

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA KONČAN

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2018

FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA KONČAN

RAZVOJ ČISTILNE MIKROEMULZIJE Z NIACINAMIDOM

**DEVELOPMENT OF CLEANSING MICROEMULSION
CONTAINING NIACINAMIDE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2018

Diplomsko delo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm. in v razvojnem laboratoriju slovenskega podjetja Ilirija d. d.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag. farm., za pomoč, usmeritev in strokovne nasvete, ki sem s veseljem uporabila pri izdelavi diplomske naloge.

Posebna zahvala gre mag. Zdenki Koren, vodji razvoja in kakovosti v podjetju Ilirija d. d., ki mi je omogočila sodelovanje pri izdelavi novega kozmetičnega izdelka v njihovem razvojnem laboratoriju. Zahvaljujem se tudi Damjani Mihelič in Evi Ogrin za čas, nasvete in pomoč pri eksperimentalnem delu moje diplomske naloge v razvojnem laboratoriju v podjetju Ilirija d. d. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž, mag. farm. za napotke in pomoč pri delu z Glossyrom.

Največja zahvala pa gre mojima staršema, ker sta mi omogočila študij ter me vzpodbujala in podpirala tekom študija in izdelave diplomske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm.

Vesna Končan

VSEBINA

POVZETEK	i
KLJUČNE BESEDE	i
SEZNAM OKRAJŠAV	ii
1. UVOD	1
1.1 SPLOŠNO O AKNAH	1
1.2 ČIŠČENJE AKNASTE KOŽE	3
1.2.1 NAČINI POVRŠINSKEGA ČIŠČENJA KOŽE	3
1.2.2 ČISTILNI IZDELKI ZA AKNASTO KOŽO	4
1.3 MIKROEMULZIJE	5
1.3.1 (PSEVDO)TRIKOMPONENTNI DIAGRAM	7
1.4 NIACINAMID	10
2. NAMEN DELA	12
3. MATERIALI IN METODE	13
3.1. MATERIALI	13
3.2. PRIPOMOČKI	15
3.3 METODE	16
3.3.1 PRIPRAVA VZORCEV MIKROEMULZIJ	16
3.3.2 MERJENJE pH-VREDNOSTI	16
3.3.3 MERJENJE VISKOZNOSTI	17
3.3.4 PREVERJANJE TIPA MIKROEMULZIJE	17
3.3.5 TESTIRANJE FIZIKALNE STABILNOSTI	17
3.3.6 ORGANOLEPTIČNO VREDNOTENJE	18
3.3.7 MERJENJE VELIKOSTI KAPLJIC	19
3.3.8 VREDNOTENJE ČISTILNE SPOSOBNOSTI MIKROEMULZIJ <i>in vivo</i>	19
3.3.9 REOLOŠKE LASTNOSTI	21
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	23
4.1 SMISELNOST IZDELAVE MIKROEMULZIJ KOT DOSTAVNIH SISTEMOV	23
4.2 OPTIMIZACIJA TEHNOLOŠKEGA POSTOPKA	26
4.3 TESTI STABILNOSTI	31
4.4 DOLOČANJE TIPA MIKROEMULZIJE	31
4.5 DOLOČANJE VELIKOSTI KAPLJIC	32
4.6 REOLOŠKE LASTNOSTI	34
4.7 VREDNOTENJE ČISTILNE SPOSOBNOSTI MIKROEMULZIJ <i>in vivo</i>	36
5. SKLEP	40
6. LITERATURA	41

KAZALO SLIK

Slika 1 - Pilosebacialna enota (1).	1
Slika 2 - Shema (psevdo)trikomponentnega diagrama in nastale asociacijske strukture (13).	8
Slika 3 - Interpretacija (psevdo)trikomponentnega diagrama (15).	9
Slika 4 - Struktura niacinamida (17).	10
Slika 5 - Princip meritev s Skin Glossymeter sondo (prirejeno po 35).	20
Slika 6 - Reometer.	21
Slika 7 - Merilno telo stožec-plošča ter kot merjenja α , ki je v primeru merilnega telesa stožec-plošča enak po celotni reži in polmer ploščice (R_0), na katero nanese vzorec (36).	22
Slika 8 - Viskozigram referenčnega izdelka, vzorca ME4 po prvem ciklu temperaturnih testov in vzorca ME5 po vsakem ciklu temperaturnih testov.....	34
Slika 9 - Vpliv spreminjanja temperature na viskoznost za referenčni izdelek in ME5 ob stalni strižni napetosti.....	35
Slika 10 - Reogram, ki prikazuje histerezo zanko vzorca ME5 in referenčnega izdelka...36	
Slika 11 - Povprečne vrednosti sijaja kože po 12 meritvah bazalne vrednosti, povprečne vrednosti 12 meritev 30 minut po nanosu vazelina in povprečne vrednosti 12 meritev po čiščenju z ME7, ME8 in referenčnim izdelkom brez upoštevanja korekcije sipane svetlobe.	38
Slika 12 - Povprečne vrednosti sijaja kože po 12 meritvah bazalne vrednosti, povprečne vrednosti 12 meritev 30 minut po nanosu vazelina in povprečne vrednosti 12 meritev po čiščenju z ME7, ME8 in referenčnim izdelkom z upoštevanjem korekcije sipane svetlobe (DSC).	39

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I – Razlike med mikro- in makroemulzijami (povzeto po 12, 14).	7
Preglednica II - Čistilni izdelki v obliki mikroemulzijskega dostavnega sistema.	26
Preglednica III - Oznake vzorcev ME, njihov izgled, posebnosti, vrednosti pH in viskoznosti.	28
Preglednica IV - Vrednosti električne prevodnosti vseh vzorcev ME.	32
Preglednica V - Velikosti kapljic in PI vzorca ME6.	33
Preglednica VI - Velikosti kapljic in PI vzorca ME7.	33
Preglednica VII - Velikosti kapljic in PI vzorca ME8.	33

POVZETEK

Akne so vnetna bolezen, ki prizadene večino mladostnikov po vsem svetu. Vzrokov za pojav aken je veliko, obstaja pa tudi več mehanizmov nastanka aken. V primeru blagih aken je dovolj že ustrezna nega s kozmetičnimi izdelki, namenjenimi aknasti koži. Eden izmed najbolj pomembnih korakov pri negi aknaste kože je čiščenje, da odstranjujemo umazanijo, znoj, sebum, odmrle poroženele celice in ostanke ličil.

Mikroemulzije so eden izmed inovativnih dostavnih sistemov, ki so v kozmetologiji izredno zanimive zaradi transparentnega videza in termodinamske stabilnosti. Niacinamid smo kot kozmetično aktivno sestavino dodali v čistilno mikroemulzijo zato, ker izkazuje podobne učinke zaviranja nastanka aken kot zdravilo klindamicin, hkrati pa povzroča bolj mile neželene učinke.

V eksperimentalnem delu diplomske naloge smo izdelali 8 vzorcev čistilnih mikroemulzij in optimizirali laboratorijski postopek njihove izdelave. Vzorcem smo izmerili pH in viskoznost ter nato izvedli obremenilne teste centrifugiranja, ki so jih prestali vsi vzorci. Izvedli smo tudi teste cikličnega spreminjanja temperature, ki so pokazali nestabilnost vzorcev ME4 in ME8. Z meritvami velikosti kapljic v vzorcih smo potrdili, da so nastali sistemi prave mikroemulzije. Čistilne sposobnosti izbranih vzorcev, ki so pokazali najboljše senzorične lastnosti, smo ovrednotili z napravo Skin-Glossymeter. Čistilno učinkovitost vzorcev smo potrdili posredno prek vrednotenja bazalnega sijaja kože, sijaja po nanosu vazelina (ki smo ga zaradi lipofilnosti in indiferentnosti uporabili kot izdelek, ki smo ga želeli očistiti iz površine kože), in sijaja po čiščenju, ko se koža posuši. Isti test smo izvedli tudi na referenčnem čistilnem izdelku istega proizvajalca, ki je že na tržišču. Ugotovili smo, da preiskovani vzorci ME izkazujejo podobno čistilno učinkovitost kot referenčni izdelek. Za potrditev ustreznosti metode vrednotenja čistilne sposobnosti z napravo Skin-Glossymeter bi morali študijo izvesti na večjem številu prostovoljcev z aknasto kožo, meritve pa bi morali izvajati na obrazu, prsnem košu ali zgornjem delu hrbta, ker je tam največ dlačno-lojničnih enot.

KLJUČNE BESEDE: mikroemulzija, niacinamid, akne, čistilni izdelek, Skin Glossymeter

ABSTRACT

Acne is an inflammatory disease that affects the majority of adolescents worldwide. There are many causes of acne and several mechanisms of acne formation. In mild cases, appropriate skin care with cosmetic products for acne is sufficient. One of the most important steps in affected skin care is cleaning so that the dirt, sweat, sebum, dead skin cells and makeup remnants are removed.

Microemulsions are one of the innovative delivery systems highly interesting to the cosmetic industry because of their transparent appearance and thermodynamic stability. In the case of this thesis, niacinamide was added to the cleansing microemulsion as a cosmetically active ingredient; it namely shows similar effects in inhibiting acne formation as the clindamycin antibiotic, with milder side effects.

In the experimental part of the thesis, 8 samples of cleaning microemulsions were prepared in an optimised laboratory production process. The samples were measured for their pH and viscosity, and underwent centrifugation tests, which were performed with all samples, as well as cyclic temperature stress tests, which showed an instability of the ME4 and ME8 samples. By measuring the droplet size in the samples, the system formation of appropriate microemulsions was confirmed. The cleaning properties of the selected samples that showed the best sensory properties were evaluated by means of the Skin-Glossymeter device. The cleaning efficacy of the samples was indirectly confirmed by evaluating the basal gloss of the skin, the skin's gloss after applying vaseline (due to its lipophilicity and indifference, vaseline was used as a product to clean off the skin surface), and the gloss of the skin when it dried after the cleaning. The same test was carried out on a reference cleaning product by the same manufacturer, which is already on the market. We found that the tested samples of ME show similar cleaning efficiency as the reference product. In order to confirm the appropriateness of the method of evaluating cleaning efficiency through Skin-Glossymeter, however, a larger number of volunteers with acne-affected skin would be required, with the measurements performed on the cheek, chest, or upper back areas as those are characterized by the highest number of the pilosebaceous units.

KEY WORDS: microemulsion, niacinamide, acne, cleanser, Skin-Glossymeter

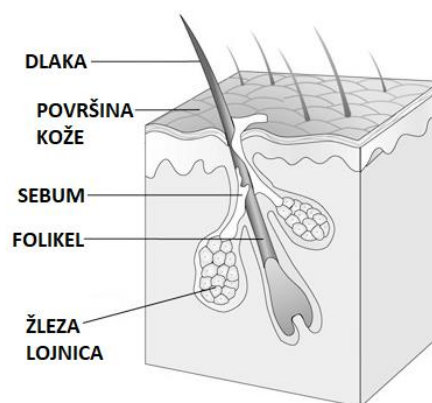
SEZNAM OKRAJŠAV

ME	mikroemulzija
HLB	hidrofilno lipofilno razmerje
KAS	kozmetično aktivna snov
KI	kozmetični izdelek
PAS	površinsko aktivna snov
POL	parfumsko olje (dišava)
Rp.	receptura
SD	standardna deviacija

1. UVOD

1.1 SPLOŠNO O AKNAH

Akne (lat. *Acne Vulgaris*) so najpogostejša kronična vnetna kožna bolezen in prizadenejo kar 80-90% celotne populacije v obdobju med 12. in 24. letom starosti, lahko pa se pojavijo tudi pri odraslih. Akne se v najstniški dobi prej pojavijo pri dekletih, v težjih oblikah pa se pojavijo pri fantih, kar je najverjetneje povezano s količino androgenih hormonov (1). Številni dejavniki kot so stres, hormonsko delovanje, genetika, prehranjevalne navade, motnje imunskega sistema in nekatera predpisana zdravila lahko vplivajo na pojav ali poslabšanje simptomov aknaste kože (1). Akne se najpogosteje pojavijo na obrazu, na področju prsnega koša ter zgornjega dela hrbta, kjer se nahaja kar 9x več dlačno-lojničnih enot (angl. *pilosebacial unit – PSU*) (Slika 1) kot na preostalih delih telesa, medtem ko jih na dlaneh in podplatih ni (2).



Slika 1 - Pilosebacialna enota (1).

Mehanizmi nastanka aken so različni in kompleksni, v grobem pa so najpomembnejši 4 in to so:

- povečana keratinizacija lasnega folikla,
- povečana tvorba sebuma,
- kolonizacija *Propionibacterium acnes*,
- vnetni in imuni odgovor prizadetega tkiva (3).

POVEČANA KERATINIZACIJA LASNEGA FOLIKLA

Keratinociti se sicer v lumen lasnega folikla splavljajo posamezno, pri koži z aknami pa se združijo v skupke, ki so povezani z monofilamenti in lipidnim plaščem. Hiperproliferacija privede do nastanka mikrokomedonov, ki so prekursorji za ostale lezije (3). Do zamaška oz. čepa pride zaradi povečanega poroženjevanja ali hiperkeratinizacije v epiteliju lasnega folikla in zaradi povečane adhezije keratinocitov, ki so hkrati tudi dobra hrana za bakterije. V čepu se nahaja tudi sebum. Hiperkeratinizacijo povzročajo zmanjšana količina esencialne linolenske kisline v dlačnih foliklih in povečana aktivnost interlevkina 1 alfa (IL-1 α) (4).

POVEČANA TVORBA SEBUMA

S prihodom v puberteto se poveča izločanje spolnih hormonov. Vloga estrogenov pri tvorbi loja še ni natančno pojasnjena, androgeni hormoni pa vplivajo na povečano tvorbo loja. Sebum sestavljajo trigliceridi (57,5%), skvalen (12%), estri voskov (26%) in holesterol s svojimi estri (4%) ter proste maščobne kisline (5). Osebe z aknami tvorijo več sebuma, ki je sicer po sestavi enak kot pri osebah brez aken.

KOLONIZACIJA *P. acnes*

Anaerobne gram-pozitivne bakterije *Propionibacterium acnes* so normalno prisotne mikrobne združbe na naši koži. Te oportunistične bakterije vsebujejo in izločajo lipaze, ki razgrajujejo trigliceride iz sebuma na proste maščobne kisline, ki omogočajo intenzivno razmnoževanje in povečano kolonizacijo teh bakterij. *P. acnes* povzročajo vnetja tudi zaradi vezave na Tollu podobne receptorje, ki igrajo ključno vlogo v prirojenem imunskem odzivu (6).

VNETNI IN IMUNSKI ODGOVOR PRIZADETEGA TKIVA

Mikrokomedon, ki je v začetni fazi še neviden, se širi in raste zaradi tvorbe, ki jo sestavljajo keratin, sebum in bakterije. Mikrokomedon se poveča in to vodi v nastanek vidnih odprtih in zaprtih komedonov. Blokada izvodila povzroča rast dlačno-lojnične enote, posledično stena epitelnega kanala počni in vsebina se razlije v dermis, kar se kaže v hitrem vnetnem odzivu, ob katerem so prisotni nevtrofilci (6). Tudi proste maščobne kisline, ki nastajajo med razgradnjo trigliceridov, so mediatorji vnetja. Iz komedonov se razvijejo hujše vnetne pustule, papule in ciste (1).

Glede na težavnost lahko akne razdelimo v tri skupine in to so blaga, srednje huda in huda oblika aken. Priporočeno je, da se vse vrste aken zdravi po navodilu zdravnika, izredno pomembna pa je tudi nega kože s kozmetičnimi izdelki, ki predstavljajo podporno nego zdravljenju. Ustrezen postopek nege vključuje čiščenje in nadaljnjo nego. V primeru blagih aken lahko stanje kože izboljšamo že z nego s kozmetičnimi izdelki, ki so namenjeni aknasti koži (1).

1.2 ČIŠČENJE AKNASTE KOŽE

Dokazi kažejo, da so milo poznali že Babilonci (7). Skozi zgodovino so uporabljali le klasična trda mila, ki se jih pridobiva z umiljenjem oz. saponifikacijo v reakciji med močno bazo (NaOH, KOH) in trigliceridom. Pri tej reakciji nastane glicerol in sol višjih maščobnih kislin oz. milo. pH mil je bistveno višji kot pH kože, zato so dandanes za čiščenje kože mnogo bolj popularna alternativa sindeti. Beseda sindet je zloženka iz besed 'sintezen' (angl. *synthetic*) in 'detergent' (angl. *detergent*) (8). Sindet ne vsebuje klasičnega mila, pač pa površinsko aktivne snovi (PAS) sinteznega izvora, ki kožo manj dražijo in manj izsušujejo, hkrati izkazujejo večjo čistilno moč kot mila in imajo bolj nevtralen pH (8, 9).

1.2.1 NAČINI POVRŠINSKEGA ČIŠČENJA KOŽE

Kisel hidrolipofilni plašč pokriva površino kože in je izredno pomemben za ohranjanje barierne funkcije kože, ker nas ščiti pred izhlapevanjem vode, pred vdorom mikroorganizmov, alergenov in iritantov ter omogoča obstoj normalne kožne mikrobne flore. Prvi korak pri negi kože je čiščenje. Glavni namen čistilnih izdelkov je odstranjevanje umazanije, znoja, sebuma, odmrlih poroženelih celic in ostankov ličil. Če bi kožo umivali z vodo, bi odstranili le hidrofilne komponente hidro-lipofilnega plašča, zato KI za čiščenje dodajamo PAS, da lahko odstranjujemo tudi lipofilne komponente. PAS znižujejo medfazno napetost in tako olajšajo čiščenje kože (9).

Poznamo 4 načine površinskega čiščenja kože in to so:

- solubilizirajoče čiščenje,
- adsorptivno čiščenje,
- raztapljajoče čiščenje,
- abrazivno čiščenje (9).

SOLUBILIZIRAJOČE ČIŠČENJE

Izdelki za solubilizirajoče čiščenje kože so geli za čiščenje, peneče kopeli ter trdna in tekoča mila. Vsebujejo PAS, ki so v čistilne izdelke dodani z namenom izboljšanja stika med lipofilnimi nečistotami, ki jih želimo odstraniti in hidrofilnim medijem čistilnega KI. Ko izdelek naneseemo na kožo, posamezne PAS tvorijo micelle, ki uspešno odstranjujejo nečistoče tako, da jih ujamejo v svojo notranjost. (9).

ADSORPTIVNO ČIŠČENJE

Med izdelke za adsorptivno čiščenje spadajo čistilne maske, ki vsebujejo zmesi različnih prahov in glin, najpogosteje kaolin, fullerjevo zemljo in pšenični klej. Ti izdelki so dispergirani v vodnem mediju, ki vsebuje tudi polimer ali pa jih tik pred uporabo zmešamo z vodo. Po nanosu začne iz obloge izhlapevati voda in na površini kože ostane film, ki v svojo strukturo ujame lipofilne nečistote (9).

RAZTAPLJAJOČE ČIŠČENJE

Pri raztaplajočem čiščenju nečistote raztapljamo v lipofilnih tekočinah, ki so uporabljene kot čistilna sredstva. Primeri KI so čistilne kreme (mleka za čiščenje) in oljni odstranjevalci ličil (9).

ABRAZIVNO ČIŠČENJE

Abrazivno čiščenje je najbolj grob način čiščenja. Trdni delci, ki se nahajajo v mehanskih pilingih odluščijo nečistoče in zgornjo, neživo plast povrhnjice imenovano rožena plast. Kot sredstva za mehanski piling v kozmetologiji pogosto uporabljamo drobce orehove lupine, koruznih zrn, mareličnih pečk in jojobine kroglice (9).

1.2.2 ČISTILNI IZDELKI ZA AKNASTO KOŽO

Najprimernejši način za čiščenje aknaste kože je solubilizirajoče čiščenje, ker iz kože nežno odstrani nečistote kot so umazanija, znoj, sebum, odmrle poroženele celice in ostanki ličil ter jo ustrezno pripravi na nadaljnjo nego. Vsakodnevno adsorptivno in abrazivno čiščenje bi občutljivo aknasto kožo preveč izsušilo in poškodovalo ter tako še bolj oslabilo njeno že porušeno barierno funkcijo, kar lahko poslabša stanje aken. Po raztaplajočem čiščenju

bi na koži ostala plast lipidnega filma, ki bi lahko deloval komedogeno, zato tudi ta način ni primeren za čiščenje aknaste kože.

Koža na obrazu je tanjša kot na preostalih delih telesa, aknasta koža pa je občutljiva in razdražena, zato v KI za čiščenje aknaste kože uporabljamo kombinacijo blagih anionskih in neionskih PAS, ki kožo manj iritirajo. Pri čistilnem izdelku je pomembno tudi, da epidermalnih lipidov iz zaščitnega hidro-lipofilnega plašča kože ne odstrani popolnoma, ker bi s tem porušili barierno funkcijo kože (4).

1.3 MIKROEMULZIJE

Mikroemulzije (ME) so eden izmed inovativnih emulzijskih dostavnih sistemov, kamor spadajo tudi tekoči kristali, multiple emulzije, nanoemulzije in t.i. pickering emulzije (10).

Definicija pravi, da so ME optično izotropni, termodinamisko stabilni in nizko viskozni dostavni sistemi. ME so ena izmed koloidno asociacijskih struktur, ki so sestavljene iz dveh tekočin, ki se med seboj ne mešata in PAS. Tvorijo jih le 4 komponente in to so vodna faza, oljna faza, emulgator in koemulgator. Posebnost ME je v njihovi sestavi, nastanejo namreč le v določenem razmerju sestavin. Njihov nastanek je odvisen od kemizma in koncentracije vsake izmed sestavin in prav tako od temperature in tlaka. Vrstni red mešanja sestavin ni pomemben. ME so stabilizirane s kompleksnim medfaznim filmom emulgatorjev in koemulgatorjev, ki delujeta sinergistično in tako še dodatno znižujeta medfazno napetost in izboljšujeta gibljivost emulgatorskega filma, ki je koherenten in se nikoli ne prekine (11, 12).

ME nastanejo spontano zaradi nizke medfazne napetosti. Velikost premera dispergiranih kapljic v ME je od 10 nm do 140 nm, kar predstavlja $\frac{1}{4}$ valovne dolžine vidne svetlobe, zato se svetloba slabo sipa in je posledično ena izmed bistvenih lastnosti ME prozoren ali opalescenten izgled. Veliko število majhnih kapljic, ki so velike do 140 nm, povzroči, da je medfazna površina zelo velika, hkrati pa se zaradi velikega števila kapljic istočasno poveča tudi entropija tega sistema. Rezultat je nizka vrednost Gibbsove proste energije sistema iz enačbe 1, ki je pri ME lahko celo negativna. Spontan nastanek ME pa v praksi pomeni, da med združitvijo vodne in oljne faze v take sisteme ni potrebno vnašati velikih količin energije za homogenizacijo sistema. (11, 12). ME so termodinamsko stabilne, kar nakazuje na dolgoročno fizikalno stabilnost.

$$\Delta G_m = \gamma \times \Delta A - T \times \Delta S \quad (\text{enačba 1})$$

ΔG_m	Gibbsova prosta energija sistema
γ	medfazna napetost med oljno in vodno fazo
ΔA	sprememba mejne površine
T	temperatura
ΔS	sprememba entropije sistema

ME so tipa voda v olju (V/O), kjer se vodne kapljice nahajajo v kontinuirani fazi olja, HLB vrednost PAS je 3-6. HLB je hidrofilno lipofilno ravnotežje, ki nam podaja informacije o topnosti PAS v olju in vodi. Velja le za neionogene PAS in zavzema vrednosti od 1 do 20. Pri ME tipa olje v vodi (O/V) je kontinuirana faza voda in vsebuje področja olj, ki so obdana z emulgatorskim filmom, HLB vrednost PAS je 8-18. ME so lahko bikontinuirane, v tem primeru sta obe fazi zunanji in razmerje med oljno in vodno fazo je enako. Emulgatorski film ločuje nemešajoči se fazi in se ne zaključí, ukrivljenost celotne mreže filma pa je blizu nič in tako nobena izmed faz ne predstavlja dispergirane faze, obe sta kontinuirani zunanji fazi (12).

ME so kinetično nestabilne. Njihova viskoznost je nizka, ker so ME tekočine, zato jih je treba pred nanosom na kožo ustrezno zgostiti, da dobimo ustrezno transparentno strukturo, ki spominja na gel. To lahko dosežemo z dodatkom zgoščeval v notranjo ali zunanjo fazo sistema. Pri izbiri zgoščevala igra ključno vlogo to, da je biokompatibilen in po dodatku še vedno ohranjamo ustrezno velikost kapljic, nizko medfazno napetost in stabilnost. ME kot KI zgoščujemo predvsem zaradi dojemanja in sprejemanja takšnega izdelka pri sodobnem zahtevnem potrošniku, ki si predstavlja KI za nanos na kožo kot bolj viskozne ali poltrdne (kreme za telo in obraz ter mila in geli za čiščenje) sisteme in ne kot nizko viskozne tekočine, kar so ME v osnovnem pomenu. Primeri zgoščeval v dermalnih ME so karagenan, ksantan in koloidni silicijev dioksid (13).

Kljub podobnemu imenu pa se ME v lastnostih močno razlikujejo od klasičnih emulzij, ki so v današnjem času najpogostejši klasični dostavni sistem na tržišču. Razlike med makroemulzijami in mikroemulzijami so predstavljene v Preglednici I.

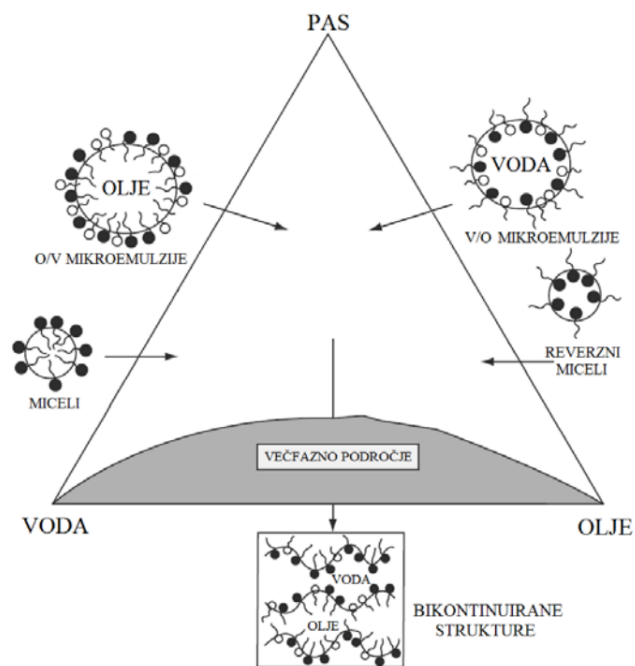
Sorodno ime, bister videz in enak velikostni red kapljic notranje faze imajo tudi nanoemulzije; še eden izmed inovativnih emulzijskih dostavnih sistemov, ki se od ME razlikujejo predvsem po tem, da vrstni red mešanja surovin izredno pomembno vpliva na velikost kapljic notranje faze in na stabilnost sistema ter da vsebujejo nižji delež PAS, kar je mogoče doseči le z velikim deležem vložene energije. Nanoemulzije so posledično termodinamsko nestabilne. Nanoemulzije so kinetično stabilne. Navadno so tipa olje v vodi (O/V) (12, 13).

Preglednica I – Razlike med mikro- in makroemulzijami (povzeto po 12, 14).

LASTNOST	EMULZIJE	MIKROEMULZIJE
<i>sistem</i>	groba disperzija	koloidna disperzija
<i>nastanek</i>	vnos energije v sistem (intenzivno mešanje)	nastanejo spontano
<i>velikost dispergiranih kapljic</i>	0,2 – 10 μm	10 – 140 nm
<i>izgled</i>	motne in mlečne	bistre/opalescentne
<i>ločitev faz</i>	termodinamična nestabilnost (razplastitev)	termodinamična stabilnost (ločbe ni)
<i>konsistenca</i>	poltrdno	nizka viskoznost, tekoče
<i>polidisperznost</i>	visoka	nizka

1.3.1 (PSEVDO)TRIKOMPONENTNI DIAGRAM

ME nastane le v določenem razmerju kombinacij oljne ter vodne faze in emulgatorjev. Za sistematičen prikaz interakcij, struktur in deležev treh komponent, ki se uporabljajo za grafični prikaz nastanka mikroemulzij tipa V/O in O/V ter preostalih asociacijskih struktur kot so tekoči kristali, miceli in reverzni miceli, se uporablja (psevdo)trikomponentne diagrame (slika 2). Pri nastanku ME sta temperatura in tlak navadno konstantna (15).



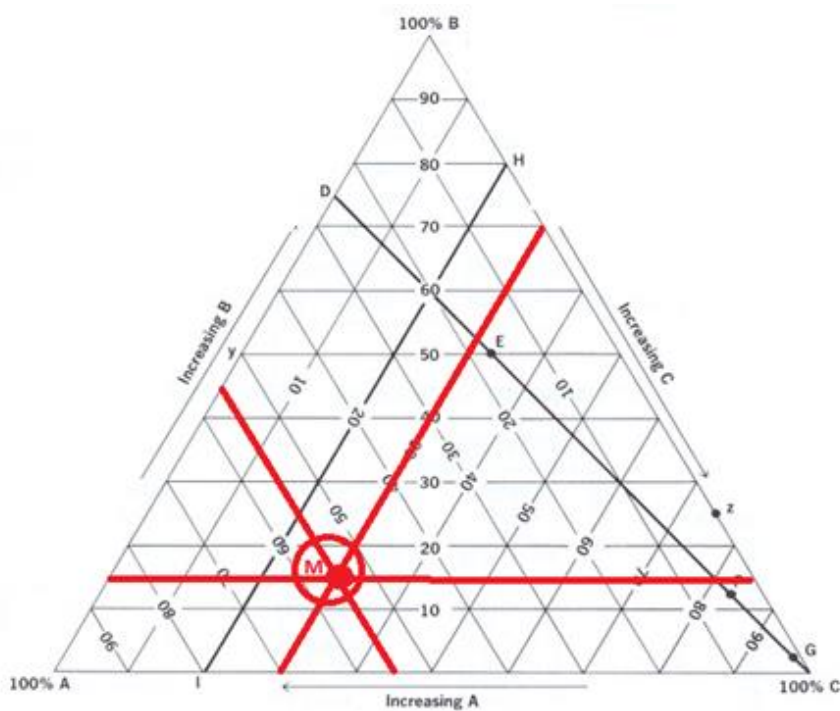
Slika 2 - Shema (psevdo)trikomponentnega diagrama in nastale asociacijske strukture (13).

V primeru, da bi želeli poleg oljne in vodne faze predstaviti tudi deleža emulgatorja in koemulgatorja posebej, bi uporabili diagram v obliki tetraedra. Za interpretacijo in uporabo v praksi je enostavnejši (psevdo)trikomponentni diagram v obliki enakostraničnega trikotnika (slika 3). Dve komponenti torej združimo v konstantnem razmerju in to sta navadno emulgator in koemulgator, na preostalih dveh ogliščih sta vodna in oljna faza; na tak način enostavno spreminjamo razmerje med izbranimi sestavinami.

Vsako oglišče iz enakostraničnega trikotnika, ki je prikazan na Sliki 3, predstavlja 100% ene izmed sestavin oziroma komponent. Stranice trikotnika predstavljajo zmesi dveh komponent (AB, AC, BC). Stranica AB predstavlja 0% komponente C. Delež komponente C narašča proti oglišču C, ki predstavlja 100% delež te komponente. Vsaka daljica iz točke na stranici trikotnika, ki gre proti nasprotnemu oglišču, bo imela konstantno razmerje dveh komponent.

Na primeru točke M (Slika 3), ki se nahaja na površini (psevdo)trikomponentnega diagrama na sliki 3 lahko prikažemo deleže posameznih komponent. Določimo, da oglišče A predstavlja vodno fazo, oglišče B zmes emulgatorja in koemulgatorja ter točka C oljno fazo. Točka M je torej sestavljena iz 55% vodne faze, 15% emulgatorske zmesi in 30% oljne

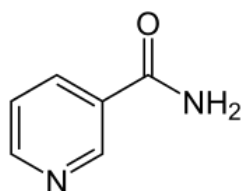
faze. Največji omejujoči faktor pri uporabi ME v kozmetologiji je velik delež PAS, ki lahko delujejo dražeče sploh pri občutljivi aknasti koži. Splošno velja, da so neionski in zwitterionski emulgatorji manj dražeči in toksični od ionskih emulgatorjev, zato so ti manj primerni za uporabo v ME za dermalno uporabo (13).



Slika 3 - Interpretacija (psevdo)trikomponentnega diagrama (15).

1.4 NIACINAMID

Niacinamid ali nikotinamid, z *IUPAC* imenom 3-piridinkarboksiamid, je vodotopna amidna oblika vitamina B3. Njegova kemijska struktura je predstavljena na Sliki 5. Najdemo ga v obliki kristalnega prahu bele barve z blagim vonjem in je občutljiv na svetlobo. Je del koencimov NAD in NADP. Vključen je v mnogo encimskih reakcij v našem telesu in zato nujno potreben za normalno delovanje našega organizma. Sodeluje tudi pri nastanku molekule ATP. Ob pomanjkanju niacinamida se pojavi bolezen *pelagra*, ki se kaže v obliki dermatitisa, diareje in demence. Kot prehranski vir ga najdemo v mesu, ribah, kvasu, mlečnih izdelkih in zelenjavi (16).



Slika 4 - Struktura niacinamida (17).

Obstaja več mehanizmov delovanja niacinamida v boju proti aknam. Eden izmed njih je bakteriostatično delovanje na *P. Acnes*, kar so v študiji dokazali A. R. Shalita s kolegi. Primerjali so vplive 4% gela z niacinamidom in 1% gela z antibiotikom klindamicinom. Dokazali so podobno učinkovitost obeh učinkovin, je pa niacinamid v primerjavi z zdravilno učinkovino klindamicinom povzročal bolj mile neželene učinke kot so le blago zbadanje in rdečica. Neželeni učinki pri uporabi klindamicina so bili srbečica in bolj mastna koža, kar kaže v prid uporabe niacinamida, ki hkrati ne povzroča rezistence *P. Acnes* in ga lahko brez omejitev uporabljamo v kozmetiki (20).

Stranski učinki dermalnega nanosa niacinamida v KI so mili in redki, to so srbečica in rdečica, kar skupaj z rezultati iz študij, ki so navedene, potrjuje njegovo atraktivnost za uporabo v kozmetologiji (17).

V študiji, ki so jo izvedli Draelos in sodelavci, so dokazali znižanje stopnje izločanja sebuma po uporabi KI z 2% niacinamida pri japonskih prostovoljcih. Bazalne vrednosti sebuma na površini kože so se po 4 tednih znižale pri skupini kavkazijskih prostovoljcev (21).

Po podatkih DSM Nutritional Products Europe Ltd, ki je proizvajalec surovine niacinamid, ki smo jo uporabili v čistilni mikroemulziji, se je transepidermalna izguba vode (TEWL) znižala za 27% za po tem, ko so na kožo 4 tedne nanašali 2% niacinamid, kar nakazuje na ugodno delovanje niacinamida pri zaščiti in obnovi barierne funkcije kože. Niacinamid je izkazal ublažitev neželenih učinkov v obliki izsušene kože, luščenja in občutljivosti zaradi ojačanja barierne funkcije kože ob dermalnem nanosu tudi v študiji, kjer je bil vključen v vlažilni negovalni izdelek, ki so ga nanašali kot podporno nego ob zdravljenju aken z 0,25% tretinoinom (22).

V kozmetologiji je niacinamid široko uporaben v izdelkih proti staranju kože (ang. *Anti-Ageing*) ter v izdelkih za nego aknaste kože in atopijskega dermatitisa. Učinkovito deluje tudi v izdelkih za beljenje kože, kjer zmanjšuje in inhibira prenos melanosomov od melanocitov do keratinocitov (18). Pogosta izbira dermatologov za zdravljenje aken je dermalni nanos retinoidov, ki povzročajo hujše draženje, rdečico in izsušenost kože. Ena izmed možnosti zdravljenja aken je tudi peroralno jemanje izotretinoina, ki je teratogen, zato ni primeren za ženske v rodni dobi. Resen svetovni problem predstavlja tudi naraščajoča rezistenca bakterij zaradi prepogoste uporabe antibiotikov, zato niacinamid predstavlja eno izmed najbolj varnih aktivnih učinkovin proti aknam (17, 19).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je razvoj in optimizacija razvoja mikroemulzije, ki je namenjena čiščenju aknaste kože. Po pregledu literature smo se odločili za dodatek kozmetično aktivne sestavine niacinamid, ker zaradi številnih mehanizmov delovanja ugodno vpliva na aknasto kožo in izkazuje mile in redke neželene učinke ob uporabi.

Vzorcem mikroemulzij bomo izmerili pH in viskoznost ter jih organoleptično ovrednotili. Na dva načina bomo preverili tip mikroemulzij pripravljenih vzorcev. S testom centrifugiranja bomo v začetnih fazah razvoja ovrednotili fizikalno stabilnost formulacij, najbolj obetavne vzorce pa bomo izpostavili tudi testom cikličnega spreminjanja temperature. Določili bomo reološke lastnosti vzorcev, ki jih bomo izpostavili stresnim pogojem ter preverili izmerili velikost kapljic. Po zaključenih cikličnih temperaturnih testih bomo spremljali morebitne nestabilnosti, ki se kažejo v ločitvi faz in izgubi transparentnosti. Preko vrednotenja sijaja kože z napravo Skin Glossymeter bomo posredno določili tudi čistilno sposobnost mikroemulzije in jo primerjali z referenčnim čistilnim izdelkom istega proizvajalca, ki je že na tržišču.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

V diplomskem delu kvantitativne recepture za mikroemulzijo ne bomo objavili zaradi varovanja podatkov o poslovnih skrivnostih podjetja Ilirija d.d.. Naveden je INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) seznam uporabljenih sestavin, ki so zapisane po padajočem vrstnem redu;

Dicaprylyl Ether, Lauryl Glucoside, Decyl Glucoside, Aqua, Octyldodecanol, Glycerol Oleat, Niacinamide, Phenoxyethanol, 1,2-Hexanediol, Citric Acid, Parfum.

Ob sprostitvi izdelka na tržišče bo ta seznam prikazan na ovojnini KI, kar določa Uredba (ES) št. 1223/2009.

PREČIŠČENA VODA

Pri izdelavi vzorcev smo kot topilo uporabili demineralizirano vodo, ki jo podjetje Ilirija d.d. proizvaja v svojem proizvodnem obratu v Lendavi za potrebe lastne proizvodnje in uporabo v razvojnem laboratoriju v Ljubljani.

LAVRILGLUKOZID

Lavrilglukozid je biorazgradljiva neionska vodotopna PAS. V pripravkih za čiščenje kože ga uporabljamo kot koemulgator. Je dobro kompatibilen s kožo in ga uporabljamo tudi z namenom povečevanja viskoznosti, ker je pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju. Je bele barve in po kemizmu sodi med poliglikozidne maščobne alkohole C₁₂-C₁₆ (23).

DECILGLUKOZID

Decilglukozid je neionska vodotopna PAS. Primeren je za uporabo v izdelkih za čiščenje suhe in občutljive kože. Pri sobni temperaturi je v obliki blede rumene nizko viskozne vodne raztopine. Ima nizko površinsko napetost in sposobnost tvorjenja bogate pene. Kože ne draži. (24)

KONZERVANS

V čistilni mikroemulziji smo uporabili raztopino konzervansa fenoksietanola v 1,2-heksandiolu. Fenoksietanol je prozorna brezbarvna tekočina brez specifičnega vonja. Je široko učinkovit zaviralec rasti bakterij, gliv in plesni, ki se uporablja v KI za čiščenje in nego kože ter tudi v lasni kozmetiki. Učinkovito deluje v pH območju med 3 in 12 (25). Glede na določilo iz Priloge V uredbe 1223/2009 je najvišja dovoljena koncentracija fenoksietanola v izdelkih 1% (26). Pri pripravi vzorcev mikroemulzij smo ga dodali v vodno fazo pred dodatkom emolientov in emulgatorja.

CITRONSKA KISLINA

Citronska kislina je sredstvo za uravnavanje pH s kelatorskim delovanjem. Je šibka organska kislina, ki je topna v vodi. Nahaja se v obliki drobnih belih kristalov brez vonja. Citronska kislina spada med alfa hidroksi kisline in se kot kozmetično aktivna sestavina v višjih koncentraciji uporablja tudi v kemičnih pilingih (27).

DIKAPRILIL ETER

Dikaprilil eter je nizko viskozen bister emolient z Ecocert certifikatom. Na koži pusti lahkoten in svilen občutek ter je idealen za inovativne formulacije, v katerih se želimo izogniti uporabi silikonov. Uporablja se ga v kozmetičnih pripravkih za nego telesa, obraza, v antiperspirantih in deodorantih ter v izdelkih za zaščito pred soncem. Stabilen je pred hidrolizo in oksidacijo (28).

OKTILDODEKANOL

Oktildodekanol je stabilen emolient. Je popolnoma bister, nežno rumenkaste barve in brez specifičnega vonja (29).

GLICERIOLEAT

Glicerioleat, ester glicerola in oleinske kisline, je neionski emulgator, ki je naravno prisoten v hidro-lipidnem plašču kože. Nahaja se v trdni obliki, ima rahel nemoteč vonj in je topen v olju. Njegova HLB vrednost je 3,5 in tvori emulzije tipa V/O. Deluje tudi kot stabilizator, koemulgator in zgoščevalec emulzij tipa O/V (30).

PARFUM

Parfumsko olje (POL) z nežnim osvežilnim vonjem smo uporabili kot dišavo.

NIACINAMID

Sestavina je opisana v poglavju 1.4.

REFERENČNI IZDELEK

Za prikaz in primerjavo reoloških parametrov ter čistilne sposobnosti smo uporabili referenčni čistilni izdelek istega proizvajalca v obliki klasičnega makroemulzijskega dostavnega sistema, ki je že na tržišču. Uvrščamo ga v skupino čistilnih izdelkov, ki delujejo solubilizirajoče.

3.2. PRIPOMOČKI

- tehtnica Mettler Toledo PM2000
- analitska tehtnica AX224 Sartorius
- propellersko mešalo IKA EUROSTARdigital
- termometer
- termoblok za segrevanje (TERMO BLOK TBTC n 1x1pr106 PID) in termoblok za ohlajanje (TERMO BLOK TBHC n 1x1pr106 PID)
- zamrzovalnik Gorenje
- elektronski pH meter Mettler Toledo MP 220
- konduktometer Mettler Toledo MC 226
- centrifuga Hettich Universal 32, DJB Labcare
- Brookfieldov viskozimeter model RVT, vreteno TD
- reometer Physica MCR 92, Anton Paar GmbH
- ZetaSizer Nano ZS (Malvern), kivete model DTS0012
- Skin Glossymeter GL 200, Courage+Khazaka Electronic GmbH

3.3 METODE

3.3.1 PRIPRAVA VZORCEV MIKROEMULZIJ

Mikroemulzijo smo pripravljali v razvojnem laboratoriju na oddelku 'Razvoj in kakovost' v slovenskem podjetju Ilirija d. d, kjer smo dobili tudi recepturo za izdelavo vzorcev ME. V primarno recepturo, ki smo jo dobili od proizvajalca, niacinamid kot izbrana kozmetično aktivna učinkovina (KAS) še ni bil vključen, zato smo recepturo prilagodili na njegov dodatek in ustrezno zmanjšali prvotno količino dikaprilil etra. Natančneje opisan in dokončno optimiziran postopek za nastanek mikroemulzije je naveden v razpravi.

Med pripravo vzorcev smo se držali pravil o varnem delu v laboratoriju, ki vključuje uporabo zaščitne opreme (halja, rokavice in zaščitna očala). V čašo smo zatehtali demineralizirano vodo, nato postopoma dodajali sestavine vodne faze in vsako dobro vmešali. Z dodatkom citronske kisline v vodno fazo smo uravnavali pH. Lipidno fazo smo nato postopoma dodajali v vodno fazo in po vsakem dodatku dobro premešali. Raztopino smo v termobloku segreli na 75°C in dodali na isto temperaturo segret emulgator. Nastalo mikroemulzijo smo v termobloku ohladili na 40°C in takrat smo ob mešanju dodali parfumske olje in KAS niacinamid. Vzorec se je na sobno temperaturo ohlajal ob konstantnem mešanju s propelerskim mešalom.

3.3.2 MERJENJE pH-VREDNOSTI

pH je negativni desetiški logaritem koncentracije vodikovih ionov in nam poda informacijo o kislosti oziroma bazičnosti preiskovanega vzorca (31). S predhodno umerjenim elektronskim pH metrom smo pH izmerili tako, da smo elektrodo najprej vzeli iz kalibracijskega pufru z vrednostjo pH = 4, jo sprali s prečiščeno vodo, jo popivnali s papirnato brisačo in potopili v preiskovani vzorec, ki smo ga prelili v manjšo čašico. Izmerjena pH vrednost se je izpisala na zaslonu.

Po meritvi smo elektrodo najprej nežno pobrisali z brisačko, da smo odstranili vzorec in nato še izprali s prečiščeno vodo. Pred meritvijo naslednjega vzorca smo jo zopet popivnali.. Ko smo končali z meritvami, smo očiščeno elektrodo potopili nazaj v kalibracijski pufer. Meritve smo izvajali med dodajanjem citronske kisline v vodno fazo

pri pripravi vzorcev ME. pH končnih vzorcev smo merili že isti dan po nastanku, ko so se ohladili na sobno temperaturo.

3.3.3 MERJENJE VISKOZNOSTI

Viskoznost smo merili z Brookfieldovim viskozimeterom, ki spada v skupino rotacijskih viskozimetrov. Meritve z Brookfieldovim viskozimetrom so preproste, poceni, izvedemo jih hitro in rezultati so na voljo takoj. Sinhroni motor vrtil vreteno, ki je potopljeno v vzorec. Sila, ki je potrebna, da se vreteno vrtil in s tem preseže upor vzorca, se meri s pomočjo kalibrirane vzmeti. Napetost vzmeti se odčita kot odklon kazalca na merilni skali in se pomnoži z ustreznim koeficientom, ki pripada posameznemu vretenu. Meritve smo na vzorcih ME izvedli šele po 24 ali 48 urah po nastanku, da smo dobili zanesljive rezultate.

3.3.4 PREVERJANJE TIPA MIKROEMULZIJE

Test preverjanja tipa vzorcev ME smo izvedli s kobaltovim papirjem. V primeru, da se barva kobaltovega papirja po stiku z vzorcem ne spremeni in vidimo le masten madež, velja, da je vzorec hidrofoben (V/O). V primeru hidrofilnega vzorca (O/V) se barva kobaltovega papirja po stiku s KI spremeni iz modre v rožnato, ker poteče sledeča reakcija:



Tip vzorcev mikroemulzij smo določali tudi preko električne prevodnosti. Elektrodo smo potopili neposredno v vse vzorce in glede na izmerjeno vrednost smo se prepričali o tipu ME. Če mikro ali makroemulzija prevaja električni tok pomeni, da je zunanja faza voda (O/V), pri tipu V/O pa se na ekranu izpiše negativna vrednost oziroma vrednost blizu 0, ker olje kot zunanja faza slabo prevaja električni tok (32).

3.3.5 TESTIRANJE FIZIKALNE STABILNOSTI

CENTRIFUGIRANJE

Vse izdelane vzorce ME smo preliminarno vrednotili z obremenilnim preizkusom centrifugiranja z namenom preverjanja fizikalne stabilnosti – razplastitve faz. Test je enostaven, poceni in nam daje hitre neposredne informacije o stabilnosti preiskovanega sistema takoj po izdelavi. Centrifugiranje vzorcev je potekalo 10 minut pri obremenitvi

10 000 RPM. Vedno smo testirali 4 vzorce hkrati, da je bilo razmerje mas v centrifugi uravnovešeno. Po izvedbi testa smo vzorce vizualno ocenili.

TEST CIKLIČNEGA SPREMINJANJA TEMPERATURE

Eni izmed testov fizikalne stabilnosti so tudi testi cikličnega spreminjanja temperature. Na področju kozmetologije ne obstajajo standardizirani protokoli testiranja in vrednotenja KI, zato smo uporabili proizvajalčev protokol in izbrane vzorce ciklično izpostavljali trem različnim pogojem, ki so zajemali: 1 dan pri nižji temperaturi (-20°C) v zamrzovalniku, sledila je izpostavitvevi povišani temperaturi (40°C) in nato še 1 dan pri sobni temperaturi, ki je nihala med 22°C in 25°. Ciklično ponovitev smo pri teh pogojih izvedli 5x. Po končanem cikličnem testiranju smo preverili organoleptične lastnosti testiranih vzorcev in ovrednotili morebitno fizikalno nestabilnost, ki se kaže z ločitvijo faz in izgubo transparentnega videza, ki ena izmed glavnih značilnosti mikroemulzij. Teste smo izvajali v manjših steklenih vsebnikih, ker vzorcem ME v tej fazi razvoja izdelka še nismo izbrali primarne ovojnine. Testirali smo temperaturno odpornost vzorcev ME4, ME5 in ME8.

3.3.6 ORGANOLEPTIČNO VREDNOTENJE

Izvedli smo tudi senzorično testiranje izbranih vzorcev. Senzorični testi so eden izmed *in vivo* testiranj za metodološke pristope ugotavljanja učinkovitosti KI (33).

Organoleptično vrednotenje izvaja človek, ki z uporabo svojih čutov, kot so vid, otip, vonj in okus, subjektivno opisuje in ocenjuje lastnosti izbranega vzorca, ki ga proučuje. Vzorcem ME in referenčnemu izdelku istega proizvajalca smo določili organoleptične lastnosti, ki so pomemben faktor pri posameznikovi percepciji o kozmetičnem izdelku, ki ga uporablja in lahko vplivajo tudi na ponovni (ne)nakup istega izdelka. Dandanes je iz vidika trženja zelo pomembna dodana vrednost in občutki, ki jih uporaba določenega KI vzbuja v posamezniku. Iz senzoričnega profila lahko izvemo tudi povratne informacije o korigiranju KI z dodatnimi pomožnimi snovi, katerih lastnosti že poznamo, o reoloških lastnostih KI ter o reklamiranju izdelka in navajanju učinkov pri oglaševanju (33).

Vrednotili smo: barvo, vonj in spremembe v strukturi po koncu cikličnih testov. Lastnosti smo vrednotili po vsaj 48 urah od izdelave sistema, po koncu testov cikličnega spreminjanja

temperature in po daljšem času shranjevanja izdelka, ki je bil izpostavljen dnevni svetlobi, a ne direktno sončnim žarkom pri sobni temperaturi.

3.3.7 MERJENJE VELIKOSTI KAPLJIC

Povprečno velikost premera dispergiranih kapljic v vzorcih smo merili z napravo Zetasizer Nano ZS na Fakulteti za farmacijo. Vzorce smo pred izvedbo meritev 24 ur hranili na sobni temperaturi. Iz vsakega vzorca ME smo pripravili 3 raztopine z različnim deležem vode po sledečem protokolu:

- 1) 5 g ME + 0 g H₂O (100% prvotni vzorec)
- 2) 4 g ME + 1 g H₂O (80% prvotni vzorec)
- 3) 4 g ME + 1,5 g H₂O (72,7% prvotni vzorec).

Raztopine smo premešali na vibracijskem mešalu, nato pa smo del prenesli v kiveto in tam premešali še s pomočjo kapalke. Pazljivo smo rokovali s kiveto, jo iz zunanje strani dobro obrisali ter vstavili v aparat. Kiveto smo nato izpraznili, očistili njeno notranjost in nato smo meritve velikosti kapljic iz pripravljenih raztopin vsakega vzorca ponovili še enkrat. Meritve smo izvajali pri 25°C s kotom merjenja 173° in valovno dolžino laserske svetlobe 633 nm (laser He-Ne). Uporabili smo kiveto DTS0012.

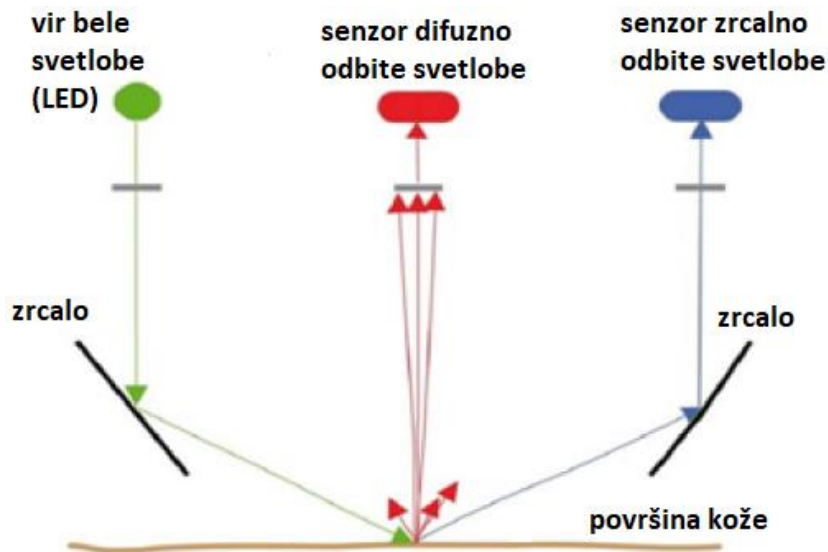
3.3.8 VREDNOTENJE ČISTILNE SPOSOBNOSTI MIKROEMULZIJ *in vivo*

Za posredno vrednotenje čistilne sposobnosti izbranih ME smo uporabili Skin Glossymeter GL 200. Sonda naprave je prilagojena za meritve na koži, laseh, ustnicah ali zobeh, in sicer meri direktno odbito svetlobo (zrcalni odboj), od katere je odvisen sijaj kože. Vrednost sijaja kože je podana v arbitrarnih enotah (a.e.) (34, 35).

Princip meritev sijaja:

S snopom bele svetlobe iz sonde osvetlimo preiskovano območje pod kotom 60° (zelena puščica na sliki 5), ta se nato odbije od ogledala in usmeri na kožo. Eden izmed dveh merilni kanalov meri direktno odbito svetlobo preko zrcala pod istim kotom (60°) kot pada vpadna svetloba (modra puščica na sliki 5). Del svetlobe se absorbira v zgornje plasti kože, nato se difuzno odbije pod kotom 0° (rdeče puščice na sliki 5), te žarke ujame drugi, vertikalno

postavljen merilni kanal, namenjen merjenju difuzne svetlobe. Koža posameznikov se namreč razlikuje v strukturi, barvi in sijaju, zato se difuzno odbita svetloba odšteje s posebno formulo za korekcijo sipane svetlobe (*angl. DSC – Diffuse Scattering Correction*). Na ta način izničimo prej omenjene razlike, kar posledično omogoča primerjavo sijaja ne glede na tip kože (34, 35).



Slika 5 - Princip meritev s Skin Glossymeter sondo (prirejeno po 35).

Vrednotili smo čistilno sposobnost treh izbranih vzorcev, in sicer:

- ME7 (ne vsebuje KAS, tj. niacinamida);
- ME8 (vsebuje niacinamid);
- referenčni čistilni izdelek istega proizvajalca.

Čistilno spodobnost izbranih vzorcev ME smo vrednotili posredno preko spremembe v sijaju kože, na katero smo predhodno nanесли vazelin, ki smo ga nato z izbranimi vzorci želeli odstraniti s kože. Natančneje, preverjali smo, če se sijaj kože po čiščenju z izbranimi vzorci povrne v bazalno stanje pred nanosom vazelina in preko teh rezultatov smo posredno vrednotili njihovo čistilno sposobnost. Za vazelin smo se odločili zato, ker je to indiferentna surovina, ki opazno poviša sijaj kože, za odstranjevanje s kože pa ne zadostuje voda, temveč je potrebno uporabiti tudi čistilni izdelek zaradi njegove lipofilne narave. V našem

primeru vazelin tako predstavlja model za negovalne izdelke in ličila, ki jih vsakodnevno nanašamo na obraz.

Po kratki 10 minutni aklimatizaciji treh prostovoljcev smo najprej pomerili bazalno vrednost sijaja kože na podlakti na štirih točkah znotraj izbranega območja v obliki kvadratov velikosti $3 \times 3 \text{ cm}^2$, ki so med seboj oddaljeni vsaj 2,5 cm. Nato smo na stekelce natehtali približno 12 mg vazelina in ga nežno razmazali po preiskovanem kvadratu. Meritve sijaja po nanosu vazelina smo izvedli čez 30 minut, tako da ni bilo zaostanka vazelina na koži. Na odgovarjajoča mesta z vazelinom smo nanесли približno 20 mg posamezne ME in referenčnega čistilnega izdelka in jih s spatulo nežno razmazali po celotnem označenem kvadratu. Z mokro vatrano blazinico, na katero smo nanесли 0,5 mL prečiščene vode smo po 2 minutah z dvema potegoma obrisali nanešen izdelek, potem smo označeno območje še dvakrat obrisali s suho vatrano blazinico. Z navedenim protokolom čiščenja smo želeli oponašati realni postopek čiščenja obraza. Počakali smo 5 minut, da se je koža popolnoma posušila in voda izhlapela, zato da zaostanek vode na koži ne bi lažno povečal sijaja. S sondo smo ponovno izmerili sijaj kože. Primerjali smo izmerjene vrednosti po metodi GLOSS in GLOSS-DSC, kjer je upoštevana korekcija sipane svetlobe.

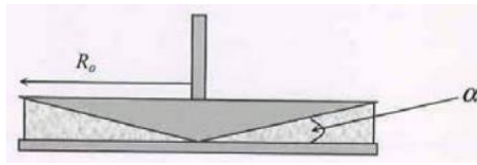
3.3.9 REOLOŠKE LASTNOSTI

Za izvedbo meritev reoloških lastnosti vzorcev ME smo uporabili rotacijski in oscilacijski reometer Anton Paar Physica MCR 92, ki je prikazan na Sliki 6.



Slika 6 - Reometer.

Uporabili smo merilno telo stožec-ploščica z nastavkom CP 50-2 ($2R_0 = 49,961$ mm, kot merjenja $\alpha = 2,01^\circ$). Shema merilnega telesa je prikazana na Sliki 7.



Slika 7 - Merilno telo stožec-ploščica ter kot merjenja α , ki je v primeru merilnega telesa stožec-ploščica enak po celotni reži in polmer ploščice (R_0), na katero naneseemo vzorec (36).

Glavne prednosti uporabe takšnega sistema so majhna poraba vzorca ter enostavno čiščenje in rokovanje naprave. Manjšo količino vzorca smo nanegli v režo med stožcem in ploščico, nato smo stožec znižali v lego merjenja (0,102 mm) in s pomočjo čiste spatule očistili odvečno količino vzorca iz okolice merilnega telesa (35).

Izvedli smo meritve:

- viskoznost v odvisnosti od strižne hitrosti,
- viskoznost v odvisnosti od temperature pri isti strižni hitrosti,
- strižna napetost v odvisnosti od strižne hitrosti (histerezna zanka).

Za boljšo interpretacijo rezultatov smo se odločili, da bomo reološke meritve izvedli tudi na referenčnem čistilnem izdelku v obliki klasične emulzije istega proizvajalca.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 SMISELNOST IZDELAVE MIKROEMULZIJ KOT DOSTAVNIH SISTEMOV

Proizvajalec je že imel okvirni načrt in želje glede vrste dostavnega sistema v obliki mikroemulzije in izbora sestavin novega kozmetičnega izdelka, zato razvoja ME nismo načrtovali od samega začetka. Kot aktivno učinkovino so želeli vključiti niacinamid, ki je sicer z drugačnim namenom že uporabljena v enem izmed kozmetičnih izdelkov, ki je že dostopen na tržišču. V diplomskem delu recepture zaradi varovanja podatkov o poslovnih skrivnostih podjetja Ilirija d.d. ne bomo objavili.

Po pregledu literature o mikroemulzijskih sistemih smo se zaradi številnih prednosti dostavnega sistema v tej obliki odločili, da bo čistilni izdelek, ki ga razvijamo v diplomskem delu, mikroemulzija. Prednosti uporabe ME v kozmetiki so:

- preprostejša izdelava, pri čemer je pomemben vidik nižja poraba energije in hitrejši nastanek sistema kot pri klasičnih emulzijah,
- daljši rok uporabe zaradi termodinamske stabilnosti,
- transparenten videz, ki je zelo atraktiven in ga lahko ob primerni ovojnini izkoristimo predvsem za potrebe trženja izdelka,
- visoka solubilizacijska kapaciteta za slabo topne KAS,
- boljši stik s kožo zaradi nižje medfazne napetosti, ki omogoča lažje razprostiranje in boljšo mazljivost,
- povečana dermalna razpoložljivost učinkovine,
- doseženo lahko nadzorovano sproščanje z vgradnjo KAS v notranjo fazo (predvsem za uporabo v kozmecevtikih),
- zaščita nestabilne učinkovine,
- dinamičnost sistema, ki nudi gibljivost aktivne učinkovine in večjo tendenca po tem, da KAS pride na željeno tarčno mesto (11, 12, 13).

Eden izmed največjih dejavnikov, ki omejujejo večjo uporabo ME kot dostavnih sistemov v kozmetiki, je velik delež emulgatorjev in koemulgatorjev, ki spadajo med PAS. V kozmetiki so emulgatorji vključeni v recepture v vseh dvofaznih sistemih. Razporedijo se

tako, da so polarne glave oziroma hidrofilni deli usmerjeni proti vodni fazi, nepolarni repi pa so obrnjeni proti lipofilni fazi. V dvofazne sisteme jih dodajamo z namenom zniževanja medfazne napetosti in posledično ohranjanja fizikalne stabilnosti, da preprečimo razplastitev faz (13).

Ko so PAS v stiku s kožo, lahko povzročajo iritativni kontaktni dermatitis zaradi vezave in denaturacije proteinov, porušitve urejene strukture lipidnih dvojnih plasti in prodiranja v spodnje plasti kože ter interakcije s celicami, ki povzročajo imunski odziv. Razlogi za različne odzive na PAS so v njihovi kemijski strukturi. Pomembno vlogo pri imunskem odgovoru kože predstavljajo celice zgornje plasti kože, to je povrhnjice (*epidermis*), in to so predvsem keratinociti in Langerhansove celice, medtem ko vloga melanocitov zaenkrat še ni znana. V srednji plasti kože, usnjici (*dermis*), pa imunski odziv ustvarjajo limfociti T, makrofagi in dendritične celice. Težko ločimo med iritativnim kontaktnim dermatitisom in alergijskim kontaktnim dermatitisom, ker lahko ista snov povzroča bodisi iritacijo ali alergijsko reakcijo. Ob pojavu iritativnega kontaktnega dermatitisa se svetuje takojšnje prenehanje uporabe KI, sistemsko zdravljenje ni potrebno (36).

PAS so iritanti in povzročajo poškodbe rožene plasti. Aknasta koža je že sama po sebi zelo občutljiva, s porušenim lipidnim dvoslojem zaradi velike koncentracije PAS v KI pa se oslabi barierna funkcija kože, poveča se transepidermalna izguba vode in tako iritanti in ostale škodljive snovi lažje potujejo v globlje plasti kože in tako povzročajo še več iritacij ali pa celo poslabšajo stanje aken pri posamezniku.

Kljub dejstvu, ki bi nas kot proizvajalca lahko odvrnili od razvoja izdelka v obliki dostavnega sistema mikroemulzije, smo se za tak sistem odločili zato, ker je to čistilni izdelek in se ga po uporabi izpere, kar pomeni, da občutno zmanjšamo možnosti za nastanek iritacije, alergijske reakcije ali celo poslabšanja stanja aken na že tako občutljivi aknasti koži (37). V recepturi smo uporabili le neionske emulgatorje, ki so manj toksični in iritativni od ionskih in so zato primernejši za uporabo v ME (13).

Ponudba čistilnih izdelkov v obliki mikroemulzije na tržišču je precej skopa. Na slovenskih in tujih spletnih trgovinah smo našli zelo malo izdelkov, ki jih proizvajalci oglašujejo kot čistilne mikroemulzije. Eden izmed njih je 'High-Efficiency Face Cleaner' znamke Hylamide kanadskega proizvajalca Deciem. Proizvajalec trdi, da kristalno čista mikroemulzija, ki jo sestavljajo olja, estri in hidrofilne snovi, deluje na principu oljnega

odstranjevalca ličil, kar pomeni, da je to mehanizem raztapljajočega čiščenje. V praksi naj bi se ta čistilna ME obnašala kot hidrofilno čistilno sredstvo, ki se učinkovito izpira le z vodo. Glede na objavljeni seznam INCI sestavin, ki je naveden v Preglednici II, nas preseneča odsotnost vode v recepturi, kar pomeni, da je to izdelek, katerega izdelava je relativno draga. Voda je namreč ena izmed najcenejših surovin, ki se jih uporablja v kozmetiki in jo zato pri večini KI najdemo na prvem mestu na INCI seznamu sestavin. To pomeni, da največji delež surovin v takih izdelkih predstavlja voda. To za proizvajalca pomeni, da je strošek z nakupom surovin precej nižji kot v primeru, ko voda v izdelku ni prisotna (38).

Druga čistilna mikroemulzija, Troiareuke Acsen Oil Cut Cleansing, ne vsebuje olj. Proizvajalec na spletni strani navaja, da je ta čistilni izdelek namenjen čiščenju mastne, aknaste in občutljive kože. Izdelek se uporablja kot klasični čistilni gel in se ga vmasira na navlažen obraz. Res je, da izdelek ne vsebuje čistih olj, kar kot eno izmed glavnih trditev pri oglaševanju navaja proizvajalec, vseeno pa izdelek vsebuje vodotopni emulgator z INCI imenom '*Olive Oil Peg-7 Esters*', ki je osnovan na olivnem olju in kemijsko modificiran s kovalentno vezavo politetilenglikola (PEG) (39).

Tretji izdelek, Microemulsion Make-Up Remover, je čistilna mikroemulzija japonskega proizvajalca Paese, ki je namenjena odstranjevanju voodpornih ličil. Namenjena je igralcem v gledališčih in filmih, ki zaradi svojega poklica vsakodnevno uporabljajo večje količine ličil. Glede na INCI seznam na vsebniku, izdelek vsebuje največji delež tekočega parafina, ki se mu zaradi sodobnih trendov v razvoju kozmetike sicer poskušamo izogniti in ga zamenjati z drugimi sestavinami, čeprav je to ena izmed najbolj indiferentnih in cenovno najbolj ugodnih surovin za izdelavo kozmetike (40).

Preglednica II - Čistilni izdelki v obliki mikroemulzijskega dostavnega sistema.

IZDELEK	INCI SEZNAM SESTAVIN
<p>High-Efficiency Face Cleaner (Hylamide – Deciem) 120 mL, 26.00€ (38)</p>	<p>CETYL ETHYLHEXANOATE, PEG-20 GLYCERYL TRIISOSTEARATE, BISABOLOL, OENOCARPUS BATAUA FRUIT OIL, BERTHOLLETIA EXCELSA SEED OIL, PLUKENETIA VOLUBILIS SEED OIL, CRAMBE ABYSSINICA SEED OIL, SIMMONDSIA CHINENSIS SEED OIL, SOLANUM LYCOPERSICUM (TOMATO) FRUIT EXTRACT, PONGAMIA PINNATA (KARANJA) SEED OIL, SQUALANE, ETHYLHEXYL STEARATE, TOCOPHEROL, PHENOXYETHANOL, CHLORPHENESIN</p>
<p>Oil Cut Cleansing (Troiareuke Acsen) 120 mL, \$76.00 (39)</p>	<p>WATER, BUTYLENE GLYCOL, PEG-7 GLYCERYL COCOATE, PEG-8, OLIVE OIL PEG-7 ESTERS, 1,2-HEXANEDIOL, TROMETHAMINE, ACRYLATES/C10-30 ALKYL ACRYLATE CROSSPOLYMER, DISODIUM EDTA, USNEA BARBATA (LICHEN) EXTRACT, ZANTHOXYLUM PIPERITUM FRUIT EXTRACT, PULSATILLA KOREANA EXTRACT, ALOE BARBADENSIS LEAF JUICE, CARICA PAPAYA (PAPAYA) FRUIT WATER, PORTULACA OLERACEA EXTRACT, FRAGRANCE</p>
<p>Microemulsion Make-Up Remover (Paese Cosmetics) 220 mL, \$14.62 (41)</p>	<p>PARAFFINUM LIQUIDUM, CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDE, ETHYLHEXYL STEARATE, ISOHEXADECANE, PEG-20 GLYCERYL TRIISOSTEARATE, AQUA, LIMNANTHES ALBA (MEADOWFOAM) SEED OIL, TOCOPHERYL ACETATE, PHENOXYETHANOL, ETHYLHEXYLGLYCERIN.</p>

Kljub obsežnemu iskanju na slovenskih in tujih spletnih straneh nismo našli čistilne mikroemulzije, ki bi vsebovala tudi niacinamid, kar nas je vzpodbudilo, da niacinamid kot KAS vključimo v recepturo, ker želimo ustvariti nov, inovativni kozmetični produkt.

4.2 OPTIMIZACIJA TEHNOLOŠKEGA POSTOPKA

Vzorci smo vedno pripravljali po isti recepturi in iskali najbolj ustrezen tehnološki način priprave. Optimiziran postopek izdelave čistilne ME je predstavljen v nadaljevanju. Dejavniki, ki so bili predmet optimizacije, so čas segrevanja in ohlajanja v termobloku in kontrolirani pogoji vzdrževanja faze emulgiranja. Spreminjanje vrednosti pH je del optimizacije recepture.

V veliki čaši smo začeli pripravljati vodno fazo in najprej natehtali prečiščeno vodo in lavrilglukozid. Ti dve sestavini smo nekaj minut segrevali na vodni kopeli, da smo dobili mešanico, ki je manj viskozna. Čašo smo vpeli v propelersko mešalo in mešali 10 minut na

le 200 RPM, da se površinsko aktivne snovi ne bi preveč penile. Nato smo v manjšo čašo natehtali decilglukozid, ga rahlo segreli na vodni kopeli, da se je utekočinil in med mešanjem smo ga počasi dodajali v čašo na mešalu in zopet mešali 10 minut. Sledil je dodatek konzervansa, ki smo ga vmešali v vodno fazo in ponovno 10-minutno mešanje. Zmes je bila bistra in nežno rumenkaste barve z veliko zračnimi mehurčki in belo peno na vrhu. Po navodilu iz recepture je sledil dodatek citronske kisline in uravnavanje pH na vrednost 5-6. Predpisane količine citronske kisline nismo dodali naenkrat, ampak smo jo dodajali postopoma, da smo da smo pH uravnali na željeno vrednost. V hidrofilno fazo smo nato dodali dikaprilil eter in oktildodekanol ter postopoma vmešali oba. Zmes je bila mlečno bele barve.

Čašo smo nato prestavili v termoblok in jo pred dodatkom emulgatorja segreli na 75°C. Medtem smo v manjši čaši emulgator gliceriloleat segrevali na vodni kopeli, zato da je prešel iz trdnega v tekoče agregatno stanje in dosegel temperaturo 75°C, ker faze vedno združujemo pri isti temperaturi. Med mešanjem smo ga dodajali predhodno pripravljeni mešanici vodne in oljne faze, ki je izgledala kot tekoča emulzija mlečno bele barve. Hitrost mešanja na propelerskem mešalu smo dvignili na 450 RPM in takoj po dodatku emulgatorja je pena povsem izginila, po 20 sekundah pa so se v zmesi ob mešalu začeli pojavljati transparentni pasovi in vzorec je po nekaj minutah hitro prešel v obliko bolj viskozne gelaste strukture. Zaradi vmešanega zraka je bilo v vzorcih veliko zračnih mehurčkov, med mešanja je zmes hitro postajala vedno bolj transparentna.

Vzorec smo približno 30 minut mešali v termobloku, ki je bil segret na 75°C in ga potem preselili v sosednji hladilni termoblok, kjer se je vzorec ohladil na 40°C. Šele po ohladitvi smo ga vzeli iz termobloka in ob mešanju s propelerskim mešalom na pultu dodali predpisano količino parfumskega olja in aktivne učinkovine niacinamid. Med ohlajanjem na sobno temperaturo je bil izdelek še vedno vpet v propelersko mešalo, zračni mehurčki so povsem izginili. Po dodatku parfuma in KAS ni bilo opaznih sprememb v viskoznosti in barvi oziroma bistrosti.

Vzorce smo vrednotili šele 24 ali 48 ur po nastanku, zato da so se stabilizirali. Shranjevali smo jih na sobni temperaturi in bili so zaščiteni pred svetlobo.

V sklopu razvoja novega čistilnega KI smo pripravili več različnih vzorcev po isti osnovni recepturi, ki se razlikujejo v prisotnosti POL in KAS. Za raziskave v diplomski nalogi smo

izbrali 8 vzorcev, ki smo jih poimenovali s kratico ME in številko vzorca (1-8). Razlike med njimi so opisane preglednici III.

Preglednica III – Oznake vzorcev ME, njihov izgled, posebnosti, vrednosti pH in viskoznosti.

VZOREC	IZGLED	POSEBNOST	pH	η [mPas]
ME1	mlečno bele barve, kot emulzija	brez POL in KAS	5,35	15 000
ME2	rumenkasto-rjave barve, ni povsem bistro, poltrdna (ne steče), prisotnost zračnih mehurčkov, rahlo transparentna	1 leto na sobni temperaturi v plastičnem vsebniku	5,28 (ob nastanku pred 1 letom 5,12)	24 000 (ob nastanku pred 1 letom 21 500 mPas)
ME3	ni bistra, najbolj moten vzorec, preveč tekoča, ni zračnih mehurčkov	<i>višji pH</i> , vsebuje POL, brez KAS	5,25	3000
ME4	srednje moten vzorec, bolj bister kot ME3, ni transparenten	<i>višji pH</i> , vsebuje POL in KAS; po dodatku citronske pH=5,2 (KAS ne vpliva na pH, niti olja)	5,31	1200
ME5	srednje moten, prisotnost veliko velikih zračnih mehurčkov, poltrdno (ne steče)	<i>nižji pH</i> , vsebuje POL in KAS; takoj po dodatku citronske pH=4,5 (KAS in olja ne vplivajo na pH)	4,67	20 000
ME6	moten, ni povsem tekoč, počasi steče, prisotnost manjših zračnih mehurčkov	osnovna receptura brez POL in KAS, 1 leto na sobni temperaturi v steklenem vsebniku	4,97 (ob nastanku pred 1 letom 4,82)	10 000 (ob nastanku pred 1 letom 9500 mPas)

ME7	malce manj moten in viskozen kot ME6, prisotnost manjših zračnih mehurčkov	osnovna receptura s POL in KAS, 1 leto na sobni temperaturi v steklenem vsebniku	5,20 (ob nastanku pred 1 letom 4,95)	8500 (ob nastanku pred 1 letom 8200 mPas)
ME8	popolnoma transparentna, rahlo rjavkasto-rumene barve, ustrezno tekoča, brez mehurčkov	osnovna receptura s POL in brez KAS, 1 leto na sobni temperaturi v steklenem vsebniku	4,94 (ob nastanku pred 1 letom 4,91)	5500 (ob nastanku pred 1 letom 4200 mPas)
referenčni izdelek	gladka homogena bela emulzija	izdelek je bil pripravljen v proizvodnem obratu	6,57	16 000

Vzorci mikroemulzij smo pripravljali po isti recepturi. Med izdelavo prvih vzorcev smo ugotovili, da je ključnega pomena združevanje emulgatorja in zmesi hidrofilnih in lipofilnih komponent v termobloku za segrevanje in nato ohlajanje na 40°C v termobloku za ohlajanje.

Prvi vzorec, ki smo ga pripravili po proizvajalčevi recepturi, je ME1. Emulgatorja in predhodno združenih zmesi hidrofilne in lipofilne faze nismo združevali v termobloku, ampak smo obe čaši segrevali na gorilniku in ju na pultu združili, ko sta dosegli 75°C. Z IKA propellerskim mešalom smo nastali vzorec mešali le 5 minut in potem pustili, dokler se ni ohladil na 40°C. Niacinamida in POL nismo dodali, ker je bil vzorec mlečno bele barve. Iz tega smo sklepali, da ni nastala mikroemulzija, ampak klasična emulzija. Kljub temu se vzorec po centrifugiranju ni razplastil. Zaradi prevelike viskoznosti vzorca se nismo odločili za merjenje velikosti kapljic tega vzorca.

Vzorec ME2 smo pripravili po optimiziranem postopku v termobloku za segrevanje in termobloku za ohlajanje. Vzorec smo eno leto hranili v plastičnem vsebniku v nepokriti škatli na polici. Po ponovnem vrednotenju po enem letu smo opazili spremembo barve; vzorec je postal bolj rjavkast, kar pomeni, da je niacinamid oksidiral. Razlogi za to so shranjevanje v plastičnem vsebniku in izpostavljenost UV žarkom, kljub temu, da sonce ni sijalo direktno na vzorec.

Odločili smo se, da bomo preverili, če ima pH vpliv na stabilnost vzorcev, ki smo jih nato podvrgli cikličnim temperaturnim testom. Vzorca ME3 in ME4 se razlikujeta le v vsebnosti

niacinamida in oba vsebujeta iz recepture določeno količino citronske kisline. Vzorcju ME5 pa smo dodali le polovico predpisane količine, zato da bi imel končni izdelek nižji pH, ki je bolj ugoden za nego aknaste kože. Zavedali smo se, da je za nastanek sistema potrebno združevanje v termobloku za segrevanje in nato ohlajanje v hladilnem termobloku. Nevede smo izbrali premajhno čašo, zato v termobloku ni bilo popolnega prileganja in stika med čašo ter ogrevalno površino, zato se zmes ni segrela. Predvidevali smo, da termoblok ne deluje pravilno. Odločili smo se, da bomo emulgator in zmes hidrofilnih in lipofilnih snovi segreli na gorilniku. Ko smo dosegli temperaturo 75°C, smo emulgator prelili k belkasti zmesi lipofilne in hidrofilne faze. Našo napako pri izbiri čase smo ugotovili takoj po združitvi faz, zato smo vzorec prelili v čašo ustrezne velikost in še 30 minut mešali v termobloku za segrevanje in nato po navodilih ohladili na 40°C v hladilnem termobloku. Sledil je dodatek POL. Vzorec smo nato natančno razdelili v dve čaši in v eno dodali niacinamid (ME4), v drugo pa ne (ME3). Vzorec ME5 smo pripravljali hkrati kot ME3 in ME4, zato tudi ME5 ni bila pripravljena po optimiziranem postopku, kjer zmes lipofilnih in hidrofilnih surovin segrevamo v termobloku. Naknadno smo ugotovili tudi to, da je emulgatorju gliceriloleatu že pred 6 meseci potekel rok uporabe. To sta verjetno dva razloga zakaj vzorci ME3, ME4 in ME5 niso povsem transparentni in da vzorca ME4 in ME5, ki smo ju izpostavili cikličnemu spreminjanju temperature, nista prestala testa in se je njuna struktura porušila.

Vzorci ME6, ME7 in ME8 smo pripravljali po dokončno optimiziranem postopku izdelave, ki je opisan na začetku poglavja 4. 2. Po nastanku sistema in ohladitvi na 40°C smo prvotni vzorec, ki mu POL in niacinamid še nista bila dodana, natančno razdelili na 3 dele. V ME6 nismo dodali niti POL niti KAS, v ME7 smo dodali le POL in v ME8 smo dodali POL in KAS. V prvih korakih razvoja tega KI nas je zanimalo, če dodatek niacinamida in POL poruši strukturo mikroemulzije. Ugotovili smo, da je vzorec ME8 po dodatku niacinamid celo bolj bister kot ME6 in ME7, kar pomeni, da dodatek niacinamida ni porušil strukture ME in da je postopek, ki je opisan v prejšnjem poglavju najbolj optimalen za nastanek čistilne ME po tej recepturi.

Med pregledom literature o niacinamidu smo našli zanimiv podatek v študiji, ki so jo izvedli Schmalfluss, Neubert in Wohlrab. Dokazali so, da dodatek holesterola v recepturo mikroemulzije poveča prehod hidrofilne učinkovine, ki jo v našem primeru predstavlja niacinamid. Holesterol, ki se sicer nahaja v membrani celic, naj bi se vmestil med ceramide

v medceličnem matriksu, ki ga poleg holesterola in ceramidov sestavljajo še proste maščobne kisline in lipidi. Ima rigidno planarno strukturo steroidnega skeleta in zato za svojo umestitev med kožne lipide potrebuje več prostora kot druge komponente v lipidnem dvosloju. Kot posledica se lipidni dvosloji razmaknejo in tako je omogočen lažji prehod hidrofilne KAS (42).

Na osnovi literarnih podatkov tako za izboljšanje sestave formulacije predlagamo, da se holesterol kot negovalno učinkovino vključi v recepturo KI. Na tak način bi povečali negovalni učinek čistilnega izdelka, ki smo ga razvijali v diplomski nalogi.

4.3 TESTI STABILNOSTI

Vsi vzorci so po vsaj 48 urah po nastanku prestali 10-minutni test centrifugiranja pri 10000 RPM. Do ločbe ni prišlo, kar potrjuje ustrezno fizikalno stabilnost vzorcev. Iz tega je razvidno tudi, da dodatek niacinamida nima negativnega vpliva na recepturo in ne poruši sistema ME. Ker so vsi vzorci uspešno prestali preliminarne teste centrifugiranja, ki jih vedno opravljamo v začetnih fazah razvoja izdelka, da potrdimo ustreznost formulacije, smo nekatere vzorce izpostavili testom cikličnega spreminjanja temperature. Dodatne teste smo izvedli zato, ker lahko s cikličnim spreminjanjem temperature v kratkem času pridobimo ustrezne podatke o stabilnosti izdelka v daljšem časovnem obdobju. Temperaturno ciklanje je obenem učinkovito tudi za napovedovanje in zagotovitev stabilnosti ob transportu KI, ker lahko v enem dnevu ali na različnih geografskih legah prihaja do večjih temperaturnih sprememb, ki lahko vplivajo na lastnosti ali celo povzročajo ločitev faz.

Odpornost na temperaturno cikliranje smo dokazali pri vzorcu ME5, ki je uspešno preстал vseh 5 ciklov. Vzorec ME4 se je razplasil po 2. ciklu. Temperaturnemu ciklanju smo izpostavili tudi eno leto star vzorec ME8, ki testa ni preстал in se je razplasil že po 1. ciklu.

4.4 DOLOČANJE TIPA MIKROEMULZIJE

Glede na prevladujoči delež hidrofilne faze v recepturi smo predvidevali, da so vzorci mikroemulzije tipa O/V. Uporabljeni emulgator gliceriloleat, za katerega smo se odločili po predlogu proizvajalca, ker nam je dal smernice glede recepture, ima vrednost HLB = 3,5, kar pomeni, da tvori emulzije tipa V/O.;

Modri kobaltovi papirčki so se po nanosu vzorcev mikroemulzij obarvali roza, kar pomeni da je potekla reakcija $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Tudi vrednosti meritev električne prevodnosti, ki so prikazani v spodnji razpredelnici potrjujejo, da je zunanja faza vodni medij, ker so vrednosti električne prevodnosti visoke.

Preglednica IV - Vrednosti električne prevodnosti vseh vzorcev ME.

VZOREC	ELEKTRIČNA PREVODNOST [$\mu\text{S}/\text{cm}$]
ME1	1941
ME2	1761
ME3	1038
ME4	1616
ME5	1539
ME6	1489
ME7	1526
ME8	1722

Z obema metodama smo torej določili O/V mikromeulzije. To pomeni, da je zaradi kompleksnosti sestave in izdelave prevladujoč dejavnik količina vodne faze, ne pa tip emulgatorja.

4.5 DOLOČANJE VELIKOSTI KAPLJIC

Pred meritvijo smo bili v dvomih, kako ustrezno redčiti naše vzorce, ker je bila večina preveč gosta za izvedbo direktne meritve brez redčenja. Z dodatkom vode kot disperznega medija bi lahko porušili strukturo ME, ker vemo, da le-te nastanejo le v točno določenem območju razmerju oz. deležu izbranih sestavin.

Meritve velikost kapljic smo izvedli na vzorcih ME6, ME7 in ME8 z namenom, da bi videli, če se ob dodatku POL in niacinamida pojavijo razlike v velikosti kapljic ali če se podre struktura ME. Te vzorce smo izbrali zato, ker so izdelani po procesu, ki se je izkazal za najprimernejšega in ker se razlikujejo le v vsebnosti POL in KAS, ki bi lahko vplivala neugodno in podrla strukturo ME

Razlik med izmerjenimi velikostmi kapljic pri vzorcih ME6, ME7 in ME8 ni, vsi spadajo v velikostni razred do 140 nm, kar ustreza definiciji mikroemulzij. Visoke vrednosti

polidisperznega indeksa pri vseh vzorcih kažejo na veliko heterogenost in širšo porazdelitev velikost kapljic, kar je zagotovo eden izmed parametrov, ki bi ga morali ustrezno optimizirati, zato ker lahko iz velikosti delcev napovedujemo tudi (ne)stabilnost izdelka.

Potrdimo lahko tudi, da redčitev ne vpliva na velikost kapljic. Velikosti kapljic pri 80% in 72,2% raztopine spadajo v območje do 140 nm in ne odstopajo od meritev velikosti kapljic 100% vzorcev ME, kar potrjuje, da kljub dodatku vode ni prišlo porušitve sistema ME.

Preglednica V - Velikosti kapljic in PI vzorca ME6.

ME6	premer kapljic [nm]		polidisperzni indeks	
	<i>2r</i>	<i>povprečje</i>	<i>2r</i>	<i>povprečje</i>
100%	13,97	15,245	0,239	0,277
	16,52		0,315	
80%	3,11	5,265	0,394	0,374
	7,42		0,354	
72,2%	4,24	6,95	0,403	0,357
	9,66		0,311	

Preglednica VI - Velikosti kapljic in PI vzorca ME7.

ME7	velikost kapljic [nm]		polidisperzni indeks	
	<i>2r</i>	<i>povprečje</i>	<i>2r</i>	<i>povprečje</i>
100%	18,23	18,14	0,473	0,4275
	18,05		0,382	
80%	4,46	4,445	0,375	0,3615
	4,43		0,348	
72,2%	4,68	4,46	0,322	0,3395
	4,24		0,357	

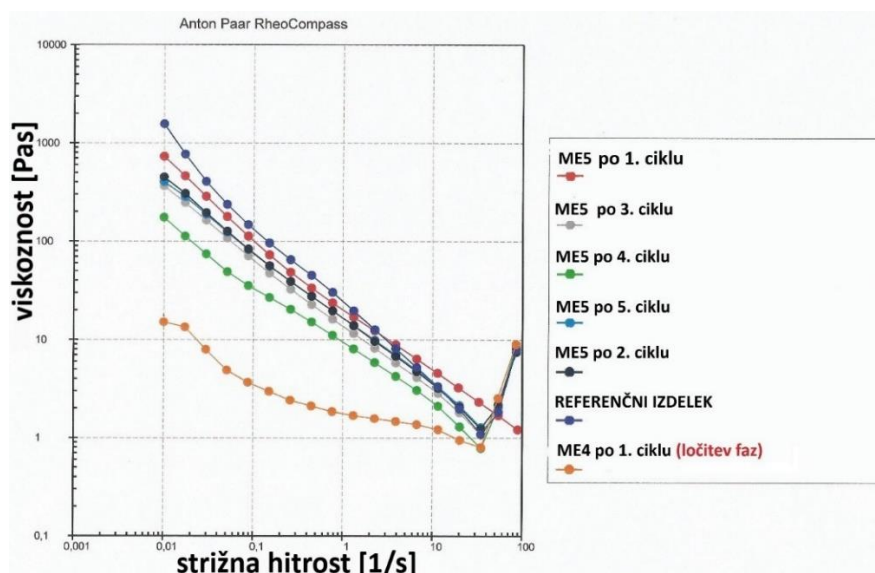
Preglednica VII - Velikosti kapljic in PI vzorca ME8.

ME8	velikost kapljic [nm]		polidisperzni indeks	
	<i>2r</i>	<i>povprečje</i>	<i>2r</i>	<i>povprečje</i>
100%	8,064	9,622	0,598	0,5585
	11,18		0,519	
80%	7,51	8,515	0,412	0,442
	9,52		0,472	
72,2%	9,45	11,24	0,359	0,373
	13,03		0,387	

4.6 REOLOŠKE LASTNOSTI

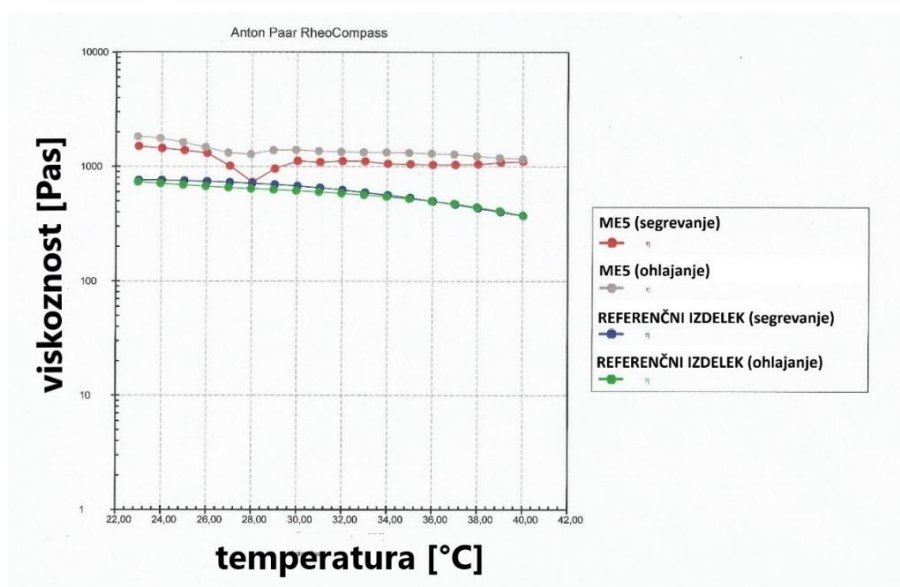
Na Sliki 8 je prikazan viskozigram, ki prikazuje viskoznost vzorcev ME in referenčnega izdelka v odvisnosti od strižne hitrosti, ki smo jo zvezno spreminjali od 0,001 do 100 s⁻¹ in od 100 do 0,001 s⁻¹. Iz grafa je razvidno, da vzorci in referenčni izdelek spadajo med newtonske psevdoplastične sisteme (angl. *shear thinning*) zaradi padanja vrednosti viskoznosti ob povečevanju strižne sile. Takšno obnašanje se pojavi kot posledica urejanja strukturnih elementov v smeri toka oziroma zaradi prehajanja v bolj urejeno stanje (43).

Referenčni izdelek istega proizvajalca ima višjo viskoznost kot vzorci ME, kar se sklada s podatki iz Preglednice III, kjer smo viskoznost izmerili z Brookfieldovim viskozimetrom. Od strižne hitrosti 20 s⁻¹ dalje se začne viskoznost nenadno povečevati, ker je prišlo do opaznega uhajanja referenčnega izdelka in vzorcev iz plošče, zato meritev, kjer je strižna hitrost večja od 20 s⁻¹ ne upoštevamo. Oranžna črta predstavlja ME4 po koncu 1. cikla testov cikličnega spreminjanja temperature. Razvidno je, da je zaradi izmerjene nižje viskoznosti prišlo do porušitve sistema zaradi temperaturne nestabilnosti. Nadaljnjih reoloških meritev ob cikličnem spreminjanju temperature na vzorcu ME4 nismo izvedli, ker je po koncu 2. cikla prišlo do ločitve faz in vzorca ne bi mogli ustrezno zajeti. Tudi vzorec ME8 smo izpostavili temperaturnim testom, vendar je prišlo do ločitve faz že po prvem ciklu, zato meritev viskoznosti na ME8 nismo izvedli.



Slika 8 – Viskozigram referenčnega izdelka, vzorca ME4 po prvem ciklu temperaturnih testov in vzorca ME5 po vsakem ciklu temperaturnih testov.

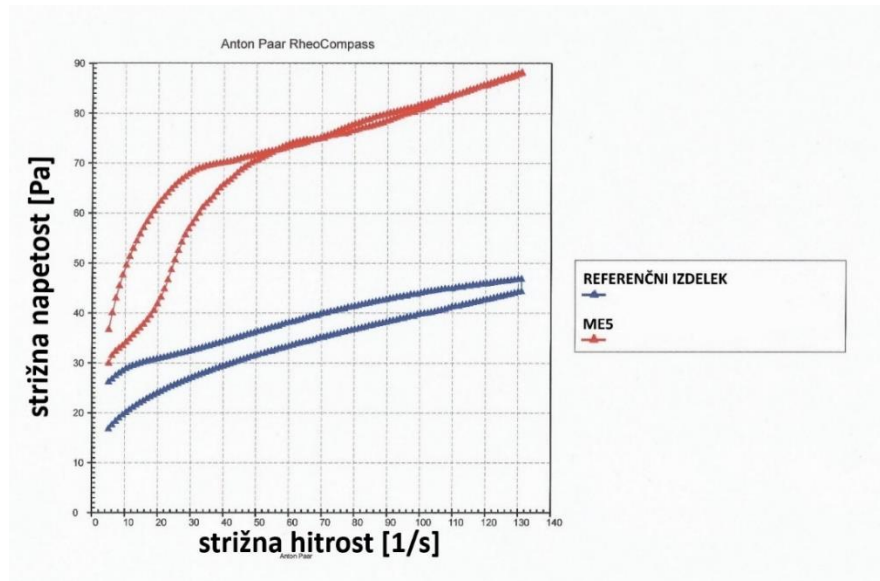
Z vzorcem ME5 in referenčnim izdelkom smo izvedli tudi meritve spreminjanja viskoznosti v odvisnosti od temperature ($22^{\circ}\text{C} - 40^{\circ}\text{C} - 22^{\circ}\text{C}$) ob stalni strižni napetosti. Ob segrevanju referenčnemu izdelku viskoznost malce pade, ob ohlajanju pa se v celoti povrne v začetno stanje. Nepričakovan padec viskoznosti vzorca ME5 ob segrevanju pri 28°C pripisujemo pojavu zračnega mehurčka oziroma nastanka praznega prostora brez vzorca v merilnem telesu stožec – plošča. Končna viskoznost ME5 po ohlajanju je višja kot viskoznost pred izvedbo testa z naraščanjem in padanjem temperature. Vrednosti sta sicer precej blizu skupaj, kar pomeni, da bi se viskoznost po nekem času mirovanja vzorca ME5 najverjetneje vrnila v prvotno vrednost. Vzorec ME5 je stabilen tudi ob povišani temperaturi.



Slika 9 – Vpliv spreminjanja temperature na viskoznost za referenčni izdelek in ME5 ob stalni strižni napetosti.

Graf na Sliki 10 predstavlja reogram, to je graf, ki prikazuje spreminjanje strižne napetosti v odvisnosti od strižne hitrosti. Oblika krivulje se sklada z viskozigramom iz slike 8 in potrjuje našo domnevo, da so vzorci ME in referenčni izdelek pseudoplastični sistemi. Na grafu vidimo histerezo zanko in površina pod to krivuljo je merilo za izgubo energije med deformacijo. Domnevamo, da so preučevani sistemi glede na časovno odvisnost tiksotropni, ker se jim je viskoznost zaradi vpliva obremenitve zmanjšala, po prenehanju obrnenitve se je notranja struktura po nekem času mirovanja obnovila in sistem se je povrnil v začetno stanje oziroma začetno obliko, kar je značilno za tiksotropne sisteme (44).

Površina histerezne zanke za referenčni izdelek znaša 621,7 Pa/s, za vzorec ME5 pa - 456,3 Pa/s. Različne vrednosti in oblike histerezne zanke smo zaradi različnega dostavnega sistema pričakovali, na raznolikost izmerjene površine histerezne zanke pa lahko vplivamo tudi sami z načinom, kako rokujemo z vzorcem in kako ga nanašamo na merilno ploščico. Vpliv na velikost in obliko histerezne zanke pa imajo tudi pogoji med meritvijo, kot sta temperatura in vlaga.



Slika 10 – Reogram, ki prikazuje histerezno zanko vzorca ME5 in referenčnega izdelka.

4.7 VREDNOTENJE ČISTILNE SPOSOBNOSTI MIKROEMULZIJ *in vivo*

Čistilno sposobnost vzorcev ME7 in ME8 smo primerjali z referenčnim izdelkom istega proizvajalca, ki je že na tržišču. Vrednotili smo jo posredno preko sprememb izmerjenih vrednosti sijaja kože po odstranjevanju predhodno nanešenega vazelina, ki poviša sijaj kože. Od testiranih čistilnih izdelkov namreč pričakujemo, da bodo odstranili nanešeni vazelin, ki simulira nečistoče in predvidevamo, da se bodo vrednosti sijaja kože po čiščenju ponovno znižale in vrnile na raven bazalne vrednosti. Postopek meritev sijaja po nanosu vazelina je bil že predhodno razvit v magistrskem delu Eve Roš (45). V okviru diplomske naloge smo tako izvedli preliminarne meritve za potrditev zastavljenega protokola čiščenja (določitev optimalnega števila potegov z mokro in nato še s suho vatrano blazinico) ter

časa merjenja sijaja po čiščenju, tako da na koži ni bilo zaostanka vode, ki bi lažno povišal meritve sijaja. Preliminarne meritve smo izvedli na enem prostovoljcu.

Rezultati meritev sijaja po odstranjevanju čistilnega izdelka zgolj s suho vatirano blazinico so bili pri dveh vzorcih ME in pri referenčnem izdelku skoraj tako visoki kot vrednosti sijaja kože po nanosu vazelina, kar pomeni, da vazelina nismo odstranili iz kože, na povečan sijaj pa je vplival tudi zaostanek čistilnega izdelka na koži. Po nežnem suhem brisanju z vatirano blazinico je prostovoljec na koži občutil masten in neočiščen občutek zaostanka čistilnega izdelka. Da bi čim bolj posnemali *in vivo* postopek čiščenja obraza, smo se zato odločili, da bomo nanešen čistilni izdelek najprej odstranili z dvema potegoma z mokro vatirano blazinico. Naknadno brisanje s suho vatirano blazinico pa posnema brisanje oziroma otiranje obraza z brisačo. Ob posnemanju *in vivo* uporabe izdelka je izpiranje z vodo priporočljivo tudi zato, da zaostanek čistilne mikroemulzije zaradi visokega deleža PAS ne bi dražil kože.

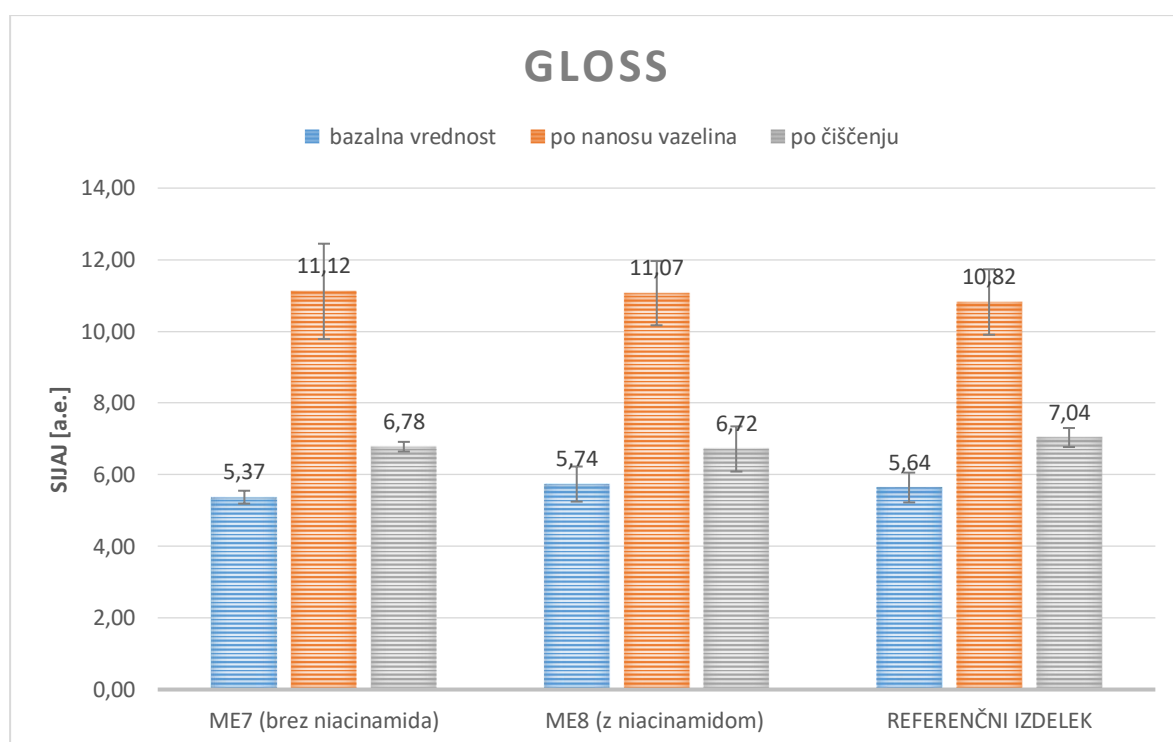
Ker preučevana površina kože tudi po dveh potegih s suho vatirano blazinico še vedno ni bila popolnoma suha, smo vrednosti sijaja kože pomerili 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 in 15 minut po čiščenju z mokro in suho vatirano blazinico. Ugotovili smo, da je najprimernejši čas za merjenje sijaja kože po čiščenju po peti minuti. Izmerjene vrednosti sijaja so se namreč ustalile od četrte minute po koncu postopka čiščenja, kar pomeni, da je takrat v celoti izhlapela vsa zaostala voda.

Sliki 11 in 12 prikazujeta rezultate meritev sijaja kože (v arbitrarnih enotah) po čiščenju z vzorcema ME7 in ME8, ki se razlikujeta v prisotnosti niacinamida, ter referenčnim izdelkom. Slika 11 predstavlja rezultate, kjer korekcija sipane svetlobe (DSC) ni upoštevana. Na Sliki 12 je korekcija sipane svetlobe upoštevana, kar pomeni, da so izničene razlike barve, strukture in sijaja kože med posamezniki. Iz pridobljenih rezultatov lahko jasno vidimo, da je v obeh primerih viden isti trend naraščanja sijaja ob nanosu vazelina in padanja sijaja po čiščenju.

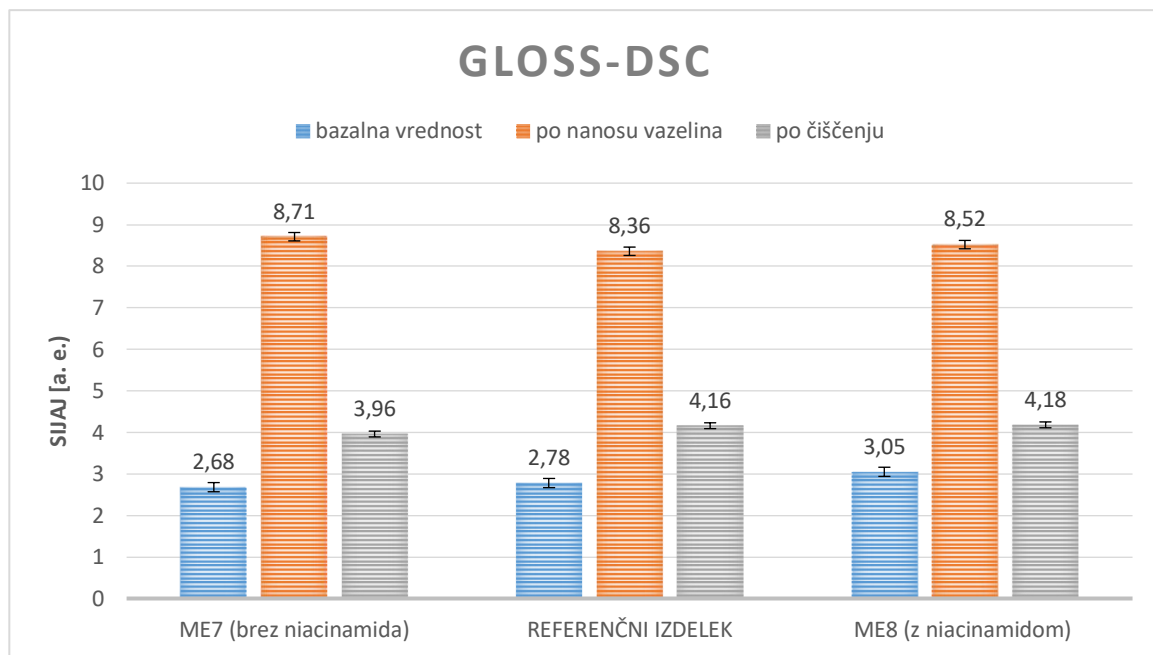
Glede na izmerjene bazalne vrednosti se sijaj kože po nanosu vazelina pričakovano poviša, po čiščenju z izbranimi izdelki pa se ne povrne povsem v začetno bazalno stanje. Izmerjene vrednosti se najbolj spremenijo pri izdelku ME7, kjer po nanosu vazelina narastejo za 6,04 a. e. in po čiščenju padejo za 4,75 a. e.. Podobno učinkovitost izkazuje tudi vzorec ME8, sijaj po nanosu vazelina se poveča za 5,47 a. e. in se po čiščenju zmanjša za 4,34 a. e. Iz

teh rezultatov lahko sklepamo, da vzorca ME7 in ME8 izkazujeta zelo podobno čistilno sposobnost. Pri referenčnem čistilnem izdelku vrednost po nanosu vazelina naraste za 5,58 in po čiščenju pade le za 4,20 a. e., kar kaže, da smo v izvedeni študiji in posrednem vrednotenju čistilne sposobnosti v spremembi sijaja kože ugotovili, da ta izdelek izkazuje praktično enako čistilno sposobnost kot vzorca ME7 in ME8, ker so razlike ob upoštevanju SD zanemarljive.

Glede na to, da je referenčni izdelek že na tržišču, vzorca ME7 in ME8 pa izkazujeta primerljivo čistilno sposobnost, lahko na podlagi rezultatov zaključimo, da predstavljata razviti ME primerno alternativo že obstoječemu KI.



Slika 11 – Povprečne vrednosti sijaja kože po 12 meritvah bazalne vrednosti, povprečne vrednosti 12 meritev 30 minut po nanosu vazelina in povprečne vrednosti 12 meritev po čiščenju z ME7, ME8 in referenčnim izdelkom brez upoštevanje korekcije sipane svetlobe.



Slika 12 - Povprečne vrednosti sijaja kože po 12 meritvah bazalne vrednosti, povprečne vrednosti 12 meritev 30 minut po nanosu vazelina in povprečne vrednosti 12 meritev po čiščenju z ME7, ME8 in referenčnim izdelkom z upoštevanjo korekcijo sipane svetlobe (DSC).

5. SKLEP

Po pregledu literature smo potrdili proizvajalčev predlog o izbiri mikroemulzije kot dostavnem sistemu za čistilni izdelek z niacinamidom. Mikroemulzije so inovativen dostavni sistem, ki je za uporabo v kozmetiki izredno zanimiv zaradi transparentne strukture, termodinamične stabilnosti in enostavnega postopka izdelave.

V čistilnem izdelku, ki smo ga razvijali v diplomski nalogi, smo uporabili neionske PAS, ki so manj dražeče in so zato bolj primerne za uporabo v izdelkih za nego in čiščenje občutljive kože, kakršna je tudi koža z aknami. Ker bomo čistilni izdelek po čiščenju izprali s površine kože, je tako dodatno zmanjšana možnost za nastanek iritacij, ki bi lahko poslabšale stanje aken pri posamezniku ali dodatno dražile že tako občutljivo aknasto kožo.

Izdelali smo 8 vzorcev in optimizirali proces za nastanek mikroemulzijskega sistema. Ugotovili smo, da je za uspešen nastanek mikroemulzije ključnega pomena uporaba termobloka ter mešanje ob ohlajanju. Kot preliminarnega pokazatelja fizikalne stabilnosti smo izvedli centrifugiranje, ki so ga prestali vsi vzorci. Dodatne stabilnostne teste s cikličnim spreminjanjem temperature pa je uspešno preстал le en vzorec. Upoštevanje organoleptične lastnosti in stabilnost po cikličnih temperaturnih testih se je najbolje izkazal vzorec ME8, za katerega smo potrdili, da je velikost kapljic v mikroemulzijskem velikostnem redu (do 140nm).

Čistilno sposobnost vzorcev ME smo vrednotili posredno preko meritev sijaja kože. Vzorci, ki smo jih pripravili v sklopu diplomske naloge, so izkazali podobno čistilno moč kot referenčni izdelek istega proizvajalca. Potrdimo lahko učinkovitost metode merjenja sijaja kože s Skin Glossymetrom za vrednotenje čistilne sposobnosti izdelkov. Za potrditev uspešnosti te metode za vrednotenje čistilnega učinka bi morali testiranje izvesti na večjem številu prostovoljcev z aknasto kožo.

Pred potencialnim lansiranjem izdelka na tržišče bi morali izvesti še dolgoročne teste stabilnosti in izzivni preizkus, kjer bi preverili mikrobiološko stabilnost izdelka. Za potrditev, da je izdelek zares varen za uporabo na aknasti koži in ne povzroča nastanka iritacij, predlagamo merjenje rdečine kože s kolorimetrom pred in po čiščenju z vzorci ME.

6. LITERATURA

1. Baumgartner S, Bajramovič N: Farmaceutski izdelki za zdravljenje aken in nega kože. Farmaceutski vestnik 2006; 57: 84-92
2. Kralj B: Etiologija in zdravljenje aken. Farmaceutski vestnik 2006; 57: 81-83
3. Yates V: Acne: current treatment. Clinical Medicine 2005; 5: 569-572
4. Draelos ZD, Thaman LA: Cosmetic formulation of skin care products, Boca Raton: CRC Press, New York, 2010: 251-298
5. Picardo M, Ottaviani M, Camera E, Mastrofrancesco A: Sebaceous gland lipids. Dermato-endocrinology. 2009; 1(2): 68-71
6. Zouboulis CC, Piquero-Martin J: Update and future of systemic acne. Dermatology 2003; 206: 37-55
7. Brooze G: Handbook of detergents. Part A: Properties. Marcel Dekker, Inc, 2008: 1-7
8. The Best Type of Bar Soap for Your Skin: <https://www.verywell.com/types-of-bar-soaps-1069542> (dostop 18. 4. 2018)
9. Ahlin Grabnar P: Predavanja pri predmetu Uvod v kozmetologijo: Razdelitev kozmetičnih izdelkov. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2015.
10. Patravale VB, Mandawgade SD: Novel cosmetic delivery systems: an application update. International Journal of Cosmetic Science 2008; 30: 19-33
11. Rozman B, Bogataj M: Pregled mikroemulzijskih sistemov za peroralno uporabo. Farmaceutski vestnik 2006; 57: 189-195
12. Gosenca M: Predavanja pri predmetu Nanotehnologija v kozmetologiji: Mikroemulzije in tekoči kristali – opredelitev in uporaba v kozmetologiji. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2016.
13. Jurkovič P, Gašperlin M: Mikroemulzije za dermalno dostavo učinkovin. Farmaceutski vestnik 2004; 55: 565-571
14. Nastiti C, Ponto T, Ramadan Abd E, Grice JE, Benson HAE, Roberts MS: Topical Nano and Microemulsion for Skin Delivery. Pharmaceutics 2017; 9(4): 37.
15. Martin A: Physical pharmacy 4th ed., Lea&Febiger, London, 1993: 43-44
16. Rolfe HM: A review of nicotinamide: treatment of skin diseases and potential side effects. Journal of Cosmetic Dermatology 2014; 13: 324-328
17. Nicotinamide: <https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotinamide> (dostop 11. 5. 2018)

18. Otte N, Borelli C, Korting HC: Nicotinamide - Biologic actions of an emerging cosmetic ingredient. *International Journal of Cosmetic Science* 2005; 27(5): 255-261
19. Walocko FM., Eber AE, Keri JE, AL-Harbi MA, Nouri K: The role of nicotinamide in acne treatment. *Dermatologic Therapy* 2017; 30(5): 1-7
20. Shalita A., Smith JG, Parish LC, Sofman MS, Chalker DK: Topical nicotinamide compared with clindamycin gel in the treatment of inflammatory acne vulgaris. *International Journal of Dermatology* 1995; 34(6): 434-437
21. Draelos ZD, Matsubara A, Smiles K: The effect of 2% niacinamide on facial sebum production. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy* 2006; 8(2): 96-101
22. Niacinamide PC. <http://shrani.si/f/36/Ke/4Uq52DOJ/niacinamid-pc1.png> (dostop 11. 5. 2018)
23. Plantacare® 1200 UP.
<https://www.ulprospector.com/en/eu/PersonalCare/Detail/804/34231/Plantacare-1200-UP> (dostop 4. 5. 2018)
24. Decyl Glucoside.
<https://www.ulprospector.com/en/eu/PersonalCare/Detail/5736/204141/Decyl-Glucoside-C8-10-Fatty-Alcohol-Glycoside--SpecSufc-APG0810-?st=1&sl=60904190&crit=RGVjeWwgR2x1Y29zaWRl&ss=2> (dostop 4. 5. 2018)
25. 2-fenoksietanol.
https://www.carlroth.com/downloads/sdb/sl/N/SDB_NC12_SI_SL.pdf (dostop dne 4. 5. 2018)
26. Uredba (ES) št. 1223/2009
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:sl:PDF> (dostop 5. 5. 2018)
27. Citric acid. https://en.wikipedia.org/wiki/Citric_acid (dostop 5. 5. 2018)
28. Cetiol OE. <https://www.truthinaging.com/ingredients/dicaprylyl-ether> (dostop 5. 5. 2018)
29. Eutanol G.
<https://www.ulprospector.com/en/na/PersonalCare/Detail/75/31943/Eutanol-G> (dostop 5. 5. 2018)
30. Glyceryl Oleat. https://www.makingcosmetics.com/Glyceryl-Oleate_p_1013.html (dostop 8. 5. 2018)

31. pH. <https://en.wikipedia.org/wiki/PH> (dostop 27. 5. 2018)
32. Baumgartner S, Zvonar A: Kozmetični izdelki I: vaje in teoretične osnove. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2013
33. Ahlin Grabnar P: Predavanja pri predmetu Uvod v kozmetologijo: Učinkovitost kozmetičnih izdelkov. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2015
34. GL 1 – The Skin-Glossymeter GL 200. <https://www.courage-khazaka.de/index.php/en/products/scientific/134-skin-glossymeter#gl4> (dostop 25. 5. 2018)
35. Skin-Glossymeter GL 200. <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/all-downloads/downloads-en/file/23-brochgl200rv600e> (dostop 26. 5. 2018)
36. Valant Zupančič A: Uvod v reologijo, 1. izdaja. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2007
37. Gosenca M, Gašperlin M, Kristl J: Iritativni kontaktni dermatitis: od mehanizmov do vrednotenja iritantov. Farmaceutski vestnik 2012; 63: 146-152
38. High-Efficiency Face Cleaner. <https://hylamide.com/product/core-high-efficiency-cleaner-120ml> (dostop 1. 5. 2018)
39. Oil Cut Cleansing <https://beautytap.com/product/troiareuke-acsen-oil-cut-cleansing> (dostop 1. 5. 2018)
40. Microemulsion Make-Up Remover. <https://beautyjungle.no/en/blogg/Please-find-below-information-about-our-great> (dostop 1. 5. 2018)
41. Paese Cosmetics Microemulsion Make-Up Remover. <https://www.ebay.com/itm/Paese-Cosmetics-Microemulsion-Make-Up-Remover-220-g-Brand-New-/192446527817> (dostop 2. 5. 2018)
42. Schmalfuss U., Neubert R., Wohlrab W.: Modification of drug penetration into human skin using microemulsions. J Controlled Release 1997; 46(3): 279-285.
43. Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2007: 43-53
44. Becher P.: Emulsions: Theory and practice. Reinhold Publishing Corporation, New York, 1966: 60-65
45. Roš E.: Razvoj sklopa metod za razlikovanje med izbranimi vzorci na osnovi belega vazelina. *Magistrsko delo*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2015