

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA MINOVA

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA MINOVA

VREDNOTENJE VPLIVA KREM Z VGRAJENIMI
MIKRODELICI Z MATIRAJOČIM UČINKOM NA LASTNOSTI
KOŽE

EVALUATION OF CREAMS WITH INCORPORATED
MICROPARTICLES WITH MATTIFYING EFFECT ON SKIN
PROPERTIES

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorstvom doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž.

Iskrena hvala prof. dr. Mirjani Gašperlin, da mi je omogočila opravljanje diplomske naloge pod njenim mentorstvom.

Prav tako se zahvaljujem somentorici doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž za njeno prijaznost, dostopnost ter strokovno pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Posebna zahvala je namenjena podjetju Ilirija d.o.o., ki mi je omogočilo opravljanje praktičnega dela diplomske naloge in s tem vpogled v industrijski razvoj kozmetičnih izdelkov ter Nataši Simonič, uni.dipl.kozm., ki mi je to izvedbo omogočila in me vpeljala v industrijsko izdelavo kozmetičnih izdelkov.

Prav tako se zahvaljujem vsem prostovoljcem za sodelovanje pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Iskrena hvala Tini, Martinu in Ninu za pomoč pri pisanju diplome.

Navsezadnje pa se zahvaljujem še svoji družini in najbližjim, ki so me tekom študija ter pisanja diplomskega dela spodbujali ter brezpogojno verjeli vame.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorice doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž.

Jasmina Minova

Ljubljana, 2016

KAZALO

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV.....	III
1. UVOD	1
1.1 MASTNA KOŽA	1
1.2 MASTNOST KOŽE IN SSL	2
1.3 SNOVI IN IZDELKI ZA NEGO MASTNE KOŽE	3
1.3.1. SNOVI Z MATIRAJOČIM UČINKOM	4
1.4 VREDNOTENJE MASTNOSTI KOŽE IN UČINKOVITOST IZDELKOV ZA NEGO MASTNE KOŽE	5
1.5 HIDRATACIJA KOŽE	5
1.6 SNOVI IN IZDELKI ZA NEGO DEHIDRATIRANE KOŽE	7
1.6.1 TEKOČI KRISTALI.....	8
1.7. VREDNOTENJE HIDRATACIJE KOŽE	10
2. NAMEN DELA	11
3. MATERIALI IN METODE.....	12
3.1. MATERIALI	12
3.2. METODE.....	15
3.2.1. IZDELAVA FORMULACIJ	15
3.2.2 VREDNOTENJE STRUKTURE FORMULACIJ.....	15
3.2.3 ŠTUDIJA UGOTAVLJANJA VPLIVA FORMULACIJ NA SSL, SIJAJ IN HIDRATACIJO KOŽE	16
3.2.3.1 PRELIMINARNO <i>IN VIVO</i> TESTIRANJE.....	16
3.2.3.2 <i>IN VIVO</i> TESTIRANJE NA PROSTOVOLJCIH.....	18
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	23

4.1	VREDNOTENJE STRUKTURE FORMULACIJ S POLARIZACIJSKIM MIKROSKOPOM.....	23
4.2	<i>IN VIVO</i> TESTIRANJA	25
4.2.1	REZULTATI IZ PRELIMINARNEGA TESTIRANJA.....	25
4.2.2	REZULTATI <i>IN VIVO</i> ŠTUDIJE	26
4.2.2.3	REZULTATI MERITEV SSL KOŽE	26
4.2.2.3	REZULTATI MERITVE SIJAJA KOŽE	32
4.2.2.3	REZULTATI MERTIVE HIDRATACIJE KOŽE.....	36
5.	SKLEP	43
6.	LITERATURA	45

POVZETEK

Majhna količina površinskih lipidov in velika količina vode na roženi plasti kože so značilni za normalno kožo. Pogosto ima oseba mastno, sijočo ter hkrati neustrezno hidrirano kožo. Kljub temu na trgu ni dovolj kozmetičnih izdelkov, ki so namenjeni negi mastne in sijoče kože in ki istočasno povečajo hidratacijo kože. Na osnovi te problematike smo izdelali in vrednotili dve formulaciji, ki naj bi imeli matirajoči učinek in dodatno povečali hidratacijo kože. Obe formulaciji sta bili pripravljene z istimi sestavinami, razlika je samo v njuni notranji strukturi. V prvo formulacijo smo vgradili zmes promotorjev tekočih kristalov (Montanov L in Montanov 82, Seppic), v drugi izdelek pa zmes anionskega emulgatorja in maščobnega alkohola (Lannate N, BASF Care Creations). Za vrednotenje vpliva vgrajenih mikrodolcev na strukturo in učinkovitost kozmetičnih izdelkov z namenom izboljšanja hidratacije kože smo izdelali še dve ekvivalentni formulaciji, vendar brez vgrajenih mikrodolcev.

Formulaciji, v kateri smo vgradili promotorje tekočih kristalov, smo analizirali s polarizacijskim mikroskopom. Z rezultati smo potrdili prisotnost tekočih kristalov z izraženimi malteškimi križi, ki so tipični za lamelarne tekoče kristale. Izvedli smo tudi preliminarno testiranje na eni testni osebi, ki je bilo namenjeno kot podlaga za izvedbo *in vivo* študije. Pri *in vivo* študiji smo pri dvanajstih prostovoljcih vrednotili količino površinskih lipidov na koži (s sebumetrom), sijaj (s skin glosimetrom) in hidratacijo kože (s korneometrom) 15, 30, 60 in 90 minut po nanosu formulacij na testnih površinah pri prostovoljcih. Obe kremi sta značilno povečali količino površinskih lipidov, hkrati pa nista imeli značilnega vpliva na hidratacijo. Pri vrednotenju sijaja smo opazili večjo učinkovitost po nanosu formulacije, ki je vsebovala lamelarne tekoče kristale, vendar je ta učinkovitost vidna samo pri ožji skupini prostovoljcev. Opazili smo tudi, da vgraditev mikrodolcev značilno zmanjša učinkovitost formulacij, da povečata hidratacijo kože. Rezultati so nato privedli do zaključka, da je potrebno izboljšanje sestave obeh formulacij, če bi hoteli, da formulaciji izkažeta matirajoči učinek, ter da povečata še hidratacijo kože.

Ključne besede: mastna koža, sijaj kože, hidratacija kože, promotorji tekočih kristalov, klasična emulzija, mikrodolci, matirajoči učinek

ABSTRACT

It has been considered that a low amount of skin surface lipids and high water content in stratum corneum are the main features of fair skin. It is not very uncommon for a person to have an oily, shiny facial skin, while also having insufficient hydration. Nevertheless, it is difficult to find a cosmetic product on the market which expresses a mattifying, as well as hydrating effect on the skin. From that point of view, we have developed and investigated the properties of two cosmetic products which are intended to express mattifying and hydrating effects simultaneously. Both of the cosmetic products were formulated with the same ingredients at the same concentration, the only difference being the inner structure. In the first formulation, we used a combination of liquid crystals' promoters (Montanov L and Montanov 82, by Seppic) and in the second one, we used a mixture of an anionic emulsifier and a fatty alcohol (Lannate N by BASF Care Creations). We also developed two more cosmetic products, without microparticles so we could identify the impact of microparticles on the structure of the first two products, and their hydrating effect on the skin.

While observing the formulations containing liquid crystals under a polarized microscope, we confirmed presence of typical lamellar crystalline texture known as Maltese crosses. Additionally, a volunteer was subjected to preliminary testing, which was used as a basis for *in vivo* studies. With *in vivo* studies we evaluated the amount of skin surface lipids (with sebumeter), skin glossiness (with skin glossymeter) and skin hydration (with corneometer) 15, 30, 60 in 90 minutes after application of the samples on the subjects. Results showed that both of the creams significantly increased the amount of skin surface lipids while their influence on skin hydration was insignificant. After evaluating skin glossiness, we concluded that liquid crystals have better mattifying effect compared to regular emulsions. Still, this outcome was noticeable only on a smaller group of people who participated in the studies. We also observed that incorporation of microparticles in formulations, caused them to have lower skin hydration effect. In conclusion, we suggest that it is necessary that both formulations should go under optimization, after which the mattifying effect on the skin and the amount of water in stratum corneum will significantly improve.

Key words: oily skin, skin hydration, skin gloss, liquid crystals' promoters, classic emulsions, microparticles, mattifying effect;

SEZNAM OKRAJŠAV

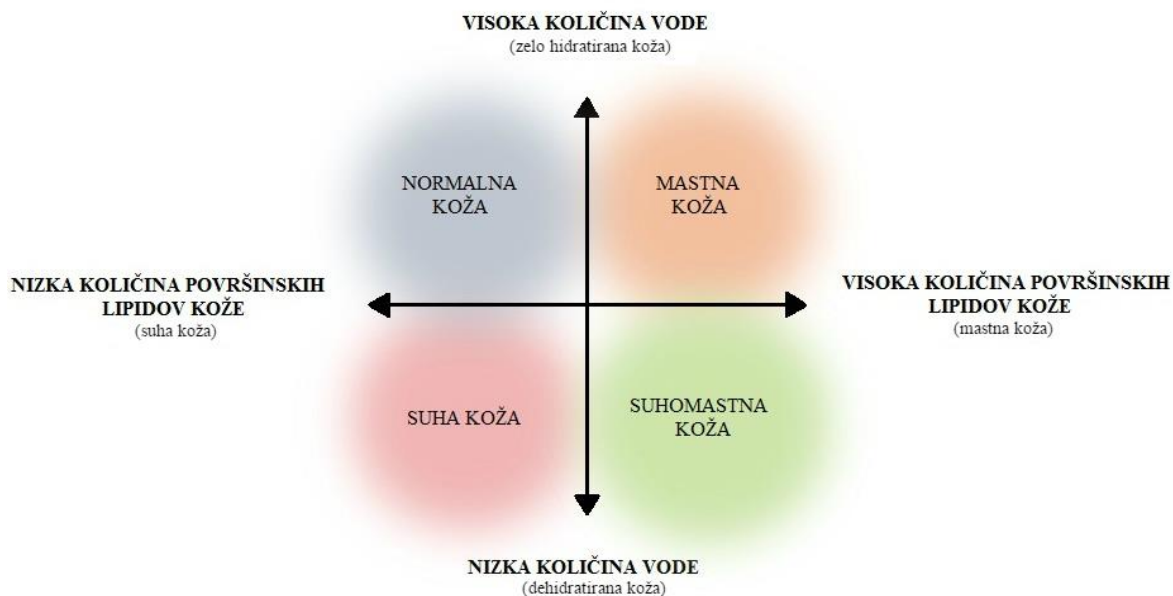
AE	-	Arbitrarna Enota
APG	-	<i>angl.</i> Alkyl Polyglycosides,
DSC	-	<i>angl.</i> Diffuse Scattering Correction,
NMF	-	<i>angl.</i> Natural Moisturizing Factor,
PAS	-	Površinsko Aktivna Snov
SC	-	<i>lat.</i> Stratum Corneum
SD	-	Standardna Deviacija
SSL	-	<i>angl.</i> Skin Surface Lipids
TK	-	Tekoči Kristal

1. UVOD

1.1 MASTNA KOŽA

Mastna koža je tip kože, ki se pojavlja zaradi povečanega izločanja sebuma iz žlez lojnic. Pojavi se masten in sijoč videz s povečanimi porami. Pri mladostnikih velja za eno izmed največjih lepotnih preglavic, ki ima lahko negativne psihološke in socialne posledice (1,2). Natančna funkcija sebuma sicer še vedno ni znana, vendar je dejstvo, da ščiti kožo in lase pred trenjem, omogoča dostavo protimikrobnih lipidov in antioksidantov na koži, sodeluje pri tvorbi feromonov in vonja telesa ter ščiti pred sončnimi žarki (3,4). Pred nekaj desetletji so veljale trditve, da sebum vpliva na količino vode v roženi plasti, ki pa so jih najnovejše raziskave ovrgle, saj so pokazale, da med količino sebuma ter hidracijo kože ne obstaja povezava (3, 5).

Sebum tvori na površini kože lipidni plašč. To ni edina snov, ki sestavlja lipidni plašč; na površini kože so prisotni še lipidi povrhnjice, vendar so v zanemarljivih količinah v primerjavi s količino izločenega sebuma. Kožo glede na količino površinskih lipidov (angl. Skin Surface Lipids, SSL) in hidratiranost razdelimo na več tipov, ki so prikazani na sliki 1 (6).



Slika 1: Tipi kože glede na količino površinskih lipidov ter količino vode v njej (prirejeno po 6).

Morda je na prvi pogled presenetljivo, da se uporabljata dve različni besedi za definiranje kože, kot sta »dehidratirana« in »suha« koža. Čeprav sta si izraza pomensko podobna, se precej razlikujeta. Z izrazom »dehidratirana koža« definiramo začasno ali dolgoročno stanje, ki je povezano z nizko količino vode v zgornji plasti, medtem ko termin »suha koža« uporabljamo samo takrat, ko definiramo odvisnost od aktivnosti žlez lojnic ter majhne količine izločenega sebuma. To pomeni, da lahko tudi pri mastni koži pride do pojava dehidratiranosti, izraz, ki opredeli to stanje je suhomastna koža. V tem primeru je količina vode v zgornji plasti zelo nizka, aktivnost žlez lojnic je enaka, ali pa višja kot normalno (7).

Kljub temu, da suhomastna koža ni tako redek pojav, še vedno ni veliko literature, ki bi istočasno obravnavala masten in dehidratiran tip kože. Večinoma se osredotočajo samo na izdelke, snovi in mehanizme za nego mastne ali pa samo za nego dehidratirane kože. Na splošno veljajo trditve, da kozmetični izdelki za nego mastne kože ne bi smeli negativno vplivati na njeno hidratacijo. Takšni kozmetični izdelki naj bi ohranili hidratacijo, ali pa jo celo izboljšali (8).

Da bi lahko kožo uvrstili v skupino suhomastne ali v katerokoli drugo skupino, omenjene na sliki 1, moramo najprej kvantitativno ovrednotiti količino vode v zgornji plasti kože in SSL (6).

1.2 MASTNOST KOŽE IN SSL

SSL predstavljajo zmes lipidov, ki je sestavljen iz sebuma-izloček žlez lojnic in lipidov povrhnjice, ki izvirajo iz dozorevajočih se korneocitov (9).

Sebum je holokrini produkt žlez lojnic, ki so prisotne po celem telesu. Število žlez in njihova razporejenost po telesu je različna; največje število žlez lojnic je po sredinski liniji telesa, na lasišču, čelu ter na sredinskem delu obraza, sledi še spodnji del hrbta in prsni koš. Na dlaneh in podplatih teh žlez nimamo. Celice žlez lojnic se imenujejo sebociti. Njihov življenjski cikel se začne v bazalnih plasteh kože, potem se te celice delijo, nastanejo hčerinske celice, ki se premikajo proti sredici žleze. Medtem ko se celice premikajo in dozorevajo, se hkrati kopičijo lipidi v njihovi notranjosti, prav tako pa se poveča še celični volumen. Končni proces izločanja sebuma se zgodi, ko zreli sebociti, bogati z lipidi, razpadejo in se vsebina izloči v lasni mešiček neposredno na površino kože.

Na koncu procesa je količina izločenega sebuma na površini kože od 100 do 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Pomembno pa je, da tip kože definiramo samo v odvisnosti količine izločenega sebuma, ker je vpliv lipidov povrhnjice neznaten. Lipidi povrhnjice imajo dolgotrajni proces izločanja, na koncu je njihova količina zelo nizka (od 5 do 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ter znatno manjša kot količina izločenega sebuma (9,10).

Število žlez lojnic se tekom življenja ne spreminja, spreminja pa se njihova aktivnost, ki je hormonsko kontrolirana. Aktivnost žlez je najbolj izrazita v puberteti, ko se zaradi povečane koncentracije androgenih hormonov začne izločati večja količina sebuma. S staranjem se količina izločenega sebuma zmanjšuje, saj aktivnost žlez lojnic pada. Še vedno pa je količina višja pri moških kot pri ženskah (11). Na aktivnosti žlez lojnic lahko dodatno vplivajo še številni drugi dejavniki, kot so prekomerna masa, prehrana (še posebej vroči in kofeinski napitki, alkohol itn.), genska zasnova, razmere v okolju (2, 12). V primeru, da je aktivnost žlez lojnic povečana do stopnje, da lojnice izločajo prekomerno količino sebuma, se lahko pojavi izjemno mastna koža, ki se strokovno imenuje seboreja (*lat. Seborrhea*) (9). Pojav, znan kot sebastaza (*lat. Sebostasis*) oziroma nemastna koža, pa nastane ravno zaradi nasprotnega razloga, in sicer zaradi premalo izločenega sebuma (13).

Ko je aktivnost žlez lojnic povečana, na koži nastanejo spremembe, ki se izražajo s povečanjem por, pojavi se neprijeten vonj ter masten občutek na njeni površini, hkrati se poveča še njen sijaj (1,2). Videz sijoče kože je rezultat optičnega fenomena, ki temelji na tem, da so nepravilnosti bolj izražene na mastni površini, ki težko absorbira svetlobo (14). Sebum gladi hrapave in grobe površine ter povzroča sijoči videz zaradi tvorbe gladke medfazne površine med sebumom in zrakom. Ko žarek svetlobe obseva njeno površino, se bo bodisi zrcalno odbil od površine bodisi se bo lomil in prehajal v njeno notranjost. Količina zrcalnega odboja s površine je v celoti odvisna od količine lipidov ter neodvisna od valovne dolžine žarka (15). Zaradi povečane aktivnosti lojnice se lahko zgodi tudi, da se na njej pojavijo akne. Takrat se lojnice zamašijo, posledično nastane hipoksično okolje, ki je zelo ugodno za rast in razmnoževanje *Propionibacterium acnes* - bakterija, ki aktivno sodeluje pri tvorbi aken (16).

1.3 SNOVI IN IZDELKI ZA NEGO MASTNE KOŽE

Na trgu že obstajajo številni izdelki, ki so namenjeni za nego tega tipa. V preteklosti so bili najbolj popularni toniki in losjoni, ki učinkovito odstranijo sebum iz njene površine,

hkrati pa izboljšajo videz in občutek, a je učinkovitost takšnih izdelkov le začasna. Učinek ni dolgotrajen ravno zaradi hitrega izločanja sebuma iz lasnega mešička, kar povzroča, da koža postane mastna že nekaj ur po nanosu tonika ali losjona. Sedaj na trgu obstajajo izdelki, ki imajo dolgoročnejši učinek. Vsebujejo snovi, ki absorbirajo sebum in kontrolirajo njeno mastnost daljši čas ter zmanjšajo neprijeten občutek na koži (5). Učinkovitost se opazi tudi glede na sijaj. Takšne snovi imajo lastnost, da izražajo matirajoči učinek, optično zgladijo površino in skrijejo njene pomanjkljivosti. Izdelki, ki vsebujejo takšne snovi, so dostopni v obliki pudrov (kompaktni ali v obliki praška), korektorjev, krem, losjonov itn. (5, 17, 18).

Razen absorbentov so na trgu za nego mastne kože še številni kozmetični izdelki, ki vsebujejo različne adstringente, protivnetne snovi, luščila, alkohole, površinsko aktivne snovi (PAS) in drugo, kot aktivne učinkovine (19).

1.3.1. SNOVI Z MATIRAJOČIM UČINKOM

V to skupino spadajo mikrodelci. To so beli praški, ki se pod mikroskopom vidijo kot okrogli delci, s povprečnim premerom med 1 in 1000 μm , ki so različnega kemizma. V literaturi obstajajo številni sinonimi za te delce: sfere, kroglice, mikro-baloni (20). V kozmetičnih izdelkih lahko uporabimo »prazne mikrodelce«, da bi dosegli matirajoči učinek. Druga možnost je, da vgradimo vanje kozmetično aktivno učinkovino ali pa, da je aktivna učinkovina adsorbirana na njihovi površini (21). Zaradi specifičnih fizikalno-kemijskih lastnosti hkrati vplivajo na senzorične lastnosti kozmetičnih izdelkov, ki se kažejo v prvem občutku po nanosu (»after-feel« občutek na koži). Njihove sferične oblike in gladke površine izražajo učinek krogličnega ležaja, ki daje eleganten in svilnat občutek na koži. Učinkovitost mikrodelcev je tesno povezana z njihovo velikostjo in s porazdelitvijo velikosti, strukturo na površini in obliko (20, 22).

Že prej smo omenili, da so nepravilnosti pri mastni koži bolj opazne zaradi visokega kontrasta. Sferični mikrodelci lahko optično zmanjšajo ta kontrast in skrijejo nepravilnosti tako, da difuzno sipajo vpadlo svetlobo (slika 2) (23, 24). Drugi način delovanja poteka z absorpcijo odvečne količine sebuma pri nanosu, ta način delovanja je poznan kot »rolling effect« (23).



Slika 2: Odbijanje svetlobe s površine kože brez in z nanešenimi mikrodenci. 2A - zrcalno odbita svetloba s površine, na kateri ni nanesenih matirajočih mikrodenc 2B - difuzno odbita svetloba s površine, na kateri so naneseni matirajoči mikrodenci (siva puščica-vpadla svetloba; vijoličaste puščice-difuzno odbita svetloba) (prirejeno po 22).

1.4 VREDNOTENJE MASTNOSTI KOŽE IN UČINKOVITOST IZDELKOV ZA NEGO MASTNE KOŽE

Obstajajo številne metode, s katerimi lahko neposredno vrednotimo SSL in določamo mastnost, kot so: ekstrakcija s topili, absorptivni papirčki, obliži z bentonitno glino, fotometrične metode, gravimetrična absorptivna tehnika idr. Najbolj prevladujoča metoda je fotometrična metoda, s katero lahko neinvazivno in hitro vrednotimo kvantitativne ter kvalitativne vrednosti SSL (9).

Posredni način vrednotenja mastnosti je z določanjem sijaja. Področje vrednotenja sijaja je še vedno zelo slabo raziskano, čeprav igra pomembno vlogo, tako na področju kozmetologije, kot tudi na področju dermatologije. Naprave, s katerimi lahko neinvazivno vrednotimo sijaj kože, so »skin glosimetri«. Z njimi merimo odboj svetlobe iz preiskovane ploskovne ali neploskovne površine (15, 17).

Vse te naprave, ki se uporabljajo za neposredno in posredno vrednotenje mastnosti, se uporabljajo tudi pri razvoju in raziskavah novih spojin, izdelkov ter za vrednotenje njihovih učinkovitosti (15, 17).

1.5 HIDRATACIJA KOŽE

Koža kot organ ima številne mehanizme in dejavnike, s katerim uravnava zadostno količino vode v poroženeli plasti (*lat. Stratum Corneum*, SC). Najbolj pomembni so medcelični lamelarni lipidi, katerih fizikalna ureditev tvori močno in učinkovito bariero, pomembna je tudi prisotnost zrelih korneocitov, ki so povezani s korneodozmosomi, ker pozitivno vpliva na barierne funkcije SC,. Vodi otežujejo pot skozi kožo do površine. Naslednje, vendar ne manj pomembne, so sestavine naravnega vlažilnega faktorja (*angl. Natural Moisturizing Factor*, NMF). To so nizko molekularne, izjemno higroskopske snovi, ki nastanejo z razpadom filagrina. Sestavine NMF-ja so predstavljene v preglednici I. Na

hidratacijo vplivajo še: prisotnost endogenega glicerola, gradient kalcijevih ionov v povrhnjici ter sam proces deskvamacije, reguliran s proteolitičnimi encimi. Vsi ti mehanizmi in dejavniki medsebojno sodelujejo in regulirajo izgubo vode iz površine, hkrati pa skrbijo za to, da zadrži zadostno količino vode (14, 24).

Preglednica I: Komponente, ki tvorijo NMF in njihov delež v koži (25)

KOMPONENTE NMF-JA	DELEŽ (%)
Proste aminokisline in urokanska kislina	40 %
2-pirolidon-5-karboksilna kislina	12 %
Laktati	12 %
Sečnina	7 %
Ioni (npr., Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-})	18,5 %
Sladkorji, organske kisline, peptidi	8,5 %
Amonjak, sečna kislina, glukozamin, kreatin	1,5 %
Citrat in format	0,5 %
Glicerol	ND*
Hialuronska kislina	ND*

*ND – nedefinirane količine

Posebnost sestavin NMF je, da zaradi svoje izjemne higroskopsnosti lahko absorbirajo vodo iz bivalnega okolja. V primeru, da je sestava NMF neuravnovnotežena, oz. da so nekatere komponente NMF prisotne v manjših količinah, lahko pride do pojava dehidratirane kože. V takemu primeru lahko koža absorbira vodo iz okolja samo, če je vlažnost okolja 100%; to pa je situacija, ki se skoraj nikoli ne pojavi pri realnih pogojih. Pozitivna stran pa je, da so znanstveniki potrdili, da dermalni nanos sestavin, ki tvorijo NMF, zmanjša dehidratiranost. Najbolj pogosto uporabljene snovi, ki tvorijo NMF so: pirolidonkarboksilna kislina, sečnina, glicerol, mlečna kislina, hialuronska kislina (25).

Ker je koža v konstantnem stiku z bivalnim okoljem, je izjemno dovzetna za različne eksogene dejavnike, pa tudi vpliv endogenih dejavnikov ni izjema. Temperatura okolja, vlažnost zraka, veter, mila, kožne bolezni, stres, diabetične težave idr. – so faktorji, ki

lahko povzročajo spremembe v hidrataciji in pojav dehidratiranosti. To je stanje, pri katerem je količina vode v SC nižja v primerjavi s tistim tipom, ki je normalno hidratirana. Lahko se pojavi v vseh starostnih obdobjih človekovega življenja. Takrat postane suha, groba, zadebeljena, se lušči, hkrati pa se zmanjša njena fleksibilnost. Vsi ti simptomi dajejo na otip občutek zategnjenosti. Zaradi visoke stopnje dehidratiranosti lahko razpoka, pojavi se rdečica in srbenje. V primeru, da je količina vode v SC nenormalno nizka, se pojavi stanje, ki mu pravimo kseroza (*lat. Xerosis*) (24).

1.6 SNOVI IN IZDELKI ZA NEGO DEHIDRATIRANE KOŽE

Najbolj pogost način za nego dehidratirane kože je uporaba »vlažilcev«. To so snovi, ki jih razdelimo v tri skupine, znane kot:

1. Humektanti: snovi, ki vežejo in zadržujejo vodo v SC. V to skupino spadajo tudi sestavine NMFja, imenovane »naravni vlažilci«;
2. Okluzivi: snovi, ki tvorijo bariero na površini ter preprečujejo transepidermalno izgubo vode;
3. Emolienti: snovi, ki nadomeščajo manjkajoče medcelične lipide v SC ter dajejo gladek in mehak občutek same površine.

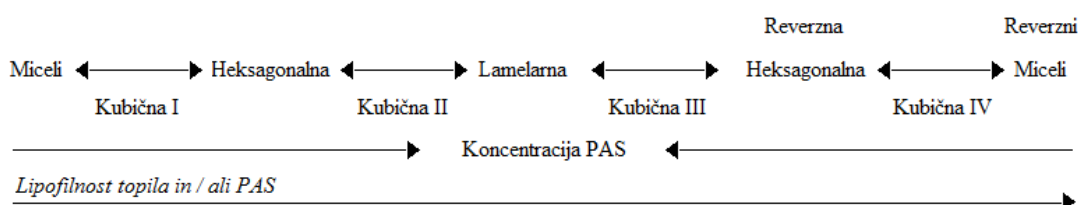
Vse te snovi imajo lastnost, da povečajo hidratacijo. Nanašajo se dermalno, potem pa hitro in učinkovito lajšajo znake in simptome dehidratiranosti (26). Povzročajo pozitivne spremembe glede hidratacije, trenja, luščenja in biomehanskih lastnosti. Po enkratnem nanosu nastanejo primarne spremembe, kot na primer povečano izhlapevanje vode iz površine, temperatura pa se zmanjša. Te spremembe so odvisne večinoma od količine vode, ki je vgrajena v izdelek. Šele po dolgoročni uporabi vlažilnega izdelka se lahko opazijo realne spremembe. Poveča se hidratacija, koža postane vlažna, mehka na videz in otip, zmanjša se luščenje, hkrati se rahlo spremeni še barva (27).

Dehidratirana koža in snovi za njeno nego so pogost naslov v številnih znanstvenih revijah. Znanstveniki konstantno raziskujejo nove spojine, nove kombinacije in sinergije med njimi. Pozornost ni namenjena samo aktivnim in pomožnim snovem, ampak tudi notranji strukturi sistema, v katerega so vgrajene te snovi. Trenutno so zelo proučevani izdelki s strukturo tekočih kristalov (24, 28).

1.6.1 TEKOČI KRISTALI

Pomembnost strukture, v kateri so vgrajene sestavine za nego kože, je izjemna. Za nego suhega tipa so se običajno uporabljali kozmetični izdelki, zasnovani na tradicionalnih emulzijskih sistemih. Težava pri takšnih sistemih pa je, da ko se enkrat nanesejo na površino, del vode iz kozmetičnega izdelka izhlapi in emulzijski sistem razpade. Snov, ki ostane na koži, lahko penetrira v zgornje plasti, ali pa samo ostane na površini. Zaradi tega se je pojavila potreba po novih sistemih z drugačnimi notranjimi strukturami, s katerimi bi lahko dosegli večjo učinkovitost snovi, ki so vgrajene v kozmetični izdelek. Obstajajo številni novi sistemi, ki se lahko uporabljajo namesto klasičnih emulzij, eni najpomembnejših so tekoči kristali (TK) (27, 28).

TK predstavljajo vmesno stanje snovi med trdnim in tekočim. Njihove mehanske lastnosti so podobne mehanskim lastnostim tekočin – tok, hkrati pa imajo optične lastnosti kot kristali – urejenost, anizotropnost, dvolomnost in mehansko stabilnost. Obstajata dva tipa TK: liotropni in termotropni TK ter številne njihove prehodne faze, znane kot mezofaze. Pri termotropnih TK je fazni prehod induciran in kontroliran s spremembo temperature, medtem ko je za liotropne TK značilno, da je fazni prehod induciran s spremembo koncentracije molekul PAS. Liotropni TK nastanejo z dodajanjem topila trdnim snovem, ki tvorijo PAS oziroma natančneje, tvorijo jih njihovi hidrati ali solvati ob prisotnosti vodne in/ali oljne faze. V hidrofilni ali lipofilni fazi na začetku PAS tvorijo micle pri natančno določeni koncentraciji, ki je znana kot kritična micelarna koncentracija. S povečanjem koncentracije pri določeni temperaturi se spremenijo optične lastnosti formulacije, poveča se viskoznost in nastanejo TK. Odvisno od koncentracije PAS in lipofilnosti topila in/ali PAS nastanejo fazni prehodi liotropnih TK (slika 3) (29).



Slika 3: Fazni prehodi liotropnih TK v odvisnosti od koncentracije PAS in lipofilnosti topila in / ali PAS (prirejeno po 29).

Zaradi specifične strukture, ki posnema strukturo lipidnega dvosloja kože, so za kozmetično industrijo posebno zanimivi lamelarni TK. Obstajajo že številne snovi, ki

delujejo kot promotorji in tvorijo lamelarne lipidne dvosloje. Najbolj pogosto uporabljeni promotorji lamelarnih TK so alkil poliglikozidi (*angl.* Alkyl Polyglycosides, APG). Kemijsko so polimerni acetali, sestavljeni iz glukoze in maščobnih alkoholov. Sladkorji so pridobljeni iz koruze, pšenice ali krompirja, medtem ko so maščobni alkoholi naravnega ali sintetičnega izvora. APG lahko tvorijo lamelarne TK - L_{α} in lamelarne gelske faze - $L_{\beta'}$ (večinoma je dominantna faza $L_{\beta'}$) pri relativno nizki temperaturi. Lamelarni sistem nastane s tvorbo vodikovih vez med vodo in hidroksilnimi skupinami monosaharidov, kar povzroča tvorbo specifične konformacije in deluje kot sterična ovira. Tvorba gela omogoča tudi stabilizacijo emulzijskih sistemov: poveča se viskoznost, oljne kapljice so imobilizirane in TK onemogočajo pojav flokulacije ali koalescence sistema (30).

Lamelarni TK sami po sebi izražajo vlažilni učinek na koži, ki se pojavlja zaradi ujetih molekul vode med plastmi PAS, ki tvorijo njihovo strukturo. Ta voda je interlamelarno ujeta v strukturi in služi kot skladišče vode, da bi TK lahko izrazili vlažilni učinek za daljši čas (29, 30). Lukić M. in sodelavci so opravili bolj podrobne raziskave o njihovem vlažilnem učinku v odvisnosti od vgrajene lipofilne sestavine. Prišli so do zaključka, da ima v terciarnih sistemih (sestavljene iz hidrofilne, lipofilne faze ter promotorja TK) bistven vpliv na hidratacijo polarnost lipofilne sestavine. Do te ugotovitve so prišli z vrednotenjem formulacij, katerih notranja struktura so bili TK. Sestava hidrofilne faze in promotorja TK je bila identična pri vseh treh formulacijah. Razlika pa je bila med lipofilnimi fazami oz. je vsak TK vseboval različno lipofilno snov. V prvi formulaciji so bili vgrajeni srednjeveržni trigliceridi, v drugi avokadovo olje, v tretji pa tekoči parafin. Vrednotenje so izvedli po nekaj tednih, ker naj bi formulacije, stabilizirane z APG, potrebovale več časa, da bi dosegle ravnovesje (31).

Nato so nadaljevali vrednotenje s termogravimetričnimi analizami ter z *in vivo* vrednotenjem s korneometrom. Po termogravimetričnih analizah so ugotovili, da je formulacija, ki vsebuje tekoči parafin, izgubila večjo količino vode pri nižji temperaturi kot preostali dve formulaciji. Razlog za ta pojav naj bi bil to, da je tekoči parafin bolj nepolarna snov v primerjavi z avokadovim oljem in srednjeveržnimi triglyceridi. Vpliv polarnosti lipofilne faze je bil značilen tudi pri *in vivo* vrednotenju. Po nanosu formulacije, ki je vsebovala tekoči parafin, so opazili, da se je hidratacija kože takoj povečala. Ko pa so postopek vrednotenja hidratacije ponovili po 5 urah po nanosu, so dobili povsem

drugačne rezultate. Izkazalo se je, da je formulacija s tekočim parafinom imela slabše vlažilne lastnosti kot ostali dve formulaciji. S tem so pokazali, da se rezultati iz termogravimetričnih analiz ter *in vivo* rezultatih medsebojno dopolnjujejo. V formulacijah, ki so vsebovale bolj polarne lipide, je bila večja količina ujete interlamelarne vode. Prvi dve formulaciji sta zato izkazovali podaljšan učinek hidratacije, v primerjavi s formulacijo s parafinom, ki je imela večjo količino proste vode, ta pa vpliva na takojšen učinek hidratacije. Zaključili so, da je izbor pravilne oljne faze eden izmed najbolj pomembnih dejavnikov pri razvoju kozmetičnega izdelka za hidratacijo, pri čemer je vprašljivo vgrajevanje močno nepolarnih lipofilnih snovi (kot tekoči parafin) v formulacijah s TK (31).

1.7. VREDNOTENJE HIDRATACIJE KOŽE

Obstajajo številne tehnike in metode, s katerimi lahko vrednotimo hidratacijo kože ali učinkovitost kozmetičnega izdelka. Najbolj pogosto se uporabljajo neinvanzivne *in vivo* tehnike, ki dajejo objektivne rezultate. Sem spadajo aparati, s katerimi merimo električne parametre oz. kapacitivnost, impedanco in prevodnost kože. Uporabljajo se tudi naprave, s katerimi določamo transepidermalno izgubo vode, topografijo, vrednotimo različne spektroskopske ter optične lastnosti, kot tudi mehanske in viskoelastične lastnosti kože (32).

2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je ovrednotiti vpliv krem z vgrajenimi mikrodelci z matirajočim učinkom na koži, ki jih bomo izdelali v sodelovanju z Ilirijo d.d., slovenskim kozmetičnim podjetjem. Izdelali bomo dve formulaciji, ki se bosta razlikovali v notranji strukturi. Za prvo formulacijo bomo uporabili promotorje tekočih kristalov, ki bi lahko tvorili tekoče kristale, v drugi formulaciji pa bomo uporabili klasični anionski emulgator, ki bo tvoril klasično emulzijo. Dodatno bomo izdelali še dve formulaciji, identični prvima, vendar brez vgrajenih mikrodelcev. Tako bomo lahko primerjali vpliv mikrodelcev na strukturo formulacije in učinkovitost pri hidrataciji kože.

Za vrednotenje strukture formulacij, ki vsebujeta promotorje tekočih kristalov, bomo uporabili polarizacijski mikroskop. Zanimalo nas bo, ali se bodo v primeru vgrajenih promotorjev tekočih kristalov res tvorili tekoči kristali, in kako bodo vgrajeni mikrodelci vplivali na tvorbo in strukture tekočih kristalov. Izvedli bomo tudi *in vivo* študijo za vrednotenje mastnosti, sijaja in hidratacije. Najprej bomo naredili preliminarno *in vivo* študijo, ki jo bomo izvedli na eni osebi, z namenom, da določimo ključne podatke za pravilno izvedbo *in vivo* študije na več prostovoljcih. Vrednotili bomo količine površinskih lipidov, sijaj ter hidratacijo kože po nanosu formulacije na testnih površinah.

Glavni cilj diplomske naloge v okviru *in vivo* študije je ugotoviti, če notranja struktura sistema vpliva na matirajoči učinek formulacij. Hkrati pa želimo določiti, ali bodo tekoči kristali bolj učinkoviti v primerjavi s klasično emulzijo glede hidratacije kože ter kakšen vpliv bo imela vgraditev mikrodelcev na njeno hidratacijo.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Kozmetične izdelke smo pripravili v sodelovanju s podjetjem Ilirija d.d.. Izdelali smo dve formulaciji, t.i. A in B. Razlika med njima je zgolj v tem, da sta obe sestavini, ki tvorita TK v formulaciji A, v formulaciji B zamenjani s sestavino, ki tvori klasično emulzijo. V obe formulaciji smo vgradili mikrodcelce z matirajočim učinkom, ki so zastopani v 5 %. Za vrednotenje vpliva vgrajenih mikrodcelcev na strukturo in učinkovitost izdelanih kozmetičnih izdelkov smo izdelali še dve formulaciji brez vgrajenih mikrodcelcev, formulaciji A' in B', v katerih smo namesto mikrodcelcev vgradili ekvivalentno količino destilirane vode. Vse sestavine, ki smo jih uporabili pri izdelavi formulacije, so predstavljene v preglednici II (posameznih deležev ni navedenih zaradi same zaščitnosti receptur, saj je diplomska naloga nastala v okviru sodelovanja z industrijo).

Preglednica II: Sestava formulacij A, B, A', B'. Označene sestavine prikazujejo razliko med formulacijami.

Sestavine	Funkcija	Tekoči kristali		Klasične emulzije	
		Krema A	Krema A'	Krema B	Krema B'
HIDROFILNE SESTAVINE					
Voda	Tvorilec kontinuirane faze/topilo	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
EDTA	Kelator (33)	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
Butilenglikol	Humektant/sotopilo (34)	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
Montanov L	Promotor TK (35)	Vsebuje	Vsebuje	NE vsebuje	NE vsebuje
Montanov 82	Promotor TK (36)	Vsebuje	Vsebuje	NE vsebuje	NE vsebuje
Glicerol	Humektant/sotopilo (37)	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
LIPOFILNE SESTAVINE					
Lanette O	Regulira viskoznost (38)	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
Lanette N	Anionski emulgator (39)	NE vsebuje	NE vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
BHT	Antioksidant (40)	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
ABIL 100	Negovalni učinek (41)	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje

Cetiol SN	Emolient (42)	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
POLIMER					
Aristoflex AVC	Gelirajoče sredstvo (43)	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
MIKRODELICI Z MATIRAJOČIM UČINKOM					
Fluidamid DF12	Mikrodelci z matirajočim učinkom (44)	Vsebuje	NE vsebuje	Vsebuje	NE vsebuje
Sepimat SB	Mikrodelci z matirajočim učinkom (45)	Vsebuje	NE vsebuje	Vsebuje	NE vsebuje
KONZERVANS					
Symocide PS	Konzervans (46)	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
KOZMETIČNO AKTIVNE SESTAVINE					
Hialurone F	Aktivna sestavina, poveča hidracijo kože (47)	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
Ektoin	Aktivna sestavina, ščiti celice kože pred UVA sevanjem (48)	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje
KORIGENS					
POL	Korigens	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje	Vsebuje

PROMOTORJI TK:

- C14-22 maščobni alkoholi in C12-20 alkilglukozidi

ZAŠČITENO IME: Montanov L™ (Seppic, France)

Montanov L™ je zmes C₁₄-C₂₂ maščobnih alkoholov in C₁₂-C₂₀ APG. Predstavlja vsestranski neionski emulgator, ki deluje kot promotor TK. Struktura, ki jo Montanov L tvori, posnema fosfolipidni dvosloj v koži, zaradi česar izboljša hidracijo kože, zmanjša transepidermalno izgubo vode in hkrati stabilizira emulzijo. Formulacije, stabilizirane z Montanov L, dajejo zelo nežen in lahek občutek (49).

- Cetearilni alkohol in kokoglukozid

ZAŠČITENO IME: Montanov 82™ (Seppic, France)

Montanov 82™ je zmes cetearilnega alkohola in kokoglukozidov. Predstavlja neionski hidrofilni emulgator naravnega izvora, ki tvori TK v kontinuirani fazi okoli lipidne kapljice. Poleg stabilizacije emulzijskega sistema poveča hidracijo in zmanjša transepidermalno izgubo vode. Koži daje prijeten in bogat občutek (36).

ANIONSKI EMULGATOR:

- Cetearilni alkohol in natrijev cetearil sulfat

ZAŠČITENO IME: LANETTE® N (BASF CARE CREATIONS)

Lanette® N je zmes cetilstearylne alkohola in natrijevega cetearil sulfata. Predstavlja anionski emulgator, ki se uporablja za izdelavo hidrofilne emulzije. V zmesi je natrijev cetearilsulfat prisoten v 8,7–10 % , preostalih (približno) 90 % pa pripada cetearilnemu alkoholu (39).

MIKRODELICI Z MATIRAJOČIM UČINKOM:

- Škrobni aluminijev oktenil sukcinat

ZAŠČITENO IME: Fluidamid DF12™ (Roquette America Inc., France)

Škrobni aluminijev oktenilsukcinat je škrob, zaestren z oktenilsukcin anhidridom in obdelan z aluminijevim sulfatom. Videti je kot bel ali skoraj bel prah oz. zrnca, brez vonja in okusa in ni toksičen. Ima dobre disperzne lastnosti in je slabo topen v vodi. Ob uporabi v dekorativni kozmetiki, delci izkazujejo matirajoči učinek na koži, tako da difuzno razpršijo svetlobo in absorbirajo določeno količino olja. V kozmetični industriji se uporablja tudi kot zgoščevalo lipofilne faze in kot sestavina, ki preprečuje tvorbe pogače pri suspenzijah (44, 50). Proizvajalec ni podal podatkov o velikosti mikrodorcev Fluidamida DF12™ .

- Metilmetakrilat premreženi polimer

ZAŠČITENO IME: SEPIMAT™ SB (Seppic, France)

Sepimat™ SB je sintezno pridobljen kopolimer metilmetakrilata, premrežen z glikol dimetilakrilatom. Je bel prašek, sestavljen iz trdnih delcev z gladko površino in velikostjo 1–5 µm (51). Uporablja se za spreminjanje konsistence in senzoričnih lastnosti kozmetičnih izdelkov. Daje tudi matirajoči učinek na koži, ki temelji na sposobnosti mikrodorcev, da selektivno absorbirajo lipofilne komponente (100 g SEPIMAT™ SB adsorbira 50 do 60 g olja) ter da difuzno razpršijo svetlobo. Na koži se ne vidi in daje mehak ter praškast občutek. Uporablja se v kozmetičnih izdelkih za nego obraza, kože, zaščito pred soncem, dekorativni kozmetiki itn. Primeren je za vgradnjo v različne sisteme: lipofilne in hidrofilne emulzije ali gele (51, 52).

3.2. METODE

3.2.1. IZDELAVA FORMULACIJ

FORMULACIJA A: Najprej smo v posebnih čašah natehtali vse sestavine lipofilne ter hidrofilne faze (sestavine predstavljene v preglednici II). Potem smo tako lipofilne kot hidrofilne komponente segreli do 85 °C, na kar smo ob konstantnem mešanju dodajali lipofilno fazo v hidrofilno. Nadaljevali smo s homogenizacijo zmesi in počasi dodajali še polimer, prav tako med mešanjem. Ko se je zmes ohladila na temperaturo 42 °C, smo dodali še matirajoče mikrodcelce. Pri 38 °C smo dodali tudi aktivne sestavine in konzervans. Postopek mešanja smo nadaljevali, dokler se formulacija ni ohladila na sobno temperaturo. Na koncu smo dodali še korigens vonja.

FORMULACIJA A': Postopek izdelave je enak kot v primeru formulacije A, razlika je le v tem, da smo v formulaciji A' namesto mikrodcelcev vgradili sorazmeren delež destilirane vode.

FORMULACIJA B: Postopek izdelave je enak kot v primeru formulacije A, le da smo namesto Montanov L in Montanov 82 (ki sta promotorja TK, kar je razvidno iz preglednice II), vgradili Lanette N (anionski emulgator) v enakem masnem deležu.

FORMULACIJA B': Postopek izdelave je potekal enako kot pri formulaciji B, razlika pa je bila v tem, da pri izdelavi formulacije nismo dodali mikrodcelcev, temveč smo jih nadomestili z enako količino destilirane vode.

3.2.2 VREDNOTENJE STRUKTURE FORMULACIJ

24 ur po izdelavi formulacije smo vrednotili formulaciji (A in A'), ki sta vsebovali dva promotorja TK (Montanov L in Montanov 82), zato da bi potrdili ali ovrgli prisotnost TK. Za ta namen smo uporabili polarizacijski mikroskop, ki je namenjen za vrednotenje kristalne strukture. Sestavljen je iz dveh polarizatorjev, ki sta pravokotno postavljena drug ob drugem, med katera vstavimo preiskovani vzorec. S prvim polarizatorjem se svetloba polarizira, nato pa potuje skozi preiskovani vzorec. Drugi polarizator ali analizator reagira,

če se polarizacija zaradi preiskovanega vzorca obrne. Polarizacijska svetloba v optičnem mikroskopu nam omogoča določanje optične kristalografske lastnosti kristalov. V primeru, da snov, ki jo analiziramo, vsebuje lamelarne TK, bomo pri končnih rezultatih lahko opazili značilne oljne črte z malteškimi križi. Če pa v napravo damo vzorec, ki izkazuje optično izotropnost, se polarizacija ne bo spremenila in do analizatorja svetloba ne bo prišla, zaradi česar bomo videli le črno sliko (30, 53).

Formulaciji A in A' smo vrednotili pri 20-kratni povečavi, s polarizacijskim nastavkom na napravi Physica MCR 301 reometer, Anton Paar, Graz, Austria.

3.2.3 ŠTUDIJA UGOTAVLJANJA VPLIVA FORMULACIJ NA SSL, SIJAJ IN HIDRATACIJO KOŽE

V okviru študije za vrednotenje vpliva formulacij na SSL, sijaj in hidratacijo kože, smo najprej izvedli preliminarno testiranje, nato pa smo nadaljevali z *in vivo* študijo, ki smo jih izvedli na prostovoljcih. Postopek poteka preliminarne testiranja in *in vivo* študije so predstavljeni v nadaljevanju.

3.2.3.1 PRELIMINARNO *IN VIVO* TESTIRANJE

Pred začetkom *in vivo* študije vrednotenja mastnosti, sijaja in hidratacije smo izvedli preliminarno testiranje, ki je podlaga za pripravo osnovnega protokola za nadaljnje delo. Preliminarno testiranje smo izvedli na eni osebi, določili smo anatomsko mesto izvajanja meritev časovne intervale v katerih bomo merili spremembe vrednosti ter količino vzorca, ki jo bomo nanесли. Preliminarno testiranje smo načrtovali in izvedli v skladu z objavljeno literaturo (5, 15, 54, 55, 56).

TESTNA PODROČJA

Začeli smo z označevanjem testnega področja. Pri vrednotenju SSL in sijaja kože smo vrednotenje izvajali na področju obraza, medtem ko smo pri vrednotenju hidratacije postopek izvajali na notranjem delu leve oz. desne podlakti. Dodatno smo bili pozorni tudi na to, da je bil med aparaturo, s katero smo vrednotili, in kožo, ki je del testiranega področja, optimalen stik. Torej, izogibali smo se hrapavih, poškodovanih, neravnih ali dlakastih področjih. Velikost površine pa smo določali v odvisnosti površine naprave, s katero smo vrednotili neposredno na koži. Obenem smo bili pozorni tudi na to, da te površine niso prevelike, zato da bi se izognili variacijam na koži. Testna področja smo

označili s črnim markerjem (s premerom 0,1 mm) na robove šablone. Šablone smo pripravili izključno zaradi označevanja testnih področij. Zaradi tega smo uporabili 3 različne šablone, ki so se medsebojno razlikovale v tem, ali smo jih uporabljali za vrednotenje SSL, sijaja ali hidratacije.

ADAPTACIJA IN AKLIMATIZACIJA

Ko smo označili testna področja, smo pustili prostovoljce, da se aklimatizirajo in prilagodijo na okolje v prostoru, zato da bi se izognili vplivu potenja zaradi predhodne fizične aktivnosti ter, da bi se izognili mehanskim obremenitvam na testnih področjih kože. Postopek aklimatizacije in prilagoditve je trajal 30 min, v sedečem in mirnem položaju. Ko se je postopek končal, so prostovoljci še vedno ostali v sedečem in mirnem položaju, zato da smo se izognili vplivu potenja, ali možnih mehanskih obremenitvah, ki bi značilno negativno vplivale na vrednotenja. Vrednotenje smo izvajali v prostoru, v katerem sta bili temperatura in hidratacija zraka natančno določeni, izognili pa smo se neposredni izpostavljenosti svetlobe in pretoku zraka. Testna področja smo pustili nepokrita, odstranili pa smo nakit, saj bi lahko povzročil pojav okluzije, mehanske iritacije (54) ali interakcije s kozmetičnim izdelkom. Po 30-minutni adaptaciji in privajanju na pogoje, smo izmerili bazalne vrednosti hidratacije kože, nato pa je sledil nanos vzorcev testnih formulacij.

NANOS VZORCEV IN KOLIČINA NANOSA

Določene količine stehtanih vzorcev smo nežno vtrli v kožo prostovoljca, seveda z orokavičeno roko, saj smo na tak način preprečili prenos sebuma, znoja ali preostalih snovi iz površine kože raziskovalca (54). Pri določanju količine nanosa vzorcev smo se držali literaturnih priporočil, da se pri vrednotenju hidratacije večinoma uporabljajo koncentracije od 1 do 3 mg oz. ml/cm² (32). Ta isti podatek smo upoštevali tudi pri vrednotenju SSL in sijaja. Proces nanosa vzorca je trajal 20 sekund, potekal je v nasprotni smeri urinega kazalca, s konstantnim pritiskom in hitrostjo. Zatem smo v točno določenih časovnih intervalih sledili spremembam, ki so nastale zaradi vpliva formulacije na koži. Izmerjene bazalne vrednosti na njeni površini so nam v nadaljevanju služile za primerjave in vrednotenje vpliva izdelkov na lastnosti kože.

3.2.3.2 IN VIVO TESTIRANJE NA PROSTOVOLJCIH

V okviru *in vivo* študije smo vrednotili vpliv testiranih krem na količino SSL, sijaj in hidratacijo kože. Pri tem je sodelovalo skupaj 12 prostovoljcev, od tega osem žensk in štirje moški, v starosti med 21 in 24 let. Izključitveni kriterij iz študije je bila prisotnost dermatitisa in/ali prisotnost drugih kožnih bolezni in alergij. Pred vrednotenjem smo prostovoljcem podali celoten postopek meritev. V študijo smo vključili samo tiste, ki so se s pogoji strinjali. Nato smo jim dali natančna navodila, ki so se jih morali držati pred študijo. Opozorili smo jih, naj pred potekom študije ne pijejo alkoholnih, vročih ali kofeinskih napitkov, 24 ur pred testiranjem naj ne nanašajo kozmetičnih izdelkov na obraz in podlahti ter da lahko testna področja umivajo samo z vodo, največ do 2 uri pred testiranjem. Nihče od prostovoljcev med izvajanjem študije ni uporabljal zdravil peroralno ali dermalno.

Glavni cilj je bil, da ugotovimo, kako vpliva notranja struktura formulacije A (TK) oz. formulacije B (klasična emulzija) na matirajoč učinek na koži. Pri vrednotenju hidratacije smo kot kontrolo uporabili dve identični kremi brez vgrajenih matirajočih mikrodcelcev (A'- TK brez vgrajenih mikrodcelcev ter B'- klasična emulzija brez vgrajenih mikrodcelcev). Vse formulacije, ki smo jih uporabili med študijo, so zaradi lažje preglednosti okrajšanih imen, predstavljene v preglednici III.

Preglednica III: Formulacije, uporabljene v *in vivo* študiji

FORMULACIJE	OPIS FORMULACIJE
KREMA A	Promotorji TK tvorijo notranjo strukturo formulacije, v kateri so vgrajeni tudi matirajoči mikrodcelci
KREMA B	Klasična emulzija, v kateri so vgrajeni matirajoči mikrodcelci
KREMA A'	Promotorji TK tvorijo notranjo strukturo formulacije; ta formulacija pa ne vsebuje matirajočih mikrodcelcev
KREMA B'	Klasična emulzija, ki ne vsebuje matirajočih mikrodcelcev

Pri vrednotenju mastnosti, sijaja in hidratacije kože smo uporabljali naprave proizvajalca Courage + Khazaka electronic GmbH. Ob uporabi naprav smo upoštevali navodila, ki smo jih dobili s strani proizvajalca. Navodila so bila predvsem zaradi klimatskih pogojev osredotočena na podrobnosti, kako naj bi potekale meritve, kalibracije, navedeni so bili tudi podatki za pogoje okolja, pri katerih bi morali izvajati te meritve. Kljub temu, da smo

se držali navodil pri izvajanju meritev, smo zaradi velikega prostora zaznali odstopanja v vlažnosti zraka in temperature. Študija je vse skupaj trajala približno 1 mesec, izvedena pa je bila v poletnem času na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Prvi postopek smo začeli tako, da smo z markerjem označili področja kože prostovoljcev, kjer se bodo izvajali testi, sledil je 30-minutni postopek adaptacije in aklimatizacije, nato smo začeli vrednotiti vpliv formulacij na njihovi koži. Merili smo bazalne vrednosti SSL, sijaja in hidratacije kože, nato smo nanесли na označena področja po obrazu oz. notranjih straneh rok določene količine vzorcev zgoraj omenjenih formulacij. Zatem smo izmerili vpliv vzorcev po nanosu. Časovni intervali meritev vzorcev so bili 15, 30, 60 in 90 minut po nanosu vzorcev.

STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Da bi ugotovili, ali imata formulaciji A in B značilen vpliv na mastnost, sijaj in hidratacijo kože, smo rezultate dobljene pri *in vivo* študiji statistično analizirali. Podobnost varianc smo preverili s F-testom, potem pa izvedli dvostranski Studentov T-test neodvisnih vzorcev. Dobljene rezultate smo primerjali s stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$. Statistične značilne razlike so bile tiste, pri katerih je bila stopnja tveganja manjša od 0,05. V primeru, da je stopnja tveganja bila večja kot 0,05, za te spremembe pravimo, da so statistično neznačilne.

MERJENJE KOLIČINE POVRŠINSKIH LIPIDOV KOŽE

Merjenje količine SSL smo izvedli s Sebumetrom[®] SM 815 (Courage+Khazaka Electronic, Köln, Nemčija). To je neinvazivna, fotometrična naprava, s katero lahko kvantitativno merimo bazalno vrednost količine lipidov na koži ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ter hitrost izločanja lipidov ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Sestavljena je iz kasete, ki vsebuje matirajoč sintetični trak z debelino 0,1 mm. Na merilnem področju kasete je izpostavljen trak s površino 64 mm². Pod to površino traka je zrcalo preko vzmeti povezano s kaseto, ki sodeluje pri fotometričnem vrednotenju in omogoča konstanten pritisk kasete na kožo (57). Pri vrednotenju se trak pritisne na površino, iz katere želimo razbrati rezultate za vrednosti SSL. Matirajoči trak adsorbira lipide iz testne površine, zaradi česar se transparentnost traka značilno poveča. V nadaljevanju se rezultati določajo na podlagi spektrofotometrične metode, odčitamo jih kot arbitrarne enote (AE) v vrednosti od 0 do 350 (58).

Pred začetkom praktičnega dela diplomske naloge smo dobili navodila o napravi, kjer je bila podana preglednica s strani proizvajalca, da bi lažje interpretirali in klasificirali kožo, odvisno od izmerjene vrednosti SSL. Vrednosti veljajo za zdravo in nepoškodovano kožo pri normalnih sobnih pogojih- temperatura: 20-22°C in vlažnost zraka: 40-60%. V opombi proizvajalec poudarja, da je to površna razvrstitev kože, narejena po izkušnjah proizvajalca. V nadaljevanju so dodali tudi, da moramo pri vrednotenju in komentiranju izmerjenih rezultatov upoštevati tudi nihanje pogojev okolja (temperatura, vlažnost zraka, geografska lokacija, klimatska sezona). Zaradi tega je proizvajalec v navodilih priporočal, da je najbolje, če vsak preiskovalec pripravi lastno lestvico uvrstitve oseb, v kateri bodo upoštevani vsi dejavniki, ki neposredno ali posredno vplivajo na sam postopek vrednotenja (58). Proizvajalčevo priporočilo za pripravo lastne lestvice uvrstitve oseb smo upoštevali.

S sebumetrom smo vrednotili količine površinskih lipidov na obrazu oz. bolj natančno, na predelu lic. Testna površina kože je bila 3×3 cm² vzdolž ličnice, na katero smo nanесли 18 mg posameznega izdelka (formulacije A in B). Čela nismo izbrali, saj je temperatura višja glede na temperaturo ostalih delov obraza, pri čemer vemo, da obstaja pozitivna povezava s količino izločenega sebuma (59). Prav tako je področje čela problematično, če je prostovoljec pod stresom, saj se aktivirajo žleze lojnice in znojnice, zaradi česar lahko dobimo lažne pozitivne ali negativne rezultate (55).

MERJENJE SIJAJA KOŽE

Za določanje sijaja in leska kože smo uporabili Skin-Glossymeter[®] GL-200 (Courage+Khazaka Electronic, Köln, Nemčija). Naprava je sestavljena iz sonde, v kateri se proizvaja vzporedna bela svetloba iz svetleče diode. V notranjosti naprave sta dve zrcali – prvo zrcalo odbije belo svetlobo in jo usmeri k površini kože pod kotom 60°, drugo pa usmeri direktno reflektirano svetlobo k merilnemu kanalu, ki meri zrcalno odbito svetlobo. Značilno za to aparaturo je, da je v notranjosti tudi kanal, ki meri difuzno odbito svetlobo. Na koncu naprava določa dve vrednosti – prva je vrednost sijaja, izražena v AE, druga pa vrednost sijaja, pri kateri je hkrati upoštevan popravek razpršenega sipanja svetlobe (*angl.* Diffuse Scattering Correction, DSC). S pomočjo DSC lahko vrednotimo in primerjamo različne tipe kože ter skoraj zanemarimo razlike med njenimi lastnostmi (barve, nepravilnosti in svetlost) (60).

Pri vrednotenju smo upoštevali območja T, U in O obraza. Na območju T smo matirajoča izdelka nanесли na označenem področju glabele, na območju U – na ličnici ali bolj natančno pod očesoma in zraven obnosnega območja, ter na območju O na izboklini brade. Na vsakem področju, simetrično na levi in na desni strani obraza, smo označili področja s površino $2 \times 2 \text{ cm}^2$. Na posameznem področju smo nanесли 8 mg formulacije A ali 8 mg formulacije B.

Pri meritvah sijaja in leska smo se morali poleg direktno vpadle svetlobe izogniti še indirektno odbiti svetlobi. Zaradi tega smo vrednotenje izvajali v prostoru brez prižganih luči, ki smo ga še dodatno zatemnili z žaluzijami. Vsak prostovoljec je sedel na stolu z obrazom, usmerjenim stran od okna. Pri vrednotenju smo si še dodatno pomagali z rokami, tako da smo zasenčili področja, na katerih smo izvajali merjenje sijaja.

MERJENJE HIDRATACIJE KOŽE

Meritve hidratacije kože smo izvajali s Corneometrom® CM 825 (Courage+Khazaka Electronic, Köln, Nemčija) na notranji strani podlahti. To je naprava, ki meri električno kapaciteto v povrhnjici. Merilna sonda Corneometra® CM 825 je sestavljena iz interdigitalne mreže zlata, pokrite z elektrodami. Aktivni del elektrode pokriva površino $7 \times 7 \text{ mm}$, površina celotne sonde pa je $0,95 \text{ cm}^2$. Aktivni del je pokrit z nizkim dielektričnim materialom, čigar debelina je $20 \text{ }\mu\text{m}$. V sondi je vzmet, ki zagotavlja konstantni pritisk $1,6 \text{ N/m}^2$, kar pri vrednotenju hidratacije omogoča natančne in ponovljive rezultate. Pri vrednotenju se razvije električno polje med elektrodami v zgornji plasti kože. Oblika in globina električnega polja sta odvisni od elektrode in dielektričnega materiala, ki jih prekriva ter od kapacitivnosti biomateriala, ki je v stiku z elektrodami. Posledično celoten »sistem«, torej elektrode, SC in zgornje plasti povrhnjice, delujejo kot variabilni kondenzator. Na vrednost kapacitance vplivajo spremembe dielektrične konstante biomateriala v stiku z elektrodami, na ta način se določa količina vode v SC (56). Čas posameznega vrednotenja traja eno sekundo, obstaja pa tudi možnost za izvajanje kontinuiranega merjenja hidratacije kože (61).

V splošnem lahko rezultate interpretiramo glede na razpredelnico, kot jo podaja proizvajalec (preglednica IV), vendar moramo enako kot pri sebumetru upoštevati tudi subjektivne izkušnje in variabilnosti, povezane s testno osebo, okoljem ter aparaturo (61).

Vrednosti veljajo za zdravo in nepoškodovano kožo pri normalnih sobnih pogojih-temperatura: 20-22°C in vlažnost zraka: 40-60%.

Preglednica IV: Opredelitev kože v odvisnosti od vrednosti AE, ki jih dobimo pri vrednotenju hidratacije kože s Corneometrom® CM 825 (61).

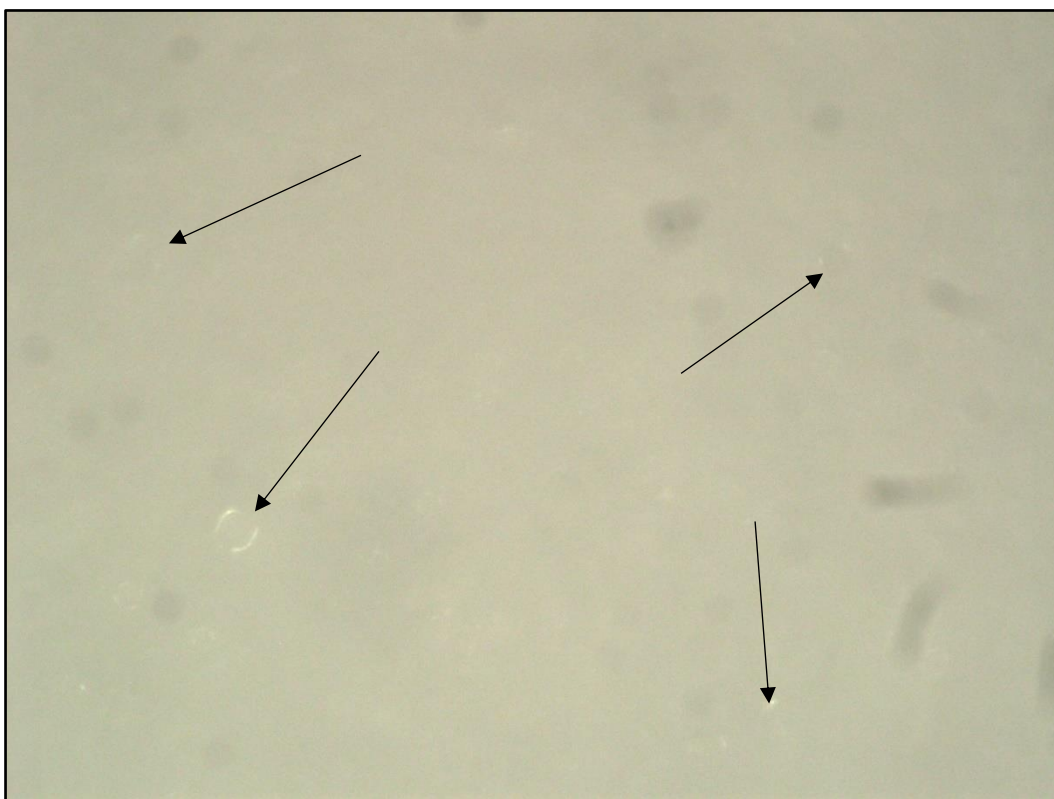
	Notranja stran podlahti
Zelo suha koža	< 30 AE
Suha koža	30-40 AE
Normalno hidratirana	> 40 AE

Za vrednotenje vpliva krem na hidratacijo smo natehtali približno 18 mg posameznega vzorca (formulacij: A, B, A' in B'), katerega smo z orokavičenim prstom nežno vtrli na predhodno natančno označena področja s površino 3×3 cm². Pri označevanju smo se izognili področju karpalnega sklepa in področju komolčne kotanje. Označili in ovrednotili smo tudi mesta, na katera nismo nanесли vzorca in so nam služila za kontrolo. Pozorni smo bili, da ne izvajamo merjenj na istem mestu, ampak postavimo merilno sondo na petih različnih mestih v označenem kvadratu, da bi se izognili okluziji, povzročeni s stikom med kožo in sondo (54). Med meritvami smo merilno sondo vedno brisali z mehkim celuloznim papirjem, da bi preprečili navzkrižne kontaminacije med vzorci. Najprej smo določali bazalno hidratacijo kože, nato pa smo vrednotili spremembe hidratacije 15, 30, 60 in 90 minutah po nanosu vzorcev.

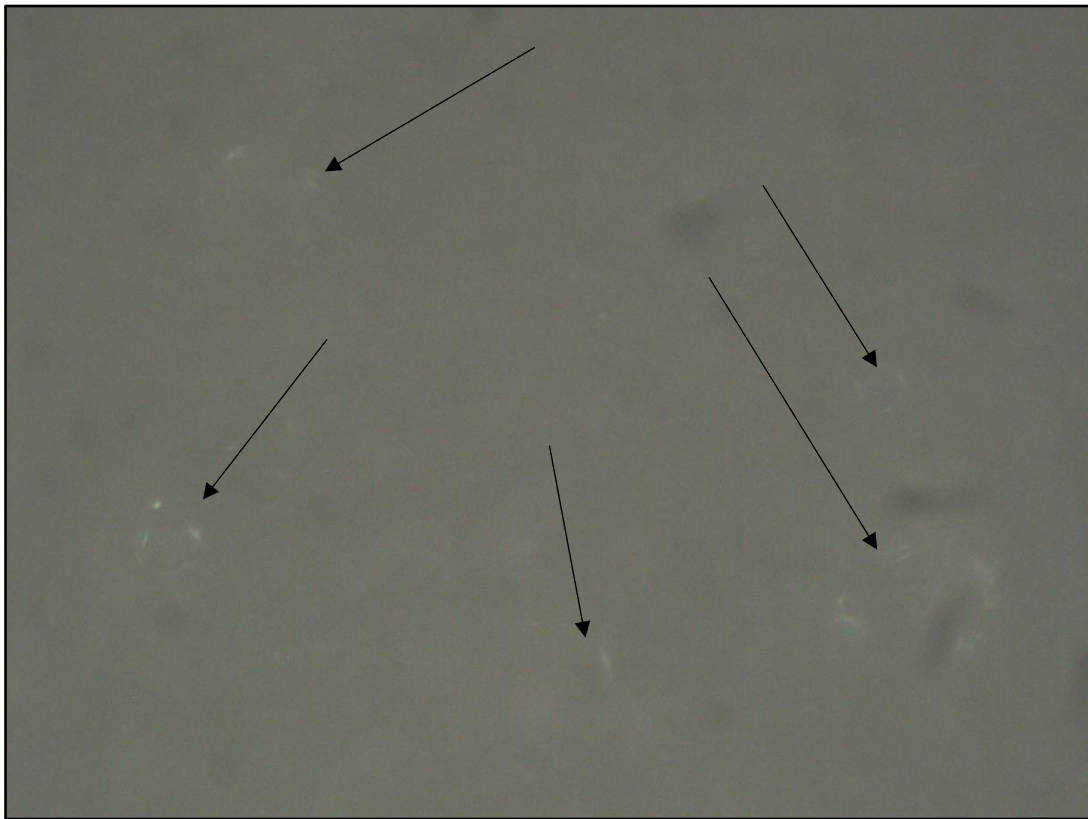
4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VREDNOTENJE STRUKTURE FORMULACIJ S POLARIZACIJSKIM MIKROSKOPOM

24 ur po izdelavi formulacij smo s polarizacijskim mikroskopom pregledali vzorce dveh, ki sta vsebovali promotorje TK. Želeli smo ugotoviti, ali bomo pri vrednotenju formulacij A in A', opazili malteške križe oz. defekte, ki bodo pokazali, da so v novo tvorjenih formulacijah prisotni lamelarni TK. Zanimalo nas je tudi, ali bodo imeli vgrajeni mikrodelci kakšen vpliv pri tvorbi TK. Na sliki 4 je slika formulacije A, ki je vsebovala promotorje TK in matirajoče mikrodelce. Na sliki 5 pa je slika formulacije A', ki je vsebovala promotorje TK, le da smo namesto matirajočih mikrodelcev vgradili enak masni delež destilirane vode.



Slika 4: Posnetki formulacije A dobljeni s polarizacijskim mikroskopom. Označena področja so vidni malteški križi.



Slika 5: Posnetki formulacije A' dobljeni s polarizacijskim mikroskopom. Označena področja so vidni malteški križi.

Na slikah 4 in 5 je razvidno, da so pri obeh formulacijah vidne naključno razporejene anizotropne strukture, znane kot malteški križi. Dejstvo pa je, da niso preveč jasno izraženi. Razlog za to naj bi bila povečava mikroskopa, ki je bila zgolj 20x, kar je omejitev pri vrednotenju struktur TK. Poleg povečave na izrazitost in opaženost malteških križev vpliva tudi sestava formulacij, še posebej lipofilne sestavine. To področje so bolj podrobno raziskovali Savič, Pantelič in Lukić, ko so vrednotili in analizirali APG kot promotorje TK in ugotovili, da ima vrsta lipofilnih sestavin velik vpliv na vidnost in organizacijo struktur TK (53).

Če primerjamo sliki 4 in 5, lahko opazimo, da so malteški križi na sliki 4 značilno manjši. Hkrati je vidljivost defektov na sliki 4 slabša kot v primerjavi z defekti, ki so prikazani na sliki 5. Predvidevamo, da so mikrodelci najverjetneje glavni dejavnik, ki vplivajo na vidnost in velikost malteških križev.

Čeprav so na slikah 4 in 5 rezultati slabo vidni, lahko sklepamo, da so pri obeh formulacijah prisotni lamelarni TK. Vgraditev matirajočih mikrodelcev ne omejuje tvorbe

lamelarnih TK v formulaciji, pač pa vplivajo na velikost, vidnost in opaznost defektov na posnetkih, pridobljenih s polarizacijskim mikroskopom.

4.2 IN VIVO TESTIRANJA

4.2.1 REZULTATI IZ PRELIMINARNEGA TESTIRANJA

V okviru preliminarnega testiranja smo želeli pridobiti ključne podatke za izvedbo *in vivo* študije. Začeli smo tako, da smo najprej označili testno mesto prostovoljcev ter zabeležili čas začetka postopka aklimatizacije in adaptacije. Po 30ih minutah smo nanесли vzorce na označena področja. Pri nanašanju vzorcev smo bili previdni, da ni prišlo do razmastitve markerja, s katerim smo označevali območje vrednotenja, saj bi lahko prišlo do interakcije med markerjem in kremo.

Razen adaptacije in aklimatizacije prostovoljcev ima pri vrednotenju vpliva formulacije na lastnosti kože bistven pomen tudi pravilna izbira anatomskega mesta. Pri vrednotenju SSL in sijaja kože smo sklepali, da je obraz najbolj primerno področje, na katerem bi lahko opravili vrednotenje zaradi velikega števila žlez lojnic, s tem bi lažje vrednotili matirajočo učinkovitost formulacij na takšnih področjih. Pri vrednotenju količine SSL je bilo testno področje na licih razdeljeno v tri manjša podobmočja. To smo naredili zaradi različne porazdelitve sebuma na licih prostovoljcev, ki temelji na različnem številu žlez lojnic. Največja količina SSL je bila izražena pri obnosnem področju, nato pa se je količina zmanjšala v smeri senc (59). Te podatke smo pri vrednotenju upoštevali, zaradi česar smo postopek izvajali poševno po ličnici od obnosnega območja proti sencam oz. od senc pa vse do obnosnega območja. Zaradi verjetnosti pojava lažnih pozitivnih rezultatov, ki se lahko pojavijo zaradi absorptivnih lastnosti traku sebumetra, smo smer vrednotenja spreminjali izmenično, da ne bi imeli zaporednih vrednotenj na istem področju. Vrednost SSL smo tako podali kot povprečje treh posameznih meritev.

Pri vrednotenju sijaja kože pa smo se izogibali dlakastih področij, saj smo opazili, da so na takšnih področjih vrednosti sijaja spremenljive in neponovljive. Dodaten dejavnik pri izbiri anatomskega področja je bila tudi velikost sonde glosimetra. Ne samo to, da je bila pomembna zadostna velikost površine kože, pomemben je bil tudi sam relief. Ponovljive in nespremenljive rezultate smo dobili samo takrat, ko smo vrednotenje izvajali na ravni površini, zato smo se odločili, da bomo vrednotili na treh področjih obraza, na katerih je stik med merilno sondo in kožo najprimernejši (na glabeli, ličnici- ali bolj natančno, pod

očesoma in zraven obnosnega območja ter na izboklini brade). Povprečne vrednosti sijaja kože smo dobili iz treh posameznih meritev na označenih področjih kože.

Ker je v večini člankov navedeno, da so vrednotenje hidratacije izvajali na notranji strani podlahti, smo se odločili, da je tudi v našem primeru to mesto najbolj primerno, saj se s tem izognemo velikemu vplivu aktivnosti žlez lojnic ter znojnic. Poleg tega je na tem področju vpliv nepravilnosti kože minimaliziran. Pri vrednotenju pa smo ugotovili, da področje karpalnega sklepa in področje komolčne kotanje nista primerna zaradi velike standardne deviacije (SD) med posameznimi meritvami. Natančnega vzroka za ta pojav ne poznamo, vendar predvidevamo, da vplivata neravna površina karpalnega sklepa, veliko število krvnih žil pod površino ter debelina maščobnega tkiva teh področij.

Časovne intervale, pri katerih smo izvajali vrednotenje, smo določali po trikratnem vrednotenju lastnosti kože pri isti osebi. Pri vsakem vrednotenju smo določali vpliv formulacije 2 uri po nanosu vzorcev. Ugotovili smo, da vrednotenje po petih ali desetih minutah po nanosu vzorcev, ni primeren časovni interval, saj so na površini še zmeraj sledi kozmetičnega izdelka, zaradi česar so rezultati neprimerni. Nato smo nadaljevali z vrednotenjem 15, 30, 60, 90 in 120 min po nanosu vzorcev. Dve uri po nanosu formulacije niso več kazale zelenega učinka. Dodatna omejitev pri določanju maksimalnega časovnega intervala je bila tudi ta, da smo vrednotenje izvajali v poletnem časovnem obdobju, zaradi česar je bilo še težje obdržati idealne pogoje, še posebej zato, ker se prostovoljci niso smeli premikati dve uri. Na osnovi teh opažanj smo se odločili, da so najbolj primerne časovne točke za vrednotenje hidratacije 15, 30, 60 in 90 minut po nanosu formulacije, saj so pri omenjenih časovnih intervalih učinki formulacije na koži najbolj opazni.

Pri *in vivo* študiji smo upoštevali podatek, da je optimalna količina nanosa vzorcev od 1 do 3 mg oz. ml/cm² (32), tako da smo vzeli povprečje 2 mg oz. ml/cm²; količina, za katero smo ugotovili, da je zadostna pri vrednotenju SSL, sijaja in hidratacije kože.

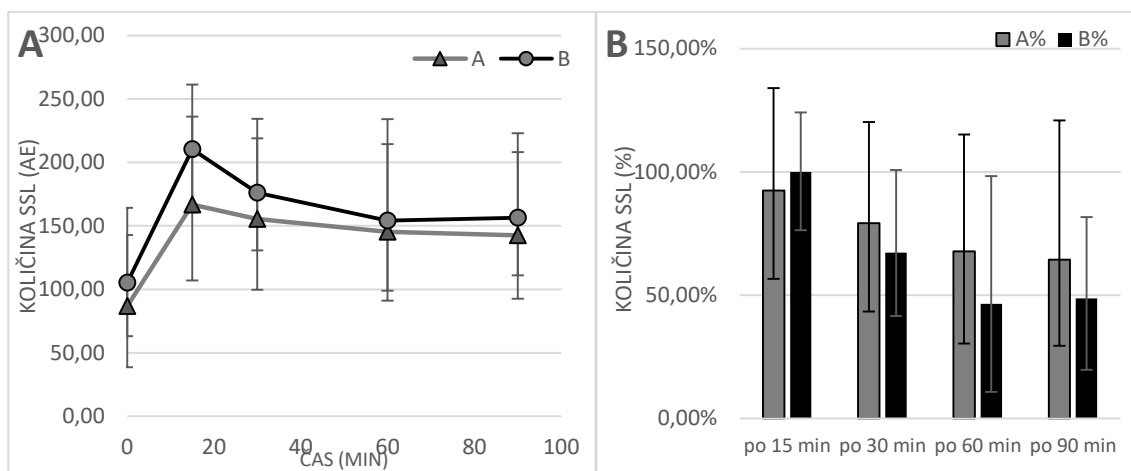
4.2.2 REZULTATI *IN VIVO* ŠTUDIJE

4.2.2.3 REZULTATI MERITEV SSL KOŽE

In vivo študijo za vrednotenje vpliva krem na količino SSL smo izvedli s sebumetrom na osmih prostovoljcih. Izbrali smo kožo na licu s površino 9 cm². Najprej smo izmerili bazalne vrednosti SSL, nato pa smo nanесли predhodno stehtane vzorce formulacij; 18 mg vzorca formulacije A in vzorca formulacije B na levem oz. desnem licu prostovoljcev. Po

nanosu vzorcev smo vrednotili vpliv formulacij po vnaprej določenih časovnih intervalih. Namen te študije je bil ugotoviti, ali formulaciji A in B zmanjšata bazalne vrednosti SSL in če njuna notranja struktura vpliva na učinkovitost absorpcije lipofilnih komponent s kože.

Na sliki 6 so predstavljene povprečne vrednosti mastnosti kože pri vseh osmih prostovoljcih. Vrednosti SSL v času 0 predstavljajo bazalne vrednosti SSL. Spremembe 15, 30, 60 ter 90 minutah po nanosu so rezultati vpliva formulacije A in B na koži. Pri vseh vrednostih so prikazane tudi SD.



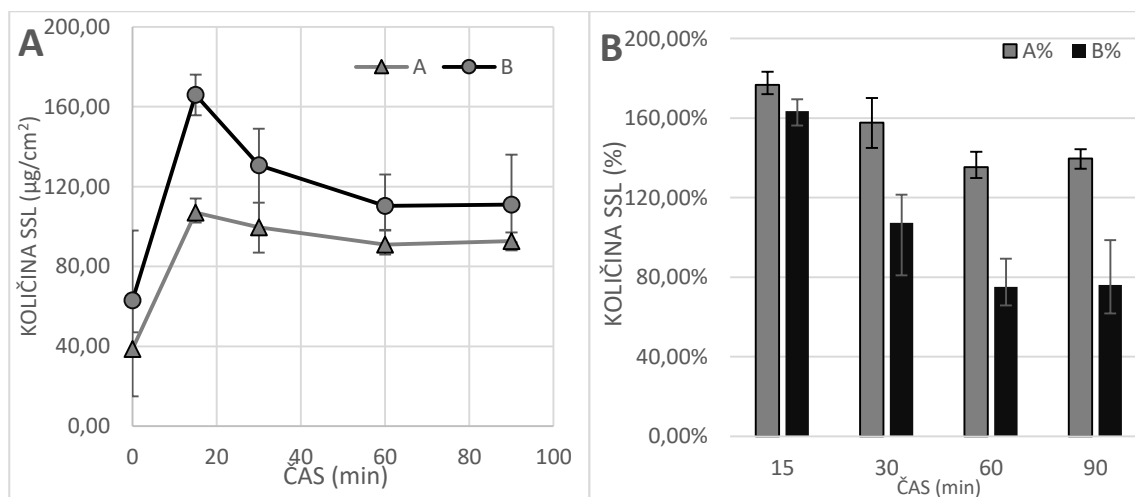
Slika 6: Povprečne vrednosti SSL, izmerjene pri osmih prostovoljcih, pred nanosom in 15, 30, 60 ter 90 minut po nanosu formulacij A in B. Slika 6A- povprečne vrednosti SSL, podane v AE $\pm$ SD; Slika 6B- povprečne vrednosti SSL, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti SSL $\pm$ SD;

S slike 6 lahko vidimo, da nobena formulacija ne zmanjša količine SSL, temveč se SSL celo poveča. Vse vrednosti SSL po nanosu so statistično značilno povečane v primerjavi z bazalno vrednostjo. Najbolj izrazito povečanje je bilo 15 minut po nanosu vzorcev, saj se je mastnost kože povečala za skoraj dvakrat glede na bazalna vrednost SSL (pri formulaciji A povprečno za 92,40%, pri formulaciji B povprečno za 99,92%). Na začetku je večji porast opazen po nanosu formulacije B. Nato se vrednosti obeh formulacij spreminjajo in čez čas količine SSL rahlo upadejo, a še vedno ne toliko, da bi izmerjene vrednosti bile nižje kot bazalne vrednosti. V času od 30 minutnega do 90 minutnega nanosa je formulacija A povečala vrednosti SSL za večji odstotek kot formulacije B. Kot smo omenili na začetku, tudi po 90 minutnemu nanosu vzorcev še vedno govorimo o

statistično značilnem povečanju v nasprotju z bazalno vrednostjo SSL, kar pomeni, da formulaciji ne izražata matirajočega učinka zaradi absorpcije sebuma iz površine kože.

Glede na to, da smo vrednotenje opravili na osmih prostovoljcih z različnimi tipi kože, smo posledično dobili rezultate, katerih bazalne vrednosti SSL so variirale od 38,67 AE do 163,67 AE. Razlika med rezultati je bila očitna tudi po SD, iz katere lahko opazimo, da je pri vseh vrednostih SD precej visoka (slika 6). Na podlagi dobljenih povprečnih rezultatih (za bazalne vrednosti SSL) pri vseh osmih prostovoljcih, smo se odločili, da jih razvrstimo v tri skupine. Prva skupina je namenjena za osebe s precej nizko bazalno vrednostjo, v drugo skupino smo uvrstili osebe, ki so imeli povprečne oz. normalne bazalne vrednosti SSL, ter na koncu tretja skupina, v katero smo uvrstili osebe, katerih bazalne vrednosti so odstopale in bile precej visoke v primerjavi z ostalimi prostovoljci. Razvrstitev oseb je bila pomembna za pravilno in čim bolj natančno komentiranje vplivov formulacij odvisnih od bazalne vrednosti SSL prostovoljcev. Razvrstitev nam je pomagala tudi pri tem, da bolj natančno ugotovimo, ali notranja struktura formulacije vpliva na matirajoči učinek na koži.

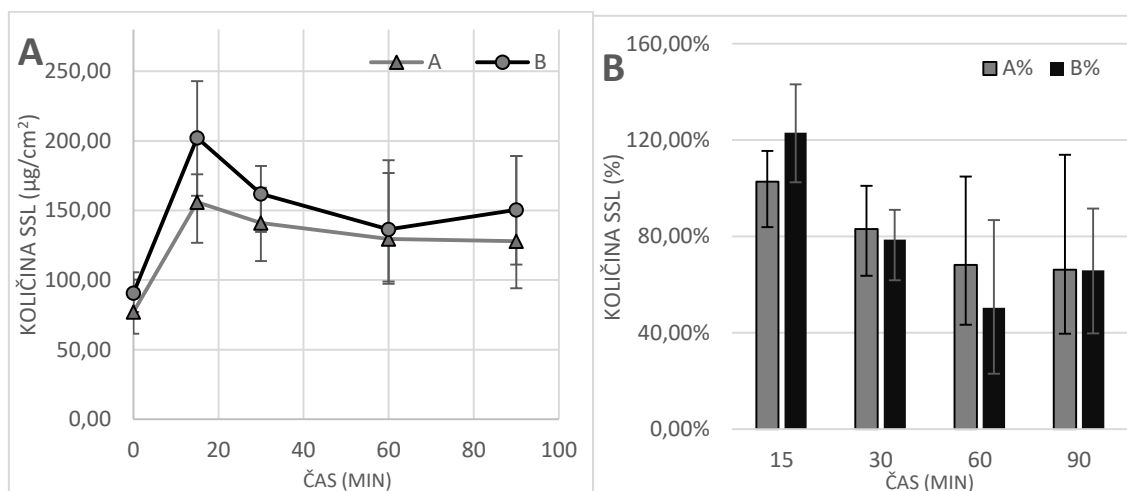
Na sliki 7 so predstavljeni rezultati povprečne vrednosti, izmerjeni pri eni osebi. To osebo smo uvrstili v prvo skupino, saj smo izmerili precej nizko bazalno vrednost SSL (38,67 AE na levem licu in 63,00 AE na desnem licu).



Slika 7: Povprečne vrednosti SSL, izmerjene pri eni osebi (prva skupina), pred nanosom in 15, 30, 60 ter 90 minut po nanosu formulacij A in B. Slika 7A - povprečne vrednosti SSL, podane v AE $\pm$ SD; Slika 7B - povprečne vrednosti SSL, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti SSL $\pm$ SD;

Kot lahko vidimo na sliki 7, je še enkrat potrjeno, da nobena od formulacij ne zmanjša količino SSL. Vse vrednosti so večje kot bazalne vrednosti SSL (statistično značilno povečanje), hkrati pa je vpliv formulacije A bolj dominanten v vseh časovnih točkah kot pri formulaciji B (še bolj so opazni na sliki 7B). Pri obeh formulacijah so najvišje vrednosti SSL izmerjene po 15 minutah (približno za 176,72% po nanosu formulacije A; približno za 163,46% po nanosu formulacije B). Pri nadaljnjih časovnih točkah vrednosti SSL vrednosti upadejo. 60 minut po nanosu je povečanje SSL minimalno glede na bazalno vrednost; takrat se je količina SSL povečala za 135,34% po nanosu formulacije A in 75,13% po nanosu formulacije B. Vrednosti, izmerjene 90 minut po nanosu, se rahlo povečajo tako pri formulaciji B kot tudi pri formulaciji A, (govorimo pa o statistično neznačilnih spremembah v nasprotju z vrednostmi izmerjenih 60 minut po nanosu vzorcev). Iz prikazanih podatkov na sliki 7 je vidno, da je opazna razlika med vplivoma formulacije A in formulacije B. Čeprav obe vsebujeta mikrodelfce za matirajoči učinek na koži, še vedno povzročata povišanje vrednosti SSL pri osebi, ki je imela nizko bazalno vrednostjo SSL.

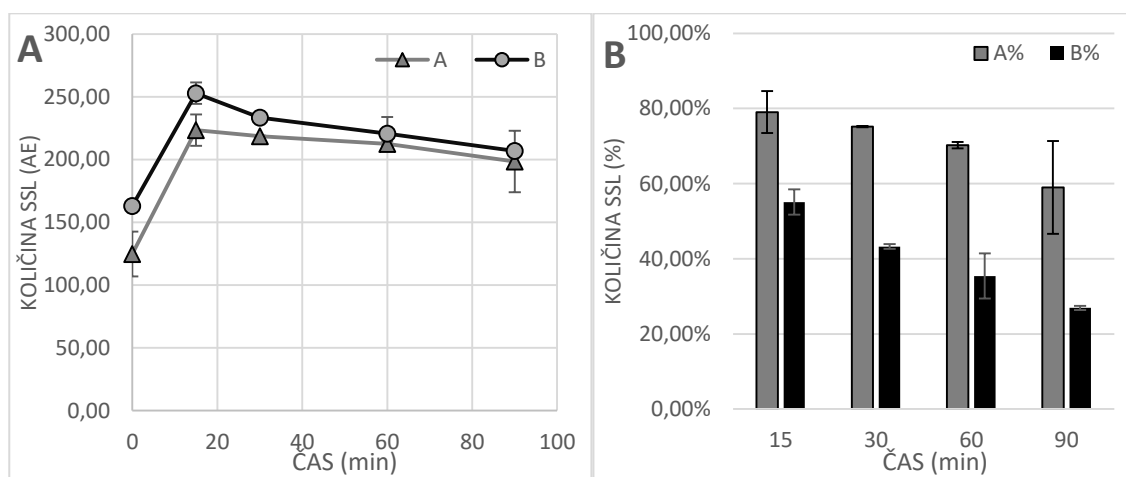
Na sliki 8 so prikazani povprečni rezultati petih oseb (uvrščene v drugo skupino), katere bazalne vrednosti SSL so se spreminjale od minimalno 61,33 AE do maksimalnih 100,33 AE. Kot v prejšnjih primerih, lahko tudi tukaj opazimo, da so vse izmerjene vrednosti vedno značilno večje kot bazalne vrednosti SSL, to smo tudi potrdili s statističnimi analizami. Tudi pri tej skupini so najvišje vrednosti SSL izmerjene 15 minut po nanosu vzorcev (po nanosu vzorca A smo opazili povečanje za 102,70%, po nanosu formulacije B pa za 123,09%), nato pa izmerjene vrednosti SSL rahlo upadejo.



Slika 8: Povprečne vrednosti SSL, izmerjeni pri petih prostovoljcih (druga skupina), pred nanosom in 15, 30, 60 ter 90 minut po nanosu formulacij A in B. Slika 8A - povprečne vrednosti SSL, podane v AE $\pm$ SD; Slika 8B - povprečne vrednosti SSL, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti SSL $\pm$ SD;

60 minut po nanosu so najmanjša odstopanja izmerjenih vrednosti SSL od bazalnih (68,17% povečanje po nanosu vzorca A; 50,38% povečanje po nanosu vzorca B). Iz prikazanih podatkov lahko sklepamo, da formulacija A in formulacija B nista izrazili matirajočega učinka na koži z absorpcijo SSL, temveč se je tudi v tem primeru še enkrat izkazalo, da se je mastnost povečala po nanosu formulacij A in B.

Na sliki 9 so prikazane izmerjene vrednosti pri dveh osebah, katerih bazalne vrednosti so bile bistveno višje v primerjavi z ostalimi prostovoljci (skupina 3).



Slika 9: Povprečne vrednosti SSL, izmerjene pri dveh prostovoljcih (tretja skupina), pred nanosom in 15, 30, 60 ter 90 minut po nanosu formulacij A in B. Slika 9A - povprečne vrednosti SSL, podane v AE $\pm$ SD; Slika 9B - povprečne vrednosti SSL, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti SSL $\pm$ SD;

Tudi na sliki 9 lahko vidimo, da so najvišje vrednosti SSL ponovno izmerjene 15 minut po nanosu (79,04% po nanosu formulacije A; 55,11% po nanosu formulacije B), nato pa se vrednosti gradientno zmanjšajo. Najnižje vrednosti SSL so bile izmerjene 90 minut po nanosu vzorcev (59,01% povečanje zaradi vpliva formulacije A in 26,92% povečanje zaradi vpliva formulacije B). Opazimo, da je v vseh časovnih točkah bolj izražen vpliv formulacije A v primerjavi s formulacijo B. Tudi pri tej skupini se je potrdil trend, da sta obe preizkušeni formulaciji statistično značilno povečali mastnost kože v primerjavi z bazalno vrednostjo SSL.

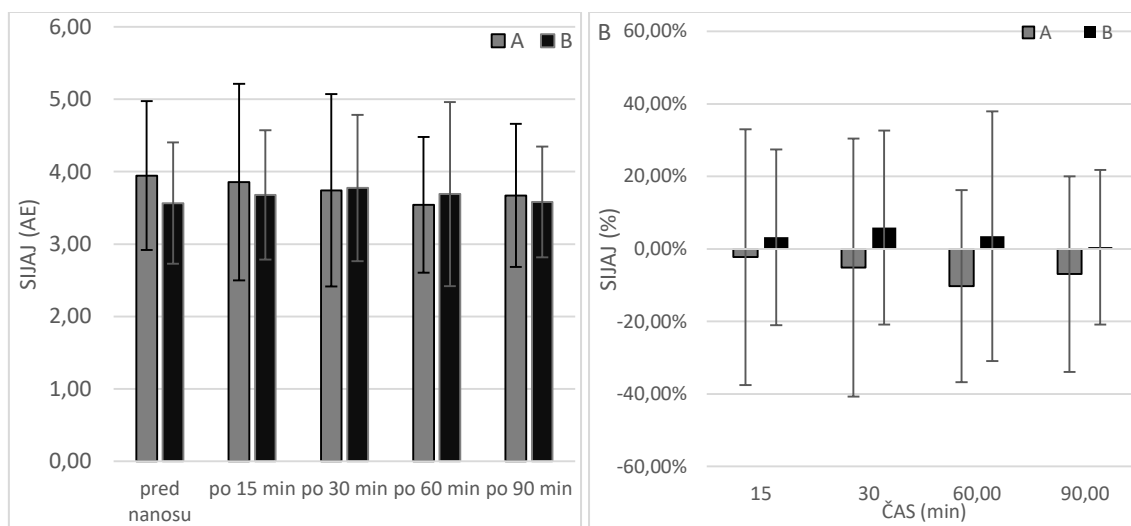
Če povzamemo zgoraj navedene rezultate, je ne glede na bazalne vrednosti kože ali strukturo formulacij, količina SSL vedno najvišja 15 minut po nanosu vzorcev. Tem rezultatom ne pripisujemo relevantnosti, saj je vzrok za tako visoke vrednosti SSL zaostanek formulacij na koži. Zanimivo je tudi to, da je stopnja povečanja SSL odvisna od bazalne vrednosti SSL. Največje odstotno povečanje je razvidno pri osebi, ki je imela izjemno nizke vrednosti SSL (slika 7). Sledijo osebe, ki so imele povprečne bazalne vrednosti SSL (slika 8), zadnji pa sta osebi, ki sta imeli višje bazalne vrednosti SSL (slika 9). Stopnja povečanja SSL ni odvisna samo od bazalne vrednosti SSL, temveč tudi od notranje strukture formulacije. Če zanemarimo rezultate po 15 minutah od nanosa, lahko rečemo, da formulacija A bolj poviša vrednosti SSL kot formulacija B. Najbolj verjeten razlog je, da se zaradi notranje strukture formulacije A (TK) na površini kože tvori okluzivna plast, zaradi katere so večje vrednosti SSL po nanosu vzorca A v primerjavi z vzorcem B (klasična emulzija). Potencialni vzrok za neizraženi absorptivni učinek pa bi lahko bil ta, da mikrodenci ne absorbirajo selektivno lipofilnih komponent s površine kože tako, kot navaja proizvajalec. Pomembno je omeniti, da tudi po uvrstitvi oseb v različne skupine, lahko še vedno opazimo nihanja v rezultatih, ki so razvidna iz SD (največji po 60 in 90 minutah). Vzroke za takšna odstopanja pripisujemo zunanjem okolju, pri katerih smo opravili vrednotenje. Zaradi letnega časa je bilo težko ohraniti idealne pogoje (temperatura: 20-22°C in vlažnost zraka: 40-60%) v prostoru. Slabost je bila tudi ta, da nismo vedeli, ali so se prostovoljci resnično držali navodil, ki smo jim jih podali pred izvajanjem študije. Dodaten vpliv imajo tudi cirkadiani ritem prostovoljcev, pritisk naprave na koži, način nanosa vzorcev na koži ter psihofizično zdravje prostovoljcev.

Zaključimo lahko, da formulacija A in formulacija B ne izražata matirajočega učinka na koži z absorpcijo SSL v notranjosti mikrodencov. Možen razlog je sestava formulacije, ki ni optimizirana oziroma celo lahko sestavine, ki tvorijo notranjo strukturo, omejujejo učinkovitost mikrodencov. Naslednji razlog, zaradi česar nismo dobili pričakovanih rezultatov, je morda tudi nezadostna količina matirajočih mikrodencov, ki so vgrajeni v formulacijah. Še vedno pa obstaja možnost, da bi formulaciji izkazali želen učinek, če bi izvedli vrednotenje pri osebah z mastno kožo (vrednosti višje kot 180 AE), ali pa, če bi izvajali vrednotenje v daljšem časovnem obdobju. Slednje pa ni sprejemljivo, saj so tovrstni izdelki namenjeni potrošnikom s suhomastnim tipom kože, ki si želijo takojšnji učinek.

4.2.2.3 REZULTATI MERITVE SIJAJA KOŽE

In vivo študijo za vrednotenje vpliva krem na sijaj smo izvedli z glosimetrom na osmih prostovoljcih na treh različnih področjih, na levi in desni strani obraza, s skupno površino 12 cm². Naš cilj je bil, da vključimo vse tri cone na obrazu - T, U in cona O. Pri coni T smo nanесли na glabeli, pri coni U pod očesom zraven obnosnega območja, pri coni O pa na izboklini brade. Na vsako področje smo nanесли po 8 mg vzorcev in z orokavičnim prstom nežno vtrli na označena področja. Nato smo nadaljevali z vrednotenjem 15, 30, 60, 90 minut po nanosu vzorcev. Dobljeni rezultati, skupaj s SD so predstavljeni v nadaljevanju.

Na sliki 10 so predstavljeni povprečni rezultati sijaja kože, izmerjenih pri vseh osmih prostovoljcih, medtem smo upoštevali vrednosti izražene z DSC.



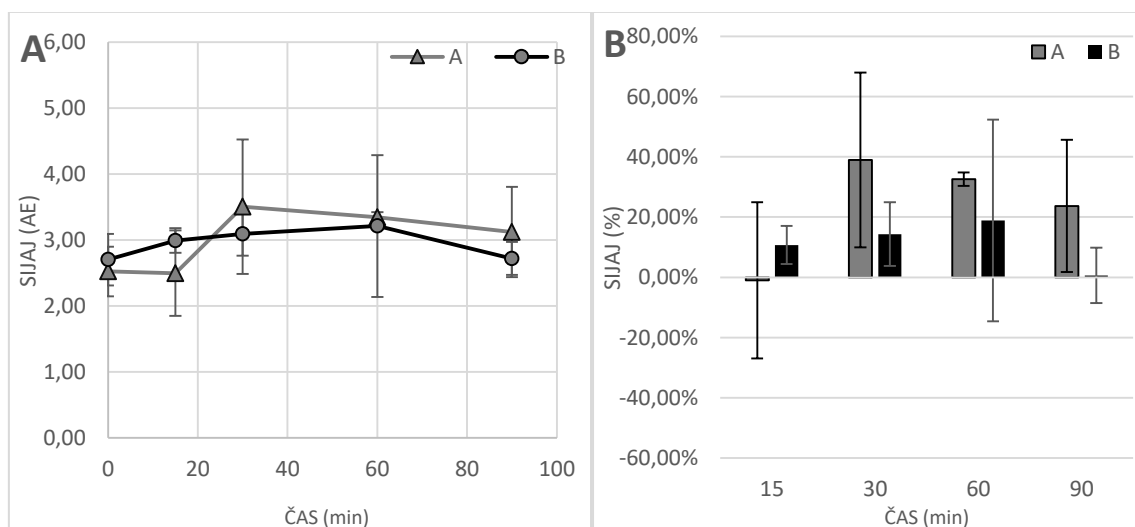
Slika 10: Povprečne vrednosti sijaja kože, izmerjene pri osmih prostovoljcih, pred nanosom in 15, 30, 60 ter 90 minut po nanosu formulacij A in B. Slika 10A - povprečne vrednosti sijaja, podane v AE $\pm$ SD; Slika 10B - povprečne vrednosti sijaja, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti sijaja kože;

Kot lahko vidimo iz slike 10, so rezultati, dobljeni z glosimetrom, pokazali, da niti ena formulacija ne povzroča pozitivnih niti negativnih učinkov na sijaj. Statistične analize so pokazale tudi, da spremembe sijaja, izmerjene 15, 30, 60 ter 90 minut po nanosu vzorcev, niso statistično značilne glede na bazalno vrednost sijaja kože. Najmanj očitne spremembe so 15 minut po nanosu vzorcev, kar je precej presenetljivo. Pričakovali smo, da bodo ravno takrat največja odstopanja in variiranja zaradi sledi formulacij, ki bi lahko vplivale na rezultate. Največje učinke lahko opazimo po 60 minutah, ko formulacija A zmanjša sijaj

približno za 10,24%, medtem ko formulacija B poviša vrednost približno za 3,49%. Opazimo lahko tudi, da glede na povprečne bazalne vrednosti sijaja in spremembe, ki nastanejo v nadaljevanju zaradi vpliva formulacij prikazanih na sliki 10, formulacija A povzroča zmanjšanje sijaja kože, medtem ko je formulacija B nasprotje.

Da bi lahko bolj natančno vrednotili učinek formulacij na koži, je potrebno upoštevati, da so imeli prostovoljci različne bazalne vrednosti sijaja, ki so se spreminjale od minimalnih 2,26 AE do maksimalnih 5,28 AE. Posledično lahko opazimo, da so vrednosti SD precej visoke (označene na sliki 10), zaradi česar smo razdelili osebe v tri različne skupine. V prvo skupino smo uvrstili osebe, pri katerih smo izmerili na levi in desni strani obraza povprečne bazalne vrednosti sijaja, nižje od 3 AE. V drugi skupini so osebe, ki so imele bazalne vrednosti sijaja med 3 in 4 AE, v tretji pa osebe, ki so imele vrednosti večje kot 4 AE.

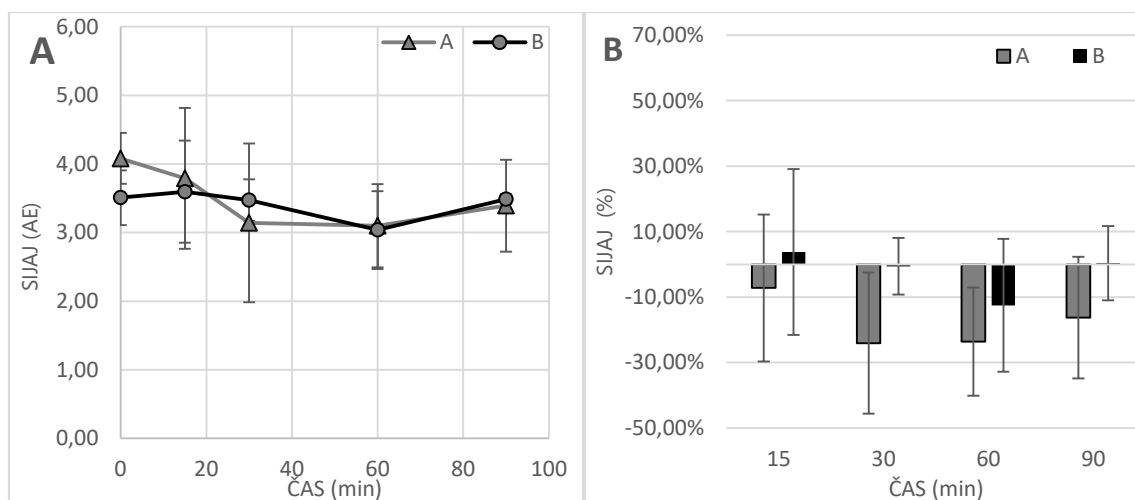
Na sliki 11 so prikazane vrednosti, izmerjene pri osebah, ki smo jih kategorizirali v prvo skupino. Bazalne vrednosti sijaja kože, ki smo jih določili v času 0, se spreminjajo od minimalnih 2,26 AE do maksimalnih 2,98 AE. Vrednosti, označene v časovni točki 15, 30, 60 in 90, so spremembe sijaja kože zaradi vpliva formulacij A in B. Iz slike 11 lahko vidimo, da formulaciji A in B izkazujeta drugačen vpliv kot povprečni rezultati, prikazani na sliki 10. Obe formulaciji povečata sijaj na koži in sicer formulacija A bolj kot formulacija B. Najbolj očitno, vendar statistično neznačilno odstopanje od bazalne vrednosti sijaja kože, je 30 minut po nanosu formulacije A (približno za 38,97%), ter 60 minut po nanosu formulacije B (približno za 18,87%).



Slika 11: Povprečne vrednosti sijaja kože, izmerjene pri dveh prostovoljcih (prva skupina), pred nanosom in 15, 30, 60 ter 90 minut po nanosu formulacij A in B. Slika 11A - povprečne vrednosti sijaja, podane v AE $\pm$ SD; Slika 11B - povprečne vrednosti sijaja, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti sijaja kože;

Po 90 minutah še vedno nobena formulacija ne zmanjša sijaja, temveč ga formulacija A celo poveča, medtem ko so po nanosu formulacije B vrednosti približno enake kot bazalne vrednosti. Zaključimo lahko, da formulacija A in formulacija B ne izražata matirajočega učinka na koži z difuznim sipanjem svetlobe.

Na sliki 12 so prikazane vrednosti, izmerjene pri štirih osebah, ki so imele povprečne bazalne vrednosti sijaja na levi in desni strani obraza, v razponu od 3 do 4 AE.

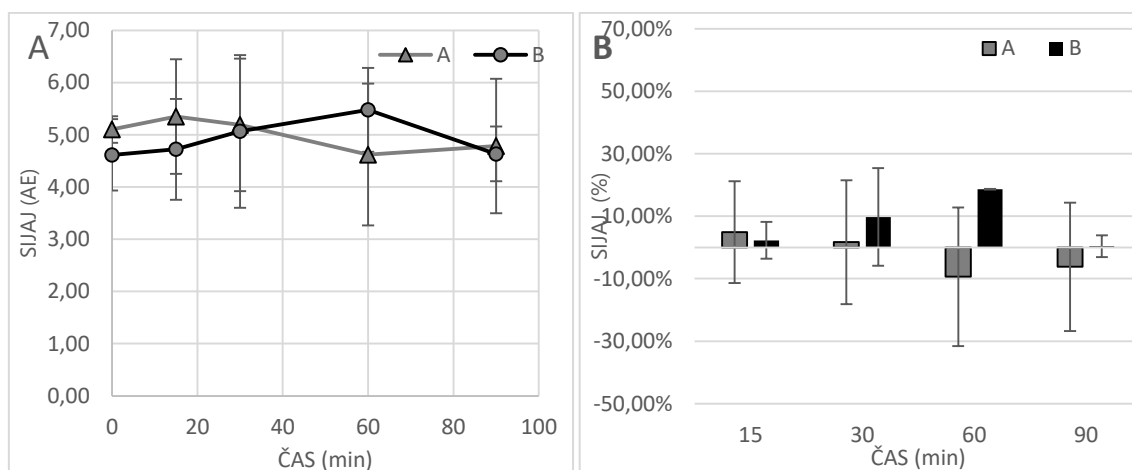


Slika 12: Povprečne vrednosti sijaja kože, izmerjene pri štirih prostovoljcih (druga skupina), pred nanosom in 15, 30, 60 ter 90 minut po nanosu formulacij A in B. Slika 12A - povprečne vrednosti sijaja, podane v AE $\pm$ SD; Slika 12B - povprečne vrednosti sijaja, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti sijaja kože;

Na sliki 12 lahko vidimo, da v primerjavi s formulacijo B, formulacija A značilno zmanjša sijaj. Največje znižanje je 30 minut po nanosu formulacije, ko se je sijaj zmanjšal približno za 24,05%. Formulacija B doseže svoj maksimum 60 minut po nanosu, ko so se vrednosti sijaja zmanjšale približno za 12,53%, kar pa je še vedno manj v primerjavi s formulacijo A (zmanjšanje za 23,59%). Iz predstavljenih rezultatov lahko rečemo, da formulacija B neznatno vpliva na sijaj kože. Zmanjšanje v samo eni časovni točki je namreč lahko posledica več dejavnikov, kot so: zunanje okolje, možnost napak pri samem vrednotenju, stik med sondo in kožo, vpliv posredne in neposredne odbite svetlobe. Za formulacijo A

smo dokazali zmanjšanje sijaja (statistično neznačilno zmanjšanje) pri osebah, ki so imele povprečne bazalne vrednosti le-tega.

Na sliki 13 so predstavljene vrednosti sijaja, izmerjene pri dveh prostovoljcih, ki smo jih uvrstili v zadnjo skupino. Njihove bazalne vrednosti sijaja so se spreminjale od 4,13 AE do 5,28 AE. Opazimo lahko, da formulacija A ponovno povzroča zmanjšanje, medtem, ko ga formulacija B poveča. Znova vidimo tudi odstopanja vrednosti formulacije B 60 minut po nanosu vzorcev. Učinkovitost formulacije A pa ni toliko izražena kot pri osebah, ki so imele povprečne vrednosti sijaja. Maksimalna učinkovitost formulacije A je dosežena 60 minut po nanosu vzorca, ko so se vrednosti zmanjšale za približno 9,38%. S statistično analizo nismo dokazali statistično značilnih razlik med bazalnimi vrednostmi sijaja kože ter vrednostmi, izmerjenimi 90 minut po nanosu vzorcev formulacij A in B. To pomeni, da formulacija A in formulacija B ne izražata matirajočega učinka na koži z difuznim sipanjem svetlobe.



Slika 13: Povprečne vrednosti sijaja, izmerjene pri dveh prostovoljcih (tretja skupina), pred nanosom in 15, 30, 60 ter 90 minut po nanosu formulacij A in B. Slika 13A - povprečne vrednosti, podane v AE $\pm$ SD; Slika 13B - povprečne vrednosti sijaja, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti sijaja kože;

Iz prikazanih rezultatov v tem poglavju lahko ugotovimo, da nobena od preizkušenih formulacij ne zmanjša sijaj kože osebam, ki so imele nizke bazalne vrednosti. Takšne rezultate smo želeli, saj ljudje, ki imajo nizke vrednosti sijaja, naj ne bi imeli težav z mastnostjo kože. Pri takšnih ljudeh torej ne želimo doseči matirajočega učinka. Pri osebah, ki so imeli povprečne in večje vrednosti sijaja, smo ugotovili, da formulacija A zmanjša te vrednosti. Zmanjšanje je bolj očitno pri osebah s povprečnimi bazalnimi vrednostmi

sijaja. Razlog za ta pojav ni znan, saj ne obstaja veliko literaturnih podatkov s to problematiko. Po našem mnenju je treba upoštevati dejstvo, da ima pri vrednotenju okolje izjemen vpliv. V preliminarni študiji smo ugotovili, da na rezultate precej vpliva posredna in neposredna svetloba okolja. Dodaten vpliv ima tudi temperatura okolja, saj vpliva na temperaturo površine kože. V primeru, da bi se temperatura spremenila samo za 1°C, lahko nastanejo do 10% spremembe v izločeni količini sebuma na koži (54). To pomeni, da bi se posredno povečal tudi njen sijaj. Dodatno imajo velik vpliv pravilna adaptacija in aklimatizacija, nanos vzorcev na koži, psihofizično zdravje prostovoljcev ter natančnost izvedbe postopka vrednotenja sijaja kože.

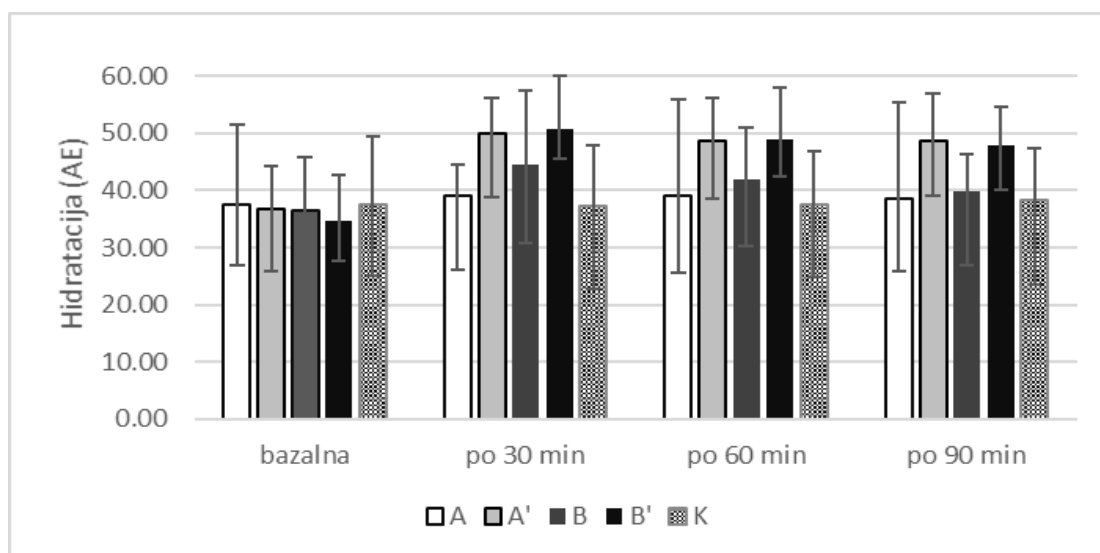
Če o vplivu formulacij na kožo pogledamo iz drugega zornega kota, torej v odvisnosti od njihove notranje strukture, lahko ugotovimo, da obstaja razlika med formulacijama v učinkovitosti. Formulacija A, ki vsebuje promotorje TK, bolj bistveno spremeni vrednosti (pri povečanju kot tudi pri zmanjšanju sijaja kože) v primerjavi s formulacijo B, ki je klasična emulzija. Kot smo omenili že prej, ni literaturnih priporočil, ki bi nam pomagale pri analiziranju in vrednotenju dobljenih rezultatov z glosimetrom, zato ne vemo, če je 24,05% zmanjšanje sijaja kože (v drugi skupini, 30 minut po nanosu vzorca A) zadostna vrednost za trditev, da formulacija A povzroča matirajoči učinek z zmanjšanjem sijaja kože. V drugem primeru, po nanosu formulacije B je očitno, da nismo dobili zelenega učinka niti pri eni skupini. Klasična emulzija torej ne izkazuje zmanjšanja sijaja kože v primerjavi z bazalnimi vrednostmi sijaja kože.

Zaključimo lahko, da je formulacija B neprimerna za zmanjšanje sijaja kože, medtem ko je formulacija A pogojno primerna, saj ni obdržala učinkovitosti za daljši čas. Glavni vzrok vidimo v nezadostni količini matirajočih mikrodelcev. Menimo, da je potrebno nadaljnje vrednotenje formulacije A skozi daljši čas z večjim številom oseb, še posebej z osebami, ki imajo mastno kožo.

4.2.2.3 REZULTATI MERTIVE HIDRATACIJE KOŽE

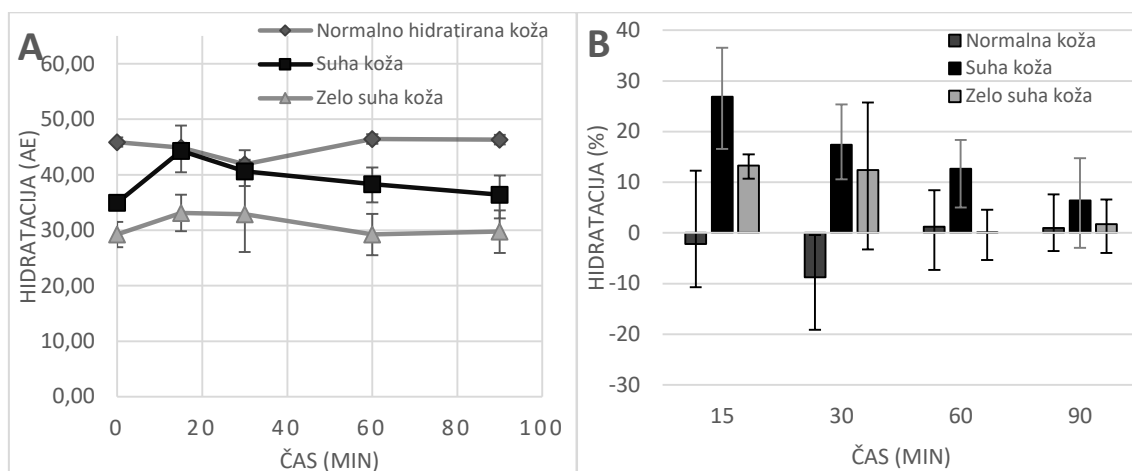
In vivo študijo za vrednotenje vpliva krem na hidratacijo kože smo izvedli na osmih prostovoljcih. Merili smo bazalno hidratacijo kože pred nanosom formulacij A, B, A' in B'. Hkrati smo izmerili še bazalno hidratacijo kože na kontrolnem področju (K), potem pa sledili in opazovali spremembe, ki so nastale zaradi vpliva zunanjih dejavnikov. Po nanosu formulacij smo ugotavljali razlike v hidraciji kože, ki so se pojavile po 15, 30, 60 in 90 minutah na označenih področjih, na notranji strani podlakti. Namen *in vivo* študije

je bil ugotoviti, ali se bo po nanosu formulacij A in B povečala hidratacija. Prav tako je namen ugotoviti, ali obstaja razlika v vplivu na hidratacijo med notranjo strukturo TK in notranjo strukturo klasične emulzije, v katerih so vgrajeni mikrodenci ter ugotoviti ali mikrodenci vplivajo na hidratacijo kože. Rezultati študije so prikazani na slikah 14–19. Pri vseh vrednostih je označena tudi SD.



Slika 14: Povprečne bazalne vrednosti in vrednosti hidratacije kože po 30, 60 in 90 minutah od nanosa formulacije pri vseh osmih prostovoljcih $\pm$ SD. A - TK z vgrajenimi mikrodenci, A' - TK brez vgrajenih mikrodelcev, B - klasična emulzija z vgrajenimi mikrodenci, B' - klasična emulzija brez mikrodelcev, K - kontrola.

Iz prikazanih rezultatov na sliki 14 lahko vidimo, da formulaciji A in B bistveno ne povečata hidratacije kože. To so pokazale tudi statistične analize. Nasprotno pa formulaciji A' in B', ki nista vsebovali matirajočih mikrodelcev, izkazujejo čisto drugačen vpliv, saj se je hidratacija kože po nanosu značilno povečala v primerjavi z bazalno vrednostjo (slika 14). Lahko opazimo tudi, da je pri vseh vrednostih SD precej visoka. Glavni vzrok za ta pojav je razlika med bazalnimi vrednostmi hidratacije kože prostovoljcev, ki so bili v razponu od 24,07 AE do 51,44 AE. Zaradi tega smo z upoštevanjem preglednice (podane s strani proizvajalca korneometra), prostovoljce znova razvrstili v tri manjše podskupine. V prvo skupino spadajo osebe, ki so imele povprečne bazalne vrednosti hidratacije nižje od 30 AE (zelo suha koža), v drugo skupino osebe, ki so imele povprečne bazalne vrednosti od 30 do 40 AE (suha koža) in v tretjo skupino, ki so imele povprečne bazalne vrednosti nad 40 AE (dobro hidratirana koža).

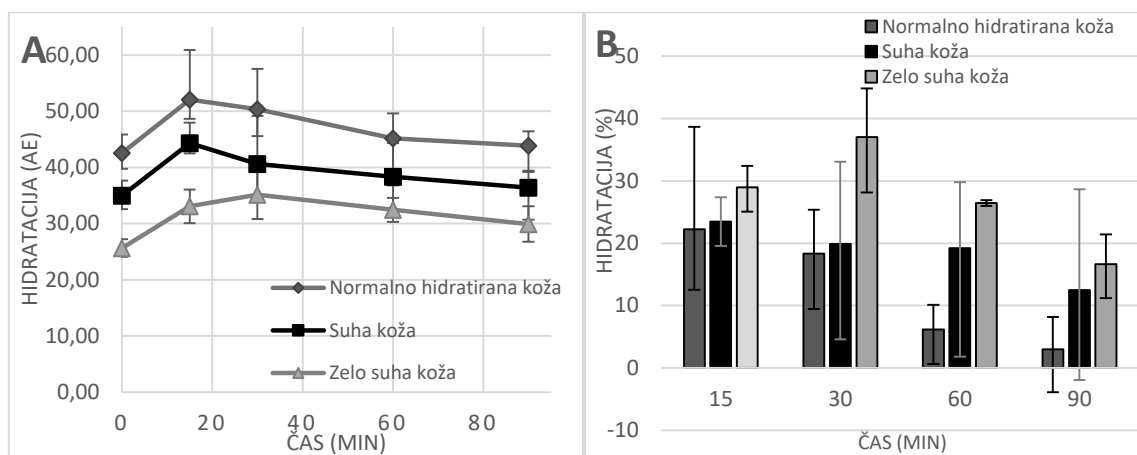


Slika 15: Povprečne vrednosti hidratacije zelo suhe, suhe in dobro hidratirane kože pred nanosom in 15, 30, 60, 90 minut po nanosu formulacije A. Slika 15A - povprečne vrednosti hidratacije kože, podane v AE $\pm$ SD; Slika 15B - povprečne vrednosti hidratacije kože, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti hidratacije kože;

Na sliki 15 so prikazane povprečne spremembe v hidrataciji kože po nanosu vzorca A. Glede na dobljene rezultate lahko opazimo, da so največje razlike in odstopanja v prvih 15 minutah, kar verjetno temelji na tem, da so na koži še vedno sledi formulacije. Po nanosu formulacije A se je hidratacija dobro hidratirane kože zmanjšala po 15 minutah (za približno 2,2 %) in po 30 minutah (za približno 8,6 %). Ta pojav si razlagamo tako, da se zaradi normalne hidratacije, krema A, ki vsebuje TK, počasi vpije v kožo, zaradi česar nastane okluzivni plašč na površini kože (27), v katerega so vgrajeni še matirajoči mikrodenci. Možno je tudi, da matirajoči mikrodenci ne absorbirajo selektivno samo lipofilnih komponent, temveč tudi hidrofilne sestavine iz površine kože.

Iz slike 15 je razvidno, da rezultati pri suhi koži bolj odstopajo v primerjavi z zelo suho in dobro hidratirano. Presenetljivost v teh podatkih je v tem, da smo pričakovali enako ali celo višje povečanje hidratacije pri osebah, ki so imele zelo suho kožo. 90 minut po nanosu vzorcev pa je povečanje hidratacije pri osebah z vsemi tremi tipi kože statistično neznačilno.

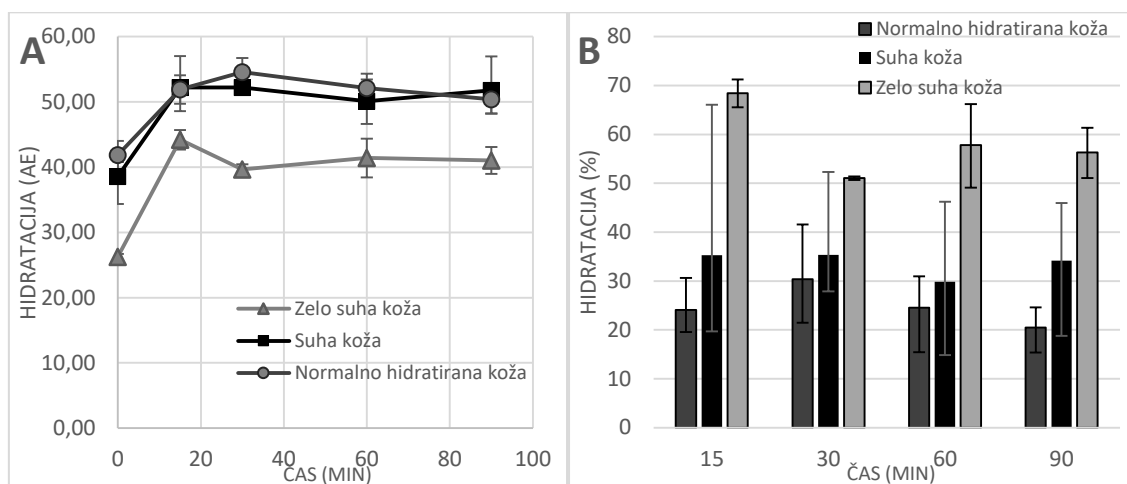
Na sliki 16 so predstavljeni rezultati, dobljeni po nanosu formulacije B.



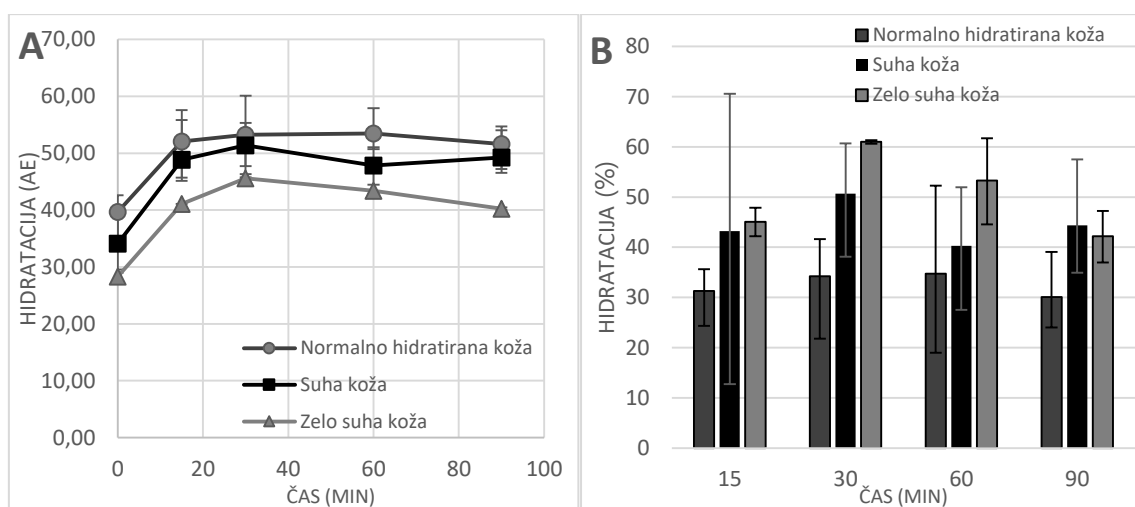
Slika 16: Povprečne vrednosti hidratacije zelo suhe, suhe in normalno hidratirane kože pred nanosom in 15, 30, 60, 90 minut po nanosu formulacije B. Slika 16A - povprečne vrednosti hidratacije, podane v AE $\pm$ SD; Slika 16B - povprečne vrednosti hidratacije, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti hidratacije kože;

Za razliko od rezultatov, dobljenih po nanosu formulacije A (slika 15), lahko na sliki 16 vidimo, da se po nanosu formulacije B hidratacija poveča pri osebah z vsemi tipi kože. Najbolj značilno je povišanje hidratacije pri zelo suhi. 15 minut po nanosu vzorca B se je hidratacija slednje povečala za najvišji odstotek (približno za 28,9 %), potem je sledila suha koža (približno za 23,48 %) ter na koncu normalno hidratirana (približno za 22,25 %). Visoke vrednosti hidratacije smo izmerili tudi 30 minut po nanosu, še posebej pri zelo suhi koži (vrednosti so se povečale za približno 36,99%). 60 in 90 minut po nanosu formulacije B opazimo, da vpliv na hidratacijo ni značilen, še posebej pri osebah, ki so imele normalno hidratiran tip. Sklepamo lahko, da formulacija B skozi daljše obdobje ne ohranja vlažilnega učinka na njej.

Na slikah 17 in 18 so predstavljeni rezultati, ki smo jih dobili po nanosu kontrolnih formulacij A' in B', v katere nismo vgradili matirajočih mikrodlecev, ampak so namesto njih vsebovale enak masni delež vode. S tem smo hoteli ugotoviti, ali prisotnost mikrodlecev v formulaciji A in B značilno vpliva na spremembe hidratacije.



Slika 17: Povprečne vrednosti hidratacije zelo suhe, suhe in normalno hidratirane kože pred nanosom in 15, 30, 60, 90 minut po nanosu formulacije A'. Slika 17A - povprečne vrednosti hidratacije, podane v AE $\pm$ SD; Slika 17B - povprečne vrednosti hidratacije, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti hidratacije kože;



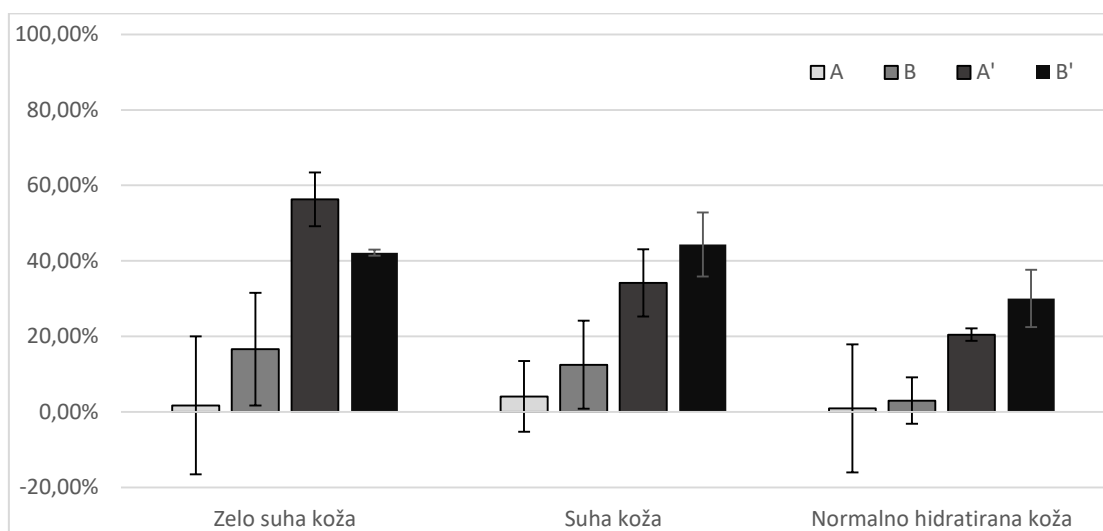
Slika 18: Povprečne vrednosti hidratacije zelo suhe, suhe in normalno hidratirane kože pred nanosom in 15, 30, 60, 90 minut po nanosu formulacije B'. Slika 18A - povprečne vrednosti hidratacije, podane v AE $\pm$ SD; Slika 18B - povprečne vrednosti hidratacije, podane v % izračunane na podlagi bazalne vrednosti hidratacije kože;

Iz zgoraj prikazanih rezultatov je razvidno, da kljub temu da so si formulacije A in A', B in B' med seboj zelo podobne, je njihov vpliv na hidratacijo povsem različen. Formulacija A' bistveno bolj poveča hidratacijo, kot formulacija A. Hidratacija se je pri zelo suhi koži po nanosu formulacije A' značilno povečala, drugo največje povečanje hidratacije je

opazno pri suhi, najmanj pa se je spremenila pri normalni koži. Najbolj zanimiv podatek je, da ni statistične značilne razlike med rezultati, dobljenimi po 15 in 90 minutah po nanosu vzorca, iz česar lahko zaključimo, da formulacija A' ohranja svoji učinek skozi daljše obdobje.

Če primerjamo formulaciji B in B', se je hidratacija kože značilno povečala po nanosu formulacije B' (slika 18). Najbolj značilna razlika in najbolj učinkovit vpliv formulacije B' se lahko opazi 30 minut po nanosu vzorca, ko se hidratacija zelo suhe kože poveča za približno 60,1 %. Takrat se tudi hidratacija suhe kože poveča približno za 50,7 % ter dobrohidratirane približno za 34,2 %. Potem se vrednosti hidratacije rahlo znižujejo, a še vedno statistično neznatno v nasprotju z vrednostmi, izmerjene 15 minut po nanosu vzorcev.

Na sliki 19 so predstavljene povprečne vrednosti hidratacije kože, ki smo jih izmerili pred nanosom in 90 minut po nanosu vzorcev A, A', B in B' na zelo suhi, suhi in normalno hidratirani koži. Hkrati so označene tudi SD.



Slika 19: Delež povečanja hidratacije zelo suhe, suhe in normalno hidratirane kože 90 minut po nanosu vzorcev A, B, A' ter B', izračunane na podlagi bazalne vrednosti hidratacije kože.

Kot je razvidno iz rezultatov (slike 16, 17, 18 in 19), ima najmanjši vpliv na hidratacijo formulacija A oz. krema, v kateri smo mikrodcelce vgradili z notranjo strukturo TK. 90 minut po nanosu je njen vpliv na hidratacijo neznačilen za vse tipe. Podobne rezultate smo dobili tudi pri formulaciji B, kjer smo mikrodcelce vgradili v klasično emulzijo. Formulaciji A' in B' brez vgrajenih mikrodcelcev izkazujeta popolnoma drugačen učinek.

90 minut po nanosu vzorcev sta značilno povečali hidratacijo. Pri zelo suhi koži je bolj učinkovita formulacija A', pri suhi in normalno hidratirani pa je vpliv formulacije B' večji.

V raziskovalnem delu so Savić in sodelavci preučevali vpliv vlažilcev, vgrajenih v TK kot nosilni sistem. Raziskave so pokazale, da sistemi, stabilizirani z APG emulgatorji, lahko značilno povišajo hidratacijo kože in učinek traja dalj časa. Pričakovali so tudi sinergijo med vlažilci (mlečna kislina in sečnina) in TK, vendar so rezultati pokazali, da TK niso primerna struktura za vgraditev močnih vlažilcev. Izkazalo se je, da vlažilci močno vežejo prosto in interlamelarno ujeto vodo iz nosilnega sistema, zaradi česar se ne izraža maksimalna učinkovitost pri negi dobro hidratirane in suhe kože. Izjema pa je zelo suha, pri kateri so te iste formulacije povzročale zelo učinkovito hidratacijo (62). Iz zaključkov te študije lahko sklepamo, da je učinek vzorca A' odvisen tako od bazalne hidratacije kot tudi od količine vgrajenih vlažilcev v formulaciji, ki so v našem primeru butilen glikol, glicerol ter hialuronska kislina. Razlika med učinkovitostjo formulacije A in A' verjetno temelji na tem, da pri formulaciji A (v kateri je količina vode manjša kot v formulaciji A') higroskopne in vlažilne snovi zelo močno vežejo vodo, ki je vgrajena v sistemu in posledično tudi pri zelo suhi koži nismo mogli opaziti povečanje hidratacije. Dodaten vpliv ima lahko tudi polarnost lipofilnih sestavin v sami formulaciji (31). Zaradi tega bi morali vrednotenje hidratacije kože po nanosu formulacije A in A' izvajati tudi daljši čas, (60). Po drugi strani pa takojšna učinkovitost formulacije B' verjetno temelji na tem, da je klasična emulzija s strukturnega vidika bolj primerna za vgraditev močne higroskopne in vlažilne učinkovine. Razlika med hidratijsko učinkovitostjo formulacij B in B' je najbrž zaradi količine vode, ki je močneje povezana s higroskopnimi snovi v formulaciji B.

Zaključimo lahko, da se hidratacija kože ni statistično značilno povečala po nanosu formulacij, ki sta vsebovali matirajoče mikrodelfce (formulacija A in B). Če dodatno primerjamo formulaciji A in B, lahko ugotovimo, da je formulacija B (klasična emulzija) bolj primerna za izražanje vlažilnega učinka. Hkrati se je izkazalo, da je klasična emulzija bolj učinkovita za nego kože oseb, ki smo jih uvrstili v skupine s suho in dobro hidratirano kožo.

5. SKLEP

V sodelovanju s podjetjem Ilirija d.o.o. smo izdelali dve kremi, ki naj bi bili namenjeni za nego mastne kože. Kremi sta se med seboj razlikovali v notranji strukturi. Pri pripravi prve formulacije, označena z A, smo uporabili promotorje tekočih kristalov (Montanov L in Montanov 82). Za pripravo druge formulacije, označene z B, smo uporabili klasičen anionski emulgator (Lanatte N). Obe kremi sta vsebovali enako količino mikrodelcev z matirajočim učinkom na koži. Izdelali smo še dve formulaciji, ki sta identični kot prvi dve, le da ti formulaciji nista imeli vgrajenih mikrodelcev, služili sta kot kontroli pri vrednotenju hidratacije.

Na začetku smo vrednotili strukturi formulacij, ki sta vsebovali promotorje tekočih kristalov. Pri obeh formulacijah smo videli naključno razporejene anizotropne strukture, znane kot malteški križi, kar so potrditev za prisotnost lamelarnih tekočih kristalov v naših vzorcih. Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da so promotorji uspešno tvorili tekoče kristale kot notranjo strukturo sistema. Sklepali smo, da vgraditev mikrodelcev ni preprečila tvorbe tekočih kristalov.

Izvedli smo preliminarno testiranje količine površinskih lipidov kože, sijaja kože ter hidratacije kože, ki je podlaga za pripravo osnovnega načrta izvedbe *in vivo* študije. Nato so sledile *in vivo* študije, pri katerih je sodelovalo 12 prostovoljcev obeh spolov, v starosti od 21 do 24 let. Ugotovili smo, da obe formulaciji ne zmanjšata količine površinskih lipidov na koži, temveč jih statistično značilno povečata. Bolj značilno povečanje smo opazili po nanosu formulacije, ki je imela notranjo strukturo tekočih kristalov, kar pomeni, da je vpliv formulacij na koži odvisen od njune notranje strukture. Ugotovili smo, da je povečanje količine površinskih lipidov na koži odvisna tudi od bazalne vrednosti le-teh. Največje povečanje je bilo razvidno pri osebah, ki so imele najnižje bazalne vrednosti površinskih lipidov, nato so sledile osebe s povprečnimi vrednostmi, zadnje pa so bili osebe, pri katerih smo izmerili najvišje bazalne vrednosti površinskih lipidov kože.

Pri vrednotenju vpliva formulacij na sijaj kože se je izpostavilo, da klasična emulzija ne izkazuje zelenega učinka. Od nanosa vzorca klasične emulzije pa vse do 90 minut po njem, nismo opazili statistične značilne spremembe sijaja kože, medtem ko smo ugotovili, da je po nanosu formulacije, ki je vsebovala promotorje tekočih kristalov značilno zmanjšala sijaj pri osebah, ki so imele povprečne vrednosti sijaja kože. Vrednosti so se zmanjšale

tudi pri osebah, ki so imele najvišje izmerjene bazalne vrednosti, vendar ne toliko, da bi jih definirali kot statistično značilne spremembe.

Pri vrednotenju vpliva formulacij na hidratacijo kože, smo ugotovili, da klasična emulzija poveča vrednosti za večji odstotek kot formulacija, ki tvori tekoče kristale, a pri obeh formulacijah še vedno govorimo o statistično neznačilnih spremembah. Kontrolni formulaciji, ki nista vsebovali matirajočih mikrodolcev, statistično značilno povečata hidratacijo. To pomeni, da imajo poleg notranje strukture formulacij vpliv na hidratacijo tudi mikrodolci z matirajočim učinkom. Dejstvo pa je, da klasična emulzija zaenkrat predstavlja boljšo izbiro za takojšnji učinek. Za podroben, bolj natančen vpliv tekočih kristalov na hidratacijo so še vedno potrebna nadaljnja raziskovanja, ki morajo trajati bistveno več kot 90 minut od nanosa vzorcev.

Iz zgoraj omenjenih podatkov lahko sklepamo, da sta formulaciji neprimerni za nego mastne kože. Razlog za to je lahko, da je količina vgrajenih mikrodolcev nezadostna. Vprašljivo je vgrajevanje večjih količin mikrodolcev v formulaciji, saj bi to lahko povzročalo dehidratacijo kože. A glede na to, da nismo opazili učinkovitosti pri formulaciji, ki je vsebovala tekoče kristale in pri formulaciji, ki je bila klasična emulzija, je potreba po izboljšanju obeh formulacij očitna. Potrebno pa je omeniti, da smo vrednotenje izvajali v pogojih, ki jih nismo zmogli kontrolirati (vplivi zunanjega okolja). Bilo je tudi premajhno število prostovoljcev, da bi lahko govorili o njihovem vplivu na lastnosti kože. Poleg izboljšanja formulacij, bi za nadaljnje delo predlagali, da se *in vivo* študije izvaja v spomladanskem ali jesenskem času ter poveča število prostovoljcev, ki imajo težave z mastno kožo.

6. LITERATURA

- 1 C. Granger in H. Pernot, „Method for treating non-acneic oily skin“. Patent number WO2012080935A1; Date of patent Jun 21, 2012.
- 2 R. Arbuckle, M. Clark, J. Harness, N. Bonner, J. Scott, Z. Draelos, R. Rizer, Y. Yeh in K. Copley-Merriman, „Item reduction and psychometric validation of the Oily Skin Self Assessment Scale (OSSAS) and the Oily Skin Impact Scale (OSIS),“ *Value Health*, 2009; 12(5): 828-837.
- 3 Z. D. Draelos, A. Matsubara in K. Smiles, „The effect of 2% niacinamide on facial sebum production,“ *J Cosmet Laser Ther*, 2006; 8(2):96-101.
- 4 V. Y. Shi, M. Leo, L. Hassoun, D. S. Chahal, H. I. Maibach in R. K. Sivamani, „Role of sebaceous glands in inflammatory dermatoses,“ *J Am Acad Dermatol*, 2015; 73(5):856-863.
- 5 R. Rizer, „Oily Skin: Claim Support Strategies,“ v *Cosmetics:Controlled Efficacy Studies and Regulation*, Springer, Berlin; New York, 1999; 81-91.
- 6 T. Mitsui: New Cosmetic Science.Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1997; 28-29.
- 7 http://www.dermalinstitute.com/us/library/18_article_The_Top_Three_Causes_of_Dry_Dehydrated_Skin.html (4.11.2016)
- 8 Y. Cheng, Y. Dong, J. Wang, M. Dong, Y. Zou, D. Ren, X. Yang, M. Li, A. Schrader, M. Rohr in W. Liu, „Moisturizing and anti-sebum secretion effects of cosmetic application on human facial skin“ v *J Cosmet Sci*, 2009; 60(1):7-14
- 9 P. Clarys in A. Barel, „Quantitative evaluation of skin surface lipids,“ *Clin Dermatol*, 1995;13 (4): 307-21.
- 10 W. Abramovits in A. Gonzalez-Serva, „Sebum, cosmetics, and skin care,“ *Dermatol Clin*, 2000; 18(4): 617-620.
- 11 M. Roh, M. Han, D. Kim in K. Chung, „Sebum output as a factor contributing to the size of facial pores,“ *Br J Dermatol*, 2006; 155 (5): 890-894.
- 12 P. W. Wertz in B. B. Michniak, „Sebum,“ v *Cosmeceuticals: Drugs vs. Cosmetics*, CRC 1Press, New York, 2000; 58-69.
- 13 T. Nasemann, W. Sauerbrey, W. H. C. Burgdorf, „Seborrheic Dermatitis and Acne“, v *Fundamentals of Dermatology*, Springer-Verlag, New York, 1983; 187-196
- 14 V. Wienert, „Skin Gloss Metry,“ v *Cosmetics:Controlled Efficacy Studies and Regulation*, Springer, Berlin, 1999: 209-214.

- 15 L. Li in C. So-ling Ng, „A Physically-based Human Skin Reflection Model,“ v *International Conference on automation and information*, Prague, 2009; 25-30.
- 16 R. P. Wickett, L. D. Rluen in S. Babajanyan, „Noninvasive Techniques to Measure Cutaneous Effects of Skin Care Products“, v *Surfactants in Personal Care Products and Decorative Cosmetics*, 3rd Edition, CRC Press, Surfactant Science Series, 2007; 57-95.
- 17 H. Dobrev, „Products for Impure, Acne-Like Skin,“ v *Practical Aspects of Cosmetic Testing: How to Set up a Scientific Study*, Springer, Berlin, 2011; 155-168.
- 18 M. Smith, „Toners and Astringents,“ v *Cosmetic Formulation of Skin Care Products*, CRC Press, New York, 2005; 67-77
- 19 Y. Lipovetskaya, „Cosmetics&Toiletries,“ *Cosmetics & Toiletries*, 24 April 2013.
<http://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/function/pigment/premium-Solid-Polyethylene-Microspheres-for-Effects-in-Color-Cosmetics-204486761.html>.
(1.8.2016)
- 20 L. Liu, R. Spindler in K. Cureton, „Matte skin finish compositions“. Patent number US 20120014888A1; Date of patent Jan 19, 2012.
- 21 C. Orr, „Kobo Products Inc.,“ 14 April 2008.
[http://www.koboproductsinc.com/Downloads/\(x\)Form_MicrosInCos08.pdf](http://www.koboproductsinc.com/Downloads/(x)Form_MicrosInCos08.pdf). (1.8.2016)
- 22 „In-CosmeticsAsia,“Marec,2014.http://www.in-cosmeticsasia.com/__novadocuments/99547?v=635756601427830000. (1.8. 2016)
- 23 R. Jeffrey, D. J. Brian, P. Chandar, M. N. Gerard De Mul in J. Polonka, „Pigmented cosmetic composition exhibiting radiance with soft focus“. Patent number US 7695726 B2, Apr 13, 2010.
- 24 M. Lindberg in B. Forslind, „The Skin as a Barrier,“ v *Dry Skin and Moisturizers, Chemistry and Function*, CRC Press, Boca Raton, 2006; 9-21.
- 25 C. R. Harding in A. V. Rawlings, „Effects of Natural Moisturizing Factor and Lactic Acid Isomers on Skin Function“, v *Dry Skin and Moisturizers, Chemistry and Function*, CRC Press, Boca Raton, 2006; 187-204.
- 26 J. Fowler, „Understanding the Role of Natural Moisturizing Factor in Skin Hydration“ v *Practical Dermatology*, July, 2012; 36-40.

- 27 A. Kligman, „Introduction: Perspectives and Prospects“ v *Dry Skin and Moisturizers, Chemistry and Function*, CRC Press, Boca Raton, 2006; 1-4.
- 28 <http://www.gcimagazine.com/business/rd/technology/83368522.html> (4.11.2017)
- 29 G. Mirjam in M. Gašperlin, „Tekoči kristali v farmaciji: struktura in metode za fizikalno-kemijsko vrednotenje,“ *Farm Vestn*, 2011; 62 (1): 15-24.
- 30 S. Savić, I. Pantelić in M. Lukić, „Behind the 1 Polyglucoside- based structures: Lamellar liquid crystalline and lamellar gel phases in different emulsion systems,“ v *Alkyl Polyglucosides*, Elsevier, Belgrade, 2014; 24-33.
- 31 M. Lukic, I. Pantelic, R. Daniels, C. Muller-Goymann, M. Savic in S. Savic, „Moisturizing emulsion systems based on the novel long-chain alkyl polyglucoside emulsifier: The contribution of thermoanalytical methods to the formulation” v *J Therm Anal Calorim*, 111 (3) (2012): 2045-2057
- 32 A. O. Barel, P. Clarys, B. Gabard, „In Vivo Evaluation of the Hydration State of the Skin: Measurements and Methods for Claim Support“ v *Cosmetics:Controlled Efficacy Studies and Regulation*, Springer, Berlin, 1999: 57-80.
- 33 <http://cosmetics.specialchem.com/inci/tetrasodium-edta>. (1.8.2016)
- 34 <http://cosmetics.specialchem.com/inci/butylene-glycol>. (1.8.2016)
- 35 <http://cosmetics.specialchem.com/product/i-seppic-montanov-1> (16.5.2016)
- 36 <http://cosmetics.specialchem.com/product/i-seppic-montanov-82> (16.5.2016)
- 37 <http://cosmetics.specialchem.com/inci/glycerin>. (1.8.2016)
- 38 <https://www.ulprospector.com/en/na/PersonalCare/Detail/75/109532/Lanette-O>. (1.8.2016)
- 39 <https://www.ulprospector.com/en/na/PersonalCare/Detail/75/32005/Lanette-N?st=1&sl=46460635&crit=a2V5d29yZDpbTGZXR0ZcKuIE5d&ss=2&k=Lanette%C2%AE|N&t=Lanette%C2%AE+N> (16.5.2016)
- 40 <http://cosmetics.specialchem.com/inci/bht>. (1.8.2016)
- 41 <http://www.surfachem.com/abil-soft-af-100>. (1.8.2016)
- 42 <https://www.ulprospector.com/en/na/PersonalCare/Detail/75/31821/Cetiol-SN>. (1.8.2016)
- 43 <http://cosmetics.specialchem.com/product/i-clariant-aristoflex-avc>. (1.8.2016)
- 44 <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0129&from=SL>. (9.8.2016)

- 45 <https://www.seppic.com/sepimat-sb> (16.5.2016)
- 46 <https://www.ulprospector.com/en/eu/PersonalCare/Detail/3029/216668/SymOcide-PS>. (1.8.2016)
- 47 <http://cosmetics.specialchem.com/inci/hyaluronic-acid>. (1.8.2016)
- 48 <https://www.ulprospector.com/en/na/PersonalCare/Detail/613/34445/RonaCare-Ectoin>. (1.8.2016)
- 49 <https://www.magnolija.si/montanov-l.html> (1.8.2016)
- 50 R. B. Rigon, A. R. Piffer, A. A. S. Lima, A. E. Bighetti in M. Chorilli, „Influence of Natura Polymer Derived From Starch as a Sensory Modifier in Sunscreen Formulations,“ *Int J Pharm Pharm Sci*, 2013; 5 (1): 306-309.
- 51 <http://www.seppic.com/texturizing-agent-mattifying-powder-sepimat-sb-@/view-2383-seproduit.html?jsessionid=TQFABLuR5EORLQy9dBSOkQ?menuid=,841,&>. (1.8.2016)
- 52 <http://www.in-cosmeticsasia.com/novadocuments/99547?v=635756601427830000> (1.8.2016)
- 53 E. Csizmazia, M. Budai-Szucs, I. Eros, Z. Makai, P. Szabo-Revesz, G. Varju in E. Csanyi, „Thermoanalytical method for predicting the hydration effect permanency of dermal semisolid preparations,“ *J Therm Anal Calorim*, 2010; 102: 313–316.
- 54 R. Darlenski in J. W. Fluhr, „Moisturizers and Emollients,“ v *Practical Aspects of Cosmetic Testing: How to Set up a Scientific Study in Skin Physiology*, Springer, Berlin, 2011; 123-141.
- 55 H. Tagami, „Epidermal Hydration: Measurement of High-Frequency Electrical Conductance,“ v *Handbook of Non-Invasive Methods and The Skin*, 2nd ured., CRC Press, Boca Raton, 2006; 329-336.
- 56 A. O. Barel in P. Clarys, „Measurement of Epidermal Capacitance,“ v *Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin*, 2nd ured., Boca Raton, CRC Press, 2006; 337-344
- 57 S. Y. Pande in R. Misri, „Sebumeter,“ *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2015;71(6):444-446.
- 58 COURAGE+KHAZAKA electronic GmbH, „SM-The Sebumeter SM 815,“ 21 December 2015. <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/all-downloads/downloads-en/file/242-anleit-sm-sonde-e>. (1.8.2016)

- 59 C. V. Wa in H. I. Maibach, „Mapping the human face: biophysical properties,“ *Skin Res Technol*, 2010; 16 (1): 38-54.
- 60 COURAGE+KHAZAKA electronic GmbH, „GL-The Skin-Glossymeter GL-200,“ 21 December 2015. <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/all-downloads/downloads-en/file/245-anleit-gl-sonde-e>. (30.7.2016)
- 61 COURAGE + KHAZAKA electronic GmbH, „CM-The Corneometer CM 825,“ 21 December 2015. <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/all-downloads/downloads-en/file/244-anleit-cm-sonde-e>. (30.7.2016)
- 62 I. Pantelić: *Alkyl Polyglucosides: From Natural-Origin Surfactants to Prospective Delivery Systems*, Elsevier Limited, Cambridge, Waltham, Kidlington, 2014: 21-52