

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Ana N. Gledović

**BIOKOMPATIBILNE NISKOENERGETSKE
NANOEMULZIJE SA ULJEM SEMENA MALINE
(*Rubus idaeus* L., Rosaceae) ZA KOZMETIČKU
PRIMENU: FORMULACIONA ISTRAŽIVANJA I
IN VITRO/IN VIVO BIOPERFORMANSE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024. godine

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Ana N. Gledović

**BIOKOMPATIBILNE NISKOENERGETSKE
NANOEMULZIJE SA ULJEM SEMENA MALINE
(*Rubus idaeus* L., Rosaceae) ZA KOZMETIČKU
PRIMENU: FORMULACIONA ISTRAŽIVANJA I
IN VITRO/IN VIVO BIOPERFORMANSE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY



Ana N. Gledović

**BIOCOMPATIBLE LOW-ENERGY
NANOEMULSIONS WITH RED RASPBERRY SEED
OIL (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) FOR COSMETIC
APPLICATION: FORMULATION INVESTIGATIONS
AND *IN VITRO/IN VIVO* BIOPERFORMANCE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Delovi eksperimentalnog rada urađeni su na Katedri za fizičku hemiju i instrumentalne metode i Katedri za mikrobiologiju i imunologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, kao i na Katedri za farmaciju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu.

MENTORI

Dr sci. Snežana Savić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sci. Aleksandra Janošević Ležaić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. _____
Dr sci. Ivana Pantelić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. _____
Dr sci. Jelena Antić Stanković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. _____
Dr sci. Tanja Ilić, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

4. _____
Dr sci. Marija Tasić Kostov, vanredni profesor,
Univerzitet u Nišu – Medicinski fakultet

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Pre svega, veliku zahvalnost dugujem svojim mentorima – profesorki Snežani Savić, što je omogućila da se pridružim njenom “nano timu” i uvek bila dostupna da mi pomogne oko nedoumica tokom izrade i pisanja ove disertacije, kao i profesorki Aleksandri Janošević Ležaić koja je bila uz mene u svim fazama ove disertacije, deleći moj entuzijazam za prirodne sirovine i brojne tehnike koje smo zajedno isprobale, ali i na konstantnom ohrabrenju da nastavim dalje.

Zahvaljujem puno i članovima komisije, prof. Ivani Pantelić i naučnom saradniku Tanji Ilić, kao i prof. Jeleni Antić Stanković i prof. Mariji Tasić Kostov, na doprinosu koji su dale prilikom izrade ove doktorske disertacije, čime su značajno poboljšale njen kvalitet. Profesorki Slobodanki Tamburić sa London College of Fashion zahvaljujem na pomoći oko stilskog i jezičkog uobličavanja radova koje smo objavili u stranim časopisima tokom izrade ove disertacije. Zahvaljujem i svim koleginicama i kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju na višegodišnjoj saradnji, a posebno koleginicama Jeleni Đoković i Ines Nikolić na lepim trenucima provedenim u laboratoriji, kao i što su uvek bile spremne za prijateljski razgovor, stručnu diskusiju, ali i za konkretnu pomoć.

Na kraju, neizmerno sam zahvalna mojoj porodici, a najviše mojoj mami Angelini i mom mužu Bojanu, na velikom razumevanju i nesebičnoj podršci u svakom smislu koju su mi pružali od početka do kraja ovog uzbuđljivog putovanja. Ovo je vaš uspeh isto koliko i moj. Beskrajno hvala!

BIOKOMPATIBILNE NISKOENERGETSKE NANOEMULZIJE SA ULJEM SEMENA MALINE (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) ZA KOZMETIČKU PRIMENU: FORMULACIONA ISTRAŽIVANJA I *IN VITRO/IN VIVO* BIOPERFORMANSE

SAŽETAK

Iako upotreba kozmetičkih sirovina biljnog porekla potiče još od antičkih vremena, u modernim kozmetičkim proizvodima ona doživljava renesansu, zahvaljujući mogućnostima naprednih formulacija da optimizuju njihove performanse. Stoga je u poslednje dve decenije nanotehnološki pristup zadobio veoma važno mesto, nudeći brojne prednosti, kao što su poboljšanje stabilnosti i aktivnosti osetljivih aktivnih sastojaka i mogućnost izbora postupaka izrade.

Predmet naučnog istraživanja ove doktorske disertacije bio je razvoj formulacija biokompatibilnih niskoenergetskih nanoemulzija sa uljem semena maline (INCI: *Red raspberry seed oil*), prirodnim kozmetički aktivnim sastojkom sa značajnim antioksidativnim potencijalom. Kao rezultat opsežnih formulacionih istraživanja, uspešno su razvijene dve različite vrste nanoemulzija (na bazi polisorbata 80 i poliglicerilskih estara), pri čemu je pokazan njihov veliki potencijal za inkorporiranje, ne samo ulja semena maline, već i drugih prirodnih aditiva. Pokazana je kompatibilnost obe vrste nanoemulzija sa hidroglikolnim ekstraktima (ploda maline ili ploda, tj. žira hrasta kitnjaka) i etarskim uljem origana, kao deo globalnog trenda u kozmetičkoj industriji koji podrazumeva zamenu sintetskih aditiva sa prirodnijim alternativama. Tokom eksperimentalnog rada, posebna pažnja bila je usmerena na karakterizaciju prelaznih faza različitog koloidnog tipa (mikroemulzije i tečno-kristalne faze), koje se javljaju tokom dobijanja nanoemulzija primenom metode inverzije faza usled promene sastava, kao inovativnog i ekološki prihvatljivog pristupa sa smanjenim utroškom energije i velikim potencijalom primene u industriji (niskoenergetske nanoemulzije). Primenom niza komplementarnih tehnika detaljno je ispitan uticaj nanoemulzifikacije i uticaj dodatka različitih aditiva na karakteristike i stabilnost nanoemulzija sa uljem semena maline.

Kao jedan od glavnih doprinosa ove disertacije, ističu se ispitivanja bioperfomansi ulja semena maline *per se* i nakon inkorporiranja u dve vrste nanoemulzija (bez ili sa različitim aditivima). U tom smislu, superiornije karakteristike i bolju dugoročnu stabilnost pokazale su poliglicerilske nanoemulzije izrađene sa minimum 98% sastojaka prirodnog porekla, kao prototip prirodnih kozmetičkih nanoemulzija. Po prvi put, potvrđeno je očuvanje antioksidativne aktivnosti ulja semena maline, uz poboljšanje oksidativne stabilnosti i efikasnosti prema ćelijama humanog malignog malanoma (Fem-X) upotrebom poliglicerilskih nanoemulzija i/ili koantioksidanasa. Razvijene formulacije poliglicerilskih nanoemulzija pokazale su i dobru biokompatibilnost primenom *in vitro* metoda, kao i tokom *in vivo* ispitivanja na humanim dobrovoljcima, uz izražen efekat hidratacije kože. Generalno, dobijeni rezultati ukazuju na veliki potencijal za dalji razvoj biokompatibilnih poliglicerilskih nanoemulzija za kozmetičku primenu.

Ključne reči: nanoemulzije, niskoenergetska nanoemulzifikacija, nanotehnologija, PIC metoda, ulje semena maline, ekstrakt ploda maline, ekstrakt ploda hrasta kitnjaka, antioksidans, oksidativna stabilnost, prirodna kozmetika.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Kozmetologija

BIOCOMPATIBLE LOW-ENERGY NANOEMULSIONS WITH RED RASPBERRY SEED OIL (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) FOR COSMETIC APPLICATION: FORMULATION INVESTIGATIONS AND *IN VITRO/IN VIVO* BIOPERFORMANCE

ABSTRACT

Although the use of cosmetic raw materials of plant origin dates back to ancient times, it is experiencing a renaissance in modern cosmetic products, thanks to the possibilities of advanced formulations to optimize their performance. Therefore, the nanotechnological approach has taken a very important place in the last two decades, offering numerous advantages, such as improving the stability and activity of sensitive active ingredients and the choice of different manufacturing methods.

The scientific research object of this doctoral dissertation was the formulation development of biocompatible low-energy nanoemulsions with raspberry seed oil (INCI: *Red raspberry seed oil*) a natural cosmetic active ingredient with significant antioxidant potential. As a result of extensive formulation research, two different types of nanoemulsions (based on polysorbate 80 and polyglycerol esters) have been successfully developed, showing their great potential for the incorporation of not only raspberry seed oil but also other natural additives. The compatibility of both types of nanoemulsions with hydroglycolic extracts (red raspberry fruit or sessile oak fruit, i.e. acorn extract) and oregano essential oil has been demonstrated as part of the global trend in the cosmetic industry to replace synthetic additives with natural alternatives. During the experimental work, particular attention was focused to the characterization of transient phases of different colloidal type (microemulsions and liquid crystalline phases) that occur during the preparation of nanoemulsions by the phase inversion method due to the change in composition, as an innovative and environmentally friendly approach with reduced energy consumption and great potential for application in industry (low-energy nanoemulsions). By applying a series of complementary techniques, the influence of nanoemulsification and the impact of the addition of various additives on the properties and stability of nanoemulsions with raspberry seed oil were studied in detail.

One of the most important contributions of this dissertation is the bioperformance testing of raspberry seed oil by itself and after incorporation into two types of nanoemulsions. In this sense, polyglyceryl ether-based nanoemulsions, which consist of at least 98% of ingredients of natural origin and are considered the prototype for natural cosmetic nanoemulsions, showed superior characteristics and better long-term stability. It has been confirmed for the first time that nanoemulsions based on polyglyceryl esters (with or without co-antioxidants) can successfully preserve the antioxidant activity of raspberry seed oil while improving its oxidative stability and efficiency against human malignant melanoma cells (Fem-X). The developed polyglyceryl nanoemulsions showed a good biocompatibility using *in vitro* methods, as well as during *in vivo* tests on human volunteers, with a pronounced skin hydration effect. Overall, the results obtained indicate great potential for the further development of biocompatible polyglyceryl nanoemulsions for cosmetic applications.

Key words: nanoemulsions, low-energy nanoemulsification, nanotechnology, PIC method, red raspberry seed oil, red raspberry fruit extract, french oak fruit extract, antioxidant, oxidative stability, natural cosmetics.

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Cosmetology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Istorijat upotrebe kozmetičkih proizvoda.....	1
1.2. Savremeni trendovi u kozmetičkoj industriji.....	1
1.3. Malina kao izvor bioaktivnih sirovina za primenu u farmaciji i kozmetici.....	3
1.3.1. Malina (<i>Rubus idaeus</i> L., Rosaceae) – istorijat i upotreba.....	3
1.3.2. Masno ulje semena maline (INCI: <i>Rubus idaeus seed oil</i>).....	4
1.3.3. Kozmetički proizvodi sa uljem semena maline.....	6
1.4. Nanoemulzije kao inovativni nosači kozmetički aktivnih supstanci.....	7
1.4.1. Emulzije, nanoemulzije i mikroemulzije – definicija i osnovne karakteristike.....	7
1.4.2. Klasifikacija i osnovni principi metoda za izradu nanoemulzija.....	9
1.4.2.1. Homogenizacija pod visokim pritiskom.....	12
1.4.2.2. Mikrofluidizacija.....	12
1.4.2.3. Ultrasonikacija.....	12
1.4.2.4. Spontano-emulgujuća metoda.....	14
1.4.2.5. Metoda inverzije usled promene temperature.....	15
1.4.2.6. Metoda inverzije usled promene sastava.....	15
1.5. Sastav nanoemulzija i ključni formulacioni parametri.....	16
1.5.1. Surfaktanti/kosurfaktanti.....	16
1.5.1.1. Definicija i klasifikacija surfaktanata.....	16
1.5.1.2. Koncentracija i odnos surfaktanata/kosurfaktanata.....	19
1.5.2. Korastvarači.....	20
1.5.3. Masna faza.....	20
1.5.4. Vodena faza.....	21
1.5.5. Kozmetički aktivne supstance.....	22
1.6. Stabilnost nanoemulzija.....	23
1.7. Nanoemulzije kao kozmetički proizvodi.....	25
1.7.1.1. Prednosti nanoemulzija kao kozmetičkih proizvoda.....	25
1.7.1.2. Izazovi u proizvodnji nanoemulzija.....	26
1.7.1.3. Stanje na tržištu kozmetičkih nanoemulzija.....	27
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	28
2.1. Cilj prve faze eksperimentalnog rada.....	28
2.2. Cilj druge faze eksperimentalnog rada.....	28
2.3. Cilj treće faze eksperimentalnog rada.....	29
2.4. Cilj četvrte faze eksperimentalnog rada.....	29
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	30

3.1. Materijali.....	30
3.2. Metode.....	32
3.2.1. Ispitivanje faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu surfaktant/masna faza/vodena faza.....	32
3.2.2. Izrada prelaznih faza i nanoemulzija za formulaciona istraživanja.....	32
3.2.3. Fizičko-hemijska karakterizacija prelaznih faza i nanoemulzija.....	34
3.2.3.1. Određivanje veličine i distribucije veličina kapi.....	34
3.2.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje optičke bistrine.....	34
3.2.3.3. Polarizaciona mikroskopija.....	35
3.2.3.4. Mikroskopija atomskih sila.....	35
3.2.3.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija.....	35
3.2.3.6. Reološka karakterizacija i teksturna analiza.....	36
3.2.3.7. Merenje električne provodljivosti.....	37
3.2.3.8. Merenje pH vrednosti.....	37
3.2.4. Procena fizičke stabilnosti nanoemulzija.....	37
3.2.5. Ramanska spektroskopija ulja semena maline i nanoemulzija.....	37
3.2.6. Određivanje sadržaja glavnih biološki aktivnih sastojaka ulja semena maline spektrofotometrijskim metodama.....	38
3.2.6.1. Određivanje apsorpcionog spektra i sadržaja ukupnih karotenoida.....	38
3.2.6.2. Određivanje sadržaja ukupnih tokoferola.....	38
3.2.6.3. Određivanje ukupnih fenola.....	39
3.2.7. Procena oksidativne stabilnosti ulja semena maline i nanoemulzija spektrofotometrijskim metodama.....	40
3.2.7.1. Određivanje peroksidnog broja ulja semena maline.....	40
3.2.7.2. Određivanje p-anisidinskog broja ulja semena maline.....	41
3.2.7.3. Određivanje derivata tiobarbiturne kiseline u ulju maline.....	41
3.2.7.4. Određivanje lipidnih hidroperoksida u nanoemulzijama.....	43
3.2.7.5. Određivanje derivata tiobarbiturne kiseline u nanoemulzijama.....	43
3.2.8. <i>In vitro</i> procena antioksidativne aktivnosti	
3.2.8.1. ABTS test.....	43
3.2.8.2. DPPH test.....	44
3.2.9. <i>In vitro</i> procena sposobnosti za ostvarivanje bioloških efekata.....	44
3.2.9.1. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti.....	44
3.2.9.2. <i>In vitro</i> procena okularne iritacije.....	45
3.2.10. <i>In vivo</i> procena kompatibilnosti sa kožom i efikasnosti.....	47
3.2.11. Statistička analiza.....	48

4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	49
4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada.....	49
4.1.1. Ispitivanje faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu polisorbat 80/ulje semena maline/voda.....	49
4.1.2. Optimizacija sastava nanoemulzija sa polisorbatom 80 (P80 NEs).....	53
4.1.2.1. Optimizacija masne faze P80 NEs.....	53
4.1.2.2. Optimizacija vodene faze P80 NEs.....	55
4.1.3. Ramanska spektroskopija ulja semena maline različitog tipa i odgovarajućih P80 NEs.....	57
4.1.3.1. Ramanski spektri ulja semena maline.....	57
4.1.3.2. Ramanski spektri P80 NEs sa različitim uljima semena maline.....	59
4.1.4. Formulaciona istraživanja optimizovanih P80 NEs.....	60
4.1.4.1. Mikroskopska analiza optimizovanih P80 NEs.....	60
4.1.4.2. Analiza krivih električne provodljivosti tokom procesa nastanka P80 NEs primenom PIC metode.....	62
4.1.4.3. Reološka i teksturna analiza.....	63
4.2. Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada.....	67
4.2.1. Ispitivanje faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu smeša poliglicerilskih estara/ulje semena maline-RO2/voda.....	67
4.2.2. Optimizacija sastava poliglicerilskih nanoemulzija (PG NEs).....	67
4.2.2.1. Uticaj smeše poliglicerilskih estara i nosećeg ulja.....	67
4.2.2.2. Uticaj kosurfaktanata.....	68
4.2.2.3. Uticaj ulja semena maline RO2 i glicerola.....	69
4.2.2.4. Uticaj hidroglukolinskih ekstrakata ploda maline i ploda hrasta kitnjaka.....	70
4.2.3. Karakterizacija prelaznih faza i finalnih PG NEs.....	72
4.2.3.1. PIC mehanizam formiranja PG NEs.....	72
4.2.3.2. Analiza krivih električne provodljivosti tokom procesa formiranja PG NEs primenom PIC metode.....	75
4.2.3.3. Analiza termalnog ponašanja tokom procesa formiranja PG NEs primenom PIC metode.....	75
4.2.3.4. Mikroskopska analiza optimizovanih PG NEs.....	76
4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada.....	79
4.3.1. Određivanje sadržaja glavnih biološki aktivnih sastojaka ulja semena maline RO2 spektrofotometrijskim metodama.....	79

4.3.1.1.	Apsorpcioni spektar ulja semena maline.....	79
4.3.1.2.	Određivanje sadržaja ukupnih karotenoida.....	80
4.3.1.3.	Određivanje sadržaja ukupnih tokoferola.....	80
4.3.1.4.	Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	80
4.3.2.	<i>In vitro</i> procena antioksidativne aktivnosti ulja semena maline RO2 pre i nakon nanoemulzifikacije.....	81
4.3.2.1.	Antioksidativna aktivnost ulja RO2 i hidroglikolnih ekstrakata ploda maline-RE i hrasta kitnjaka-FE.....	81
4.3.2.2.	Antioksidativna aktivnost P80 NEs.....	82
4.3.2.3.	Antioksdativna aktivnost PG NEs.....	83
4.3.3.	Procena oksidativne stabilnosti ulja semena maline RO2.....	84
4.3.4.	Procena oksidativne stabilnosti P80 NEs i PG NEs.....	86
4.3.4.1.	Optimizacija sastava P80 NEs i PG NEs u cilju procene/ poboljšanja oksidativne stabilnosti.....	87
4.3.4.2.	Uporedna analiza oksidativne stabilnosti P80 NEs i PG NEs na različitim temperaturama.....	91
4.4.	Rezultati i diskusija četvrte faze eksperimentalnog rada.....	94
4.4.1.	<i>In vitro</i> procena sposobnosti za ostvarivanje bioloških efekata.....	94
4.4.1.1.	<i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti.....	94
4.4.1.2.	<i>In vitro</i> procena okularne iritacije.....	97
4.4.2.	<i>In vivo</i> procena kompatibilnosti sa kožom i efikasnosti PG NEs.....	99
5.	ZAKLJUČAK.....	102
5.1.	Zaključak prve faze eksperimentalnog rada.....	102
5.2.	Zaključak druge faze eksperimentalnog rada.....	103
5.3.	Zaključak treće faze eksperimentalnog rada.....	104
5.4.	Zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada.....	107
5.5.	Opšti zaključak.....	108
6.	LITERATURA.....	109
7.	PRILOG.....	124

1. UVOD

1.1. Istorijat upotrebe kozmetičkih proizvoda

Brojni istorijski izvori svedoče o univerzalnoj ljudskoj težnji ka lepom, mladolikom i zdravom izgledu. Naime, poznato je da su još od antičkih dana ljudi pripremali razne smeše za primenu na koži, kosi ili noktima, u cilju održavanja lične higijene, nege i ulepšavanja. Među najistaknutijim primerima su recepti za izradu kozmetičkih preparata zabeleženi u egipatskim papirusima i na zidovima hramova starosti više hiljada godina pre nove ere. U sastav antičkih kozmetičkih proizvoda ulazile su prirodne sirovine – biljna ili životinjska ulja, cveće ili ekstrakti biljaka, minerali, gline, drago kamenje itd. U cilju nege i zaštite kože od nepovoljnih klimatskih uslova, korišćene su mešavine na bazi biljnih ulja (maslinovog, susamovog i bademovog ulja), često uz dodatak meda, magarećeg mleka, pčelinjeg voska, dok je smeša morske soli i meda služila za piling tela, a kosu i nokte su bojili kanom (Blanko- Dávila, 2000; Parish i Crissey, 1988). Biblijski tekstovi takođe pominju upotrebu ulja susama, badema, maslina, kao i masnih materija dobijenih od životinja ili riba za negu kože, dok su se cvetni i biljni mirisi (mira, tamjan, kedar, majoran, ljiljan, ruža, ruzmarin, menta, lavanda itd.) koristili za izradu preparata za parfimisanje tela, prostorija. Upotreba mirisnih ulja i trgovina istim bila je zastupljena ne samo u Egiptu, Grčkom i Rimskom carstvu već i u Kini, Indiji, na Bliskom Istoku, Španiji, Veneciji itd. Među najpopularnijim mirisnim notama, pored već pomenutih mirisa, bili su ruža, jasmin, pačuli, sandalovo drvo, zatim začini poput cimeta, karanfilića i đumbira (Blanko-Dávila, 2000; Chaudri i Jain, 2009; Parish i Crissey, 1988).

S obzirom da je upotreba kozmetičkih proizvoda više milenijuma bila bazirana isključivo na empirijskim saznanjima, pored prirodnih sirovina sa dobrim bezbednosnim profilom, često su korišćene i različite toksične supstance. Posledično, neželjeni efekti su bili veoma česta pojava, posebno kada je u pitanju upotreba dekorativne kozmetike ili kremova za izbeljivanje kože lica, što je kroz istoriju bilo veoma popularno.

Uspon kozmetologije kao multidisciplinarne nauke kakva je i danas dogodio se tek u 20. veku, u jeku industrijske revolucije posle II svetskog rata, kada na scenu stupaju i mnoge nove sirovine potekle iz drugih grana industrije (npr. oleo, petrohemijska i prehrambena industrija), nižu se brojne inovacije i dolazi do diverzifikacije kozmetičkih proizvoda. Važno je istaći da je tada viševjekovna praksa pripisivanja svemogućih i neutemeljenih svojstava kozmetičkim proizvodima počela sve više da ustupa mesto razvoju proizvoda sa dokazanom efikasnošću i bezbednošću (Paye i sar., 2010).

1.2. Savremeni kozmetički proizvodi – aktuelni trendovi u kozmetičkoj industriji

Kozmetička industrija je jedna od najbrže rastućih industrija u poslednjoj deceniji, te se smatra se da će njena vrednost od procenjenih 429,2 milijardi američkih dolara u 2022. godini dostići čak 864,6 milijardi američkih dolara 2032. godine, sa procenjenom godišnjom stopom rasta od oko 7,1%, u periodu od 2023. do 2032. godine (Cosmetics market size, share, competitive landscape and trend analysis report). Najveće grupe kozmetičkih proizvoda današnjice su: proizvodi za negu kože (engl. *skin care products*), proizvodi za čišćenje tj. održavanje higijene (engl. *toiletries*), proizvodi za higijenu i negu usne duplje (engl. *oral care*), parfemi (engl. *fragrances*), proizvodi za ulepšavanje (šminka – engl. *make up* ili bojenje – engl. *color cosmetics*), proizvodi za negu kose (engl. *hair care*). Proizvodi za negu kože čine najveću i najznačajniju kategoriju, sa procenjenim udelom na tržištu oko 40% (Cosmetics market size, share, competitive landscape and trend analysis report; Global cosmetic skin care market 2019–2023).

Od savremenih kozmetičkih proizvoda očekuje se multifunkcionalnost i potvrđena efikasnost, uz bezbednost koja je apsolutni imperativ. Naime, današnji kozmetički proizvodi za negu kože najčešće nemaju samo ulogu da poboljšaju izgled, tj. da održavaju kožu u dobrom stanju, već mogu da poboljšaju stanje kože (npr. *anti-age* efekat, umirivanje iritirane kože, hidratacija suve kože itd.), kao i da pruže zaštitu (npr. od štetnih efekata sunčevog zračenja i aerozagađenja).

Kada je reč o funkciji kozmetičkog proizvoda, u poslednjih nekoliko decenija istraživanja su intenzivno usmerena ka ublažavanju znakova starenja kože, kao i prevenciji starenja i kancera kože, u čemu značajnu ulogu imaju proizvodi na bazi sirovina sa antioksidativnim dejstvom (Khalil i sar., 2019; Lou i sar. 2017; Niculae i sar., 2014). Naime, razlozi za upotrebu antioksidanasa u kozmetici su dvostruki, sa jedne strane, oni štite osetljive sastojke u proizvodu od oksidacije, a sa druge strane štite kožu od spoljašnjih negativnih uticaja (UV zračenje, zagađenje vazduha, toksične supstance, hemikalije), kao i od unutrašnjih negativnih uticaja (inflamacija, metabolički poremećaji itd.). Kao posledica ovih negativnih uticaja u koži dolazi do stvaranja slobodnih radikala, naročito reaktivnih kiseoničnih vrsta, koji dovode do promene funkcija ćelija kože i posledično do starenja kože. Poznato je da mlada koža ima veliki kapacitet za neutralizaciju slobodnih radikala, međutim, sa starenjem kože dolazi do disbalansa između prooksidativnih i antioksidativnih procesa, te dolazi do oštećenja vitalnih molekula kao što su proteini, lipidi i DNK. Kao rezultat oksidativnog stresa, ostarela koža biva oštećena, što se manifestuje izboranošću, gubitkom elastičnosti, suvoćom, hiperpigmentacijom itd.

Prema tome, smatra se da je u cilju očuvanja zdravlja kože i prevenciji i tretmanu hronološkog i fotostarenja kože potrebno da se aktivno deluje protiv oksidativnog stresa, što se postiže upotrebom kozmetičkih proizvoda sa antioksidativnim dejstvom (Badea i sar., 2015; Marsup i sar., 2020). Takođe, postoji realna potreba da se nađu bezbednije i efikasnije alternative za sintetske antioksidanse koji mogu ispoljiti neželjene efekte, što je u skladu sa rastućom negativnom percepcijom od strane potrošača kada je u pitanju upotreba klasičnih sintetskih sastojaka i kozmetičkih proizvoda koji ih sadrže (Lou i sar., 2017; Aburjai i Natseh, 2003).

Pored pomenutog multifunkcionalnog pristupa, savremeni trendovi u kozmetičkoj industriji obuhvataju nekoliko pravaca koji se međusobno prepliću:

- i) upotreba prirodnih sirovina, posebno onih koje se mogu dobiti iz obnovljivih izvora, ili iz nusproizvoda prehrambene industrije (Barbulova i sar., 2015; Faria-Silva i sar., 2020)
- ii) upotreba savremenih nosača kozmetičkih aktivnih sastojaka u cilju poboljšanja njihove stabilnosti i/ili efikasnosti, npr. nanoemulzija (Mod-Setapar i sar., 2022; Sonnevile-Auburn i sar., 2018)
- iii) formulisanje novih proizvoda za uže niše potrošača koje ranije nisu bile dovoljno zastupljene (npr. vegani, muškarci, uniseks proizvodi itd.) (Mohiuddin i sar., 2019).

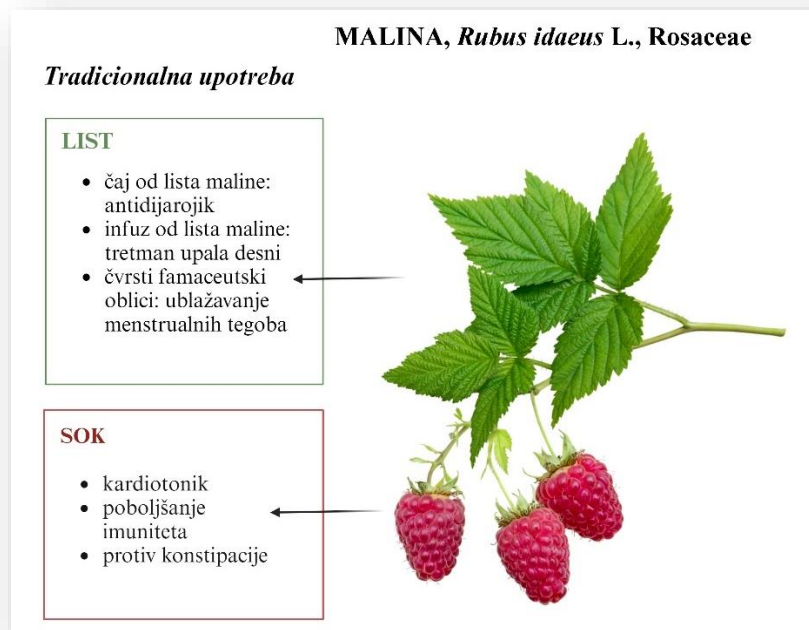
1.3. Malina kao izvor bioaktivnih sirovina za primenu u farmaciji i kozmetici

1.3.1. Malina (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) – istorijat i upotreba u farmaciji

Malina (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) spada u najznačajnije vrste jagodastog voća (npr. jagode, kupine, ribizle) koje je poznato čoveku od davnina. Naime, prvi pisani podaci o crvenoj malini datiraju iz 45. godine n.e., kada je rimski pisac i naučnik Plinije Stariji zabeležio da narod Troje u podnožju planine Ida (današnja severozapadna Turska) sakuplja plodove „ide“. Poreklo crvene maline ogleda se i u latinskom nazivu vrste: *Rubus* (od lat. reči *ruber* – crven) i *idaeus* (od mesta pronalaska – Ida). Ipak, smatra se da je postojbina maline zapravo bila Mala Azija, a malina je nativno bila rasprostranjena i u Severnoj Evropi i Severnoj Americi, gde je najzastupljenija srodna vrsta crvene maline *Rubus idaeus* ssp. *Strigosus*. Interesantno je da je malina prvobitno kultivisana kao dekorativna žbunasta biljka koja se gajila u engleskim baštama, potom i u Severnoj Americi (Kempler i sar., 2012; United States Department of Agriculture, Plant guide – American red raspberry, *Rubus idaeus* L.).

Danas se malina gaji širom sveta, pri čemu Evropa po proizvodnji i dalje premašuje ostale kontinente. Prema podacima iz 2019. godine godišnja proizvodnja ploda maline iznosi oko 800.000 tona, Rusija je vodeći proizvođač (22%), a slede Meksiko (16,3%), Srbija (15,2%), Sjedinjene Američke Države (13%) i Poljska (9,6%) (Ispiryan i sar., 2021). Plod maline je veoma popularan u ljudskoj ishrani, zahvaljujući karakterističnom lepom, aromatičnom ukusu i povoljnom sadržaju makro i mikronutrijenata (Dhalaria i sar., 2020). Naime, plod maline sadrži brojna fenolna jedinjenja (galne tanine, uključujući i elagne tanine, antocijane i fenolne kiseline), vitamin C, šećere, dijetna vlakna, minerale (kalijum, magnezijum, fosfor, kalcijum, gvožđe i cink), a od lipofilnih sastojaka prisutni su tokoferoli, karotenoidi i visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina koji su prisutni u masnom ulju semena maline (Dimić i sar., 2012; Figueira i sar., 2014; Lee i sar., 2012). Zahvaljući brojnim naučnim publikacijama, potražnja za plodom maline je sve veća, a pored upotrebe u vidu svežeg voća, najveći deo proizvedene maline se koristi za zamrzavanje, a potom za proizvodnju džemova, voćnih sokova, dezerata, kao i za neprehrambene proizvode, poput dijetetskih suplemenata ili kozmetike (Kempler i sar., 2012).

Kada je reč o upotrebi maline u narodnoj medicini, zabeležena je upotreba soka maline kao kardiotonika, za poboljšanje imuniteta i protiv konstipacije, a poznata je i upotreba čaja od lista maline kao antidijaroika i antiinflamatornog sredstva kod prehlade (Milovanović i sar., 2009). Interesantno je da je još u 1. veku n.e. Dioskorid pisao o upotrebi čaja od lista maline (ukus podseća na crni čaj), za ublažavanje bolova i krvarenja prilikom porođaja (Patel i sar., 2005). Evropska agencija za lekove (EMA) je u okviru monografije lista maline (Community herbal monograph on *Rubus idaeus* L., folium) odobrila da se od lista maline mogu izrađivati tradicionalni biljni lekovi: u obliku infuza list maline se koristi oromukozalno za tretman manjih inflamacija usne duplje i ždrela; oralno, čaj se koristi za tretman blage dijareje, a suvi vodeni ekstrakt u obliku čvrstih doziranih oblika za ublažavanje manjih spazama vezanih za menstrualni ciklus (European Medicines Agency. EMA/HMPC/44211/2012. Community herbal monograph on *Rubus idaeus* L., folium, 2012.). Izgled biljke *Rubus idaeus* sa zrelim plodovima i listovima koji se koriste za izradu pomenutih farmaceutskih preparata prikazan je na *Slici 1.1*.



*Slika 1.1. Malina (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) – izgled biljke sa zrelim plodovima, semenom i uljem dobijenim iz semena maline, kao i pregled indikacija za tradicionalnu upotrebu.*

Međutim, danas su mnogo zastupljenija istraživanja koja se bave ekstraktima ploda, pulpe ili semena maline. Istraživanja vršena sa različitim ekstraktima ploda maline (najčešće korišćeni rastvarači su metanol, etanol, voda, aceton i etilacetat) pokazala su da oni ispoljavaju antioksidativni (Figueira i sar., 2014; de Souza i sar., 2014), antiinflamatorni (Bowen-Forbes i sar., 2010; Figueira i sar., 2014), kao i antiproliferativni efekat na ćelije kancera kolona, prostate, želuca, jetre itd. (Bowen-Forbes i sar., 2010; Figueira i sar., 2014; Zhang i sar., 2018). Interesantno je da i vodeni ekstrakti pulpe i semena maline ispoljavaju antiproliferativni efekat prema ćelijama kancera kolona (Juranić i sar., 2005). Pomenuti efekti se dovode u vezu sa prisustvom pigmenta antocijana od kojih potiče crvena boja ploda (cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-rutinozid, cijanidin-3-soforozid, cijanidin-3-glukozilrutinozid, pelargonidin-3-glukozid, pelargonidin-3-rutinozid, pelargonidin-3-glukozilrutinozid), fenolnih kiselina (elagna, ferulinska, kafena kiselina), flavonoida – kvercetin, kao i tanina – elagnih tanina (lambertanin C i sangvinin H-6) (Lee i sar., 2012; Šućurović i sar., 2009). Dokazano je i da hidroetanolni ekstrakt ploda maline inhibira UVB-indukovanu sekreciju matriksne metaloproteinaze 1 i 3, kao i inflamatornih faktora IL-6 i IL-1 β , a takođe promoviše sintezu prokolagena tipa I, čime je potvrđeno njegovo dejstvo protiv fotostarenja kože (Gao i sar., 2018). Iz ovih navoda proizilazi da ekstrakti ploda maline mogu naći svoje mesto u prevenciji ili tretmanu različitih oštećenja kože povezanih sa oksidativnim stresom (npr. fotostarenje kože).

1.3.2. Masno ulje semena maline (INCI: *Rubus idaeus* seed oil)

U poslednje dve decenije evidentna je povećana potražnja za prirodnim kozmetičkim proizvodima, a takođe je povećana i potreba da se reši problem zagađenja životne sredine, što je rezultiralo istraživanjima i ekološki prihvatljivom proizvodnjom specijalnih ulja iz alternativnih izvora kao što su semena voća i povrća koji su tipični nusproizvodi prehrambene industrije (Bialek i sar., 2016; Krasodomska i Jungnickel, 2015). Kao što je već rečeno, malina spada u jagodasto voće, a njen plod je

zbirna koštunica koja sadrži semenke maline. Naime, seme maline čini 9–12% mase ploda, pri čemu je sadržaj ulja u semenu oko 10–23%, a ulje se dobija najčešće hladnim ceđenjem (ili eventualno CO₂ superkritičnom ekstrakcijom) (Ispiryan i sar., 2021; Oomah i sar., 2000; Van Hoed i sar., 2009).

Ulje maline je bogat izvor polinezasićenih masnih kiselina (C18:2 ω6 linolna kiselina: 50–62% i C18:3 ω3 α-linolenska kiselina: 21–36 %), a sadrži i mononezasićene kiseline (C18:1 ω9 oleinska kiselina: 8–14%) i vrlo malo zasićenih masnih kiselina (C16:0 palmitinska i C18:0 stearinska kiselina, ukupno 3 do 5%) (Krasodomska i Jungnickel 2015; Oomah i sar., 2000). Kod većine biljnih ulja koja sadrže polinezasićene masne kiseline, odnos ω6: ω3 masnih kiselina iznosi 6 do 10, dok ulje maline karakteriše niža vrednost (1,5 do 2,7) koja se smatra optimalnom za prevenciju kardiovaskularnih i malignih oboljenja (Bushman i sar., 2004; Van Hoed i sar., 2009).

Ono što ulje maline čini dodatno vrednom sirovinom su i komponente nesaponifikovane frakcije ulja kao što su: fitosteroli (ukupno: 493,7 mg/100g, od čega je dominantno zastupljen β-sitosterol –79,6%, a prisutni su i avenasterol, kampesterol i stigmasterol) i skvalen–8,4 mg/100g ulja (Van Hoed i sar., 2009). Zatim su prisutni i tokoferoli, ukupno od 198 do 2113 mg/kg ulja (dominantno γ-tokoferol, oko 75%, a zatim slede α-tokoferol, Δ-tokoferol i γ-tokotrienol) (Oomah i sar., 2000; Van Hoed i sar., 2009; Yang i sar., 2011). Usled prisustva karotenoida u nesaponifikovanoj frakciji ulje maline je žutonarandžaste boje; ukupni sadržaj karotenoida procenjuje se na oko 40 mg/kg ulja (Dimić i sar., 2012), odnosno, 12,5 μmoL-a/kg ulja, od čega je najzastupljeniji zeaksantin (oko 72%), a slede kriptoksantin (oko 25%), β-karoten i lutein (Parry i sar., 2005). Pokazano je da ulje maline apsorbuje svetlost u UVB oblasti (290-320 nm) i u UVA oblasti (320-400 nm) (Oomah i sar., 2000). Pored tokoferola i karotenoida, antioksidativnom efektu ulja maline doprinose fenolna jedinjenja kao što je tirozol (2300 mg/ kg ulja), a sadržaj ukupnih fenola procenjen je na oko 8,4 mg ekvivalenata kafene kiseline/g ulja (Van Hoed i sar., 2011), odnosno 2 mg ekvivalenata galne kiseline/g ulja (Parry i sar., 2005). Krupan prikaz ploda, semena i ulja maline, kao i potencijalne indikacije za primenu na koži sirovina dobijenih iz ploda/ semena maline prikazani su na *Slici 1.2*.



*Slika 1.2. Vizuelni izgled ploda, semena i ulja semena maline i dermatološko-kozmetološka primena ekstrakata ploda i ulja semena maline (*Rubus idaeus*, L., Rosaceae)*

Dokazano je da ulje maline ispoljava antioksidativni efekat slično kao resveratrol (Šučurović i sar., 2009), te da je efikasniji hvatač peroksil radikala u odnosu na ulje semena brusnice, ribizle i jagode, dok je u slučaju inhibicije lipidne peroksidacije ulje maline manje efikasno od ulja semena jagode i ribizle, a efikasnije od ulja semena brusnice (Yang i sar., 2011). Takođe, pokazano je da je ulje semena maline slabiji antioksidans od ulja semena kupine (Bushman i sar., 2004), a jači antioksidans od ulja semena borovnice (Parry i sar., 2005).

S obzirom da je naša zemlja među najvećim proizvođačima maline na svetu, važno je napomenuti da su i domaći proizvođači prepoznali potencijal izrade ovakvog ulja, te se od pre nekoliko godina može naći na tržištu i ulje izrađeno od srpskih sorti maline.

1.3.3. Kozmetički proizvodi sa uljem semena maline – dokazani efekti i formulacioni izazovi

Kada je u pitanju dermatološko-kozmetološka upotreba ulja maline, većina naučno-istraživačkih radova i patenata se odnosi na kontekst antiinflamatornog dejstva zahvaljujući prisustvu esencijalnih polinezasićenih masnih kiselina (nega suve, osetljive kože, tretman ekcema, psorijaze sl.), antioksidativnu zaštitu i fotozaštitu kože (preparati za zaštitu od sunca i negu kože nakon sunčanja) i *anti-age* negu kože. Takođe, ulje semena maline koristi se i u proizvodima za higijenu usne duplje (tretman gingivitisa, vodice za ispiranje usta) i proizvodima za kupanje (šamponi protiv peruti i za masnu kosu, sapuni i kupke za osetljivu kožu) (Badea i sar., 2015; Bialek i sar., 2016; Ispiryian i sar. 2021, Omaah i sar., 2000). Nedavno je dokazano da čisto ulje semena maline značajno povećava hidrataciju *stratum corneum*-a, slično kao i susamovo i kokosovo ulje, dok je jedino ulje semena maline dovodi do izraženog smanjenja transepidermalnog gubitka vode (TEGV), što se smatra indikatorom oporavka barijerne funkcije kože (Dzidek i sar., 2023). Novije studije su pokazale da je faktor zaštite od sunca čistog ulja maline, kao i mnogih drugih biljnih ulja (kokosa, šargarepe, šipurka, pirinča), znatno niži nego što se ranije mislilo – SPF 2,6 (Ácsová i sar., 2021), umesto SPF 25–50 (Oomah i sar., 2000). Međutim, ova ulja deluju sinergistički sa sintetskim UV filterima u naprednim formulacijama tipa nanostrukturiranih lipidnih nosača, a antioksidativni sastojci ulja takođe doprinose fotoprotektivnom efektu (Badea i sar., 2015; Niculae i sar., 2014).

Uprkos tako širokoj paleti potencijalnih indikacija za primenu na koži koja proizilazi iz obilja bioaktivnih sastojaka, kao i ostala ulja bogata polinezasićenim masnim kiselinama, ulje maline ima lošu oksidativnu stabilnost i ograničen rok trajanja, najčešće 6 do 12 meseci (Prescha i sar., 2014; Šučurović i sar., 2009). Kao jedan od razloga navodi se i velika varijabilnost u sadržaju prirodno prisutnih antioksidanasa u ulju maline poput tokoferola, karotenoida i polifenola, što zavisi od sorte i uslova gajenja maline, ali i od tehnika ekstrakcije. Takođe, na stabilnost ulja maline značajno utiču i način prerade ulja, ali i uslovi čuvanja nakon hladnog ceđenja (Van Hoed i sar., 2011). Zbog toga je potrebno da se ono stabilizuje u finalnom proizvodu dodatkom aditiva kako bi se sprečilo formiranje štetnih proizvoda oksidacije (peroksida, aldehida i alkohola) koji ne samo da dovode do neprijatnog užeglog mirisa već mogu ispoljiti i toksične efekte (Bialek i sar., 2016). Pored standardnih sintetskih aditiva koji se dodaju biljnim uljima (kao što je antioksidans butilhidroksitoluen – BHT), sve više se istražuje kombinovanje lipofilnih i hidrofилnih ekstrakata dobijenih iz istog biljnog izvora (na primer, ulje semena nara i ekstrakt kore nara) (Drnić i sar., 2020). Znatno češće se pominju kombinacije iz različitih biljnih izvora, npr. ekstrakt lista ruzmarina za stabilizaciju suncokretovog ulja (Hraš i sar., 2000), ili hidroglikolni ekstrakti acerole, šipurka i kore vrbe u kombinaciji sa uljem pšeničnih klica u U/V emulzijama (Malinowska i sar., 2014). Cilj ovakvih kombinacija je stabilizacija ulja i postizanje sinergističnog antioksidativnog efekta, a takođe se upotrebom prirodnih antioksidanasa mogu izbeći neželjeni efekti povezani sa upotrebom sintetskih jedinjenja (Drnić i sar., 2020; Malinowska i sar., 2014). Shodno ovim saznanjima, moglo bi se očekivati

da se stabilnost ulja semena maline može poboljšati u formulacijama tipa emulzija upotrebom hidrofилnih ekstrakata ploda maline ili nekog drugog biljnog ekstrakta (poput ekstrakta ploda, tj. žira hrasta kitnjaka) sa dokazanom antioksidativnom aktivnošću (Figueira i sar., 2014; Popović i sar., 2013).

Dakle, imajući u vidu ograničenu efikasnost prirodnih antioksidanasa usled inherentne nestabilnosti, degradacije prilikom isporuke do mesta delovanja, teškoća prilikom prolaska kroz ćelijske membrane itd., potrebno je da se nađe pogodan nosač za njihovu stabilizaciju i poboljšanje bioperformansi. U tom pogledu, tokom poslednje dve decenije ističe se upotreba nanoemulzija, s obzirom da je dokazano da se njihovom primenom može postići poboljšana penetracija aktivnih sastojaka i hidratacija kože (Kong i sar., 2011; Mahdi i sar. 2011), a moguće je postići i produženo oslobađanje i zaštitu osetljivih aktivnih sastojaka (Yukuyama i sar., 2016).

1.4. Nanoemulzije kao inovativni nosači kozmetički aktivnih supstanci

1.4.1. Emulzije, nanoemulzije i mikroemulzije – definicija i osnovne karakteristike

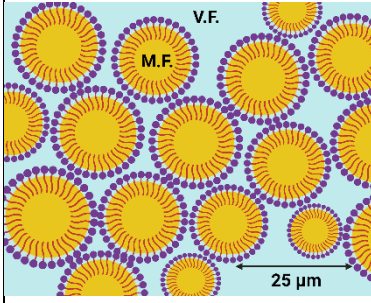
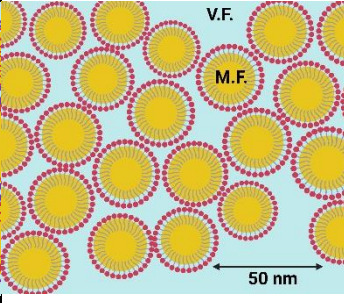
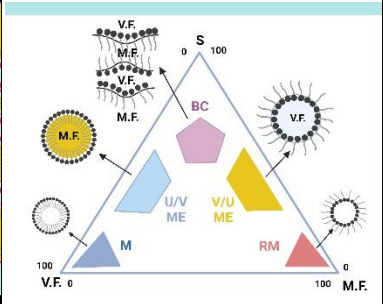
Kada je reč o primeni na koži, emulzioni sistemi različitih vrsta tradicionalno se upotrebljavaju za isporuku lekovitih ili kozmetički aktivnih supstanci, u terapiji kožnih oboljenja, ali i u svakodnevnoj nezi i zaštiti kože. Prema opšte prihvaćenoj definiciji emulzije predstavljaju smešu dve tečnosti koje se međusobno ne mešaju (tj. ulja i vode), pri čemu je jedna faza (unutrašnja, disperzna tj. diskontinuirana faza) dispergovana u drugoj fazi (spoljašnja, kontinuirana faza ili disperzno sredstvo) u vidu kapi koje mogu biti različitih veličina. Ukoliko je veličina kapi unutrašnje faze od 1 do 100 μm , u pitanju su makroemulzije ili uobičajeno, samo emulzije. U zavisnosti od rasporeda faza razlikuju se emulzije ulje u vodi tipa (U/V), voda u ulju (V/U), a postoje i višestruke emulzije (U/V/U ili V/U/V tipa), premda su kada je reč o farmaceutskoj i kozmetičkoj primeni najzastupljenije emulzije U/V tipa. S obzirom da ove dve faze imaju tendenciju da se međusobno razdvoje, kako bi nastala emulzija potrebno je da se u smešu doda emulgator (npr. surfaktanti ili druga amfifilna jedinjenja – lipidi, proteini ili čvrste čestice) koji se pozicionira na granici faza ulje-voda čime se smanjuje međupovršinski napon i povećava stabilnost. Takođe, neophodno je da se sistemu „prinese“ određena energija (upotrebom različitih mešalica ili homogenizatora, u toku procesa emulgovanja ovih faza) kako bi nastala stabilna emulzija (Gupta i sar., 2016).

Istorijski gledano, od submikronskih sistema prvo su otkrivene mikroemulzije, a ubrzo zatim i liposomi (1959 i 1961. godine, redom). Naime, termin mikroemulzija je skovao Schulman koji je nakon više od 10 godina istraživanja pomoću elektronske mikroskopije potvrdio prisustvo optički izotropnih struktura nalik emulzijama nastalih mešanjem vode, ulja i surfaktanta, a koje su transparentne i termodinamički stabilne Njutnovske tečnosti (Schulman i sar., 1959). Kasnija istraživanja su potvrdila da osim sferične (micelarne) strukture sa prosečnim dijametrom od nekoliko do 100 nm, mikroemulzije mogu imati i drugačiju organizaciju (cilindričnu, lamelarnu ili bikontinuiranu) (McClements, 2012). Potom se terminologija dodatno komplikuje, te se od 1983. godine često sreće i termin miniemulzije, koji se odnosi na emulzije sa prosečnom veličinom kapi od 50 do 500 nm, a potom i submikronske emulzije (do 1000 nm). Konačno, smatra se da su Calvo i saradnici po prvi put upotreбили termin nanoemulzija u svom radu iz 1996. godine, iako je zapravo ta reč pomenuta samo u naslovu, dok se u samom tekstu koristi termin submikronska emulzija prosečne veličine kapi od 200 do 250 nm (Calvo i sar., 1996). Tek u periodu od 2000. do 2012. godine termin nanoemulzija dobija jasniju i konstantniju definiciju.

Danas je ustanovljeno mišljenje da nanoemulzije predstavljaju koloidne disperzije dve faze koje se međusobno ne mešaju, pri čemu je uljana faza dispergovana u vodenoj (U/V nanoemulzije) ili obrnuto (V/U nanoemulzije) u vidu finih kapi prosečnog dijametra koji se kreće najčešće od 20 do 200 nm, a prema novijim shvatanjima, dijametar kapi mora biti manji od 100 nm u jednoj ili više dimenzija

(Ashaolu 2021; Wani i sar. 2018). Odabirom odgovarajućih stabilizatora, sastojaka masne i vodene faze i/ili proizvodnog procesa dolazi do drastičnog smanjenja veličine kapi do nano opsega čime se postiže kinetička stabilnost nanoemulzije, tj. generalno bolja fizička stabilnost i veća otpornost prema vidovima nestabilnosti izazvanih silom gravitacije. Prema tome, nanoemulzije mogu biti dugoročno stabilne, iako su termodinamički nestabilne za razliku od relativno srodnih nano-sistema mikroemulzionog tipa (Gupta i sar., 2016; Komaiko i McClements, 2016; Tadros i sar., 2004). U cilju lakše distinkcije različitih vrsta emulzija (makroemulzija, nanoemulzija i mikroemulzija) predlaže se klasifikacija na osnovu veličine kapi i termodinamičke stabilnosti sistema (*Tabela 1.1.*)

Tabela 1.1. Uporedne karakteristike i shematski prikaz strukture makroemulzija, nanoemulzija i mikroemulzija (prilagođeno na osnovu referenci Gupta i sar., 2016, Komaiko i McClements, 2016; Klang i Valenta, 2011)

	Makroemulzije	Nanoemulzije	Mikroemulzije
			
Veličina	1–100 μm	20–500 nm	10–100 nm
Oblik	sferičan	sferičan	sferičan, lamelaran, heksagonalan...
Turbiditet/ Vizuelni izgled	zamućene, mlečno bele	transluentne ili mlečno bele, sa plavim sjajem	transparentne do translucentne
Stabilnost	termodinamički nestabilne, slabo kinetički stabilne	termodinamički nestabilne, kinetički stabilne	termodinamički stabilne
Metoda izrade	visokoenergetske i niskoenergetske metode	visokoenergetske i niskoenergetske metode	niskoenergetske metode
Količina surfaktanta	niska do srednja (< 10 – 20%)	niska do srednja (< 10 – 20%)	relativno visoka (≥ 20%), često neophodni kosurfaktanti
Polidisperznost	često visoka (> 40%)	niska (< 10 – 20%)	niska (< 10%)
Mogućnost razblaživanja	bez promene	bez promene	često narušava strukturu

*S – surfaktant, M.F. – masna faza, V.F. – vodena faza, tipovi mikroemulzija: BC- bikontinuirana mikroemulzija, U/V ME – ulje u vodi mikroemulzija, V/U ME – voda u ulju mikroemulzija, M – micelarna i RM – reverzna micelarna zona hipotetičkog pseudoternarnog faznog dijagrama.

1.4.2. Klasifikacija i osnovni principi metoda za izradu nanoemulzija

Nanoemulzije spadaju u termodinamički nestabilne sisteme, kao i većina disperznih sistema sačinjenih od dve tečnosti koje se spontano ne mešaju, te potrebna je određena količina energije za njihovo formiranje. Slobodna energija koja je potrebna za formiranje nanoemulzije (ΔG) opisana je sledećom jednačinom:

$$\Delta G = \Delta A\gamma - T\Delta S \quad (\text{Jednačina 1.1.})$$

pri čemu $\Delta A\gamma$ predstavlja slobodnu energiju potrebnu da se poveća međupovršina ulje-voda prilikom nanoemulgovanja (gde je γ – međupovršinski napon na granici ulje-voda, ΔA – promena u međupovršini između faza, dok $T\Delta S$ označava energiju koja se odnosi na povećanje broja mogućih uređenja koje zauzimaju nanokapi u formiranoj nanoemulziji (gde je T – temperatura, ΔS – promena entropije).

U sastavu nanoemulzija se nalaze emulgatori i drugi stabilizatori (koemulgatori i korastvarači) koji smanjuju površinski napon na granici faza i olakšavaju formiranje nanoemulzije, pri čemu se sa povećanjem broja nanokapi povećava i dodirna površina (međupovršina) između vodene i masne faze nanoemulzije. Iako se formiranjem nanoemulzije entropija sistema povećava, to povećanje nije dovoljno da se prevaziđe slobodna energija potrebna za povećanje međupovršine na granici faza do koga dolazi formiranjem nanokapi (ΔG ostaje >0), što znači da formiranje nanoemulzija nije spontan proces (Komaiko i McClements, 2016; Tadros i sar., 2004).

Što je manja veličina kapi nanoemulzije to je veća energija koja se mora obezbediti kako bi se uspešno odigrao proces nanoemulgovanja, što proizilazi iz razlike u pritisku unutrašnje i spoljašnje strane dispergovane kapi (Laplasov pritisak), koji je opisan sledećom jednačinom (Shah i sar., 2017):

$$p = 2\gamma/r \quad (\text{Jednačina 1.2.})$$

gde je p – Laplasov pritisak, γ – međupovršinski napon na međufazi ulje-voda, a r – dijametar kapi (podrazumevano da je kap sferičnog oblika).

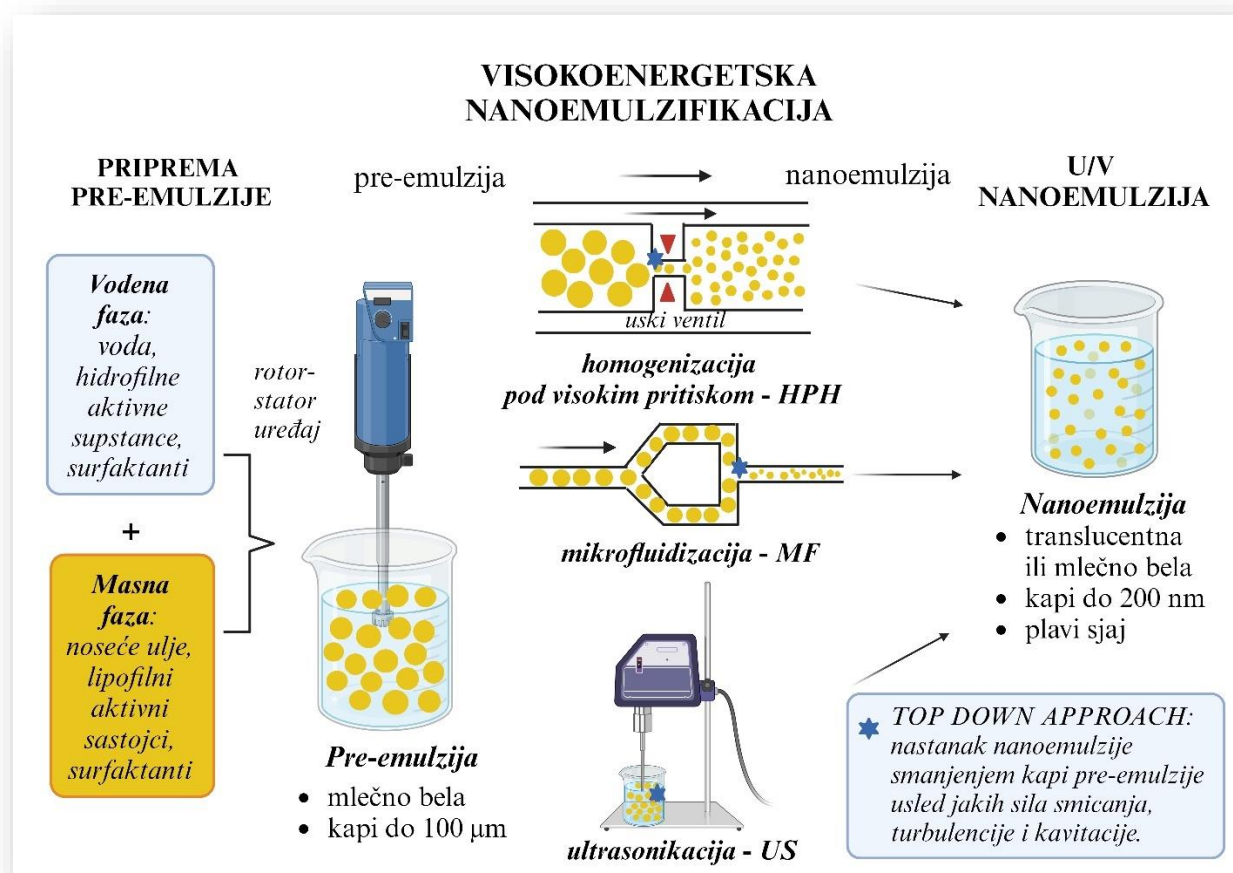
Generalno, postoje dva pristupa kako se slobodna energija može obezbediti za formiranje nanoemulzija – visokoenergetski i niskoenergetski pristup. Pregled najznačajnijih metoda nanoemulzifikacije prikazan je u *Tabeli 1.2.*; shematski prikaz procesa izrade i mehanizama nastanka nanoemulzija upotrebom visokoenergetskih metoda prikazan je na *Slici 1.3.*, a niskoenergetskih metoda, na *Slici 1.4.*

Tabela 1.2. Najznačajnije metode za izradu nanoemulzija – osnovni principi, prednosti i nedostaci. Preuzeto i prilagođeno prema referencama Faria-Silva i sar., 2020 i Yukuyama i sar., 2016

Utrošak energije	Naziv metode	Princip metode	Prednosti	Nedostaci
Visok	Homogenizacija pod visokim pritiskom (HPH)	Propuštanje pre-emulzije kroz posebno dizajnirani uski ventil homogenizatora pod pritiskom – stvaranje jakih sila smicanja, kavitacije i turbulencije rezultira stvaranjem nanokapi.	Fleksibilnost po pitanju sastojaka i niža koncentracija surfaktanta od niskoenergetskih metoda	Visoka cena, nije preporučljiva za osetljive sastojke.
	Mikrofluidizacija (MF)	Propuštanje pre-emulzije kroz interakcionu komoru pod pritiskom, – lomljenje kapi i formiranje nanoemulzije usled jakih sila smicanja, laminarnog i turbulentnog proticanja tečnosti i kavitacije.	Kontrola veličine kapi, moguća izrada različitih tipova emulzija.	Visoka cena, nije predviđena za proizvodnju većih šarži.
	Ultrasonikacija (US)	Uranjanjem sonde ultrasonikatora u pre-emulziju – dolazi do kavitacije (pod uticajem ultrazvuka) i formiranja nanokapi.	Jeftinija od ostalih visokoenergetskih metoda; fleksibilnija po pitanju sastava od niskoenergetskih metoda.	Uglavnom za laboratorijski nivo proizvodnje.
Nizak	Spontano-emulgujući metod (SE)	Brza difuzija molekula surfaktanta, kosurfaktanta i/ili organskih rastvarača u kontinualnu vodenu fazu, bez promene krivine surfaktanta.	Niska cena; postoji potencijal za <i>scale-up</i> ; nema potrebe za zagrevanjem ako su svi sastojci tečni.	Ograničena količina masne faze.
	Metoda inverzije usled promene temperature (PIT)	Promena spontane krivine surfaktanta usled promene temperature (hlađenjem)	Niska cena; postoji potencijal za <i>scale-up</i> .	Ograničeno na nejonske surfaktante; zahteva zagrevanje; teškoće pri brzom hlađenju većih količina proizvoda.
	Metoda inverzije usled promene sastava (PIC)	Promena spontane krivine surfaktanta usled promene sastava (razblaženjem vodenom fazom)	Niska cena; postoji potencijal za <i>scale-up</i> ; nema potrebe za zagrevanjem ako su svi sastojci tečni.	Zahteva titraciju kako bi se formirale ključne prelazne faze (tečno-kristalne, mikroemulzione) koje prethode nastanku nanoemulzije.

Visokoenergetska nanoemulzifikacija

Visokoenergetska nanoemulzifikacija bazirana je na upotrebi menahičkih uređaja (npr. homogenizator pod visokim pritiskom, mikrofluidizer, ultrasonikator i sl.) koji dovode do stvaranja intenzivnih sila poput turbulencije, kavitacije i smicanja, pri čemu se kapi pre-emulzije (makrometarskih dimenzija) redukuju do nanokapi, zbog čega se ovaj pristup drugačije naziva i “**top-down approach**” (Slika 1.3.). Visokoenergetski pristup karakteriše visok utrošak energije (10^8 - 10^{10} W kg⁻¹), a s obzirom da svega oko 0,1% te energije odlazi na samu emulzifikaciju upitna je energetska efikasnost i ekonomičnost ovakvog pristupa (Azmi i sar., 2019; Gupta i sar., 2016). Dodatno, jedan deo energije se pretvara u toplotu koja zagreva nastalu nanoemulziju, što može biti problem za termolabilne sastojke, ali se može prevazići uvođenjem sistema za hlađenje (Chong i sar., 2018; Espitia i sar., 2018). Kao glavne prednosti visokoenergetskog pristupa ističu se mogućnost upotrebe manje koncentracije surfaktanta i šira paleta kozmetičkih sastojaka u odnosu na niskoenergetske metode (Gothani i Prasert, 2014; Solans i Solè, 2012). Kada je reč o laboratorijskom nivou proizvodnje nanoemulzija, najčešće se koriste homogenizacija pod visokim pritiskom i ultrasonikacija, dok na industrijskom nivou dominiraju homogenizacija pod visokim pritiskom i mikrofluidizacija (Azmi i sar., 2019; Gupta i sar., 2016; Sonnevile-Aubrun i sar., 2018).



Slika 1.3. Shematski prikaz procesa izrade i mehanizama nastanka nanoemulzija upotrebom visokoenergetskih metoda – homogenizacija pod visokim pritiskom (HPH), mikrofluidizacija (MF) i ultrasonikacija (US). Preuzeto i prilagođeno prema referenci Nikolić i sar., 2020.

1.4.2.1. Homogenizacija pod visokim pritiskom (engl. *high pressure homogenization* – HPH)

Nanoemulzifikacija putem HPH metode započinje pripremom pre-emulzije (makrometarskih veličina kapi) mešanjem surfaktanata, masne faze i vodene faze najčešće pomoću rotor-stator uređaja, a potom se pre-emulzija prinudno propušta kroz posebno dizajnirani uski ventil homogenizatora pod pritiskom od 50 do 150 MPa. Ovaj proces se tipično ponavlja više puta dok se ne formiraju uniformne nanokapi željene veličine kao rezultat kombinacije intenzivnih sila koje razbijaju kapi pre-emulzije, kao što su sile smicanja, kavitacija i turbulentno proticanje (Salem i Ezzat, 2018). Glavni procesni parametri koji utiču na finalnu veličinu kapi su pritisak, temperatura i broj prolazaka kroz homogenizator (tzv. broj ciklusa), pri čemu generalno veličina kapi opada sa povećanjem broja ciklusa sve dok se ne dostigne plato minimalne veličine kapi, nakon čega dolazi do neželjenog povećanja kapi sa povećanjem broja ciklusa (engl. *over-processing*). Naime, finalna veličina kapi zavisi od dva međusobno suprotna procesa koja se odvijaju paralelno: razbijanje mikrometarskih kapi pre-emulzije i koalescencija koja se povećava usled intenzivnih sila koje se javljaju tokom HPH procesa. Dodatno, tokom ovog procesa ključnu ulogu ima izbor i koncentracija odgovarajućih stabilizatora (surfaktanata), budući da sa jedne strane oni snižavaju površinski napon čime se olakšava razbijanje kapi pre-emulzije do nanokapi, a sa druge strane sprečavaju koalescenciju pozicioniranjem na granici faza ulje/voda. Temperatura i pritisak takođe utiču na veličinu kapi u ovom procesu, smanjujući njihovu veličinu kada se temperatura ili pritisak poveća (Maali i Mosavian, 2012). Pored odgovarajućeg stabilizatora, veoma važni formulacioni parametri su viskozitet masne i vodene faze (Gupta i sar., 2016).

1.4.2.2. Mikrofluidizacija (engl. *microfluidization* – MF)

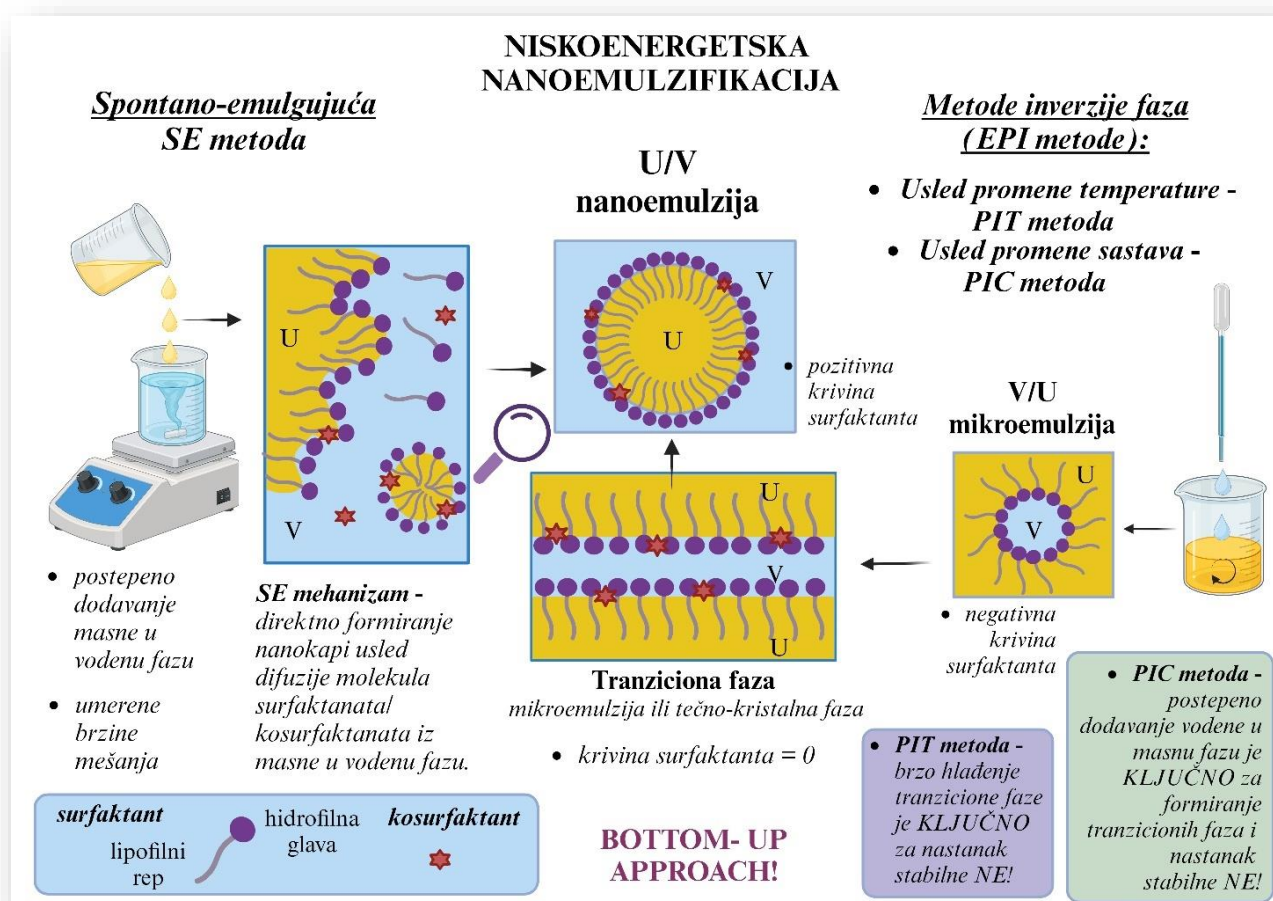
Slično kao kod HPH metode, kod MF prethodno pripremljena pre-emulzija se propušta kroz interakcionu komoru pod pritiskom koja se sastoji od dva odvojena protočna kanala. Zbog specifičnog dizajna kanala, dva toka pre-emulzije se sudaraju velikom brzinom, stvarajući velike sile smicanja, što rezultira lomljenjem kapi i formiranjem nanoemulzije usled dva glavna tipa proticanja (laminarno i turbulentno) i pod uticajem sila kavitacije. Željena veličina i distribucija kapi se postižu višestrukim ponavljanjem postupka, pod uslovom da je prisutna dovoljna količina surfaktanta da obavije novonastale nanokapi (Salem i Ezzat 2018; Salvia-Trujillo i sar., 2013). U zavisnosti od dizajna uređaja, moguća je i direktna izrada bez pripreme pre-emulzije, direktnim ubrizgavanjem disperzne faze u kontinualnu fazu kroz mikrokanale, što je prednost u odnosu na HPH metodu (Vladisavljevic i sar., 2012). S obzirom da su HPH i MF metode bazirane na sličnim principima, najčešće su međusobno zamenljive, a takođe su obe primenljive u laboratorijskim i industrijskim uslovima (Salem i Ezzat 2018; Salvia-Trujillo i sar., 2013).

1.4.2.3. Ultrasonikacija (engl. *ultrasonication* – US)

US podrazumeva umetanje sonde sonikatora u pre-emulziju, mada moguća je varijanta i bez pripreme pre-emulzije. Sonda stvara zvučne talase visoke frekvencije (> 20 kHz), izazivajući udarne talase koji dovode do turbulencije usled kavitacije u okolnoj tečnosti. Mehaničke vibracije dovode do stvaranja mlazova tečnosti velikom brzinom, dok kolaps mikromehurića stvara intenzivne disruptivne sile koje dovode do lomljenja kapi i formiranja nanokapi (Rinaldi i sar., 2017). Veličina kapi se značajno smanjuje kada se poveća intenzitet ultrazvučnih talasa, vreme obrade ultrazvukom, nivo snage i koncentracija surfaktanta, dok prekomerna obrada može da izazove koalescenciju i nestabilnost kapi (Azmi i sar., 2019). Količina surfaktanta i viskozitet masne i vodene faze su među važnim parametrima u formiranju nanoemulzije, stoga ih treba precizno optimizovati. US ima nekoliko prednosti, kao što su jednostavna manipulacija i jeftinija oprema, čišćenje i servisiranje (Rebolleda i sar., 2015). Glavni nedostatak US je proizvodnja malih serija na laboratorijskom nivou. Takođe, US može dovesti do denaturacije proteina, depolimerizacije polisaharida i oksidacije lipida tokom homogenizacije (Salem i Ezzat, 2018).

Niskoenergetska nanoemulzifikacija

Niskoenergetska nanoemulzifikacija bazirana je na svojstvu pojedinih surfaktanata da se organizuju tako da nastaju nanokapi, pod uticajem hemijske energije koja se oslobađa zahvaljujući pažljivo odabranim sastojcima, uz minimalno mešanje na specifičan način (Slika 1.4.). Prema tome, niskoenergetski pristup dominantno je zavisan od sastava formulacije, odnosno, limitiran je na pojedine surfaktante, ulja i aditive (Solans i Solè, 2012). Ovakav pristup zahteva dobro poznavanje ključnih karakteristika (npr. molekulska geometrija, rastvorljivost) surfaktanata i drugih površinski aktivnih molekula (npr. poliola), kao i kontrolu međufaznih fenomena na granici vodene i uljane faze nanoemulzije (Chang i McClements, 2014). S obzirom da primenom niskoenergetskih metoda nanokapi nastaju direktno (npr. kod spontanog emulgovanja) ili prolaskom kroz odgovarajuće tranzicione faze – mikroemulzione ili tečno kristalne (npr. kod metode inverzije faza) ovaj pristup naziva se još i “**bottom-up approach**” (Solans i Solè, 2012).



Slika 1.4. Shematski prikaz najznačajnijih niskoenergetskih metoda nanoemulzifikacije: bez promene spontane krivine surfaktanta – spontano-emulgujuća metoda (SE) i metode inverzije faza: usled promene temperature (PIT metoda) ili usled promene sastava (PIC metoda).

Jedna od glavnih prednosti niskoenergetskog pristupa je mogućnost izrade nanoemulzija pomoću jednostavne, ekonomične i lako dostupne opreme (npr. magnetna mešalica ili vorteks mikser), a nanoemulzifikacija se postiže primenom malih brzina mešanja, budući da je neophodan utrošak energije znatno niži (10^3 - 10^5 W kg⁻¹) nego kod visokoenergetskog pristupa. Dodatna prednost je mogućnost izrade bez zagrevanja, na sobnoj temperaturi, pod uslovom da su svi sastojci u tečnom agregatnom stanju (Espitia i sar., 2018; Gothani i Prasert, 2014). Prema tome ove metode se smatraju posebno korisnim za termoosetljive i prirodne sastojke, kao što su prirodna ulja i ekstrakti (Chang i McClements, 2014; Solans i Solè, 2012).

Kao glavni nedostaci ovakvog pristupa ističu se nedovoljno poznavanje mehanizama koji su zaslužni za niskoenergetsku nanoemulzifikaciju i limitiran sastav formulacije, budući da je proces veoma osetljiv na minimalne promene u sastavu i nedovoljno podataka o mogućnostima *scale up*-a. Takođe, ovakav pristup zahteva veće koncentracije surfaktanata (tipično između 10 i 20%) i/ili dodatak kosurfaktanata (npr. poliola) što može povećati rizik od pojave iritacije na koži (Azmi i sar., 2019; Gupta i sar., 2016; Salem i Ezzat, 2018).

Klasifikacija niskoenergetskih metoda je ponekad nejasna, kao posledica činjenice da mehanizmi formiranja niskoenergetskih nanoemulzija još uvek nisu u potpunosti shvaćeni. Generalno, najšire prihvaćen pristup za klasifikaciju zasniva se na tome da li tokom formiranja nanoemulzije dolazi do inverzije faza usled transformacije spontane krivine molekula surfaktanta ili ne (Solans i Solè, 2012). U slučaju da nema transformacije, govori se o *spontano-emulgujućoj metodi (SE)*, koja se ponekad označava kao samoemulzifikacija, dok ukoliko dolazi do inverzije faza reč je o EPI metodama. U zavisnosti od toga šta je izazvalo inverziju, postoje dve varijante: metoda inverzije faza usled promene temperature (*engl. phase inversion temperature – PIT*) ili metoda inverzije usled promene sastava sastojaka (*engl. phase inversion composition – PIC*).

1.4.2.4. Spontano-emulgujuća metoda (*engl. spontaneous emulsification – SE*)

SE metoda izvodi se veoma jednostavno: organska faza (smeša surfaktanta, ulja i organskog rastvarača rastvorljivog u vodi) se postepeno dodaje u vodenu fazu uz kontinuirano mešanje, a ultrafine nanokapi se formiraju kao rezultat brze difuzije molekula surfaktanta, kosurfaktanta i/ili organskih rastvarača u kontinualnu vodenu fazu, bez promene krivine surfaktanta (Anton i Vandamme, 2009; Chang i McClements, 2014). Smatra se da je okidač za ovaj fenomen gradijent hemijskog potencijala između faza, koji pod određenim uslovima dovodi do negativne vrednosti slobodne energije potrebne za nanoemulzifikaciju. Pored difuzije, smatra se da postoji i doprinos drugih faktora kao što je međufazna turbulencija ili lokalno sniženje međupovršinskog napona (Solans i sar., 2016). Studije koje su se bavile izradom SE nanoemulzija kao nosača za prirodna ulja (ulje kore pomorandže i ulje kore limuna) pokazale su da su koncentracija i tip surfaktanta (polietoksilovanih derivata sorbitana), kao i sastav masne faze ključni formulacioni parametri koji određuju fizičko-hemijske karakteristike i stabilnost sistema (Chang i McClements, 2014; Zhong i sar., 2017). U slučaju da se koristi organski rastvarač kao kosurfaktant tokom SE procesa, potrebno ga je ukloniti na kraju procesa kako bi se obezbedio odgovarajući kvalitet nanoemulzija, ali uvek postoji rizik od rezidua rastvarača. Dodatno, kao ograničenje ove metode često se navodi i relativno mala količina masne faze koja se može inkorporirati u ulje u vodi nanoemulziju (najčešće do 10%) (Sonneville-Aubrun i sar., 2018, Yukuyama i sar., 2016).

1.4.2.5. Metoda inverzije usled promene temperature (*engl. phase inversion temperature – PIT*)

Jedna od najstarijih niskoenergetskih metoda za dobijanje kozmetičkih nanoemulzija je PIT metoda koja je bazirana na principima prvi put objašnjenim od strane Shinode i saradnika 60-tih godina prošlog veka (Shinoda i Saito, 1968). PIT metoda je bazirana na promeni rastvorljivosti pojedinih surfaktanata (polietoksilovanih nejonskih, npr. polisorbit 80, PEG-30/40/60 ricinusovo ulje i polioksietilen-4 lauril etar) pod uticajem promene temperature. Naime, pomenuti surfaktanti su na sobnoj temperaturi rastvorljivi u vodi usled hidratacije višestruko etoksiliranih lanaca, dok sa povećanjem temperature dolazi do njihove dehidratacije što za posledicu ima smanjenje rastvorljivosti. Na određenoj temperaturi (tzv. PIT temperatura) uspostavlja se balans rastvorljivosti surfaktanata u vodenoj i masnoj fazi što rezultira time da je srednja vrednost spontane krivine surfaktanta jednaka nuli, tj. dolazi do drastičnog smanjenja površinskog napona na granici faza (10^{-2} - 10^{-5} mN·m⁻¹), te dolazi do prelaza emulzije U/V tipa u bikontinuiranu mikroemulziju ili tečno-kristalnu strukturu (tzv. tranziciona ili prelazna faza). Daljim povećanjem temperature surfaktanti postaju više rastvorljivi u masnoj fazi te dolazi do inverzije faza i nastanka emulzije V/U tipa.

Prema tome, kako bi došlo do nastanka nanoemulzije U/V tipa, potrebno je prvo zagrejati smešu surfaktanta, masne i vodene faze nekoliko stepeni iznad PIT temperature, a zatim sprovesti naglo hlađenje tranzicione faze niskog površinskog napona, kako bi usled brzog prelaza surfaktanata iz masne u vodenu fazu nastale kapi nanometarskih veličina ujednačene distribucije (Anton i Vandamme, 2009; Solans i Solè, 2012). Kasnije su postale aktuelnije varijante kada se zagrevanje sastojaka izvodi na nekoliko stepeni ispod PIT temperature, što je označeno kao sub-PIT metoda (Dario i sar., 2016). S obzirom da je kod PIT metode neophodno zagrevanje ova metoda je energetski neefikasnija u odnosu na druge niskoenergetske metode i nije pogodna za termoosetljive sastojke. Takođe, prilikom čuvanja proizvoda mora se voditi računa o temperaturi, jer približavanje PIT temperaturi može dovesti do koalescencije. Kao nedostatak se navode i problemi sa *scale up*-om, usled teže izvodljivosti brzog hlađenja veće količine smeše sastojaka (Sonneville-Aubrun i sar., 2018; Yukuyama i sar., 2016).

1.4.2.6. Metoda inverzije usled promene sastava (*engl. phase inversion composition – PIC*)

PIC metoda je bazirana na sličnim faznim tranzicijama kao i PIT, ali su one izazvane promenama u sastavu do kojih dolazi prilikom procesa razblaživanja smeše surfaktanta i/ili kosurfaktanata i masne faze postepenim dodavanjem vodene faze. Naime, razblaživanje izaziva promenu spontane krivine surfaktanta i inverziju faza slično kao u slučaju PIT metode, a u literaturi su dokumentovane različite vrste tranzicionih faza, od tečno-kristalnih mezomorfni faza lamelarne (Guevara i sar., 2023) ili kubne strukture (Solè i sar., 2008) do mikroemulzija bikontinuiranog tipa (Solè i sar., 2012). Iako sami mehanizmi nastanka nisu do kraja razjašnjeni, smatra se da je neophodni preduslov nizak međupovršinski napon i odgovarajuća kinetika inverzije koji rezultiraju kompletnom solubilizacijom masne faze u tečno-kristalnoj ili mikroemulzionoj tranzicionoj fazi (Sonneville-Aubrun et al., 2009; Maestro i sar., 2008, Solè i sar., 2012). Prema tome, PIC metoda podrazumeva intenzivna istraživanja faznog ponašanja i konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama za svaku kombinaciju smeša surfaktanata, masne faze i vodene faze (*engl. surfactant-oil-water – SOW*) kako bi se identifikovao region čijim daljim razblaženjem nastaje nanoemulzija.

Glavna prednost PIC metode ogleda se u mogućnosti upotrebe šire palete surfaktanata (nejonskih, katjonskih i anjonskih) i ostalih sastojaka, čak i termolabilnih, dokle god su svi sastojci u tečnom stanju ili su lako rastvorljivi u vodenoj/ masnoj fazi. S obzirom da se nanoemulzifikacija odigrava bez zagrevanja ili uz minimalno zagrevanje (do 45°C) uz umerene brzine mešanja, PIC metoda predstavlja energetski efikasniji pristup od PIT metode. Patenti L'Oreal grupacije svedoče o versatilnosti PIC tehnologije preko dvadeset godina, a kao prednost navode čitav niz biljnih ulja i aditiva koji se mogu

inkorporirati u nanoemulzije (Aubrun-Sonneville 2014; Dubief i sar. 2009; Ribier i sar., 1995). Takođe, renomirani proizvođač kozmetičkih sirovina Evonik je izbacio na tržište koncentrat koji razblaživanjem vodom postaje nanoemulzija, uz mogućnost dodatka određenih aditiva u vodenu i masnu fazu. U publikaciji koja je dostupna javnosti objašnjava se detaljnije sam mehanizam PIC nanoemulzifikacije na kojoj se bazira ovaj proizvod, s tim da ga autori nazivaju *phase inversion concentration method*, aludirajući na kritičnu koncentraciju vodene faze pri kojoj dolazi do faznog prelaza (Heunemann i sar., 2011). Kada je reč o procesnim parametrima, smatra se da su najznačajniji brzina dodavanja vodene faze, brzina mešanja i geometrija suda, a moraju se podešavati od slučaja do slučaja (Yukuyama i sar., 2016). Ipak, kako bi se omogućila proizvodnja većih šarži nanoemulzija primenom PIC metode potrebne su dodatne studije koje se tiču efikasnije kontrole procesa i *scale-up-a*.

1.5. Sastav nanoemulzija i ključni formulacioni parametri za niskoenergetsku nanoemulzifikaciju

Pored izbora odgovarajuće metode izrade i procesnih parametara, formulacioni parametri, kao što su osobine i odnos masne faze, vodene faze i surfaktanata, predstavljaju ključne parametre koji utiču na konačne karakteristike i performanse nanoemulzija (Azmi i sar. 2019; Gothani i Prasert 2014; Gupta i sar., 2016). Formulacioni parametri su od presudnog značaja kada je reč o niskoenergetskim metodama izrade budući da su one upravo bazirane na pažljivom odabiru svih sastojaka. Zbog toga je potrebno veliku pažnju posvetiti formulacionim istraživanjima kako bi niskoenergetske metode nanoemulzifikacije dokazale svoj puni potencijal za komercijalizaciju.

1.5.1. Surfaktanti i kosurfaktanti

1.5.1.1. Definicija i klasifikacija surfaktanata

Postoji nekoliko razloga za nedostatak fizičke i/ili hemijske stabilnosti u nanoemulzionim sistemima. Glavni razlog je izbor surfaktanata, tj. površinski aktivnih materija, imajući u vidu njihovu ključnu ulogu u procesu formiranja i dugoročnoj stabilnosti nanoemulzija. Sa strukturne tačke gledišta, surfaktanti su molekuli koji se sastoje od hidrofilne glave i hidrofobnog (lipofilnog repa) te prema tome imaju afinitet i prema hidrofilnim i prema lipofilnim supstancama (tzv. amfifili). Jedinstvena svojstva surfaktanata povezana su sa načinom na koji su oba funkcionalna dela povezana međusobno (Kjellin i Johansson, 2010), odnosno, zavise od geometrije surfaktanta koja se najčešće izražava preko kritičnog parametra pakovanja (*engl. critical packing parameter – cpp*) koji predstavlja količnik volumena hidrofobnog repa (V) i proizvoda poprečnog preseka glave (a) i dužine nepolarnog lanca (l) (Komaiko i McClements, 2016). Veza između vrednosti parametra pakovanja i oblika agregata surfaktanata je dobro poznata. Naime, ukoliko je nepolarni rep mnogo veći od polarne glave ($cpp > 1$) monosloj surfaktanta se orijentiše ka spolja te nastaju reverzne micelle ili V/U emulzije, a u suprotnom (kada je $cpp < 1$) monosloj se organizuje tako što su polarne glave ka spolja te nastaju micelle ili U/V emulzije. U slučaju da je $cpp \sim 1$ favorizovan je nastanak dvosloja surfaktanata i vezikula (Komaiko i McClements, 2016).

Druga podela surfaktanata koja je od značaja za razvoj formulacija bazirana je na hidrofilno-lipofilnom broju (HLB), pri čemu HLB vrednost od 1–10 odgovara lipofilnim, a vrednost > 10 odgovara hidrofilnim surfaktantima. Odavno je ustanovljena i dodatna klasifikacija surfaktanata u 5 kategorija na osnovu njihove funkcionalnosti: voda u ulju emulgatori (HLB 3,5-6), sredstva za kvašenje (HLB 7-9), ulje u vodi emulgatori (HLB 8–18), deterdženti (HLB 13–15), solubilizatori (HLB 15-18) (Davies, 1957). Međutim, ova podela je uopštena i ne daje informacije o ponašanju surfaktanata u različitim temperaturnim uslovima ili u slučaju kompleksnog sastava emulzije. Generalno, za nastanak U/V nanoemulzija koje su zastupljenije kada je reč o kozmetičkoj primeni preporučuju se surfaktanti ili smeše surfaktanata HLB vrednosti 10–15 (Komaiko i McClements, 2016; Marhmati i sar., 2021), iako taj

podatak ne znači mnogo imajući u vidu da su važniji parametri poput geometrije molekula ili interakcija sa drugim sastojcima formulacije (npr. masnom fazom).

Kako bi se prevazišli ovi nedostaci, uveden je pojam hidrofilno-lipofilne devijacije surfaktanata (*engl. hydrophilic-lipophilic deviation*–HLD), kao neimenovanog broja koji opisuje afinitet surfaktanta ka vodenoj ili masnoj fazi, uzimajući u obzir prirodu kompletne surfaktant-ulje-voda smeše (npr. tipa surfaktanta i masne faze, sastava vodene faze – pH, jonska jačina, salinitet...), prisustva kosurfaktanata, ali i uslova (npr. temperature) (Salager i sar., 2005).

Naime, HLD vrednost nejonskog surfaktanta se izračunava prema formuli:

$$HLD = \alpha - EON + b \times S - k \times ACN + c(T - Tref) + aA \quad (\text{Jednačina 1.3.})$$

gde su α , EON, k i c parametri karakteristični za svaki pojedinačni surfaktant, S – salinitet vodene faze (izražen u masenim procentima), b – osetljivost formulacionog balansa na prisustvo soli, ACN – broj ugljenikovih atoma (ukoliko je parafinsko ulje masna faza), a ukoliko je drugo ulje, koristi se EACN – efektivni alkalni karbonski broj (*engl. effective alkan carbone number*), kao parametar koji ukazuje na polarnost ulja, T je realna temperatura, a $Tref$ je referentna temperatura (25°C), A je koncentracija eventualno prisutnog kosurfaktanta (najčešće alkohola) izražena u masenim procentima, dok je a odgovarajući parametar osetljivosti koji zavisi od surfaktanta i kosurfaktanta.

Za anjonske surfaktante, važi slična jednačina:

$$HLD = \sigma + \ln S - k \times ACN + c(T - Tref) + aA \quad (\text{Jednačina 1.4.})$$

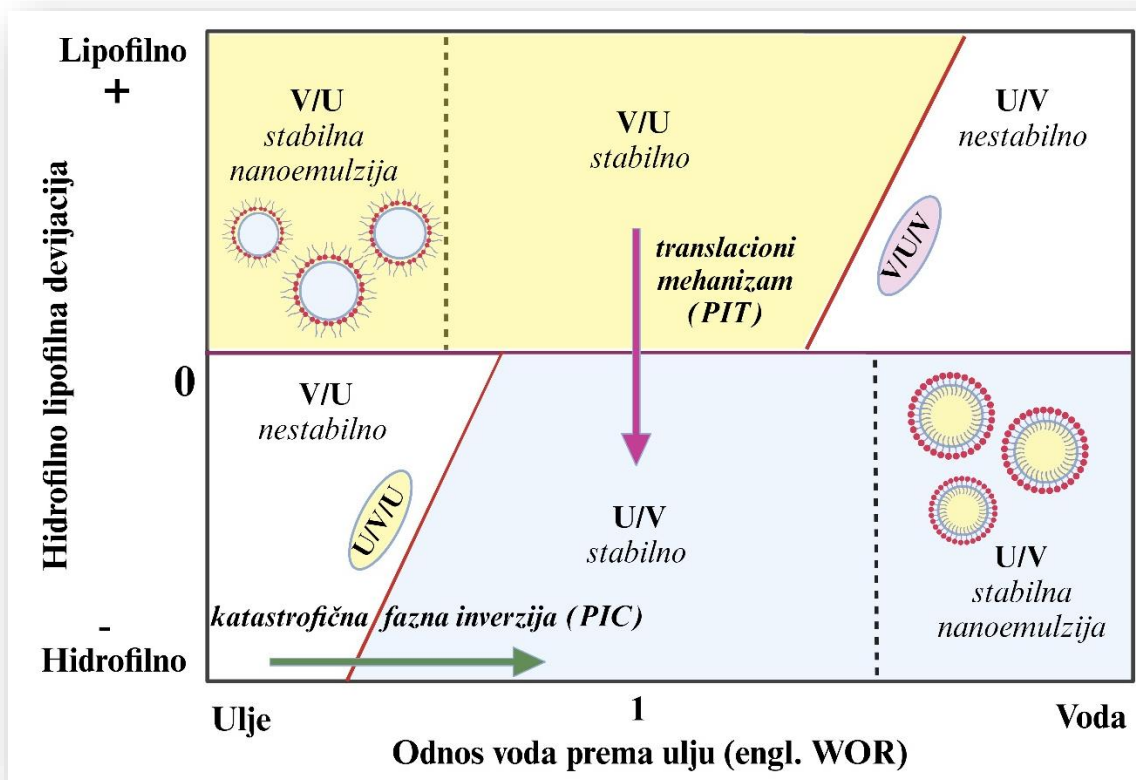
gde je σ parametar koji se koristi umesto α iz prethodne jednačine.

U slučaju tzv. optimalne formulacije afinitet surfaktanta prema lipofilnoj i hidrofilnoj pseudofazi je podjednak i spontana krivina surfaktanta jednaka nuli, odnosno, HLD je jednako 0. Svaka promena sistema, npr. promena tipa surfaktanta ili masne faze, dodatak kosurfaktanta, promena saliniteta ili temperature dovodi do udaljavanja od te optimalne formulacije, odnosno, do pozitivne ili negativne HLD vrednosti, usled povećanja lipofilnog ili hidrofilnog ponašanja surfaktanta (Kunz i sar, 2009). Ova klasifikacija prikazana je u *Tabeli 1.3.* i posebno je korisna za razumevanje formiranja nanoemulzija pomoću određenih niskoenergetskih metoda jer omogućava kategorizaciju uslova koji dovode do inverzije faza.

Tabela 1.3. Klasifikacija surfaktanata na osnovu njihove HLD vrednosti i prikaz odgovarajućih formiranih mikrostruktura. Adaptirano prema referenci Komaiko i McClements, 2016.

HLD	Afinitet surfaktanta	Formirana mikrostruktura	Tip emulzije
HLD < 0	Veći afinitet prema vodi nego prema ulju	Micele u vodi	U/V emulzije
HLD = 0	Podjednak afinitet prema vodi i ulju	Bikontinuirane mikroemulzije ili tečno-kristalne faze	Ni U/V ni V/U
HLD > 0	Veći afinitet prema ulju nego prema vodi	Reverzne micele u ulju	V/U emulzije

Na *Slici 1.5.* prikazana je dvodimenzionalna mapa afiniteta surfaktanta (HLD) u odnosu na sastav sistema, tj. odnosa vode prema ulju (engl. *water-to-oil ratio* – WOR), koja se često koristi u cilju lakše identifikacije regiona gde nastaju stabilne nanoemulzije. U zavisnosti od toga šta izaziva promenu sistema, do inverzije faza može doći putem translacionog mehanizma (usled promene temperature, kao u slučaju PIT metode ili sastava formulacije: tip surfaktanta, pH, salinitet...) ili putem katastrofične inverzije faza usled promene WOR, kao u slučaju PIC metode (Komaiko i Mc Clements, 2016).



Slika 1.5. Mapa hidrofилno lipofilne devijacije u zavisnosti od odnosa vode prema ulju i prikaz nastanka stabilne U/V nanoemulzije pomoću translacionog mehanizma ili katastrofične fazne inverzije. Adaptirano prema referenci Komaiko i McClements, 2016.

Još jedna podela surfaktanata od značaja u praktičnom razvoju formulacija je podela prema naelektrisanju polarnog dela molekula. U tom smislu surfaktanti se klasifikuju na anjonske (negativno naelektrisani), katjonske (pozitivno naelektrisani) ili amfoterne (mogu biti pozitivno i negativno naelektrisani, u zavisnosti od pH vrednosti, ili su u obliku cviterjona u izoelektričnoj tački) i nejonske (ne sadrže jonske grupe, već njihova hidrofилna svojstva potiču najčešće od atoma kiseonika koji grade vodonične veze sa molekulima vode). Najčešće upotrebljavani surfaktanti bez obzira na način izrade U/V nanoemulzija su hidrofилni nejonski surfaktanti male molekulske mase i visoke HLB vrednosti, tačnije polietoksilovani derivati sorbitana i oleinske kiseline (polisorbat 80 tj. Tween® 80) ili laurinske kiseline (polisorbat 20, tj. Tween® 20). Polisorbati su generalno poznati po svojoj pogodnosti za primenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji zahvaljujući svojoj versatilnosti i dobroj kompatibilnosti sa raznim biljnim i sintetskim uljima i ostalim sastojcima, a odlikuje ih i dobar bezbednosni profil (Mayer i sar., 2013; Walker i sar., 2015a).

1.5.1.2. Koncentracija i odnos surfaktanata/kosurfaktanta

Pored tipa surfaktanta za nastanak i kvalitet nanoemulzija ključni parametri su: odnos surfaktanta i masne faze (engl. *surfactant-to-oil ratio*, tj. SOR), kao i odnos surfaktanta i emulzije (engl. *surfactant-to-emulsion ratio*, tj. SER), odnosno koncentracija surfaktanta. Generalno, kada se za izradu nanoemulzija koriste visokoenergetske metode moguće je koristiti manje koncentracije surfaktanta, pa su i SOR i SER vrednosti niže, dok je u slučaju niskoenergetskih metoda SOR najčešće ≥ 1 i SER između 10 i 20, što može biti ograničavajuće za pojedine vrste primene. Takođe, optimalne SOR i SER vrednosti zavise i od prisustva drugih sastojaka aktivnih na granici faza, kao što su korastvarači, ali i od sastava masne faze, te je u praksi vrlo čest slučaj da se usled promene sastava masne faze moraju dodatno prilagođavati SOR i SER kako bi došlo do uspešnog nanoemulgovanja.

Naime, kako bi nastala stabilna nanoemulzija potrebno je da postoji dovoljna količina surfaktanta, a povećanjem koncentracije upotrebljenog surfaktanta generalno se postiže smanjenje veličine kapi (Saber i sar., 2013). Ipak, nakon postizanja određene minimalne veličine nanokapi, dalje povećanje koncentracije surfaktanta najčešće vodi ka suprotnom efektu. Postoji nekoliko objašnjenja za ovaj fenomen, na primer, usled povećanja viskoziteta smeše masne faze i surfaktanta može doći do usporavanja procesa nanoemulzifikacije, ili do formiranja višeslojnog omotača surfaktanta na granici faza. Takođe, može doći do formiranja tečno-kristalnih agregata od viška molekula surfaktanata u vodenoj fazi koji koegzistiraju sa nanokapima, što dovodi do destabilizacije nanoemulzije (Walker i sar., 2015b).

S obzirom da monosloj jednog surfaktanta najčešće nije dovoljan da obezbedi dugoročnu stabilizaciju nanoemulzija, polisorbati se često kombinuju sa različitim kosurfaktantima, npr. lipofilnim derivatima sorbitana (sorbitan monooleat – Span[®] 80 ili sorbitan monolaurat – Span[®] 20) kako bi se snizila HLB vrednost Tween[®]-Span[®] smeše i prilagodila HLB vrednosti prirodnih ulja, čime se posledično smanjuje veličina kapi nanoemulzija i povećava fizičko-hemijska stabilnost (Chong i sar. 2018, Zhong i sar., 2017). Drugi često korišćeni kosurfaktant u kombinaciji sa polisorbitom 80 je lecitin soje (fosfolipid) koji se pozicionira na međupovršini ulje-voda čime povećava zeta potencijal na površini kapi i omogućava elektrostatičku stabilizaciju nanoemulzija. Takođe, postoje dokazi da lecitin doprinosi i povećanju oksidativne stabilnosti nanoemulzija (Pan i sar., 2013).

U cilju poboljšane stabilnosti putem mehanizma elektrosterne stabilizacije, moguće je dodati i malu količinu anjonskog ili katjonskog kosurfaktanta. U studiji koja se bavila kombinacijom anjonskog kosurfaktanta dilauril citrata, sa poligliceril-4 lauratom kao glavnim, nejonskim surfaktantom, fenoksietanolom kao korastvaračem i dietilheksil karbonatom kao masnom fazom, potvrđeno je formiranje niskoenergetskih nanoemulzija PIC metodom na sobnoj temperaturi. Ovaj komercijalno dostupni koncentrat koji spontano formira nanoemulziju jednostavnim razblaživanjem vodom zamišljen je kao nosač za razne kozmetički aktivne sastojke (Heumman i sar. 2011). Takođe, moguća je i upotreba katjonskih surfaktanata, na primer, cetiltrimetilamonijum hlorida, u kombinaciji sa polietoksilovanim etrima kao glavnim, nejonskim surfaktantima, te su ove katjonske nanoemulzije pripremljene niskoenergetskom sub-PIT metodom, kao prospektivni nosač za prirodni antioksidans kvercetin (Dario i sar, 2016).

1.5.2. Korastvarači

Korastvarači se često upotrebljavaju u formulacijama nanoemulzija, zbog toga što mogu da menjaju osobine vodenih rastvora (viskozitet, gustinu, površinsku aktivnost i rastvorljivost), odnosno, utiču na strukturnu organizaciju rastvora surfaktanata (npr. optimalna krivina surfaktanta, kritična micelarna koncentracija i fazno ponašanje) što je naročito od značaja za niskoenergetsku nanoemulzifikaciju. Najčešće se upotrebljavaju kratkolančani alkoholi propilenglikol i glicerol, a pomenuti poliol utiču na smanjenje veličine kapi nanoemulzija uz povećanje transparentnosti i/ili na smanjenje koncentracije surfaktanta neophodnog za formiranje nanoemulzije (Saber i sar, 2013; Szumala i sar. 2015; Wakisaka i sar., 2015). Posebna pogodnost je to što oni deluju i kao humektansi i rastvarači za kozmetički aktivne supstance, bez negativnog uticaja na reološke karakteristike proizvoda (Ashaoulu, 2021). Još jedan korastvarač koji se pokazao veoma korisnim u formulacijama niskoenergetskih nanoemulzija je fenoksietanol, za koji je dokazano da promovise nastanak nanoemulzija izrađenih upotrebom PIC niskoenergetske metode (Heuneman i sar., 2011), a takođe u kozmetičkim proizvodima ima i ulogu konzervansa. Ipak, veza između tipa i koncentracije upotrebljenog korastvarača i karakteristika nastale nanoemulzije je kompleksna, te je neophodno da se ispita fazno ponašanje smeše surfaktant/korastvarač–ulje–voda kako bi se pronašla optimalna koncentracija korastvarača za svaku formulaciju ponaosob.

1.5.3. Masna faza

Sastav masne faze je jedan od najvažnijih formulacionih parametara koji određuje fizičko-hemijske i aplikativne karakteristike kao i stabilnost nanoemulzije. Karakteristike ulja koje se uobičajeno uzimaju u obzir prilikom njihovog odabira kao potencijalnog sastojaka masne faze nanoemulzija su: hemijska struktura, viskozitet, polarnost ulja i površinski napon (Azmi i sar., 2019; Komaiko i McClements, 2016). Generalno je ustanovljeno da su ulja manje polarnosti pogodnija za razvoj formulacija nanoemulzija jer se na taj način izbegava Ostvaldovo „sazrevanje“ kao jedan od glavnih vidova nestabilnosti, te se smatra da barem 50% masne faze moraju činiti nepolarna ulja (Barreto i sar., 2017). Viskozitet ulja takođe mora biti odgovarajući kako bi se omogućilo formiranje nanokapi i u tom smislu su pogodnija ulja manjeg viskoziteta (Tadros i sar., 2004). Ipak, novije studije su pokazale da nema korelacije između veličine čestica nastale nanoemulzije i fizičko-hemijskih karakteristika ulja: indeksa prelamanja, gustine, površinskog napona ili viskoziteta ulja (Komaiko i McClements, 2015; Saber i sar. 2014). Ovi rezultati sugerišu da je važnije fazno ponašanje konkretnog surfaktant–ulje–vodenog sistema, a ne fizičko-hemijska svojstva ulja kada je reč o formiranju ispitivanih niskoenergetskih nanoemulzija.

Pregledom literature evidentno je da su kaprilno-kaprinski trigliceridi srednje dužine lanca (srednje polarnosti), a potom i trigliceridi veće dužine lanca (nepolarno ulje) najčešći sastojci masne faze nanoemulzija, bez obzira na način izrade. Naime, oni su kompatibilni sa brojnim surfaktantima, a takođe su odlično noseće ulje (*engl. carrier oil*) za izolovane kozmetički aktivne sastojke (npr. alfa-tokoferol, beta-karoten, gama-orizanol) (Hategakimana i sar., 2015; Qian i sar., 2012; Zhong i sar., 2017). Ostala ulja koja se često koriste su estri (izopropil miristat, izopropilpalmitat) ili alkani (izododekan, izoheksadekan, decil oleat) (Sonneville-Aubrun i sar., 2018).

Međutim, u posljednje vreme se sve više istražuju prirodna ulja sa višestrukim benefitima po zdravlje kože (npr. emolijentni, antioksidativni, UV-protektivni, antimikrobni efekat), sa ciljem da delimično ili u potpunosti zamene sintetska jedinjenja, ali i radi njihove sopstvene stabilizacije inkorporiranjem u nanoemulzije U/V tipa. Dosadašnje studije koje su izvršene sa suncokretovim, kukuruznim, maslinovim uljem, uljem pšeničnih klica, uljem ljuske riže, ili uljem dobijenim iz semenki bobičastog voća ukazuju da pod određenim uslovima ona mogu da se koriste kao izvor triglicerida umesto tradicionalno upotrebljivanih triglicerida srednje ili veće dužine lanca (Bernardi i sar., 2011; Pereira i sar., 2016; Rebolleda i sar., 2015). Pored toga ova ulja sadrže prirodno prisutne tokoferole, karotenoide, fitosterole, fenolna jedinjenja itd., čime i sama imaju ulogu kozmetički aktivnih sastojaka pogodnih za izradu *anti-age* kozmetičkih sastojaka, ili proizvoda za antioksidativnu zaštitu kože.

Inkorporiranje etarskih ulja u U/V nanoemulzije predstavlja još jedno interesantno polje istraživanja, imajući u vidu da se radi o smešama aromatičnih i isparljivih jedinjenja, koja se moraju koristiti isključivo u veoma niskim koncentracijama na koži kako bi se izbegla iritacija. Prema tome, mešanjem etarskih ulja sa nosećim uljem tipa kaprilno-kaprinskih triglicerida (ili biljnim uljem koje je bogato trigliceridima) omogućava se njihovo inkorporiranje u U/V nanoemulziju. Sa druge strane etarska ulja često i sama ispoljavaju ulogu kosurfaktanta/korastvarača na granici faza ulje-voda čime mogu pospešiti nastanak nanoemulzije. Dodatno, inkorporiranjem u nanoemulzioni nosač, očekuje se zaštita bioaktivnosti etarskih ulja, imajući u vidu da mnoga od njih ispoljavaju antioksidativni, antimikrobni, antiinflamatorni efekat, kao i brojne druge efekte koji su od značaja za kozmetičku primenu. U cilju očuvanja stabilnosti etarskih ulja logičan izbor predstavljaju niskoenergetske nanoemulzije, te je većina publikacija upravo i razmatrala takav pristup. Primer etarskih ulja koja su uspešno inkorporirana u U/V nanoemulzije su etarsko ulje pomorandže (Chang i McClements, 2014) i etarsko ulje limuna (Lou i sar., 2017), u oba slučaja uz mešanje u odnosu 1:1 sa kaprilno-kaprinskim trigliceridima kao nosećim uljem, uz Tween[®] 80 kao surfaktant. Etarsko ulje lavande je uspešno iskombinovano sa uljem pasiflore kao prirodnim nosećim uljem i stabilizovano u nanoemulziji sa Tween[®] 80/Span[®] 80 kombinacijom, a slično kao u prethodnim studijama optimalan odnos etarskog i nosećeg ulja bio je 1:1 (Rocha-Filho i sar., 2014).

1.5.4. Vodena faza

Vodena faza U/V nanoemulzija je najvećim delom sačinjena od visokoprečišćene vode, ali se često u vodenu fazu pre nanoemulgovanja dodaju polioli (glicerol, propilen glikol i sl.) koji imaju multifunkcionalnu ulogu (korastvarač, kosurfaktant, humektans...) (Chong i sar., 2018; Saberi i sar., 2014; Su i sar., 2017). U poslednje vreme aktuelno je i dodavanje hidroglikolnih biljnih ekstrakata u vodenu fazu, čime se sa jedne strane koriste benefiti poliola, a sa druge strane se uvode prirodni bioaktivni sastojci koji imaju raznolike uloge u kozmetičkim proizvodima.

Grupa autora iz Brazila je ispitivala ekstrakte brojnih biljaka ovog podneblja koje se tradicionalno upotrebljavaju u kozmetičkim formulacijama sa antioksidativnim, *anti-age* i umirujućim efektom. U prvoj studiji koja se bavila izradom nanoemulzija PIT metodom stabilizovanih kombinacijom PEG-40 ricinusovo ulje i Span[®] 80, sa babasu uljem (INCI: *Orbignya oleifera seed oil*) kao masnom fazom, ispitivana je mogućnost dodatka hidrofилnih ekstrakata biljaka (INCI: *Areca catechu seed extract*, *Glycyrrhiza glabra root extract*, *Portulaca oleracea extract*) u vodenu fazu. Zaključeno je da dodatak ovih ekstrakata ne narušava stabilnost polu-transparentnih U/V nanoemulzija veoma finih veličina kapi (~45 nm), dok je na osnovu *in vitro* i *in vivo* procene (npr. hidratacija, masnoća i pH kože) pokazano da ove formulacije mogu biti pogodne za primenu na koži (Rocha-Filho i sar., 2017).

U drugoj studiji U/V nanoemulzije stabilizovane kombinacijom Tween 80/ Span 80 su proizvedene kombinacijom PIT metode i homogenizacije rotor-stator uređajem. Masna faza je sadržala tradicionalne sintetske emolijense (kaprilno-kaprinski trigliceridi, etilheksil palmitat, C12-15 alkil benzoat, tečni parafin), smešu fenoksietanola i kaprilil glikola – konzervansi i korastvarači/kosurfaktanti i butilhidroksitoluen – lipofilni antioksidans, dok su u vodenoj fazi pored prečišćene vode i ekstrakta biljke *Opuntia ficus-indica* prisutni, dinatrijum edetat – hidrofilni antioksidans i ksantan guma – kostabilizator i reološki modifikator. Nastale U/V nanoemulzije su bile beličaste boje usled prosečnih veličina kapi (92,2 do 233,6 nm) i prihvatljivih vrednosti indeksa polidisperznosti (PDI~0,2), a pokazale su i zadovoljavajuću stabilnost nakon 60 dana čuvanja (naročito na 4°C), uz značajne promene veličina kapi na 25°C i 40°C, ali bez grubog narušavanja fizičko-hemijske stabilnosti nanoemulzija. Dodatno, *in vivo* studijom na humanim dobrovoljcima je dokazano da nanoemulzija sa dodatim ekstraktom ima veći efekat hidratacije *stratum corneum*-a tokom 5h- studije u odnosu na čistu nanoemulziju, kao i u odnosu na komercijalno dostupnu nanoemulziju, čime je sa jedne strane potvrđen doprinos samog ekstrakta, a sa druge strane doprinos testirane nanoemulzije formulacije u odnosu na komercijalnu (Ribeiro i sar., 2015).

U trećoj studiji izvršena je priprema polisaharidne frakcije iz industrijskog otpada koji nastaje obradom lista biljke *Agave sisalana*, sa ciljem da se ispita mogućnost korišćenja ovog ekstrakta za izradu nanoemulzija za primenu na koži. Nakon što je pokazano da dobijeni ekstrakt ne ispoljava citotoksičnost i fototoksičnost (*in vitro* testovima) niti iritacije na koži dobrovoljaca (*in vivo* ispitivanje), izrađene su nanoemulzije metodom ultrasonikacije uz stabilizatore Tween 80/Span 80. Interesantno je da je bilo moguće inkorporirati do 40% masne faze (sačinjene od kaprilno-kaprinskih triglicerida, etilheksil palmitata i izostearil neopentanoata u različitim odnosima, uz BHT kao lipofilni antioksidans), a vodena faza je sadržala pored vode dinatrijum edetat i biljni ekstrakt. Rezultujuće optimalne nanoemulzije sa ili bez ekstrakta agave imale su prosečne veličine kapi ~170 nm i PDI ~ 0,1 i bile su stabilne 90 dana na 4°C i 25°C. Obe formulacije su pokazale i efekat hidratacije kože u toku 5h-studije, pri čemu je veću efikasnost pokazala nanoemulzija sa dodatkom ekstrakta, što ukazuje da ispitivani ekstrakt agave doprinosi hidratantnom efektu (Barreto i sar., 2017). Autori ove studije ukazuju da se korišćenjem industrijskog otpada za potpuno nove namene kao što je farmaceutska i kozmetička primena može uticati na rešavanje problema industrijskog otpada uz istovremeno kreiranje inovativnih proizvoda sa dodatnom vrednošću.

1.5.5. Kozmetički aktivne supstance

Na osnovu prethodno diskutovanih publikacija koje se tiču sastava nanoemulzija jasno je da je moguće inkorporiranje raznih lipofilnih i hidrofilnih sastojaka, kao i da njihov dodatak može značajno da utiče na stabilnost samih nanoemulzionih nosača i obrnuto. Pored već pomenutih biljnih ulja i ekstrakata kao i izolovanih jedinjenja iz prirodnih izvora, nanoemulzije se često preporučuju za inkorporiranje sintetskih kozmetički aktivnih supstanci koje se tradicionalno koriste za negu i zaštitu kože.

Na primer, od liposolubilnih jedinjenja u nanoemulzije do sada su uspešno inkorporirani: vitamin E – alfa-tokoferol (Hategakimana i sar., 2015) i tokoferil acetat (Teo i sar., 2010), askorbil palmitat (vitamin C) (Fratter i sar., 2011), karotenoidi (beta karoten) (Mao i sar., 2009) i astaksantin (Kim i sar., 2012 poglavlje), koenzim Q10 (Tou i sar., 2019). S obzirom da i ove studije govore u prilog tome da U/V nanoemulzije kao nosači omogućavaju optimizaciju upotrebe lipofilnih sastojaka prevođenjem u hidrofilniji oblik koji je pogodniji za primenu na koži, uz istovremeno postizanje stabilizacije i/ili kontrolisanog oslobađanja aktivnih sastojaka, jasno je da će uslediti brojna nova istraživanja u budućnosti.

1.6. Stabilnost nanoemulzija

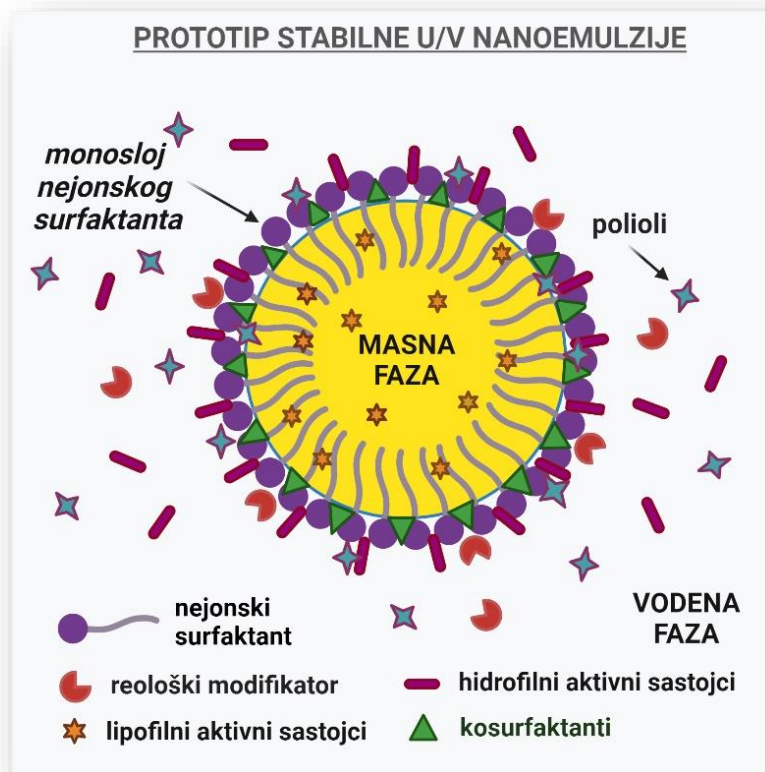
Nanoemulzije predstavljaju termodinamički nestabilne sisteme, s obzirom da je slobodna energija nastale nanoemulzije viša nego slobodna energija pojedinačnih faza (masne i vodene). Prema tome, sistem teži da se vrati u niže energetska stanje, pa je neizbežno razdvajanje faza nakon određenog vremenskog perioda, što u velikoj meri zavisi od razlika slobodne energije nastale nanoemulzije i odvojenih faza. Naime, što je viša energetska barijera između ova dva stanja, to će nanoemulzija duže trajati, a smatra se da bi energetska barijera trebalo da bude veća od 20 kT kako bi nastala nanoemulzija sa dugotrajnom stabilnošću. Visina energetske barijere je uglavnom određena fizičko-hemijskim fenomenima koji sprečavaju kapi da dođu u kontakt, kao što su odbojne hidrodinamičke i koloidne (npr. sterne i elektrostatičke) interakcije između kapi masne faze (McClements, 2012).

Brzina kojom se nanoemulzija vraća nazad u razdvojene faze je takođe određena učestalošću kojom kapi ulja dolaze u kontakt jedna sa drugom, što zavisi od primarnog mehanizma odgovornog za kontakte između kapi (npr. Braunovo kretanje, sila gravitacije ili intenzitet mešanja). Međutim, ukoliko nanoemulzija ostaje u tzv. metastabilnom stanju duži vremenski period smatramo da je kinetički stabilna (McClements, 2012).

Glavni vidovi nestabilnosti nanoemulzija su: flokulacija, koalescencija, Ostvaldovo „sazrevanje“ (engl. *Ostwald ripening*) i na kraju raslojavanje koje vodi do separacije faza. Kada je reč o flokulaciji, kapi masne faze dolaze u blizak kontakt usled privlačnih interakcija i dalje se kreću kao jedna celina, za razliku od koalescencije do koje dolazi kada se više kapi spoji u jednu veću kap. Sloj surfaktanta oko kapi nanoemulzija suprotstavlja se ovom procesu, pri čemu se jača sterna stabilizacija postiže kada je sloj surfaktanta približno oko 10 nm, tj. kada je uporediv sa veličinom stabilizovane kapi ulja (Gupta i sar., 2016). Ostvaldovo „sazrevanje“ je glavni mehanizam destabilizacije U/V nanoemulzija bez obzira na način njihovog dobijanja, a predstavlja povećanje broja većih kapi nanoemulzije uz istovremeno smanjenje broja i veličine malih kapi nanoemulzije. Uzrok ovog fenomena je razlika u hemijskom potencijalu kapi masne faze različitih veličina, a budući da je hemijski potencijal veći u kapima manjih veličina, dolazi do masenog transfera manjih ka većim kapima. Jedan od ključnih faktora koji određuje brzinu Ostvaldovog „sazrevanja“ je rastvorljivost masne faze u kontinuiranoj vodenoj fazi, što se može iskoristiti u cilju usporavanja ovog procesa, tako što se u masnu fazu nanoemulzije obavezno dodaje hidrofobno ulje.

Poznato je i da su nanoemulzije stabilnije od klasičnih emulzija kada je reč o destabilizacionim fenomenima uzrokovanim silom gravitacije (npr. raslojavanje i sedimentacija), posebno kada je veličina kapi nanoemulzije < 90 nm, s obzirom da je tada izraženije Braunovo kretanje (engl. *Brownian motion*) u odnosu na silu gravitacije (McClements, 2012). Drugim rečima, tek kada usled neefikasne sterne stabilizacije ili izraženog Ostvaldovog „sazrevanja“ veličina kapi nanoemulzija poraste do mikrometarskih veličina, dolazi do finalnih ireverzibilnih destabilizacionih procesa i konačnog „rušenja“ nanoemulzije.

U cilju sprečavanja svih vidova nestabilnosti preporučuje se i kreiranje debljeg sloja surfaktanta, kao i uvođenje kosurfaktanata, polimernih emulgatora i drugih stabilizatora (Gupta i sar., 2016, Yukuyama i sar., 2015), kao što je prikazano na *Slici 1.6*.



Slika 1.6. Shematski prikaz prototipa stabilne nanoemulzije sa nejonskim surfaktantima, kosurfaktantima, kao i različitim hidrofilnim i lipofilnim aktivnim sastojcima.

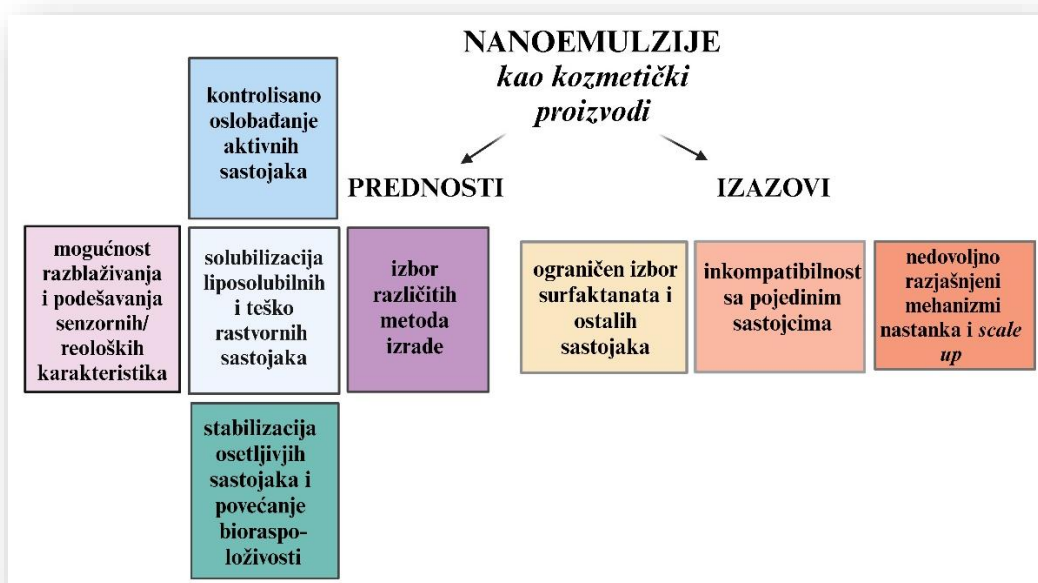
U zaključku, može se istaći da je moguće kreirati dugoročno stabilne nanoemulzije čija stabilnost se meri godinama, uzimajući u obzir razne parametre pomenute u navedenim studijama (Mc Clements, 2012; Gupta i sar., 2016; Yukuyama i sar., 2015) koji se koriste za kontrolu stabilnosti nanoemulzija:

- Veličina kapi (poželjno ispod 90 nm) i uska distribucija veličina kapi (poželjno PDI <0,15) u cilju inhibicije Ostvaldovog „sazrevanja“ i destabilišućih fenomena izazvanih gravitacijom,
- Temperatura proizvodnje i čuvanja nanoemulzija (posebno od značaja kod PIT i HPH metoda),
- Jonska jačina kontinuirane vodene faze nanoemulzija (povećanje jonske jačine dovodi do smanjenja repulsivne barijere između kapi i posledično do flokulacije/ koalescencije),
- Rastvorljivost masne faze (moraju biti u sastavu masne faze i hidrofobna ulja u cilju prevencije Ostvaldovog „sazrevanja“),
- Koncentracija aditiva (dodatak polimernih stabilizatora ili reoloških modifikatora, npr. kod nanoemulgela),
- Koncentracija surfaktanta (dovoljna da se obezbedi „deblji“ sloj oko kapi),
- Hemijska struktura svih komponenata, uključujući i (kozmetički) aktivne supstance.

1.7. Nanoemulzije kao kozmetički proizvodi – prednosti i izazovi

1.7.1. Prednosti nanoemulzija kao kozmetičkih proizvoda

Kao i druge grane industrije koje zavise od prodaje tj. od zadovoljstva krajnjih korisnika, kozmetička industrija mora da se oslanja na inovacije kako bi išla u korak sa vremenom. U tom smislu, smatra se da nanotehnoški pristup ima brojne benefite u poređenju sa konvencionalnim tehnologijama, te da se upotrebom nanoemulzija može uspešno odgovoriti na povećanu potražnju na tržištu za inovativnim i kvalitetnim kozmetičkim proizvodima koji poseduju poboljšane performanse i stabilnost (Faria-Silva i sar., 2020; Pandey, 2020) Takođe, od značaja je i činjenica da se nanoemulzije mogu pripremiti uz poštovanje principa održivog razvoja, korišćenjem prirodnih sirovina i ekoloških proizvodnih procesa (Barbulova i sar., 2015; Philippe i sar., 2012). Pregled glavnih prednosti i izazova nanoemulzija kao kozmetičkih proizvoda prikazan je na *Slici 1.7.*



Slika 1.7. Nanoemulzije kao kozmetički proizvodi – prednosti i izazovi

Nanoemulzije nude niz prednosti kada je reč o primeni na koži:

- (i) prijatan vizuelni izgled, s obzirom da mogu biti transparentne ili translucetne (ukoliko je veličina kapi ispod 100 nm) ili mlečno bele boje (veličina kapi iznad 100 nm) uz karakteristični plavi sjaj (Gupta i sar., 2016)
- (ii) mogućnost izrade različitih vrsta kozmetičkih proizvoda: tečni proizvodi (serumi, sprejovi, tonici ili polučvrsti (kremovi, krem-gelovi, gelovi) različitih funkcionalnih i senzornih atributa (Faria-Silva i sar., 2020);
- (iii) mogućnost inkorporiranja lipofilnih, hidrofilnih ili amfifilnih sastojaka s obzirom da nanoemulzije sadrže masnu (uljanu), vodenu fazu i međufazni region na granici faza (Pandey, 2020; Sonnevile-Aubrun i sar., 2018)

- (iv) s obzirom na malu veličinu nanokapi, povećan je odnos površine prema volumenu (engl. *surface-to-volume ratio*), olakšano je formiranje kompaktnog i homogenog filma nanokapi na koži, čime se poboljšava hidratacija kože i/ ili penetracija aktivnih sastojaka (Kong i sar., 2011; Mahdi i sar. 2011)
- (v) modificirano ili produženo oslobađanje i zaštita osjetljivih aktivnih sastojaka (Gupta i sar., 2016; Yukuyama i sar., 2016)

Među ostalim istaknutim prednostima nanoemulzija u odnosu na druge nanonosače ističe se i činjenica da je potrebna manja količina surfaktanata i/ili kosurfaktanata (5%–15%) za izradu nanoemulzija u poređenju sa mikroemulzijama, čime se smanjuje i mogućnost za iritaciju kože, kao i cena proizvoda (Pavoni i sar., 2020; Pereira i sar., 2016). Imajući u vidu povećanu potražnju za prirodnim proizvodima na tržištu od velikog značaja je činjenica da se nanoemulzije mogu pripremiti od biokompatibilnih surfaktanata i ulja prirodnog porekla (Demisli i sar., 2020), a takođe postoji mogućnost dodatka hidrofilnih ekstrakata u vodenu fazu (Damasceno i sar., 2016), što ih čini univerzalnom platformom za isporuku raznih prirodnih aktivnih sastojaka koji su veoma traženi sastojci kozmetičkih proizvoda. Dodatno, sa tehnološkog aspekta posebnu prednost predstavlja i činjenica da se nanoemulzije mogu izraditi i niskoenergetskim metodama (slično kao i mikroemulzije), bez skupe opreme i sa malim utroškom energije (npr. izrada bez zagrevanja), što ceo proces čini veoma atraktivnim iz ekoloških i ekonomskih razloga.

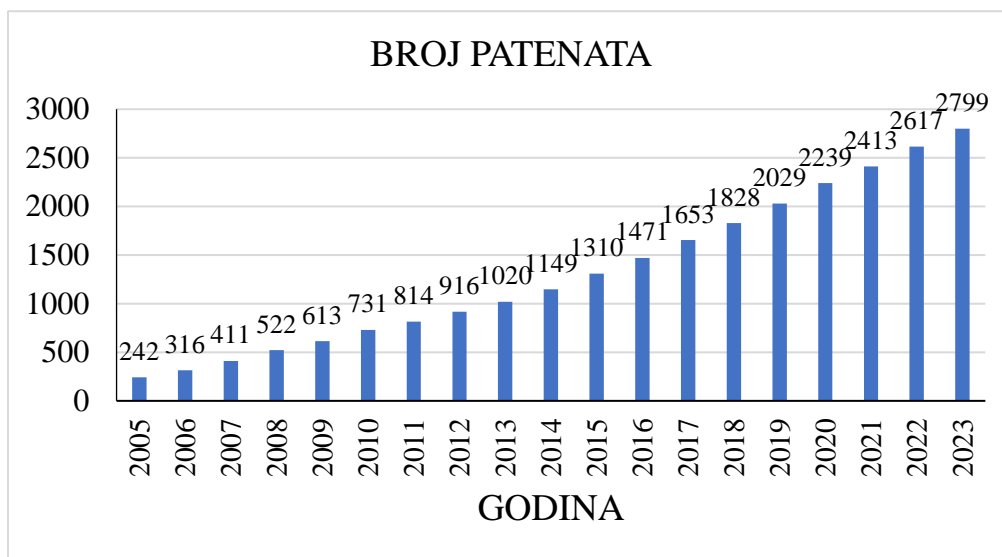
1.7.2. Izazovi u proizvodnji nanoemulzija

Ipak, kada je reč o proizvodnji nanoemulzija postoje i dalje određeni izazovi koji nisu prevaziđeni te su potrebna nova rešenja kako bi se podstakla proizvodnja nanokozmetike. Naime, kao glavni nedostatak se ističe neophodnost pažljivog prilagođavanja proizvodnog procesa konkretnom sastavu formulacije, s obzirom da nisu sva ulja, surfaktanti i aktivni sastojci pogodni za nanoemulgovanje. Visokoenergetski načini proizvodnje, konkretno, homogenizacija pod visokim pritiskom i mikrofluidizacija, dominiraju u patentnim prijavama i u industriji jer omogućavaju upotrebu šire palete sastojaka uz niže koncentracije stabilizatora, međutim, ovakav pristup nije pogodan za sastojke osjetljive na povišenoj temperaturi, na povišen pritisak i velike brzine smicanja, a takođe je i skup zbog neophodne opreme. Sa druge strane, niskoenergetske metode koje predstavljaju metode izbora za osjetljive i prirodne sastojke veoma su limitirane u pogledu sastava same formulacije, pa je potrebno dobro poznavanje fizičko-hemijskih osobina i faznog ponašanja ključnih sastojaka nanoemulzije (surfaktant-ulje-voda). Naime, potrebno je pažljivo podešavanje načina dodavanja sastojaka kako bi došlo do formiranja stabilne nanoemulzije, što limitira veličinu proizvodne šarže (npr. do 1L), što se ne može smatrati industrijskim nivoom (Sonneville-Auburn i sar., 2018; Yukuyama i sar., 2016). Takođe, primećene su inkompatibilije sa pojedinim kozmetičkim sastojcima, npr. pigmentima, polimerima, polivalentnim solima, a takođe postoji osjetljivost na promene pH vrednosti, kao i na sastojke koji mogu da deluju na granici faza ulje-voda (Sonneville-Auburn i sar., 2018).

Konačno, aspekt bezbednosti nanoemulzija se mora ozbiljno razmotriti, imajući u vidu da se zbog veoma malih veličina kapi nanoemulzije očekuje lakše prodiranje aktivnih sastojaka u kožu u odnosu na klasične emulzije. Dakle, treba imati u vidu da prema definiciji kozmetičkog proizvoda u EU (kao i u našoj zemlji) kozmetički proizvodi ne služe za lečenje, te prema tome penetracija kozmetički aktivnih sastojaka i u slučaju nanoemulzija mora biti stogo kontrolisana, tj. ograničena na nivo epidermisa i eventualno dermisa (Ferraris i sar., 2021; Mohd-Setapar i sar., 2022). Takođe, s obzirom da je u slučaju niskoenergetskih nanoemulzija potrebno upotrebiti veće koncentracije surfaktanta nego u slučaju makroemulzija i visokoenergetskih nanoemulzija, mora se proceniti i potencijal za iritaciju kože koji potiče od interakcije surfaktanata sa ljudskom kožom (Seweryn 2018).

1.7.3. Stanje nanoemulzija na tržištu kozmetičkih proizvoda

U prilog tome da prednosti nanoemulzija kao inovativnih nosača u kozmetici sve više prevazilaze izazove govore mnogobrojna istraživanja i patenti. Naime, kao što je prikazano na *Slici 1.8.* kao rezultat intenzivnih istraživanja broj patenata koji se tiču kozmetičkih proizvoda na bazi nanoemulzija je u konstantnom porastu, posebno od 2005. godine do kraja 2023. godine kada je broj patenata od skromnih 242 (za period od 1990. do 2005. godine) dostigao čak 2799 (zaključno sa krajem 2023. godine). Kompanije lideri koje se posebno ističu u patentiranju nanoemulzija su L’Oreal, Symrise, Henkel, BASF, Amorepacific i Procter&Gamble (<https://worldwide.espacenet.com/patent/search>). Gledajući namenu kozmetičkih proizvoda tipa nanoemulzija koji se sreću u naučnoj literaturi i u patentima najčešće su zastupljeni *anti-age* proizvodi, proizvodi za hidrataciju suve kože, proizvodi za zaštitu od sunca, kao i proizvodi za negu kose (Mohd-Setapar i sar., 2022; Sonnevile-Aubrun i sar., 2018).



Slika 1.8. Ukupan broj patenata u Espacenet bazi podataka dobijenih kao rezultat pretrage prema ključnoj reči – cosmetic nanoemulsion, za period od početka 2005. do kraja 2023. godine.

Najpoznatiji primeri nanoemulzija koje su proizvele renomirane kozmetičke kuće, a koje su među prvima i lansirale nanoemulzije na tržište su: Kerastase Aqua Oleum (L’Oreal) – nanoemulzija u spreju za hidrataciju kose; Solution Destressante (Chanel) – umirujuća nanoemulzija za lice; Bepanthol-Protect Facial Cream Ultra nanoemulsion (Bayer) – zaštitna nanoemulzija za lice (Faria-Silva, 2020; Mohd-Setapar, 2022). Međutim, danas se i manje poznati proizvođači, a posebno korejski proizvođači, opredeljuju za plasman ovakvih inovativnih proizvoda, kako bi se istakli na sve zahtevnijem tržištu. Neki od novijih primera popularnih nanoemulzionih kozmetičkih proizvoda su: NanoVital VITANICS Whitening Cream (Vitacos Corporation) i Double A Skin Brightener Face Serum (Nano Cosmetics) – nanoemulziona krema i serum za izbeljivanje kože; Coni Hyaluronic Acid & Nanoemulsion Intensive Hydration Toner (Coni Beauty) – nanoemulzioni tonik za hidrataciju kože i HANACURE Nano Emulsion Moisturizer – nanoemulzija za hidrataciju kože) (<https://www.hanacure.com/products/multi-peptide-nano-emulsion>; <https://mynanoskin.com/product-category/double-a-series/>; <http://www.vitacos.co.kr/en/brand-story/nanovital-cosmetics>).

Iz svega prethodno navedenog deluju veoma opravdana očekivanja da će trend nanokozmetike biti jedan od najuspešnijih trendova budućnosti, s obzirom da pored tehnološke naprednosti ovakvi proizvodi mogu biti izrađeni potpuno u skladu sa trendom i principima prirodne kozmetike, uz izbor odgovarajućih prirodnih sastojaka i niskoenergetskih procesa proizvodnje koji su još uvek nedovoljno eksploatisani.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Generalni cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je razvoj niskoenergetskih nanoemulzija postupkom inverzije faza usled promene sastava (engl. *phase inversion composition method* – PIC metodom na sobnoj temperaturi) na bazi novih prirodnih poliglicerilskih surfaktanata i tradicionalno korišćenog polisorbata 80 kao prospektivnih nosača za ulje semena maline. Istraživanje je bilo fokusirano na razumevanje kompleksnih interakcija svih ključnih formulacionih faktora koji su u osnovi nastanka ovih koloidnih sistema (izbor surfaktanata, kosurfaktanata, lipofilnih i hidrofilnih aditiva). Takođe, prelazne koloidne faze koje su se pokazale kao ključne za dobijanje niskoenergetskih nanoemulzija bile su podvrgnute detaljnoj karakterizaciji u cilju rasvetljavanja mehanizma nastanka niskoenergetskih nanoemulzija primenom odabrane PIC metode. Konačno, dobijene optimalne formulacije nanoemulzija podvrgnute su proceni stabilnosti, kao i *in vitro/in vivo* proceni efikasnosti i biokompatibilnosti, imajući u vidu njihovu potencijalnu upotrebu kao kozmetičkih proizvoda za negu i antioksidativnu zaštitu kože.

Kako bi bio ispunjen generalni cilj, disertacija je imala nekoliko potciljeva, čija je realizacija sprovedena kroz više eksperimentalnih faza.

2.1. Cilj prve faze eksperimentalnog rada

Prva faza istraživanja imala je za cilj ispitivanje faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu surfaktant/masna faza/ vodena faza. U tom cilju, planirana je analiza faznog ponašanja pseudoternarnih sistema uz primenu često korišćenog surfaktanta, polisorbata 80, koji je standardni izbor među surfaktantima za izradu nanoemulzija i mikroemulzija, dok je kao glavni sastojak masne faze cilj bio da se testiraju 4 različite vrste ulja semena maline (hladno ceđena ulja: iz standardne agrikulture, rafinisano ili organsko, nerafinisano i CO₂-ekstrahovana ulja: nerafinisano, iz standardne agrikulture ili nerafinisano, organsko), uz treću komponentu, visokoprečišćenu vodu. Nakon identifikacije ključnih formulacionih parametara: odnos surfaktanta i masne faze (engl. *surfactant-to-oil ratio* – SOR) i odnos surfaktanta prema emulziji (engl. *surfactant-to-emulsion ratio* – SER), te optimizacije masne faze nanoemulzija uvođenjem estara (izostearil izostearat, tokoferil acetat), kao i optimizacije vodene faze (dodatkom glicerola ili prirodnih hidroglikolih ekstrakata ploda maline/ hrasta kitnjaka), dalji cilj rada bio je da se detaljno okarakterišu PIC mehanizmi formiranja nanoemulzija, odnosno sprovede karakterizacija detektovanih prelaznih gel faza i finalnih nanoemulzija na bazi polisorbata 80. U tom smislu, anticipirana je implementacija palete komplementarnih metoda, kao što su mikroskopske tehnike (optička mikroskopija i mikroskopija atomskih sila), foton korelaciona spektroskopija, reološka merenja – oscilatorna i kontinualna, merenje električne provodljivosti, pH vrednosti itd.). Dodatno, namera je bila da se primenom Ramanske spektroskopije detektuju fine razlike u sastavu različitih ulja semena maline, kao i eventualne interakcije među sastojcima nanoemulzije. Kao ishod ove faze istraživanja planirano je da se izvrši finalni odabir jedne vrste ulja semena maline za sva ostala ispitivanja, tj. za izradu svih vrsta nanoemulzija.

2.2. Cilj druge faze eksperimentalnog rada

Cilj druge faze eksperimentalnog rada bio je usmeren na ispitivanje mogućnosti dobijanja niskoenergetskih nanoemulzija sa prirodnim poliglicerilskim surfaktantima, kao novijim prospektivnim kozmetičkim sastojcima pogodnim za formulaciju prirodne kozmetike. Slično kao i u prvoj fazi, najpre je planirano ispitivanje faznog ponašanja poliglicerilskih surfaktanata, budući da nisu dovoljno zastupljeni u nanoemulzijama. Identifikovani su optimalni sastojci – kosurfaktant 1 (fenoksietanol, etilheksilglicerol) ili kosurfaktant 2 (parfemsko ulje maline), lipofilni aditivi (etilheksil pelargonat) i hidrofilni aditivi (glicerol i ekstrakti ploda maline ili ploda hrasta kitnjaka), kao i ključni formulacioni parametri (SOR i SER). Dalji cilj bio je rasvetljavanje dva nanoemulzifikaciona puta koji se mogu

primeniti kao postupci izrade tokom faze razvoja formulacija, pri čemu se koriste relevantne metode potvrde – polarizaciona mikroskopija, diferencijalna skenirajuća kalorimetrija i merenje električne provodljivosti, kao i kontinualna reološka merenja. Slično kao u prvoj fazi, rezultujuće poliglicerilske nanoemulzije bi se karakterisale u pogledu prosečne veličine kapi i distribucije veličina kapi (foton korelacionom spektroskopijom), morfologije (mikroskopijom atomskih sila), tipa proticanja (kontinualnim reološkim merenjima), praćenjem pH vrednosti i električne provodljivosti, tokom 3 meseca čuvanja na sobnoj temperaturi.

2.3. Cilj treće faze eksperimentalnog rada

U trećoj fazi eksperimentalnog rada, cilj je bio da se proceni ukupni sadržaj ključnih bioaktivnih sastojaka ulja semena maline (karotenoida, tokoferola, fenolnih jedinjenja) primenom odgovarajućih spektrofotometrijskih metoda, kao i da se testira antioksidantni kapacitet prirodnih sirovina (ulje semena maline i hidroglikolni ekstrakti ploda maline ili hrasta kitnjaka), *per se* ili u vidu dva različita tipa nanoemulzija, stupanjem u reakciju sa slobodnim radikalima: 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS⁺ katjon radikal) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH radikal). U nastavku, cilj je bio da se sprovede studija oksidativne stabilnosti ulja semena maline/ nanoemulzija pogodnim spektrofotometrijskim metodama, praćenjem relevantnih parametara (peroksidni broj, p-anisidinski broj, sadržaj derivata tiobarbiturne kiseline itd.), u periodu od mesec dana čuvanja na različitim temperaturama (5°C, 25°C i 40°C). Ova ispitivanja su izvršena pre i nakon inkorporiranja ulja semena maline u nanoemulzije na bazi polisorbata 80 ili poliglicerilskih estara, a uporedo je ispitan i efekat dodatka lipofilnih koantioksidanasa (sintetskih: butilhidroksitoluen ili prirodnih: etarsko ulje origana) ili hidrofilnih koantioksidanasa (sintetskih: etilendiaminotetrasirćetna kiselina ili prirodnih: hidroglikolni ekstrakti ploda maline–RE ili hrasta kitnjaka–FE) u pomenute nanoemulzije. Na osnovu ovih ispitivanja, cilj je bio da se stekne uvid u efekte nanoemulzifikacije i/ili efekte dodatka lipofilnih/hidrofilnih koantioksidanasa na oksidativnu stabilnost pomenutih nanoemulzija. Dobijeni rezultati su potom dovedeni u vezu sa sadržajem ključnih bioaktivnih sastojaka u ulju semena maline ili drugih upotrebljenih sirovina, kako bi se objektivno procenio doprinos različitih nanoemulzionih nosača stabilnosti i efikasnosti ulja semena maline.

2.4. Cilj četvrte faze eksperimentalnog rada

Cilj četvrte faze eksperimentalnog rada bila je procena sposobnosti ulja semena maline i drugih prirodnih sirovina, kao i odabranih optimalnih formulacija nanoemulzija, da ispolje biološke efekte. Planirano je da se ovo sprovede kroz *in vitro* procenu citotoksičnosti sirovina/nanoemulzija na odabranim ćelijskim linijama (normalnim humanim keratinocitima – HaCaT, normalnim fibroblastima pluća – MRC-5, kao i ćelijama malignog melanoma – Fem-X), a zatim i *in vitro* ispitivanjem mogućnosti pojave okularne iritacije (HET-CAM test na horioalantoinskoj membrani pilećeg embriona). Konačno, planirana je i *in vivo* procena kompatibilnosti sa kožom i efikasnosti odabranih finalnih poliglicerilskih nanoemulzija na zdravim humanim dobrovoljcima, imajući u vidu da se radi o novijim nedovoljno istraženim nanoformulacijama.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

Ulje semena maline: ukupno 4 različita ulja semena maline prikazana u *Tabeli 3.1.* su korišćena za izradu nanoemulzija u ovoj doktorskoj disertaciji. Dva ulja su bila hladno ceđena ulja: RO1–rafinisano, neorgansko (Seatons, East Yorkshire, Ujedinjeno Kraljevstvo) i RO2–nerafinisano, organsko (proizvođač - Aromaaz International, New Delhi, India, za domaći brend Eterra/kompanija Terra Co, Novi Sad, Srbija), oba sa istim INCI nazivom: *Rubus idaeus seed oil*. Druga dva ulja su proizvedena CO₂ superkritičnom ekstrakcijom: RO3–neorgansko i RO4–organsko (proizvođač Flavex Naturextrakte GmbH, Rehlingen, Nemačka), oba sa INCI nazivom: *Rubus idaeus seed (Raspberry) extract and Rosmarinus officinalis (Rosemary) leaf extract*, s obzirom da sadrže dodatak do 0,1% ekstrakta lista ruzmarina koji ima ulogu antioksidansa.

Tabela 3.1. Ključne karakteristike i glavni sastojci različitih vrsta ulja semena maline korišćenih u eksperimentalnom radu (podaci dobijeni iz proizvođačkih specifikacija).

	Ulje semena maline (engl. <i>Red raspberry seed oil</i> – RO)			
Vrsta ulja	RO1	RO2	RO3	RO4
	Hladno ceđeno	Hladno ceđeno	CO ₂ -ekstrahovano	CO ₂ -ekstrahovano
	Nije organsko	Organsko	Nije organsko	Organsko
	Rafinisano	Nerafinisano	Nerafinisano	Nerafinisano
Vizuelni izgled	Svetlo žuto	Narandžasto-žuto	Svetlo zeleno-žuto	Zlatno žuto
Sastav masnih kiselina/ uobičajen opseg koncentracija				
C16:0 palmitinska (2–6%)	3,12%	5,11%	2,20%	2,20%
C18:0 stearinska (<3%)	0,92%	1,51%	0,91%	0,89%
C18:1 ω9 oleinska (8–14 %)	12,10%	12,20%	12,60%	12,70%
C18:2 ω6 linolna (50 – 62%)	51,94%	58,05%	59,10%	59,00%
C18:3 ω3 linolenska (21–36%)	30,01%	22,00%	24,40%	24,10%
Ukupno zasićenih kiselina	4,04%	6,62%	3,11%	3,09%
Ukupno nezasićenih kiselina	94,05%	92,25%	96,10%	95,80%
Odnos ω6 : ω3	1,73	2,64	2,42	2,45
Ukupni tokoferoli	n.p.	n.p.	0,12%	0,28%
Ukupni tokotrienoli	n.p.	n.p.	0,03%	0,03%
n.p. - nije poznato				

Ostale komponente masne faze (emulijensi/ noseća ulja): izostearil izostearat (INCI: *Isostearyl isostearate*) - Crodamol® ISIS; etilheksil pelargonat (INCI: *Ethylhexyl pelargonate*) - Crodamol® OPG, oba od proizvođača CRODA, East Yorkshire, Ujedinjeno Kraljevstvo.

Surfaktanti: Za pripremu niskoenergetskih nanoemulzija korišćeni su isključivo nejonski surfaktanti pogodni za izradu na hladno: polisorbat 80 tj. polioksietilen-20 sorbitan monooleat (INCI: *Polysorbate 80*), Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Nemačka; i poliglicerilski estri: poligliceril 4-

laurat (INCI: *Polyglyceryl 4-laurate*) – Tego Care[®] PL4 u kombinaciji sa smešom drugih estara: poligliceril-6 kaprilat, poligliceril-3 kokoat, poligliceril-4 kaprat, poligliceril-6 ricinoleat (odnos 1:1:1:1) (INCI: *Polyglyceryl-6 caprylate, Polyglyceryl-3 cocoate, Polyglyceryl-4 caprate, Polyglyceryl-6 ricinoleate*) – Tego Solve[®] 61, oba od proizvođača Evonik Nutrition and Care GmbH, Essen, Nemačka.

Kosurfaktanti: komercijalno dostupna smeša konzervansa fenoksietanola i etilheksilglicerina – Euxyl PE[®] 9010 (INCI: *Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin*), Schülke GmbH, Norderstedt, Nemačka; parfemsko ulje crvene maline (Jean Products, Karsbach, Nemačka).

Lipofilni antioksidansi: alfa tokoferil acetat (TA), INCI: *Tocopheryl acetate*, FAGRON, Trikala, Grčka; butilhidroksitoluen (BHT), INCI: *Butylated hydroxytoluene*, Sigma-Aldrich Co., St. Lois, MO, SAD; etarsko ulje origana (ORE), INCI: *Oregano (Origanum vulgare) essential oil*, standardizovano na 80% karvakrola (proizvođač - Aromaaz International, New Delhi, India, za domaći brend Eterra/kompanija Terra Co, Novi Sad, Srbija).

Vodena faza: visokoprečišćena voda (INCI: *Aqua/Water*), GenPure, TKA Wasseranfertigungssysteme GmbH, Nemačka); glicerol (INCI: *Glycerin*), Fisher Chemical, Waltham, ME, SAD ili Glycerol Solvagreen[®] (≥ 98%, anhydrous, Ph. Eur.), Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemačka.

Hidroglolikolni ekstrakti: ekstrakt ploda maline – Fruitliquid[®] raspberry (INCI: *Water, Propylene glycol, Rubus idaeus fruit extract*) i ekstrakt ploda (žira) hrasta kitnjaka – Phytessence[®] French oak (INCI: *Aqua, Glycerin, Quercus petraea fruit extract*), standardizovan na 1% polifenola, oba ekstrakta su bila od proizvođača CRODAROM, Chanac, Francuska.

Hidrofilni antioksidansi: etilendiaminotetrasirćetna kiselina, dinatrijumova so (EDTA), Lach-ner, Ltd., Neratovice, Češka Republika.

Reagensi za određivanje oksidativne stabilnosti: barijum-hlorid dihidrat i amonijum-tiocijanat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemačka); gvožđe (II) sulfat heptahidrat, kumen hidroperoksid, tiobarbiturna kiselina, trihlorsirćetna kiselina, butilhidroksitoluen (BHT), 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP), Folin-Ciocalteu reagens za određivanje fenola, hloroform, 2-propanol, izooktan, toluen i 1-butanol (Sigma-Aldrich Co., St. Lois, MO, SAD); hlorovodonična kiselina, 37% i glacijalna sirćetna kiselina (Fischer Scientific, Loughborough, UK); etanol i metanol (Honeywell, Muskegon, MI, SAD).

Reagensi za određivanje antioksidativne aktivnosti: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH); 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijumova so (ABTS); kalijum persulfat, (±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Trolox[®]), Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Nemačka.

Sve ostale supstance i reagensi koji su korišćeni u eksperimentalnom radu u okviru ove doktorske disertacije bili su farmakopejskog (Ph. Eur), odnosno HPLC kvaliteta, i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja.

3.2. Metode

3.2.1. Ispitivanje faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu surfaktant/ masna faza/ vodena faza i odabir formulacija niskoenergetskih nanoemulzija za dalju optimizaciju

Kako bi se identifikovao region u kome dolazi do formiranja nanoemulzija, sa odabranim smešama surfaktanata, masne faze i vodene faze, varirani su odnosi masne faze i surfaktanata/kosurfaktanata, te su primenom titracije vodenom fazom konstruisani pseudoternarni fazni dijagrami, kao što je prethodno opisano (Todosijević i sar., 2014), primenom programa Sigma Plot, verzija 12.5 (Systat Software, Čikago, SAD).

Naime, prvo su pripremljene smeše surfaktanta (polisorbata 80) i masne faze (4 različite vrste ulja semena maline, *Tabela 3.1.*) varirajući njihov međusobni odnos (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60) kratkim mešanjem na vorteks mešalici (Vortex mixer ZX Classic, VELP Scientifica Srl, Italija). Potom je svakoj od napravljenih smeša postepeno dodavano (prvo po 20 μ L, a kasnije u rastućim alikvotima – 50, 100, 200 i 400 μ L visokoprečišćene vode) uz konstantno mešanje na sobnoj temperaturi (staklenim štapićem, u slučaju pojave guste prelazne faze, ili na vorteks mešalici, pri brzini od 1300 rpm), a titracija je završena kada je smeša imala 80 % m/m vodene faze. U cilju detekcije ključnih prelaznih faza koje su prethodile formiranju nanoemulzija, notiran je izgled početne smeše surfaktant-ulje i svaka promena koja je uočena tokom titracije vodom: pojava замуćenosti ili povećanje transparentije, geliranje itd. Nanoemulzije su prepoznate kao polu-transparentne ili mlečno bele tečne emulzije sa karakterističnim plavičastim odsjajem, uz potvrđen prosečan hidrodinamički dijametar kapi Z-ave < 200 nm (merenjem na odgovarajućem uređaju).

Analizom nanoemulzionih regiona sa pseudoternarnih faznih dijagrama odabrana je osnovna formulacija sledećeg sastava izraženog u masenim procentima (% m/m): polisorbit 80 – 10%, ulje semena maline (RO1–RO4) – 10% i voda – 80%, koja je kasnije podvrgnuta optimizaciji. Naime, optimizacija formulacije nanoemulzija na bazi polisorbata 80 uključivala je variranje sastava masne faze (dodatkom tokoferil acetata i/ili izostearil izostearata) i vodene faze (dodatak glicerola, ili hidroglikolnih ekstrakata ploda maline–RE ili hrasta kitnjaka–FE). Takođe, izvršen je i konačan odabir optimalnog ulja semena maline za dalji eksperimentalni rad (RO2–hladno ceđeno, nerafinisano ulje iz organske proizvodnje).

U drugoj fazi eksperimentalnog rada izvršeno je ispitivanje faznog ponašanja u drugačijem pseudoternarnom sistemu: surfaktant – smeša poliglicerilskih estara – PG/ kosurfaktant (Euxyl® PE 9010 ili parfemsko ulje maline – RF), masna faza (ulje semena maline – RO2, etilheksil pelargonat – EP) i vodena faza (visokoprečišćena voda, glicerol), na sličan način kao što je opisano za smeše sa polisorbitom 80. Analizom faznog ponašanja ovakvih smeša, odabrane su osnovne formulacije nanoemulzija na bazi poliglicerilskih estara koje su dalje obogaćene hidroglikolnim ekstraktima RE ili FE, za potrebe daljeg istraživanja.

3.2.2. Izrada prelaznih faza i nanoemulzija PIC metodom za formulaciona istraživanja

Gel prelazne faze i nanoemulzije na bazi polisorbata 80 – P80 NEs

Prvo su pripremljene smeše polisorbata 80 i masne faze u staklenim bočicama od 15 mL, a potom je toj smeši dodavana vodena faza u rastućim alikvotima (20, 50, 100, 200 i 400 μ L) uz konstantno mešanje – u početku staklenim štapićem (dok sadržaj vode faze ne pređe 40%), a potom na vorteks mešalici (na 1300 rpm). Kada je dodata sva količina vodene faze (80%) izvršena je kratka homogenizacija (2 minuta, na 1600 rpm). Uzorci gel faza kao ključnih faza u nastanku niskoenergetskih nanoemulzija na bazi

polisorbata 80 pripremljeni su tako da je ukupan sadržaj vodene faze iznosio 30%, isključivo mešanjem staklenim štapićem.

Tabela 3.2. Finalni sastav (% m/m) gel prelaznih faza i niskoenergetskih nanoemulzija na bazi polisorbata 80 sa uljem semena maline RO2 izrađenih za formulaciona istraživanja

Naziv formulacije	P80	RO2	ISIS	TA	Glicerol	RE	FE	Voda
Gel prelazne faze								
P80 G1	35	31,5	/	3,5	3	/	/	27
P80 G2	35	15,75	15,75	3,5	3	/	/	27
P80 G1+RE	35	31,5	/	3,5	/	1,5	/	28,5
P80 G1+FE	35	31,5	/	3,5	/	/	1,5	28,5
Nanoemulzije								
P80 F1	10	9	1	8	/	/	/	72
P80 F2	10	4,5	1	8	4	/	/	72
P80 F1+RE	10	9	1	/	/	4	/	76
P80 F1+FE	10	9	1	/	/	/	4	76

* P80 – polisorbit 80; RO2 – ulje semena maline, hladno ceđeno, organsko, nerafinisano; ISIS-izostearil izostearat; TA – tokoferil acetat; RE – hidroglikolni ekstrakt ploda maline; FE – hidroglikolni ekstrakt ploda (žira) hrasta kitnjaka.

Tečne prelazne faze i nanoemulzije na bazi poliglicerilskih estara – PG NEs

Uzorci tečnih prelaznih faza i nanoemulzija na bazi poliglicerilskih estara (Tabela 3.3.) izrađeni su na identičan način kao i nanoemulzije na bazi polisorbata 80, s tim da je bilo moguće mešanje isključivo na vorteks mešalici usled tečne konzistencije uzoraka. Važno je napomenuti da je dodatak hidroglikolnih ekstrakata (RE, FE) bio moguć samo pred kraj izrade nanoemulzija, tj. da nije bilo moguće izraditi prelazne faze sa ovim aditivima.

Tabela 3.3. Finalni sastav (% m/m) tečnih prelaznih faza i niskoenergetskih poliglicerilskih nanoemulzija (PG NEs) izrađenih za formulaciona istraživanja

Naziv formulacije	Surfaktant smeša*	Masna faza (kosurfaktant/RO2/emolijens)	Vodena faza (glicerol: voda)
Tečne prelazne faze			
PG M0 30%	35	35 (7 kosurfaktant 2: 28 EP)	30 (1,5: 28,5)
PG M0 50%	25	25 (5 kosurfaktant 2: 20 EP)	50 (2,5: 47,5)
PG M1 30%	35	35 (1,75 kosurfaktant 1: 7 RO2: 26,25 EP)	30 (9: 21)
PG M1 50%	25	25 (1,25 kosurfaktant 1: 5 RO2: 18,75 EP)	50 (15: 25)
Nanoemulzije			
PG F0 80%	10	10 (2 kosurfaktant 2: 8 EP)	80 (4:76)
PG F1 80%	10	10 (0,5 kosurfaktant 1: 2 RO2: 7,5 EP)	80 (24: 56)
PG F2 74%	13	13 (2,6 kosurfaktant 2: 2,6 RO2: 7,8 EP)	74 (22,2: 51,8)
PG F2 80%	10	10 (2 kosurfaktant 2: 2 RO2: 6 EP)	80 (24: 56)

* PG – smeša poliglicerilskih estara (Tego Care® PLA: Tego Solve® 61 u odnosu 1:1); kosurfaktant 1 – Euxyl® PE9010; kosurfaktant 2 – parfemsko ulje maline (RF); RO2 – ulje semena maline, hladno ceđeno, organsko, nerafinisano; emolijens – etilheksil pelargonat (EP).

3.2.3. Fizičko-hemijska karakterizacija prelaznih faza i nanoemulzija

3.2.3.1. Određivanje veličine i distribucije veličina kapi

U cilju potvrde formiranja nanokapi tokom ispitivanja faznog ponašanja kao i u ostalim fazama rada određivana je prosečna veličina kapi nanoemulzija, tj. prosečan hidrodinamički dijametar kapi ($Z\text{-ave}$) i raspodela veličine kapi, izražen kao indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index* - PDI) **metodom dinamičkog rasipanja svetlosti** (engl. *dynamic light scattering* – DLS), takođe poznatom i kao **foton korelaciona spektroskopija** (engl. *photon correlation spectroscopy* – PCS). Ova standardna metoda zasniva se na merenju stepena fluktuacije intenziteta rasute svetlosti do koga dolazi usled Braunovog kretanja čestica (tj. nanokapi) u analiziranom uzorku (Shekunov i sar., 2007). Potom se dobijeni rezultati prevode u veličinu kapi na osnovu Stokes-Einstein jednačine na kojoj je baziran softver uređaja (Malvern Dispersion Technology Software – DTS (Nano), verzija 5.00, uređaj Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK). U cilju izbegavanja višestrukog rasipanja svetlosti, ispitivani uzorci nanoemulzija su neposredno pre merenja razblaženi visokoprečišćenom vodom u odnosu 1:100 v/v. Merenje je sprovedeno u polistirenskim kivetama za jednokratnu upotrebu, na temperaturi od 25°C, primenom He–Ne lasera (talasna dužina svetlosti: 633 nm), pod uglom rasipanja svetlosti od 90°. Merenja su vršena 24-48 h nakon izrade nanoemulzija, kao i u vremenskim intervalima prema planu studija stabilnosti (npr. nakon 1, 3, 6 meseci čuvanja).

Dodatno, optimalne formulacije nanoemulzija koje su pokazale odgovarajuću veličinu kapi primenom DLS tehnike i zadovoljavajuću preliminarnu stabilnost bile su podvrgnute i merenjima upotrebom tehnike statičkog rasipanja svetlosti, poznatom i kao **laserska difrakcija** (LD). Za razliku od DLS tehnike koja je limitirana na veličinu čestica od 0,3 nm–3,0 μm , LD omogućava i detekciju većih struktura poput agregata čestica, te su ova merenja od značaja i sa aspekta praćenja stabilnosti. Naime, LD se zasniva na difrakciji svetlosti usled osvetljavanja čestica, a takođe dolazi i do refleksije, prelamanja i apsorpcije svetlosti. Kako bi se svi ovi fenomeni uzeli u obzir, softver za obradu podataka koji je zasnovan na Mie teoriji, analizira zavisnost između ugla rasipanja svetlosti i veličine kapi, pri čemu, što je kap veća, manji je ugao pod kojim se svetlost rasipa (Shekunov i sar., 2007). Merenja su izvedena na uređajima (Beckman Coulter LS 13320, Beckman Coulter Inc, Fullerton, Kalifornija, SAD, primenom *universal liquid* modula) ili Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK), na temperaturi od 25°C, uz upotrebu visokoprečišćene vode kao medijuma za dispergovanje kapi nanoemulzija. Dobijeni rezultati predstavljaju volumetrijsku raspodelu veličina kapi (engl. *volume weighted diameters*) – $d(10)$, $d(0.5)$, $d(0.9)$, a ukazuju na to da 10%, 50% i 90% kapi/čestica ima manji prečnik od izmerene vrednosti, respektivno. Dodatno, mogu se dobiti informacije o zapreminskom srednjem prečniku $D[4,3]$ i površinskom srednjem prečniku $D[3,2]$ čestica/kapi analiziranog uzorka.

3.2.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje optičke bistrine

Optička bistrina polu-transparentnih tečnih prelaznih faza u toku nastanka poliglicerilskih nanoemulzija sa različitim udelom vodene faze i finalnih nanoemulzija (*Tabela 3.3.*) ispitivana je spektrofotometrijskom metodom odnosno, merenjem procenta transparentcije, % TP (engl. *percentage of transmittance*) na 600 nm, pri čemu su uzorci ispitivani nerazblaženi, uz visokoprečišćenu vodu kao slepu probu, kao što je prethodno opisano (Liew i sar., 2020). Na osnovu dobijenih vrednosti može se izvršiti distinkcija između mikroemulzionih prelaznih faza koje karakteriše visoka vrednost %TP (95-100%) i polu-transparentnih faza i nanoemulzija (%TP~60-80%). Za merenja je bio korišćen spektrofotometar Evolution 300 UV-VIS (Thermo Scientific, Loughborough, Velika Britanija).

3.2.3.3. Polarizaciona mikroskopija

Odabrani uzorci prelaznih faza i odgovarajućih nanoemulzija analizirani su na polarizacionom mikroskopu Olympus BX53P polarizing microscope, sa softverskim paketom the cellSens Entry version 1.14 software (Olympus, Tokyo, Japan), pri uveličanju do 100 x (poliglicerilske nanoemulzije) ili pomoću mikroskopa Motic digital DMB3-22ASC microscope (Motic GmbH, Nemačka), sa Motic Images Plus v.2.0 softverom, pri uveličanju do 400 x (nanoemulzije sa polisorbatom 80). Analizom mikrografija izvršena je distinkcija između anizotropnih prelaznih faza sa vidljivim različitim strukturama (lamelarne, heksagonalne) i izotropnih struktura (kubna faza) koje ne interferiraju sa linearno polarizovanom svetlošću, te vidno polje ostaje tamno. U slučaju analize nanoemulzija, polarizacionom mikroskopijom utvrđeno je prisustvo/odsustvo agregata surfaktanata ili većih uljanih kapi nanoemulzije, koji se pojavljuju u slučaju nestabilnosti i sa starenjem uzoraka.

3.2.3.4. Mikroskopija atomskih sila

Analiza mikroskopijom atomskih sila (engl. *atomic force microscopy* – AFM) sprovedena je u cilju sticanja direktnog uvida u submikronsku strukturu i morfološke karakteristike prelaznih faza i nanoemulzija, kao i u cilju potvrde rezultata merenja veličine kapi nanoemulzija dobijenih pomoću DLS i LD. Ova metoda podrazumeva prevlačenje sonde mikroskopa na veoma malim rastojanjima od samog uzorka (npr. <10 nm, kada je reč o beskontaktnom režimu merenja), pri čemu uređaj detektuje privlačne i odbojne sile između vrha igle i uzorka, čime se dobijaju podaci o visini uzorka i trodimenzionalnoj organizaciji čestica (Jokanović, 2014).

Analiza nanoemulzija na bazi polisorbata 80 vršena je na uređaju AutoProbe CP-Research SPM (TM Microscopes-Bruker, Nemačka), uz prethodno razblaženje uzoraka nanoemulzija visokoprečišćenom vodom u odnosu 1:500 v/v. Potom je 10 μ L razblaženog uzorka preneto na mika pločicu (takođe Highest Grade V1 AFM Mica Discs, Ted Pella Inc., Redding, California, SAD) i osušeno na 25°C pod vakuumom. Snimanje je sprovedeno na vazduhu, u beskontaktnom režimu, primenom sonde Bruker Phosphorous (n) doped silicon Tap300, model MPP-11123-10, sa omotačem od aluminijuma i simetričnim vrhom, pri pokretačkoj frekvenciji od 300 kHz. Prikupljeni topografski snimci i snimci “signal-greška” su potom analizirani primenom softverskih paketa Image Processing and Data Analysis (verzija 2.1.15) i SPMLab Analysis, DI SPMLab NT (verzija 6.0.2).

Analiza nanoemulzija na bazi poliglicerilskih estara vršena je na uređaju NTEGRA Prima Atomic Force Microscope (NT-MDT, Rusija), uz prethodno razblaženje uzoraka nanoemulzija visokoprečišćenom vodom u odnosu 1:100 i 1:1000 v/v. Naime, 10 μ L razblaženog uzorka preneto je na mika pločicu (Highest Grade V1 AFM Mica Discs) i sušeno 24 h na 25°C pod vakuumom. Merenja su sprovedena u naizmeničnom kontaktnom režimu korišćenjem NT-MDT NSGO1 silikonske sonde (N-tipa, obogaćene antimonom i obložene zlatom), pri nominalnoj konstanti sile sonde 5,1 N/m i frekvenciji oko 150 kHz. Dobijene mikrografije (topografija i “signal greška”) su potom obrađene softverom Image Analysis 2.2.0 (NT-MDT).

3.2.3.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) je metoda termalne analize kojom se na indirektan način mogu dobiti informacije o strukturi sistema na osnovu termalnog ponašanja vode, npr. prilikom smrzavanja ili zagrevanja ispitivanog uzorka. U tom smislu, ova metoda se pokazala korisnom za analizu mikroemulzija i nanoemulzija sa različitim udelom vodene faze, kao i za detekciju prisustva/lokalizacije i interakcija između komponenata u nanoformulacijama (Todosijević i sar., 2014). Eksperimenti su sprovedeni na uređaju Mettler Toledo DSC 820, (Mettler Toledo GmbH Analytical, Giessen, Nemačka),

pri čemu su uzorci (približno 10 mg) nanoseni na standardne aluminijumske nosače, hermetički zatvoreni, a potom hlađeni od -25°C do -60°C, pri brzini hlađenja od 5 K/min, a prazan aluminijumski nosač korišćen je kao referentni uzorak. Naime, na ovaj način su analizirane ključne prelazne faze u procesu nastanka nanoemulzija izrađenih sa poliglicerilskim estrima i različitim kosurfaktantima, a koje su sadržale 30% i 50% vodene faze, kao i same finalne nanoemulzije koje su sadržale 80% vodene faze (*Tabela 3.3.*). Cilj ovih analiza je bio da se dodatno razjasni mehanizam nastanka nanoemulzija upotrebom novijih poliglicerilskih surfaktanata. Analiza dobijenih termalnih krivih i određivanje relevantnih termalnih parametara (entalpija, T zamrzavanja vode) izvršeni su primenom Mettler Toledo STARe softvera.

3.2.3.6. Reološka karakterizacija i teksturna analiza

U cilju određivanja tipa proticanja odabranih prelaznih faza i odgovarajućih nanoemulzija, kao i ostalih relevantnih parametara koji se dovode u vezu sa strukturom i/ili stabilnošću ispitivanih uzoraka sprovedena su reološka merenja (kontinualna i oscilatorna) na uređaju HAAKE Mars rheometer (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Nemačka), kao i teksturna analiza.

Kontinualna reološka merenja

Kontinualna reološka merenja (engl. *continuous flow - hysteresis loop tests*) izvršena su pomoću rotacionog viskozimetra HAAKE Mars rheometer (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Nemačka) na sobnoj temperaturi $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$, a kao pribor je korišćen cilindar DG 41 sa titanijumskim senzorom. Merenje histereznih petlji (krive napona smicanja - τ u zavisnosti od brzine smicanja - $\dot{\gamma}$) obavljeno je u opsegu brzina smicanja od $0,5-100 \text{ s}^{-1}$, pri čemu je svaki uzorak izmeren tri puta.

Na osnovu sledeće jednačine krive proticanja:

$$\tau = k \times \dot{\gamma}^n \quad (\text{Jednačina } 3.1.)$$

određeni su faktor konzistencije (k) i indeks proticanja (n) koji su potom korišćeni za kvantitativnu analizu tipa proticanja (Njutnovski ili Nenjutnovski tip proticanja), odnosno za determinaciju tipa prelaznih faza i karakteristika finalnih nanoemulzija pripremljenih sa različitim aditivima.

Eskperimentalna podešavanja su bila prilagođena vrsti analiziranih uzoraka na sledeći način:

Prelazne gel faze i nanoemulzije na bazi polisorbata 80 (P80 NEs)

Uzorci P80 NEs (P80 F1, P80 F2, P80 F1+RE, P80 F1+FE, *Tabela 3.2.*) su prvo izloženi brzinama smicanja koje su uvećavane od $0,5$ do 100 s^{-1} , potom su podvrgnuti brzini smicanja 100 s^{-1} u trajanju od 30 sekundi, i konačno, opadajućim brzinama smicanja do $0,5 \text{ s}^{-1}$, pri čemu su uzlazna i silazna merenja trajala 100 sekundi. Prelazne gel faze sa 30% vodene faze (G1, G2, G1+RE, G1+FE, *Tabela 3.2.*) nisu mogle biti podvrgnute kontinuiranim reološkim merenjima jer su ispoljile Weissenberg-ov efekat.

Prelazne faze i nanoemulzije na bazi smeše poliglicerilskih estara (PG NEs)

Uzorci prelaznih faza (sa 30% i 50% vodene faze) i odgovarajućih poliglicerilskih nanoemulzija (sa 80% vodene faze) testirani su u 3 faze: 1. 120 sekundi, povećanjem brzine smicanja od $0,5$ do 100 s^{-1} , 2. 60 sekundi pri konstantnoj brzini smicanja od 100 s^{-1} , i 3. 120 sekundi, smanjenjem brzine smicanja od 100 do $0,5 \text{ s}^{-1}$. Sastav testiranih uzoraka prikazan je u *Tabeli 3.3.*

Oscilatorna reološka merenja

Oscilatorna reološka merenja (engl. *oscillatory rheology tests - frequency sweep tests*) sprovedena su na prelaznim gel fazama polu-čvrste konzistencije (gel faze sa polisorbatom 80: G1, G2, G1+RE, G1+FE, *Tabela 3.2.*), kako bi se utvrdila njihova viskoelastična svojstva – prividni viskozitet (η^*), elastični modul (G') i viskozni modul (G''). Na osnovu vrednosti G' i G'' dobijenih u linearnom viskoelastičnom režimu, može se odrediti da li sistem ima karakteristike gela ili tečnosti. Naime, ukoliko je $G' > G''$ sistem se svrstava u gelove dok ukoliko je $G' < G''$ sistem zadržava tečno stanje, što se može koristiti u karakterizaciji različitih tečno-kristalnih prelaznih faza (u postupku nanoemulzifikacije). Oscilatorna merenja sprovedena su u triplikatu na $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ korišćenjem modela dve paralelne ploče sa PP35 senzorom, pri frekvencijama (od 0,1 do 10 Hz) na konstantnom naponu smicanja od 1 Pa.

Teksturna analiza

Teksturane karakteristike (čvrstina, konzistencija i adhezivnost) polučvrstih prelaznih gel faza sa polisorbatom 80 (G1, G2, G1+RE, G1+FE, *Tabela 3.2.*) izmerene su pomoću uređaja TA.XT-Plus Texture analyzer (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, Velika Britanija) upotrebom cilindra prečnika 5 mm, pri brzini pre analize od 1mm/s, brzini tokom analize 2 mm/s i brzini nakon analize 2 mm/s, dok je rastojanje iznosilo 5 mm. Sva merenja su izvedena u triplikatu, na temperaturi $23 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dobijeni rezultati su korišćeni u cilju procene uticaja različitih aditiva na stabilnost prelaznih faza u procesu nastanka nanoemulzija.

3.2.3.7. Merenje električne provodljivosti

Merenje električne provodljivosti sprovedeno je direktnim uranjanjem elektrode konduktometra u ispitivane uzorke prelaznih faza koje se javljaju tokom izrade nanoemulzija kao i samih finalnih nanoemulzija. Merenja su izvršena pomoću konduktometra SENSION+EC71 (HACH, Loveland, Kolorado, SAD), na sobnoj temperaturi ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), u triplikatu.

3.2.3.8. Merenje pH vrednosti

Merenje pH vrednosti izvedeno je direktno iz uzoraka nerazblaženih nanoemulzija pomoću laboratorijskog pH-metra (HI 9321, Hanna Instruments Inc., Ann Arbor, Mičigen, SAD), na sobnoj temperaturi ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), u triplikatu.

3.2.4. Procena fizičke stabilnosti nanoemulzija

Studija fizičke stabilnosti nanoemulzija (placebo i formulacija sa uljem semena maline, sa ili bez različitih lipofilnih i hidrofilnih aditiva) podrazumevalo je praćenje odabranih parametara u definisanim vremenskim intervalima: pored organoleptičke karakterizacije merena je veličina kapi, indeks polidisperznosti, pH vrednost, električna provodljivost, inicijalno (24 h nakon izrade) i u određenim vremenskim intervalima, npr. jedan, dva, tri meseca, do godinu dana nakon izrade. Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.2.5. Ramanska spektroskopija ulja semena maline i nanoemulzija sa uljem semena maline

Ramanska spektroskopija je metoda pogodna za brzu procenu profila masnih kiselina (tj. ukupnog stepena nezasićenosti) različitih ulja semena maline kao i za detekciju prisustva nekih minornih sastojaka ulja (npr. karotenoida). Ramanski spektri biljnih ulja pokazuju karakteristične trake u regionu od 1800

do 800 cm^{-1} koje potiču od estara masnih kiselina u njihovom sastavu, a kao merilo stepena nezasićenosti se mogu koristiti odnosi intenziteta traka na 1266 i 1305 cm^{-1} (I_{1266}/I_{1305}), kao i na 1659 i 1749 cm^{-1} (I_{1659}/I_{1749}) (Jiménez-Sanchidrian i Ruiz, 2016). Prisustvo karotenoida u biljnim uljima se može potvrditi prisustvom karakterističnih traka na 1524 i 1159 cm^{-1} (Duraipandian i sar., 2019; Ferreira i sar., 2013).

Pored različitih ulja semena maline RO1–RO4 (*Tabela 3.1.*), analizirani su (u regionu od 1300 do 900 cm^{-1}) i ramanski spektri ostalih komponenata nanoemulzija (surfaktant polisorbit 80, glicerol, voda), kao i finalnih nanoemulzija koje su se razlikovale samo po vrsti ulja u masnoj fazi (sastav nanoemulzija: P80 10%, RO1/RO2/RO3/RO4 9%, tokoferil acetat 1%, glicerol 8%, visokoprečišćena voda 72%). Cilj je bio da se dobiju informacije o interakcijama među sastojcima u vodenoj sredini, tj. u U/V nanoemulziji, na osnovu promena položaja i intenziteta traka, budući da je nedavno pokazano da se Ramanska spektroskopija može koristiti i u ove svrhe (Rachmawati i sar., 2015; Zhu i sar., 2019).

Ramanski spektri su snimljeni pomoću DXR Raman mikroskopa (Thermo Fisher Scientific, Medison, Wisconsin, SAD), sa optičkim mikroskopom i CCD detektorom, korišćenjem diodnog lasera pri talasnoj dužini svetlosti od 780 nm. Svi spektri su snimljeni istog dana, nakon podešavanja uređaja i kalibracije, pod istim uslovima: 2,1- μm laserski fokusirana veličina polja na površini uzorka, uz mikroskopsko uveličanje 10 x; snaga lasera (780 nm) je držana konstantno na 10 mW, vreme ekspozicije bilo je identično za sva merenja, kao i ostali varijabilni instrumentalni parametri. Takođe, u cilju eliminacije uticaja varijacija u fokusu lasera između individualnih merenja uzoraka, korišćene su zlatne pločice sa jasno definisanim mestima za nanošenje uzoraka (EZ-Spot Micro Mounts support from Thermo Scientific) koje su sadržale uvek istu količinu uzorka (5 μL) (EZ-Spot Micro Mounts support from Thermo Scientific). Merenja su vršena u opsegu od 2000 cm^{-1} do 300 cm^{-1} pri čemu je svaki uzorak meren 5 puta kako bi se izbegao efekat potencijalne nehomogenosti uzorka. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost Ramanskih spektara, onako kako je izračunato pomoću softvera Thermo Scientific OMNIC software.

3.2.6. Određivanje sadržaja glavnih biološki aktivnih sastojaka ulja semena maline RO2 spektrofotometrijskim metodama

3.2.6.1. Određivanje apsorpcionog spektra i sadržaja karotenoida

Određivanje apsorpcionog spektra izvršeno je iz uzorka ulja semena maline RO2 (hladno ceđeno, nerafinisano ulje iz organske agrikulture, *Tabela 3.1.*) razblaženih u izopropanolu, u UV delu spektra (od 200 do 400 nm) imajući u vidu da se apsorpcija u ovom delu spektra dovodi u vezu sa fotoprotektivnim efektom ulja. Razblaženje ulja RO2 je pripremljeno na sličan način kao što je prethodno opisano (Oomah i sar., 2000), pri čemu je kao rastvarač korišćen izopropanol umesto heksana, u odnosu 1:100. U cilju kvantifikacije sadržaja karotenoida, dodatno je snimljen apsorpcioni spektar u vidljivom delu svetlosti (od 400 do 800 nm, razblaženje 1:10 u izopropanolu). Sadržaj karotenoida je kvantifikovan na osnovu izmerene apsorpcije rastvora uzorka na 450 nm, pomoću kalibracione krive dobijene merenjem apsorpcije standardnih rastvora različitih koncentracija standarda beta-karotena u izopropanolu na 450 nm. Rezultat je izražen kao mg beta-karotena na 1 kg ulja.

3.2.6.2. Određivanje sadržaja ukupnih tokoferola

Iako je HPLC standardno korišćena metoda za određivanje ukupnih tokoferola i njihovih pojedinih frakcija u biljnim uljima, u cilju brze preliminarne procene sadržaja ukupnih tokoferola često se predlažu modifikacije spektrofotometrijske metode po Emmerie-Engel-u, uz odgovarajuću pripremu ulja (Wong i sar., 1988), a poželjno je da se radi analiza iz nesaponifikovane frakcije ulja, kako bi se eliminisao uticaj eventualno prisutnih karotenoida i sterola (Paquot i sar., 1967). Ova metoda je bazirana na redukciji Fe^{3+}

jona do Fe^{2+} jona u prisustvu tokoferola i tokotrienola, a potom Fe^{2+} joni formiraju crveno obojeni kompleks sa 2,2'-bipiridilom, te se merenjem apsorbcije ovog kompleksa može kvantifikovati sadržaj ukupnih tokoferola u uzorku.

Ispitivanja su izvršena po prethodno opisanim procedurama (Paquot i sar., 1967; Wong i sar., 1988), uz manje modifikacije. Naime, prvo je pripremljena nesaponifikovana frakcija ulja semena maline na sledeći način: ispitivano ulje (1 g) pomešano je u balonu okruglog dna sa 96% etanolom (30 mL) i 50% kalijum-hidroksidom (5 mL) i zagrevano uz povratni kondenzator na 90°C, tokom 60 min. Nakon hlađenja, sadržaj je prebačen u levak za odvajanje, uz dodatak 96% etanola do zapremine 40 mL, a zatim i vode (prvo tople, a zatim hladne) do zapremine 80 mL. U cilju odvajanja nesaponifikovane frakcije, ova smeša je ispirana 3 puta sa po 50 mL petroletra. Balon u kojem je vršena saponifikacija ispiran je svim navedenim rastvaračima neposredno pre njihovog dodavanja u levak za odvajanje. Nakon saponifikacije i odvajanja petroletarskih slojeva, petroletarski slojevi su spojeni, isprani 3 puta sa po 50 mL 10% etanola, profiltrirani preko bezvodnog natrijum sulfata, upareni pod sniženim pritiskom i osušeni u vakuum-eksikatoru.

Izvođenje testa – prvo su pripremljeni reagensi: etanolni rastvor 2,2'-bipiridila (0,07 % w/v u 96 % v/v etanolu) i etanolni rastvor FeCl_3 (0,2% w/v $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ u 96% v/v etanolu). Potom su pripremljeni uzorci na sledeći način: odgovarajuća količina nesaponifikovane frakcije ulja semena maline RO2 je preneti u normalni sud od 10 ml, zatim je dodato 5 mL toluena kako bi se rastvorio uzorak. Nakon toga je dodato 3 mL rastvora bipiridina i 0,5 mL rastvora FeCl_3 redom, i reakciona smeša je dopunjena do 10 mL 96% etanolom. Reakcija se izvodi zaštićeno od svetlosti, uz merenje apsorbcije na 520 nm nakon 1 minut, pri čemu je slepa proba pripremljena na identičan način, izuzev dodatka nesaponifikovane frakcije ulja. Metoda je validirana pomoću standardnih rastvora alfa-tokoferola, a rezultat je izražen kao mg alfa-tokoferola na 1 kg ulja, na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{Ukupan sadržaj tokoferola (mg/kg)} = [(A1 - A0) \times V \times 10^4] / 39,2 \times V_s \times m \quad (\text{Jednačina 3.2.})$$

gde je $A1$ – apsorbcija uzorka, $A0$ – apsorbcija slepe probe, V – zapremina benzenskog rastvora neosaponifikovane frakcije ulja (50 mL), V_s – zapremina reakcione smeše (10 mL), m – masa uzorka nesaponifikovane frakcije ulja (u gramima), a 39,2 – koeficijent ekstinkcije za kompleks stvoren iz čistog alfa-tokoferola.

3.2.6.3. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Princip metode se zasniva na redukciji metalnih jona prisutnih u Folin-Ciocalteu reagensu u prisustvu fenolnih jedinjenja, što rezultira promenom boje iz žute u molibden-tungsten plavu (pruska plava) pri čemu je intenzitet boje direktno proporcionalan sadržaju fenola u uzorku. Analiza ukupnih fenola je sprovedena kao što je prethodno opisano (Alizadeh i sar., 2013; Güzel i sar., 2009), uz manje modifikacije. Naime, prvo je pripremljen ekstrakt ulja za analizu tako što je 0,200 g ulja semena maline pomešano sa 1 mL metanola i centrifugirano na 5000 rpm 20 minuta (Dragon Centrifuge High Speed Mini D2012 Plus, Dragon Lab Instruments Ltd., Beijing, Kina). Reakciona smeša je pripremljena na sledeći način: u staklenim epruvetama sa šlifovanim zatvaračem odmereno je 50–200 μL metanolnog ekstrakta ulja i pomešano sa 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (sveže razblaženog visokoprečišćenom vodom u odnosu 1:10), a zatim su smeše ostavljene 5 minuta na sobnoj temperaturi, uz povremeno mešanje na vorteks-u. Potom je dodato 2 mL rastvora Na_2CO_3 (7,5% m/m u visokoprečišćenju vodi), dopunjeno do 5 mL visokoprečišćenom vodom i reakcione smeše su nakon mešanja ostavljene 90 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svetlosti. Apso rbancija uzoraka je merena na 735 nm pri čemu je slepa proba bila visokoprečišćena voda. Kalibraciona kriva je konstruisana na osnovu apsorbcije

standardnih rastvora različite koncentracije galne kiseline, a sadržaj ukupnih fenola je izražen kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu ulja (mg GA/g).

3.2.7. Procena oksidativne stabilnosti ulja semena maline i nanoemulzija

Oksidativna stabilnost ulja semena maline RO2

Oksidativni status ulja semena maline (RO2) određivan za čisto ulje i ulje sa dodatnim antioksidansima: prirodnim etarskim uljem origana–ORE (u koncentraciji 0,2% i 1,0%) ili sintetskim butilhidroksitoluenom– BHT (u koncentraciji 0,2% i 0,6%), imajući u vidu uobičajene limite za primenu ovih supstanci na koži. Pripremljeni uzorci ulja semena maline su testirani inicijalno i nakon 15 i 30 dana čuvanja na različitim temperaturama (5°C, 25°C i 40°C), zaštićeno od svetlosti, u dobro zatvorenim staklenim bočicama od 10 mL.

3.2.7.1. Određivanje peroksidnog broja spektrofotometrijskom metodom

Peroksidni broj (PB) uzoraka ulja semena maline kao mera primarnih proizvoda oksidacije ulja određivan je pomoću oficijelne spektrofotometrijske metode udruženja *International dairy federation* – IDF metoda. Ova metoda je pogodna za analizu manjih količina uzoraka ulja, odnosno, kada je potrebna rutinska analiza velikog broja uzoraka. IDF metoda je bazirana na sposobnosti lipidnih hidroperoksida iz uzorka ulja da oksiduju Fe²⁺ u Fe³⁺ jone koji u prisustvu aktivatora grade tamno crveno obojeni kompleks. Za analizu uzoraka ulja semena maline korišćena je sledeća procedura, uz manje modifikacije (Shantha i Decker, 1994):

Prvo su pripremljeni sledeći rastvori – Fe²⁺ reagens- dobijen mešanjem 25 mL rastvora BaCl₂ x 2 H₂O (0,2 g u visokoprečišćenoj vodi) i 25 mL rastvora Fe₂SO₄ x 7 H₂O (0,25 g u visokoprečišćenoj vodi), a potom je je dodato 1 mL 10M rastvora hlorovodonične kiseline, i sve zajedno kratko promešano na vorteksu, nakon čega je smeša centrifugirana na 5 minuta na 5000 rpm (MPW centrifuge, MPW MED Instruments, Warszawa, Poljska) kako bi se uklonio talog Ba₂SO₄, pri čemu supernatant predstavlja Fe²⁺ reagens. Rastvor aktivatora je pripremljen rastvaranjem 1,5 g amonijumtiocijanata u visokoprečišćenoj vodi (do 5 mL).

Uzorak ulja (0,01 do 0,3 g, u zavisnosti od oksidativnog statusa) je odmeren u normalni sud od 10 mL i rastvoren u 5 mL medijuma za određivanje peroksida (hloroform: metanol – 7:3 v/v). Potom je dodato 50 µL rastvora Fe²⁺ i 50 µL rastvora aktivatora. Reakciona smeša je zatim dopunjena do 10 mL medijumom za određivanje peroksida, promešana nekoliko sekundi na vorteksu i zaštićena od svetlosti. Apsorbancija je merena na 500 nm nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi, pri čemu je slepa proba bila pripremljena na isti način sa izuzetkom ulja. Svi uzorci su mereni u triplicatu, a kalibraciona kriva je pripremljena sa standardnim uzorcima Fe³⁺ (2,5-50 µg Fe³⁺) koji su pripremljeni prema proceduri kao što je već opisano (Shantha i Decker, 1994). Rezultati su izraženi kao peroksidni broj koji predstavlja miliekvivalente peroksida po kg ulja, a preračunava se na osnovu sledeće jednačine:

$$PB = \frac{(As - Ao) \times s}{55,84 \times m \times 2} \quad (\text{Jednačina 3.3.})$$

gde je As – apsorbcija uzorka, Ao – apsorbcija slepe probe, s – nagib kalibracione krive (iznosio je 31,18), m – masa uzorka u gramima, 55,84 – atomska masa gvožđa, a broj 2 je neophodan kako bi se peroksidni broj izrazio kao miliekvivalenti peroksida, a ne kiseonika.

3.2.7.2. Određivanje p-anisidinskog broja

p-Anisidinski broj (PA) određen je na osnovu oficijelne metode Američkog udruženja oleohemičara (*AOCS official method Cd 18-90*) uz manje modifikacije u cilju smanjenja količine uzorka i utroška reagenasa. Metoda je bazirana na reakciji sekundarnih proizvoda oksidacije ulja koji nastaju razgradnjom hidroperoksida (uglavnom nezasićenih aldehida-2-alkenala i 2,4-alkadienala) sa p-anisidinom u kiseloj sredini, pri čemu nastali žuto obojeni proizvodi snažno apsorbuju na 350 nm, što se koristi za određivanje PA. Smatra se da je poželjna vrednost PA do 10, dok više vrednosti ukazuju na užeglost ulja.

Određivanje p-anisidinskog broja izvršeno je kao što je prethodno opisano (Malinowska i sar., 2014): prvo je pripremljen p-anisidin reagens, rastvaranjem 0,025 g p-anisidina u glacijalnoj sirćetnoj kiselini (u normalnom sudu zapremine od 10 mL), nakon čega je pripremljen rastvor ulja semena maline odmeravanjem 0,5 g ulja i rastvaranjem u izooktanu (u normalnom sudu od 25 mL). Zatim je pripremljen nereakcioni rastvor mešanjem 5 mL rastvora ulja sa 1 mL glacijalne sirćetne kiseline, dok je reakcioni rastvor dobijen mešanjem 5 mL rastvora ulja sa 1 mL p-anisidin reagensa, a slepa proba je pripremljena mešanjem 5 mL izooktana sa 1 mL p-anisidin reagensa (rastvori su pripremani u staklenim epruvetama sa šlifovanim čepom, uz mešanje 10 sekundi na vorteksu, zaštićeno od svetlosti). Nakon 10 minuta apsorbancija ovih rastvora je izmereno na 350 nm pomoću UV-VIS spektrofotometra. Vrednost p-anisidinskog broja dobijena je prema sledećoj formuli:

$$PA = 25 \times \frac{1,2 \times (A_2 - A_0) - A_1}{m} \quad (\text{Jednačina 3.4.})$$

pri čemu je A_1 apsorbancija nereakcionog rastvora, A_2 je apsorbancija reakcionog rastvora, A_0 je apsorbancija slepe probe i m masa ulja u gramima. Uzorci su mereni u triplikatu, pri čemu je izooktan korišćen za anuliranje uređaja pre merenja.

3.2.7.3. Određivanje derivata tiobarbiturne kiseline

TBARS test se bazira na formiranju ružičastog kompleksa sa jakom apsorbancijom na 532-535 nm koji nastaje reakcijom 2-tiobarbiturne kiseline i sekundarnih proizvoda oksidacije ulja bogatih polinezasićenim masnim kiselinama. Ovi proizvodi se nazivaju supstance koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid reacting substances* – TBARS).

TBARS test je sproveden prema prethodno opisanoj proceduri (Walker i sar., 2017) uz manje modifikacije. Naime, TBARS reagens je pripremljen rastvaranjem 7,5 g trihlorsirćetne kiseline i 0,1875 g tiobarbiturne kiseline u 0,25 M HCl (u normalnom sudu zapremine od 50 mL). Uzorci ulja su pripremljeni odmeravanjem 0,1 g, tj. 120 μ L ulja semena maline, 600 μ L rastvora antioksidansa (2wt %/v butilhidroksitoluen u etanolu), 3750 μ L TBARS reagensa, i dopunjeni do 5 mL visokoprečišćenom vodom. Pripremljeni uzorci (u staklenim epruvetama sa šlifovanim zatvaračem) su kratko promešani na vorteksu, a potom zagrevani u čaši sa toplom vodom (na $90 \pm 5^\circ\text{C}$, 15 minuta). Nakon toga su uzorci brzo prohladjeni pod mlazom hladne vode iz česme, pa centrifugirani 15 minuta 3000 rpm (MPW centrifuge, MPW MED Instruments, Warszawa, Poljska). Apsorbancija supernatanta je izmerena nakon 15 minuta, na 532 nm pomoću UV-VIS spektrofotometra, dok je za standardizaciju metode korišćen prekursor malonaldehida (1,1,3,3- tetraetoksipropan). Slepa proba je pripremljena sa 120 μ L visokoprečišćene vode umesto ulja maline. Rezultati su izraženi kao miligrami malonaldehida po kilogramu ulja (mg MDA/kg ulja).

Oksidativna stabilnost nanoemulzija sa uljem semena maline RO2

Oksidativni status je određivan za uzroke nanoemulzija stabilizovanih surfaktantom polisorbitom 80 (P80 NEs) ili poliglicerilskim estrima (PG NEs), pripremljenih bez ili sa uljem semena maline, kao i sa ili bez hidrofilnih antioksidanasa (prirodni: ekstrakt hrasta kitnjaka – FE, u koncentraciji 1%, ili sintetski: etilendiaminotetrasirćena kiselina – EDTA, 0,2%) ili lipofilnih antioksidanasa (prirodni: ORE, 0,02% i sintetski: BHT, 0,02%), kao i čiste disperzije surfaktanata P80 i PG u visokoprečišćenoj vodi. Koncentracije su odabrane imajući u vidu uobičajenu praksu za kozmetičke ili farmaceutske emulzije proizvode, proizvođačke specifikacije i na osnovu dostupne literature (Costa i sar., 2021; Kampa i sar., 2022; Ferreira da Silveira i sar., 2021; Malinowska i sar., 2014).

Pripremljeni uzorci nanoemulzija (*Tabela 3.4.*) su testirani inicijalno i nakon 15 i 30 dana čuvanja na različitim temperaturama (5°C, 25°C i 40°C), zaštićeno od svetlosti, u dobro zatvorenim staklenim bočicama od 10 mL.

Tabela 3.4. Sastav nanoemulzija (% m/m) pripremljenih sa različitim surfaktantima i antioksidansima za studiju oksidativne stabilnosti

Naziv formulacije	Surfaktant (10%)	Masna faza (10%)	Vodena faza (80%)
F0 P80	P80	EP – 9,5, EUX – 0,5	voda
F1 P80		EP – 7,5, RO2 – 2, EUX – 0,5	voda
F1 P80 + BHT		EP – 7,48, RO2 – 2, EUX – 0,5, BHT – 0,02	voda
F1 P80 + ORE		EP – 7,48, RO2 – 2, EUX – 0,5, ORE – 0,02	voda
F1 P80 + EDTA		EP – 7,5, RO2 – 2, EUX – 0,5	voda – 79,8, EDTA – 0,2
F1 P80 + FE		EP – 7,5, RO2 – 2, EUX – 0,5	voda – 79,0, FE – 1,0
F0 PG	PG	EP – 9,5, EUX – 0,5	voda – 76, glicerol – 4
F1 PG		EP – 7,5, RO2 – 2, EUX – 0,5	voda – 56, glicerol – 24
F1 PG + BHT		EP – 7,48, RO2 – 2, EUX – 0,5, BHT – 0,02	voda – 56, glicerol – 24
F1 PG + ORE		EP – 7,48, RO2 – 2, EUX – 0,5, ORE – 0,02	voda – 56, glicerol – 24
F1 PG + EDTA		EP – 7,5, RO2 – 2, EUX – 0,5	voda – 55,8, glicerol – 24, EDTA – 0,2
F1 PG + FE		EP – 7,5, RO2 – 2, EUX – 0,5	voda – 55,8, glicerol – 24, FE – 1

Legenda tabele: BHT – butilhidroksitoluen; EDTA – etilendiaminotetrahlorsirćetna kiselina, dinatrijumova so; EP – etilheksil pelargonat; EUX – Euxyl® PE 9010 (konzervans i kosurfaktant); FE – hidroglikolni ekstrakt ploda/žira hrasta kitnjaka; ORE – etarsko ulje origana; PG – smeša poliglicerilskih estara Tego Care® P4L: Tego Solve® 61, 6:4); P80 – polisorbit 80; RO2 – ulje semena maline, hladno ceđeno, nerafinisano, organsko.

3.2.7.4. Određivanje lipidnih hidroperoksida u nanoemulzijama

Za određivanje prisustva lipidnih hidroperoksida kao primarnih proizvoda oksidacije u nanoemulziji koji mogu da potiču od ulja semena maline, ali i od surfaktanata korišćena je modifikacija IDF metode (Walker i sar., 2017), uz manje izmene koje su se ticale smanjenja utroška reagenasa/uzoraka nanoemulzija:

Rastvor Fe^{2+} dobijen je rastvaranjem 0,06 g $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ u visokoprečišćenju vodi, do zapremine od 1,5 mL, a potom mešanjem sa rastvorom BaCl_2 (0,0484 g $\text{BaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ u visokoprečišćenju vodi, do zapremine od 1,5 mL). Ova smeša rastvora je potom centrifugirana 5 minuta na 5000 rpm, pri čemu dobijeni supernatant predstavlja rastvor Fe^{2+} . Potom je sprovedena ekstrakcija nanoemulzija odmeravanjem 0,3 mL uzorka nanoemulzije i 1,5 mL smeše izooktana i izopropanola (3:1 v/v), uz kratko mešanje na vorteksu (10 sekundi), a potom centrifugiranjem na 3000 rpm, 2 minuta (MPW centrifuge, MPW MED Instruments, Warszawa, Poljska). Dobijeni gornji sloj (0,2 mL) se pomeša sa 2,8 mL smeše metanol: 1-butanol (2:1 v/v), a potom se dodaju prethodno pripremljeni rastvor Fe^{2+} i rastvor aktivatora (1,5 g amonijum tiocijanata, rastvorenog u visokoprečišćenju vodi, u normalnom sudu od 5 mL), po 15 μL od oba rastvora. Reakciona smeša se kratko izmeša na vorteksu i ostavi na sobnoj temperaturi zaštićeno od svetlosti. Apsorbancija uzorka merena je nakon 20 minuta na 510 nm, a slepa proba je pripremljena na identičan način pri čemu je umesto nanoemulzije korišćen izooktan. Za validaciju metode korišćen je za kumen hidroperoksid, a rezultati su izraženi kao milimoli kumen hidroperoksida po litru nanoemulzije (mmol CUM/L nanoemulzije).

3.2.7.5. Određivanje derivata tiobarbiturne kiseline u nanoemulzijama

Uzorci nanoemulzija su analizirani na isti način kako što je opisano za ulje semena maline (poglavlje 3.2.6.3.) tako što je pomešano 500 μL nanoemulzije sa 4 mL TBA reagenasa i 500 μL rastvora BHT. Slepa proba je pripremljena sa visokoprečišćenju vodom umesto uzorka nanoemulzije. Rezultati su dobijeni na osnovu jednačine kalibracione krive i izraženi kao miligrami malonaldehida po litru nanoemulzije (mg MDA/L nanoemulzije).

3.2.8. *In vitro* procena antioksidativne aktivnosti

3.2.8.1 ABTS test

ABTS test je metoda za ispitivanja antioksidativne aktivnosti uzorka koja se zasniva na uklanjanju katjon radikala 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS^{++}), u reakciji transfera elektrona sa antioksidansima. Test se zasniva na spektrofotometrijskom merenju dekolizacije plavo-zelenog rastvora ABTS^{++} , koji pokazuje apsorpcioni maksimum na 734 nm, a koji se u prisustvu antioksidansa redukuje u bezbojni ABTS. ABTS^{++} je reaktivan prema većini antioksidanasa, uključujući fenole, tiole, flavonoide i vitamin C, itd. ABTS test se može izvoditi i u vodenoj sredini što ga čini pogodnim za analizu U/V nanoemulzija uz očuvanje njihove strukture.

Uzorci ulja i nanoemulzija analizirani su prema proceduri (de Souza i sar., 2014) uz manje modifikacije. Naime, prvo je pripremljen rastvor ABTS^{++} u reakciji 10 mL rastvora ABTS-a (7 mM rastvor 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) u PBS puferu, pH 7,4) sa 176 μL vodenog rastvora kalijum persulfata (140 mM). Smeša je ostavljena 16 h na sobnoj temperaturi, u boci od tamnog stakla, nakon čega je dobijeni rastvor aktiviranog ABTS^{++} razblažen sa PBS puferom kako bi se dobila apsorbcija od $0,7 \pm 0,05$ jedinica (mereno na 734 nm). Potom je sprovedena analiza antioksidativne aktivnosti prirodnih sirovina (ulja semena maline ili hidrofilnih ekstrakata ploda maline/ ploda hrasta kitnjaka, u koncentracijama od 1,7–100 $\mu\text{L}/10 \text{ mL}$) ili nanoemulzija (50–100 $\mu\text{L}/10 \text{ mL}$) mešanjem sa ABTS^{++}

rastvorom (do zapremine od 10 mL). Reakcione smeše su ostavljene 6 minuta na sobnoj temperaturi zaštićene od svetlosti (uz lagano mućkanje svakih 1 minut). Apsorbancija je merena na 734 nm pri čemu su upotrebljene 2 različite slepe probe – čist PBS pufer za ulja i ekstrakte, dok su za nanoemulzije pripremani rastvori (50–100 µL nanoemulzije u PBS puferu, do 10 mL) kako bi se eliminisao efekat zamućenja koji potiče od samih nanoemulzija. Rastvori Trolox[®]-a različitih koncentracija (2,5 mM, 1,25, 0,625, 0,3125 i 0,15625 mM) pripremljeni su u PBS puferu u cilju validacije metode. Rezultati su izraženi kao % inhibicije ABTS katjon radikala prema sledećoj jednačini:

$$\% \text{ inhibicije}_{ABTS} = [(A_{ABTS} - A_{UZORKA}) / A_{ABTS}] \times 100 \quad (\text{Jednačina 3.5.})$$

pri čemu je A_{ABTS} apsorbancija početnog rastvora ABTS⁺ (0,7), a A_{UZORKA} apsorbancija uzorka, izmerena nakon 6 minuta.

3.2.8.2. DPPH test

DPPH test zasniva se na redukciji DPPH radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) kroz transfer H⁺ jona, pri čemu dolazi do obezbojavanja ljubičastog rastvora usled formiranja DPPH-H, a apsorbancija se uobičajeno meri na 514 do 517 nm, pri čemu je intenzitet obezbojenja proporcionalan stepenu inhibicije slobodnog radikala.

Test je sproveden prema metodi (Rebolleda i sar., 2015) uz manje modifikacije. Naime, prvo je pripremljeno 100 mL rastvora DPPH slobodnog radikala (0,004% m/v, u metanolu), i rastvor standardnog antioksidansa Trolox[®]-a (100 mg/L, u metanolu), koji je korišćen za validaciju metode. Uzorci prirodnih sirovina (ulja semena maline ili hidrofilnih ekstrakata - ploda maline/ ploda hrasta kitnjaka) testirani su u koncentracijama od 1,7–100 µL/10 mL, a nanoemulzije od 50–300 µL/10 mL, mešanjem odgovarajuće količine uzorka sa 5 ml rastvora DPPH i dopunjavanjem metanolom do 10 mL. Reakcione smeše su potom čuvane na sobnoj temperaturi, zaštićene od svetlosti, uz lagano mućkanje svakih 5 minuta, nakon čega je izmerena apsorbancija na 514 nm, pri čemu je slepa proba bila čist metanol. Rezultati su izraženi kao % inhibicije DPPH radikala prema sledećoj jednačini:

$$\% \text{ inhibicije}_{DPPH} = [(A_{DPPH} - A_{UZORKA}) / A_{DPPH}] \times 100 \quad (\text{Jednačina 3.6.})$$

pri čemu je A_{DPPH} apsorbancija standardnog uzorka DPPH radikala (5 mL of DPPH standardnog rastvora pomešanog sa 5 mL metanola), a A_{UZORKA} apsorbancija testiranog uzorka nakon 30 minuta.

3.2.9. In vitro procena sposobnosti za ostvarivanje bioloških efekata

3.2.9.1. In vitro ispitivanje citotoksičnosti

U cilju procene bioloških efekata prema normalnim ćelijskim linijama humanog porekla (MRC-5 i HaCaT), odnosno provere selektivnosti delovanja prema tumorskim ćelijama (Fem-X) sproveden je test redukcije 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromida (MTT test) kao standardna metoda za procenu metaboličke aktivnosti i vijabilnosti ćelija nakon tretmana test supstancama.

Ćelijske linije. Korišćene su sledeće ćelije: normalne ćelije – humani fibroblasti pluća (MRC-5), humani keratinociti (HaCaT) i tumorske ćelije humanog malignog melanoma (Fem-X). Ćelije su dobijene iz American Type Culture Collection (Manassas, VA, SAD), a gajene su u kompletnom hranljivom medijumu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), na 37°C, u vlažnoj atmosferi sa 5% ugljen-dioksida. Ovaj medijum je obogaćen L-glutaminom (3mM), streptomycinom (100 mg/mL), penicilinom (100 IU/mL), fetalnim goveđim serumom (10%) inaktivisanim toplotom na 56°C radi inaktivacije holin-

esteraze i sistema komplementa) i HEPES-om (25 mM). pH vrednost medijuma podešena je na 7,2 pomoću rastvora bikarbonata.

Priprema polaznih rastvora sirovina i nanoemulzija. Polazni rastvor ulja semena maline (RO2) i parfemskog ulja maline (RF) pripremljeni su u dimetilsulfoksidu (DMSO), a potom razblaženi hranljivim medijumom tako da koncentracija DMSO koja dolazi u kontakt sa ćelijama bude < 0,1%. Placebo nanoemulzije bez prirodnih sirovina i nanoemulzije sa RO2, bez ili sa dodatkom hidroglikolnih ekstrakata ploda maline (RE) ili hrasta kitnjaka (FE), i parfema (RF) razblaženi su direktno hranljivim medijumom, s obzirom da su u pitanju U/V sistemi. Svi uzorci su zatim filtrirani kroz membranski filter promera 0,22 µm, i dalje razblaženi hranljivim medijumom u cilju pripreme ispitivanih koncentracija uzoraka prirodnih aktivnih sastojaka RO2, RF, RE i FE (12,5, 25, 50, 100, 200 i 400 µg/mL), a za nanoemulzije su pripremljena razblaženja u koncentracijama koje odgovaraju pomenutim koncentracijama sirovina. Placebo nanoemulzija je razblažena na isti način kao i ostale nanoemulzije.

Tretman ćelija. MRC-5 (5x10³ ćelija po bazenu, HaCaT (5x10³ ćelija po bazenu) i Fem-X (5x10³ ćelija po bazenu) su zasejane u ploče sa 96 mesta (bazena). Nakon što su ćelije adherirale za dno bazena (20–24 h), dodati su uzorci u prethodno određenom opsegu koncentracija, dok je u kontrolne bazene dodat samo hranljivi medijum.

Određivanje citotoksičnosti – vijabilnost ćelija. Vijabilnost ćelija određivana je 48 h nakon tretmana, primenom MTT testa, Naime, prvo je MTT reagens (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) rastvoren u PBS puferu (pH 7,2) u koncentraciji od 5 mg/mL, a zatim je profiltriran pre upotrebe (Millipore membranski filter promera 0,22 µm). Nakon toga je u svaki bazenčić dodato 10 µL rastvora MTT i uzorci su inkubirani dodatnih 4 h na 37°C, u vlažnoj atmosferi (sa 5% CO₂). Nakon toga je u svaki bazenčić dodato 100 µL 10% rastvora natrijum dodecilsulfata (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) kako bi se izvršilo liziranje ćelija. Narednog dana izmerena je apsorbancija ćelijskog medijuma u svim bazenčićima, pomoću uređaja *Multiskan™ FC Microplate Photometer* (Thermo Scientific, SAD). Rezultati su izraženi kao % vijabilnih ćelija koji su računati prema navedenoj formuli:

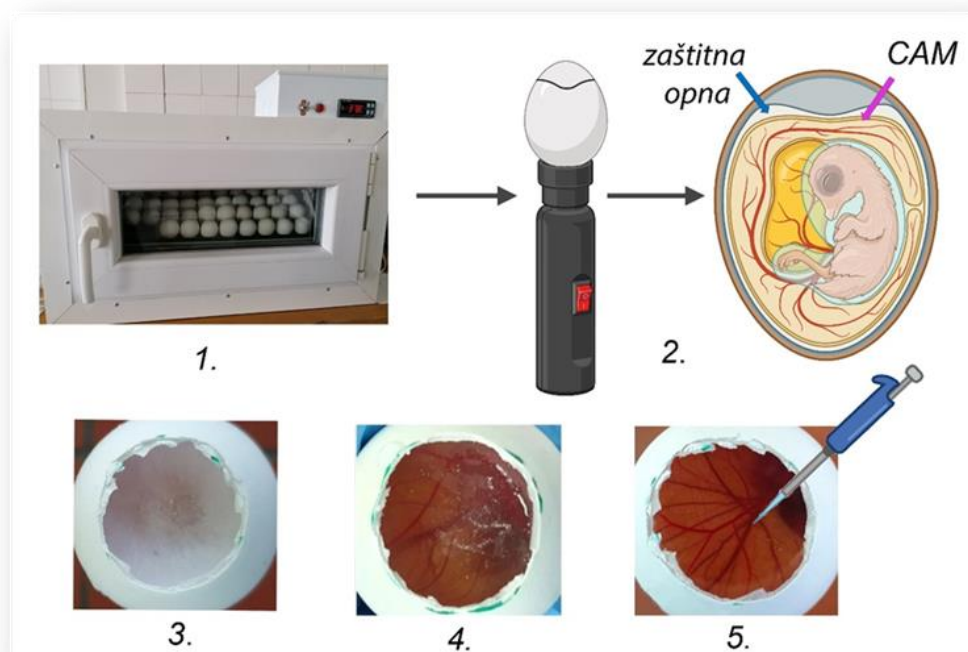
$$\% \text{ vijabilnih ćelija} = \frac{A_{\text{uzorka}} - A_{\text{slepe probe}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{slepe probe}}} \times 100 \quad (\text{Jednačina 3.7})$$

Takođe, analiziranjem grafika % vijabilnih ćelija dobijenih pri rastućim koncentracijama uzoraka, određena je i IC50 vrednost za svaki uzorak (IC50 predstavlja koncentraciju uzorka koja je smanjila vijabilnost ćelija za 50%). Za svaki uzorak je urađeno po 3 nezavisna testa, pri čemu rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja ± SD.

3.2.9.2. *In vitro* procena okularne iritacije (HET-CAM test)

Test na horioalantoinskoj membrani oplodnog pilećeg embriona (engl. *Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane* – HET-CAM test) izveden je u cilju procene potencijala pojedinačnih kozmetičkih sastojaka ili nanoemulzija da izazovu okularnu iritaciju. Ukratko, HET-CAM test je sproveden na sledeći način: oplodena kokošija jaja Leghorn rase odgovarajućih karakteristika (bela boja, težina oko 50 g), čuvana su u inkubatoru pod specijalnim uslovima (temperatura 37,5±0,5°C, relativna vlažnost vazduha: 55%±7%, učestalost rotacije jaja: svakih 3 do 6 h) do izvođenja testa prema relevantnom protokolu, npr. DB-ALM Protocol N° 96: Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM), uz manje modifikacije kao što je prethodno opisano (Rocha-Filho i sar., 2017). Test je izveden 9. dana inkubacije, nakon odgovarajuće pripreme jajeta i horioalantoinke membrane – CAM (*Slika 3.1.*), nanošenjem 300 µL nerazblaženog uzorka sirovina ili nanoemulzija, tako da minimalno 25% CAM bude pokriveno uzorkom. Nakon 20 sekundi, CAM je isprana sa 5 mL fiziološkog rastvora (tzv.

simulacija lučenja suza), posle čega je praćen intenzitet reakcija (hiperemija, hemoragija i koagulacija) do ukupnog vremena od 5 minuta.



Slika 3.1. HET-CAM test – priprema jaja i horioalantoinne membrane: 1. inkubator sa jajima pod kontrolisanim uslovima; 2. jaja se 9. dana života osvetljavaju kako bi se identifikovala i obeležila vazдушna komora i procenila vijabilnost embriona; 3. uklanjanje označenog dela ljuske jajeta; 4. unutrašnja zaštitna opna tretirana 0,9% rastvorom natrijum hlorida; 5. jaje sa pripremljenom horioalantoinnom membranom -CAM, na koju se direktno nanosi uzorak.

Testirani su sledeći uzorci – ulje semena maline (RO2), poliglicerilske nanoemulzije, pripremljene bez ili sa pomenutim aktivnim sastojcima (PG F0, PG F1, PG F1+RE, PG F1+FE, Tabela 3.3.), kao i nanoemulzije na bazi polisorbata 80 (P80 NEs, istog sastava kao PG NEs samo sa P80 umesto PG, i bez glicerola u vodenoj fazi). Svaki uzorak je testiran na najmanje tri jajeta, pri čemu su za validaciju metode korišćeni rastvori standardnih iritanasa (Texapon®ASV, natrijum-hidroksid, natrijum-lauril sulfat, sirćetna kiselina), a kao negativna kontrola korišćen je 0,9% rastvor natrijum-hlorida u vodi.

U cilju procene stepena okularne iritacije nanoemulzija korišćena je prethodno opisana metodologija (Rocha-Filho i sar., 2017) u kojoj je korišćen sistem bodovanja/klasifikacije uzoraka kao što je prikazano u Tabelama 3.5. i 3.6., redom.

Tabela 3.5. Luepke skala pojave fenomena koji se odnose na okularnu iritaciju u funkciji vremena

Fenomen	Vreme (T)		
	T ≤ 30 sec	30 sec < T ≤ 2 min	2 min < T ≤ 5 min
Hiperemija	5	3	1
Hemoragija	7	5	3
Koagulacija	9	7	5

Tabela 3.6. Klasifikacija testiranih uzoraka u zavisnosti od bodova ostvarenih prema Luepke skali (Luepke, 1986)

HET-CAM indeks	Klasifikacija
$N \leq 1$	Nije iritans
$1 < N \leq 5$	Blagi iritans
$5 < N \leq 9$	Umeren iritans
$9 < N \leq 21$	Jak iritans

3.2.10. *In vivo* procena kompatibilnosti sa kožom i efikasnosti poliglicerilskih nanoemulzija

In vivo procena kompatibilnosti sa kožom poliglicerilskih nanoemulzija

Procena kompatibilnosti sa kožom razvijenih nanoemulzija na bazi poliglicerilskih estara sprovedena je na humanim dobrovoljcima (ukupno 12 dobrovoljaca, prosečne starosti $26,3 \pm 5,1$ godina) koji imaju zdravu kožu, bez istorije alergijskih reakcija. Studija je izvršena merenjem relevantnih biofizičkih parametara kože primenom savremenih *in vivo* tehnika: a) električna kapacitivnost kao mera stepena hidratisanosti *stratum corneum*-a (SCH), b) eritema indeks (EI) kao mera pojave crvenila (eritema), c) transepidermalni gubitak vode (TEGV) kao merilo integriteta *stratum corneum*-a (glavne kožne barijere).

Svi parametri su izmereni pre nanošenja testiranih uzoraka (bazalne vrednosti), a potom su testirani uzorci poliglicerilskih nanoemulzija (PG F1, PG F2, PG F1+RE, PG F1+FE, Tabela 3.3.) naneti na označena mesta na volarnim stranama leve i desne podlaktice u obliku kvadrata površine 9 cm^2 (količina uzorka $0,016 \text{ g/cm}^2$) i pokriveni silikonskim filmom (Parafilm[®], Curwood, SAD) i hipoalergijskom adhezivnom trakom radi postizanja okluzije (24 h). Takođe je pripremljena kontrola pod okluzijom i kontrola bez okluzije. Finalna merenja su izvršena 60 minuta nakon prekida 24 h-okluzije, kada su ponovo izmereni sledeći parametri: TEGV, EI i SCH.

In vivo procena efikasnosti poliglicerilskih nanoemulzija

U nastavku *in vivo* eksperimenata izvršena je i kratkotrajna studija procene efikasnosti nanoemulzija u pogledu potencijala za hidrataciju kože i uticaja na pH vrednost kože. Ispitivanja su izvršena na novoj grupi informisanih dobrovoljaca (ukupno 11 zdravih dobrovoljaca, prosečne starosti $23,2 \pm 1,6$ godina), tako što su na volarnu stranu leve i desne podlaktice aplikovani uzorci nanoemulzija (leva podlaktica - PG F1, PG F2, desna podlaktica - PG F1+RE, PG F1+FE, Tabela 3.3.) na tačno određena polja, u obliku kvadrata površine 9 cm^2 , a jedno polje ostavljeno je kao netretirana kontrola (UC). Količina uzorka nanoemulzija je iznosila $0,016 \text{ g/cm}^2$. Merenja SCH i pH vrednosti kože su izvršena inicijalno (pre tretmana), a potom 0,5, 1 i 2 h nakon nanošenja testiranih uzoraka.

Sva merenja sprovedena su prema relevantnim vodičima (Berardesca i sar, 2018; Fullerton i sar, 1996; Rogiers, 2001). Sledeći uređaji su korišćeni za merenja: Tewameter[®]TM 210 (za merenje TEGV), EI - Mexameter[®]MX 18 (za merenje EI), Corneometer[®]CM 825 (za merenje SCH), i pH meter 900 Multi Probe Adapter System MPA9 (za merenje pH vrednosti). Proizvođač instrumenata je Courage and Khazaka, Koln, Nemačka. Pre svakog merenja ispitanici su potpisali informisani pristanak za učešće u studiji i proveli 30 minuta kako bi se aklimatizovali na atmosferske uslove laboratorije u kojoj se sprovodi ispitivanje ($21 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 5\%$ RH). Protokoli za sprovođenje opisanih *in vivo* studija procene kompatibilnosti sa kožom i efikasnosti nanoemulzija odobreni su od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, odlukom 12-8818-2/3 od 23.09.2020. godine i Etičkog

komiteta za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, odlukom 232021, na sednici održanoj 15.11.2021. godine.

3.2.11. Statistička analiza

Svi rezultati predstavljeni su kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija, osim ukoliko nije drugačije naznačeno. U zavisnosti od prirode podataka i broja poređenih grupa, statistička značajnost ($p < 0,05$) je testirana korišćenjem Studentovog t-testa, jednofaktorskom ili dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) uz primenu odgovarajućeg post hoc testa -*Tukey's Honest Significance Test* (HST) ili Fisher LSD, upotrebom softverskih paketa OriginPro8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, Velika Britanija) ili SPSS statistics 20 (IBM, New York, SAD).

Rezultati *in vivo* studije predstavljeni su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Izmereni parametri u studiji procene kompatibilnosti sa kožom (SCH, TEGV i EI) izraženi su kao relativna (procentualna) promena odnosu na vrednosti pre nanošenja testiranih uzoraka (Δ vrednosti drugi dan u odnosu na prvi dan). *In vivo* efekti uzoraka upoređivani su međusobno i u odnosu na kontrolne uzorke (UC-netretirana kontrola pod okluzijom, UCO- netretirana kontrola bez okluzije), korišćenjem jednofaktorske ANOVE, uz HST post hoc test. U *in vivo* studiji efikasnosti parametri SCH i pH predstavljeni su kao apsolutna promena u odnosu na vrednosti pre nanošenja uzoraka, i inicijalno i nakon određenih vremenskih intervala u slučaju netretirane kontrole UC. Poređenje efekata različitih uzoraka izvršeno pomoću jednofaktorske ANOVE, uz HST post hoc test. Izmerene vrednosti SCH i pH kože za isti uzorak u različitim vremenskim intervalima upoređeni su pomoću T- testa za zavisne uzorke (*paired T test*). Prihvatana je razlika kao statistički značajna za $p < 0,05$. Statistička analiza je sprovedena pomoću komercijalno dostupnog softvera SPSS for Windows 17.0 (IBM, New York, SAD).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada

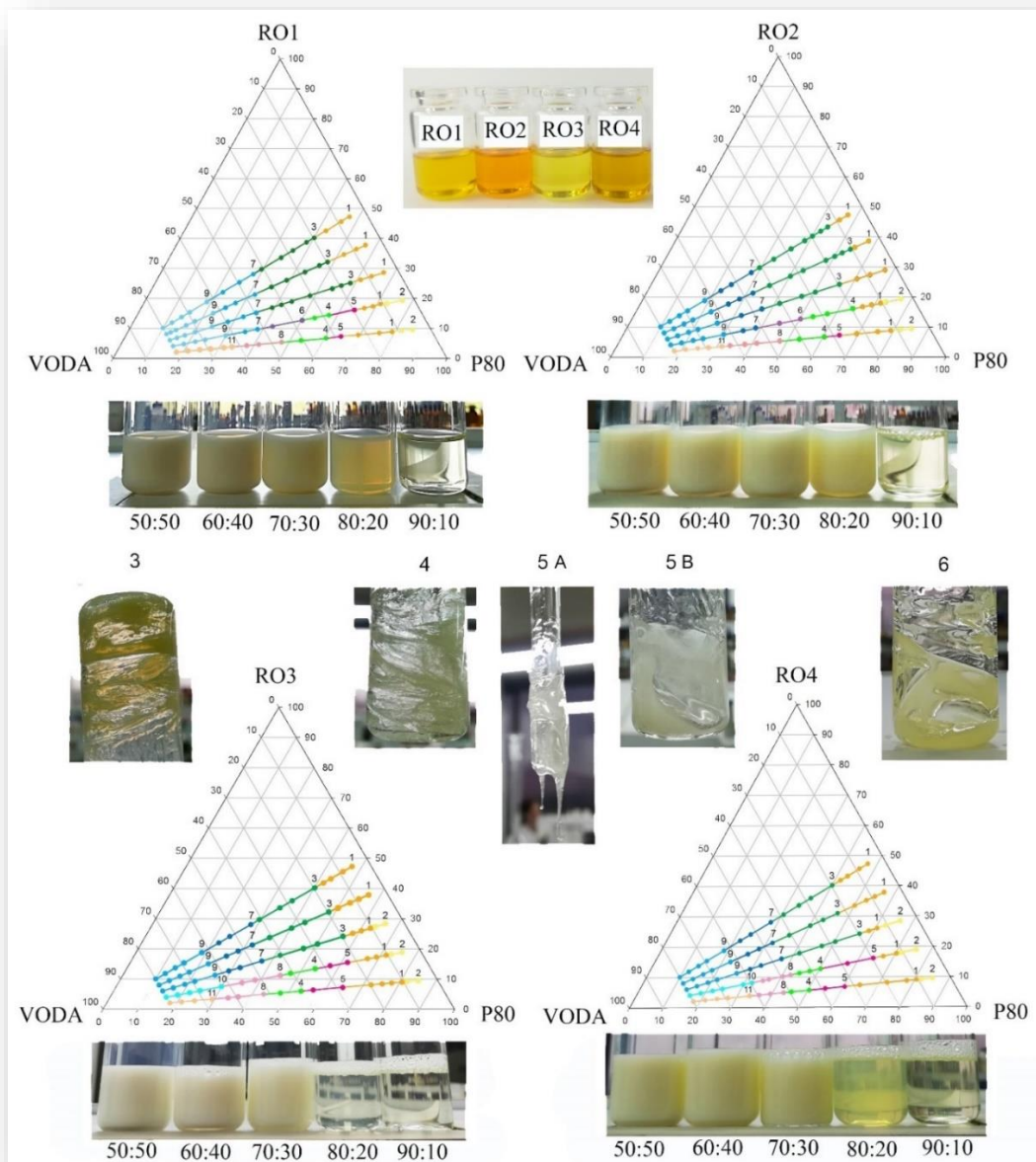
4.1.1. Ispitivanje faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu polisorbata 80/ulje semena maline /voda

Među dostupnim niskoenergetskim metodama za pripremu nanoemulzija, metoda inverzije usled promene sastava (engl. *phase inversion composition* – PIC) jedna je od metoda koja poseduje najveći potencijal za primenu u industriji u odnosu na druge niskoenergetske metode, s obzirom da je pogodna za širu paletu surfaktanata i aktivnih sastojaka, pa čak i onih najosetljivijih. U ovom doktoratu PIC metoda izvođena je isključivo na sobnoj temperaturi (tzv. izotermalna PIC metoda), sa ciljem da se maksimalno zaštite prirodni aktivni sastojci u ulju semena maline kao ključnoj komponenti masne faze ispitivanih nanoemulzija. Kada je reč o primeni PIC metode za nove kombinacije sastojaka, kao prvi korak potrebno je sprovesti studiju faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu. Naime, polazeći od smeše surfaktanta i uljane (masne) faze, uz titraciju vodenom fazom, sistem sačinjen od surfaktanta, ulja i vode (engl. *surfactant-oil-water* – SOW system) prolazi kroz neke od karakterističnih faza koje se smenjuju sa povećanjem udela vode u sistemu: i) voda u ulju (V/U) emulzija, ii) tečno-kristalna faza (engl. *liquid crystalline* – LC phase)/mikroemulzija (ME)/multipla emulzija ulje-u-vodi-u-ulju tipa (U/V/U) i, na kraju, iii) ulje u vodi (U/V) nanoemulzija (Sonneville-Aubrun i sar., 2009; Maestro i sar., 2008, Solè i sar., 2012).

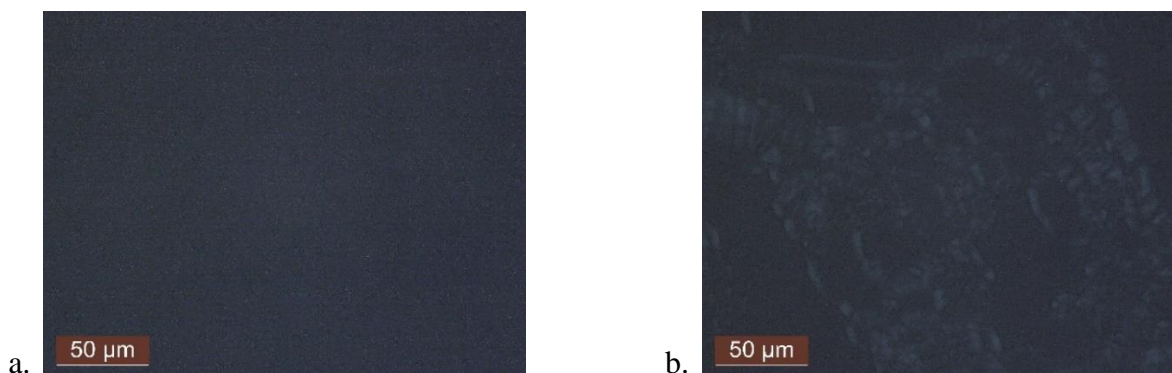
Kao što je poznato, u procesima faznih tranzicija tj. tokom nastanka nanoemulzija niskoenergetskim putem, najznačajniji formulacioni parametri su odnos surfaktanta i ulja (engl. *surfactant-to-oil ratio* – SOR) i odnos surfaktanta prema emulziji (engl. *surfactant-to-emulsion ratio* – SER) (Fernandez i sar., 2004; Mayer i sar., 2013). Polisorbit 80 (P80), koji se koristi veoma često u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji kao emulgator i solubilizator, izabran je zahvaljujući dokazanoj efikasnosti i prihvatljivom bezbednosnom profilu. Kao surfaktant male molekulske mase i visoke HLB vrednosti (~15,0), P80 je posebno pogodan za formulacije U/V nanoemulzija, mikroemulzija i tečno-kristalnih struktura (Fasolin i sar., 2012; Mayer i sar., 2013; Walker i sar., 2015a). U farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji uobičajeno je dostupan veliki izbor sastojaka istog imena, ali od različitih proizvođača. Ovo je posebno izraženo kada je reč o prirodnim sirovinama, kao što su biljna ulja, gde postoje brojne vrste formalno istih ulja iako su različitog porekla ili načina dobijanja (npr. ulje iz organske agrikulturne ili standardnog uzgoja, rafinisana ili nerafinisana ulja, hladno ceđena ili ulja ekstrahovana pomoću superkričkog CO₂), a posledično i sastava (Carvalho i sar., 2013; Van Hoed i sar., 2011; Yang i sar., 2011). Uticaj varijacija u sastavu ovakih sirovina na sisteme koji zavise upravo od fizičko-hemijske kompatibilnosti svih sastojaka formulacija, kao što su niskoenergetske nanoemulzije, nedovoljno je razjašnjen i predstavlja izazov za istraživače.

Prema tome, prvi cilj ovog istraživanja je bio da se ispita fazno ponašanje u pseudoternarnom sistemu polisorbata 80/ četiri različita ulja semena maline (RO1– RO4, *Tabela 3.1.*) i voda, te da se utvrde granice eventualno prisutnih tečno-kristalnih, mikroemulzionih i nanoemulzionih regiona, budući da se oni mogu dobiti korišćenjem različitih SOR i SER vrednosti i različitih udela vode u SOW sistemu. Naročito je bilo važno da se utvrdi da li, i na koji način, izbor ulja semena maline utiče na nastanak, karakteristike i stabilnost niskoenergetskih nanoemulzija sa polisorbitom 80. Rezultati ispitivanja faznog ponašanja u

pseudoternarnom sistemu polisorb 80/ulje semena maline/voda prikazani su na *Slici 4.1.*, dok su karakteristične izotropne/ anizotropne tečno-kristalne strukture prikazane na *Slici 4.2.*



Slika 4.1. Studija faznog ponašanja u sistemu polisorb 80 (P80)/ulje semena maline (RO1–RO4)/voda, visokoprečišćena i vizuelni izgled niskoenergetskih nanoemulzija P80 NEs, mikroemulzija (MEs) i tečno-kristalnih (LC) faza. Legenda slike: brojevi koji predstavljaju LC faze: 3 – polu-transparentna, polu-čvrsta izotropna gel faza; 4- transparentna, polu-čvrsta, izotropna LC gel faza; 5A i 5B – zamućena, tečna, anizotropna LC faza; 6- polu-transparentna, tečna, anizotropna LC faza. Brojevi koji predstavljaju tečne emulzije sisteme: 1 – V/U transparentna, tečna emulzija; 2- opalescentna ili zamućena, tečna V/U emuzija; 7 – mlečno bela, tečna U/V emulzija; 8 – polu-transparentna, tečna U/V emulzija; 9 – mlečno bela, sa plavim sjajem U/V P80 nanoemulzija niskog viskoziteta; 10-transparentna ili blago opalescentna U/V P80 nanoemulzija niskog viskoziteta; 11 – transparentna, tečna U/V mikroemulzija.



Slika 4.2a. Izotropna polu-transparentna, polu-čvrsta tečno-kristalna gel faza (oznaka 3, sa Slike 4.1) i b. anizotropna polu-transparentna, tečna, tečno-kristalna faza (oznaka 6, sa Slike 4.1.); skala na slici predstavlja 50 μm (metoda – optička mikroskopija).

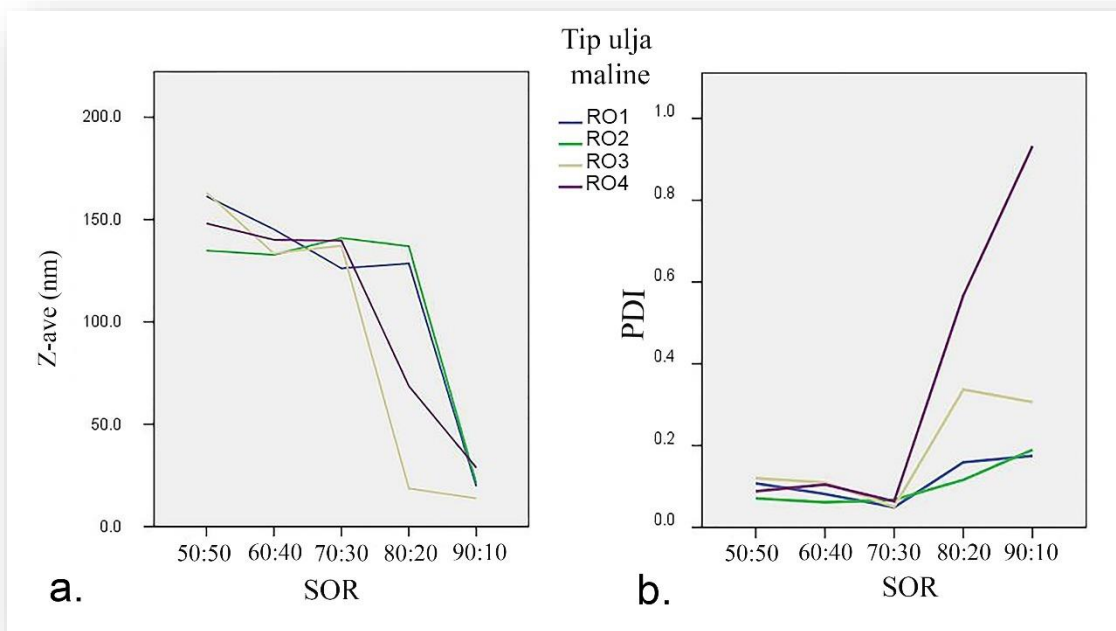
Naime, kao što je prikazano u *Tabeli 3.1.* testirana 4 različita ulja semena maline (RO1–RO4) karakteriše sličan profil masnih kiselina (visok udeo nezasićenih masnih kiselina – 92,25 do 96,10%, a posebno polinezasićenih: linolna kiselina – 51,94 do 59,10% i linolenska kiselina – 22,0 do 30,01%). Sa druge strane, vizuelni izgled, tj. boja testiranih ulja je varirala od svetlo žute, zlatno žute do žuto-narandžaste, što se odrazilo i na boju početnih smeša ulja i polisorbata 80, ali i finalnih P80 NEs koje su sadržale 80% vode. Ono što je bilo još važnije je da su primećene značajne razlike u vrednostima prosečnog dijametra kapi (Z-ave) i distribuciji veličina kapi (izraženih kao PDI) i posledično u nivou transparentnosti nanoemulzija i mikroemulzija dobijenih upotrebom različitih vrednosti SOR (50:50, 60:40; 70:30, 80:20 i 90:10) u finalnim sistemima koji su sadržali 80% vode (*Tabela 4.1.*).

Ipak, zapažene su i određene sličnosti: minimalna SER vrednost (tj. koncentracija P80) koja je potrebna kako bi nastala nanoemulzija je bila 10, dok je minimalna vrednost SOR bila 1 (odnos 50:50) za sva testirana ulja. Veoma je značajna bila činjenica da su dobijene nanoemulzije sa sva 4 ulja maline i to kombinacijom samo tri sastojka: P80, RO i voda, uz minimalno mešanje i bez zagrevanja. Ovakvo ponašanje se može dovesti u vezu sa specifičnim sastavom ulja semena maline (do 85% polinezasićenih masnih kiselina i oko 12% mononezasićene oleinske kiseline). Naime, poznato je da izolovane polinezasićene masne kiseline, kao i ulja koja ih sadrže, mogu da formiraju razne tečno-kristalne strukture (Alam i sar., 2009; Fasolin i sar., 2012), što je i bilo primećeno u slučaju svih testiranih ulja maline, u vidu polu-transparentnih, polu-čvrstih izotropnih gel faza koje su prethodile nastanku P80 NEs (LC faza pod brojem 3, *Slika 4.1.*). Može se pretpostaviti da je kompatibilnost između hidrofobnog oleinskog dela molekula P80 (Walker i sar., 2015a) i samog ulja maline bazirana na njihovim strukturnim sličnostima, što je rezultiralo spontanom formiranjem prelazne gel faze, čijim daljim razblaženjem vodom nastaju nanokapi.

Tabela 4.1. Vizuelni izgled smeša surfaktanta P80 i ulja (SO mix) pre titracije vodom i glavne karakteristike rezultujućih niskoenergetskih P80 nanoemulzija/mikroemulzija pripremljenih sa različitim uljima semena maline (RO1–RO4) i različitim SOR vrednostima tokom ispitivanja faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu P80/RO/ voda, visokoprečišćena: prosečan dijametar kapi (Z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI), 24 h nakon izrade. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija.

Ulje semena maline	RO1	RO2	RO3	RO4
SOR 50:50				
SO mix	Zamućen, žut	Zamućen, žuto-narandžast	Transparentan, svetlo zelen	Zamućen, zlatno žut
Z-ave (nm)	161,37 \pm 0,65	134,83 \pm 0,04	163,20 \pm 0,26	148,10 \pm 0,46
PDI	0,108 \pm 0,016	0,071 \pm 0,018	0,120 \pm 0,008	0,088 \pm 0,024
SOR 60:40				
SO mix	Opalescentan, žut	Opalescentan, žuto-narandžast	Transparentan, svetlo zelen	Zamućen, zlatno žut
Z-ave (nm)	145,23 \pm 1,010	132,77 \pm 1,16	134,43 \pm 0,58	140,10 \pm 1,18
PDI	0,082 \pm 0,025	0,061 \pm 0,021	0,110 \pm 0,026	0,105 \pm 0,016
SOR 70:30				
SO mix	Opalescentan, žut	Opalescentan, žuto-narandžast	Transparentan, svetlo zelen	Transparentan, zlatno žut
Z-ave (nm)	126,17 \pm 0,51	141,00 \pm 4,06	137,20 \pm 1,13	139,67 \pm 2,60
PDI	0,049 \pm 0,020	0,067 \pm 0,049	0,050 \pm 0,025	0,064 \pm 0,009
SOR 80:20				
SO mix	Transparentan, žut	Transparentan, žuto-narandžast	Transparentan, svetlo zelen	Transparentan, zlatno žut
Z-ave (nm)	128,53 \pm 1,63	136,93 \pm 1,33	18,64 \pm 0,26	68,64 \pm 0,45
PDI	0,159 \pm 0,040	0,116 \pm 0,049	0,337 \pm 0,022	0,508 \pm 0,024
SOR 90:10				
SO mix	Transparentan, žut	Transparentan, žuto-narandžast	Transparentan, svetlo zelen	Transparentan, zlatno žut
Z-ave (nm)	19,72 \pm 9,31	21,05 \pm 7,73	13,77 \pm 1,31	28,79 \pm 1,71
PDI	0,175 \pm 0,028	0,190 \pm 0,093	0,306 \pm 0,067	0,932 \pm 0,065

Statistička analiza simultanog efekta promene SOR i tipa ulja semena maline (RO1–RO4) na prosečnu veličinu kapi (Z-ave) i distribuciju veličina kapi (PDI) ukazala je na značajne razlike između P80 nanoemulzija pripremljenih sa različitim vrednostima SOR i istim uljem semena maline, kao i između nanoemulzija pripremljenih sa istim SOR, a različitim uljem semena maline. Takođe, dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da su i interakcije između SOR i vrste ulja bile značajne ($p < 0,05$) (Slika 4.3.). Drugim rečima, nije bilo moguće promeniti tip ulja semena maline bez podešavanja SOR, kako bi se dobila nanoemulzija željenih karakteristika (npr. vizuelnog izgleda i veličine kapi).



Slika 4.3. Interakcije ulja semena maline različitog tipa (RO1–RO4) i SOR-a: a. prosečna veličina kapi (Z-ave) u zavisnosti od SOR, b. indeks polidisperznosti (PDI) u zavisnosti od SOR.

Objašnjenje ovog ponašanja može se naći u finim razlikama u hemijskom sastavu testiranih ulja (Tabela 3.1.). Naime, smatra se da hladno ceđena ulja, posebno nerafinisana, sadrže više tokoferola, karotenoida, fenolnih jedinjenja i fitosterola u poređenju sa ekstrahovanim uljima (Carvalho i sar., 2013; Van Hoed i sar., 2011; Yang i sar., 2011). Pomenuti sastojci, na žalost, najčešće nisu deo proizvođačke specifikacije iako mogu biti aktivni na međusloju surfaktant-ulje (Mayer i sar., 2013). Vrsta biljnog materijala je takođe veoma značajna, s obzirom da je dokazano da sadržaj tokoferola i karotenoida može varirati i po 2-3 puta u malinama različitih sorti (Carvalho i sar., 2013). Slična situacija je bila primećena i u slučaju ulja maline RO3 i RO4 korišćenih u ovom istraživanju, te iako su oba ulja proizvedena na identičan način (CO₂ ekstrakcijom), RO4 (ulje iz organske agrikulture) imalo je tri puta veći sadržaj tokoferola u odnosu na RO3, ulje iz standardnog uzgoja (prema proizvođačkoj specifikaciji, Tabela 3.1.). Dodatno, male razlike u profilu masnih kiselina (npr. u odnosu zasićenih/nezasićenih masnih kiselina) koje takođe zavise i od tehnike dobijanja ulja (Yang i sar., 2013) takođe doprinose razlikama između testiranih ulja semena maline. Drugo moguće objašnjenje može se dovesti u vezu sa poznatim ili nepoznatim aditivima u ulju semena maline. Na primer, RO3 i RO4 sadrže ekstrakt lista ruzmarina ($\leq 0,1\%$) koji ima ulogu antioksidansa, dok su hladno ceđena ulja RO1 i RO2 bila bez aditiva.

4.1.2. Optimizacija sastava nanoemulzija sa polisorbatom 80 (P80 NEs)

4.1.2.1. Optimizacija masne faze nanoemulzija – uticaj tokoferil acetata i/ili izostearil izostearata

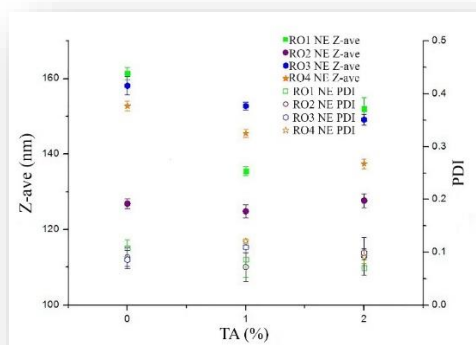
Studija faznog ponašanja pokazala je da se nanoemulzije mogu izraditi PIC metodom od samo tri sastojka – P80, vode i ulja semena maline. Ipak, nakon nekoliko dana/nedelja čuvanja svi uzorci sa niskim vrednostima SOR su pokazali određene znake nestabilnosti (agregacija, raslojavanje). Redosled stabilnosti nanoemulzija je bio: RO2 P80 NE > RO1 P80 NE > RO3 P80 NE > RO4 P80 NE. S obzirom da je pokazano da se translucetne nanoemulzije mogu dobiti samo za izuzetno visoke SOR vrednosti (80:20)

cilj dalje optimizacije nije bila veličina kapi ispod 100 nm, već maksimalan mogući sadržaj ulja semena maline uz što nižu koncentraciju upotrebljenog surfaktanta (SOR 50:50, SER 10), kako bi se izbegla iritacija kože. Koncentracija masne faze je ograničena na 10%, pri čemu je ulje semena maline (RO1–RO4) mešano sa lipofilnim estrima (tokoferil acetatom i izostearil izostearatom) kao deo standardne strategije za prevenciju glavnih vidova nestabilnosti nanoemulzije koji zavise od hidrofobnosti masne faze (npr. Ostvaldovo “sazrevanje” ili transfer uljanih kapi) (Fernandez i sar., 2004; Gupta i sar., 2016; Klang i sar., 2012). Takođe, ovakva intervencija je imala za cilj i da se eventualno minimizuju razlike među nanoemulzijama zapažene tokom studije faznog ponašanja koje su nastale usled upotrebe različitih ulja semena maline.

Uticaj tokoferil acetata na karakteristike P80 NEs

Tokoferil acetat je lipofilni estar, derivat alfa-tokoferola, koji se odavno koristi kao antioksidans u kozmetičkim formulacijama za negu kože (Chen i sar., 2012; Masaki 2010). Međutim, pokazano je da tokoferil acetat (TA) ispoljava ulogu kosurfaktanta i smanjuje veličinu kapi u formulacijama niskoenergetskih nanoemulzija zahvaljujući svojoj amfifilnoj prirodi, odnosno, pozicioniranju na međusloju ulje/voda. Drugi predloženi mehanizam baziran je na visokom viskozitetu TA, čijim dodatkom se povećava i viskozitet masne faze, te se posledično menja struktura tranzicione faze tokom procesa nastanka nanoemulzija niskoenergetskim metodama (Mayer i sar., 2013; Teo i sar., 2010).

Kao što je prikazano na *Slici 4.4.*, rezultati ukazuju da je dodatak 1 do 2% TA (od ukupnih 10% masne faze) doveo do značajnog smanjenja veličine kapi P80 NEs za sva testirana ulja semena maline, ali se optimalan odnos RO:TA razlikovao. Tako je za hladno ceđena ulja RO1 i RO2 optimalan odnos bio 9:1, dok je za CO₂-ekstrahovana ulja RO3 i RO4 iznosio 8:2 (dvo faktorska ANOVA, $p < 0,05$). Uz to, dodatak TA poboljšao je stabilnost P80 NEs na sobnoj temperaturi, s obzirom da je prosečna veličina kapi ostala nepromenjena nakon 45 dana čuvanja na sobnoj temperaturi. Formiranje agregata ili raslojavanje su bili inhibirani kod svih uzoraka, izuzev RO4 P80 NE. Ovi nalazi su u skladu sa prethodnim studijama koje su potvrdile stabilizujući efekat TA u nanoemulzionim sistemima (Mayer i sar., 2013; Teo i sar., 2010).



Slika 4.4. Uticaj koncentracije tokoferil acetata (TA%) na prosečan dijametar kapi (Z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) nanoemulzija sa polisorbitom 80 i 4 različita tipa ulja semena maline (RO1–RO4), 24 h nakon izrade.

Uticaj izostearil izostearata na karakteristike P80 NEs

Još jedan sastojak masne faze koji je razmatran u cilju dodatne stabilizacije i poboljšanja karakteristika P80 nanoemulzija za kozmetičku primenu je bio izostearil izostearat (ISIS). ISIS je emolijentni estar

razgranate strukture, potpuno zasićen, srednje polarnosti i prirodnog porekla. Dokazano je da ISIS poboljšava barijernu funkciju kože, a prilikom nanošenja na koži daje prijatan osećaj i poboljšava razmazivost proizvoda (Dederen i sar., 2012; Pennick i sar., 2010), ali njegova primena nije prethodno istražena u nanosistemima.

Rezultati preformulacionih istraživanja u SOW sistemima: P80, ISIS i/ili ulje semena maline RO1–RO4, i voda pokazala su da se ISIS može koristiti kao monokomponenta masne faze (P80 NE sledećeg sastava: 10% P80, 10% ISIS, 80% voda imala je Z-ave: ~ 158 nm, PDI ≤ 0,10). U kombinaciji sa uljem semena maline, optimalan odnos ISIS: RO iznosio je 1 (za 10% masne faze), a rezultujuće P80 NEs imale su prosečnu veličinu kapi od ~ 130 do 170 nm i PDI ≤ 0,1, u zavisnosti od upotrebljenog tipa ulja maline.

Uticaj kombinacije tokoferil acetata i izostearil izostearata na karakteristike P80 NEs

Nakon potvrđene kompatibilnosti TA i ISIS sa svim testiranim uljima semena maline, ispitana je i mogućnost kombinacije ova dva aditiva u formulacijama P80 NEs. Naime, nađeno je da dodatak TA u mešane masne faze RO/ISIS dovodi do smanjenja prosečne veličine kapi P80 NEs (≤ 152 nm). P80 NE pripremljena sa uljem RO2 imala je najmanju veličinu kapi (~131 nm, za odnos RO:ISIS:TA – 4,5:4,5:1), dok je redosled za ostale formulacije bio sledeći: RO1 P80 NE, RO4 P80 NE i RO3 P80 NE (~143 nm, 145 nm i 151 nm, redom), ali je optimalan odnos RO:ISIS:TA bio nešto drugačiji (4:4:2).

Kao zaključak studije optimizacije masne faze P80 NEs ističe se kompatibilnost oba testirana aditiva (TA i ISIS), samostalno ili u kombinaciji, sa svim testiranim uljima semena maline (RO1–RO4). Međutim, odnos komponenata masne faze se mora prilagođavati za svako ulje semena maline. Prema tome, nije bilo moguće prevazići inicijalne razlike između formulacija P80 NEs pripremljenih sa različitim uljima semena maline jednostavnim uvođenjem lipofilnih aditiva TA i/ili ISIS. Takođe, primećeno je da P80 NEs pripremljene sa RO2 uljem semena maline (hladno ceđeno, nerafinisano, organsko), imaju najmanju prosečnu veličinu kapi i u slučaju kada je RO2 jedina komponenta masne faze i u prisustvu lipofilnih aditiva.

4.1.2.2. Optimizacija vodene faze P80 NEs – uticaj glicerola i hidroglikolnih ekstrakata ploda maline (RE) i ploda hrasta kitnjaka (FE)

Imajući u vidu da moderni dermokozmetički proizvodi predstavljaju kompleksne smeše lipofilnih i hidrofилnih aktivnih sastojaka, surfaktanta, vode i aditiva (npr. konzervansi, reološki modifikatori, parfemi) isti zahtevi važe i za nanokozmetiku. Međutim, evidentan je nedostatak originalnih naučnih radova koji se bave uticajem poliola, kao i hidroglikolnih ekstrakata biljaka i voća pogodnih za dermokozmetičku primenu, na formiranje i stabilnost PIC nanoemulzija, pripremljenih sa masnom fazom koja sadrži i biljna ulja.

Poznato je da polioli interaguju sa molekulima surfaktanata na međusloju ulje i voda čime dolazi do smanjenja površinskog napona i promene spontane krivine surfaktanta, a posledično može doći i do promene faznog ponašanja u SOW sistemu. Na primer, dokazano je da glicerol dovodi do dehidratacije hidrofилnih polarnih glava molekula P80, što dovodi do promene optimalne krivine surfaktanta i nastanka niskoenergetskih nanoemulzija ili mikroemulzija različitog tipa (Alam i sar., 2009; Saberi i sar., 2013). Dodatak poliola (najčešće glicerola ili propilenglikola) može dovesti do smanjenja veličine kapi i posledično do povećanja transparentnosti nanoemulzija, a ponekad polioli dovode i do smanjenja koncentracije surfaktanta neophodnog za formiranje nanoemulzije (Saberi i sar, 2013; Szumala i sar. 2015).

Benefit upotrebe poliola u kozmetici ogleda se i u njihovom humektantnom/ hidratišućem efektu (Alam i sar., 2009), što predstavlja dodatni razlog za uključivanje glicerola u P80 NEs. U cilju obogaćivanja

formulacija P80 NEs sa uljem semena maline i eventualne dodatne stabilizacije, testirana je i mogućnost dodatka hidroglikolnih ekstrakata ploda maline (RE) i ploda (žira) hrasta kitnjaka (FE), imajući u vidu obilje bioaktivnih sastojaka u ovim ekstraktima sa antioksidativnim efektom (https://www.crodabeauty.com/en-gb/products/product/2919-phytessence_1_french_1_oak; Rios de Souza, 2014; Popović i sar., 2013; Van Hoed i sar., 2011). Prema tome, P80 NEs su pripremljene sa 4 različita ulja semena maline (uz dodatak TA ili TA/ISIS, u prethodno ustanovljenim optimalnim odnosima) i vodenom fazom, sa dodatkom glicerola ili hidroglikolnih ekstrakata RE/ FE, a analiza prosečne veličine kapi (Z- ave) i indeksa polidisperznosti (PDI) je sprovedena 24 h i jedan mesec nakon izrade. Kao što je prikazano u *Tabeli 4.2.*, vrednosti Z-ave i PDI su varirale među uzorcima P80 NEs pripremljenim sa različitim lipofilnim/hidrofilnim aditivima (Z-ave: od ~120 nm do ~170 nm i PDI: od ~0,05 do ~0,125), pri čemu su optimalne koncentracije hidrofilnih aditiva bile 4 do 8% (za glicerol), odnosno, 4% (za ekstrakte RE i FE) (računato na ukupnu masu P80 NE).

Tabela 4.2. Preformulaciona studija sa različitim uljima semena maline (RO–RO4) i različitim lipofilnim aditivima (TA i ISIS) i hidrofilnim aditivima (glicerolom – GLI ili ekstraktima – RE/FE): prosečna veličina kapi nanoemulzija – Z-ave (nm) i indeks polidisperznosti – PDI, 24 h i mesec dana nakon izrade. Uzorci sa vidljivim znacima raslojavanja ili agregacije označeni su kao nestabilni (nest.)

Vodena faza (%)	GLI				RE				FE			
	4		8		4		8		4		8	
Masna faza (%)	24h	1m	24h	1m	24h	1m	24h	1m	24h	1m	24h	1m
RO1 - 9 TA - 1	144,6 nm	146,6 nm	157,2 nm	153,5 nm	165,3 nm	168,7 nm	151,6 nm	154,9 nm	151,6 nm	152,3 nm	131,3 nm	134,7 nm
	0,108	0,122	0,074	0,110	0,097	0,096	0,108	0,089	0,095	0,102	0,085	0,084
RO1 - 4 ISIS - 4 TA - 2	148,3 nm	146,3 nm	140,2 nm	139,7 nm	149,5 nm	154,5 nm	153,3 nm	159,6 nm	145,3 nm	146,2 nm	140,4 nm	140,8 nm
	0,081	0,098	0,060	0,129	0,099	0,084	0,105	0,092	0,092	0,060	0,116	0,125
RO2 - 9 TA - 1	141,7 nm	140,0 nm	131,3 nm	130,3 nm	122,3 nm	129,1 nm	128,4 nm	127,1 nm	124,6 nm	124,5 nm	130,2 nm	127,2 nm
	0,054	0,080	0,079	0,070	0,054	0,093	0,066	0,082	0,085	0,068	0,085	0,104
RO2 - 4,5 ISIS - 4,5 TA - 1	129,6 nm	125,6 nm	134,8 nm	128,6 nm	134,1 nm	131,7 nm	140,2 nm	142,3 nm	124,8 nm	125,8 nm	139,7 nm	145,4 nm
	0,051	0,066	0,086	0,089	0,090	0,084	0,095	0,092	0,093	0,100	0,077	0,100
RO3 - 8 TA - 2	147,7 nm	148,4 nm	161,4 nm	159,8 nm	147,8 nm	150,2 nm	142,2 nm	144,1 nm	156,7 nm	155,9 nm	170,9 nm	158,6 nm
	0,107	0,108	0,081	0,098	0,137	0,090	0,084	0,100	0,131	0,124	0,139	0,081
RO3 - 4 ISIS - 4 TA - 2	144,9 nm	144,6 nm	156,6 nm	170,6 nm	134,9 nm	141,2 nm	169,3 nm	171,8 nm	143,7 nm	144,3 nm	155,9 nm	157,4 nm
	0,111	0,101	0,089	0,134	0,126	0,099	0,103	0,125	0,093	0,127	0,103	0,133
RO4 - 8 TA - 2	138,5 nm	142,5 nm	146,9 nm	147,6 nm	143,3 nm	146,2 nm	157,4 nm	162,3 nm	156,4 nm	nest.	159,2 nm	nest.
	0,111	0,100	0,121	0,133	0,114	0,107	0,142	0,124	0,089	nest.	0,120	nest.
RO4 - 4 ISIS - 4 TA - 2	152,9 nm	154,3 nm	135,5 nm	nest.	135,4 nm	135,0 nm	nest.	nest.	130,1 nm	136,4 nm	nest.	nest.
	0,112	0,104	0,106	nest.	0,103	0,089	nest.	nest.	0,135	0,106	nest.	nest.

Pokazano je da su ove optimalne koncentracije u snažnoj vezi sa prelaznim gel fazama koje su identifikovane tokom preformulacione studije kao neophodan korak tokom nastanka P80 NE primenom PIC metode, budući da su veće koncentracije hidrofилnih aditiva (tj. $\geq 12\%$ za glicerol, odnosno, $\geq 8\%$ za RE/FE) ometale formiranje ključnih prelaznih faza. Takođe, zaključeno je da dodatak hidrofилnih aditiva u formulacije sa već optimizovanom masnom fazom nije doveo do drastičnijeg smanjenja veličina kapi P80 NEs, te nije bilo moguće dobiti translucetne ili transparente sisteme. Ovakvi rezultati se mogu objasniti činjenicom da je dokazano da su obično potrebne veće koncentracije poliola (npr. $> 20\%$) i/ili SOR vrednosti kako bi se dobili transparentniji sistemi (Mayer i sar., 2013; Walker i sar., 2015a).

Konačno, imajući u vidu rezultate optimizacije sastava masne i vodene faze, primećeno je da P80 NEs pripremljene sa RO2 (hladno ceđenim, nerafinisanim, organskim uljem semena maline) pokazuju najmanje veličine kapi (Z-ave: ~ 122 do 145 nm) i najniže PDI vrednosti ($PDI \leq 0,1$) u odnosu na ostala testirana ulja. S obzirom da su ovi uzorci imali i dobru preliminarnu stabilnost nakon mesec dana čuvanja na sobnoj temperaturi (Tabela 4.2.), zaključeno je da je ulje RO2 najbolji izbor za formulacije niskoenergetskih nanoemulzija sa P80.

4.1.3. Ramanska spektroskopija ulja semena maline različitog tipa i odgovarajućih P80 NEs

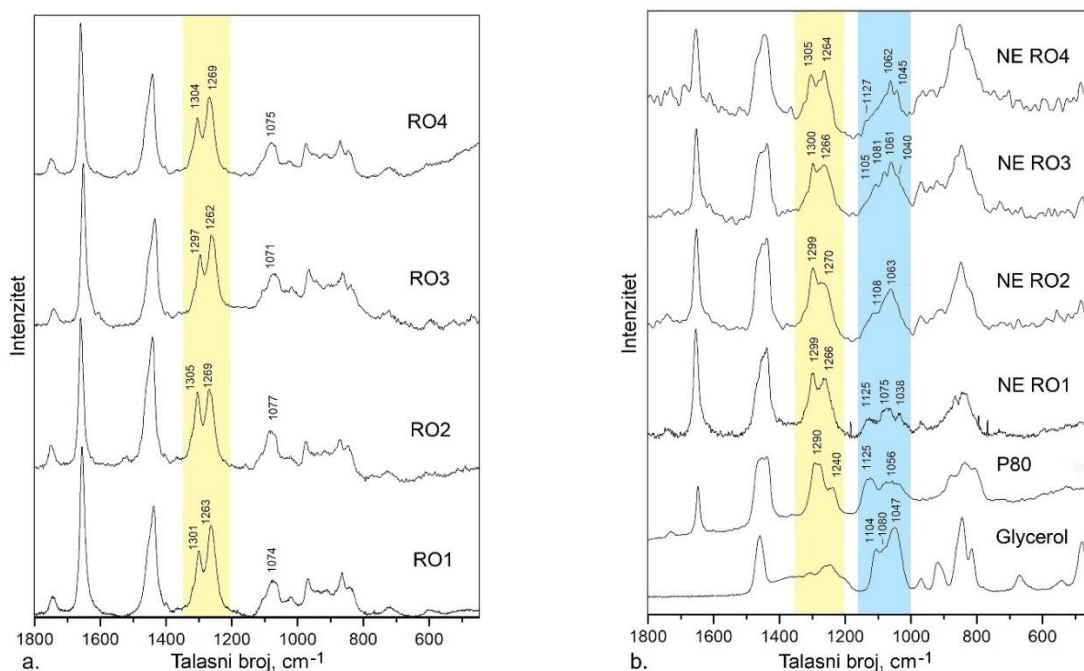
Ramanska spektroskopija je napredna tehnika koja može da se koristi za određivanje profila masnih kiselina, tj. stepena nezasićenosti biljnih ulja (Dennis, 2007; Jiménez-Sanchidrian i Ruiz, 2016), kao i za detekciju minornih bioaktivnih komponenti, na primer, karotenoida (Duraipandian i sar., 2019; Ferreira i sar., 2013) i tokoferola (Beattie i sar., 2007; Feng i sar., 2013). Nedavno je pokazano da se Ramanska spektroskopija može koristiti i za analizu strukturnih promena kada se inkorporira kurkumin (Rachmawati i sar., 2015) ili proteini (Zhu i sar., 2019) u nanokapi, kao i za praćenje interakcija među sastojcima nanoemulzije.

4.1.3.1. Ramanski spektri ulja semena maline različitog tipa

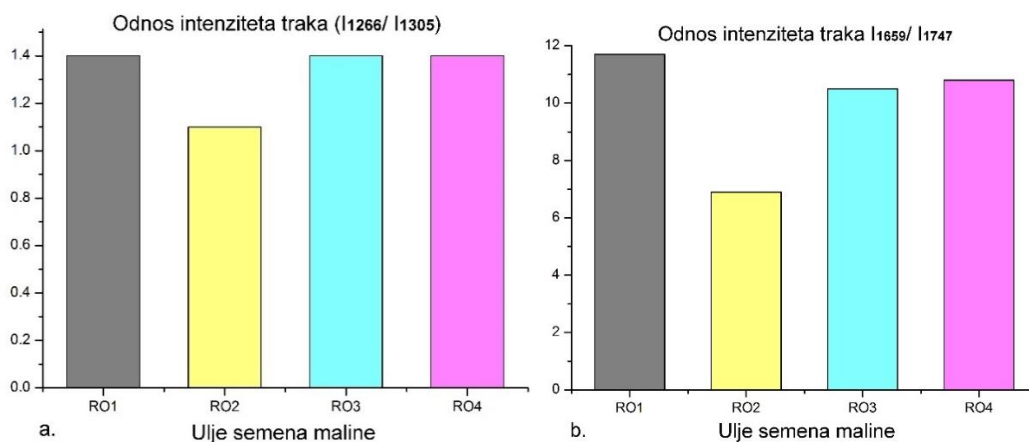
U ovoj doktorskoj disertaciji prikazani su po prvi put Ramanski spektri ulja semena maline, a takođe je po prvi put sprovedena studija koja se bavila ispitivanjem uticaja finih razlika u uljima semena maline različitog tipa na formiranje niskoenergetskih nanoemulzija stabilizovanih polisorbitom 80 (P80 NEs), kao i interakcijama među sastojcima nanoemulzija. Na *Slici 4.5a.* prikazan je ključni region ("region otiska prsta") Ramanskog spektra ulja semena maline (1800 to 800 cm^{-1}) u kome se ističu 2 glavna spektralna paterna: jedan koji odgovara polinezasićenim masnim kiselinama (linolnoj C18:2 $\omega 6$, linolenskoj C18:3 $\omega 3$ i oleinskoj C18:1 $\omega 9$ kiselini) i drugi koji odgovara zasićenim masnim kiselinama (palmitinskoj C16:0 i stearinskoj C18:0). Nađeno je da su spektri sva 4 ulja semena maline veoma slična, sa trakama koje odgovaraju mastima i uljima na sledećim pozicijama: ~ 1747 cm^{-1} (istežuća karbonilna C=O vibracija), ~ 1659 cm^{-1} (C=C vibracija u ugljovodoničnim lancima masnih kiselina), ~ 1440 cm^{-1} (makazaste deformacione vibracije CH₂ grupa u lancima masnih kiselina), ~ 1305 cm^{-1} (uvijajuća vibracija metilenske grupe), ~ 1266 cm^{-1} (savijajuća deformaciona =C–H vibracija), i ~ 1079 cm^{-1} (skeletne C–C vibracije u lancu masnih kiselina) (Dennis, 2007; Duraipandian i sar., 2019; Ferreira i sar., 2013; Jiménez-Sanchidrian i Ruiz, 2016).

Najistaknutije uočene razlike ticale su se odnosa relativnih intenziteta traka koje su u vezi sa stepenom nezasićenosti ugljovodoničnih lanaca u uljima: odnosi I_{1266}/I_{1305} (*Slika 4.6a.*) i I_{1659}/I_{1749} (*Slika 4.6b.*) bili su veći u slučaju RO1, RO3 i RO4 ulja, u poređenju sa RO2. Naime, dokazano je da se povećanje nezasićenosti ulja ispoljava povećanjem intenziteta traka na ~ 1266 cm^{-1} (C=C–H savijajuća

deformaciona vibracija) (Duraipandian i sar., 2019; Jiménez-Sanchidrian i Ruiz, 2016) i trake na $\sim 1659 \text{ cm}^{-1}$ (C=C vibracija u ugljovodoničnim lancima masnih kiselina) (Dennis, 2007; Ferreira i sar., 2013), pri čemu traka na $\sim 1747 \text{ cm}^{-1}$ (istežuća karbonilna C=O vibracija) predstavlja interni standard (Dennis, 2007). Ovakve spektralne karakteristike različitih ulja semena maline bile su u skladu da proizvođačkom specifikacijom (Tabela 3.1.), iz kojih se vidi da je RO2 ulje imalo 6,62% zasićenih masnih kiselina i 92,25% ukupnih nezasićenih masnih kiselina, dok su sva ostala ulja imala niži sadržaj zasićenih masnih kiselina (3,09 do 4,04%) i viši sadržaj ukupnih nezasićenih masnih kiselina (94,05 do 96,10%).



Slika 4.5a. Ramanski spektri različitih ulja semena maline: RO1 – RO4; b. Ramanski spektri P80, glicerola i P80 NEs pripremljenih sa različitim uljima semena maline, snimljeni 48 h nakon izrade (P80 NE sastav: P80 10%, RO1/RO2/RO3/RO4, 9%, tokoferil acetat 1%, glicerol 8% i voda 72%).



Slika 4.6a. Odnos intenziteta traka (I₁₂₆₆/ I₁₃₀₅) i b. odnos intenziteta traka (I₁₆₅₉/ I₁₇₄₇) u Ramanskim spektrima različitih ulja semena maline (RO1–RO4).

Druga zapažena razlika među Ramanskim spektrima različitih ulja semena maline odnosila se na sadržaj karotenoida u ovim uljima, koji inače nisu uključeni u proizvođačku specifikaciju. Naime, nađeno je da samo organska, nerafinisana ulja – RO2 (hladno ceđeno) i RO4 (CO₂-ekstrahovano), pokazuju prisustvo traka na ~1524 cm⁻¹ (C=C istežuća vibracija u karotenoidima) i na ~1159 cm⁻¹ (C-C istežuća vibracija) (Duraipandian i sar., 2019; Ferreira i sar., 2013). Ovo je bilo u saglasnosti sa intenzivnom zlatno žutom ili narandžastom bojom ovih organskih ulja (*Slika 4.1.*), kao i sa poznatom činjenicom da sadržaj ovih bioaktivnih sastojaka može varirati i 2-4 puta u zavisnosti od vrste maline (Yang i sar., 2011) ili načina proizvodnje ulja (Van Hoed i sar., 2011). Treba napomenuti da tokoferoli nisu mogli biti određeni na ovaj način usled preklapanja sa trakama samih masnih kiselina u ulju maline (Beattie i sar., 2007; Feng i sar., 2013), što ne znači da nisu prisutni (npr. proizvođačka specifikacija je potvrdila prisustvo tokoferola i tokotrienola u RO3 i RO4, dok za RO1 i RO2 nije bio dostupan ovaj podatak).

4.1.3.2. Ramanski spektri P80 NEs sa uljima semena maline različitog tipa

Kada je reč o Ramanskim spektrima P80 NEs pripremljenih sa različitim uljima semena maline (identičnog sastava osim tipa ulja maline), primećene su trake koje odgovaraju glavnim komponentama nanoemulzija – polisorbitat 80, glicerol i ulje maline (*Slika 4.5b.*), uz blago pomeranje u položaju određenih traka, kao i promenu odnosa intenziteta traka. Naime, odnos traka na ~1305 cm⁻¹ i 1266 cm⁻¹ u spektrima P80 NEs je promenjen u odnosu na odnose koji su zapaženi za čista ulja maline. Intenzitet trake na ~1300 cm⁻¹ povećao se u spektrima svih P80 NEs, što se može dovesti u vezu sa doprinosom trake iz surfaktanta P80, a koja se u čistom spektru zapaža na ~1290 cm⁻¹ (CH₂ uvijajuća vibracija u ravni i CH₂ deformaciona vibracija u oleinskoj kiselini). Razlike su uočene i u regionu od 1200 do 900 cm⁻¹, što je karakteristično za skeletne C-C vibracije ugljovodoničnog lanca, kao i za C–O istežuće vibracije (*Slika 4.5b.*). Zapažene razlike u spektrima NE se mogu objasniti interakcijama između komponentata nanoemulzije (ulje semena maline, polisorbitat 80, glicerol i voda), što dovodi do pomeranja traka karakterističnih za čist P80 i glicerol. U spektru čistog P80 zapažene su dve karakteristične trake: na 1125 cm⁻¹ (mod istežuće C–OH vibracije) i široka traka na 1056 cm⁻¹, kao rezultat kombinacije traka koje potiču od moda istežuće C–OH vibracije i uvijajuće CH₂ vibracije. Spektar čistog glicerola pokazuje tri karakteristične trake: na 1047 cm⁻¹ i 1080 cm⁻¹ (C–OH istežuće vibracije) i na 1104 cm⁻¹ (uvijajuća CH₂ vibracija). Međutim, kada je glicerol u vodenom rastvoru (kao što je slučaj sa U/V nanoemulzijom), nova traka koja potiče od slabije povezanih molekula glicerola (npr. monomera i dimera) se može pojaviti na 1125 cm⁻¹ (nove C–OH istežuće vibracije), s obzirom da je očekivano da oligomeri glicerola prelaze sa razblaženjem u monomere i dimere (Mudalige i sar., 2007).

Najznačajniji nalaz odnosio se na spektar P80 NEs pripremljenih sa RO2 uljem, s obzirom da su primećene samo dve trake, na 1063 i 1108 cm⁻¹, za razliku od ostalih nanoemulzija gde su pored trake na ~ 1063 cm⁻¹ bile prisutne i trake karakteristične za čist P80 i glicerol. S obzirom da su sva ulja semena maline imala traku na ~ 1075 cm⁻¹ (skeletne C–C vibracije u lancu masnih kiselina), nova traka na 1063 cm⁻¹ u P80 NE RO2 spektru je verovatno rezultat nove uniformne strukture sačinjene od glicerola, P80 i RO2. Ova nova struktura nastala je usled drugačijeg pakovanja uzrokovanog promenjenim konformacijama i dinamici ugljovodoničnog lanca, kao i formiranju vodonične veze u vodenoj nanoemulzionoj sredini. Može se pretpostaviti da su ove interakcije koje su nastale u slučaju RO2 ulja dovele do formiranja stabilne nanoemulzije sa najmanjom veličinom kapi (RO2 P80 NE: 125,5 nm), dok je redosled veličina kapi kod ostalih uzoraka bio sledeći: RO3 P80 NE: 143,9 nm, RO4 P80 NE: 151,8 nm i RO1 P80 NE: 157,2 nm. Rezultati Ramanske spektroskopije P80 nanoemulzija pripremljenih sa različitim uljima semena maline su bili generalno u saglasnosti sa rezultatima preformulacione studije gde je zapaženo da se ulja semena maline različitog tipa ne mogu međusobno zameniti bez značajnog uticaja na karakteristike (Z-ave i PDI), kao i preliminarnu stabilnost P80 nanoemulzija.

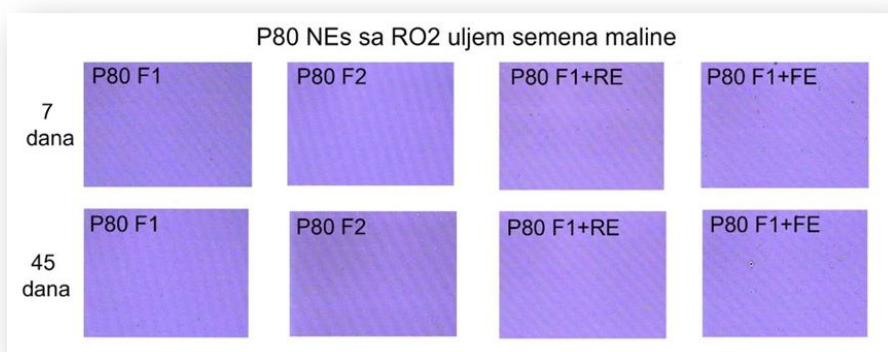
4.1.4. Formulaciona istraživanja optimizovanih P80 NEs sa RO2 uljem semena maline: fizičko-hemijska karakterizacija i stabilnost

Kao što je već napomenuto, preformulaciona studija je nedvosmisleno ukazala da je pored SOR i SER vrednosti ključan parametar za nastanak P80 niskoenergetskih nanoemulzija PIC metodom bio izbor odgovarajućeg ulja semena maline, pri čemu je RO2 bilo optimalno ulje za dalji razvoj nanoemulzija. Takođe, zapaženo je da je neophodan preduslov za nastanak P80 NE bila prelazna gel faza (po pretpostavci tečno-kristalne prirode). Kako bi se stekao detaljniji uvid u mehanizam nastanka P80 NE upotrebom PIC metode, kao i karakteristike finalnih nanoemulzija, sprovedena je detaljna karakterizacija (mikroskopska analiza uz analizu veličine kapi DLS/LD metodama, merenje električne provodljivosti, reološka i teksturna analiza, merenje pH vrednosti itd.)

4.1.4.1. Mikroskopska analiza optimizovanih P80 NEs

Mikroskopska istraživanja omogućavaju direktan uvid u prisustvo/odsustvo agregata kapi nanoemulzije i/ili surfaktanta (optička mikroskopija) ili submikronsku strukturu nanoemulzija (npr. mikroskopija atomskih sila), zbog čega se uobičajeno koriste kao tehnike komplementarne sa DLS/LD merenjima koja na indirektnan način određuju prosečnu veličinu kapi uzorka (Klang i sar., 2012; Nikolic i sar., 2018).

S obzirom da je RO2 (hladno ceđeno, nerafinisano, organsko ulje semena maline) bilo optimalno za dalji razvoj nanoemulzija, pripremljen je set dodatnih uzoraka prelaznih gel faza sa 30% vodene faze (P80 G1, P80 G2, P80 G1+RE i P80 G1+FE, *Tabela 3.2.*), kao i finalnih P80 NEs optimizovanog sastava sa 80% vodene faze (P80 F1, P80 F2, P80 F1+RE i P80 NE F1+FE, *Tabela 3.2.*). Nađeno je da su sve ispitivane gel faze izotropne bez obzira na dodatak ISIS/TA i/ili hidroglikolne ekstrakte RE/FE (vidno polje je ostalo tamno, bez vidljivih struktura, *Slika 4.2a*). Mikroskopska analiza optimizovanih P80 NEs nije pokazala znakove formiranja agregata kapi ili drugih znakova nestabilnosti nakon 45 dana čuvanja na sobnoj temperaturi (*Slika 4.7.*), što je bilo u skladu sa veličinama nanokapi od 150 nm i veoma niskim vrednostima PDI ($< 0,1$), dobijenim pomoću DLS/LD merenja. Zapaženo je da je dodatak ekstrakata RE i FE doveo do smanjenja veličina kapi nanoemulzija P80 F1+RE i P80 F1+FE, redom (*Tabela 4.3.*), što je u skladu sa poznatim saznanjima da biljni ekstrakti mogu da utiču na veličinu kapi i stabilnost emulzija, usled interakcija sa molekulima surfaktantata (Zillich i sar., 2015).

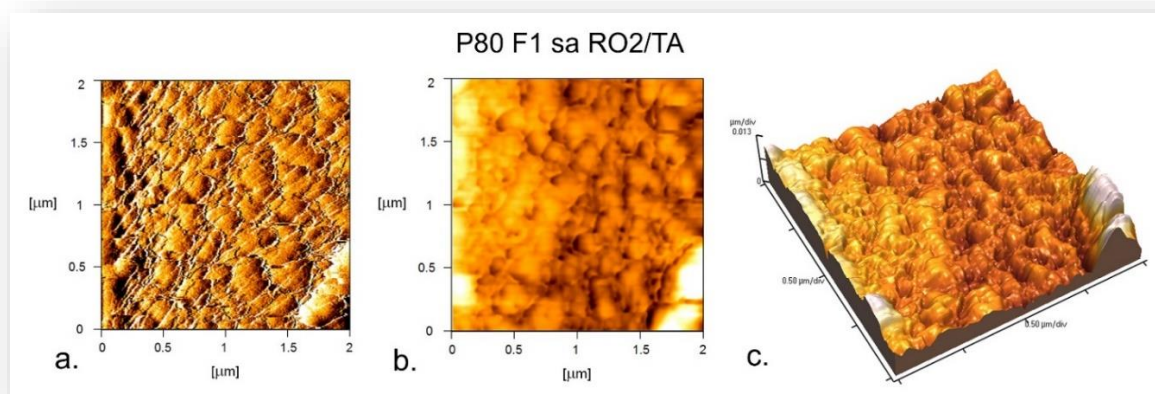


Slika 4.7. Optička mikroskopija P80 nanoemulzija sa RO2 uljem semena maline različitog sastava 7 dana nakon izrade (gornji red) i 45 dana nakon izrade (donji red); uzorci su čuvani na $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, a mikrografije su urađene pri uveličanju 400x.

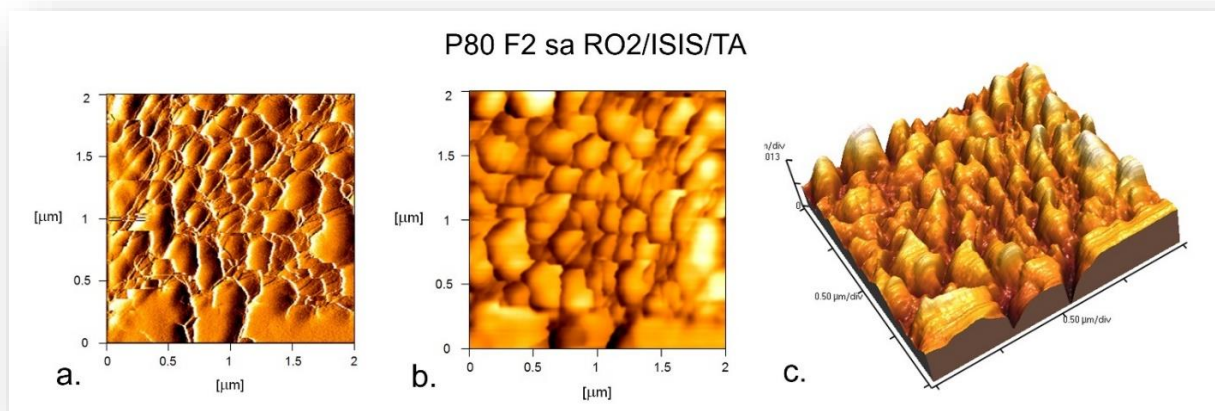
Tabela 4.3. Preliminarna stabilnost optimizovanih P80 NEs sa uljem maline RO2: DLS merenja - prosečna veličina kapi (Z-ave), indeks polidisperznosti (PDI), pH vrednost i električna provodljivost (el.prov.) 24 h nakon izrade i nakon 45 dana čuvanja na 25±1°C. Parametri koji se odnose na LD merenja (d10, d50, d90) su dobijeni nakon 45 dana čuvanja na 25±1 °C.

	Z-ave (nm)		PDI		d10	d50	d90	pH		El. prov. (μS/cm)	
	24h	45d	24h	45d	45d			24h	45d	24h	45d
P80 F1	131,0	130,3	0,079	0,070	0,110	0,142	0,183	6,603	6,650	71,43	61,18
st. dev.	1,877	3,252	0,008	0,027				0,031	0,010	0,251	0,352
P80 F2	134,8	128,6	0,086	0,089	0,115	0,148	0,191	7,313	6,783	66,97	65,23
st.dev.	4,179	2,774	0,011	0,042				0,006	0,038	0,416	0,057
P80 F1+RE	122,3	123,1	0,054	0,093	0,108	0,140	0,179	6,647	6,423	94,57	79,37
st.dev.	3,427	2,706	0,033	0,012				0,006	0,015	0,115	0,153
P80 F1+FE	124,6	124,6	0,085	0,068	0,104	0,136	0,176	5,650	5,693	251,33	228,33
st.dev.	3,407	1,007	0,007	0,013				0,010	0,021	0,577	0,577

Mikroskopija atomskih sila omogućila je bliži uvid u morfologiju i veličinu kapi P80 nanoemulzija, budući da je reč o submikronskom opsegu veličina (Nikolic i sar., 2018). Kao što je prikazano na Slici 4.8. kapi P80 NEs su bile ovalnog oblika koji se donekle razlikovao u zavisnosti da li je u masnoj fazi bio prisutan izostearil izostearat ili ne, dok je opseg veličina generalno bio u skladu sa rezultatima DLS/LD merenja. Takođe, primećeno je da su kapi međusobno pozicionirane veoma blizu, što je verovatno posledica razblaženja koje je korišćeno tokom pripreme uzorka, kao i sušenja uzorka tokom koga često dolazi do udruživanja kapi ili geliranja (Alessandrini i Facci, 2014).



Slika 4.8. Mikroskopija atomskih sila reprezentativnog stabilnog uzorka P80 F1 sa uljem semena maline RO2 i TA: a. 2D signal greške; b. 2D topografija, c. 3D topografija; mikrografije su snimljene 7 dana nakon izrade.



Slika 4.9. Mikroskopija atomskih sila reprezentativnog stabilnog uzorka P80 F2 sa uljem semena maline RO2 i ISIS/TA: a. 2D signal greške; b. 2D topografija, c. 3D topografija; mikrografije su snimljene 7 dana nakon izrade.

4.1.4.2. Analiza krivih električne provodljivosti tokom procesa nastanka P80 NEs primenom PIC metode

U cilju dodatnog razjašnjenja mehanizma nastanka stabilnih P80 NEs sa odabranim uljem semena maline (RO2), kao i lipofilnim (ISIS/TA)/ hidrofilnim aditivima (RE/FE) (Tabela 3.2.), krive električne provodljivosti konstruisane su tokom izrade primenom PIC metode (titracija smeše P80 i masne faze vodenom fazom). Kao što je prikazano na *Slici 4.10.*, tokom procesa formiranja P80 NEs primećeno je nekoliko karakterističnih faza: i) pri nižem sadržaju vodene faze (do ~ 20%) vrednosti električne provodljivosti su bile veoma niske, što ukazuje na vodenu fazu koja se nalazi okružena masnom fazom (V/U emulzija); ii) daljim dodatkom vodene faze (od ~ 20 do 40%) vrednosti električne provodljivosti su se povećale usled formiranja vodenih kanala, što ukazuje na postojanje bikontinuirane strukture (najverovatnije, kubne tečno-kristalne gel faze); iii) kada vodena faza prevaziđe ~40 do 50% u SOW sistemu, vodena faza postaje spoljašnja faza i sistem počinje da teče; iii) konačno, kada sadržaj vode prevaziđe ~55 – 60% električna provodljivost dostiže maksimalne vrednosti (za formulacije P80 F1, P80 F2 i P80 F1+RE), s obzirom da je sva voda postala spoljašnja faza, tokom formiranja P80 NEs U/V tipa. Daljim povećanjem koncentracije vodene faze (tj. za vrednosti od ~65-80%) električna provodljivost pomenutih uzoraka opada, što je prethodno opisano kao fenomen razblaženja (Nikolic i sar., 2018).

Jedini izuzetak je bila formulacija P80 F1+FE kod koje je električna provodljivost kontinuirano rasla sa daljim dodatkom vodene faze (do finalnih 80%). Ovakvo ponašanje je bilo izazvano prisustvom FE u vodenoj fazi pomenute nanoemulzije. Naime, u proizvođačkoj specifikaciji FE ekstrakta i u publikacijama koje se tiču ekstrakata sličnog sastava (Popović i sar., 2013; Vinha i sar., 2016) stoji da ovi hidroglukolini ekstrakti predstavljaju bogat izvor bioaktivnih sastojaka pogodnih za kozmetičku/farmaceutsku primenu (npr. tanini, flavonoidi, proantocijanidini, hlorofili, fenolne kiseline). Prema tome, najveća vrednost električne provodljivosti uzorka P80 F1+FE je očekivano bila primećena tada kada je i sadržaj vodene faze u uzorku bio maksimalan. Što se tiče uticaja ostalih varijacija u sastavu nanoemulzija, pokazano je da mešanje RO2 sa ISIS/TA ili dodatak hidroglukolnog ekstrakta ploda maline (RE) u vodenu fazu nije imalo velikog uticaja na električnu provodljivost. Analizom krive električne provodljivosti tokom titracije P80 vodenim rastvorom glicerola (10%) (kontrolni uzorak P80 Fc) uočeno

je da su vrednosti električne provodljivosti bile niže u odnosu na uzorke nanoemulzija, a takođe je izostala i karakteristična gusta gel faza.

Prema tome, zaključeno je da je nastanak karakteristične kubne tečno-kristalne gel faze, kao ključne tokom formiranja P80 NEs putem PIC metode, zapravo indukovano specifičnim sastavom masne faze korišćene za izradu ovih formulacija, što je bilo u skladu sa nalazima drugih autora (Alam i sar., 2009). Takođe, potvrđeno je da dodatak optimalne koncentracije glicerola (10%), ili hidroglikolnih ekstrakata RE/FE (5%) u vodenu fazu nanoemulzije nije remeti nastanak ključne prelazne faze, što je rezultiralo formiranjem stabilnih P80 NEs.

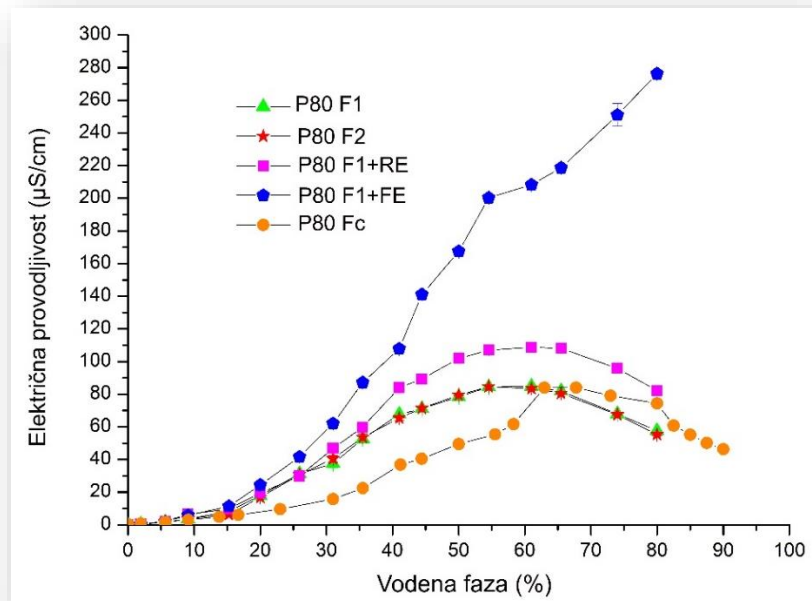


Fig 4.10. Krive električne provodljivosti u funkciji koncentracije vodene faze (% m/m) tokom formiranja P80 nanoemulzija (P80 F1, P80 F2, P80 F1+RE, P80 F1+FE) i kriva električne provodljivosti kontrolne binarne smeše - P80 Fc (P80 / vodeni rastvor glicerola, 10%).

4.1.4.3. Reološka i teksturna analiza

Reološka i teksturna analiza sprovedena je kako bi se stekao dublji uvid u strukturu karakterističnih tečno-kristalnih gel faza (najverovatnije kubnih) koje su detektovane kao ključne za nastanak P80 NEs. Takođe, ova ispitivanja su imala za cilj da se istraži potencijalna veza između karakteristika odabranih gel faza (P80 G1, P80 G2, P80 G1+RE, P80 G1+FE, *Tabela 3.2.*) i odgovarajućih optimalnih P80 NEs (P80 F1, P80 F2, P80 F1+RE i P80 F1+FE, *Tabela 3.2.*)

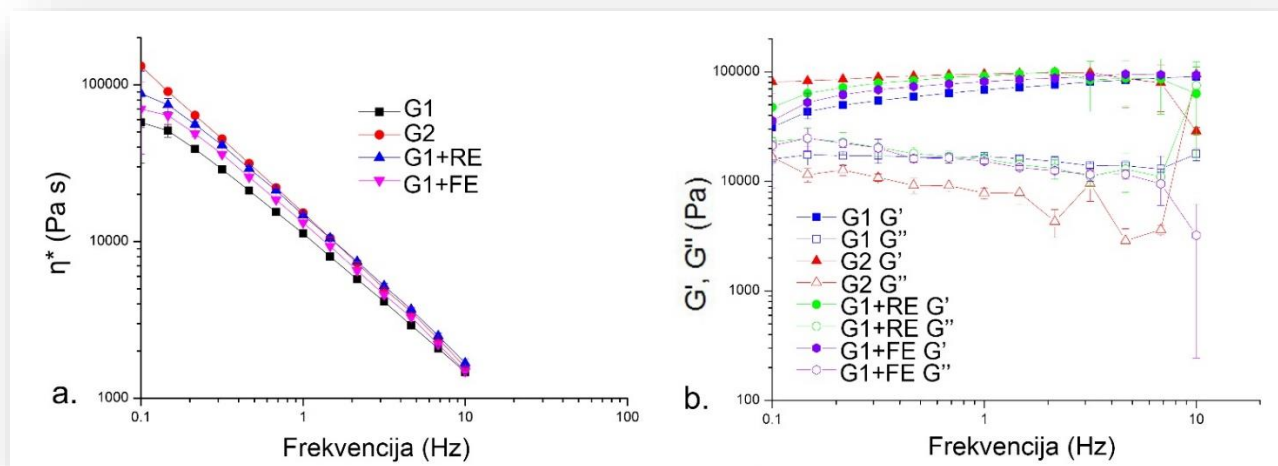
Oscilatorna reološka merenja gel faza

Poznato je da su kubne tečno-kristalne faze veoma elastične izotropne faze (Bento da Silva i sar., 2017; Garti i sar., 2012) sačinjene od micela surfaktanta organizovanih u trodimenzionalnu rešetku, što se može dokazati kombinacijom oscilatornih reoloških merenja i teksturne analize (Alam i sar., 2009; Bento da Silva i sar., 2017; Fonseca-Santos i sar., 2017). Naime, u studiji koja se bavila SOW sistemom P80/ulje (skvalan/tečni parafin/dekan)/ voda pokazano je da prisustvo skvalana kao masne faze dovodi do formiranja kubne gel faze. Daljim razblaženjem ove prelazne faze vodom nastaju gel-emulzije, pri čemu

autori konstatuju da je prethodno pokazano da se na sličan način mogu dobiti i nanoemulzije (Alam i sar., 2009), kao što je bio slučaj sa uzorcima ispitivanim u okviru ove doktorske disertacije (Tabela 3.2.).

Glavna odlika kubne gel faze je njena struktura “čvrstog gela” (engl. “*hard-gel*” structure), što je tipična karakteristika kubne rešetke (Alam i sar., 2009; Bento da Silva i sar., 2017; Garti i sar., 2012). Naime, ova osobina je primećena i u slučaju gel faza tokom nastanka P80 NEs, s obzirom da ovi gelovi nisu tekli kada se bočica okrene naopačke (Slika 4.1., gel faza pod brojem 3), te je tokom pokušaja kontinuiranih reoloških merenja ispoljen Weissenberg-ov efekat. S obzirom da gel faze nisu pokazivale znake nestabilnosti nakon 7 dana čuvanja na sobnoj temperaturi uprkos visokom sadržaju masne faze (35%), oscilatorna reološka merenja su sprovedena kako bi se ispitalo viskoelastično ponašanje gel faza, analizom parametara poput: G' - elastičnog i G'' – viskoznog modula, kao i η^* - kompleksnog viskoziteta.

Kao se vidi sa Slike 4.11a. izmerene vrednosti kompleksnog viskoziteta (η^*) svih uzoraka gel faza su opadale sa povećanjem frekvencije, bez značajnih razlika među uzorcima ($p < 0,05$). Takođe, kod svih gel faza elastični modul (G') bio je drastično izraženiji od viskoznog modula (G'') (Slika 4.11b.), što ukazuje na čvrstu ili gelastu strukturu kubne rešetke (Garti i sar., 2012). Imajući u vidu da su sve testirane faze bile izotropne, oscilatorna reološka merenja su bila dodatna potvrda da je reč o kubnoj tečno-kristalnoj gel strukturi.



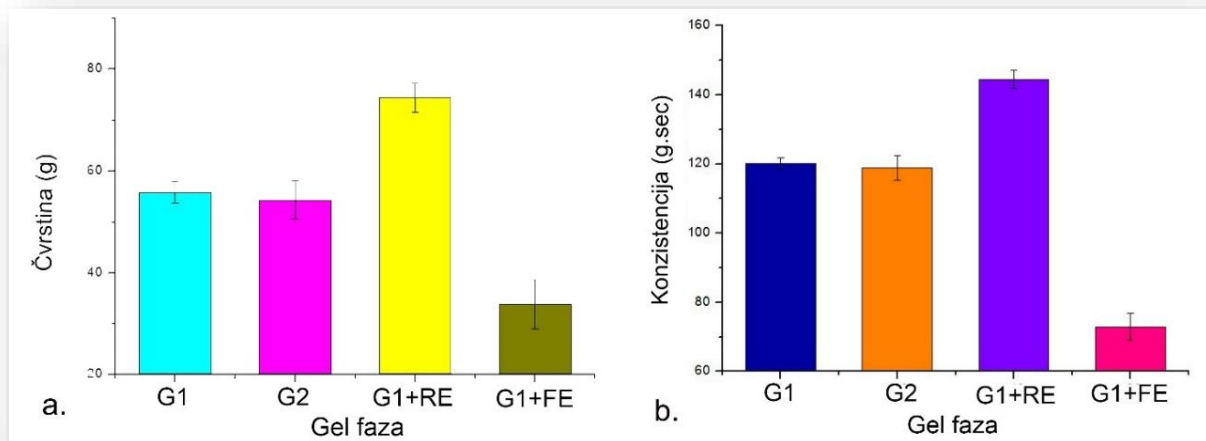
Slika 4.11. Oscilatorna reološka merenja gel faza: a. kompleksni viskozitet u zavisnosti od frekvencije, b. G' – elastični modul (zatvoreni simboli) i G'' – viskozni modul (otvoreni simboli) u zavisnosti od frekvencije.

Teksturna analiza gel faza

Teksturna analiza je sprovedena sa ciljem da se utvrde mehanička svojstva gel faza, kao relativno novi pristup ispitivanja uticaja razlika u sastavu formulacija na ove ključne prelazne gel strukture (Bento da Silva i sar., 2017; Fonseca Santos i sar., 2017). Dva parametra su analizirana: čvrstina (maksimalna sila potrebna da dođe do deformacije) i konzistencija (rad koji je neophodan da se prevaziđu unutrašnje sile u uzorku kako bi se uronila sonda/proba uređaja) (Kolanowski i sar., 2004; Lukic i sar., 2013).

Rezultati prikazani na Slici 4.12. pokazuju da gel faze G1 i G2 (obe sa glicerolom u vodenoj fazi) imaju veoma slične vrednosti čvrstine i konzistencije (bez značajnih razlika), prema tome, dodatak ISIS u masnu fazu uzorka G2 nije imao značajan uticaj na teksturne karakteristike. Međutim, prisustvo

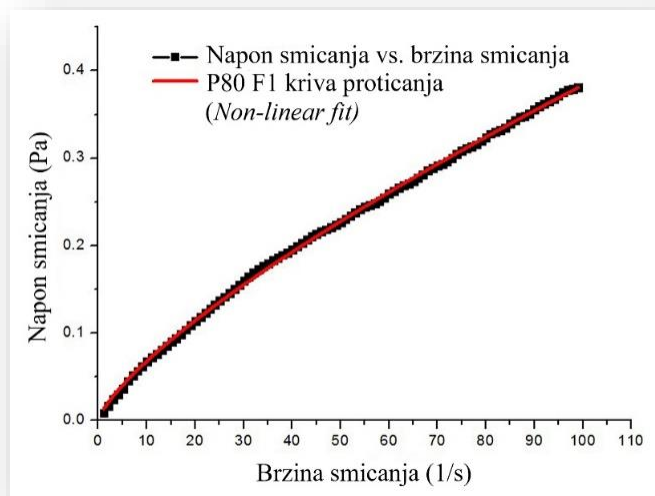
hidroglikolnih ekstrakata RE i FE u gel fazama G1+RE i G1+FE uticalo je na gel faze tako da je RE ekstrakt doveo do povećanja, a FE ekstrakt do smanjenja čvrstine i konzistencije odgovarajućih gel faza. Jedno objašnjenje može biti u činjenici da su različiti polioli u sastavu ovih ekstrakata, tj. propilenglikol u RE (u G1+RE), a glicerol u FE ekstraktu (u G1+FE). Takođe, prethodno je pokazano da ekstrakti bogati polifenolima (kao što je FE) mogu da smanje viskozitet emulzija, usled interakcija sa molekulima surfaktanta (Zillich i sar., 2015). Dodatno, imajući u vidu da postoje i brojni drugi molekuli u ovakvim ekstraktima (npr. u RE - šećeri, vitamini, voćne kiseline, pigmenti itd.) brojne druge interakcije su moguće među sastojcima gel faza/emulzija. Na primer, dokazano je da biljni ekstrakti mogu da indukuju promenu tečno-kristalnih struktura, na primer, promenu heksagonalne faze u lamelarnu ili kubnu strukturu (Bento da Silva i sar., 2017). Međutim, u slučaju testiranih gel faza koje su bile neophodan korak za dobijanje P80 NEs, zaključeno je da su sve faze ostale kubne strukture, tj. da se mogu dodati pomenuti hidroglikolni ekstrakti (u koncentraciji do 5%, računato na vodenu fazu nanoemulzije).



Slika 4.12. Teksturna merenja gel faza: a) čvrstina gel faza (g); b) konzistencija gel faza

Kontinualna reološka merenja P80 NEs

Ova merenja su sprovedena kako bi se stekao uvid u tip proticanja optimizovanih P80 NEs koje su sadržale 80% vodene faze (Tabela 3.2.), kao karakteristiku koja je u vezi sa lakoćom primene na koži. Rezultati kontinualnih reoloških merenja pokazali su da sve testirane nanoemulzije pokazuju Nenjutnovski tip proticanja (Slika 4.13.). Krive proticanja su fitovane prema Jednačini 3.1., odakle su dobijene vrednosti ključnih reoloških parametara: faktora konzistencije – k i indeksa proticanja – n (prikazani u Tabeli 4.4.)



Slika 4.13. Reprezentativna kriva proticanja formulacije P80 F1 (Nenjutnovski tip proticanja), 7 dana nakon izrade.

Tabela 4.4. Karakteristike krivih proticanja optimizovanih P80 NEs sa uljem semena maline i lipofilnim/hidrofilnim aditivima: K-indeks i n-indeks 7 dana nakon izrade. Sve vrednosti date su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija iz minimalno tri merenja, na sobnoj temperaturi.

Nanoemulzija	K-indeks	n-indeks
P80 F1	$0,0144 \pm 0,0007$	$0,7417 \pm 0,0107$
P80 F2	$0,0149 \pm 0,0004$	$0,7418 \pm 0,0063$
P80 F1+RE	$0,0114 \pm 0,0003$	$0,7589 \pm 0,0049$
P80 F1+FE	$0,0117 \pm 0,0005$	$0,7589 \pm 0,0122$

Vrednosti indeksa proticanja svih ispitivanih P80 NEs bile su manje od 1, što se može pripisati pseudoplastičnom tipu proticanja. Istovremeno, vrednosti faktora konzistencije su bile veoma niske, što je bilo u skladu sa zapažanjem da su uzorci niskoviskozni. Ovakve karakteristike se mogu smatrati poželjnim za farmaceutsku/kozmetičku primenu na koži, s obzirom da su P80 NEs tečne emulzije, lake za nanošenje, ali istovremeno grade film koji zaostaje na površini kože (Fonseca-Santos i sar., 2017). Ovako tečne formulacije mogu biti posebno pogodne za razvoj formulacija tipa seruma za lice, sprejova za kosu ili zaštitu od sunca, tj. različitih proizvoda koji se obično pakuju u boce sa pipetom ili sa raspršivačem.

4.2. Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada

4.2.1. Ispitivanje faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu smeša poliglicerilskih estara/ulje semena maline/voda

Tokom druge faze eksperimentalnog rada u fokusu je bio razvoj poboljšanih formulacija niskoenergetskih nanoemulzija sa novijim prirodnim surfaktantima tipa poliglicerilskih estara. Poliglicerilski estri se dobijaju iz prirodnih izvora – esterifikacijom biljnog glicerola (kao hidrofilnog dela molekula) i masnih kiselina iz različitih biljnih ulja (kao lipofilnog dela molekula surfaktanta). U zavisnosti od broja glicerolskih jedinica različitog stepena esterifikacije i karakteristika masnih kiselina (npr. dužina lanca i nezasićenost), mogu se dobiti različite vrste poliglicerilskih estara i njihove smeše (Hanno i sar., 2015; Kato i sar., 2003). Izuzev patenata sa ograničenim informacijama (Bernard i sar., 2013; Hameyer i sar., 2008), postoji samo nekoliko publikacija koje se tiču izrade U/V nanoemulzija (Heunemann i sar., 2011; Wakisaka i sar., 2014; Wakisaka i sar., 2015) ili mikroemulzija (Sahle i sar., 2012) sa poliglicerilskim estrima. Prema tome, većina ovih novih poliglicerilskih surfaktanata još uvek nije okarakterisana u pogledu mogućnosti izrade nanoemulzija PIC metodom, niti su upoređeni sa polisorbitom 80, kao standardnim nejonskim polietoksilovanim surfaktantom potvrđene efikasnosti u submikronskim formulacijama sa biljnim uljima i lipofilnim vitaminima (Chang i McClements 2014; Fasolin i sar., 2012).

Poligliceril-4 laurat (P4L) bio je odabran kao glavni surfaktant na osnovu prethodnih studija koje su pokazale njegovu podobnost za izradu topikalnih mikroemulzija (Sahle i sar., 2012) i nanoemulzija (Heunemann i sar., 2011). Iako je prvobitna zamisao bila da se P4L direktno uporedi sa P80, nanoemulzije nisu mogle nastati u jednostavnom sistemu P4L/RO2/voda, a takođe nije bilo moguće zameniti P80 sa P4L u optimizovanim formulacijama P80 NEs, čak ni uz povećanje SOR i SER (SOR \geq 1 i SER \geq 10). Prema tome, moralo se pristupiti optimizaciji formulacija *de novo*, u pogledu nalaženja odgovarajućih poliglicerilskih surfaktanata i kosurfaktanata, ali i u pogledu sastava masne i vodene faze.

4.2.2. Optimizacija sastava poliglicerilskih nanoemulzija (PG NEs)

4.2.2.1. Uticaj smeše poliglicerilskih estara i nosećeg ulja – etilheksil pelargonata

Nakon što je potvrđeno da ISIS nije kompatibilan sa P4L, kao noseće ulje izabran je noviji estar dobijen iz prirodnih izvora – etilheksil pelargonat (EP). EP je nedovoljno istražen u nanoemulzijama, a ispoljava dobar emolijentni efekat, lako se razmazuje i ostavlja lak osećaj na koži, uz dobar bezbednosni profil u formulacijama namenjenim za primenu na koži (Jonhson i sar., 2011). Međutim, slično kao u slučaju čistog ulja maline RO2, P4L nije mogao da formira nanoemulzije ni kada je EP bio jedina komponenta masne faze, pa se morala uključiti dodatna smeša, takođe poliglicerilskih estara (poligliceril-6 kaprilat, poligliceril-3 kokoat, poligliceril-4 kaprat, poligliceril-6 ricinoleat, u odnosu 1:1:1:1, u daljem tekstu označena kao TS). S obzirom da je TS smeša estara, dobijena iz različitih masnih kiselina različitog stepena nezasićenosti, u kombinaciji sa 4-6 glicerolskih jedinica, očekivano je da se poboljša kapacitet solubilizacije mešavine P4L-TS za različite vrste ulja. Takođe, TS je doveo do smanjenja viskoziteta ove kombinacije, s obzirom da je na sobnoj temperaturi TS providna tečnost niskog viskoziteta, dok je P4L opalescentna viskozna pasta, čime je verovatno olakšano mešanje surfaktanta sa masnom fazom i posledično formiranje nanoemulzija putem PIC metode (Saber i sar., 2014).

Naime, tokom ispitivanja faznog ponašanja smeše poliglicerilskih estara, pokazano je da je optimalan odnos P4L: TS iznosio 1:1, minimalan SOR=1 i SER=10 (što je bila sličnost sa P80 NEs), a dobijena osnovna formulacija PG Fb (P4L: TS 10%, EP 10%, voda 80%) imala je prosečnu veličinu kapi Z-ave

~187,2 nm i PDI ~0,35. Veće vrednosti SOR i SER vodile su ka dodatnom povećanju veličine kapi nanoemulzija, i/ili povećanju PDI, kao i formiraju dvofaznih Winsor sistema, čime je pokazano da je nanoemulzini region u pseudoternarnom sistemu bio veoma uzak. Prema tome, za dalju optimizaciju PG NEs korišćeni su minimalni SOR i SER odnosi (1 i 10, redom).

4.2.2.2. Uticaj kosurfaktanata

U cilju smanjenja veličine kapi osnovne formulacije PG Fb testirano je nekoliko potencijalnih kosurfaktanata, dodavanjem u masnu fazu (EP). Nađeno je da dodatak 0,5% tečne smeše konzervanasa (fenoksietanol: etilheksilglicerin, u odnosu 90:10) – kosurfaktant 1 ili 2% parfemskog ulja maline – kosurfaktant 2, dovode do drastičnog smanjenja veličine kapi PG NEs (~131,7 nm, PDI: ~0,22, i ~88,6 nm, PDI: 0,07, za kosurfaktant 1 ili 2, redom). Međutim, veće koncentracije ovih kosurfaktanata ili njihova kombinacija doveli su do povećanja kapi i destabilizacije PG NEs (Tabela 4.5.)

Tabela 4.5. Prosečna veličina kapi (Z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) PG NEs pripremljenih sa kosurfaktantom 1 i/ili kosurfaktantom 2.

	Z-ave (nm) 24h	Z-ave (nm) 1m	PDI 24 h	PDI 1m
Kosurfaktant 1				
0,5%	131,72 ± 1,10	157,22 ± 2,06	0,216 ± 0,012	0,201 ± 0,004
1%	231,36 ± 5,53	2F, nestabilno	0,261 ± 0,031	2F, nestabilno
Kosurfaktant 2				
0,5%	89,71 ± 0,43	99,43 ± 0,84	0,112 ± 0,003	0,116 ± 0,010
1%	86,44 ± 0,71	103,20 ± 0,81	0,116 ± 0,016	0,141 ± 0,008
1,5%	89,63 ± 0,08	104,19 ± 1,15	0,078 ± 0,016	0,120 ± 0,019
2%	88,61 ± 0,53	90,98 ± 0,29	0,069 ± 0,019	0,098 ± 0,006
2,5%	85,25 ± 0,35	100,11 ± 1,52	0,099 ± 0,018	0,145 ± 0,021
3%	92,43 ± 0,73	109,65 ± 1,00	0,122 ± 0,009	0,133 ± 0,019
3,5%	101,11 ± 0,46	110,72 ± 1,16	0,105 ± 0,006	0,168 ± 0,012
4%	161,74 ± 5,81	159,75 ± 5,37	0,314 ± 0,037	0,360 ± 0,061
Kosurfaktant smeša				
kosurfaktant 1, 0,5% + kosurfaktant 2, 2%	216,02 ± 1,47	2F, nestabilno	0,398 ± 0,003	2F, nestabilno
kosurfaktant 1, 1% + kosurfaktant 2, 2%	328,47 ± 18,28	2F, nestabilno	0,629 ± 0,116	2F, nestabilno
kosurfaktant 1, 1% + kosurfaktant 2, 1%	255,25 ± 1,15	2F, nestabilno	0,272 ± 0,006	2F, nestabilno

*PG NEs su bile sledećeg sastava: 10% smeše poliglicerilskih estara (P4L:TS = 1:1), 10% masne faze (EP + kosurfaktant) i 80% vode, visokoprečišćene. Uzorci su pripremljeni i čuvani na sobnoj temperaturi, a merenja su izvršena 24 h i jedan mesec nakon izrade.

** 2F – označava dvofazni sistem, tj. separaciju faza ili nestabilne formulacije

Dobijeni rezultati su bili u skladu sa studijom kojom je pokazano da je fenoksietanol veoma efikasan kosurfaktant u kombinaciji sa P4L kao glavnim surfaktantom, čime je omogućeno formiranje nanoemulzija putem PIC metode (Heunemann i sar., 2011). Dodatno, pokazano je da parfemsko ulje maline takođe može biti efikasan kosurfaktant što je bilo u skladu sa prethodno opisanim ponašanjem pojedinih etarskih ulja, koja se pozicioniraju na međusloju ulje-voda, zahvaljujući visokom sadržaju

fenolnih ili drugih alkoholnih jedinjenja (Rocha-Filho i sar. 2017; Pavoni i sar., 2020). Ovakvi nalazi imaju praktičan značaj, imajući u vidu da uloga konzervanasa i parfema nije dovoljno istražena u kontekstu formiranja i stabilnosti nanoemulzija primenom PIC metode, iako su u pitanju veoma česti, i praktično neophodni sastojci kozmetičkih emulzija.

4.2.2.3. Uticaj ulja semena maline RO2 i glicerola

Inkorporiranje biljnih ulja u nanosisteme sa veoma finim veličinama kapi (< 100 nm) je izazovan zadatak s obzirom na njihov kompleksan sastav, npr. prisustvo robusnih lipofilnih repova masnih kiselina u molekulima triglicerida (Do i sar., 2009; Szumala, 2015). Prema tome, nije bilo neuobičajeno što je bilo moguće inkorporirati svega 2% ulja maline RO2 (od ukupnih 10% masne faze), ali je bilo značajno što je u tom slučaju bio neophodan dodatak poliola u vodenu fazu nanoemulzije, tačnije glicerola (optimalno 30% računato na vodenu fazu, odnosno, 24% računato na ukupnu masu nanoemulzije) nevezano za to koji kosurfaktant je bio upotrebljen. Na ovaj način su dobijene PG NEs sa uljem semena maline RO2 veoma finih kapi (< 70 nm, PDI< 0,1) i poboljšane stabilnosti (Tabela 4.6.), kao posledica sinergističkog efekta dodatka RO2 u masnu fazu i glicerola u vodenu fazu. Pogodnost glicerola za ovu namenu bila je donekle i očekivana, imajući u vidu prisustvo glicerolskih grupa u samoj smeši poliglicerilskih surfaktanata, kao i u trigliceridima iz ulja maline. Generalno je poznato da dodatak glicerola menja polarnost i viskozitet vodene faze, što može doprineti formiranju mikroemulzija (Do i sar., 2009; Szumala, 2015). Takođe, polioli mogu da promovišu nastanak niskoenergetskih nanoemulzija i mikroemulzija direktnom interakcijom sa molekulima surfaktanata na međusloju ulje-voda, čime utiču na spontanu krivinu surfaktanta (Alam i sar., 2009; Wakisaka i sar., 2015).

Tabela 4.6. Prosečna veličina kapi (Z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) PG NEs sa uljem semena maline RO2 pripremljenih sa različitim kosurfaktantima, uz dodatak optimalne koncentracije glicerola.

	Z-ave (nm) 24h	Z-ave (nm) 2m	PDI 24 h	PDI 2m
PG F1 osnovna formulacija Masna faza: 2% RO2, 0,5% kosurfaktant 1, 7,5% EP				
Vodena faza: Glicerol 24%	64,33 ± 6,11	65,58 ± 1,07	0,063 ± 0,020	0,059 ± 0,008
PG F2 osnovna formulacija Masna faza: 2% RO2, 2% kosurfaktant 2, 6% EP				
Vodena faza: Glicerol 24%	58,98 ± 1,98	62,27 ± 4,05	0,079 ± 0,012	0,111 ± 0,016

*Procentualan sastav je dat na ukupnu masu nanoemulzija.

**Uzorci su pripremljeni i čuvani na sobnoj temperaturi, a merenja su izvršena nakon 24 h i dva meseca nakon izrade.

Sa druge strane, optimalna koncentracija glicerola bila je značajno niža u slučaju PG NEs bez ulja semena maline (5% računato na vodenu fazu, odn. 4% računato na ukupnu masu NE), s obzirom da je povećanje koncentracije glicerola vodilo ka povećanju veličine kapi i destabilizaciji PG NEs. Bitno je bilo i zapažanje da su prosečna veličina kapi i PDI ovih formulacija bili oko 2 puta veći u odnosu na formulacije sa uljem maline, što ukazuje da je dodatak ulja maline značajno doprineo smanjenju kapi i optimizaciji sistema (Tabela 4.7.).

Tabela 4.7. Prosečna veličina kapi (Z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI) PG NEs bez ulja semena maline RO2 pripremljenih sa različitim kosurfaktantima u zavisnosti od sadržaja glicerola u vodenoj fazi.

	Glicerol 4%		Glicerol 8%		Glicerol 16%		Glicerol 24%	
	Z-ave (nm) 24h	Z-ave (nm) 2m	Z-ave (nm) 24 h	Z-ave (nm) 2m	Z-ave (nm) 24 h	Z-ave (nm) 2m	Z-ave (nm) 24 h	Z-ave (nm) 2m
Kosurf. 1 – 0,5%	131,70± 1,11	133,60± 0,95	205,20± 3,92	221,14± 3,15	250,20± 3,92	2F Nestab.	Nema NE	Nema NE
	PDI 24 h	PDI 2m	PDI 24 h	PDI 2m	PDI 24 h	PDI 2m	PDI 24 h	PDI 2m
	0,206± 0,013	0,198± 0,090	0,304± 0,021	0,315± 0,033	0,443± 0,017	2F Nestab.	Nema NE	Nema NE
Kosurf. 2 – 2%	Z-ave (nm) 24 h	Z-ave (nm) 2m	Z-ave (nm) 24 h	Z-ave (nm) 2m	Z-ave (nm) 24 h	Z-ave (nm) 2m	Z-ave (nm) 24 h	Z-ave (nm) 2m
	123,60± 1,14	118,10± 0,13	107,40± 1,76	133,50± 2,36	108,60± 0,15	163,40± 1,18	2F	2F
	PDI 24 h	PDI 2m	PDI 24 h	PDI 2m	PDI 24 h	PDI 2m	PDI 24 h	PDI 2m
	0,145± 0,022	0,125± 0,017	0,136± 0,010	0,215± 0,012	0,174± 0,006	0,218± 0,001	2F	2F

*PG NEs su bile sledećeg sastava: 10% smeše poliglicerilskih estara (P4L:TS = 1:1), 10% masne faze (EP + kosurfaktant) i 80% vodene faze, sa dodatkom 4, 8, 16 ili 24% glicerola, računato na ukupnu masu nanoemulzije. Uzorci su pripremljeni i čuvani na sobnoj temperaturi, a merenja su izvršena 24 h i 2 meseca nakon izrade.

** 2F – označava dvofazni sistem, tj. separaciju faza.

Rezultati ove studije optimizacije masne i vodene faze su bili generalno u skladu sa važećim saznanjima da se za svaku promenu u SOW sistemu (npr. promena surfaktanta, kosurfaktanta ili masne faze itd.) mora izvršiti novo podešavanje odnosa svih sastojaka (Kunz i sar., 2009; Komaiko i Mc Clements, 2016), što ujedno predstavlja i najveće ograničenje niskoenergetskih metoda za dobijanje nanoemulzija.

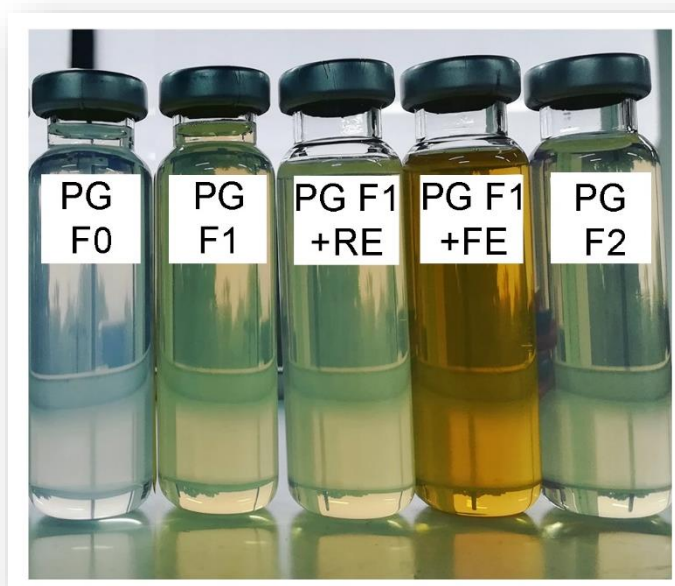
4.2.2.4. Uticaj hidroglikolnih ekstrakata RE i FE

Dodatno, ispitana je mogućnost dodatka hidroglikolnih ekstrakata RE ili FE u PG NEs sa uljem semena maline RO2, slično kao za uzorke P80 NEs. Kao što je prikazano u Tabeli 4.8. moguće je bilo dodati do 4% ovih ekstrakata (u formulacije koje sadrže i glicerola 24%, računato na ukupnu masu nanoemulzije), ali isključivo nakon što je formirana nanoemulzija, tj. na kraju izrade, s obzirom da je zapaženo da sami ekstrakti ometaju PIC proces formiranja nanokapi ako se dodaju na početku titracije. U tom sučaju, PG NEs sa maksimalnom koncentracijom RE/FE zadržale su svoj karakterističan polu-transparentni izgled (Slika 4.14.) usled veoma finih veličina kapi i uniformne distribucije veličina kapi (Z-ave < 65 nm, PDI ≤ 0,1), a takođe su bile preliminarno stabilne nakon 3 meseca čuvanja na sobnoj temperaturi, poput

ostalnih optimizovanih uzoraka - PG F1 i PG F2 izrađenih bez dodatka ovih hidroglolikolnih ekstrakata RE/FE (Tabela 4.8.).

Tabela 4.8. Preliminarna stabilnost optimizovanih PG NEs: prosečna veličina kapi (Z-ave) i indeks polidisperznosti (PDI), pH i električna provodljivost (el.prov.), izmereno nakon 24 h i 3 meseca nakon izrade (uzorci čuvani na sobnoj temperaturi).

Uzorak	Z-ave (nm)		PDI		pH		El. prov. (μS/cm)	
	24 h	3 m	24 h	3m	24 h	3 m	24h	3 m
PG F0	131,70± 1,11	138,30± 1,36	0,226± 0,012	0,162± 0,023	4,56± 0,02	4,29± 0,05	128,60± 0,20	145,40± 0,96
PG F1	58,21± 5,19	60,12± 8,83	0,071± 0,015	0,099± 0,037	4,53± 0,03	4,15± 0,01	30,68± 1,66	48,50± 0,40
PG F1+RE	55,48± 6,77	62,73± 1,26	0,071± 0,010	0,079± 0,007	4,00± 0,04	3,83± 0,01	42,73± 0,35	52,63± 0,42
PG F1+FE	56,37± 5,13	59,21± 10,09	0,058± 0,024	0,089± 0,005	4,48± 0,07	4,47± 0,15	117,53± 0,06	124,87± 0,21
PG F2	55,62± 1,16	59,77± 2,21	0,093± 0,022	0,098± 0,011	4,49± 0,28	4,29± 0,03	35,11± 4,99	41,53± 4,46



Slika 4.14. Vizuelni izgled optimizovanih PG NEs: PG F0 (blanko nanoemulzija, bez RO2, sa kosurfaktantom 1), PG F1 (sa RO2 i kosurfaktantom 1), PG F1+RE i PG F1+FE (sa RO2 i ekstraktima – RE i FE i F2 (sa RO2 i kosurfaktantom 2, bez RE/FE).

S obzirom da nije bilo znakova kremiranja, separacije faza niti značajnog povećanja veličine kapi i PDI, može se zaključiti da optimizovane formulacije PG NEs pokazuju dobru preliminarnu stabilnost nakon 3 meseca čuvanja na sobnoj temperaturi, kao što je i predviđeno. Male promene pH vrednosti i električne provodljivosti jesu zapažene kod pojedinih uzoraka PG NEs, što je bilo u skladu sa prethodno opisanim

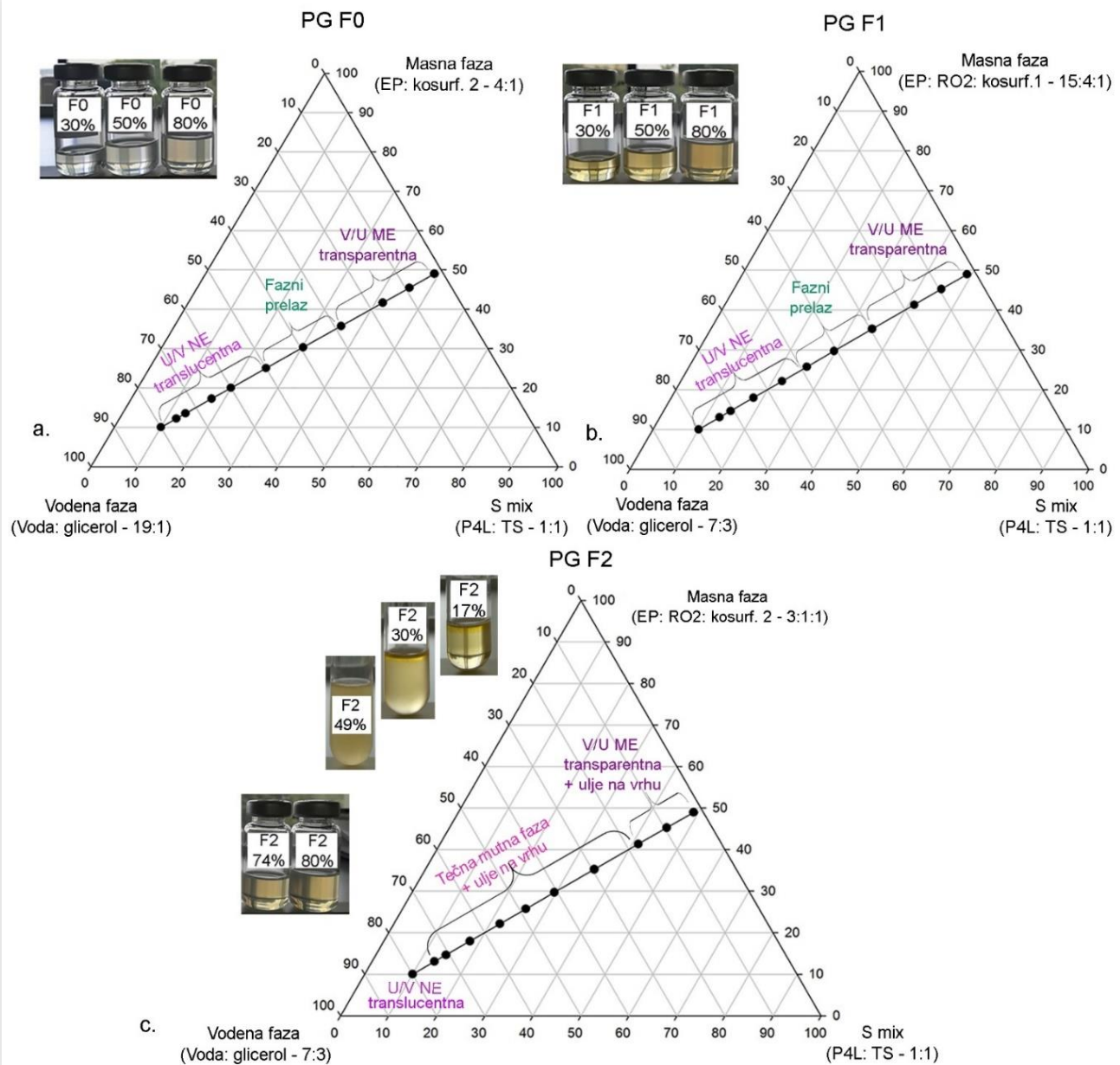
ponašanjem nanoemulzija sa prirodnim uljima (Bernardi i sar., 2011; Bento da Silva i sar., 2017). Ovakvo ponašanje najčešće je posledica parcijalne hidrolize estara masnih kiselina iz ulja, a može doći do “curenja” masnih kiselina iz molekula poliglicerilskih surfaktanata, što je rezultiralo padom pH vrednosti i povećanjem električne provodljivosti nanoemulzija. Uzorak PG F1+FE je pokazao najbolju preliminarnu stabilnost, s obzirom da su ovi parametri ostali najbliži početnim vrednostima.

4.2.3. Karakterizacija prelaznih faza i finalnih poliglicerilskih nanoemulzija (PG NEs)

4.2.3.1. PIC mehanizam formiranja PG NEs

PG NEs su izrađene pomoću PIC metode, tj. postepenim dodavanjem vodene faze u odgovarajuće smeše surfaktanta/kosurfaktanta/masne faze, pri čemu su detektovane ključne prelazne faze, koje su potom izrađene za formulaciona ispitivanja kao i karakteristične PG NEs (*Tabela 3.3.*). U zavisnosti od SOW sastava, detektovana su dva različita nanoemulzifikaciona puta. U prvom slučaju, primećene su translucetne ili transparentne izotropne tečne prelazne faze (do ~50% vodene faze) za SOW sisteme sa kosurfaktantom 1 (fenoksietanol: etilheksilglicerin u odnosu 9:1) i masnom fazom sačinjenom od EP kao nosećeg ulja i RO2 ulja semena maline (*Slika 4.15b.*, *Tabela 3.3.* uzorci PG M1 30% i PG M1 50%), kao i za sisteme sa kosurfaktantom 2 (parfemsko ulje maline) i masnom fazom sačinjenom samo od EP, bez RO2 (*Slika 4.15a.*, *Tabela 3.3.*, uzorci PG M0 30% i PG M0 50%). Takođe, % transparentije je opadao kako je udeo vodene faze rastao, što se može pripisati konverziji transparentne izotropne mikroemulzije faze u translucetnu nanoemulziju, nakon što je koncentracija vodene faze dostigla kritičnu tačku (na ~50%) (*Tabela 4.9.*), što predstavlja jedan od mogućih mehanizama PIC postupka dobijanja nanoemulzija prethodno opisanih u literaturi (Solè i sar., 2012).

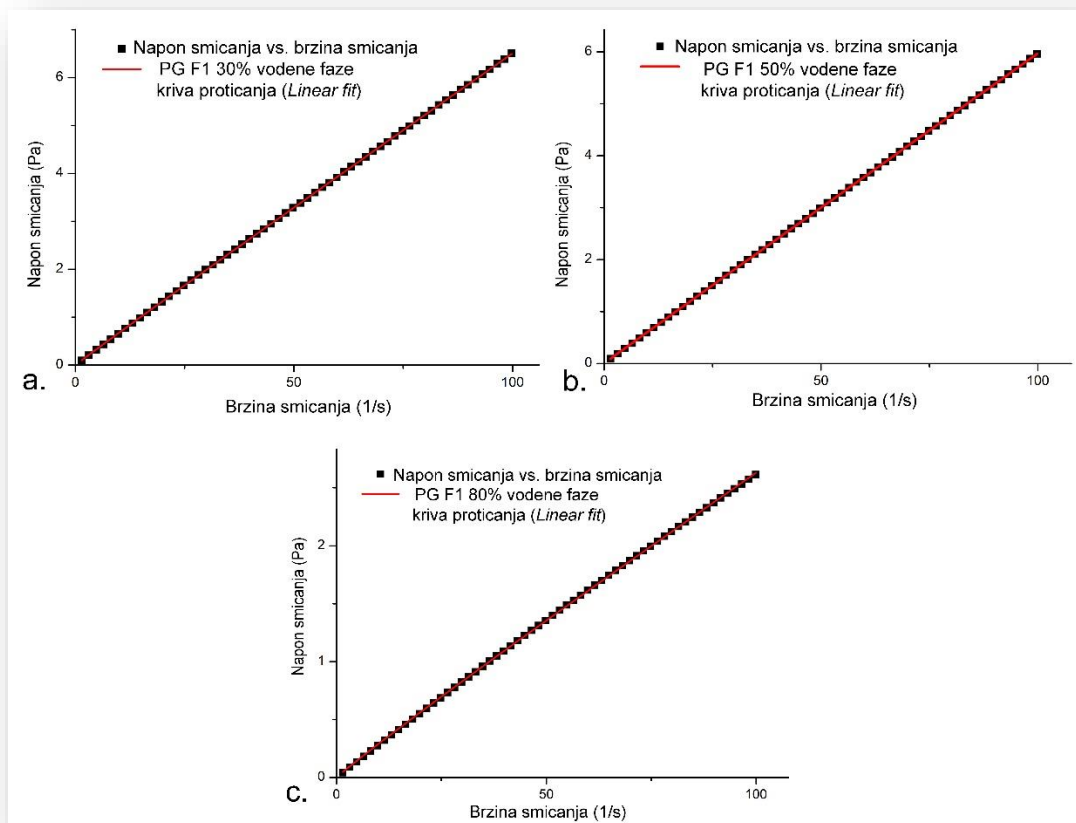
Drugi nanoemulzifikacioni put primećen kod PG NEs pripremljenih sa kosurfaktantom 2 i uljem semena maline RO2 u masnoj fazi, uključivao je dvofazni sistem (prvo mikroemulziju, a zatim produženu zamućenu tečnu fazu, sa uljanim slojem na vrhu, u oba slučaja). Interesantno je bilo da je tranzicija u translucetnu U/V nanoemulziju nastupila tek kada je sadržaj vodene faze bio $\geq 74\%$, odnosno kada je solubilizovana kompletna masna faza (*Slika 4.15c.*). Sve prelazne faze (sa 30 i 50% vodene faze) i odgovarajuće nanoemulzije koje su sadržale 80% vodene faze pokazale su Njutnovski tip proticanja (n-indeks ~ 1), što je karakteristika mikroemulzija i pojedinih nanoemulzija (*Slika 4.16.* i *Tabela 4.9.*).



Slika 4.15. Vizuelni izgled i fazni prelazi u funkciji sadržaja vodene faze duž linije koja odgovara optimalnom odnosu surfaktant: masna faza/kosurfaktant = 50:50 (tj. $SOR=1$): a. PG F0 uzorci sa kosurfaktantom 2, bez RO2; b. PG F1 uzorci sa kosurfaktantom 1 i RO2; c. PG F2 uzorci sa kosurfaktantom 2 i RO2; Legenda: ME – mikroemulzija, NE – nanoemulzija, P4L – poligliceril 4-laurat, TS – smeša poliglicerilskih estara.

Tabela 4.9. Procenat transparentcije (% TP) 24 h nakon izrade (izmeren na 600 nm) i reološki parametri dobijeni sa krivih proticanja tečnih prelaznih faza i finalnih nanoemulzija (indeks proticanja – n i faktor konzistencije – K). Svi parametri su izmereni 7 dana nakon izrade, nakon čuvanja na sobnoj temperaturi.

Naziv uzorka	% TP	K-indeks	n-indeks
Tečne prelazne faze			
PG M0 30%	94,82 ± 0,005	0,0532 ± 0,0026	0,9895 ± 0,0090
PG M0 50%	87,57 ± 0,006	0,0683 ± 0,0008	0,9828 ± 0,0026
PG M1 30%	94,42 ± 0,004	0,0699 ± 0,0037	0,9843 ± 0,0102
PG M1 50%	81,95 ± 0,002	0,0617 ± 0,0073	0,9938 ± 0,0239
Nanoemulzije			
PG F0 80%	82,16 ± 0,037	0,0045 ± 0,0004	1,0040 ± 0,0019
PG F1 80%	76,18 ± 0,019	0,0319 ± 0,0022	0,9582 ± 0,0136
PG F2 74%	71,12 ± 0,047	0,0532 ± 0,0056	0,9894 ± 0,0178
PG F2 80%	78,10 ± 0,016	0,0073 ± 0,0004	0,9876 ± 0,0133

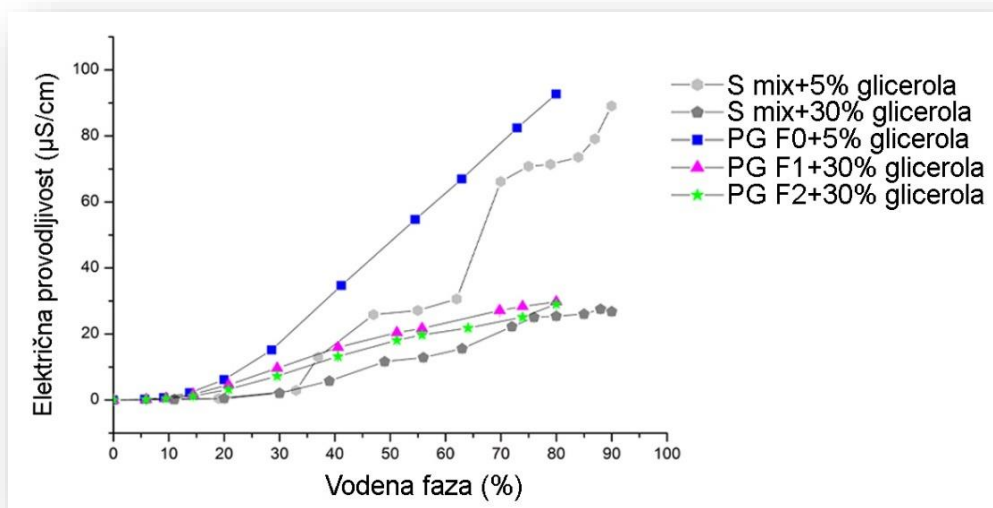


Slika 4.16. Reprezentativne krive proticanja uzoraka: a. prelazna faza PG F1 30%; b. PG F1 50% i c. finalna nanoemulzija PG F1 80%, sa 30, 50 i 80% vodene faze (30% rastvor glicerola u vodi). Krive proticanja prikazuju Njutnovski tip proticanja kod svih testiranih uzoraka.

Dodatna potvrda strukturne organizacije prelaznih faza dobijena je analizom krivih električne provodljivosti i analizom DSC termograma pri rastućem udelu vodene faze tokom PIC procesa nanoemulzifikacije.

4.2.3.2. Analiza krivih električne provodljivosti tokom procesa formiranja PG NEs primenom PIC metode

Električna provodljivost prelaznih faza i disperzija smeše poliglicerilskih estara bila je veoma niska ($< 10 \mu\text{S}/\text{cm}$) sve do sadržaja od $\sim 20\%$ vodene faze, što je impliciralo na prisustvo V/U mikroemulzija/reverznh micela surfaktanta (Slika 4.17.). Sa daljim porastom sadržaja vodene faze došlo je do postepenog porasta (za formulacije PG F1 i PG F2 sa uljem semena maline RO2 i visokim udelom glicerola) ili oštrijeg porasta električne provodljivosti (za PG F0, sa manjim udelom glicerola u vodenoj fazi), što se može pripisati stvaranjem vodenih kanala u bikontinuiranoj mikroemulziji (Savic i sar., 2017, Zhang i sar., 2013). Kada je sadržaj vodene faze dostigao kritičnu vrednost, prelazna mikroemulziona faza se narušava, čime nastaje U/V nanoemulzija čija provodljivost generalno raste sa dodatkom preostale količine vodene faze. Zapaženo je i da je električna provodljivost ostala prilično niska ($\leq 30 \mu\text{S}/\text{cm}$) kod svih PG NEs pripremljenih sa RO2 i visokim sadržajem glicerola (30% računato na vodenu fazu, tj. 24% računato na ukupnu masu nanoemulzije), kao i u slučaju disperzije smeše poliglicerilskih estara u vodenoj fazi sa 30% glicerola. Ovime je potvrđena pretpostavka da su molekuli poliglicerilskih surfaktantata u PG NEs, kao i u disperziji smeše poliglicerilskih surfaktantata, snažno vezani za molekule glicerola.

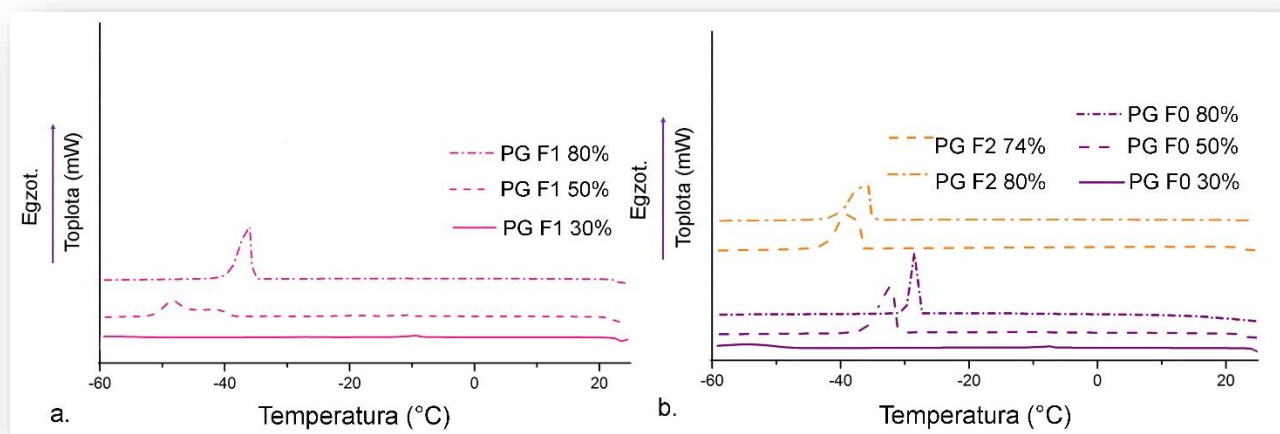


Slika 4.17. Krive električne provodljivosti u funkciji sadržaja vodene faze (glicerol/voda): poliglicerilske smeše surfaktanata S mix (P4L:TS - 1:1)/ vodena faza i odgovarajućih nanoemulzija (PG F0, PG F1 i PG F2) tokom PIC postupka formiranja nanoemulzija.

4.2.3.3. Analiza termalnog ponašanja tokom procesa formiranja PG NEs primenom PIC metode

Nalazi dobijeni merenjem električne provodljivosti potvrđeni su praćenjem termalnog ponašanja uzoraka prelaznih faza sa 30% i 50% vodene faze (uzorci PG M0 30%, PG M0 50%, PG F1 30%, PG F1 50%, Tabela 3.3.) i finalnih nanoemulzija sa 74-80% vodene faze (uzorci PG F0 80%, PG F1 80% i PG F2 74% i 80%, Tabela 3.3.), tokom hlađenja sa 25°C na -60°C , kao što je prikazano na Slici 4.18. Strukturne

promene su se odigrale sledećim redosledom: i) u uzorcima sa malim sadržajem vodene faze ($\leq 30\%$) primetan je izostanak egzotermnog pika koji odgovara vodi (na oko -15°C), što je u saglasnosti sa pretpostavkom da je ova faza zapravo V/U mikroemulzija gde je voda u unutrašnjoj fazi te nije moglo doći do zamrzavanja; ii) sa povećanjem udela vodene faze (na $\sim 50\%$ vodene faze) dolazi do inverzije faza i pik vode počinje da se pojavljuje, premda je bio pomeren ka nižim temperaturama (oko -30 do -50°C) u odnosu na čistu vodu (obično na oko 0°C do -15°C), usled interakcija sa molekulima surfaktanta i poliola (Nikolic i sar., 2018; Savic i sar., 2017); iii) u slučaju finalnih nanoemulzija (sa 74-80% vodene faze) pik vode je bio izražen zbog toga što je voda kontinuirana, spoljašnja faza U/V nanoemulzija, a ujedno i najzastupljenija komponenta u sistemu. Ovakvi nalazi su bili u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima koja su se bavila termalnim ponašanjem tokom hlađenja nanoemulzija (Nikolic i sar., 2018) i mikroemulzija (Savic i sar., 2017). Zabeležena razlika između termalnih krivih bila je usko povezana sa sadržajem glicerola u finalnim PG NE formulacijama. Naime, kod uzoraka PG F1 80% i PG F2 80% došlo je do pomeranja temperature smrzavanja ka nižim vrednostima usled visokog sadržaja glicerola (24%) sa krioprotektivnim efektom, u odnosu na uzorak PG F0 80% koji je sadržao samo 4% glicerola, što je i bilo u skladu sa rezultatima prethodnih studija (Savic i sar., 2017; Szumala i sar., 2015).



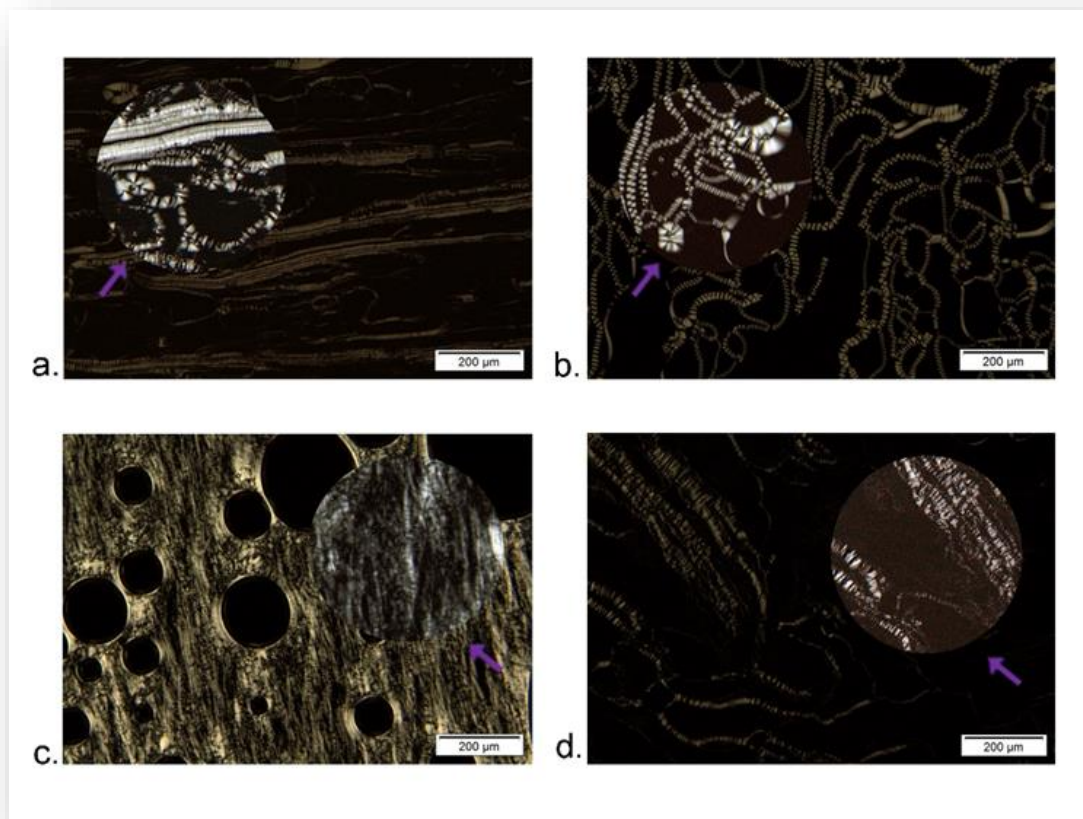
Slika 4.18. DSC termogrami u „cooling mode”-u pri rastućem udelu vodene faze: a. formulacije PG M1 30%, PG M1 50% i PG F1 80% (sa kosurfaktantom 1) i b. formulacije PG M0 30%, PG M0 50%, PG F0 80% i PG F2 74% i PG F2 80% (sa kosurfaktantom 2) snimljeni 7 dana nakon izrade.

4.2.3.4. Mikroskopska analiza optimizovanih PG NEs

Izotropno ponašanje koje je pokazano u slučaju prelaznih tečnih faza sa 30 i 50% vodene faze bilo je još jedna potvrda njihove mikroemulziona strukture, dok je u slučaju finalnih nanoemulzija sa 80% vodene faze odsustvo aglomerata surfaktanta i/ili uljanih kapi potvrdilo njihovu dobru preliminarnu stabilnost. Nasuprot tome, smeša poliglicerilskih surfaktanata formirala je anizotropne tečno-kristalne strukture lamelnog tipa (Slika 4.19a. i b.) ili heksagonalnog tipa (Slika 4.19c. i d.), tokom titracije vodenom fazom (5 ili 30% rastvor glicerola u vodi, redom), čime je dokazano da je masna faza (sa ili bez RO2) indukovala nastanak mikroemulzionih faza.

Poznato je da mikroemulzije mogu biti prekursori za dobijanje U/V nanoemulzija (Heunemann i sar., 2011; Solans i Solè 2012), kao što je bio slučaj i sa smešom poliglicerilskih estara korišćenih u ovoj doktorskoj disertaciji. Treba napomenuti da su opisani i slučajevi lamelnih prelaznih faza sačinjenih

od poligliceril poliricinoleata i poligliceril laurata kao prekursora U/V nanoemulzija veoma finih veličina kapi ≤ 50 nm (Wakisaka i sar., 2014), te je detaljna karakterizacija prelaznih faza jedan od ključnih koraka za razumevanje i kontrolu nastanka nanoemulzija putem PIC metode.

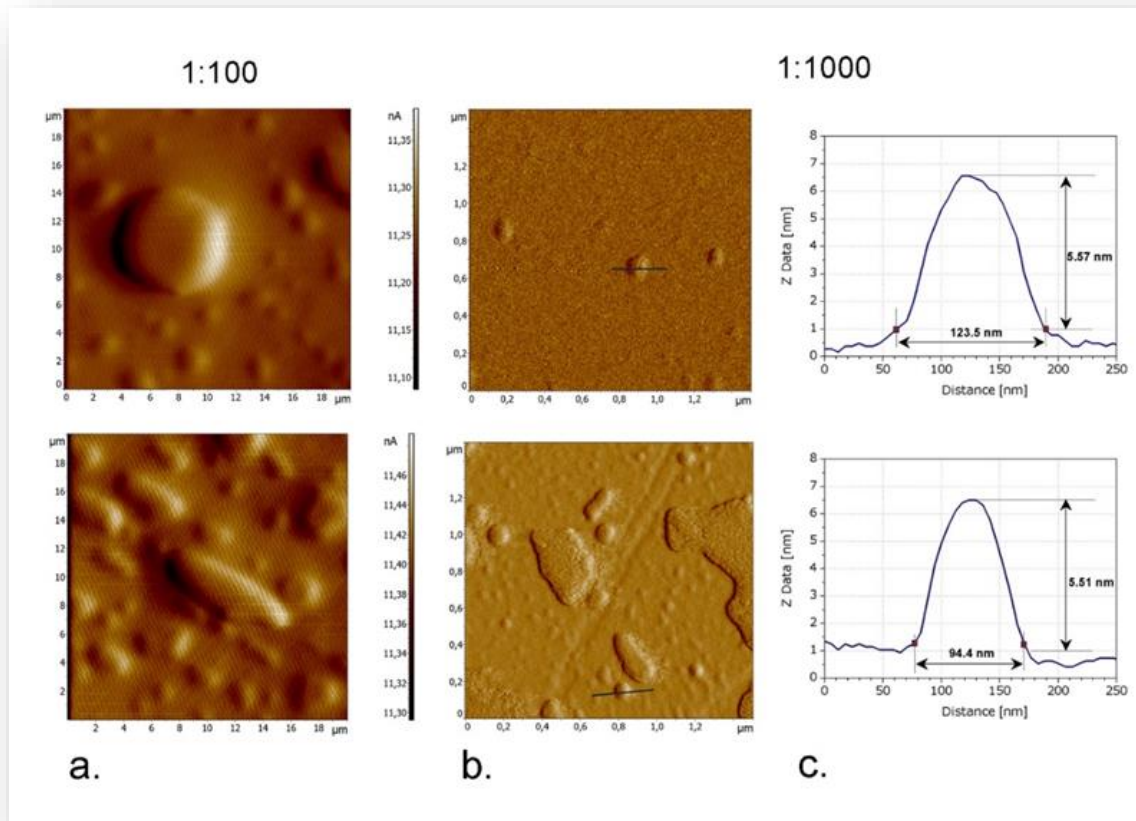


Slika 4.19. Optička tekstura pod polarizacionom svetlošću smeše poliglicerilskih surfaktanata (Smix - P4L:TS=1:1) dispergovanih u vodenoj fazi: a. S mix 70%, 30% vodena faza (5% glicerol u vodi) i b. S mix 46%, 54% vodena faza (5% glicerol u vodi) – pokazuju lamelarnu fazu sa anizotropnim trakama, “Malteškim krstevima” i optički izotropnim domenima (crna polja); c. S mix 70%, 30% vodena faza (30% glicerol u vodi) - heksagonalna faza i mehurići vazduha – tamni krugovi, d. S mix 46%, 54% vodena faza (30% glicerol u vodi) - heksagona faza (svetla polja) i izotropni domen (tamna polja). Mikrografije su snimljene pri uveličanju od 100 x, a bliži prikaz anizotropnih domena obeležen ljubičastom strelicom predstavlja uveličanje do 400 x.

AFM analiza otkrila je tendenciju nanoemulzija da formiraju agregate tokom procesa sušenja (Slika 4.20.), zavisno od razblaženja uzorka. Pri razblaženju 1:100 uočeno je prisustvo velikih agregata nalik na ostrva nastalih usled geliranja uzorka, kao što je prethodno opisano (Alessandrini i Facci, 2014). Međutim, kada je razblaženje uzorka povećano na 1:1000 bilo je moguće uočiti i ove strukture i pojedinačne kapi nanoemulzije sačuvane u osušenom ultra-tankom sloju uzorka. Individualne nanokapi su bile ovalnog oblika, veličina sličnih kao što je utvrđeno DLS metodom (PG F1 Z-ave ~ 58 nm, PG F2 Z-ave ~ 56 nm). Transformacija izotropnih u anizotropne strukture može biti interesantna opcija kada je u pitanju topikalna primena, imajući u vidu da su tečno-kristalne formulacije poznate po svom produženom hidratišućem efektu usled sličnosti sa lamelarnom strukturom kože (Hanno i sar., 2015; Fonseca-Santos i sar., 2017). Druge vrste tečno-

kristalnih faza (npr. kubne ili heksagonalne) takođe mogu da ispolje produženo oslobađanje aktivnih sastojaka ili povećanu bioaktivnost, u zavisnosti od lokalizacije aktivnih sastojaka u njihovoj strukturi (Bento da Silva i sar., 2017).

Nažalost, mikroemulzione prelazne faze nisu mogle biti analizirane dostupnim eksperimentalnim protokolom, s obzirom da nije bilo moguće njihovo razblaživanje usled narušavanja strukture, a sa druge strane, nerazblaženi uzorci se nisu mogli osušiti usled specifičnosti u strukturi. Ipak, ovakvo ponašanje je svakako bilo u skladu sa DSC analizom i merenjima električne provodljivosti čime je indirektno potvrđeno prisustvo vode u unutrašnjoj fazi sistema, što je ukazalo na prisustvo V/U mikroemulzija kao ključnih prelaznih faza tokom nastanka PG NEs.



Slika 4.20. AFM reprezentativnih uzoraka PG NEs: PG F1 (gornji red) i PG F2 (donji red) u zavisnosti od razblaženja vodom: a. 2D "signal greška" uzorka veličine 20 x 20 μm² pri razblaženju 1:100; b. 2D "signal greška" uzorka veličine 20 x 20 μm² pri razblaženju 1:1000 sa označenim profilom kapi; c. analiza profila odabranih kapi nanoemulzija pri razblaženju 1:1000.

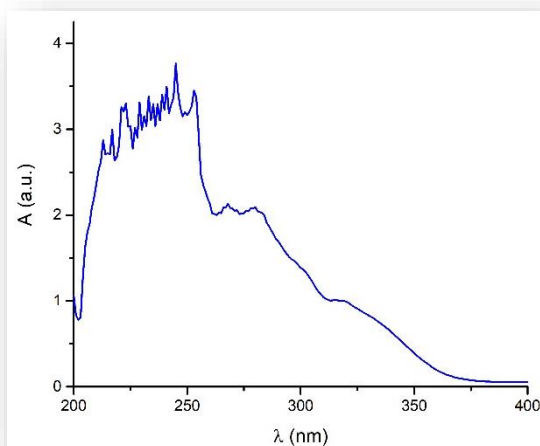
4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada

4.3.1. Određivanje sadržaja glavnih biološki aktivnih sastojaka ulja semena maline RO2 spektrofotometrijskim metodama

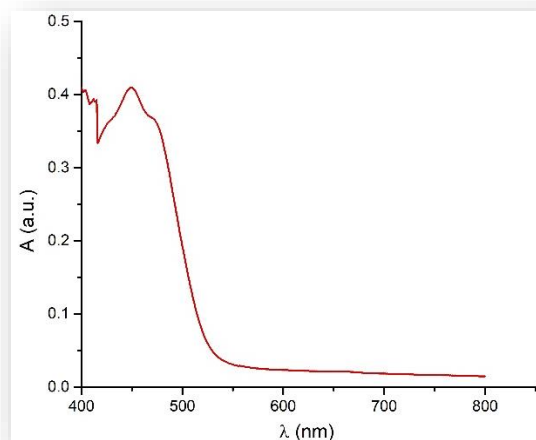
4.3.1.1. Apsorpcioni spektar ulja semena maline RO2

U poslednjih 15 godina u fokusu brojnih kampanja za zaštitu javnog zdravlja na globalnom nivou je povećanje efikasnosti zaštite od štetnih efekata sunčevog zračenja. Poznato je da postoji uzročno-posledična veza između izlaganja UV zracima i brojnih akutnih i hroničnih negativnih efekata po ljudsko zdravlje. Naime, UVB zračenje (290- 320 nm) uglavnom deluje na nivou epidermisa izazivajući crvenilo i opekotine, dok dugoročnim izlaganjem UVB zracima dolazi do direktnih promena molekula DNK, imunosupresije i karcinogeneze. UVA zračenje (320-390 nm) prodire u dublje slojeve kože (dermis) usled čega dolazi do tamnjenja kože, ali i promovisanja fotostarenja kože (uglavnom putem oksidativnih oštećenja DNK) i fotokarcinogeneze. Kao najopasniji vid oštećenja kože izazvan UVB i UVA zracima ističe se pojava kancera kože (npr. malignog melanoma, bazalioma ili kancera skvamoznih ćelija) te je preventivna zaštita kože od sunca postala imperativ (Ácsová i sar., 2021).

Imajući u vidu negativnu percepciju sintetskih sastojaka u kozmetičkim proizvodima (sa jedne strane zbog trenda prirodne kozmetike, a sa druge strane zbog njihovih potencijalnih neželjenih efekata) brojna biljna ulja se razmatraju kao kandidati za formulacije proizvoda za zaštitu od sunca (Ácsová i sar., 2021, Badea i sar., 2015; Niculae i sar., 2014; Oomah i sar., 2000). Naime, u prethodnim studijama je pokazano da ulje semena maline apsorbuje u širokom delu UV spektra (Ácsová i sar., 2021; Oomah i sar., 2000), a slično ponašanje potvrđeno je i u slučaju ulja semena RO2 korišćenog u ovoj doktorskoj disertaciji (Slika 4.21.)



Slika 4.21. UV spektar ulja semena maline RO2 RO2 pri razblaženju 1:100 (ulje: izopropanol)



Slika 4.22. VIS spektar ulja semena maline RO2 pri razblaženju 1:10 (ulje: izopropanol)

4.3.1.2. Određivanje sadržaja ukupnih karotenoida

Intenzivno narandžasta boja RO2 ulja ukazivala je na visok sadržaj karotenoida, koji su poznati kao antioksidansi, provitamini i pigmenti u kozmetičkim proizvodima (Kim i sar., 2012). Za spektrofotometrijsko određivanje karotenoida često se koristi maksimalna vrednost apsorbanije koje ulja bogata karotenoidima pokazuju na ~ 450 nm (npr. ulje semena maline RO2 - *Slika 4.22.*), pri čemu se sadržaj ukupnih karotenoida dobija na osnovu jednačine kalibracione krive za različite koncentracije standardnih rastvora beta karotena ($y = 1340,16 x + 0.0025$, $R^2 = 0,9998$, za opseg koncentracija od 0,0000625 do 0,0008 g/100 mL). Dobijeno je da sadržaj ukupnih karotenoida u ulju maline RO2 iznosi ~ 35,16 mg/kg ulja (*Tabela 4.10.*), što je u saglasnosti sa rezultatima studije koja se bavila domaćim uljem semena maline (40 mg/kg ulja) (Dinić i sar., 2012).

Tabela 4.10. Određivanje ukupnog sadržaja glavnih bioaktivnih sastojaka ulja semena maline RO2 (karotenoida, tokoferola i fenola) brzim spektrofotometrijskim metodama

Ulje semena maline RO2	Ukupni karotenoidi izraženi kao beta-karoten (mg/kg ulja)	Ukupni tokoferoli izraženi kao alfa-tokoferol (mg/kg ulja)	Ukupni fenoli izraženi kao mg GA/g ulja
Hladno ceđeno, organsko, nerafinisano	35,16 ± 0,78	497,09 ± 4,38	4,29 ± 0,05

4.3.1.3. Određivanje sadržaja ukupnih tokoferola

Poznato je da je ulje semena maline bogat izvor tokoferola (dominantno gama-tokoferola) i tokotrienola, koji štite ulje od oksidacije, što je uobičajen problem usled obilja polinezasićenih masnih kiselina u njegovom sastavu (*Tabela 3.1.*). Takođe, tokoferoli su veoma značajni antioksidansi u kozmetičkim proizvodima, čija je uloga da štite sam proizvod od oksidacije, ali i da pruže izvesnu antioksidativnu zaštitu kože (Masaki, 2010). Pokazano je da ulje semena maline RO2 sadrži tokoferole odgovarajućom spektrofotometrijskom metodom (Paquot i sar., 1967; Wong i sar., 1988), pri čemu je njihov ukupni sadržaj određen na osnovu jednačine kalibracione krive za različite koncentracije standardnih rastvora alfa-tokoferola ($y = 30948,36 x - 0,00626$, $R^2 = 0,9998$, za opseg koncentracija od 0,000025 do 0,00018 g/10 mL). Dobijeno je da ukupan sadržaj tokoferola u ulju RO2 iznosi ~ 497 mg/kg ulja, što je u okviru opsega vrednosti koji se navodi u dostupnoj literaturi (198 - 2113 mg/kg ulja, Omah i sar., 2000; Van Hoed i sar., 2009; Yang i sar., 2011).

4.3.1.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Fenolna jedinjenja koja su prisutna u mnogim biljnim ekstraktima, nalaze se u manjoj meri i u biljnim uljima, čime doprinose njihovim antioksidativnim svojstvima. Sadržaj ukupnih fenola u RO2 ulju je kvantifikovan na osnovu izmerene apsorbanije rastvora uzorka na 735 nm, pomoću kalibracione krive dobijene merenjem apsorbanije standardnih rastvora različitih koncentracija galne kiseline u vodi na 735 nm ($y = 113854,5216 x + 0,0324$, $R^2 = 0,9993$). Dobijeno je da RO2 sadrži ~ 4,29 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu ulja (mg GA/g), što je bilo duplo više nego 2 mg GA/g nego što je prethodno opisano (Van Hoed i sar., 2011). Svakako jeste uobičajeno da sadržaj prirodno prisutnih minornih sastojaka ulja (karotenoida, tokoferola i fenola) varira i po više puta, u zavisnosti od vrste maline, klimatskih uslova tokom gajenja, načina dobijanja ulja, čuvanja ulja itd. (Van Hoed i sar., 2011; Yang i sar., 2011).

4.3.2. *In vitro* procena antioksidativne aktivnosti ulja semena maline RO2 pre i nakon nanoemulzifikacije

S obzirom da je dokazano da RO2 ulje sadrži karotenoide, tokoferole i fenolna jedinjenja (*Tabela 4.10.*), bilo je očekivano da ovo ulje ispolji antioksidativnu aktivnost, kao što je već opisano u literaturi (Bushman i sar., 2004; Parry i sar., 2005; Šućurović i sar., 2009; Van Hoed i sar., 2011). Imajući u vidu da su prirodni antioksidansi generalno nestabilni, postoji veliko interesovanje da se oni stabilizuju upotrebom inovativnih rešenja kao što su nanoemulzije, čime se teži poboljšanju njihove stabilnosti, biokompatibilnosti i efikasnosti (Ahmadi i sar., 2020; Demisli i sar., 2020; Pavoni i sar., 2020).

Prema tome, usled nedovoljno literaturnih podataka, važno je bilo ispitati uticaj novih, neistraženih - PG NEs nanoemulzija, u poređenju sa NEs na bazi tradicionalno korišćenog polisorbata -P80 NEs, kao i uticaj dodatnih hidrofilnih antioksidanasa u vodenoj fazi nanoemulzije (hidroglikolni ekstrakt ploda maline – RE ili hrasta kitnjaka – FE) na antioksidativnu aktivnost nanoemulzija. S tim u vezi, pored standardno korišćenog DPPH testa koji uključuje rastvaranje kompletne nanoemulzije (sa svim njenim sastojcima) u metanolu (Rebolleda i sar., 2015), upotrebljen je i ABTS test koji se može izvoditi i u vodenoj sredini, uz očuvanje strukture U/V nanoemulzija (Rios de Souza i sar., 2014).

4.3.2.1. Antioksidativna aktivnost ulja semena maline RO2 i hidroglikolnih ekstrakata RE i FE

Rezultati ispitivanja čistog ulja maline RO2 primenom ABTS i DPPH testa potvrdili su koncentracionu zavisnost antioksidativne aktivnosti u hidrofilnom i lipofilnom medijumu: u slučaju ABTS testa, % inhibicije slobodnog radikala (%INH_{ABTS}) bio je ~ 20,95%, dok je u slučaju DPPH testa izmerena vrednost bila znatno veća (%INH_{DPPH} ~ 74,72%), oba pri maksimalnoj test koncentraciji RO2 od 10 µL/mL (*Tabela 4.11.*). Ovakav rezultat je bio krajnje očekivan imajući u vidu da je RO2 ulje koje se rastvara u metanolu, te su prirodno prisutni antioksidansi iz ulja (karotenoidi i tokoferoli) bili dostupni za reakciju „hvatanja“ slobodnog DPPH radikala (Carvalho i sar., 2013; Yang i sar., 2011), premda DPPH test može biti pogodan i za hidrofilnije antioksidanse (Rebolleda i sar., 2015). Što se tiče ABTS testa u vodenoj sredini, takođe je utvrđena izvesna aktivnost RO2, čime je potvrđeno prisustvo hidrofilnih antioksidanasa u ulju maline (npr. fenolnih jedinjenja), kao što je prethodno zapaženo (Van Hoed i sar., 2011).

Značajno je bilo otkriće da je FE ekstrakt pokazao veoma visoku antioksidativnu aktivnost prema oba slobodna radikala (% INH > 82%) čak i za najmanju testiranu koncentraciju (0,17 µL/mL), što je bilo u skladu sa prethodnim studijama koje su se bavile ovom novijom prirodnom sirovinom koja takođe spada u industrijske nusproizvode (Popović i sar., 2013; Vinha i sar., 2016), kao i sa proizvođačkom specifikacijom u kojoj je navedeno da je FE standardizovan na 1% polifenola (https://www.crodabeauty.com/en-gb/products/product/2919-phytessence_1_french_1_oak). Nasuprot tome, ekstrakt RE pokazao je slabu antioksidativnu aktivnost primenom DPPH testa (~7,13%).

Tabela 4.11. Antioksidativna aktivnost ulja semena maline (RO2) i hidroglikolnih ekstrakata (RE i FE): ABTS test u vodenoj sredini (PBS puffer) i DPPH test u metanolu. Rezultati predstavljaju % inhibicije slobodnog radikala u prisustvu testiranog uzorka antioksidansa.

Uzorak (ulje/ ekstrakt) ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	DPPH % inhibicije	ABTS % inhibicije
R02		
0,27 ^a	2,11 \pm 0,11	/
0,6 ^b	6,43 \pm 0,36	1,35 \pm 0,14
1,2 ^c	11,07 \pm 0,18	2,28 \pm 0,23
10	74,72 \pm 0,26	20,95 \pm 0,51
RE		
0,4 ^d	2,01 \pm 0,04	/
0,9	2,09 \pm 0,06	/
10	7,13 \pm 0,14	1,61 \pm 0,03
FE		
0,17	82,02 \pm 0,31	95,02 \pm 0,99
0,4 ^e	90,70 \pm 0,23	95,75 \pm 0,11
0,9	90,44 \pm 0,11	96,34 \pm 0,16
10	84,87 \pm 0,04	96,84 \pm 0,33

^a odgovara % m/m RO2 u 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ formulacija: PG F1, PG F2, PG F1+RE, i PG F1+FE

^b odgovara % m/m RO2 u 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ formulacije: P80 F2

^c odgovara % m/m RO2 u 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ formulacija: P80 F1, P80 F1+RE i P80 F1+FE

^d odgovara % m/m RE u 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ formulacija: P80 F1+RE i PG F1+RE

^e odgovara % m/m FE u 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ formulacija: P80 F1+FE i PG F1+FE

/ nije zabeležena antioksidativna aktivnost

4.3.2.2. Antioksidativna aktivnost P80 NEs

Imajući u vidu potencijalnu primenu U/V nanoemulzija na koži, za prevenciju oštećenja kože koja su u vezi sa štetnim efektima slobodnih radikala, rezultati koji se tiču uticaja nanoemulzifikacije na antioksidativnu aktivnost bili su od posebnog značaja. Najveća moguća test koncentracija nanoemulzija za oba testa bila je 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, s obzirom da su P80 NEs bile mlečno bele boje, te je u većim koncentracijama dolazilo do nepoželjnog zamućenja reakcione smeše.

Posebno je bilo interesantno da su gotovo identične vrednosti % INH dobijene primenom ABTS i DPPH testa (Tabela 4.12.). Izuzetak je bio uzorak P80 F2 – uzorak koji je sadržao 4,5% RO2 u masnoj fazi umesto 9% kao ostali uzorci (Tabela 3.2.), pri čemu je %INH_{DPPH} bio 3,5 x veći nego %INH_{ABTS}, što se verovatno može pripisati razlikama u rastvorljivosti masne faze ovih nanoemulzija, usled dodatka ISIS u uzorku P80 F2. Uzorci P80 F1+RE i P80 F1+FE su u oba slučaja pokazali veći % INH_{DPPH} i %INH_{ABTS} radikala u odnosu na P80 F1 bez dodatka ovih hidroglikolnih ekstrakata, premda je u slučaju dodatka RE povećanje % INH bilo gotovo nezatno, dok je u slučaju dodatka FE povećanje bilo izuzetno izraženo (%INH_{ABTS} ~ 92,33%, ~%INH_{DPPH} ~ 91,55%). Ovakav efekat se može objasniti dodatkom 5% FE ekstrakta u vodenu fazu P80 NE (tj. 4% računato na ukupnu masu NE), s obzirom da je pokazano da je ovaj hidroglikolni ekstrakt izuzetno jak antioksidans i u minimalnim testiranim koncentracijama (Tabela 4.11.). Generalno, dobijeni rezultati su bili u skladu sa koncentracijom testiranih sirovina sa antioksidativnim delovanjem u formulacijama P80 NEs.

Tabela 4.12. Antioksidativna aktivnost P80 nanoemulzija izražena kao % inhibicije slobodnih radikala DPPH i ABTS u zavisnosti od koncentracije uzorka, izmereno 24h nakon izrade

P80 Nanoemulzije ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	DPPH % inhibicije	ABTS % inhibicije
P80 F1		
5,0	$6,77 \pm 0,13$	$5,51 \pm 0,17$
7,5	$7,72 \pm 0,26$	$9,68 \pm 0,35$
10,0	$11,56 \pm 0,31$	$11,47 \pm 0,59$
P80 F1+RE		
5,0	$8,56 \pm 0,22$	$6,16 \pm 0,69$
7,5	$10,76 \pm 0,15$	$6,37 \pm 0,27$
10	$12,96 \pm 0,27$	$12,09 \pm 0,12$
P80 F1+FE		
5,0	$62,46 \pm 0,36$	$75,99 \pm 0,69$
7,5	$78,17 \pm 0,37$	$93,29 \pm 0,79$
10,0	$91,55 \pm 0,31$	$92,33 \pm 0,44$
P80 F2		
5,0	$3,93 \pm 0,09$	$2,11 \pm 0,01$
7,5	$8,89 \pm 0,02$	$2,95 \pm 0,56$
10,0	$9,30 \pm 0,11$	$2,65 \pm 0,38$

*P80 F0 – negativna kontrola (bez RO2, RE, FE) - % INH: 1- 2,5% za oba testa

** P80 FT – pozitivna kontrola (sa 1% tokoferil acetata, bez RO2, RE, FE) – % INH: 3 – 5% za oba testa

4.3.2.3. Antioksidativna aktivnost PG NEs

Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti PG NEs, prikazani u *Tabeli 4.13.*, ukazali su na koncentracionu zavisnost antioksidativnog efekta za sve testirane uzorke, pri čemu je bilo moguće testirati PG NEs DPPH testom u koncentraciji do $30 \mu\text{L}/\text{mL}$, tj. do $10 \mu\text{L}/\text{mL}$ putem ABTS testa. Veće koncentracije pri ABTS testu su dovodile do zamućenja uzorka, iako su PG NEs bile polu-transparente, što ukazuje pojavu neželjenih interakcija u reakcionoj smeši. Slično kao i u slučaju P80 NEs, najjači antioksidans je bio uzorak sa FE ekstraktom u vodenoj fazi - PG F1+FE (% $\text{INH}_{\text{DPPH}} \sim 90,87\%$, % $\text{INH}_{\text{ABTS}} \sim 99,67\%$), usled sinergističkog efekta između RO2 (lipofilni antioksidans, sa dokazanim sadržajem karotenoida, tokoferola i fenolnih jedinjenja) i FE (hidrofilni antioksidans sa 1% polifenola). U poređenju sa P80 NEs, PG NEs su efikasnije neutralisale ABTS radikal u vodenoj sredini, dok su P80 NEs ispoljile više vrednosti % INH_{DPPH} radikala (za istu test koncentraciju od $10 \mu\text{L}/\text{mL}$), što se može objasniti različitom koncentracijom RO2 ulja kao i ostalim razlikama u sastavu ovih formulacija, kao što je prikazano u *Tabeli 3.2.* i *3.3.*

Antioksidativna aktivnost ostala je neznatno promenjena nakon 3 meseca čuvanja na sobnoj temperaturi u slučaju obe vrste nanoemulzija ($\pm 5\%$ u odnosu na inicijalne vrednosti % INH_{DPPH} i % INH_{ABTS} , za test koncentraciju od $10 \mu\text{L}/\text{mL}$, *Tabela 4.12.* i *Tabela 4.13.*), što je bio indikator njihove dobre preliminarnе stabilnosti i efikasnosti kao nosača za ispitivane lipofilne/hidrofilne prirodne antioksidanse.

Tabela 4.13. Antioksidativna aktivnost PG nanoemulzija izražena kao % inhibicije slobodnih radikala DPPH i ABTS u zavisnosti od koncentracije uzorka, izmereno 24h nakon izrade

P80 Nanoemulzije ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	DPPH % inhibicije	ABTS % inhibicije
PG F1		
10	3,73 \pm 0,10	13,48 \pm 1,118
20	6,41 \pm 0,14	/
30	8,37 \pm 0,55	/
PG F1+RE		
10	3,91 \pm 0,09	22,14 \pm 0,620
20	7,33 \pm 0,12	/
30	9,53 \pm 0,41	/
PG F1+FE		
10	90,87 \pm 0,31	99,67 \pm 0,158
20	92,49 \pm 0,29	/
30	91,65 \pm 0,93	/
PG F2		
10	3,67 \pm 0,06	35,74 \pm 0,924
20	8,37 \pm 0,07	/
30	9,90 \pm 0,56	/

* PG F0 – negativna kontrola, bez RO2, RE, FE, RF, sa kosurfaktantom I –
% INH: $\leq 2,5\%$ za oba testa

/ - koncentracije pri kojima nije bilo moguće izvesti test

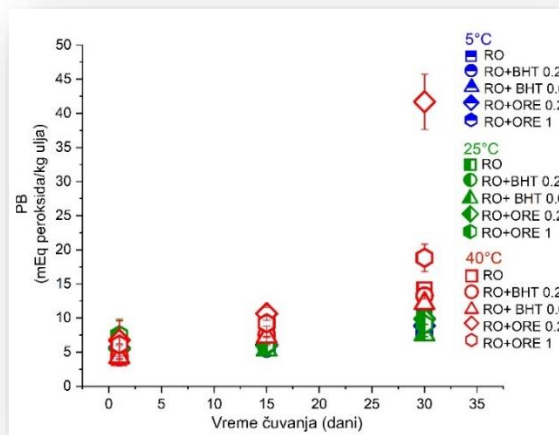
4.3.3. Procena oksidativne stabilnosti ulja semena maline RO2

Ulje semena maline RO2 spada u organska, hladno ceđena biljna ulja bogata polinezasićenim masnim kiselinama (> 80%), a dokazano je i prisustvo minornih bioaktivnih sastojaka - karotenoida, tokoferola i fenolnih jedinjenja u ovom ulju (Tabela 3.1. i Tabela 4.10.). RO2 je ulje narandžaste boje i prijatnog mirisa, a pokazalo je i antioksidativnu aktivnost *per se* i u nanoemulzijama P80 NEs i PG NEs (poglavlje 4.3.2.). Međutim, slično kao i kod drugih ulja bogatih polinezasićenim masnim kiselinama, postoji izazov kako obezbediti oksidativnu stabilnost tokom čuvanja i korišćenja ulja, posebno na povišenoj temperaturi. Naime, oksidacioni proizvodi koji se brzo formiraju nakon nakon prvog otvaranja pakovanja ili usled povećanja temperature značajno narušavaju senzorne karakteristike ulja i/ili proizvoda koji ih sadrže, usled pojave neprijatnog mirisa, promene boje ili teksture. Dodatno, primarni i sekundarni oksidacioni proizvodi mogu ispoljiti i štetne efekte po ljudsko zdravlje (Drinić i sar., 2020; Neves i sar., 2015; Walker i sar., 2015a).

Prema tome, važan korak u razvoju kozmetičkog proizvoda je bila procena oksidativne stabilnosti samog ulja RO2 kao sirovine, kao i pronalaženje kompatibilnog antioksidansa za očuvanje njegove stabilnosti. U tu svrhu sprovedena je studija oksidativne stabilnosti (na 5°C, 25°C ili 40°C) čistog ulja RO2, kao i ulja sa dodatim standardnim, sintetskim antioksidansom butilhidroksitoluenom (BHT–0,2% i 0,6%) ili prirodnim etarskim uljem origana (ORE–0,2% i 1%), sa dokazanom snažnom antioksidativnom aktivnošću (Dorman i sar., 2000; Kulisic i sar., 2004).

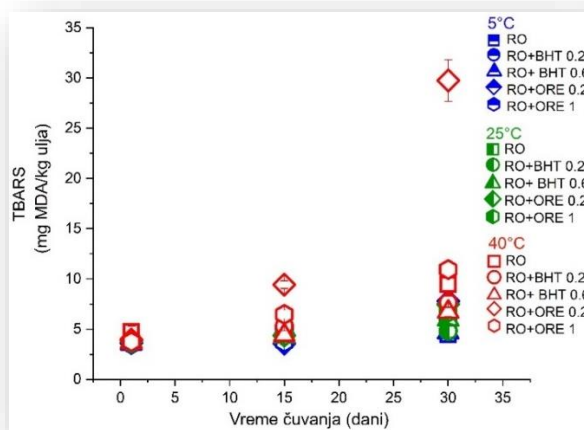
Kao što je prikazano na Slici 4.23., čisto ulje RO2 i RO2 sa dodatim antioksidansima pokazalo je zadovoljavajuće vrednosti primarnih proizvoda oksidacije (npr. lipidnih peroksida) izraženih kao peroksidni broj – PB < 10 tokom prvih 15 dana čuvanja na svim temperaturama. Nakon 30 dana, kod

većine uzoraka čuvanih na 40°C bio je premašen limit od PB = 10 (što se smatra indikatorom formiranja primarnih oksidacionih proizvoda, tj. lipidnih hidroperoksida) (Drinić i sar., 2020), mada se za hladno ceđena ulja poput RO2 kao limit često uzima i vrednost PB ≤ 15 (Prescha i sar., 2014). Interesantno je bilo da je ORE u koncentraciji od 1%, a posebno 0,2% na 40°C delovalo kao prooksidans, pri čemu je došlo do značajnog povećanja PB ulja (do 41,34). Sa druge strane, nije bilo značajne razlike između PB vrednosti čistog ulja RO2 i RO2 sa BHT (0,2% i 0,6%), kao ni između uzoraka čuvanih na 5°C i 25°C, jer su sve vrednosti PB ostale u željenom opsegu (≤ 15).

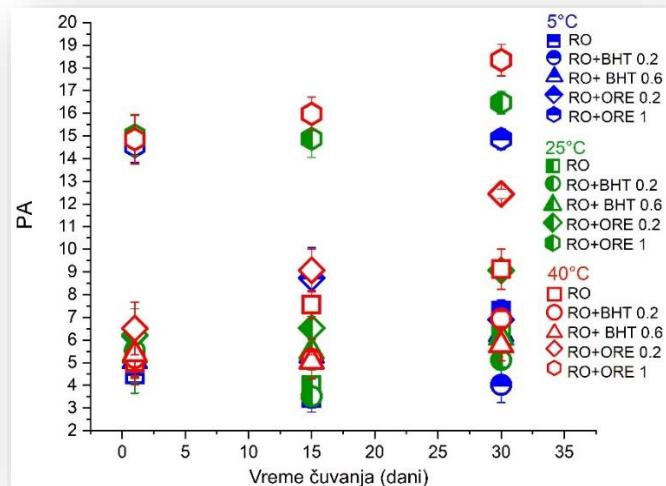


Slika 4.23. PB uzoraka ulja semena maline RO2 bez ili sa dodatim antioksidansima (BHT ili ORE) tokom 30 dana čuvanja na 5°C, 25°C i 40°C. Rezultati su izraženi kao miliekivalenti peroksida/kg ulja (IDF metoda).

Formiranje sekundarnih proizvoda oksidacije, npr. malonaldehida, praćeno je pomoću TBARS testa (Slika 4.24.), a formiranje drugih aldehida (npr. 2-alkenala i 2,4-alkadienala) je izraženo kao p-anisidinski broj (PA) (Slika 4.25.).



Slika 4.24. TBARS vrednosti uzoraka ulja semena maline RO2 bez ili sa dodatim antioksidansima tokom 30 dana čuvanja na 5°C, 25°C i 40°C. Rezultati su izraženi kao mg malonaldehida/ kg ulja (mg MDA/kg ulja).



Slika 4.25. PA broj uzoraka ulja semena maline RO2 bez ili sa dodatim antioksidansima tokom 30 dana čuvanja na 5°C, 25°C i 40°C.

Slično kao u slučaju PB vrednosti, TBARS vrednosti nakon 15 dana čuvanja na svim temperaturama ostale su ispod 5 mg MDA/kg ulja za RO2 i za RO2 sa dodatkom BHT 0,2% ili BHT 0,6%, što je ukazivalo na sporu razgradnju formiranih primarnih lipidnih hidroperoksida (tj. rani stupan oksidacije ulja). U slučaju RO2 sa ORE čuvanih na 40°C, primećen je značajan porast TBARS: od 3,96 do 9,40 (RO2-ORE 0,2%) i od 3,74 do 6,47 (RO2-ORE 1%), što je bilo u skladu sa skokom PB u pomenutim uljima. Konačno, nakon 30 dana, nije bilo značajnih razlika između uzoraka ulja čuvanih na 5 i 25°C, kao ni između uzoraka čistog RO2 i RO2 sa dodatkom BHT (0,2% i 0,6%), kod kojih je došlo do blagog povećanja u odnosu na početne vrednosti. Međutim, kod RO2-ORE uzoraka za obe testirane koncentracije pokazan je značajan porast TBARS.

Rezultati merenja PA (Slika 4.25.) su generalno bili u skladu sa PB i TBARS vrednostima, s obzirom da su vrednosti PA čistog RO2 ili RO2 sa dodatkom BHT ostali ispod preporučene granice ($PA < 10$) (Prescha i sar., 2014) za sve temperature nakon 30 dana čuvanja, i nije bilo značajnih razlika između uzoraka čuvanih na 5 i 25°C. Interesantno zapažanje se odnosilo na uzorak sa 1% ORE koji je inicijalno imao veoma visoku vrednost PA (~15), čime je ustanovljeno da neka komponenta ovog etarskog ulja stupa u interakciju sa reagensima prilikom izvođenja PA testa.

Generalno, oksidativna stabilnost čistog ulja maline RO2 i RO2 sa dodatnim antioksidansima bila je zadovoljavajuća tokom 30 dana čuvanja na 5°C i 25°C, pri čemu su svi relevantni parametri (PB, TBARS i PA) ostali u okviru optimalnih granica, što se može pripisati antioksidativnoj aktivnosti samog ulja RO2. Ipak, na 40°C zapažena je oksidativna degradacija ulja – u slučaju dodatka BHT je bila umerena (za obe testirane koncentracije), dok je u slučaju ORE došlo do veće nestabilnosti u odnosu na čisto ulje, što je potvrdilo da ORE nije adekvatan antioksidans za ulje semena maline.

4.3.4. Procena oksidativne stabilnosti nanoemulzija P80 NEs i PG NEs

Tokom formulacionih istraživanja, dva seta optimizovanih formulacija nanoemulzija: P80 NEs (Tabela 3.2.) i PG NEs (Tabela 3.3.) detaljno je okarakterisano uz praćenje njihove preliminarnosti na sobnoj temperaturi do 3 meseca čuvanja (Tabela 4.3. i Tabela 4.8.). Iako je većina testiranih formulacija pokazala zadovoljavajuću stabilnost na sobnoj temperaturi (uz promene praćenih parametara - Z-ave,

PDI, pH i električna provodljivost $\pm 15\%$), prilikom čuvanja na povišenoj temperaturi P80 NEs (svi uzorci osim P80 NE+FE, 4%) pokazali su drastičan pad pH vrednosti (do 3 pH jedinice) i skok električne provodljivosti (i do 100%) u odnosu na inicijalne vrednosti (*Tabela 4.3.*). Ovakvo pošanje već je opisano kada je reč o nanoemulzijama sa polisorbatom 80, s obzirom da sa povećanjem temperature dolazi do promene HLB vrednosti surfaktanta i posledične destabilizacije nanoemulzije usled “curenja” nezasićene laurinske kiseline koja potom podleže brznoj oksidaciji (Ferreira da Silveira i sar., 2021). RO2, kao i druga biljna ulja, takođe je podložno hidrolizi, čime se oslobađaju masne kiseline te dolazi do pada pH vrednosti i skoka električne provodljivosti nanoemulzije (Bento da Silva i sar., 2017; Bernardi i sar., 2011).

4.3.4.1. Optimizacija sastava P80 NEs i PG NEs u cilju procene/ poboljšanja oksidativne stabilnosti

S obzirom da podaci o fizičko-hemijskoj stabilnosti, a posebno o oksidativnoj stabilnosti, nanoemulzija na bazi poliglicerilskih estara nisu bili dostupni u literaturi, radi detaljnijeg uvida u ovu tematiku urađena je uporedna studija novog seta uzoraka P80 NEs i PG NEs sa 2% ulja RO2 (s obzirom da je to bila maksimalna koncentracija koja je mogla biti inkorporirana u PG NEs, kao i zbog činjenice da su P80 NEs sa 4,5 i 9% RO2, ali i čisto ulje RO2, pokazali nestabilnost na 40°C). Ispitivane P80 NEs i PG NEs su bile gotovo identičnog sastava, izuzev surfaktanta, a testirano je ukupno 4 antioksidansa u koncentracijama prilagođenim sadržaju masne faze u U/V emulzijama. Lipofilni antioksidansi su bili: BHT - 0,02% ili ORE - 0,02%, a kao hidrofilni antioksidansi testirani su: EDTA, dinatrijumova so - 0,2% ili FE - 1%, računato na ukupnu masu nanoemulzije (*Tabela 3.4.*).

Kao što je prikazano u *Tabeli 4.14.*, nađeno je da izbor surfaktanta i dodatak ulja RO2 drastično utiču na veličinu kapi nanoemulzija (Z-ave i PDI), dok dodatak testiranih antioksidanasa nije ispoljio značajan efekat, što je potvrdilo njihovu dobru kompatibilnost sa odabranim nanonosacima. Naime, 24 h nakon izrade, P80 NEs sa RO2 imale su prosečnu veličinu kapi od 203,5 do 211,4 nm, dok je P80 F0 bez RO2 imala znatno veće kapi (245,3 nm). Kao rezultat, sve P80 NEs su bile mlečno bele boje, sa plavim odsjajem karakterističnim za nanoemulzije (Klang i sar., 2012). Sa druge strane, PG NEs bile su polu-transparentne, usled veoma finih veličina kapi (< 65 nm), a takođe je postojala razlika među uzorcima bez RO2 (PG F0 – 62,33 nm) i sa RO2 uljem (38,4 – 46,6 nm, za PG NEs-RO2). Distribucija veličina kapi svih nanoemulzija bila je uska (PDI < 0,125), ukazujući na dobru preliminarnu stabilnost sistema (Kampa i sar., 2022; Rebolleda i sar., 2015).

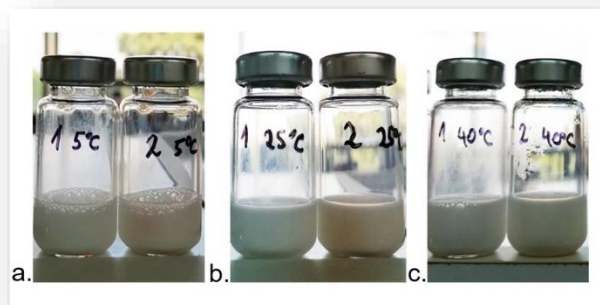
Tabela 4.14. Prosečna veličina kapi (Z-ave), indeks polidisperznosti (PDI), pH vrednost i električna provodljivost nanoemulzija sa različitim surfaktantima (P80 ili PG) i antioksidansima 24 nakon izrade

Naziv formulacije	Z-ave (nm)	PDI	pH	El. prov. ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
P80 F0	245,30 \pm 3,12	0,121 \pm 0,015	5,37 \pm 0,01	159,33 \pm 1,71
P80 F1	207,63 \pm 1,46	0,108 \pm 0,017	5,45 \pm 0,02	156,03 \pm 0,76
P80 F1+BHT	210,03 \pm 1,62	0,125 \pm 0,004	5,38 \pm 0,02	167,37 \pm 0,65
P80 F1+ORE	203,50 \pm 1,15	0,108 \pm 0,014	5,40 \pm 0,02	155,07 \pm 0,49
P80 F1+EDTA	206,03 \pm 1,39	0,084 \pm 0,027	4,98 \pm 0,06	744,67 \pm 0,58
P80 F1+FE	211,43 \pm 1,66	0,116 \pm 0,020	6,16 \pm 0,03	242,67 \pm 2,08
PG F0	62,32 \pm 0,32	0,060 \pm 0,014	4,16 \pm 0,01	167,73 \pm 0,40
PG F1	41,96 \pm 0,72	0,059 \pm 0,018	4,19 \pm 0,01	81,07 \pm 1,51
PG F1+BHT	38,36 \pm 0,73	0,110 \pm 0,008	4,20 \pm 0,02	75,77 \pm 0,68
PG F1+ORE	41,40 \pm 0,95	0,079 \pm 0,016	4,21 \pm 0,03	71,27 \pm 0,75
PG F1+EDTA	46,56 \pm 1,01	0,051 \pm 0,013	4,59 \pm 0,06	346,67 \pm 1,53
PG F1+FE	41,57 \pm 0,83	0,069 \pm 0,024	4,35 \pm 0,06	89,85 \pm 0,23

Nakon 30 dana čuvanja na različitim temperaturama (5°C, 25°C ili 40°C), obe vrste nanoemulzija pokazale su dobru fizičku stabilnost, s obzirom da nije bilo većeg porasta veličina kapi i PDI kod većine uzoraka (Tabela 4.15.). Ipak, vizuelnom kontrolom uzoraka uočene su određene promene kod uzoraka P80 NEs koje nisu detektovane DLS merenjima, usled limita detekcije (5 mikrona) i/ili zbog obaveznog razblaživanja uzoraka pre merenja, jer se na taj način često uklone i znaci nestabilnosti nanoemulzija (npr. flokulacija ili formiranje agregata) (Klang i sar., 2012). Tako je, na primer, uočeno raslojavanje uzorka P80 F0 na svim temperaturama, čime je još jednom potvrđeno da dodatak RO2 ima stabilišući efekat u P80 nanoemulzijama (Slika 4.26.).

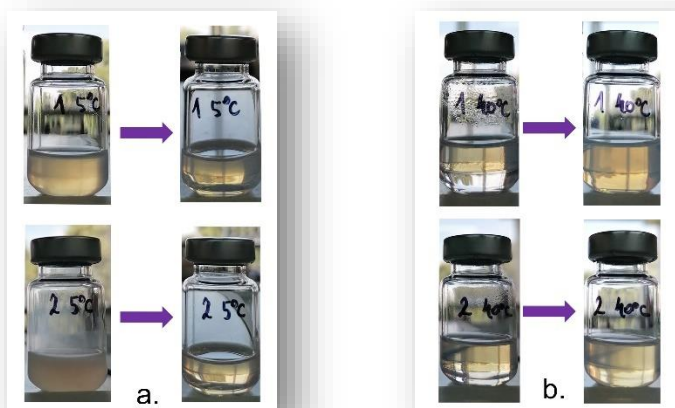
Tabela 4.15. Prosečna veličina kapi (Z-ave), indeks polidisperznosti (PDI), pH vrednost i električna provodljivost nanoemulzija sa različitim surfaktantima (P80 ili PG) i antioksidansima nakon 30 dana čuvanja na 5°C, 25°C ili 40°C.

Naziv formulacije	Z-ave (nm)			PDI		
	5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C
P80 F0	211,73 ± 3,62	283,03 ± 5,53	230,77 ± 0,40	0,147 ± 0,020	0,206 ± 0,034	0,085 ± 0,023
P80 F1	219,33 ± 4,33	208,67 ± 1,50	207,33 ± 1,20	0,180 ± 0,021	0,078 ± 0,010	0,097 ± 0,015
P80 F1+BHT	205,03 ± 2,35	207,80 ± 0,52	202,07 ± 1,50	0,106 ± 0,018	0,097 ± 0,037	0,097 ± 0,018
P80 F1+ORE	199,87 ± 0,71	201,33 ± 1,35	198,80 ± 0,44	0,103 ± 0,019	0,091 ± 0,020	0,098 ± 0,045
P80 F1+EDTA	203,90 ± 2,75	202,90 ± 2,78	201,47 ± 1,09	0,070 ± 0,018	0,068 ± 0,012	0,083 ± 0,027
P80 F1+FE	211,43 ± 0,63	212,93 ± 0,91	199,63 ± 1,53	0,105 ± 0,015	0,108 ± 0,003	0,094 ± 0,013
PG F0	64,43 ± 1,73	64,35 ± 4,56	72,22 ± 1,19	0,060 ± 0,136	0,060 ± 0,014	0,177 ± 0,026
PG F1	44,75 ± 1,52	43,85 ± 0,52	50,18 ± 0,89	0,056 ± 0,009	0,072 ± 0,011	0,070 ± 0,014
PG F1+BHT	44,03 ± 1,13	40,54 ± 0,35	50,00 ± 1,01	0,038 ± 0,006	0,083 ± 0,005	0,093 ± 0,021
PG F1+ORE	44,38 ± 0,78	46,47 ± 0,96	51,00 ± 1,26	0,062 ± 0,004	0,036 ± 0,019	0,083 ± 0,013
PG F1+EDTA	54,58 ± 0,92	53,21 ± 1,47	60,16 ± 2,33	0,063 ± 0,013	0,063 ± 0,048	0,047 ± 0,012
PG F1+FE	43,55 ± 0,96	45,44 ± 0,65	52,35 ± 1,71	0,064 ± 0,011	0,081 ± 0,011	0,081 ± 0,014



Slika 4.26. Vizuelni izgled P80 nanoemulzije bez ulja maline RO2 (uzorci 1 – P80 F0, sa vidljivim znacima kremiranja na zidu bočice) i P80 NE sa uljem RO2 (uzorci 2 – P80 F1, sa poboljšanom stabilnošću) nakon 30 dana čuvanja na: a. 5°C, b. 25°C i c. 40°C.

Kada je reč o nanoemulzijama pripremljenim sa smešom poliglicerilskih estara, otkrivena su neka veoma zanimljiva svojstva: na 5°C većina uzoraka PG NEs je postala zamućena, dok su uzorci čuvani na 40°C prešli u dvofazni sistem (na vrhu koncentrovana nanoemulzija: Z-ave–52,53 nm, PDI–0,18, a višak vodene faze bio je u donjem sloju). Međutim, ove transformacije su bile reverzibilne, s obzirom da su se nanoemulzije vratile u prvobitno stanje nakon kratkog mućkanja i čuvanja nekoliko sati na sobnoj temperaturi (Slika 4.27.).



Slika 4.27. Vizuelni izgled PG nanoemulzije bez ulja maline RO2 (uzorak 1 – PG F0) ili sa RO2 (uzorak 2 – PG F1) nakon 30 dana čuvanja na: a. 5°C (zamućeni uzorci); b. 40°C (dvofazni uzorci) i njihova transformacija u originalno stanje (nakon 1 h na sobnoj temperaturi).

Promene pH vrednosti i električne provodljivosti P80 NEs i PG NEs

Razlike u stabilnosti između P80 NEs i PG NEs ogledale su se i u promenama njihove pH vrednosti i električne provodljivosti tokom čuvanja 30 dana na različitim temperaturama (Tabela 4.16.). Zapažena je veoma dobra stabilnost uzoraka PG NEs sa RO2 uljem u masnoj fazi na svim temperaturama, s obzirom da nije uočeno značajno smanjenje pH vrednosti, koje ukazuje na “curenje“ masnih kiselina iz nanoemulzionog jezgra i/ili sloja surfaktanta (Bernardi i sar., 2011; Walker i sar., 2015a). Određene promene električne provodljivosti uočene su kod većine uzoraka: povećanje do 20% (za PG F1+EDTA i PG F1+FE) i do 55% (za PG F1+BHT i PG F1+ORE), a naročito za uzorak PG F0, na svim

temperaturama (povećanje do 71%). Međutim, ove promene električne provodljivosti nisu se odrazile na generalnu stabilnost sistema.

Nasuprot tome, P80 NEs su ponovo pokazale izuzetnu nestabilnost na 40°C, sa izrazitim smanjenjem pH vrednosti (od 5,37 do 3,39 i od 5,45 do 3,72 za blanko emulziju - P80 F0 i za P80 F1 sa RO2, bez dodatka antioksidansa, redom). Takođe, zabeležen je i drastičan skok električne provodljivosti kod ovih uzoraka (sa 159,33 na 325,33 za P80 F0, i sa 156,03 na 248,54, za P80 F1). Dakle, ovim je potvrđeno da i u novom setu uzoraka sa smanjenim sadržajem RO2 na 2% i dalje perzistira problem sa stabilnošću na 40°C, najviše usled nestabilnosti samog P80, kao što je prethodno opisano (Ferreira da Silveira i sar., 2021; Walker i sar., 2015a). Ipak, važno otkriće tokom ove studije oksidativne stabilnosti bila je potvrda da svi ispitani antioksidansi mogu da spreče destabilizaciju P80 NEs, te je dodatak antioksidansa neophodan u slučaju P80 NEs.

Tabela 4.16. pH vrednost i električna provodljivost P80 NEs i PG NEs nakon 30 dana čuvanja na 5°C, 25°C ili 40°C.

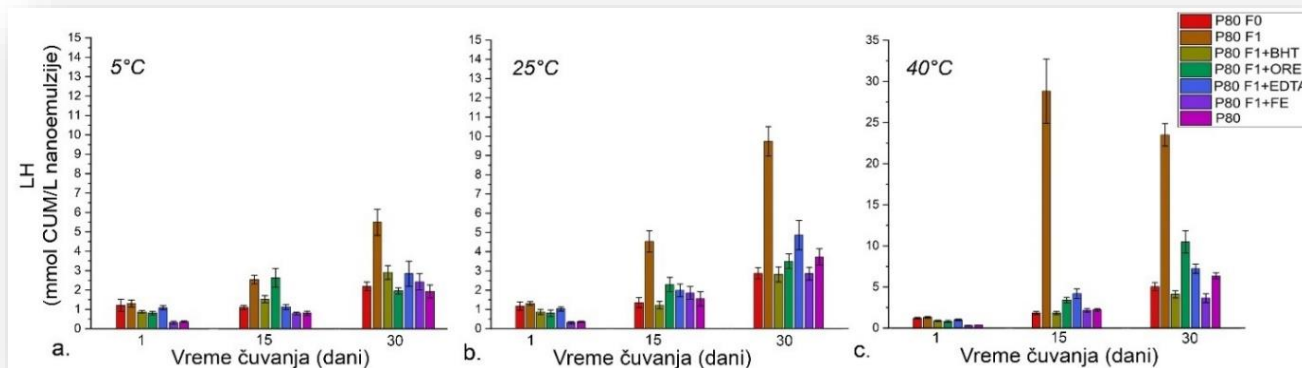
Naziv formulacije	pH vrednost			Električna provodljivost (µS/cm)		
	5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C
P80 F0	5,32 ± 0,01	4,85 ± 0,01	3,39 ± 0,01	229,67 ± 1,155	190,53 ± 5,358	325,33 ± 0,578
P80 F1	5,70 ± 0,01	6,11 ± 0,06	3,72 ± 0,02	217,00 ± 3,464	155,50 ± 0,300	248,54 ± 0,777
P80 F1+BHT	6,19 ± 0,04	6,16 ± 0,02	5,34 ± 0,01	199,67 ± 0,577	206,39 ± 2,310	179,23 ± 1,762
P80 F1+ORE	6,31 ± 0,05	6,14 ± 0,06	4,84 ± 0,06	137,37 ± 0,115	169,87 ± 0,404	200,33 ± 0,577
P80 F1+EDTA	6,37 ± 0,01	4,82 ± 0,03	4,77 ± 0,08	737,33 ± 1,155	749,33 ± 1,527	703,67 ± 0,345
P80 F1+FE	6,22 ± 0,02	6,21 ± 0,03	5,59 ± 0,03	263,83 ± 0,578	224,67 ± 0,577	270,33 ± 2,517
PG F0	3,96 ± 0,03	3,98 ± 0,02	3,92 ± 0,01	246,67 ± 8,083	287,00 ± 3,464	300,33 ± 0,577
PG F1	4,02 ± 0,03	4,07 ± 0,05	4,02 ± 0,02	85,83 ± 0,351	115,80 ± 1,114	89,73 ± 0,115
PG F1+BHT	3,98 ± 0,01	3,98 ± 0,01	3,95 ± 0,06	81,42 ± 1,166	115,47 ± 1,569	118,07 ± 7,557
PG F1+ORE	4,04 ± 0,05	4,05 ± 0,01	3,99 ± 0,08	84,70 ± 3,118	95,30 ± 2,995	103,30 ± 4,729
PG F1+EDTA	4,80 ± 0,04	4,47 ± 0,06	4,41 ± 0,07	285,47 ± 1,790	356,00 ± 1,001	349,00 ± 1,125
PG F1+FE	4,60 ± 0,02	4,17 ± 0,03	3,99 ± 0,04	111,21 ± 1,607	108,10 ± 0,173	99,87 ± 1,270

4.3.4.2. Uporedna analiza oksidativne stabilnosti P80 NEs i PG NEs

Inkorporiranje ulja u klasične emulzije (uljane kapi makrometarskih veličina) i nanoemulzije (poželjno ≤ 200 nm) može imati kontraproduktivan efekat na oksidativnu aktivnost. Jedan od glavnih razloga za povećanu nestabilnost ulja u emulzionim sistemima u poređenju sa čistim uljem jeste povećana kontaktna površina između uljane i vodene faze u kojoj se nalaze prooksidanti. Prethodne studije su pokazale da stukturne i fizičko-hemijske karakteristike surfaktanata, kao i interakcije u koje stupaju sa antioksidansima u formulaciji značajno utiču na oksidativnu aktivnost emulgovanih ulja (Kampa i sar., 2022; Lee i Choi, 2021; Neves i sar., 2015; Rehman i sar., 2020; Walker i sar., 2015a).

Važno je napomenuti i činjenicu da trenutno nema konsenzusa u literaturi oko izražavanja rezultata oksidativne stabilnosti nanoemulzija. U većini radova oksidativna stabilnost nanoemulzija je bila izražena kao mmol ili mg CUM i MDA/kg ulja (Kampa i sar., 2022; Ferreira da Silveira i sar., 2021; Guo i sar., 2021; Rehman i sar., 2020). Imajući u vidu kompleksan sastav nanoemulzija i brojne moguće interakcije među sastojcima, u ovoj disertaciji rezultati su izraženi kao mmol CUM/L i mg MDA/L nanoemulzije, kao što je prethodno opisano (Walker i sar., 2017; Zhong i sar., 2017). Takođe, limit za LH i TBARS vrednosti nanoemulzija tek treba da se uspostavi, kao što su istakli i autori studije koja se bavila uporednom analizom oksidativne stabilnosti ribljeg ulja u nanoemulzijama i klasičnim makroemulzijama (Nejadmansouri i sar., 2016).

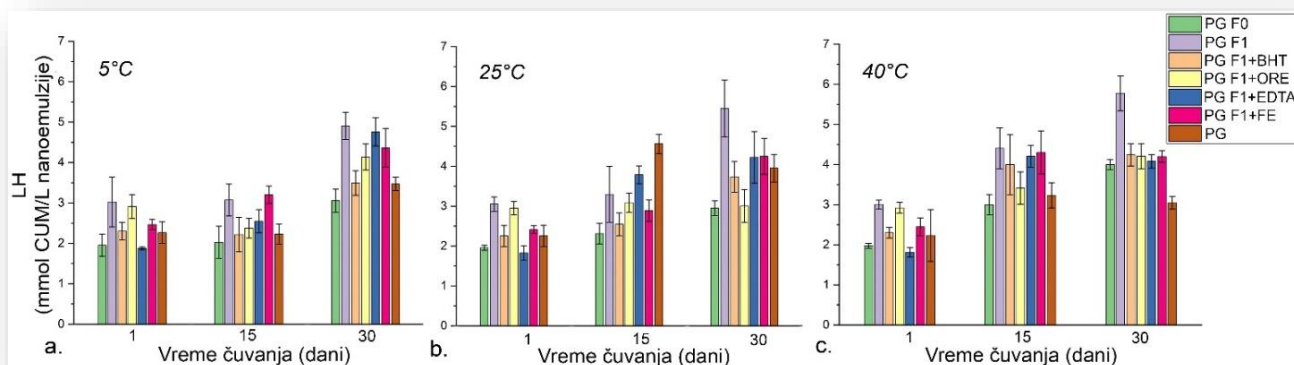
Rezultati formiranja lipidnih hidroperoksida – LH, kao primarnih proizvoda oksidacije P80 NEs (Slika 4.28.) i PG NEs (Slika 4.29.) i sekundarnih proizvoda oksidacije izraženih kao TBARS vrednosti istih uzoraka (P80 NEs – Slika 4.30. i PG NEs – Slika 4.31.) ukazali su da izbor surfaktanta ima odlučujuću ulogu kada je reč o oksidativnoj stabilnosti nanoemulzija, kao i da je dodatak antioksidansa ponekad neophodan da bi se formulacija optimizovala za čuvanje na različitim temperaturama.



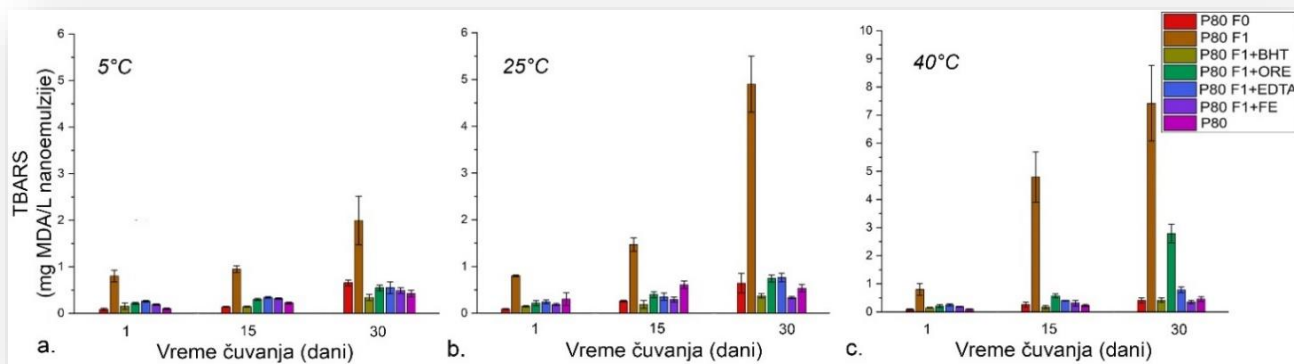
Slika 4.28. LH vrednosti disperzije polisorbata 80 u vodi (P80) i nanoemulzija P80 NEs tokom 30 dana čuvanja na različitim temperaturama: a. 5°C, b. 25°C i c. 40°C. Oznake uzoraka: blanko nanoemulzija bez ulja maline RO2 (P80 F0), a nanoemulzije sa RO2 (P80 F1-bez antioksidansa, P80 F1+antioksidans).

Kada je reč o P80 NEs, pokazana je izrazita oksidativna nestabilnost na 40°C uzorka P80 F1 (sa uljem RO2, bez antioksidansa), s obzirom da je primećen drastičan skok LH i TBARS vrednosti nakon svega 15 dana čuvanja (LH – od 1,32 do 28,81, TBARS – od 0,79 do 4,79). Ovakav rezultat je bio posledica prooksidativne interakcije između RO2 i komponenata nanoemulzije, s obzirom da je u slučaju disperzije čistog surfaktanta u vodi (P80) i blanko nanoemulzije (P80 F0) znatno sporije došlo do formiranja oksidacionih proizvoda. Slično zapažanje je objašnjeno činjenicom da hidrofilne glave molekula P80

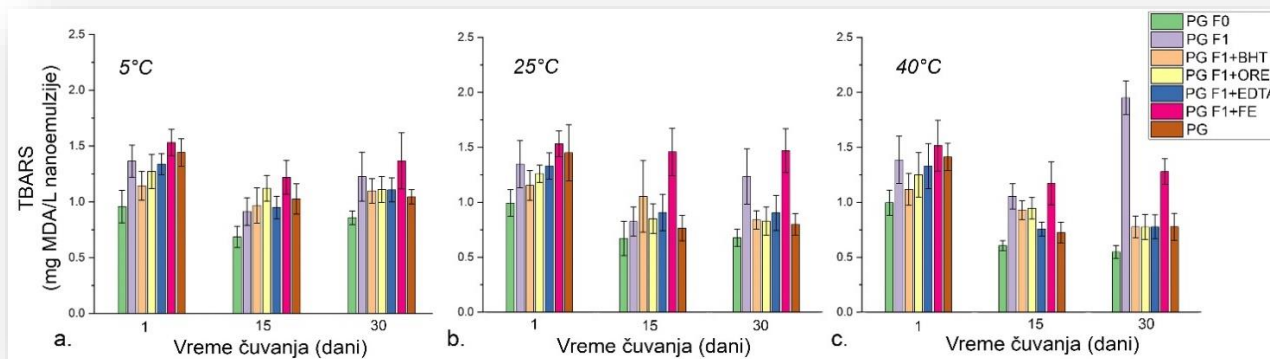
mogu da generišu hidroperokside kada se nađu u kontaktu sa prooksidansima u vodi, što dalje dovodi do ubrzane oksidacije nezasićenih masnih kiselina u uljima (Mc Clements i Decker, 2018). Ipak, dodatak bilo kog od testiranih antioksidanasa (posebno BHT, FE ili EDTA) ili čuvanje u frižideru (na 5°C) značajno je inhibiralo formiranje oksidacionih proizvoda, tj. poboljšalo oksidativni status P80 NEs.



Slika 4.29. LH vrednosti disperzije smeše poliglicerilskih estara u vodi (PG) i nanoemulzija PG NEs tokom 30 dana čuvanja na različitim temperaturama: a. 5°C, b. 25°C i c. 40°C. Oznake uzoraka: blanko nanoemulzija bez ulja maline RO2 (PG F0), a nanoemulzije sa RO2 (PG F1-bez antioksidansa, PG F1+antioksidans).



Slika 4.30. TBARS vrednosti uzoraka – disperzije polisorbata 80 u vodi (P80) i nanoemulzija P80 NEs tokom 30 dana čuvanja na različitim temperaturama: a. 5°C, b. 25°C i c. 40°C.



Slika 4.31. TBARS vrednosti uzoraka – disperzije smeše poliglicerilskih estara u vodi (PG) i nanoemulzija PG NEs tokom 30 dana čuvanja na različitim temperaturama: a. 5°C, b. 25°C i c. 40°C.

Što se tiče PG NEs, iako su se vrednosti LH blago povećale sa vremenom, statistička analiza je pokazala da nakon 30 dana čuvanja nema značajne razlike između LH vrednosti uzoraka čuvanih na različitim temperaturama (Slika 4.29.), a nije bilo ni značajnih razlika TBARS vrednosti uzoraka čuvanih na 25°C i 40°C (Slika 4.31.). Čak i u slučaju formulacije bez antioksidansa (PG F1), LH i TBARS vrednosti ostale su u prihvatljivim granicama, što je pokazalo da je sloj poliglicerilskih surfaktanata odigrao ključnu ulogu u zaštiti ulja maline unutar kapi nanoemulzija. Na Slici 4.27a. prikazana je transformacija PG F1 u dvofazni sistem na 40°C, pri čemu je RO₂ ulje bilo locirano u gornjem sloju (koncentrovana nanoemulzija je bila žute boje), dok je ostatak vodene faze bio u donjem sloju. Prema tome, ova transformacija je mogla imati bitnu ulogu u stabilizaciji RO₂, na primer, odvajanjem RO₂ od prooksidanata u vodenoj fazi nanoemulzije ili usled debljeg sloja surfaktanata u međusloju ulje-voda, ali bi ovu hipotezu trebalo detaljnije istražiti. Što se tiče testiranih antioksidanasa, BHT, EDTA i ORE pokazali su sličan pozitivan efekat na oksidativnu stabilnost PG NEs, dok je FE ekstrakt bio najmanje efikasan. Interesantno je bilo i otkriće da je ORE bio efikasan antioksidans za oba tipa nanoemulzija, iako je u slučaju čistog RO₂ očigledno delovao destabilišuće, kao prooksidant. Prema tome, P80 NEs i PG NEs su stabilizovale ORE i očuvale njegovu antioksidativnu aktivnost, što je bilo u skladu sa trenutnim saznanjima da su nanoemulzije veoma prospektivni nosači za etarska ulja (Chang i Mc Clements., 2014; Lou i sar., 2017; Rocha-Filho i sar., 2014).

Treba istaći da su PG NEs imale 4 puta manju prosečnu veličinu kapi u poređenju sa P80 NEs (~45 nm vs. ~210 nm), ali uprkos većoj površini međusloja ulje-vode nije došlo do povećanja nestabilnosti, naprotiv. I u drugim studijama je apostrofirana činjenica da se veličina kapi ne može uzeti kao jedini faktor koji utiče na oksidativnu stabilnost nanoemulzija, imajući u vidu njihov kompleksan sastav i moguće interakcije među sastojcima, kao što su komponente masne faze i antioksidansi (Guo i sar., 2021; Kampa i sar., 2022; Rehman i sar., 2020). Smeša poliglicerilskih estara korišćena u ovoj doktorskoj disertaciji bila je sačinjena od poligliceril-4 laurata (kao glavnog surfaktanta), poligliceril-6 kaprilata, poligliceril-3 kokoata, poligliceril-4 kaprata i poligliceril-6 ricinoleata. Prema tome, može se pretpostaviti da je ovaj kompleksan sastav smeše poliglicerilskih estara doprineo kompaktnom pakovanju sloja surfaktanta i poboljšanju barijere na granici faza ulje-voda, u poređenju sa polisorbitom 80 (polioksietilen-20 sorbitan monolaurat) kao surfaktantom male molekulske mase (Marhamati i sar., 2021). Ovaj sloj poliglicerilskih surfaktanata verovatno je donekle ograničio efekte testiranih antioksidanasa na međusloju ulje-voda; prema tome, njihova uloga je bila manje izražena od zaštitne uloge poliglicerilskih surfaktanata (Weigel i sar., 2018). U svakom slučaju, dalja istraživanja su neophodna kako bi se potvrdile ove hipoteze, s obzirom da nisu nađene druge studije koja su se bavile oksidativnom stabilnošću nanoemulzija na bazi poliglicerilskih estara.

4.4. Rezultati i diskusija četvrte faze eksperimentalnog rada

4.4.1. *In vitro* procena sposobnosti za ostvarivanje bioloških efekata prirodnih sirovina i nanoemulzija

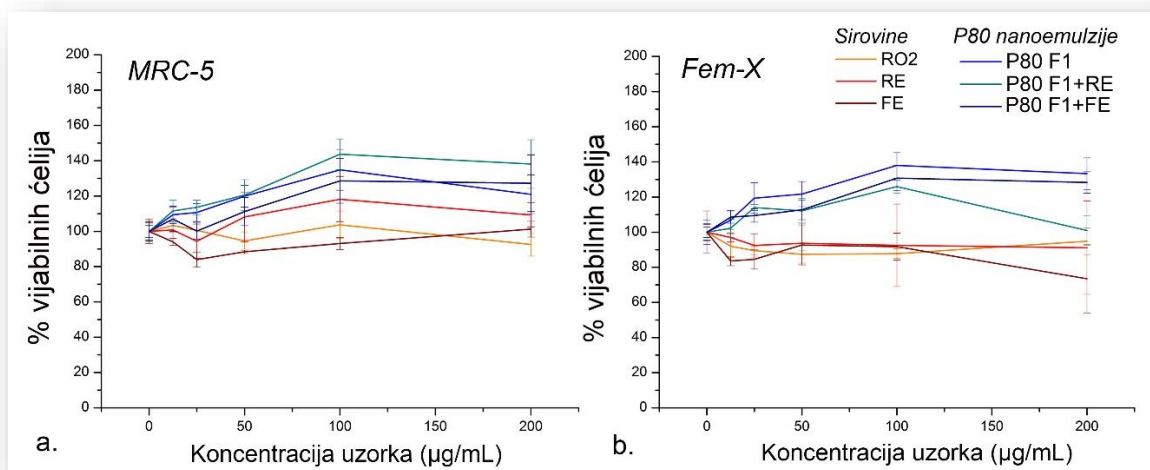
4.4.1.1. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti – MTT test

P80 nanoemulzije i prirodne sirovine (RO2, RE i FE)

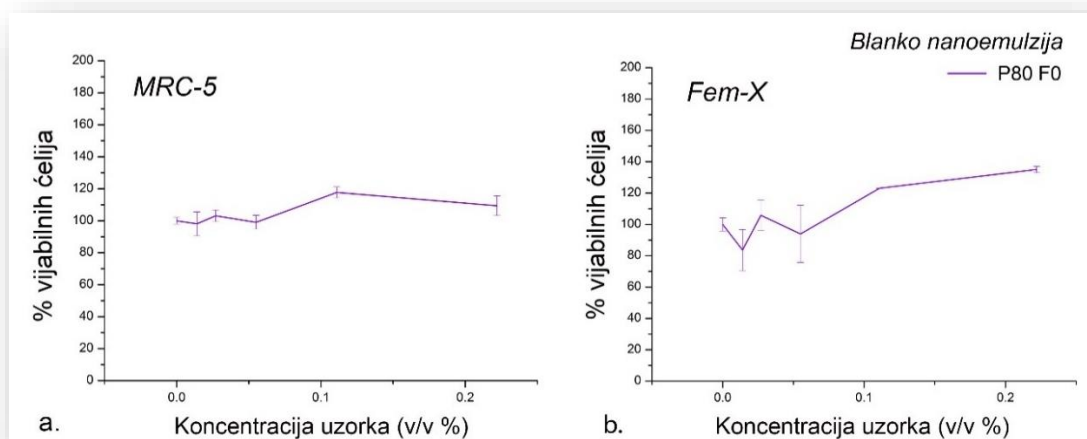
In vitro ispitivanje citotoksičnosti (MTT test) sprovedeno je u cilju procene bioloških efekata prirodnih sirovina – ulja semena maline RO2 i hidroglikolnih ekstrakata RE i FE, kao i uzoraka optimalnih P80 NEs, pripremljenih bez ili sa navedenim prirodnim sirovinama (sastav - *Tabela 3.2.*). Kao standardna ćelijska linija za ispitivanje bezbednosti, korišćeni su normalni fibroblasti pluća (MRC-5), s obzirom da su u pitanju ćelije slične fibroblastima dermisa ljudske kože. Kako bi se procenila citotoksičnost pomenutih uzoraka, izabrane su ćelije malignog melanoma (Fem-X), imajući u vidu potencijalnu primenu ovih nanoemulzija na koži, npr. u prevenciji štetnih efekata sunčevog zračenja.

MTT test sproveden je na osnovu sličnih ispitivanja prirodnih sirovina u nanoformulacijama (Nikolic i sar., 2018), kao i na osnovu standardne procedure (Mosmann i sar., 1983). U cilju određivanja IC50 vrednosti (koncentracija uzorka koja je smanjila ćelijsku vijabilnost za 50%), sirovine su testirane u različitim koncentracijama, a nanoemulzije su testirane u odgovarajućem razblaženju (tako da koncentracija sirovina u razblaženim nanoemulzijama odgovara koncentraciji čistih sirovina).

Kao što je prikazano na *Slici 4.32.*, testirane prirodne sirovine (RO2, RE i FE) nisu pokazale efekat na normalnim fibroblastima *per se*, kao ni u obliku nanoemulzija (formulacije - P80 F1, P80 F1+RE, i P80+FE). Fem-X ćelije takođe nisu bile osetljive na testirane sirovine i P80 NEs (IC50 > 200 µg/mL), odnosno, nije došlo do značajnog pada u broju metabolički aktivnih ćelija u koncentracionom opsegu od 12,5 do 200 µg/mL (računato na koncentraciju ulja RO2 *per se* ili u nanoemulziji). Blanko nanoemulzija P80 F0 takođe nije pokazala aktivnost (*Slika 4.33.*).



Slika 4.32. Rezultati MTT testa – % vijabilnih ćelija (MRC-5 i Fem-X ćelijske linije) u funkciji koncentracije uzorka sirovina (RO2, RE i FE) i odgovarajućih razblaženja P80 nanoemulzija sa aktivnim sastojcima (P80 F1, P80 F1+RE, P80 F1+FE);
n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija



Slika 4.33. Rezultati MTT testa – % vijabilnih ćelija (MRC-5 i Fem-X) u funkciji koncentracije blanko P80 nanoemulzije bez aktivnih sastojaka (P80 F0); $n=3$, srednja vrednost \pm standardna devijacija

PG nanoemulzije i prirodne sirovine (RO2, RF, RE i FE)

Prirodne sirovine RO2, RF, RE i FE i optimizovane formulacije nanoemulzija na bazi poliglicerilskih estara sa ovim sirovinama (PG NEs, *Tabela 3.3.*) ispitane su u pogledu njihovog citotoksičnog efekta i eventualne selektivnosti prema ćelijama malignog melanoma (Fem-X), u poređenju sa zdravim humanim keratinocitima (HaCaT). U odnosu na prethodno ispitivanje sirovina i P80 NEs, u ovom setu ispitivanja povećana je koncentracija uzoraka sirovina do 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (uz razblaženje nanoemulzija tako da se podudaraju sa koncentracijama aktivnih sastojaka). Međutim, ponovo je pokazano da ni jedna od prirodnih sirovina nije ispoljila efekat na testiranim ćelijskim linijama ($\text{IC}_{50} > 400 \mu\text{g}/\text{mL}$, *Slika 4.34.*). Iznenadjuća je bila činjenica da FE ekstrakt nije pokazao aktivnost ni prema jednoj od ćelijskih linija, uprkos izrazitoj antioksidativnoj aktivnosti koju je pokazao putem DPPH i ABTS testa, kao i drastičnom povećanju antioksidativne aktivnosti i oksidativne stabilnosti P80 i PG nanoemulzija sa FE u vodenoj fazi.

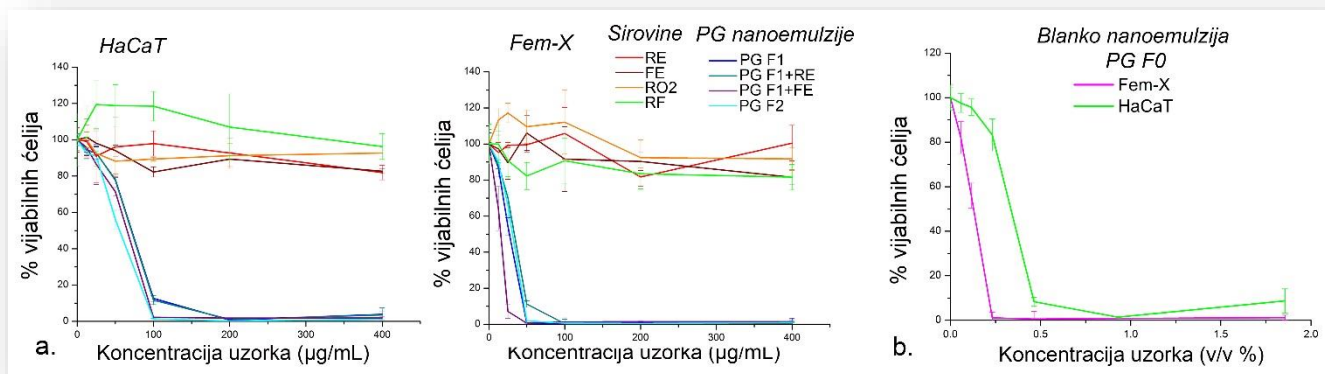
Sa druge strane, odgovarajuće PG NEs imale su izrazit citotoksični efekat na Fem-X ćelije ($\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g}/\text{mL}$), što je bilo u potpunoj suprotnosti u poređenju sa P80 NEs ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g}/\text{mL}$). S obzirom da su za HaCaT ćelije dobijene mnogo veće IC_{50} vrednosti ($\text{IC}_{50} \sim 51$ do $164 \mu\text{g}/\text{mL}$) (*Tabela 4.17.*, *Slika 4.34.*), potvrđena je selektivna citotoksičnost testiranih nanoemulzija prema malignim Fem-X ćelijama, koje su dalje izražene kao SI indeksi i SI skorovi, kao što je prethodno opisano (Francielli de Oliveira, 2015; Siti Syarifah i sar., 2015). Najveći SI skor (SI skor 3) imala je formulacija PG F1 sa uljem maline RO2, bez dodatih hidroglikolnih ekstrakata RE/FE, čime je pokazano da je ulje maline RO2 u nanoemulziji zapravo glavni aktivni sastojak odgovoran za ovakav efekat. Dodatak RE, FE ili parfemskog ulja maline RF (označenog i kao kosurfaktant 2 u formulacionim studijama PG NEs) povećao je antiproliferativni efekat prema zdravim ćelijama kože, te su ove formulacije bile klasifikovane kao umereno selektivne (SI skor 2). Blanko nanoemulzija (PG F0) takođe je imala SI skor 2, što je moguće bila posledica prisustva kosurfaktanta 1 (fenoksietanol, etilheksilglicerin) u njenom sastavu (kao i kod PG F1 aktivnih formulacija). Pored toga, na ovakav rezultat je mogla da utiče i relativno visoka koncentracija uzorka, s obzirom da je poznato da surfaktanti iz nanoemulzija mogu da indukuju toksične efekte na ćelijama usled solubilizacije (Vater i sar., 2019), bez obzira što se generalno smatraju biokompatibilnim.

Tabela 4.17. Rezultati MTT testa na HaCaT i Fem-X ćelijama: IC50 vrednosti, indeksi selektivnosti i SI skorovi PG nanoemulzija (NE sa uljem semena maline RO2- PG F1) i PG NEs sa RO2 i ekstraktima – RE (PG F1+RE) ili FE (P80 F1+FE), ili parfemskim uljem maline – RF (PG F2).

Naziv uzorka	Fem-X IC50 (µg/mL)	HaCaT IC50 (µg/mL)	SI indeks*	SI skor**
PG F1	31,41 ± 8,75	164,16 ± 34,57	5,23	3
PG F1+RE	28,99 ± 4,99	93,79 ± 42,55	3,24	2
PG F1+ FE	25,06 ± 6,58	65,06 ± 8,14	2,60	2
PG F2	29,41 ± 2,52	51,05 ± 6,41	1,74	2

*SI indeks = Indeks selektivnosti predstavlja količnik IC50 vrednosti uzorka na HaCaT (normalnim ćelijama) prema Fem-X (tumorskim ćelijama)

**SI skor: skor 1 (neselektivno) = $SI \leq 1$, skor 2 (umereno selektivno) = $1 < SI < 5$, skor 3 (selektivno) = $SI \geq 5$.



Slika 4.34. Rezultati MTT testa – % vijabilnih ćelija (HaCaT i Fem-X ćelijske linije) u funkciji koncentracije uzoraka: a. sirovina (RO2, RF, hidroglikolni ekstrakt RE ili FE) i PG nanoemulzija sa aktivnim sastojcima (PG F1, PG F1+RE, PG F1+FE, PG F2) i b. blanko PG nanoemulzije bez aktivnih sastojaka (PG F0); n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija

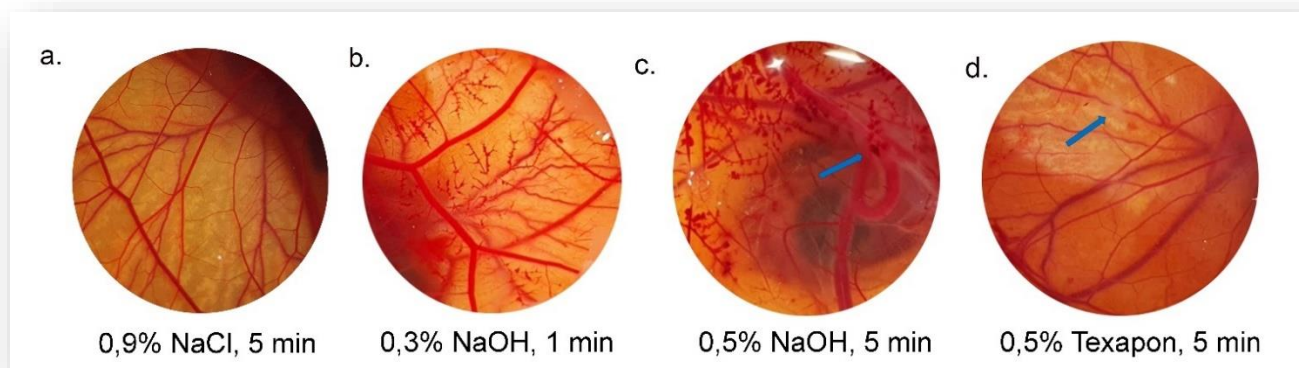
Treba napomenuti da nije bilo moguće uporediti dobijene rezultate, budući da nije bilo dostupnih podataka u literaturi za pomenute ćelijske linije, ali jeste dokazano da brojni ekstrakti maline inhibiraju ćelije raka dojke i raka želuca pri IC50 koncentraciji od 250 µg/mL (Bowen-Forbes i sar., 2010), odnosno 103 µg/mL za adenokarcinom debelog creva (Jeong i sar., 2010). Ipak, dobijeni rezultati potvrđuju pretpostavku da se aktivnost prirodnih sirovina može poboljšati upotrebom nanoemulzionih nosača, što je ujedno jedan od najvećih razloga za njihovu upotrebu (Bernardi i sar., 2011; Moghaddasi i sar., 2018). Ovakvo ponašanje jasno je pokazano u slučaju nanoemulzija na bazi poliglicerilskih estara, s obzirom da je postignut značajan efekat na Fem-X ćelijskim linijama koji nije bio zapažen kada je korišćen polisorbitat 80. Zapažene razlike u efektima verovatno su posledica značajne razlike u prosečnoj veličini kapi dve vrste nanoemulzija, imajući u vidu da su PG NEs imale i po 2-3 puta manji prosečan dijametar kapi od P80 NEs (Tabela 4.3. i Tabela 4.8.).

Prema literaturi (Siti Syarifah i sar., 2011; Vater i sar., 2019), vrednost IC50 < 30 µg/mL za testirani biljni materijal se smatra obećavajućim antikancerogenim agensom, te bi se moglo zaključiti da RO2 ulje maline može biti dobar kandidat za dalji razvoj formulacija, ali samo u obliku nanoemulzija. Ipak, dobijene rezultate treba smatrati preliminarnim, s obzirom da 2D model ćelijskih kultura koji je korišćen tokom ovih ispitivanja ima određena ograničenja i nije prava replika prirodnog tkiva te ne može imitirati interakcije ćelijskog i vanćelijskog okruženja u potpunosti (Kapalczyńska i sar., 2018).

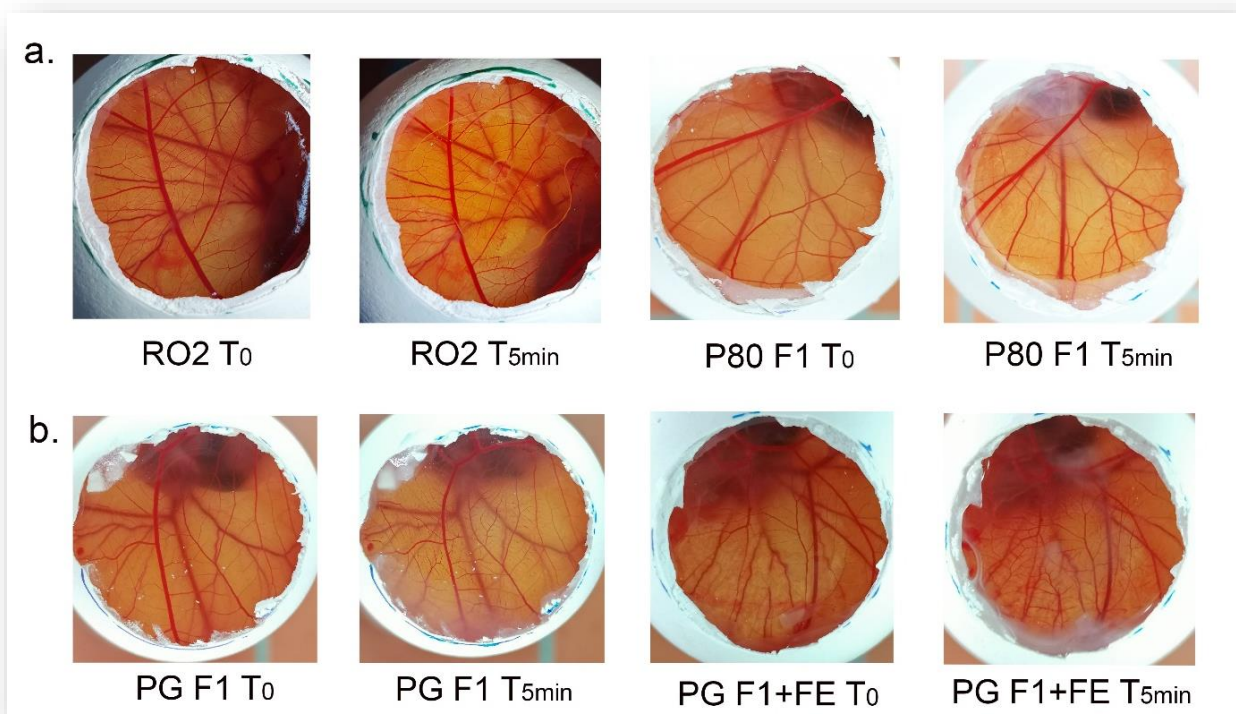
4.4.1.2. *In vitro* procena okularne iritacije – HET CAM test

Horioalantoinska membrana – CAM je dobro prokrvljena, neinervisana membrana pilećeg embriona koja predstavlja potpuno funkcionalno tkivo (sadrži vene, arterije i kapilare), zbog čega se koristi u okviru standardnih protokola za procenu okularne iritacije do koje može doći prilikom primene kozmetičkih proizvoda oko očiju. Naime, CAM oponaša promene koje se javljaju na krvnim sudovima oka pri kontaktu sa određenim hemijskim agensom, kao organotipski model konjunktivalnog odgovora. HET CAM test je brz, jednostavan i osetljiv test, koji predstavlja graničnu metodu između *in vitro* i *in vivo* ispitivanja potencijala za okularnu iritaciju (Ribatti 2016; Rocha-Filho i sar., 2017). U svim protokolima test traje 5 minuta (tj. 300 sekundi), bilo da je testirana supstanca sve vreme u kontaktu sa CAM ili se ispira nakon 20 sekundi, a kao krajnje tačke testa u većini studija navode se: hemoragija (krvarenje iz krvnih sudova), vaskularna liza (raspadanje krvnih sudova) i koagulacija (intra- i ekstravaskularna denaturacija proteina). U slučaju testiranja blažih iritanasa, kao krajnje tačke testa uzimaju se fenomeni slabijeg intenziteta: pojava hiperemije (pojačana vidljivost vaskularne mreže), vazokonstrikcija (suženje promera krvnih sudova) ili blaga hemoragija (DB-ALM Method Summary N° 96).

Analizom vizuelnog izgleda CAM nakon aplikacije negativne kontrole i standardnih iritanasa (Slika 4.35.), u poređenju sa testiranim uzorcima (Slika 4.36.) u periodu od 5 minuta, zaključeno je da ni jedan od uzoraka sirovina i nanoemulzija u prvih 30 sekundi testa ne pokazuje znake hemoragije ili koagulacije, kao fenomena koji ukazuju na veći iritacioni potencijal.



Slika 4.35. Vizuelni izgled horioalantoinske membrane – CAM u kontaktu sa test supstancama tokom validacije metode: a. 0,9% natrijum-hlorid – nema iritacije, b. 0,3% natrijum-hidroksid – hiperemija i hemoragija (nakon 1 minut); c. 0,5% natrijum-hidroksid – koagulacija i hemoragija (nakon 5 minuta); d. 0,5 % Texapon ASV standard– liza krvnog suda (nakon 5 minuta).



Slika 4.36. Vizuelni izgled reprezentativnih uzoraka tokom HET-CAM testa: a. uzorci klasifikovani kao neiritansi (ulje semena maline RO2) ili blagi iritansi (npr. P80 F1 nanoemulzija); b. uzorci klasifikovani kao umereni iritansi (npr. PG F1 i PG F1+FE).

Bodovanje i klasifikacija ulja semena maline RO2 i nanoemulzija na bazi polisorbata 80 ili poliglicerilskih estara (P80 ili PG NEs) sprovedeno je prema prethodno opisanoj metodologiji (Luepke i sar., 1986; Rocha-Filho i sar., 2017), a rezultati HET-CAM testa prikazani su u Tabeli 4.18.

Tabela 4.18. Rezultati HET-CAM testa prema Luepke sistemu bodovanja i klasifikacije (Luepke 1986)

Naziv uzorka	Vreme				
	Hiperemija	Hemoragija	Koagulacija	Skor	Klasifikacija
Ulje semena maline - RO2	/	/	/	0	Nije iritans
P80 F0	$30\text{ s} < T \leq 2\text{ min}$	/	/	3	Blagi iritans
P80 F1	$30\text{ s} < T \leq 2\text{ min}$	/	/	3	Blagi iritans
P80 F1+RE	$30\text{ s} < T \leq 2\text{ min}$	/	/	3	Blagi iritans
P80 F1+FE	$30\text{ s} < T \leq 2\text{ min}$	$2\text{ min} < T \leq 5\text{min}$	/	6	Umereni iritans
PG F0	$30\text{ s} < T \leq 2\text{ min}$	$2\text{ min} < T \leq 5\text{min}$	/	6	Umereni iritans
PG F1	$30\text{ s} < T \leq 2\text{ min}$	$2\text{ min} < T \leq 5\text{min}$	/	6	Umereni iritans
PG F1+RE	$30\text{ s} < T \leq 2\text{ min}$	$2\text{ min} < T \leq 5\text{min}$	/	6	Umereni iritans
PG F1+FE	$T \leq 30\text{ s}$	$2\text{ min} < T \leq 5\text{min}$	/	8	Umereni iritans

Dobijeni rezultati potvrdili su da ulje semena maline RO2 praktično ne izaziva iritaciju, s obzirom da je kao lipofilna supstanca ostalo na površini CAM i nije imalo efekat na krvne sudove (*Slika 4.36a*). Sa druge strane, testirane U/V nanoemulzije izazivale su reakciju različitog intenziteta na krvnim sudovima, pri čemu su P80 NEs bile klasifikovane kao blagi iritansi, a PG NEs kao umereni iritansi (*Slika 4.36b*). Prema tome, moguće je da je tip surfaktanta imao ulogu u ovim zapaženim razlikama, ili velika razlika u prosečnoj veličini kapi P80 NEs i PG NEs, s obzirom da je tokom formulacionih studija zapaženo da su PG NEs imale i po 3-4 puta manju vrednost Z-ave (*Tabela 4.3.*, *Tabela 4.4.* i *Tabela 4.14.*).

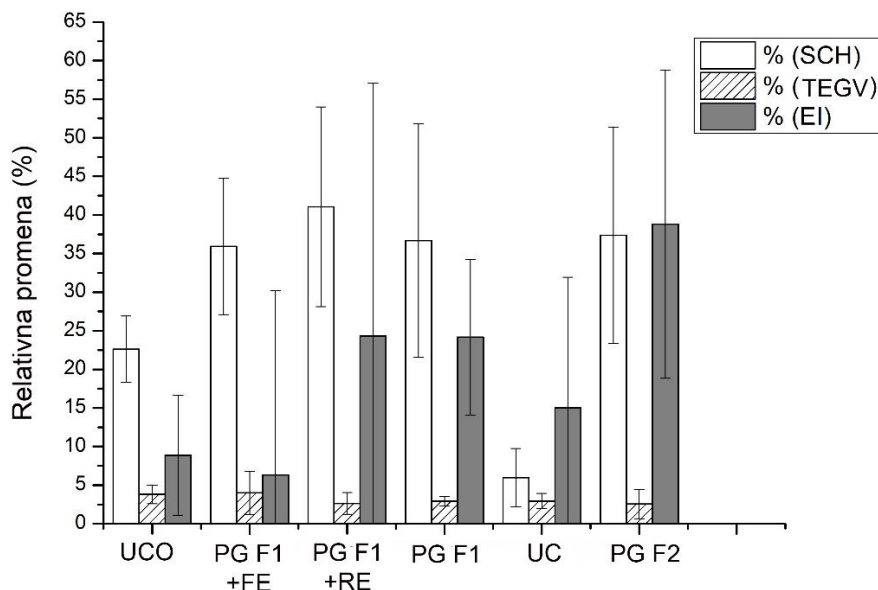
Generalno, ovakvi rezultati nisu bili preterano iznenađujući, imajući u vidu da obe vrste testiranih nanoemulzija sadrže 10% surfaktanta. To je relativno visoka koncentracija, ali je karakteristična za niskoenergetske nanoemulzije, a poznato je da su u kozmetičkim formulacijama surfaktanti među prvim supstancama po potencijalu za izazivanje iritacije (Rocha-Filho i sar., 2017). U prilog ovim tvrdnjama treba istaći da su blanko nanoemulzije i nanoemulzije sa uljem RO2, bez ili sa ekstraktom RE pokazale veoma slične iritacione skorove, pri čemu je zapaženo da su nanoemulzije sa ekstraktom FE imale nešto veći skor, ali i dalje u granicama umerenih iritanasa. S obzirom da su sve testirane nanoemulzije pokazale potencijal za okularnu iritaciju, može se zaključiti da nisu pogodne za primenu u predelu oka.

4.4.2. *In vivo* procena kompatibilnosti sa kožom i efikasnosti PG NEs

Uprkos rastućoj popularnosti prirodnih sastojaka u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, njihovo poreklo ne sme da se tumači kao bezuslovni dokaz bezbednosti i efikasnosti (Le Guenic i sar., 2015). Poliglicerilski estri korišćeni u ovoj studiji su prirodnog porekla i smatra se da su biokompatibilni, međutim, s obzirom na njihov relativno visok sadržaj u nanoemulzijama (10%), kao i na prisusvo kosurfaktanata (*Tabela 3.3.*), neohodno je bilo proceniti njihov iritacioni potencijal (Savic i sar., 2017). Dodatni razlog bila je činjenica da nisu pronađeni rezultati *in vivo* studija rađeni sa nanoemulzijama na bazi poliglicerilskih estara, a nađeno je svega nekoliko *in vivo* studija koje su se bavile biljnim uljima u nanonosaićima (Bernardi i sar., 2011; Pereira i sar., 2016; Rocha-Filho i sar., 2017). Prema tome, cilj je bio da se sprovede *in vivo* studija procene kompatibilnosti sa kožom i efikasnosti PG NEs na humanim dobrovoljcima kako bi se obezbedile bitne informacije vezano za njihovu potencijalnu primenu na koži. P80 NEs nisu ispitivane, imajući u vidu da postoji dovoljno podataka *in vivo* studija relativno sličnih nanoformulacija na bazi P80 u literaturi (Nikolic i sar., 2018; Savic i sar., 2017).

***In vivo* procena kompatibilnosti sa kožom PG NEs**

In vivo potencijal za iritaciju kože, odnosno kompatibilnost formulacija sa kožom najčešće se procenjuje analizom nekoliko parametara koji su relevantni pokazatelji zdravlja i funkcije kože, kao što su: stepen hidratisanosti *stratum corneum*-a (SCH), transepidermalni gubitak vode (TEGV) i eritema indeks (EI). Test se najčešće izvodi na humanim dobrovoljcima sa zdravom kožom, tako što se testirana formulacija nanese jednokratno, a potom se tretirano mesto stavi pod dvadesetčetvoročasovnu okluziju, kao što je prethodno opisano (Nešić i sar., 2019). Promene vrednosti parametara SCH, TEGV i EI izmerenih drugog dana u odnosu na prvi dan (tj. bazalne vrednosti), iskorišćene su za procenu bezbednosnog profila uzoraka PG NEs kozmetičkih formulacija. Rezultati prikazani na *Slici 4.37.* potvrdili su dobar bezbednosni profil svih testiranih uzoraka PG NEs, s obzirom da nisu primećeni znaci iritacije kože, kao ni značajno povećanje parametara EI ili TEGV, a takođe nije zapaženo ni značajno smanjenje SCH, imajući u vidu da pomenute promene ukazuju na oštećenje barijerne funkcije kože (Pinagoda i sar., 1990).

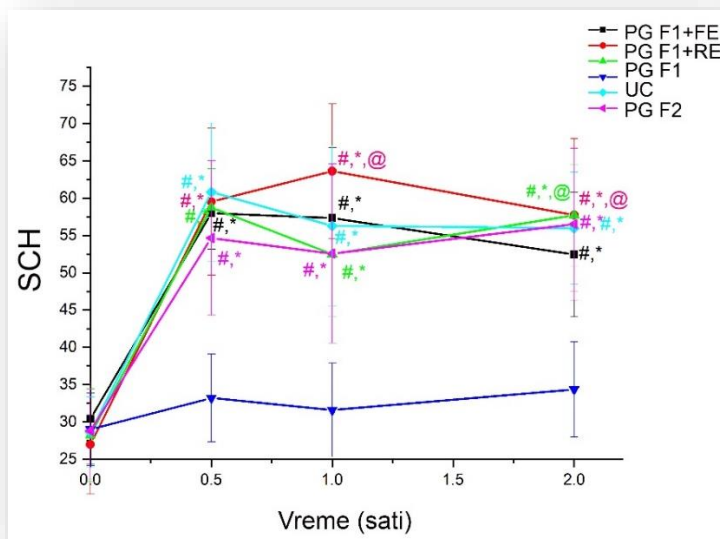


Slika 4.37. Rezultati *in vivo* studije procene kompatibilnosti sa kožom PG nanoemulzija predstavljeni su kao relativna promena (%) parametara EI, SCH i TEGV u odnosu na bazalne vrednosti; UCO-kontrola pod okluzijom, UC-kontrola bez okluzije; $n=3$, srednja vrednost \pm standardna devijacija

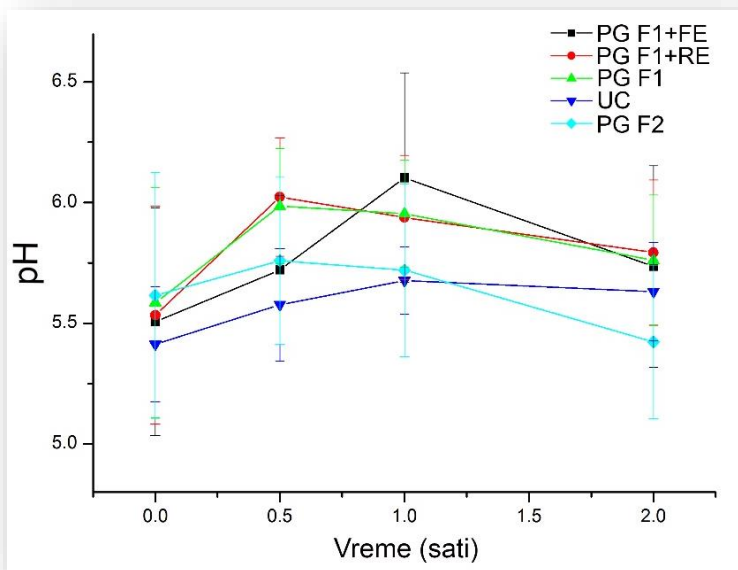
***In vivo* procena efikasnosti PG NEs**

Hidratacija kože je veoma važno pitanje koje se mora razmotriti prilikom razvoja novih proizvoda za primenu na koži. Optimalna hidratacija kože ogleda se kroz prijatan vizuelan izgled (npr. glatkoću), koja ukazuje na dobro zdravlje kože, a utiče i na permeabilnost kože prilikom topikalne primene lekova i dermokozmetičkih preparata (Pereira i sar., 2016).

Prema tome, kratkotrajna *in vivo* studija efikasnosti sprovedena je kako bi se stekao uvid u sadržaj vode *stratum corneum*-a nakon jednokratne aplikacije PG NEs bez okluzije. Pokazano je da je aplikacija svakog uzorka PG NE rezultirala značajnim povećanjem hidratisanosti kože (SCH povećanje 0,5, 1 i 2 h nakon primene), u poređenju sa netretiranom kontrolom i bazalnim vrednostima. Dakle, iako su svi testirani uzorci bili efikasni, nakon 2 h primene najefikasniji su bili uzorci PG F1 i PG F1+RE, zatim PG F2, i na kraju PG F1+FE (Slika 4.38.). Takođe, pokazano je da se pH vrednost kože nije značajno promenila tokom dva sata nakon aplikacije nanoemulzija (Slika 4.39.), što je ukazivalo na dobru kompatibilnost formulacija sa kožom (Bernardi i sar., 2011; Pereira i sar., 2016). Takođe, nije bilo značajnih razlika između pojedinih uzoraka PG NEs u pogledu očuvanja normalne pH vrednosti kože.



Slika 4.38. Efekat topikalne primene PG NEs na SCH tokom kratkotrajne studije. Značajne razlike ($p < 0,05$) su označene sa (#) – razlika u odnosu na netretiranu kontrolu (UC), sa (*) za razliku u odnosu na bazalnu vrednost i sa (@) za razliku u odnosu na ostale uzorke; $n=3$, srednja vrednost \pm standardna devijacija



Slika 4.39. Efekat topikalne primene PG NEs na pH vrednost kože u funkciji vremena (sati) nakon aplikacije nanoemulzija (kratkotrajna studija); $n=3$, srednja vrednost \pm standardna devijacija

5. ZAKLJUČAK

5.1. Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

Imajući u vidu povećanu potražnju za kozmetičkim proizvodima sa prirodnim sastojcima, u prvoj fazi detaljno je ispitana mogućnost razvoja formulacija nanoemulzija sa uljem semena maline i polisorbatom 80, kao tradicionalno korišćenim surfaktantom pogodnim za razne vrste nanosistema. Nanoemulzije su izrađene upotrebom niskoenergetske metode inverzije faza usled promene sastava (engl. *phase inversion composition method*, skraćeno PIC). PIC metoda je izvedena na sobnoj temperaturi, što se smatra optimalnim pristupom za tretman prirodnih i osetljivih aktivnih sastojaka, ali i iz ekoloških i ekonomskih razloga.

Prva faza započela je detaljnim ispitivanjem faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu polisorbit 80/ ulje semena maline – RO/ voda, a testirana su 4 različita ulja: hladno ceđena (iz standardne agrikulture, rafinisano – RO1 ili organsko, nerafinisano – RO2) i CO₂-ekstrahovana (iz standardne agrikulture, nerafinisano – RO3 ili organsko, nerafinisano – RO4). PIC metoda podrazumevala je titraciju smeša surfaktant/ ulje pripremljenih u različitom odnosu (npr. 50:50, 60:40, 70:30) vodenom fazom, uz lagano mešanje bez zagrevanja. Pokazano je da fazno ponašanje dominantno zavisi od odnosa surfaktanta prema ulju (engl. *surfactant-to-oil ratio* – SOR) i sadržaja vode, pri čemu sistem surfaktant-ulje-voda (engl. *surfactant-oil-water* – SOW) mora proći kroz karakterističnu gel fazu (pri sadržaju vode oko 40–50%), kako bi nastale nanoemulzije sa polisorbatom 80 (P80 NEs).

Značajno otkriće bilo je da nanoemulzije mogu da se dobiju korišćenjem sva 4 testirana RO, u jednostavnom trokomponentnom sistemu (P80/RO/H₂O), ali su primećene značajne razlike u vrednostima prosečnog dijametra kapi (*Z-ave*) i distribuciji veličina kapi (izraženih kao PDI), kao i organoleptičkim karakteristikama nanoemulzija (boja). Zaključeno je da je minimalna koncentracija surfaktanta koja je potrebna za nastanak nanoemulzija 10% (tj. *surfactant-to-emulsion ratio* – SER bio je 10), dok je minimalna vrednost odnosa surfaktanta prema ulju iznosila 1 (*surfactant-to-oil ratio* – SOR =1). Osnovne formulacije P80 NEs bile su sledećeg sastava: P80 - 10%, ulje semena maline (RO1–RO4) - 10% i voda - 80%, a imale su raspon prosečnih veličina kapi (*Z-ave*) od ~ 136 do ~163 nm i indeksa polidisperznosti (PDI) od ~ 0,07 do ~ 0,12. Dodatno, utvrđeno je da P80 NEs sa pojedinim uljima ubrzo pokazuju znake nestabilnosti (npr. pojava agregata kod P80-RO4 NE), što je pokazalo da je vrsta ulja značajno uticala na preliminarnu stabilnost P80 NEs.

Kao zaključak studije optimizacije masne faze P80 NEs ističe se kompatibilnost oba testirana aditiva (tokoferil acetat – TA i izosteatil izostearat – ISIS), samostalno ili u kombinaciji, sa svim testiranim uljima semena maline (RO1– RO4). Međutim, odnos komponenata masne faze se morao prilagođavati za svako ulje semena maline, pri čemu je P80 NE sa uljem RO2 ponovo imala najmanju veličinu kapi u odnosu na P80 NEs sa ostalim vrstama RO (*Z-ave* ~131 nm, za odnos RO:ISIS:TA - 4,5:4,5:1).

Kao zaključak studije optimizacije vodene faze P80 NEs pokazano je da je optimalna koncentracija glicerola iznosila 8%, a moguć je bio i dodatak do 4% hidroglikolnih ekstrakata ploda maline – RE ili hrasta kitnjaka – FE, umesto glicerola (računato na ukupnu masu NE). Veće koncentracije hidrofilnih aditiva od navedenih uticale su negativno na formiranje prelaznih gel faza identifikovanih tokom nastanka P80 NEs.

Sveukupni zaključak preformulacione studije bio je da su P80 NEs pripremljene sa RO2 i lipofilnim i/ili hidrofilnim aditivima imale najmanje veličine kapi (*Z-ave*: ~122 do 145 nm) i najniže PDI vrednosti (PDI ≤ 0,1) u odnosu na ostala testirana ulja, kao i najbolju preliminarnu stabilnost nakon mesec dana čuvanja na sobnoj temperaturi. Tehnika Ramanske spektroskopije primenjena je u cilju detekcije razlika

u sastavu ulja RO1–RO4, kao i interakcija među sastojcima nanoemulzija koje su mogle uticati na različite karakteristike formiranih P80 NEs. Ramanski spektri ulja RO1–RO4 pokazali su da postoje fine razlike u profilu masnih kiselina, dok je kod RO2 i RO4 detektovano i prisustvo karotenoida. Interesantno je bilo otkriće da je ulje RO2 stupalo u interakciju sa molekulima P80 i glicerola u vodenoj sredini, što je rezultiralo formiranjem P80-RO2 NE sa najmanjom veličinom kapi i najboljom preliminarnom stabilnošću u odnosu na ostala ulja maline.

Kao ishod opsežnih preformulacionih istraživanja izvršen je konačan odabir optimalnog ulja semena maline – RO2 (hladno ceđeno, nerafinisano ulje iz organske proizvodnje) za dalji eksperimentalni rad i detaljna formulaciona istraživanja. U cilju sticanja detaljnijeg uvida u mehanizam nastanka i stabilnost P80 NEs sa uljem RO2 upotrebom PIC metode, sprovedena je detaljna karakterizacija ključnih gel faza (sa 30% vodene faze) i odgovarajućih nanoemulzija (sa 80% vodene faze). Naime, kombinacija mikroskopske analize, merenja električne provodljivosti, reološke i teksturne analize, pokazala je da je prelazna faza tečno-kristalne prirode (tj. izotropna, kubna gel faza), dok su finalne nanoemulzije bile mlečno-bele i tečne, sa Nenjutnovskim tipom proticanja.

Optimalne P80 NEs sa RO2 imale su prosečnu veličinu kapi od 122,3 do 134,8 nm, PDI od 0,054 do 0,086, što je bilo potvrđeno i mikroskopijom atomskih sila. Ove formulacije pokazale su i dobru preliminarnu stabilnost tokom 45 dana čuvanja na sobnoj temperaturi, budući da su izmerene vrednosti Z-ave, PDI, pH i provodljivosti bile neznatno promenjene, kao i da optičkom mikroskopijom nisu uočeni znaci nestabilnosti (npr. formiranje agregata).

5.2. Zaključak druge faze eksperimentalnog rada

Tokom druge faze eksperimentalnog rada u fokusu je bio razvoj poboljšanih formulacija niskoenergetskih nanoemulzija sa novijim prirodnim surfaktantima tipa poliglicerilskih estara, i što većim procentom prirodnih sastojaka (prototip prirodnog kozmetičkog proizvoda). Poligliceril-4 laurat (P4L) izabran je kao glavni surfaktant, na osnovu malobrojnih publikacija koje su pokazale da je pogodan za izradu nano- i mikroemulzija na sobnoj temperaturi. Iako je prvobitna zamisao bila da se P4L direktno zameni sa P80, nanoemulzije nisu mogle nastati u jednostavnom sistemu P4L/RO2/voda. Takođe, nije bilo moguće zameniti P80 sa P4L u optimizovanim formulacijama P80 NEs, čak ni uz povećanje SOR i SER ($SOR \geq 1$ i $SER \geq 10$). Prema tome, moralo se pristupiti optimizaciji formulacija poliglicerilskih nanoemulzija *de novo*.

Ustanovljeno je da ISIS nije odgovarajuće noseće ulje za PG NEs, te je odabran novi emolijens sertifikovan za prirodnu kozmetiku – etilheksil pelargonat (EP). Međutim, nanoemulzije su nastale tek uz uvođenje dodatnih surfaktanata iz grupe poliglicerilskih estara. Optimalna smeša poliglicerilskih surfaktanata pripremljena je od: glavnog surfaktanta – P4L i komercijalno dostupne smeše – TS (poligliceril-6 kaprilat, poligliceril-3 kokoat, poligliceril-4 kaprat, poligliceril-6 ricinoleat, u odnosu 1:1:1:1). Tokom ispitivanja faznog ponašanja smeše poliglicerilskih estara, utvrđen je optimalan odnos P4L: TS (1:1), minimalan SOR bio je 1 i SER 10 (što je bila sličnost sa P80 NEs). Dobijena osnovna formulacija, blanko nanoemulzija - PG Fb (P4L: TS - 10%, EP - 10%, voda - 80%) imala je prosečnu veličinu kapi Z-ave ~187,2 nm i PDI ~0,35. Veće vrednosti SOR i SER vodile su ka dodatnom povećanju veličine kapi nanoemulzija, i/ili povećanju PDI, kao i formiraju dvofaznih Winsor sistema, te su za dalju optimizaciju PG NEs korišćeni minimalni SOR i SER odnosi (1 i 10, redom).

U cilju smanjenja veličine kapi osnovne formulacije PG Fb testirano je nekoliko potencijalnih kosurfaktanata, dodavanjem u masnu fazu (EP). Nađeno je da dodatak 0,5% tečne smeše konzervanasa (fenoksietanol: etilheksilglicerin, u odnosu 90:10) – kosurfaktant 1 ili 2% parfemskog ulja maline –

kosurfaktant 2, dovode do drastičnog smanjenja veličine kapi PG NEs (Z-ave ~131,7 nm, PDI: ~ 0,22, i Z-ave ~ 88,6 nm, PDI: ~ 0,07, za kosurfaktant 1 ili 2, redom).

Što se tiče dodatka ulja maline, pokazano je da se može dodati svega 2% RO2 (od ukupnih 10% masne faze), i to isključivo uz dodatak poliola u vodenu fazu nanoemulzije, tačnije glicerola (optimalno 30% računato na vodenu fazu, odnosno, 24% računato na ukupnu masu nanoemulzije), nevezano za to koji kosurfaktant je bio upotrebljen. Na ovaj način dobijene su PG NEs sa uljem RO2 značajno manjih veličina kapi (< 70 nm, PDI < 0,1) i poboljšane stabilnosti u odnosu na blanko nanoemulziju PG Fb.

Dalje je ispitana i mogućnost dodatka prirodnih hidroglikolnih ekstrakata RE ili FE u PG NEs sa uljem semena maline RO2, slično kao kod uzoraka P80 NEs. Maksimalna koncentracija ekstrakta koja je dodata bila je 4% ekstrakata (u formulacije koje sadrže i glicerola 24%, računato na ukupnu masu nanoemulzije), ali isključivo nakon što je formirana nanoemulzija, tj. na kraju izrade, s obzirom da je zapaženo da sami ekstrakti ometaju PIC proces formiranja nanokapi ako se dodaju na početku titracije.

Tokom izrade pomenutih PG NEs pomoću PIC metode, u zavisnosti od SOW sastava, detektovana su dva različita nanoemulzifikaciona puta koja su potom detaljno rasvetljena. U prvom slučaju, primećene su transparentne izotropne tečne prelazne faze (do ~50% vodene faze), za SOW sisteme sa kosurfaktantom 1 i masnom fazom sačinjenom od EP i RO2, kao i za sisteme sa kosurfaktantom 2 i EP kao masnom fazom, bez RO2. Daljim razblaženjem ovih mikroemulzija, tj. kada je procenat vodene faze bio veći od 50% došlo je do inverzije faza, a finalne PG NEs sadržale su 80% vodene faze. Drugi nanoemulzifikacioni put primećen kod PG NEs sa kosurfaktantom 2 i RO2 u masnoj fazi, predstavljao je dvofazni sistem (mikroemulziju i produženu zamućenu tečnu fazu, sa uljanim slojem na vrhu, u oba slučajeva). Interesantno je bilo da je tranzicija u translucetnu U/V nanoemulziju nastupila kada je sadržaj vodene faze bio $\geq 74\%$, odnosno tek kada je solubilizovana kompletna masna faza.

U cilju razjašnjavanja mehanizma nastanka PG NEs, kao inovativnih sistema koji nisu dovoljno istraženi, sprovedena je detaljna karakterizacija ključnih prelaznih faza sa 30 i 50% vodene faze i odgovarajućih PG NEs sa 80% vodene faze. Istraživanja su uključivala: mikroskopsku analizu, merenje % transparentije, merenje električne provodljivosti i DSC analizu, kao i reološka merenja. Dobijeni rezultati potvrdili su da su tečne prelazne faze mikroemulzione strukture (izotropne, Njutnovske tečnosti). Finalne PG NEs bile su translucetne emulzije koje su takođe ispoljile Njutnovski tip proticanja (n-indeks ~1). AFM analizom otkrivena je tendencija PG NEs da formiraju agregate tokom procesa sušenja uzorka (pri razblaženju 1:100). Kada je razblaženje uzorka povećano na 1:1000, uočene su i ove strukture i pojedinačne kapi nanoemulzije sačuvane u osušenom ultra-tankom sloju uzorka. Individualne nanokapi bile su ovalnog oblika, veličina sličnih kao što je utvrđeno DLS metodom (PG F1 Z-ave ~ 58 nm, PG F2 Z-ave ~ 56 nm, za nanoemulzije sa RO2 i kosurfaktantom 1 ili kosurfaktantom 2, redom).

Kao ishod druge faze eksperimentalnog rada dobijene su optimizovane formulacije PG NEs koje su sadržale 2% RO2 ulja i kosurfaktant 1 - PG F1 (bez dodatka hidrofilnih aditiva) i PG F1+RE, PG F1+FE (sa dodatkom hidroglikolnih ekstrakata RE i FE, redom) ili kosurfaktant 2 (PG F2). Ove formulacije imale su veoma lep, polu-transparentan izgled uz karakterističan plavičasti odsjaj, usled veoma finih veličina kapi (Z-ave < 65 nm i PDI < 0,12), a od značaja je bila i činjenica da su ostale stabilne do tri meseca čuvanja na sobnoj temperaturi.

5.3. Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

Prvi deo treće faze eksperimentalnog rada bio je usmeren na određivanje sadržaja glavnih biološki aktivnih sastojaka ulja semena maline RO2. Naime, RO2 je hladno ceđeno, organsko, nerafinisano ulje semena maline intenzivno narandžaste boje, što je ukazivalo na prisustvo karotenoida, a tokom prve faze eksperimentalnog rada to se i pokazalo, snimanjem Ramanskog spektra ovog ulja. U trećoj fazi,

merjenjem apsorbanije rastvora RO2 u izopropanolu (1:10) na 450 nm, a na osnovu jednačine kalibracione krive konstruisane pomoću standardnih rastvora beta-karotena, određeno je da sadržaj ukupnih karotenoida iznosi ~ 35,16 mg/kg ulja. Od prirodnih antioksidanasa ispitano je i prisustvo tokoferola u nesaponifikovanoj frakciji ulja RO2. Sadržaj ukupnih tokoferola procenjen je na ~ 497,09 mg/kg ulja (računato na alfa tokoferol). Folin-Ciocalteu metodom potvrđeno je da sadržaj ukupnih fenola u RO2 iznosi ~ 4,29 mg ekvivalenta galne kiseline po gramu ulja (mg GA/g). Dakle, ovim relativno jednostavnim i brzim spektrofotometrijskim metodama definitivno je utvrđeno da RO2 ima najmanje tri vrste prirodnih antioksidanasa u sastavu. Dodatno, snimanjem UV apsorpcionog spektra rastvora RO2 u izopropanolu (1:100) potvrđeno je da ovo ulje apsorbuje u širokom delu UV spektra (od 200 do 400 nm). Sveukupno gledano, prisustvo antioksidanasa i sposobnost apsorpcije UV zraka čini ulje maline RO2 veoma perspektivnim kozmetički aktivnim sastojkom za razvoj proizvoda namenjenih za svakodnevnu zaštitu kože od oksidativnog stresa, kao i od štetnih efekata sunčevog zračenja koje dokazano generiše stvaranje slobodnih radikala.

U nastavku treće faze sprovedena je procena antioksidativne aktivnosti ulja RO2 *per se* ili nakon inkorporiranja u P80 NEs i PG NEs, imajući u vidu da su prirodni antioksidansi generalno nestabilni, te postoji veliko interesovanje i realna potreba da se oni stabilizuju upotrebom inovativnih rešenja kao što su nanoemulzije. U tu svrhu, pored standardno korišćenog DPPH testa u metanolu, čime se rastvara kompletna nanoemulzija, upotrebljen je i ABTS test u vodenoj sredini, uz očuvanje strukture U/V nanoemulzija. Rezultati ispitivanja čistog RO2 primenom ABTS i DPPH testa potvrdili su koncentracionu zavisnost antioksidativne aktivnosti u hidrofilnom i lipofilnom medijumu. U skladu sa očekivanjima, aktivnost RO2 bila je veća u lipofilnoj sredini (% INH_{DPPH} ~74,72%), nego u hidrofilnoj sredini (% INH_{ABTS} ~ 20,95%), pri maksimalnoj test koncentraciji RO2 od 10 µL/mL. Dodatno je ispitana i antioksidativna aktivnost hidroglikolnih ekstrakata RE i FE, kao potencijalnih koantioksidanasa i kostabilizatora u ispitivanim nanomulzijama. Značajno je bilo otkriće da je FE ekstrakt pokazao veoma visoku antioksidativnu aktivnost prema oba slobodna radikala (% INH_{DPPH} ~ 82% vs. % INH_{ABTS} ~ 95%), čak i za najminimalniju testiranu koncentraciju (0,17 µL/mL). Nasuprot tome, RE ekstrakt pokazao je slabu antioksidativnu aktivnost primenom DPPH testa (% INH_{DPPH} ~7,13%) i nije pokazao aktivnost prema ABTS katjon radikalu.

Rezultati koji se tiču uticaja nanoemulzifikacije na antioksidativnu aktivnost ulja maline bili su od posebnog značaja, imajući u vidu potencijalnu primenu ovih U/V nanoemulzija na koži. Prilikom ispitivanja antioksidativne aktivnosti P80 NEs, dobijene su gotovo identične vrednosti % INH_{ABTS} i % INH_{DPPH} (oko 12%, za uzorke sa 9% ulja RO2 u masnoj fazi nanoemulzije). Dodatak RE ekstrakta neznatno je doprineo poboljšanju aktivnosti, dok je FE drastično povećao antioksidativnu aktivnost uzorka P80 F1+FE (~92% za DPPH i ABTS test), što je bilo u skladu sa prethodno dokazanom izrazitom antioksidativnom aktivnošću ovog ekstrakta. Što se tiče PG NEs, takođe je pokazano da postoji koncentraciona zavisnost antioksidativnog efekta za sve testirane uzorke, slično kao i u slučaju P80 NEs. Najjači antioksidans ponovo je bio uzorak sa FE ekstraktom u vodenoj fazi, tj. PG F1+FE (% INH_{DPPH} ~ 90,8%, % INH_{ABTS} ~99,7%), što je potvrdilo da je ovaj ekstrakt pogodan kao koantioksidans za oba tipa NEs. U poređenju sa P80 NEs, PG NEs su efikasnije neutralisale ABTS radikal u vodenoj sredini, dok su P80 NEs ispoljile više vrednosti % INH_{DPPH} radikala (za istu test koncentraciju od 10 µL/mL), što se može objasniti različitom koncentracijom RO2 ulja kao i ostalim razlikama u sastavu ovih formulacija. Značajna je bila i činjenica da je antioksidativna aktivnost ostala neznatno promenjena nakon 3 meseca čuvanja na sobnoj temperaturi u slučaju obe vrste nanoemulzija (± 5% u odnosu na inicijalne vrednosti), što je bio indikator njihove dobre preliminarne stabilnosti i efikasnosti kao nosača za ispitivane lipofilne/hidrofilne prirodne antioksidanse.

Kao izuzetno važan deo treće faze, sprovedena je uporedna analiza oksidativne aktivnosti ulja RO2 pre i nakon inkorporiranja u PG NEs i P80 NEs, imajući u vidu da kod svih ulja bogatih polinezasićenim masnim kiselinama, postoji izazov kako obezbediti oksidativnu stabilnost tokom čuvanja i korišćenja ulja (ili proizvoda koji ih sadrže), a posebno na povišenoj temperaturi. Procena oksidativnog statusa izvršena je na osnovu dobijenih rezultata formiranja primarnih proizvoda oksidacije ulja izraženih kao peroksidni broj – PB, kao i sekundarnih proizvoda oksidacije (izraženih kao p-anisidinski broj – PA i sadržaj derivata tiobarbiturne kiseline –TBARS). Naime, zaključeno je da je oksidativna stabilnost čistog ulja maline RO2 i RO2 sa dodatnim antioksidansima (prirodno etarsko ulje origana – ORE ili sintetski, butilhidroksitoluen – BHT) bila zadovoljavajuća tokom 30 dana čuvanja na 5°C i 25°C, pri čemu su svi relevantni parametri ostali u okviru optimalnih granica (PB <15, TBARS <5 i PA <10). Ipak, na 40°C zapažena je oksidativna degradacija ulja – u slučaju dodatka BHT je bila umerena (za obe testirane koncentracije, tj. 0,2% i 0,6%), dok je u slučaju ORE došlo do veće nestabilnosti u odnosu na čisto ulje, što je potvrdilo da ORE nije adekvatan antioksidans za ulje semena maline.

Imajući u vidu da inkorporiranje ulja u nanoemulzije ponekad može imati i negativan efekat na oksidativnu stabilnost, na primer usled povećanja površine međusloja ulje-voda, ili usled oksidativne nestabilnosti samih surfaktanata koji ulaze u njihov sastav, detaljno je ispitana i oksidativna stabilnost nanoemulzija na 5°C, 25°C ili 40°C. Za tu namenu pripremljen je novi set uzoraka optimizovanih nanoemulzija sa 2% ulja RO2 gotovo identičnog sastava izuzev surfaktanta, a pored pomenutih lipofilnih antioksidanasa (BHT i ORE, oba u koncentraciji od 0,02%), ispitana su i dva hidrofilna: prirodni FE ekstrakt (1%) i etilendiaminotetrasirćetna kiselina – EDTA, kao standardni sintetski antioksidans (0,2%).

Rezultati formiranja lipidnih hidroperoksida – LH, kao primarnih proizvoda oksidacije i sekundarnih proizvoda oksidacije izraženih kao TBARS vrednosti, ukazali su da izbor surfaktanta ima odlučujuću ulogu kada je reč o oksidativnoj stabilnosti nanoemulzija. U slučaju P80 NEs, pokazana je izrazita oksidativna nestabilnost na 40°C uzorka P80 F1 (sa uljem RO2, bez antioksidansa), s obzirom da je primećen drastičan skok LH i TBARS vrednosti nakon svega 15 dana čuvanja (LH: od 1,32 do 28,81, TBARS: od 0,79 do 4,79). Ovakav rezultat bio je posledica sinergističke interakcije između RO2 i komponenata nanoemulzije, s obzirom da je u slučaju disperzije čistog surfaktanta u vodi (P80) i blanko nanoemulzije (P80 F0) znatno sporije došlo do formiranja oksidacionih proizvoda. Poznato je da hidrofilne glave molekula P80 mogu da generišu hidroperokside kada se nađu u kontaktu sa prooksidansima u vodi, što dalje dovodi do ubrzane oksidacije nezasićenih masnih kiselina u uljima. Ipak, dodatak bilo kog od testiranih antioksidanasa (posebno BHT, FE ili EDTA) ili čuvanje u frižideru (na 5°C) značajno su inhibirali formiranje oksidacionih proizvoda, tj. došlo je do poboljšanja oksidativnog statusa P80 NEs.

Što se tiče PG NEs, iako su se vrednosti LH blago povećale sa vremenom, statistička analiza je pokazala da nakon 30 dana čuvanja nema značajne razlike između LH vrednosti uzoraka čuvanih na različitim temperaturama, a nije bilo ni značajnih razlika TBARS vrednosti uzoraka čuvanih na 25°C i 40°C. Čak i u slučaju formulacije bez antioksidansa (PG F1), LH i TBARS vrednosti ostale su u prihvatljivim granicama, što je pokazalo da je sloj poliglicerilskih surfaktanata odigrao ključnu ulogu u zaštiti ulja maline unutar kapi nanoemulzija. Ispitani antioksidansi, BHT, EDTA i ORE, pokazali su sličan pozitivan efekat na oksidativnu stabilnost PG NEs, dok je FE ekstrakt bio najmanje efikasan. Interesantno je bilo i otkriće da je ORE bio efikasan antioksidans za oba tipa nanoemulzija, iako je u slučaju čistog RO2 očigledno delovao destabilišuće, kao prooksidans. Prema tome, P80 NEs i PG NEs stabilizovale su ORE i očuvale njegovu antioksidativnu aktivnost, što je bilo u skladu sa trenutnim saznanjima da su nanoemulzije veoma prospektivni nosači za etarska ulja.

Trebalo bi istaći da su u ovoj studiji oksidativne stabilnosti PG NEs imale 4 puta manju prosečnu veličinu kapi u poređenju sa P80 NEs (Z-ave ~ 45 nm vs. ~ 210 nm), ali da uprkos većoj površini međusloja ulje-

voda nije došlo do povećanja nestabilnosti, naprotiv. I u drugim studijama je apostrofirana činjenica da se veličina kapi ne može uzeti kao jedini faktor koji utiče na oksidativnu stabilnost nanoemulzija, imajući u vidu njihov kompleksan sastav i moguće interakcije među sastojcima, kao što su komponente masne faze i antioksidansi.

5.4. Zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada

Četvrta faza bila je posvećena *in vitro* i *in vivo* proceni sposobnosti za ostvarivanje bioloških efekata sirovina i/ili nanoemulzija, posebno kada je reč o poliglicerilskim nanoemulzijama za koje ovakvi podaci nisu bili dostupni.

In vitro ispitivanje citotoksičnosti (MTT test) spovedeno je u cilju procene bioloških efekata prirodnih sirovina – ulja semena maline RO2 i hidroglikolnih ekstrakata RE i FE, kao i uzoraka optimalnih P80 NEs i PG NEs. Sve pomenute sirovine pokazale su zadovoljavajući bezbednosni profil, imajući u vidu da nisu ispoljile citotoksičnost na normalnim fibroblastima pluća (MRC-5 ćelije) i humanim keratinocitima (HaCaT ćelije), ali ove sirovine nisu pokazale citotoksičnost ni prema ćelijama malignog melanoma (Fem-X). Takođe, Fem-X ćelije nisu bile osetljive na P80 NEs (blanko NE, kao i P80 NEs sa aktivnim sastojcima), odnosno, nije došlo do značajnog pada u broju metabolički aktivnih ćelija. Sa druge strane, PG NEs imale su izrazit citotoksični efekat na Fem-X ćelije (IC50 < 30 µg/mL), što je bilo u potpunoj suprotnosti u poređenju sa P80 NEs (IC50 > 200 µg/mL). S obzirom da su za HaCaT ćelije dobijene mnogo veće IC50 vrednosti (IC50 ~ 51 to 164 µg/mL, računato na koncentraciju ulja RO2 *per se* ili u nanoemulziji), potvrđena je selektivna citotoksičnost testiranih nanoemulzija prema malignim Fem-X ćelijama. Najveći SI skor (SI skor 3) imala je formulacija PG F1 sa uljem maline RO2, bez dodatih hidroglikolnih ekstrakata RE/FE, čime je pokazano da je ulje maline RO2 u nanoemulziji zapravo glavni aktivni sastojak odgovoran za ovakav efekat. Blanko nanoemulzija (PG F0) takođe je imala SI skor 2, što se može objasniti prisustvom kosurfaktanta 1 (fenoksietanol, etilheksilglicerin) u njenom sastavu (kao i kod PG F1 aktivnih formulacija). Zapažene razlike u aktivnosti između P80 NEs i PG NEs verovatno su posledica značajne razlike u prosečnoj veličini kapi ovih dveju vrsta nanoemulzija, imajući u vidu da su PG NEs imale i po 2-3 puta manji prosečan dijametar kapi od P80 NEs, ili su posledica razlika u njihovom sastavu.

Rezultati HET CAM testa, kao brze, relativno jednostavne i osetljive metode za *in vitro* procenu okularne iritacije, potvrdili su da ulje semena maline RO2 praktično ne izaziva iritaciju, s obzirom da je kao lipofilna supstanca ostalo na površini CAM i nije imalo efekat na krvne sudove. Sa druge strane, testirane U/V nanoemulzije izazivale su reakciju različitog intenziteta na krvnim sudovima, što ukazuje da nisu pogodne za primenu u predelu oka, pri čemu su P80 NEs bile klasifikovane kao blagi iritansi, a PG NEs kao umereni iritansi. Prema tome, moguće je da je tip surfaktanta imao ulogu u ovim zapaženim razlikama, ili velika razlika u prosečnoj veličini kapi P80 NEs i PG NEs, kao što je već napomenuto.

Na kraju četvrte faze, izvršena je *in vivo* procena kompatibilnosti sa kožom i efikasnosti poliglicerilskih nanoemulzija na humanim dobrovoljcima, budući da nisu pronađeni slični podaci u literaturi, a poznato je da rezultati *in vitro* i *in vivo* studija ne moraju uvek biti u korelaciji. Analizirani su biofizički parametri koji su relevantni pokazatelji zdravlja i funkcije kože, kao što su: nivo hidratisanosti *stratum corneum*-a (SCH), transepidermalni gubitak vode (TEGV) i eritema indeks (EI). Potvrđen je dobar bezbednosni profil svih testiranih uzoraka PG NEs, s obzirom da nisu primećeni znaci iritacije kože, kao ni značajno povećanje parametara EI ili TEGV (nakon 24h okluzije), a takođe nije zapaženo ni značajno smanjenje SCH, imajući u vidu da pomenute promene ukazuju na oštećenje barijerne funkcije kože. Kratkotrajna *in vivo* studija efikasnosti pokazala je da je jednokratna aplikacija svakog testiranog uzorka PG NE rezultirala značajnim povećanjem hidratisanosti kože (SCH povećanje 0,5, 1 i 2 h nakon primene), u poređenju sa netretiranom kontrolom i bazalnim vrednostima. Takođe, pokazano je da se pH vrednost

kože nije značajno promenila tokom dva sata nakon aplikacije nanoemulzija, što je ukazivalo na dobru kompatibilnost formulacija sa kožom.

5.5. Opšti zaključak

Rezultati doktorske disertacije prikazali su uspešan razvoj dve različite vrste biokompatibilnih nanoemulzija (na bazi polisorbata 80 i poliglicerilskih estara) sa uljem semena maline kao perspektivne sirovine za širu kozmetičku primenu. Nanoemulzije su izrađene primenom niskoenergetske PIC metode, kao inovativne, energetske efikasne i prospektivne metode pogodne za prirodne i osetljive aktivne sastojke. Opsežna ispitivanja koja su sprovedena u toku faze optimizacije ovih formulacija, pokazale su njihov veliki potencijal za inkorporiranje ne samo ulja semena maline, već i brojnih drugih prirodnih aktivnih sastojaka.

Fundamentalni naučni doprinos ove doktorske disertacije ogleda se u detaljnoj karakterizaciji, primenom niza komplementarnih tehnika, različitih vrsta prelaznih koloidnih faza koje su detektovane kao ključne tokom nastanka nanoemulzija PIC metodom, kao i odgovarajućih nanoemulzija. Ovo je bilo od posebnog značaja kada je reč o nanoemulzijama pripremljenim sa surfaktantima na bazi poliglicerilskih estara, imajući u vidu da je reč o novijim, prirodnim jedinjenjima, nedovoljno istraženim u nanoemulzionim sistemima.

Konačno, u ovoj disertaciji velika pažnja bila je posvećena proceni i očuvanju biološke aktivnosti i stabilnosti ulja semena maline kao izvora prirodnih antioksidanasa (karotenoida, tokoferola i fenolnih jedinjenja) u nanoemulzijama. Generalno gledajući, kao krajnji ishod ove doktorske disertacije pokazano je da poliglicerilske nanoemulzije predstavljaju superiorniji sistem za inkorporiranje ulja semena maline i/ili drugih prirodnih sirovina, u odnosu na do sada tradicionalno korišćene nanoemulzije na bazi polisorbata 80. Poliglicerilske nanoemulzije pokazale su dobar bezbednosni profil, dokazano su povećale hidrataciju kože uz povećanje efikasnosti i stabilnosti ulja semena maline u odnosu na čistu sirovinu, što je i bio krajnji cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije.

6. LITERATURA

- Aburjai, T. and Natseh, F.M. (2003) Plants Used in Cosmetics. *Phytother. Res.* 17, 987–1000.
- Ácsová, A., Hojerová, J., Janotková, L., Bendova, H., Jedlickova, L., Hamranova, V., Martiniakova, S. (2021) The real UVB photoprotective efficacy of vegetable oils: In vitro and in vivo studies. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 20, 139–151.
- Ahmadi, O.; Jafarizadeh-Malmiri, H. (2020) Green approach in food nanotechnology based on subcritical water: Effects of thyme oil and saponin on characteristics of the prepared oil in water nanoemulsions. *Food Sci. Biotechnol.*, 29, 783
- Alam, M.M., Ushiyama, K., Aramaki, K. (2009) Phase behavior, formation, and rheology of cubic phase and related gel emulsion in Tween80/Water/Oil Systems. *J. Oleo Sci.*, 58: 361–367.
- Alessandrini, A.; Facci, P. (2014) Phase transitions in supported lipid bilayers studied by AFM. *Soft Matter*, 37, 7145–7164.
- Alizadeh, A., Alizadeh, O., Amari, G., Zare, M. (2013) Essential oil composition, total phenolic content, antioxidant activity and antifungal properties of iranian *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak.as in influenced by ontogenetical variation. *J. of Essent. Oil Bear. Pl.*, 16:1, 59–70.
- Anton, N. and Vandamme T.F. (2009) The universality of low-energy nano-emulsification. *Int. J. Pharm.*, 377(1-2), 142–147.
- Anwer, M.K., Aldawsari, M.F., Iqbal, M., Almutairy, B.K., Soliman, G.A., Aboudzadeh, M.A. (2023) Diosmin-loaded nanoemulsion-based gel formulation: Development, optimization, wound healing and anti-inflammatory studies. *Gels*, 9, 95.
- AOCS Official Method Cd 18-90 p-Anisidine value. Dostupno na: <https://www.aocs.org/attain-lab-services/methods/methods/search-results?method=111529>
- Ashaolu (2021) Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review. *Environ. Chem. Lett.*, 19, 3381–3395.
- Aubrun-Sonneville and O., Guiramand, C., 2014. Oil-in-water emulsion. US 8,741,322 B2
- Azmi, N.A.N., Elgharbawy, A.A.M., Motlagh, S.R., Samsudin, N., Salleh, H.M. (2019) Nanoemulsions: factory for food, pharmaceutical and cosmetics. *Processes*, 7, 617.
- Badea, G., Lacatusu, I., Badea, N., Ott, C., Meghea, A. (2015) Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. *Ind. Crops. Prod.*, 67, 18–24.
- Barbulova, A.; Colucci, G.; Apone, F. (2015) New trends in cosmetics: by-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, 2, 82-92.
- Barreto, S.M.A.G., Maia, S.M., Benicá, A.M., de Assis, H.R.B.S., Leite-Silva, V.R., da Rocha-Filho, P.A., de Negreiros, M.M.F., de Oliveira Rocha, H.A., Ostrosky, E.A., Lopes, P.S., de Farias Sales, V.S., Giordani, R.B., Ferrari, M. (2017) Evaluation of in vitro and in vivo safety of the by-product of Agave

- sisalana as a new cosmetic raw material: Development and clinical evaluation of a nanoemulsion to improve skin moisturizing, *Ind. Crop. Prod.*, 108, 470–479.
- Beattie, J.R., Maguire, C., Gilchrist, S., Barrett, L.J., Cross, C.E., Possmayer, F., Ennis, M., Elborn, J.S., Curry, W.J., McGarvey, J.J., Schock, B.C. (2007) The use of Raman microscopy to determine and localize vitamin E in biological samples. *FASEB J.*, 21, 766–776.
- Bento da Silva, P.; Fioramonti Calixto, G.M.; Oshiro Júnior, J.A.; Bombardelli, R.L.Á.; Fonseca-Santos, B.; Rodero, C.F.; Chorilli, M. (2017) Structural features and the anti-inflammatory effect of green tea extract-loaded liquid crystalline systems intended for skin delivery. *Polymers*, 30 (9) 30–44.
- Bernardi, D.S, Pereira, T.A., Maciel, N.R., Bortoloto, J., Viera, G.S., Oliveira, G.C., Rocha-Filho, P.A. (2011) Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. *J. Nanobiotechnol.*, 9, 44.
- Bialek, A., Bialek, M., Jelinska, M., Tokarz, A. (2016) Fatty acid profile of new promising unconventional plant oils for cosmetic use. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 38(4), 1–7.
- Blanco-Dávila, F. (2000) Beauty and the body: the origins of cosmetics. *Plast. Reconstr. Surg.*, 105(3), 1196–1204.
- Bowen-Forbes, C.S., Zhang, Y., Nair, M.G. (2010) Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *J. Food Compos. Anal.*, 23, 554–560.
- Bushman, B.S., Phillips, B., Isbell, T., Ou, B., Crane, J.M., Knapp, S.J. Chemical composition of caneberry (*Rubus spp.*) seeds and oils and their antioxidant potential. (2004) *J. Agric. Food Chem.* 52, 7982–7987.
- Calvo, P., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J. (1996) Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.*, 85 (5), 530–536.
- Carvalho, E., Fraser, P.D., Martens, S. (2013) Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. *Food Chem.*, 139, 744–752.
- Chang, Y.Y. and McClements, D.J. (2014) Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 2306–2312.
- Chaudhri, S. K., and Jain, N. K. (2014). History of cosmetics. *Asian J. Pharm.*, 3(3).
- Chen, L., Hu, J.Y., Wang, S.Q. (2012) The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 67, 1013–1102.
- Chong, W-T, Tan, C-P, Cheah, Y-K, B. Lajis, A.F, Habi Mat Dian, N.L., Kanagaratnam, S., Lai, O-M. (2018) Optimization of process parameters in preparation of tocotrienol-rich red palm oil-based nanoemulsion stabilized by Tween 80-Span 80 using response surface methodology. *PLoS ONE*, 13(8), e0202771.

Cosmetics market size, share, competitive landscape and trend analysis report by category, by gender, by distribution channel: global opportunity analysis and industry forecast, 2023-2032. Dostupno na: <https://www.alliedmarketresearch.com/cosmetics-market>

Costa, M., Freiría-Gándara, J., Losada-Barreiro, S., Paiva-Martins, F., Aliaga, C.; Bravo-Díaz, C. (2021) Interfacial kinetics in olive oil-in-water nanoemulsions: Relationships between rates of initiation of lipid peroxidation, induction times and effective interfacial antioxidant concentrations. *J. Colloid Interface Sci.*, 604, 248–259.

Damasceno, G. A. B., Silva, R. M. A. da C., Fernandes, J. M., Ostrosky, E. A., Langassner, S. M. Z., Ferrari, M. (2016) Use of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill extracts from brazilian caatinga as an alternative of natural moisturizer in cosmetic formulations. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 52(3), 459–470.

Dario, M.F., Oliveira, C.A., Cordeiro, L.R.G., Rosado, C., Mariz, I.A., Maçôas, E., Santos, M.S.C.S., da Piedade, M.E.M., André, Baby, A.R., Velasco, M.V.R. (2016) Stability and safety of quercetin-loaded cationic nanoemulsion: In vitro and in vivo assessments, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 506, 591–599.

Davies, J.T. (1957) A Quantitative kinetic theory of emulsion type. I. Physical chemistry of emulsifying agent. Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interfaces. Proceedings of 2nd International Congress Surface Activity, Butterworths, London.

Dhalaria, R., Verma, R., Kumar, D., Puri, S., Tapwal, A., Kumar, V., Nepovimova, E., Kuca, K. (2020) Bioactive compounds of edible fruits with their anti-aging properties: A comprehensive review to prolong human life. *Antioxidants*, 9, 1123.

DB-ALM Method Summary n° 96 : Hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HET-CAM). Dostupno na: [https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/96_M_Hen's%20Egg%20Test%20on%20the%20Chorioallantoic%20Membrane%20\(HET-CAM\).pdf](https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/96_M_Hen's%20Egg%20Test%20on%20the%20Chorioallantoic%20Membrane%20(HET-CAM).pdf)

Dederen, J.C., Chavan, B., Rawlings, A.V. (2012) Emollients are more than sensory ingredients: the case of isostearyl isostearate. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 502–510.

Demisli, S., Theochari, I., Christodoulou, P., Zervou, M., Xenakis, A., Papadimitriou, V. (2020) Structure, activity and dynamics of extra virgin olive oil-in-water nanoemulsions loaded with vitamin D3 and calcium citrate. *J. Mol. Liq.*, 306, 112908.

Dennis, A. (2007) Raman spectroscopy of edible oils and fats. Dostupno na: https://resources.perkinelmer.com/corporate/pdfs/downloads/app_ramanspectroscopyofedibleoilsandfats.pdf

de Souza, V.R., Pereira, P.A., da Silva, T.L., de Oliveira Lima, L.C., Pio, R., Queiroz, F. (2014) Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chem.*, 156, 362–368.

Dimić, E.B., Vujasinović, V.B., Radočaj, O.F., Pastor, O.P. (2012) Characteristics of blackberry and raspberry seeds and oils. *APTEFF*, 43, 1–9.

- Do, L.D.; Withayyapayanon, A.; Harwell, J.H.; Sabatini, D.A. (2009) Environmentally friendly vegetable oil microemulsions using extended surfactants and linkers. *J. Surfact. Deterg.*, 12, 91–99.
- Dorman, H.J.D.; Surai, P.; Deans, S.G. (2000) In vitro antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. *J. Essent. Oil Res.*, 12, 241–248.
- Drinić, Z., Mudrić, J., Zdunić, G., Bigović, D., Menković, N., Šavikin, K. (2020) Effect of pomegranate peel extract on the oxidative stability of pomegranate seed oil. *Food Chem.*, 333, 127501.
- Dubief, C., Fack, G., Nicolas-Morgantini, L., Restle, S. (2009) Process for the preparation of a cationic nanoemulsion, and cosmetic composition. US 7,476,393 B2.
- Duraipandian, S., Petersen, J.C., Lassen, M. (2019) Authenticity and concentration analysis of extra virgin olive oil using spontaneous Raman spectroscopy and multivariate data analysis. *Appl. Sci.*, 9, 2433.
- Dzidek, A.; Czerwińska-Ledwig, O.; Ziembła, A.; Matysiak, K.; Zawadzka, K.; Kulesa-Mrowiecka, M.; Uher, I.; Pałka, T.; Poráčová, J.; Piotrowska, A. (2023) Impact of raspberry seed oil, sesame oil, and coconut oil on skin in young women. *Cosmetics*, 10, 169.
- Espitia, P.J.P., Fuenmayor, C.A., Otoni, C.G. (2018) Nanoemulsions: synthesis, characterization, and application in bio-based active food packaging. *Compr. Rev. Food Sci. Food. Saf.*, 18, 264–285.
- European Medicines Agency. EMA/HMPC/44211/2012. (2014) Community herbal monograph on *Rubus idaeus* L., folium. *European Pharmacopoeia editio 8th*, Ph. Eur. 8.0., 2013
- Fasolin, L.H., Santana, R.C., Cunha, R.L. (2012) Microemulsions and liquid crystalline formulated with triacylglycerols: Effect of ethanol and oil unsaturation. *Colloids Surf. A*, 415: 31–40
- Faria-Silva, C.A., Costa, A.M., Ascenso, A., Ribeiro, H.M., Marto, J., Gonçalves, L.M., Carvalheiro, M., Simões, S. (2020) Chapter 4 - Nanoemulsions for cosmetic products, Editor(s): Nanda, A., Nanda, S., Nguyen, T.A., Rajendran, S., Slimani, Y. In micro and nano technologies, *Nanocosmetics*, Elsevier, 59–77.
- Feng, S., Gao, F., Chen, Z., Grant, E., Kitts, D.D., Wang, S., Lu, X. (2013) Determination of α -tocopherol in vegetable oils using a molecularly imprinted polymers–surface-enhanced Raman spectroscopic biosensor. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 10467–10475.
- Fernandez, P., André, V., Rieger, J., Kühnle, A. (2004) Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids Surf. A*, 251: 53–58.
- Ferraris, C.; Rimicci, C.; Garelli, S.; Ugazio, E.; Battaglia, L. (2021) Nanosystems in cosmetic products: A brief overview of functional, market, regulatory and safety concerns. *Pharmaceutics*, 13, 1408.
- Ferreira, B. S., de Almeida, C. G., Le Hyaric, M., de Oliveira, V. E., Edwards, H. G. M., & de Oliveira, L. F. C. (2013). Raman spectroscopic investigation of carotenoids in oils from amazonian products. *Spectroscopy Letters*, 46(2), 122–127.
- Ferreira da Silveira, T.F., Laguerre, M., Bourlieu-Lacanal, C., Lecomte, J., Durand, E., Figueroa-Espinoza, M.C., Baréa, B.; Barouh, N., Alves Castro, I., Villeneuve, P. (2021) Impact of surfactant concentration and antioxidant mode of incorporation on the oxidative stability of oil-in-water nanoemulsions. *LWT*, 141, 110892.

Figueira, M.E., Câmara, M.B., Direito, R., Rocha, J., Serra, A.T., Duarte, C.M.M. Fernandes, A., M. Freitas, M., Fernandes, E., Marques, M.C., Bronze, M.R., Sepodes, B. (2014) Chemical characterization of a red raspberry fruit extract and evaluation of its pharmacological effects in experimental models of acute inflammation and collagen-induced arthritis. *Food Funct.*, 5(12), 3241–3251.

Fonseca-Santos, B., Satake, C.Y., Calixto, G.F.M., Martins dos Santos, A., Chorilli, M. (2017) Trans-resveratrol-loaded nonionic lamellar liquid-crystalline systems: structural, rheological, mechanical, textural, and bioadhesive characterization and evaluation of in vivo anti-inflammatory activity. *Int. J. Nanomedicine*, 12, 6883–6893.

Francielli de Oliveira, P., Morais Alves, J., Lopes Damasceno, J., Machado Oliveira, R.A., Dias, H.J., Miller Crotti, A.E., Tavares, D.C. (2015) Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 25, 183–188.

Fratter, A. and Samenzato, A. (2011) New association of surfactants for the production of food and cosmetic nanoemulsions: preliminary development and characterization. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 33, 443–449.

Gao, W., Wang, Y., Hwang, E., Lin, P., Bae, J., Seo, S.A., Yan, Z., Yi, T-H. (2018) *Rubus idaeus* L. (red raspberry) blocks UVB-induced MMP production and promotes type I procollagen synthesis via inhibition of MAPK/AP-1, NF- κ B and stimulation of TGF- β /Smad, Nrf2 in normal human dermal fibroblasts. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, 185, 241–253.

Garti, N., Libster, B., Aserin, A. (2012) Lipid polymorphism in lyotropic liquid crystals for triggered release of bioactives. *Food Funct.*, 3, 700–713.

Global cosmetic skin care market 2019–2023. Dostupno na: <https://www.businesswire.com/news/home/20191121005662/en/Global-Cosmetic-Skin-Care-Market-2019-2023-Evolving-Opportunities-with-Beiersdorf-and-Johnson-Johnson-Services-Technavio>.

Gothani, S. and Prasert, W. (2014) Nano-emulsions; emulsification using low energy methods. *Japan J. Food. Eng.*, 15, 119–130.

Guevara, M, Mercado, R., Vega, K., Cardenas, A., Forgiarini, A. (2023) Rheology and phase behavior of surfactant–oil–water systems and their relationship with O/W nano-emulsion's characteristics obtained by dilution. *Nanomanufacturing*, 3, 20-35.

Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., Doyle, P.S. (2016) Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12, 2826–2841.

Guo, X.; Sun, X.-T.; Liang, L.; Shi, L.-K.; Liu, R.-J.; Chang, M.; Wang, X.-G. (2021) Physical stability, oxidative stability, and bioactivity of nanoemulsion delivery systems incorporating lipophilic ingredients: Impact of oil saturation degree. *J. Agric. Food Chem.*, 69, 5405–5415.

Güzel, S., Herken, E.N., Akademik Gıda, O.E. (2009) Total antioxidant capacity and total phenol contents of turkish edible oils 7(6), 13-17.

Hameyer, P.; Meyer, J.; Polak, G. Cold-Preparable, Low-Viscosity and Prolonged-Stability Cosmetic Emulsions. (2008) U.S. Patent No. 879,569,2B2.

Hanno, I.; Centini, M.; Anselmi, C.; Bibiani, C. (2015) Green cosmetic surfactant from rice: Characterization and application. *Cosmetics*, 2, 322–341.

Hategekimana, J., Chamba, M.V.M., Shoemaker, C.F, Majeed, H., Zhong, F. (2015) Vitamin E nanoemulsions by emulsion phase inversion: effect of environmental stress and long-term storage on stability and degradation in different carrier oil types. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 483, 70–80.

Heunemann, P., Prevost, S., Grillo, I., Marino, C.M., Meyer, J., Gradzielski, M. (2011) Formation and structure of slightly anionically charged nanoemulsions obtained by the phase inversion concentration (PIC) method. *Soft Matter*, 7, 5697–5710.

Hraš, A.R., Hadolin, M., Knez, Ž., Bauman, D. (2000) Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem.*, 71, 229–233.

<https://archive.org/details/101636361.nlm.nih.gov>

https://www.crodabeauty.com/en-gb/products/product/2919-phytessence_1_french_1_oak

<https://www.hanacure.com/products/multi-peptide-nano-emulsion>

<https://mynanoskin.com/product-category/double-a-series/>

<https://worldwide.espacenet.com/patent/search>

<https://www.vitacos.co.kr/en/brand-story/nanovital-cosmetics>

Ispiryan, A., Viškelis, J., Viškelis, P. (2021) Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil: A review. *Plants*, 10, 944.

Jain, K.K. (2008) Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Med. Princ. Pract.*, 17(2), 89–101.

Jeong, J-H., Jung, H., Lee, S-R., Lee, H-J., Hwang, K.T, Kim, T-Y. (2010) Anti-oxidant, anti-proliferative and antiinflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. *Food Chem.*, 123, 338–344.

Jiménez-Sanchidrian, C., Ruiz, J.R. (2016) Use of Raman spectroscopy for analyzing edible vegetable oils. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 51, 417–430.

Johnson, W.; Heldreth, B.; Bergfeld, W.F.; Belsito, D.V.; Klaassen, C.D.; Hill, R.; Liebler, D.; Marks, J.G.; Shank, R.C.; Slaga, T.J.; et al. (2011) Final report of the cosmetic ingredient review expert panel on the safety assessment of pelargonic acid (nonanoic acid) and nonanoate esters. *Int. J. Toxicol.*, 30, 228S–269S.

Jokanović, V. (2014). Mikroskopija atomskih sila. U: Instrumentalne metode: Ključ za razumevanje nanotehnologije i nanomedicine. Beograd: Inženjerska akademija Srbije i Institut za nuklearne nauke Vinča, 779–845.

- Juranic Z., Zizak, Z., Tasic, S., Petrovic, S., Nidzovic, S., Lepasovic, A., Stanojkovic, T. (2005) Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars. *Food Chem.*, 93, 39–45.
- Kampa, J., Frazier, R., Rodriguez-Garcia, J. (2022) Physical and chemical characterisation of conventional and nano/emulsions: Influence of vegetable oils from different origins. *Foods*, 11, 681.
- Kapalczynska, M., Kolenda, T., Przybyla, W., Zajackowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Blizniak, R., Luczewski, L., Lamperska, K. (2018) 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch. Med. Sci.*, 14, 910–919.
- Kato, T.; Nakamura, T.; Yamashita, M.; Kawaguchi, M.; Kato, T.; Itoh, T. (2003) Surfactants properties of purified polyglycerol monolaurates. *J. Surfact. Deterg.*, 6, 331–337.
- Kempler, C., Hall, H., Finn, C.E. (2012) Raspberry. In: Badenes, M., Byrne, D. (eds) *Fruit Breeding. Handbook of Plant Breeding*, Vol 8. Springer, Boston, MA
- Khalil, I., Yehye, W.A., Etxeberria, A.E., Alhadi, A.A., Dezfooli, S.M., Julkapli, N.B.M., Basirun, W.J., Seyfoddin, A. (2020) Nanoantioxidants: Recent Trends in Antioxidant Delivery Applications. *Antioxidants*, 9, 24.
- Kim, D.M, Hyun, S.S., Yun, P., Lee, C.H., Byun, S.Y. (2012) Identification of an emulsifier and conditions for preparing stable nanoemulsions containing the antioxidant astaxanthin. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 34(1), 64–73.
- Kjellin, M., and Johansson, I. (Eds.) (2010) *Surfactants from renewable resources*. West Sussex, England: John Wiley & Sons
- Klang, V. And Valenta, C. (2011) Lecithin-based nanoemulsions, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 21(1), 55–76.
- Klang, V., Matsko, N.B., Valenta, C., Hofer, F. (2012) Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron*, 43, 85–103.
- Kolanowski, W., Swiderski, F., Jaworska, D., Berger, S. (2004) Stability, sensory quality, texture properties and nutritional value of fish oil-enriched spreadable fat. *J. Sci. Food Agric.*, 84, 2135–2141.
- Komaiko, J.S. and McClements, D.J. (2016) Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 15(2), 331–352.
- Komaiko, J.S. and McClements D.J. (2015) Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: factors influencing particle size. *J. Food Eng.*, 146, 122–128.
- Kong, M., Chen, X.G., Kweon, D.K., Park, H.J. (2011) Investigations on skin permeation of hyaluronic acid based nanoemulsion as transdermal carrier. *Carbohydr. Polym.*, 86, 837–843.
- Koroleva, M.Y. and Yurtov, E.V. (2012) Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russ. Chem. Rev.*, 81, 21–43.
- Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M. (2004) Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.*, 85, 633–640.

- Kunz, W., Testard, F., Zemb, T. (2009) Correspondence between curvature, packing parameter, and hydrophilic– lipophilic deviation scales around the phase-inversion temperature. *Langmuir*, 25, 112–115.
- Lee, J., Dossett, M., Finn, C.E. (2012) Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chem.*, 130, 785–796.
- Lee, J.; Choi, S.-J. (2021) Influence of blending of nonionic emulsifiers having various hydrophilic head sizes on lipid oxidation: Investigation of antioxidant polarity—Interfacial characteristics relationship. *Antioxidants*, 10, 886.
- Liew, S.N., Utra, U., Alias, A.K., Tan, T.B., Tan, C.P., Yussof, N. S. (2020) Physical, morphological and antibacterial properties of lime essential oil nanoemulsions prepared via spontaneous emulsification method. *LWT*, 128, 109388.
- Lou, Z., Chen, J., Yu, F., Wang, H., Kou, X., Ma, C., Zhu, S. (2017) The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion, *LWT*, 80, 371–377.
- Lukic, M., Jaksic, I., Krstonosic, V., Dokic, Lj., Savic, S. (2013) Effect of small change in oil phase composition on rheological and textural profiles of W/O emulsion. *J. Texture Stud.*, 44, 34–44.
- Luepke, N.P.; Kemper, F.H. (1986) The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. *Food Chem. Toxicol.*, 24, 495–496.
- Maali, A. and Hamed Mosavian, M.T. (2013) Preparation and application of nanoemulsions in the last decade (2000–2010). *J. Dispersion Sci. Technol.*, 34, 92–105.
- Maestro, A., Solè, I., González, C., Solans, C., Gutiérrez, J.M. (2008) Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method, *J. Colloid Interface Sci.*, 327, 433–439,
- Mahdi, E.S., Noor, A.M., Sakeena, M.H., Abdullah, G.Z., Abdulkarim, M.F., Sattar, M.A. (2011) Formulation and in vitro release evaluation of newly synthesized palm kernel oil esters-based nanoemulsion delivery system for 30% ethanolic dried extract derived from local *Phyllanthus urinaria* for skin antiaging. *Int. J. Nanomedicine*, 6, 2499–2512.
- Majeed, H., Bian, Y-Y., Ali, B., Jamil, A., Majeed, U., Khan, Q.F., Iqbal, K.J., Shoemaker, C.F., Fang, Z. (2015) Essential oil encapsulations: uses, procedures, and trends. *RSC Adv*. 5, 58449.
- Malinowska, P., Gliszczyńska-Świgło, A., Szymusiak, H. (2014) Protective effect of commercial acerola, willow, and rose extracts against oxidation of cosmetic emulsions containing wheat germ oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 116, 1553–1562
- Mao, L., Xu, D., Yang, J., Yuan, F., Gao, Y., Zhao, J. (2009) Effects of small and large molecule emulsifiers on the characteristics of b-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization. *Food Technol. Biotech.*, 47(3), 336–342.
- Marhmati, M., Ranjbar, G., Rezaie, M. (2021) Effects of emulsifiers on the physicochemical stability of oil-in-water nanoemulsions: A critical review. *J. Mol. Liq.*, 340, 117218.

- Marsup, P., Yeerong, K., Neimkhum, W., Sirithunyalug, J., Anuchapreeda, S., To-anun, C., Chaiyana, W. (2020) Enhancement of Chemical Stability and Dermal Delivery of Cordyceps militaris Extracts by Nanoemulsion. *Nanomaterials*, 10, 1565.
- Masaki, H. (2010) Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *J. Dermatol. Sci.*, 58, 85–90.
- Mayer, S., Weiss, J., McClements, D.J. (2013) Vitamin E-enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: Factors influencing droplet size and stability. *J. Colloid Interface Sci.*, 402: 122–130.
- Mc Clements, D.J. (2012) Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8, 1719–1729.
- Mc Clements, D.J.; Decker, E. (2018) Interfacial antioxidants: A review of natural and synthetic emulsifiers and coemulsifiers that can inhibit lipid oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 66, 20–35.
- Milovanović, M., Banjac, N., Vucelić Radović, B. (2009) Functional food: rare herbs, seeds and vegetable oils as sources of flavors and phytosterols. *J. Agric. Sci.*, 54 (1) 80–93.
- Moghaddasi, F., Housaindokht, M.R., Darroudi, M., Bozorgmehr, M.R., Sadeghi, A. (2018) Synthesis of nano curcumin using black pepper oil by O/W Nanoemulsion Technique and investigation of their biological activities. *LWT—Food Sci. Technol.*, 92, 92–100.
- Moghimi, S.M, Hunter, A.C., Murray, J.C. (2005) Nanomedicine: current status and future prospects, *FASEB J.* 19, 311–330.
- Mohd-Setapar, S.H.; John, C.P.; Mohd-Nasir, H.; Azim, M.M.; Ahmad, A.; Alshammari, M.B. (2022) Application of nanotechnology incorporated with natural ingredients in natural cosmetics. *Cosmetics*, 9, 110.
- Mohiuddin, A.K. (2019) Cosmetics in use: A pharmacological review. *Eur. J. Biol. Res.* 7(4), 22–64.
- Mosmann, T. (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55–63.
- Mudalige, A., Jeanne, E., Pemberton, J.E. (2007) Raman spectroscopy of glycerol/D2O solutions. *Vib. Spectrosc.*, 45, 27–35.
- Nejadmansouri, M., Hosseini, S.M.H., Niakosari, M., Yousefi, G.H., Golmakani, M.T. (2016) Physicochemical properties and oxidative stability of fish oil nanoemulsions as affected by hydrophilic lipophilic balance, surfactant to oil ratio and storage temperature. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng.*, 506, 821–832.
- Nesic, I., Stojiljkovic, D., Savic, S., Tasic-Kostov, M., Tadic, V. (2019) Stability, antioxidant activity, in vivo safety and efficacy of creams with standardized wild apple fruit extract: A comparison of conventional and biodegradable emulsifiers. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 41, 300–310.
- Neves, M.A., Wang, Z., Kobayashi, I., Nakajima, M. (2015) Assessment of oxidative stability in fish oil-in-water emulsions: Effect of emulsification process, droplet size and storage temperature. *J. Food Process Eng.*, 40, e12316.

- Niculae, G., Lacatusu, I., Badea, N., Stan, R., Vasile, B.G., Meghea, A. (2014) Rice bran and raspberry seed oil-based nanocarriers with self-antioxidative properties as safe photoprotective formulations. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 13, 703–716.
- Nikolic, I., Lunter, D.J., Randjelovic, D., Zugic, A., Tadic, V., Markovic, B., Cekic, N., Zivkovic, L., Topalovic, D., Spremo-Potparevic, B., Daniels, R., Savic, S. (2018) Curcumin-loaded low-energy nanoemulsions as a prototype of multifunctional vehicles for different administration routes: physicochemical and in vitro peculiarities important for dermal application. *Int. J. Pharm.*, 550, 333–346.
- Nikolić, I., Gledović, A., Tamburić, S., Major, T., Savić, S. (2020) Nanoemulsions as Carriers for Natural Antioxidants: Formulation Development and Optimisation. In: Aboudzadeh, M.A. (eds) *Emulsion-based Encapsulation of Antioxidants. Food Bioactive Ingredients*. Springer, Cham.
- Oomah, B.D., Ladet, S., Godfrey, D.V., Liang, J., Girar, B. (2000) Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chem.*, 69, 187–193.
- Parish, L.C. and Crissey, J.T. (1988) Cosmetics: a historical review. *Clin. Dermatol.* 6(3), 1-4.
- Patel, A.V., Rojas-Vera, J., Dacke, C.G. (2004) Therapeutic Constituents and Actions of *Rubus Species*. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1501–1512.
- Pavoni, L.; Perinelli, D.R.; Bonacucina, G.; Cespi, M.; Palmieri, G.F. (2020) An Overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. *Nanomaterials*, 10, 135.
- Paye, M., Barel, O. and Maibach, H.I. (2010) Introduction (Eds.) Barel, A.O., Paye, M., and Maibach, H.I (2010) In: *Handbook of cosmetic science and technology* (3rd ed.). *CRC Press*, 1–3.
- Philippe, M., Didillon, B., Gilbert, L. (2012) Industrial commitment to green and sustainable chemistry: using renewable materials & developing eco-friendly processes and ingredients in cosmetics. *Green Chem.*, 14, 952–956.
- Pan, Y., Tikekar, R.V., Nitin, N. (2013) Effect of antioxidant properties of lecithin emulsifier on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds. *Int. J. Pharm.* 450, 129–213.
- Pandey, V., Shukla, R., Garg, A., Kori, M.L., Rai, G. (2020) Chapter 17 - Nanoemulsion in cosmetic: from laboratory to market, Editor(s): Nanda, A., Nanda, S., Nguyen, T.A., Rajendran, S., Slimani, Y. In *micro and nano technologies, Nanocosmetics*, Elsevier, 327–347.
- Paquot, C., Mercier J., Lefort D., Mathieu A., Perron R. (1967). Metode analize lipida, 175-179. Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja, Beograd.
- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., M. Yurawecz, M.P., Whittaker, P., Yu, L. (2005) Fatty Acid Composition and Antioxidant Properties of Cold-Pressed Marionberry, Boysenberry, Red Raspberry, and Blueberry Seed Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 566–573.
- Pennick, G., Harrison, S., Jones, D., Rawlings, A.V. (2010) Superior effect of isostearyl isostearate on improvement in stratum corneum water permeability barrier function as examined by the plastic occlusion stress test. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 32, 304–312.

- Pereira, T.A., Guerreiro, C.M., Maruno, M., Ferrari, M., Rocha-Filho, P.A. (2016) Exotic vegetable oils for cosmetic O/W nanoemulsions: *In vivo* evaluation. *Molecules*, 21, 248–263.
- Popović, B.M., Štajner, D., Ždero, R., Orlović, S., Galić, Z. (2013) Antioxidant characterization of oak extracts combining spectrophotometric assays and chemometrics. *Sci. World J.*, 8.
- Prescha, A., Grajzer, M., Dedyk, M., Grajeta, H. (2014) The antioxidant activity and oxidative stability of Cold-Pressed Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 91:1291–1301.
- Qian, C., Decker, E.A., Xiao, H., McClements, D.J. (2012) Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility, *Food Chem.*, 135, 1440–1447.
- Rachmawati, H., Budiputra, D.K., Mauludin, R. (2015) Curcumin nanoemulsion for transdermal application: formulation and evaluation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41, 560–566.
- Rebolleda, S., Sanz, M.T., Benito, J.M., Beltran, S., Escudero, I., González San-José, M.L. (2015) Formulation and characterisation of wheat bran oil-in-water nanoemulsions. *Food Chem.*, 167, 16–23.
- Rehman, A.; Jafari, S.M.; Tong, Q.; Karim, A.; Mahdi, A.A.; Iqbal, M.W.; Aadil, R.M.; Ali, A.; Manzoor, M.F. (2020) Role of peppermint oil in improving the oxidative stability and antioxidant capacity of borage seed oil-loaded nanoemulsions fabricated by modified starch. *Int. J. Biol. Macromol.*, 153, 697–707.
- Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) (2016) A multifaceted experimental model. *Mech Dev.*, 141:70-77.
- Ribeiro, R.C., Barreto, S.M., Ostrosky, E.A., da Rocha-Filho, P.A., Veríssimo, L.M., Ferrari, M. (2015) Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) mill extract as moisturizing agent, *Molecules*, 20(2), 2492–2509.
- Ribier, A., Simonnet, J.T., Legret, S. (1995b) Transparent nanoemulsion less than 100 nm based on fluid non-ionic amphiphilic lipids and use in cosmetics or in dermopharmaceuticals. US 5,753,241
- Rinaldi, F., Hanieh, P.N., Longhi, C., Carradori, S., Secci, D., Zengin, G., Ammendolia, M.G., Mattia, E., Del Favero, E., Marianecchi, C., Carafa, M. (2017) Neem oil nanoemulsions: characterisation and antioxidant activity. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 32, 1265–1273.
- Rios de Souza, V., Pimenta Pereira, P.A, Teodoro da Silva, T.L., Carlos de Oliveira Lima, L., Pio, R., Queiroz, F. (2014) Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chem.* 156, 362–368.
- Rocha-Filho, P.A., Camargo, M.F.P., Ferrari, M., Maruno, M. (2014) Influence of lavender essential oil addition on passion fruit oil nanoemulsions: Stability and *in vivo* study. *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 5, 198.
- Rocha-Filho, P.A., Ferrari, M., Maruno, M., Souza, O., Gumiero, V. (2017) *In vitro* and *in vivo* evaluation of nanoemulsion containing vegetable extracts. *Cosmetics*, 4, 32.
- Rodriguez-Abreu, C., Garcia-Roman, M., Kunieda, H. (2004) Rheology and dynamics of micellar cubic phases and related emulsions. *Langmuir*, 20, 5235–5240.

- Saberi AH, Fang Y, McClements DJ. (2013) Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *J. Colloid Interface Sci.*, 391, 95–102.
- Saberi, A.H., Fang, Y., McClements, D.J. (2014) Stabilization of vitamin E-enriched mini-emulsions: influence of organic and aqueous phase compositions. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 449, 65–73.
- Sahle, F.F.; Metz, H.; Wohlrab, J.; Neubert, R.H.H. (2012) Polyglycerol fatty acid ester surfactant-based microemulsions for targeted delivery of ceramide AP into the stratum corneum: Formulation, characterisation, in vitro release and penetration investigation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 82, 139–150.
- Salager, J.-L., Anton, R.E., Sabatini, D.A., Harwell, J.H., Acosta, E.J., Tolosa, L.I. (2005) Enhancing solubilization in microemulsions—state of the art and current trends. *J. Surf. Deterg.*, 8, 3–21.
- Salem, M.A., Ezzat, S.M. (2018) Nanoemulsions in food industry. In: Milani, J.M. (ed) Some new aspects of colloidal systems in foods. *InechOpen*, London, 31–51.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Grau, M.A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2013) Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. *Food Hydrocoll.*, 30, 401–407.
- Savic, V., Todosijevic, M., Ilic, T., Lukic, M., Mitsou, E., Papadimitriou, V., Avramiotis, S., Markovic, B., Cekic, N., Savic, S. (2017) Tacrolimus loaded biocompatible lecithin-based microemulsions with improved skin penetration: Structure characterization and in vitro/in vivo performances. *Int. J. Pharm.*, 529, 491–505
- Schulman, J.H., Stoeckenius, W., Prince, L.M. (1959) Mechanism of formation and structure of microemulsions by electron microscopy, *J. Phys. Chem.*, 63,1677–1680.
- Seweryn, A. (2018) Interactions between surfactants and the skin—Theory and practice. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 256, 242–255.
- Shah, M.R., Imran, M. and Ullah, S. (2017). Nanoemulsions. In: Shah, M.R., Imran, M. And Ullar, S. (eds). *Lipid-based nanocarriers for drug delivery and diagnosis*. William Andrew, 111–137.
- Shantha, N. and Decker, E.A. (1994) Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *R J. AOAC Int.* 77, 1994.
- Shekunov. B. Y., Chattopadhyay, P., Tong, H.H., Chow, A. H. (2007) Particle size analysis in pharmaceuticals: principles, methods and applications, *Pharm. Res.*, 24(2), 203-227.
- Shinoda, K. and Saito, H. (1968) The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. *J. Colloid Interface Sci.*, 26, 70–74.
- Siti Syarifah, M.M., Nurhanan, M.Y., Muhd Haffiz, J., Mohd Ilham, A., Getha, K., Asiah, O., Norhayati, I., Lili Sahira, H., Anee Suryani, S. (2011) Potential anticancer compound from *Cerbera Odollam*. *J. Trop. For. Sci.*, 89–96.

- Solè, I., Maestro, A., González, C., Solans, C., Gutiérrez, J.M. (2008) Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method. *J. Colloid Interface Sci.*, 327 (2), 15, 433–439.
- Solè, I., Solans, C., Maestro, A., González, C., Gutiérrez, J.M. (2012) Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.*, 376 (1), 133–139.
- Solans, C., Solè, I. (2012) Nano-emulsions: formation by low-energy methods. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 17, 246–254.
- Solans, C., Morales, D., Maria, H. (2016) Spontaneous emulsification. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 22, 88–93.
- Sonneville-Aubrun, O., Yukuyama, MN, Pizzino, A. (2018) Chapter 14 - Application of Nanoemulsions in Cosmetics, Editor(s): Jafari, S.M., McClements, D.J., *Nanoemulsions*, Academic Press, 435–475.
- Su, R., Yang, L., Wang, Y., Yu, S., Guo, Y., Deng, J., Zhao, Q., Jin, X. (2017) Formulation, development, and optimization of a novel octyldodecanol-based nanoemulsion for transdermal delivery of ceramide IIIB. *Int. J. Nanomedicine*. 12, 5203–5221.
- Szumala, P. (2015) Structure of microemulsion formulated with monoacylglycerols in the presence of polyols and ethanol. *J. Surfact.Deterg.*, 18, 97–106.
- Šućurović, A., Vukelić, N., Ignjatović, Lj., Brčeski, I., Jovanović, D. (2009) Physical-chemical characteristics and oxidative stability of oil obtained from lyophilized raspberry seed. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 111, 1133–1141.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C. (2004) Formation and stability of nano-emulsions. *Adv. Colloid Interf. Sci.*, 108–109, 303–318.
- Teo, B.S.X., Basri, M., Zakaria, M.R.S., Salleh, A.B., Rahman, R.N.Z.R.A., Rahman, M.B.A. (2010). A potential tocopherol acetate loaded palm oil esters-in-water nanoemulsions for nanocosmeceuticals. *J. Nanobiotechnol.*, 8, 4.
- Todosijević, M. N., Cekić, N.D., Savić, M. M., Gašperlin, M., Randelović, D. V., Savić S. D. (2014) Sucrose ester-based biocompatible microemulsions as vehicles for aceclofenac as a model drug: formulation approach using D-optimal mixture design, *Colloid Polym. Sci.*, 292(12), 3061–3076.
- Tou, K. A. S., Rehman, K., Ishak, W. M. W., Zulfakar, M. H. (2019) Influence of omega fatty acids on skin permeation of a coenzyme Q10 nanoemulsion cream formulation: characterization, in silico and ex vivo determination. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 45(9), 1451–1458.
- United States Department of Agriculture. Plant guide – American red raspberry, *Rubus idaeus* L. https://plants.usda.gov/DocumentLibrary/plantguide/pdf/pg_ruid.pdf
- Van Hoed, V., de Clerq, N., Echim, C., Andjelkovic, M., Leber, E., Dewettnick, K., Verhé, R. (2009) Berry seeds: A source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value. *J. of Food Lipids*. 16(1), 33–49.

- Van Hoed, V., Barbouche, I., De Clercq, N., Dewettinck, K., Slah, M., Leber, E., Verhé, R. (2011) Influence of filtering of cold pressed berry seed oils on their antioxidant profile and quality characteristics. *Food Chem.*, 127, 1848–1855.
- Vater, C., Adamovic, A., Ruttensteiner, L., Steiner, K., Tajpara, P., Klang, V., Elbe-Burger, A., Wirth, M., Valenta, C. (2019) Cytotoxicity of lecithin-based nanoemulsions on human skin cells and ex vivo skin permeation: Comparison to conventional surfactant types. *Int. J. Pharm.*, 2019, 566, 383–390.
- Vinha, A.F., Costa, A.S.G., Barreira, J., Pacheco, R., Beatriz, M., Oliveira, M. (2016) Chemical and antioxidant profiles of acorn tissues from *Quercus* spp.: potential as new industrial raw materials. *Ind. Crop. Prod.*, 2016; 94, 143–151.
- Vladisavljevic, G.T., Kobayashi, I. and Nakajima, M. (2012) Production of uniform droplets using membrane, microchannel and microfluidic emulsification devices. *Microfluid. Nanofluid.*, 13, 151–178.
- Walker, R., Decker, E.A., McClements, D.J. (2015a) Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. *Food Funct.*, 6, 42–55.
- Walker, R.M., Decker, E.A., McClements, D.J. (2015b) Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: effect of surfactant concentration and particle size. *J. Food Eng.*, 164, 10–20.
- Walker, R.M., Gumus, C.E., Decker, E.A., McClements, D.J. (2017) Improvements in the formation and stability of fish oil-in-water nanoemulsions using carrier oils: MCT, thyme oil, & lemon oil. *J. Food Eng.*, 211, 60–68.
- Wani, T.A., Masoodi, F.A., Jafari, S.M., McClements, D.J. (2018) Chapter 19 - Safety of nanoemulsions and their regulatory status, Editor(s): Jafari, S.M., McClements, D.J., *Nanoemulsions*, Academic Press, 613–628.
- Wakisaka, S., Nakanishi, M., Gohtani, S. (2014) Phase behavior and formation of o/w nano-emulsion in vegetable oil/ mixture of polyglycerol polyricinoleate and polyglycerin fatty acid ester/water systems. *J. Oleo Sci.*, 63, 229–237.
- Wakisaka, S., Nishimura, T., Gohtani, S. (2015) O/W nano-emulsion formation using an isothermal low-energy emulsification method in a mixture of polyglycerol polyricinoleate and hexaglycerol monolaurate with glycerol system. *J. Oleo Sci.*, 64, 405–413.
- Weigel, F., Weiss, J., Decker, E.A., Mc Clements, D.J. (2018) Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of emulsifiers and antioxidants on physical and chemical stability. *Food Chem.*, 242, 395–403.
- Wong, M. L., Timms, R.E., Goh, M.E. Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1988, 65, 258–261.
- Yang, B., Ahotupa, M., Maatta, P., Kallio, H. (2011) Composition and antioxidative activities of supercritical CO₂-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Res. Int.* 2011, 44, 2009–2017.

- Yukuyama, M.N., Ghisleni, D.D., Pinto, T.J., Bou-Chacra, N.A. (2016) Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics--a review. *Int. J. Cosmet Sci.*, 38(1), 13–24.
- Zhang, H., Liu, J., Li, G., Wei, J., Chen, H., Zhang, C., Zhao, J., Wang, Y., Dang, S., Li, X., Xuan Fang, Liu, L., Liu, M. (2018) Fresh red raspberry phytochemicals suppress the growth of hepatocellular carcinoma cells by PTEN/AKT pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 104, 55–65.
- Zhang, H., Taxipalati, M., Que, F., Feng, F. (2013) Microstructure characterization of a food-grade U-type microemulsion system by differential scanning calorimetry and electrical conductivity techniques. *Food Chem.*, 141, 3050–3055.
- Zhong, J., Liu, X., Wang, Y., Qin, X., Li, Z. (2017) γ -Oryzanol nanoemulsions produced by a low-energy emulsification method: an evaluation of process parameters and physicochemical stability. *Food Funct.*, 8(6), 2202–2211.
- Zhu, Y., Li, Y., Wu, C., Teng, F., Qi, B., Zhang, X., Zhou, L., Yu, G., Wang, H., Zhang, S., Wang Z., Jiang, L. (2019) Stability mechanism of two soybean protein-phosphatidylcholine nanoemulsion preparation methods from a structural perspective: A Raman spectroscopy analysis. *Sci. rep.*, 9, 6985.
- Zillich, O.V., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., Kerscher, M. (2015) Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 37, 455–464.

7. PRILOG

BIOGRAFIJA

Ana Gledović je rođena 1982. u Beogradu. Osnovnu školu „Mihailo Petrović Alas“ završila je kao nosilac diplome Vuk Karadžić, a zatim „Prvu Beogradsku gimnaziju“ završava sa odličnim uspehom. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2008. godine. Nakon pripravničkog staža i položenog stručnog ispita za farmaceute 2009. godine, u periodu od 2009. do 2014. godine radi kao diplomirani farmaceut u apotekama privatnog sektora. Profesionalno usavršavanje dalje nastavlja u marketinškoj agenciji specijalizovanoj za farmaceutski marketing i konsalting (u periodu od 2015. do 2018. godine) na poziciji urednika BENU zdravstvenog magazina, baveći se izradom stručnih i tekstova za opštu javnost, kao i idejnih rešenja za farmaceutsku i kozmetičku ambalažu u kolaboraciji sa dizajnerskim timom.

Na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu je zaposlena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju od novembra 2018. godine, kao istraživač pripravnik (od 2018. do 2022. godine), a potom kao istraživač saradnik (2022– danas) gde pohađa doktorske akademske studije iz kozmetologije. Učestvovala je na projektima finansiranim od strane Fonda za inovacionu delatnost Republike Srbije (Naziv projekta: *Natural cosmetic nano-serum with Red Raspberry Seed Oil of Serbian origin for antioxidant treatment of skin photoaging*, 2021/2022 – Dokaz koncepta i 2022/2023 – Transfer tehnologije). Redovno učestvuje u realizaciji praktične nastave na integrisanim akademskim studijama iz predmeta Kozmetologija.

Autor je 4 naučna rada u objavljena u međunarodnim časopisima, jednog poglavlja knjige inostranog izdavača, 11 saopštenja sa domaćih ili međunarodnih skupova, koautor je jedne patentne prijave.

Istraživački interes: razvoj, fizičko-hemijska i *in vitro* karakterizacija niskoenergetskih nanoemulzija sa biljnim uljima i ekstraktima za kozmetičku primenu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора АНА ГЛЕДОВИЋ

Број индекса 221 2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

БИОКОМПАТИБИЛНЕ НИСКОЕНЕРГЕТСКЕ НАНОЕМУЛЗИЈЕ СА
УЛОМ СЕМЕНА МАЛИНЕ (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) ЗА
КОЗМЕТИЧКУ ПРИМЕНУ: ФОРМУЛАЦИОНА ИСТРАЖИВАЊА И
IN VITRO / IN VIVO БИОПЕРФОРМАНСЕ

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

Потпис аутора

У Београду, 24.06.2024.

Ана Гледовић

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора АНА ГЛЕДОВИЋ

Број индекса 22/2018

Студијски програм ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ, МОДУЛ КОЗМЕТОЛОГИЈА

Наслов рада БИОКОМПАТИБИЛНЕ НИСКОЕНЕРГЕТСКЕ НАНОЕМУЛЗИЈЕ СА УЛОМ
СЕМЕНА МАЛЧИНЕ (*Rubus idaeus* L., ROSACEAE) ЗА КОЗМЕТИЧКУ ПРИМЕНУ:
ФОРМУЛАЦИОНА ИСТРАЖИВАЊА И *IN VITRO/IN VIVO* БИОПЕРФОРМАНСЕ

Ментор СНЕЖАНА САВИЋ, АЛЕКСАНДРА ЈАНОШЕВИЋ ЛЕЖАИЋ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 24. 06. 2024.

Ana Gledovic

Изјава о коришћењу

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

БИОКОМПАТИБИЛНЕ НИСКОЕНЕРГЕТСКЕ НАНОЕМУЛЗИЈЕ СА УЉЕМ СЕМЕНА МАЛИНЕ (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) ЗА КОЗМЕТИЧКУ ПРИМЕНУ: ФОРМУЛАЦИОНА ИСТРАЖИВАЊА И *in vitro*/и *in vivo* БИОПЕРФОРМАНСЕ
која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 24.06.2024.

Ana Gledovic

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.