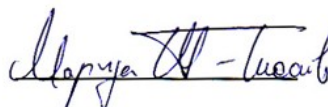
да је докторска дисертација под насловом

„Дермокозметичке емулзије са ламеларном течном-кристалном фазом као носач за лактобионску киселину-испитивање колоидне структуре, ефикасности и безбедности“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Тасић-Костов

Број индекса 45/06

Студијски програм Козметологија

Наслов рада „Дермокозметичке емулзије са ламеларном течном кристалном фазом као носач за лактобионску киселину- испитивање колоидне структуре, ефикасности и безбедности“

Ментор Проф. др Снежана Савић

Потписани/а Марија Тасић-Костов

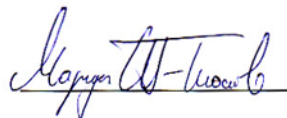
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Дермокозметичке емулзије са ламеларном течном-кристалном фазом као носач за лактобионску киселину – испитивање колодне структуре, ефикасности и безбедности“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, _____

Потпис докторанда

