https://doi.org/10.63356/stes.med.2026.003 УДК 616.34-006:582.991.15

NISKOENERGETSKE NANOEMULZIJE SA FERULINSKOM I KOFEINSKOM KISELINOM – FORMULACIONA ISTRAŽIVANJA I ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL

Autor: NEVENA SIMOVIĆ
e-mail: nevena.s.0123@gmail.com
Mentor: prof. dr sc. Snežana Savić, dr sc Ana Gledović, naučni saradnik
Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Uvod: Ferulinska i kofeinska kiselina, novije prirodne sirovine sa antioksidativnim efektom, dobri su kandidati za tretman oksidativnog stresa koji svakodnevno nastaje u koži pod dejstvom brojnih štetnih uticaja. Međutim, njihova upotreba je limitirana zbog loše rastvorljivosti, nestabilnosti i male bioraspoloživosti, te postoji realna potreba za inovatinim formulacijama.

Cilj rada: Razvoj niskoenergetskih nanoemulzija kao nosača za ferulinsku i kofeinsku kiselinu u kombinaciji sa novijim sastojcima sertifikovanim za prirodnu kozmetiku, uz analizu antioksidativne aktivnosti i procenu stabilnosti.

Materijal i metode: Nanoemulzije su izrađene niskoenergetskom metodom fazne inverzije na sobnoj termperaturi. Na osnovu dobijenih parametara konstruisan je pseudoternarni fazni dijagram radi grafičke potvrde opsega nastanka i stabilnosti optimalnih formulacija. Karakterizacija i procena stabilnosti nanoemulzija sprovedeni su merenjem veličine i raspodele veličina kapi, pH vrednosti i električne provodljivosti, procenta transparencije i mikroskopskom analizom. Antioksidativna aktivnost ispitivana je primenom DPPH i ABTS testa.

Rezultati: Konvencionalna smeša surfaktanata na bazi polisorbata 80 i sorbitan oleata bila je superiorniji izbor u odnosu na prirodne poliglicerilske estre. Novije sirovine sertifikovane za prirodnu kozmetiku – Emogreen L19 (emolijens) i Euxyl ECO (multifunkcionalni aditiv) – uspešno su zamenile sintetska ulja i aditive. Nanoemulzije sa ferulinskom i kofeinskom kiselinom imale su male veličine kapi (< 40 nm) i efikasno su inhibirale ABTS i DPPH slobodne radikale (≥ 85 %).

Zaključak: Nanoemulzija sa kofeinskom kiselinom i Euxyl-om ECO pokazala je najbolju stabilnost i antioksidativnu aktivnost te predstavlja formulaciju izbora. Uz adekvatnu optimizaciju sistema, formulacija nanoemulzije sa ferulinskom kiselinom i Euxyl-om PE zadržava značajan potencijal kao dodatni kandidat za buduća istraživanja.

Ključne reči: prirodna kozmetika; niskoenergetske nanoemulzije; kofeinska kiselina; ferulinska kiselina; antioksidativni potencijal

UVOD

U uslovima dinamičnog tržišta koje je podložno čestim promenama i novim zahtevima, savremena kozmetička industrija kontinuirano odgovara na brojne izazove u pogledu bezbednosti i efikasnosti, ali i povećane potražnje korisnika za prirodnim kozmetičkim proizvodima. Poznato je da je ljudsko telo svakodnevno izloženo štetnom dejstvu ultraljubičastog zračenja, zagađenja vazduha, ozona, dima cigareta, teških metala i stresora povezanih sa svakodnevnim stilom života [1]. U tom smislu, preporučuje se primena

multifunkcionalnih proizvoda za negu kože, u cilju njene zaštite, kao i podsticanja fizioloških, regenerativnih mehanizama koji revitalizuju kožu i omogućuju njenu funkciju. Iz pomenutih razloga, prirodne sirovine su u poslednje vreme u intenzivnom fokusu istraživača imajući u vidu brojne potencijalne pozitivne efekte na koži, ali i rastuću ekološku osvešćenost potrošača i povećanu zabrinutost usled neželjenog unosa sintetskih sastojaka prilikom svakodnevne upotrebe kozmetičkih proizvoda [2,3].

Kofeinska (3,4-dihidroksi cimetna kiselina) i ferulinska (4-hidroksi-3-metoksi cimetna kiselina) kiselina jesu fenolna jedinjenja široko rasprostranjena u povrću (paradajz, krompir, kupus, karfiol), voću (citrusi, jagode, jabuke, kruške), žitaricama (pšenica, ovas, ječam) i dobro su poznate po svom antioksidativnom delovanju. Zahvaljujući prisustvu fenolnog prstena i nezasićenog bočnog lanca (Slika br. 1 i 2) vrlo lako neutrališu slobodne kiseonične radikale i time vrše efikasnu zaštitu organizma od oksidativnog stresa [3]. Dokazano je da topikalna primena pomenutih fenolnih kiselina sprečava fotostarenje kože uzrokovano štetnim ultraljubičastim zracima i prevenira rano narušavanje integriteta kože koje se ogleda u pojavi bora, gubitku jedrosti, sjaja i nastanku hiperpigmentacija [4].

Ferulinska i kofeinska kiselina se mogu naći u kozmetičkim proizvodima namenjenim fotoprotekciji, zarastanju rana i posvetljivanju kože (dodatno, ferulinska kiselina podstiče angiogenezu i inhibira melanogenezu). Njihovu širu primenu u kozmetici ograničavaju problemi poput slabe rastvorljivosti u vodi, hemijske nestabilnosti (naročito pri baznom pH, povišenoj temperaturi i izlaganju svetlosti), kao i ograničena permeacija [4,5].

Prethodne publikacije koje su se bavile prevazilaženjem ovih problema uključuju inkorporiranje pomenutih kiselina u napredne nosače, poput nanoemulzija, lipidnih nanočestica, multiplih emulzija [3,6–9].

Kao jedan od posebno obećavajućih savremenih pristupa u poslednjih nekoliko decenija, predlaže se primena nanotehnologija, konkretno, nanoemulzija za izradu naprednih kozmetičkih proizvoda. Nanoemulzije predstavljaju koloidne, izotropne disperzne sisteme sastavljene od dve tečnosti koje se ne mešaju (ulje i voda) stabilizovane monoslojem jednog ili više surfaktanata, koji formiraju sferične kapi prečnika 20–200 nm. To su termodinamički nestabilni, ali kinetički stabilni sistemi, a zahvaljujući submikronskim dimenzijama kapi nanoemulzije generalno mogu imati duži rok trajanja u odnosu na klasične makroemulzije [10, 11]. Nanometarska veličina kapi determiniše i njihov karakterističan vizuelni izgled (polutransparentne ili mlečnobele sa specifičnim plavičastim odsjajem) i pogodna senzorna svojstva (visoka fluidnost i dobra razmazivost). Formiranjem homogenog i kompaktnog filma na površini kože, ovi sistemi omogućavaju efikasniju hidrataciju i pospešuju isporuku aktivnih supstanci u odnosu na tradicionalne emulzione sisteme [12,13].

Dodatni benefit predstavlja činjenica da se nanoemulzije mogu izraditi i niskoenergetskim metodama izrade, koje se zasnivaju na oslobađanju hemijske energije sistema tokom specifičnog mešanja odgovarajućih komponenti u određenom odnosu. Ove tehnike su ekonomski isplative, jednostavne za izvođenje i omogućavaju izradu manjih serija uzoraka uz minimalan utrošak materijala i energije. Pogodne su za inkorporiranje prirodnih i termolabilnih supstanci, jer omogućavaju izradu i na sobnoj temperaturi, bez izlaganja visokom temperaturnom ili mehaničkom stresu [14].

Detaljnom pretragom literature utvrđeno je da postoji svega nekoliko studija posvećenih nanoemulzijama sa ferulinskom kiselinom [13,15], dok je za inkorporiranje kofeinske kiseline dostupna jedna publikacija [6]. Uočeni nedostatak podataka bio je ključni motiv za koncipiranje i sprovođenje ovog istraživanja.

Prvi cilj ovog istraživanja bio je razvoj formulacija niskoenergetskih nanoemulzija kao nosača za pomenute prirodne kiseline u kombinaciji sa novijim sirovinama odobrenim za prirodnu kozmetiku. Shodno tome, u ovom istraživanju ispitivana je mogućnost zamene standardno korišćene smeše surfaktanata – polisorbat 80 i sorbitan oleat (S_{mix}) prirodnijom alternativom, tj. smešom poliglicerilskih estara (PG), koji su takođe pogodni

za izradu niskoenergetskih nanoemulzija [16]. Takođe je testirana potencijalna zamena konvencionalnog *Euxyl PE* aditiva novoodobrenim multifunkcionalnim aditivom *Euxyl ECO*, u skladu sa COSMOS / Ecocert standardima za prirodnu kozmetiku. Kao glavna komponenta masne faze ispitivani su noviji sertifikovani biorazgradivi alkani – *Emogreen L15* i *L19* za koje je nedavno pokazano da su moguća alternativa sintetskim mineralnih uljima pri izradi niskoenergetskih nanoemulzija [17].

Drugi cilj ovog istraživanja bio je da se analizira antioksidativni potencijal ferulinske i kofeinske kiseline pre i nakon inkorporiranja u nanoemulzije, kako bi se procenila njihova funkcionalnost i stabilnost u finalnim sistemima tipa kozmetičnih (niskoenergetskih) nanoemulzija. Dodatno, sprovedeno je praćenje preliminarne stabilnosti optimalnih formulacija tokom mesec dana čuvanja na sobnoj temperaturi.

MATERIJALI I METODE

Materijali

Za izradu nanoemulzija korišćeni su nejonski surfaktanti: polisorbat 80 – *INCI*: *Polysorbate 80 (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH*, Nemačka) u kombinaciji sa sorbitan oleatom – *INCI: Sorbitan oleate (Fagron*, Italija) ili poliglicerilski estri: poligliceril-10 laurat – *INCI: Polyglyceryl-10 Laurate (Durosoft ®PG10L-SG, Stephenson*, Ujedinjeno Kraljevstvo) u kombinaciji sa smešom poligliceril-4 laurata i poligliceril-6 laurata – *INCI: Polyglyceryl-4 Laurate (and) Polyglyceryl-6 Laurate (PolyAquol™ LW, Innovacos*, Italija); emolijensi: *Emogreen® L15* i *Emogreen® L19*, oba sa istim *INCI* nazivom – *C15-19 Alkane (Seppic*, Francuska); kostabilizator: polietilenglikol 400 – *INCI: PEG-400 (Suzhou Greenway Biotech Co., Ltd,* Kina); multifunkcionalni aditivi (konzervansi): *Euxyl® PE9010 – INCI: Phenoxyethanol (and) Ethylhexylglycerin* i *Euxyl® ECO 910 – INCI: Benzyl Alcohol (and) Cymbopogon Flexuosus Leaf Oil (and) Tocopherol (Schülke GmbH*, Nemačka), a vodena faza nanoemulzije je bila visokoprečišćena voda – *INCI: Aqua (Water) (Maxlab Nature's laboratory*, Srbija). Kao model kozmetički aktivne supstance (KAS) ispitivane su ferulinska kiselina – *INCI: Ferulic acid (Inabata*, Francuska) i *kofeinska kiselina – INCI: Caffeic acid (Suzhou Greenway Biotech Co., Ltd,* Kina).

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti KAS pre i nakon inkorporiranja u odgovarajuće nanoemulzije, korišćene su sledeće hemikalije: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijumova so (ABTS), kalijum persulfat, metanol (HPLC kvaliteta) proizvela je kompanija *Sigma-Aldrich, Laborchemikalien GmbH*, Nemačka, dok je etanol (96% v/v, p.a.) proizvela kompanija *Honeywell* (Nemačka).

Metode

Izrada niskoenergetskih nanoemulzija

Formulacije nanoemulzija izrađene su niskoenergetskom metodom fazne inverzije usled promene sastava (engl. *phase inversion composition – PIC*). Ova metoda je bazirana na promeni spontane zakrivljenosti surfaktanata od negativne ka pozitivnoj (formiranje ulje u vodi – U/V tipa nanoemulzija) ili obrnuto (nastanak voda u ulju – V/U nanoemulzija). Prilikom postepenog dodavanja vodene u smešu masne faze i surfaktanata, sistem prolazi kroz seriju karakterističnih faza: V/U mikroemulzije, bikontinuirani ili lamelarni tečno-kristalne strukture do nanoemulzija U/V tipa, kada udeo vode u sistemu pređe kritičnu koncentraciju [13,16].

Odmerene komponente (masna faza *Emogreen L19,* mešavina surfaktanata i kosurfaktanata – S_{mix}: polisorbat 80, sorbitan oleat, *Euxyl PE / Euxyl ECO,* kostabilizator PEG 400,

te ferulinska / kofeinska kiselina) su pomešane radi dobijanja homogenih smeša blanko i formulacija sa odabranim kiselinama. Pojedinačne smeše titrirane su visoko prečišćenom vodom uz postepeno povećanje udela vodene faze i konstantno mešanje staklenim štapićem na sobnoj temperaturi. Nakon smanjenja viskoziteta i formiranja tečnije strukture izrada je nastavljena na vorteks uređaju (brzina 1000 obrtaja / min). Nakon dodatka kompletne vodene faze, izvršena je završna homogenizacija u trajanju od dva minuta na istoj brzini. Finalne U/V nanoemulzije su identifikovane kao homogene polutransparentne tečne emulzije karakterističnog plavičastog odsjaja, sa prosečnom veličinom kapi < 100 nm (potvrđeno relevantnom metodom). Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi (25 ± 2°C), zaštićeno od svetlosti tokom mesec dana.

Konstrukcija pseudoternarnih faznih dijagrama

Izrada pseudoternarnih faznih dijagrama izvedena je metodom vodene titracije radi praćenja fizičko-hemijskih promena kroz koje sistem prolazi tokom postepenog razblaživanja. Temena trougla definisana su kao 100% udeo čiste vodene faze (gornje teme), uljane faze (levo teme) i S_{mix} sistema (desno teme). Stranice (ose) trougla jesu binarni granični sistemi, a unutrašnjost (površina) predstavlja trokomponentnu mešavinu gde svaka tačka definiše maseni udeo i sastav sistema. Eksperimentalne tačke na dijagramu dobijene su postepenim dodavanjem vodene faze u smešu masne faze sledećim tempom: 40 μL (10 ponavljanja), zatim 100 μL (10 ponavljanja), 200 μL (10 ponavljanja) i završno po 400 μL do potpunog utroška vodene faze uz konstantno mešanje i beleženje vizuelnih promena sistema nakon svakog koraka.

Grafički prikaz i matematička konstrukcija pseudoternarnih faznih dijagrama izvršeni su u programskom jeziku *Python* (verzija 3.x) unutar okruženja *Google Colaboratory (Google LLC, Mountain View, CA, USA)* uz korišćenje specijalizovane biblioteke za ternarnu analizu *python-ternary* i biblioteke za vizuelizaciju podataka *matplotlib*.

Analiza veličine kapi nanoemulzija

U cilju potvrde nanoveličina kapi dobijenih uzoraka nanoemulzija i praćenja njihove stabilnosti tokom čuvanja, korišćena je metoda bazirana na foton korelacionoj spektroskopiji, primenom uređaja *Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd*., Velika Britanija). Kao ključni parametri određivani su: prosečna veličina kapi nanoemulzija (engl. *Z-average diameter, Z-ave*) i raspodela veličine kapi (indeks polidisperznosti – PDI). Naposredno pre analize uzorci su razblaženi visokoprečišćenom vodom (1:100, v/v), a merenja su sprovedena na temperaturi od 25°C u triplikatu [16].

Mikroskopska analiza

Optička mikroskopija korišćena je za ispitivanje znakova nestabilnosti nanoemulzija (npr. pojava agregata kapi ili kristala ferulinske / kofeinske kiseline). Analiza je vršena pri uveličanju od 40 do 100x pomoću polarizacionog mikroskopa *Olympus BX53P*, a dobijene slike su analizirane pomoću softvera *cellSens Entry*, verzija 1.14 (*Olympus*, Tokio, Japan).

Spektroskopska karakterizacija optičke bistrine (% transparencije)

Optička bistrina nanoemulzija (pripremljenih bez ili sa ferulinskom / kofeinskom kiselinom) određivana je spektroskopski pomoću *Evolution 300 UV-VIS* spektrofotometra (*Thermo Scientific*, Velika Britanija) merenjem procenta transparencije (%TP) uzoraka na 600 nm, pri čemu je visokoprečišćena voda bila slepa proba. Talasna dužina od 600 nm odabrana je u cilju izbegavanja apsorpscionih maksimuma ferulinske, kofeinske kiseline

i ispitivanih aditiva u UV regionu. Ovim korakom eliminisan je uticaj hemijske prirode komponenti na merenje, čime je osigurano da su promene u %TP direktna posledica rasejanja svetlosti na kapima nanoemulzija, tj. stvarne optičke bistrine sistema.

Merenje pH vrednosti i električne provodljivosti

Merenje pH vrednosti izvedeno je potenciometrijskom metodom direktnim uranjanjem staklene elektrode pH metra (*pH meter AD1000, Adwa*, Mađarska) u ispitivane uzorke nanoemulzija. Električna provodljivost merena je konduktometrijskom metodom na uređaju *sensION*^{TM}*+EC71 (HACH LANGE GmbH Ltd*, Nemačka) direktnim uranjanjem elektrode konduktometra u ispitivane uzorke. Sva merenja pH vrednosti i električne provodljivosti izvedena su u triplikatu, na sobnoj temperaturi (25 ± 2°C).

Stabilnost nanoemulzija

U cilju ispitivanja stabilnosti formulacija nakon mesec dana čuvanja na sobnoj temperaturi, sprovedene su prethodno navedene metode karakterizacije: merenje veličine i raspodele veličine kapi, pH vrednosti, električne provodljivosti, % transparencije i mikroskopska analiza.

***In vitro* ispitivanje antioksidativnog potencijala**

DPPH test

Pripada grupi antioksidativnih testova baziranih na prenosu vodonikovog atoma (engl. *hydrogen atomic transfer – HAT*) pri čemu antioksidansi prisutni u uzorku redukuju DPPH radikal do DPPH-H. Intenzitet obezbojenja ljubičastog DPPH radikala proporcionalan je koncentraciji antioksidanata u uzorku, pri čemu se vrednosti apsorbancije mere na 514–517 nm [18]. Test je izveden pripremom 0,04% m/v rastvora DPPH u metanolu, mešanjem različitih koncentracija ispitivanih uzoraka rastvora ferulinske (5–30 μg/mL) i kofeinske kiseline (1,25–15 μg/mL) sa konstantnom zapreminom rastvora DPPH (5 mL). Nanoemulzije su ispitivane na sličan način u koncentracijama 1–5 μL/mL (što odgovara 3–15 μg/mL kiselina u nanoemulziji). Uzorci su za vreme testa čuvani zaštićeno od svetlosti, a reakciono vreme iznosilo je 20 minuta. Rezultati su izraženi kao % inhibicije DPPH radikala koji je izračunat prema jednačini:

$$\% \text{ Inhibicije DPPH} = [(A_{DPPH} - A_{UZORKA}) / A_{DPPH}] \times 100$$

gde je A_{DPPH} apsorbancija slepe probe (5 mL metanola + 5 mL rastvora DPPH), a A_{UZORKA} apsorbancija uzorka nakon 20 min.

ABTS test

Pripada grupi antioksidativnih testova zasnovanih na prenosu jednog elektrona (engl. *single electrone transfer – SET*), gde antioksidansi prisutni u uzorku redukuju pre-generisani $ABTS^{\bullet+}$ katjonski radikal do ABTS. Intenzitet obezbojenja zeleno-plavog ABTS katjonskog radikala proporcionalan je koncentraciji antioksidanata u uzorku, pri čemu se vrednosti apsorbancije mere na 734 nm [19]. Pre samog testa, generisan je ABTS katjonski radikal mešanjem 10 mL ABTS (7 mM) u razblaženom 70% v/v etanolu i 176 μL 140 mM rastvora kalijum-persulfata (vodeni rastvor) – konačna koncentracija rastvora iznosi 2,45 mM. Smeša je aktivirana 16 sati na tamnom mestu i na sobnoj temperaturi, a potom je razblažena 70% v/v etanolom do apsorbancije oko 0,7 (radni rastvor ABTS-a).

Test je izveden mešanjem konstantne zapremine radnog rastvora ABTS radikala (9,9 mL) sa različitim koncentracijama ispitivanih uzoraka rastvora ferulinske (1 μg/mL – 6 μg/mL) i kofeinske kiseline (0,5–5 μg/mL). Nanoemulzije su ispitivane na sličan način u koncentracijama 0,2 – 3 μL/mL (što odgovara 0,6 – 9 μg/mL kiselina u nanoemulziji). Uzorci su za vreme testa čuvani zaštićeno od svetlosti, a reakciono vreme iznosilo je šest minuta. Rezultati su izraženi kao % inhibicije ABTS slobodnog radikala prema jednačini:

$$\% \text{ Inhibicije ABTS} = [(A_{ABTS} - A_{UZORKA}) / A_{ABTS}] \times 100$$

gde je A_{ABTS} apsorbancija slepe probe (100 μL 70% v/v etanola + 9,9 mL rastvora ABTS-a), a A_{UZORKA} apsorbancija uzorka (uzorak +70% v/v etanola do 100 μL + 9,9 mL rastvora ABTS-a nakon šest min).

Grafici zavisnosti antioksidativne aktivnosti od koncentracije testiranih uzoraka izrađeni su u programu *Origin Pro 8.5*, uz pomoć koga su očitane i IC_{50} vrednosti (koncentracija antioksidansa koja inhibira 50% slobodnog radikala) u cilju poređenja njihove aktivnosti.

Statistička analiza

Svi eksperimenti i merenja sprovedeni su u tri nezavisne serije (n = 3) u triplikatima. IC_{50} vrednosti za sve nanoemulzije preračunate su i izražene isključivo na osnovu ekvivalentne koncentracije inkorporirane aktivne komponente (ferulinske ili kofeinske kiseline) radi objektivnog i direktnog poređenja sa čistim kiselinama. Jednofaktorska ANOVA sa *Tukey post hoc* testom sprovedena je za tri i više normalno raspodeljenih grupa podataka (*Origin Pro 8.5*), pri čemu je nivo značajnosti bio podešen na $p < 0,05$.

REZULTATI

Razvoj formulacija niskoenergetskih nanoemulzija

Ispitivanje uticaja ključnih formulacionih parametara na formiranje blanko nanoemulzija

Prvi deo formulacionih istraživanja baziran je na određivanju minimalne ukupne koncentracije surfaktanata (engl. *Surfactant-to-Emulsion Ratio – SER*) neophodne za formiranje niskoenergetskih nanoemulzija i optimalni odnos surfaktanata prema masnoj fazi (engl. *Surfactant-to-Oil Ratio – SOR*). Utvrđeno je da je optimalna SER vrednost za formiranje oba tipa nanoemulzija iznosila 10–12%, pri čemu je SOR vrednost bila 0,8 do 1, a udeo vodene faze podešen na 70–80% m/m. Razvojem formulacija primećena je neophodnost prilagođavanja hidrofilno-lipofilne ravnoteže (HLB) smeše surfaktanata na oko 11, u cilju bolje kompatibilnosti sa testiranim emolijentnim uljima. Cilj je postignut kombinovanjem polisorbata 80 i sorbitan oleata (S_{mix}), u masenom odnosu 2:1, ili poliglyceril-10 laurata i poligliceril-4/-6 laurata (PG), u istom odnosu.

Dobijene S_{mix} (Slika br. 3) i PG (Slika br. 4) blanko nanoemulzije bile su polutransparentne do mlečnobele, sa karakterističnim plavičastim odsjajem usled formiranih kapi u nanometarskom opsegu (Tindalov efekat). Raspon izmerenih prosečnih veličina kapi (*Z*-ave) kretao se od 72,21 ± 0,02 nm (za formulaciju 12 S_{mix}) do 262,05 ± 2,47 nm (14 S_{mix}), uz relativno širu distribuciju veličina kapi (izraženo kao indeks polidisperznosti–PDI) od ~ 0,15 do 0,32, respektivno (Slika br. 3). U slučaju blanko nanoemulzija na bazi poliglicerilskih estara (PG NE) zapažene su nešto niže vrednosti: *Z*-ave od 63,17 ± 0,01 nm do 199,37 ± 2,55 nm, a PDI od 0,24 do 0,26, za uzorke 5 i 7, redom (Slika br. 4).

Poređenjem izrađenih formulacija sa dva različita emolijentna ulja, uočena je bolja

kompatibilnost *Emogreen L19* sa oba tipa surfaktanata u odnosu na *Emogreen L15*. Merenjem prosečne veličine kapi dobijenje su značajno manje (i do dva puta niže) vrednosti. Na osnovu ovog rezultata, *Emogreen L19* je odabran kao optimalna masna faza za sva dalja formulaciona istraživanja (Slika br. 5 i 6).

Poseban akcenat stavljen je na ispitivanje mogućnosti zamene aditiva *Euxyl PE* smešom konzervanasa sertifikovanih za prirodnu kozmetiku – *Euxyl ECO* (smeša benzil-alkohola, tokoferola i etarskog ulja limunove trave), s obzirom na to da pregledom literature nije istražena ova kombinacija u kontekstu niskoenergetskih nanoemulzija. Dobijeni rezultati potvrđuju kompatibilnost aditiva *Euxyl ECO* sa S_{mix} NE i PG NE formulacijama (u koncentraciji do 1% m/m). Formulisane nanoemulzije pokazuju uporedive karakteristike u pogledu veličine kapi i PDI u poređenju sa alternativama izrađenim sa *Euxyl PE* (Slika br. 6).

Optimizacija formulacija – dodatak ferulinske i kofeinske kiseline

Nakon uspešnog definisanja optimalnih parametara za izradu blanko nanoemulzija, ključni korak u daljem razvoju sistema predstavljao je inkorporacija kozmetički aktivnih supstanci sa izraženim antioksidativnim svojstvima. U nastavku je analizirana kompatibilnost ferulinske i kofeinske kiseline sa odabranim S_{mix} sistemima i multifunkcionalnim aditivima.

U S_{mix} nanoemulzije uspešno je inkorporirano od 0,1 do 0,5% m/m ferulinske i kofeinske kiseline, pri čemu je kao optimalna odabrana koncentracija od 0,3%. Rezultujuće optimizovane S_{mix} nanoemulzije sa ferulinskom i kofeinskom kiselinom bile su polutransparentne (Slika br. 7, Tabela br. 1), sa prosečnom inicijalnom veličinom Z-ave ≤ 38 nm i PDI ≤ 0,16, dok su odgovarajuće blanko formulacije imale nešto niže vrednosti Z-ave ≤ 33 nm, uz višu vrednost polidisperznosti (PDI ≤ 0,24).

Tokom jednomesečnog praćenja fizičko-hemijske stabilnosti optimizovanih S_{mix} nanoemulzija na sobnoj temperaturi, analizirane su promene procenta transparencije (%TP) na 600 nm u strogoj korelaciji sa rezultatima DLS analize (srednja veličina kapi, Z-ave i indeks polidisperznosti, PDI). Rezultati pokazuju da vrednosti %TP ne treba posmatrati izolovano, već kao optičku posledicu promena veličine kapi uljane faze. Kod blanko nanoemulzija i sistema sa *Euxyl ECO* aditivom, %TP i parametri veličine kapi ostaju stabilni tokom celog perioda posmatranja. Izuzetak jeste formulacija 22 (S_{mix} nanoemulzija sa ferulinskom kiselinom i aditivom *Euxyl ECO*) kod koje je zabeležen izražen pad procenta transparencije sa inicijalnih 19,63% na 7,23% nakon mesec dana čuvanja. Ovako naglašen pad optičke bistrine u potpunosti korelira sa DLS podacima (Slika br. 8, Tabela br. 2), koji za isti sistem registruju merljiv porast hidrodinamičkog prečnika kapi. Pomenute promene ukazuju na početne procese kinetičke destabilizacije i blagu tendenciju rasta kapljica usled sekundarnih interakcija između kiseline i fenoksietanola u aditivu. Suprotno tome, ekvivalentna formulacija sa multifunkcionalnim aditivom *Euxyl ECO,* ali sada kofeinskom kiselinom (formulacija 23) pokazuje znatno veću stabilnost sistema i manja odstupanja u dimenzijama kapi. Sve testirane formulacije imale su pH vrednosti u fiziološkom opsegu pogodnom za primenu na koži (4,5–6,5) i bez značajnih promena nakon mesec dana. Vrednosti električne provodljivosti kretale su se od 118,5 do 143,3 μS/cm, čime je dodatno potvrđeno da je reč o nanoemulzijama U/V tipa i odsustvu jonske destabilizacije. Mikroskopskom analizom potvrđeno je odsustvo agregata uljanih kapljica, kao i odsustvo kristala nesolubilisane FK / KK u uzorcima aktivnih S_{mix} nanoemulzija. Nanoemulzije na bazi poliglicerilskih estara (PG NE) pokazale su izrazitu inkompatibilnost već sa minimalnom koncentracijom obe kiseline, pri čemu je neposredno tokom izrade dolazilo do narušavanja strukture i raslojavanja sistema. Prema tome, za dalja ispitivanja antioksidativnog potencijala odabrane su optimizovane nanoemulzije na bazi smeše poli-

sorbata 80 i sorbitan oleata (S_{mix} NE).

Antioksidativni potencijal ferulinske i kofeinske kiseline pre i nakon inkorporiranja u nanoemulzije

Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti čistih rastvora ferulinske i kofeinske kiseline prikazani u Tabeli br. 3 potvrđuju njihov visoki antioksidativni kapacitet, pri čemu je ferulinska kiselina pokazala veći afinitet prema $ABTS^{\bullet+}$ katjonskom radikalu, a kofeinska prema DPPH radikalu. Poređenje IC_{50} vrednosti čistih kiselina i odgovarajućih nanoemulzija izvršeno je na istoj koncentracionoj osnovi kozmetički aktivne supstance, uz primenu statističke obrade podataka iz tri nezavisne serije ($p < 0,05$).

Sve testirane S_{mix} nanoemulzije sa inkorporiranom ferulinskom i kofeinskom kiselinom zadržale su visoku antioksidativnu aktivnost i nakon mesec dana čuvanja na sobnoj temperaturi. Kao što je prikazano na Slikama br. 9 i 10, najviše vrednosti procenta inhibicije oba testirana slobodna radikala zabeležene su u slučaju formulacije 23 NE KK + *ECO* – sa kofeinskom kiselinom i aditivom *Euxyl ECO* (~ 91,83% INH_{DPPH} i ~ 95,69% INH_{ABTS}).

U slučaju odgovarajućih blanko formulacija, maksimalna izmerena aktivnost iznosila je tek ~ 3 % INH_{ABTS} i ~ 1% INH_{DPPH} (za 21 NE + *Euxyl ECO*).

DISKUSIJA

Uloga *Euxyl PE* i PEG 400

Značajno smanjenje veličine kapi omogućeno je uključivanjem aditiva *Euxyl PE* u pomenute formulacije (komercijalno dostupna smeša fenoksietanola i etilheksilglicerina) u koncentraciji od 0,5 do 1% m/m. Takav rezultat je u skladu sa prethodnim studijama u kojima je dokazano da ovaj aditiv (pored uloge konzervansa) može da vrši i funkciju kosurfaktanta / kostabilizatora u niskoenergetskim nanoemulzijama [16]. Kao dodatni kostabilizator i kosolvens primenjen je PEG 400, koji je značajno povećao rastvorljivost ferulinske i kofeinske kiseline u smeši surfaktanata i masne faze.

Tumačenje pseudoternarnih faznih dijagrama optimalnih nanoemulzionih sistema

Karakteristike nanoemulzione oblasti i mehanizam faznih prelaza

Pseudoternarni fazni dijagrami odabranih optimalnih formulacija omogućavaju identifikaciju oblasti formiranja nanoemulzije i definisanje optimalnog odnosa komponenata (S_{mix}, uljane i vodene faze) neophodnih za obrazovanje nanoemulzija sa minimalnim sadržajem surfaktanata. Titracijom vodenom fazom prate se fizičko-hemijske promene kroz koje sistem prolazi tokom postepenog razblaživanja.

Na osnovu analiziranih eksperimentalnih tačaka i njihovog unosa u programski model, na pseudoternarnim faznim dijagramima (Slika br. 11 i Slika br. 12) jasnije su izdvojene tri fazne oblasti prikazane u legendi: (1) oblast početnih smeša titracije, (2) centralna zona visoko-viskoznih tečno-kristalnih i gel struktura i (3) prostrana oblast polutransparentnih nanoemulzija. Kriterijum za određivanje granica nanoemulzione oblasti sastojao se u uočavanju jasnih vizuelnih granica između bistrih ili blago opalescentnih tečnih sistema (koji zadovoljavaju kriterijum veličine kapi < 100 nm) i zamućenih, dvofaznih ili gelastih sistema koji ne grade nanoemulzije.

Analizom dobijenih dijagrama može se zaključiti da ispitivani S_{mix} sistemi formiraju jasno definisanu i prostranu nanoemulzionu oblast pri primeni niskoenergetske PIC metode.

Na dijagramima se jasno uočava karakterističan put faznih transformacija tokom

postepenog dodavanja vodene faze u smešu masne faze i surfaktanata. U početnoj fazi, pri niskim udelima vode (0–16,7%), sistem se inicijalno nalazi u oblasti obrnutih micela ili V/U mikroemulzija, gde je mala količina vode zarobljena unutar kontinuirane masne faze. Postepenim dodavanjem vodene faze (16,7–41,2%) dolazi do intenzivne hidratacije hidrofilnih glava polisorbata 80, što menja spontanu zakrivljenost međupovršinskog sloja surfaktanata. U ovoj tranzicionoj zoni sistem prolazi kroz bikontinualnu ili tečno-kristalnu fazu, pri čemu se međupovršinski napon drastično smanjuje i dostiže ultraniske vrednosti. Pri sadržaju vode od 47,4%, sistem prolazi kroz tačku nulte zakrivljenosti međupovršinskog sloja i u tom trenutku dolazi do rastečnjavanja gel faze i inverzije iz V/U u U/V. Nastavkom dodavanja vode (56,5–80%) prelazi se tačka inverzije faza (engl. *Phase Inversion Point*), što uzrokuje spontano deljenje masne faze i njeno zarobljavanje u vidu nanokapljica obavijenih stabilizacionim monoslojem surfaktanata, čime konačno nastaje U/V nanoemulzija. [22]

Dobijanje široke nanoemulzione oblasti pri nižim udelima surfaktanata (SER 10–12%) potvrdilo je da je hidrofilno-lipofilna ravnoteža izabranog sistema adekvatno podešena. Sinergija polisorbata 80 i sorbitan oleata omogućila je optimalno pakovanje molekula na međupovršini ulje/voda, što je pogodovalo spontanom formiranju nanokapljica bez potrebe za dodatnom mehaničkom energijom.

Poređenjem dobijenih pseudoternarnih faznih dijagrama primećuje se da je putanja faznih transformacija gotovo identična kod oba ispitivana sistema, bez obzira na to koja je fenolna kiselina ili konzervans korišćen. Sistemi u oba slučaja prolaze kroz tečno-kristalnu (gel) fazu pri udelu vode od oko 33,3%, da bi pri 80% vode formirali U/V nanoemulziju. Ova podudarnost u faznom ponašanju ukazuje na visoku robusnost našeg S_{mix} sistema. Praktično, izabrana kombinacija i odnos surfaktanata (polisorbat 80 i sorbitan oleat) i kosurfaktanta (PEG 400) ima dominantnu ulogu na međupovršini i uspešno održava stabilnost sistema, čineći ga otpornim na male razlike u strukturi i lipofilnosti između kofeinske i ferulinske kiseline. Ovakva robusnost formulacije je izuzetno važna jer nam govori da je sistem pouzdan i primenljiv za inkorporaciju različitih prirodnih antioksidanasa.

Uticaj strukture kiselina na fazno ponašanje

Iako su obe fenolne kiseline uspešno inkorporirane unutar nanoemulzionog regiona, mogu se uočiti pojedine razlike u njihovom uticaju na međupovršinski sloj, što direktno proizilazi iz njihovih strukturnih karakteristika.

Usled prisustva dve susedne (kateholne) hidroksilne grupe u svojoj strukturi, kofeinska kiselina je polarnija (logP ~ 1,15) i zahvaljujući njima ostvaruje jake intermolekulske vodonične veze sa hidriranim polioksietilenskim sferama polisorbata 80. Time pokazuje veći afinitet prema hidriranoj zoni međupovršinskog sloja. [23, 24] Na faznom dijagramu se to ogleda u vrlo stabilnim granicama nanoemulzione oblasti. Formulacija 23 NE KK + *ECO*, koja se ranije izdvojila po najvišoj kinetičkoj stabilnosti i najvećem antioksidativnom potencijalu, pozicionirana je duboko unutar najstabilnijeg dela ovog regiona, što grafički opravdava njen status najoptimalnije formulacije.

Za razliku od kofeinske kiseline, ferulinska kiselina poseduje metoksi ($-OCH_3$) grupu na aromatičnom prstenu, što joj daje blago izraženiji lipofilni karakter (logP ~ 1,50). [25] Ovo dovodi do drugačije raspodele kiseline unutar kapljice, bliže samom uljanom jezgru ili dublje u lipofilnom delu međupovršinskog sloja. [24, 25] Uočeno ponašanje na faznom dijagramu manifestuje se blagom promenom osetljivosti granice NE regiona, gde je potrebna pažljiva optimizacija udela kosurfaktanta kako bi se očuvala relativna transparentnost i kinetička stabilnost sistema.

Mehanizam antioksidativnog delovanja i razlike kiselina

Poznato je da ferulinska i kofeinska kiselina ispoljavaju značajnu antioksidativnu aktivnost zahvaljujući prisustvu fenolnih hidroksilnih (–OH) grupa u svojoj hemijskoj strukturi, koje mogu lako donirati atom vodonika slobodnim radikalima. Ovaj proces dovodi do formiranja rezonantno stabilizovanog fenoksi radikala, čime se efikasno prekidaju lančane radikalske reakcije i smanjuje oksidativni stres. Takođe, obe kiseline poseduju konjugovani sistem dvostrukih veza u bočnom lancu, što omogućava delokalizaciju elektrona kao sekundarni mehanizam stabilizacije slobodnih radikala [20].

Radi objektivnog poređenja antioksidativnog potencijala čistih kiselina i inkorporiranih oblika, IC_{50} vrednosti za nanoemulzije preračunate su i izražene u odnosu na koncentraciju same aktivne supstance (μg kiseline/mL), a ne na ukupnu zapreminu nanoemulzije. Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih u Tabeli br. 3, uviđamo da je kofeinska kiselina pokazala nešto jači antioksidativni efekat, što se pripisuje prisustvu dve kateholne -OH grupe u njenoj strukturi (u poređenju sa jednom -OH i jednom $-OCH_3$ grupom kod ferulinske kiseline), što je u potpunosti u skladu sa dostupnim literaturnim podacima [21]. Poređenjem ovih vrednosti uočava se da inkorporacija ferulinske i kofeinske kiseline u S_{mix} nanoemulzije ne smanjuje njihov antioksidativni kapacitet. Štaviše, IC_{50} vrednosti inkorporiranih kiselina pokazuju očuvanu, a u pojedinim slučajevima i blago poboljšanu efikasnost u poređenju sa slobodnim kiselinama (npr. za ferulinsku kiselinu u formulaciji 19 iznosi 1,22 μg/mL u poređenju sa 1,34 μg/mL za čistu ferulinsku kiselinu u ABTS testu), što se može pripisati dobroj solubilizaciji i nanodisperziji aktivnih supstanci unutar nanokapljica. Ovo jasno potvrđuje da izmereni antioksidativni potencijal dominantno potiče od inkorporiranih prirodnih kiselina, pri čemu prisustvo aditiva *Euxyl ECO* (koji u svom sastavu sadrži tokoferol i etarsko ulje limunove trave) blago doprinosi ukupnom antioksidativnom kapacitetu i stabilnosti sistema.

Značaj očuvanja formulacije sa ferulinskom kiselinom (FK + *Euxyl PE*)

Iako se sistem sa kofeinskom kiselinom pokazao kao najoptimalniji, analiza dijagrama ukazuje na to da formulaciju zasnovanu na ferulinskoj kiselini uz prisustvo aditiva *Euxyl PE* ne treba smatrati neuspešnom. Uočeno je da kombinacija ferulinske kiseline i *Euxyl PE* ne dovodi do narušavanja nanoemulzione oblasti. Naprotiv, sistem i dalje ostaje unutar regiona nanoemulzija, bez pojave makroskopskog raslojavanja, sedimentacije ili kremiranja. Blagi porast veličine kapi, koji je zabeležen tokom mesec dana praćenja, ukazuje pretežno na sekundarne interakcije između kiseline i fenoksietanola prisutnog u aditivu, a ne na potpunu inkompatibilnost sa osnovnim surfaktantima. Za razliku od blagog porasta veličine kapi, posebno je izražen pad transparencije (u toku mesec dana čuvanja vrednost je sa 46,0,1% pala na 30,81%) navedene formulacije. Uočen pad optičke bistrine direktno je povezan sa progresivnim povećanjem prosečnog prečnika nanokapljica i PDI tokom vremena. Prema principima Rejlijevog rasejanja svetlosti, intenzitet rasejanja srazmeran je šestom stepenu prečnika kapljica, što znači da i minimalni porasti dimenzija nanokapljica izaziva srazmerno drastičan pad prolaska svetlosti [10]. Prisustvo fenoksietanola u *Euxyl PE* aditivu, usled njegovog delimičnog raspoređivanja u međupovršinski sloj surfaktanta može blago narušiti gustinu pakovanja i elastičnost monosloja, favorizujući blago uvećanje kapi i pad transparencije, uprkos tome što sistem zadržava strukturnu celovitost unutar nanoemulzione oblasti.

ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih formulacionih istraživanja i analize faznog ponašanja, može se zaključiti da emolijentno ulje *Emogreen L19*, sertifikovano za prirodnu kozmetiku, predstavlja adekvatnu zamenu za sintetska ulja u razvoju niskoenergetskih nanoemulzija. Kompatibilnost analiziranog ulja potvrđena je u kombinaciji sa obe ispitivane smeše surfaktanata (na bazi polisorbata 80 i poliglicerilskih estara). Multifunkcionalni aditiv *Euxyl ECO* može zameniti konvencionalni *Euxyl PE* u ispitivanim formulacijama, pri čemu su u oba slučaja dobijene preliminarno stabilne blanko nanoemulzije sa prosečnom veličinom kapi manjom od 40 nm i uskom distribucijom veličina kapi (PDI < 0,15). Konstrukcijom pseudoternarnih faznih dijagrama pri primeni niskoenergetske PIC metode potvrđeno je formiranje nanoemulzione oblasti U/V tipa prolaskom kroz karakteristične bikontinualne fazne prelaze vizuelno detektovano. Prisustvo PEG 400 doprinosi stabilizaciji nanoemulzija sa ferulinskom i kofeinskom kiselinom isključivo u slučaju S_{mix} sistema. U okviru ispitivanih sistema, primenjeni poliglicerilski estri (poligliceril-10 laurat u kombinaciji sa smešom poligliceril-4 laurata i poligliceril-6 laurata) pokazali su inkompatibilnost sa ferulinskom i kofeinskom kiselinom, te pod ovim eksperimentalnim uslovima ne mogu biti zamena za konvencionalnu smešu polisorbata. Najveći stepen fizičko-hemijske stabilnosti i najizraženiju antioksidativnu aktivnost među ispitivanim sistemima pokazuje S_{mix} nanoemulzija sa kofeinskom kiselinom i aditivom *Euxyl ECO* tokom jednomesečnog praćenja stabilnosti na sobnoj temperaturi. Pomenuti sistem predstavlja perspektivnog kandidata za dalji razvoj u formulaciji kozmetičkog proizvoda sa antioksidativnim delovanjem, što zahteva dalja tehnološka i biološka ispitivanja. Analizom pseudoternarnog faznog dijagrama utvrđeno je da formulacija sa ferulinskom kiselinom i aditivom *Euxyl PE* zadržava integritet nanoemulzione oblasti i odsustvo makroskopskog raslojavanja. Odgovarajućom optimizacijom može se kvalifikovati kao kandidat za dalja istraživanja.

LITERATURA

Budzianowska A, Banaś K, Budzianowski J, Kikowska M. Antioxidants to defend healthy and youthful skin—current trends and future directions in cosmetology. Appl Sci. 2025;15(1): 1–22.

Harasim E, Kwiatkowski CA, Kujawska J, Nnolim A. Sustainable utilization of natural plant resources in eco-friendly cosmetic production. J Ecol Eng. 2026;27(1): 53–68.

Mancuso A, Cristiano MC, Pandolfo R, Greco M, Fresta M, Paolino D. Improvement of ferulic acid antioxidant activity by multiple emulsions: In vitro and in vivo evaluation. Nanomaterials. 2021;11(2):425.

Jesus A, Ratanji S, Cidade H, Sousa E, Cruz MT, Oliveira R, et al. Phenolics as active ingredients in skincare products: A myth or reality? Molecules. 2025;30(6):1423.

Das S, Wong AB. Stabilization of ferulic acid in topical gel formulation via nanoencapsulation and pH optimization. Sci Rep. 2020;10(1):12288.

de Almeida TM, de Almeida JM, Kudrna KB, Emanuelli T, Leite DC, Frizzo CP, et al. Photostable ferulic acid-loaded nanoemulsion for anti-inflammatory skin application. ACS Appl Nano Mater. 2023;6(24):22807–17.

Garg S, Goyal PK, Jain S. Formulation and evaluation of O/W nanoemulsions of caffeic acid. Int J Innov Res Eng Multidiscip Phys Sci. 2023;11(1):1–7.

Harwansh RK, Mukherjee PK, Bahadur S, Biswas R. Enhanced permeability of ferulic acid loaded nanoemulsion based gel through skin against UVA mediated oxidative stress. Life Sci. 2015;141:202–11.

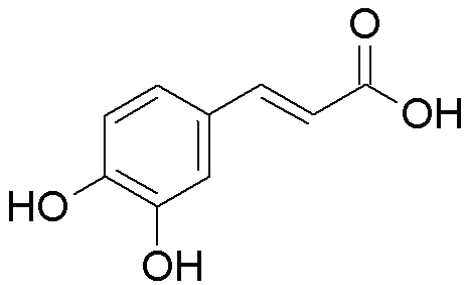
Gupta KM, Das S, Chow PS, Macbeath C. Encapsulation of ferulic acid in lipid nanoparticles as antioxidant for skin: Mechanistic understanding through experiment and molecular simulation. ACS Appl Nano Mater. 2020;3(6):5351–61.

Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. Pharm Res. 2011;28(5):978–85.

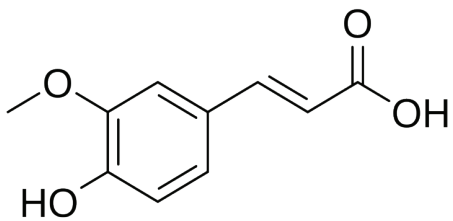
Kumar R, Sinha VR. Preparation and optimization of ferulic acid nanoemulsion for topical delivery. J Mol Liq. 2017;240:259–65.

de Souza AC, Sipoli CC, Aranha ACR, Samulewski RB, da Silva GN, Defendi RO, et al. Applicability of nanoemulsions for the incorporation of bioactive compounds in cosmetics: A review. ACS Omega. 2026;11(4):4818–42.
Yukuyama MN, Ghisleni DDM, Pinto TJA, Bou-Chacra NA. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics – a review. Int J Cosmet Sci. 2016;38(1):13–24.
Solans C, Solé I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2012;17(5):246–54.
Sharma A, Gupta V, Pathak K. Nanoemulsion based delivery system for enhanced transdermal delivery of ferulic acid. J Drug Deliv Sci Technol. 2015;27:8–16.
Gledovic A, Janosevic Lezaic A, Nikolic I, Tasic-Kostov M, Antic-Stankovic J, Krstonosic V, et al. Polyglycerol ester-based low energy nanoemulsions with red raspberry seed oil and fruit extracts: Formulation development toward effective in vitro/in vivo bioperformance. Nanomaterials. 2021;11(1):217.
Hiranchansook M, Trongsiriwat N, Simasatitkul L, Pranee S, Seeyangnok S. The evaluation of stability and bioactivity of xanthone nanoemulsion. J Dispers Sci Technol. 2024;45(9):1746–54.
Rebolleda S, Sanz MT, Benito JM, Beltrán S, Escudero I, González San-José ML. Formulation and characterisation of wheat bran oil-in-water nanoemulsions. Food Chem. 2015;167:16–23.
Aarabi A, Honarvar M, Mizani M, Faghihian H, Gerami A. Extraction and purification of ferulic acid as an antioxidant from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis. Ital J Food Sci. 2016;28(3):362–75.
Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. J Agric Food Chem. 1999;47(4):1453–9.
Shahidi F, Chandrasekara A. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. Phytochem Rev. 2010;9(1):147–70.
Forgiarini A, Esquena J, González C, Solans C. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods. Langmuir. 2001;17(7):2076–83.
Dudomé M, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Partitioning and antioxidant efficiency of caffeic and ferulic acids in surfactant-based nanoemulsions. Food Chem. 2012;132(1):120–7.
Shahidi F, Zhong Y. Revisiting the polar paradox: Ionization, partitioning, and antioxidant efficacy of phenolics in lipid systems. J Agric Food Chem. 2011;59(8):3499–504.
Poquet L, Clifford MN, Williamson G. Effect of chemical structure and logP on the interfacial behavior of hydroxycinnamic acids in O/W systems. J Agric Food Chem. 2008;56(14):5645–52.

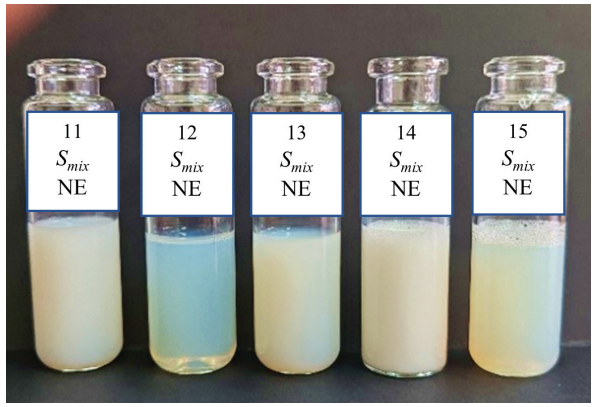
PRILOZI



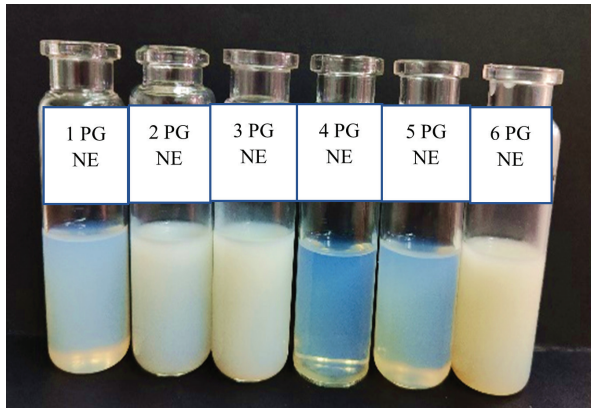
Slika br. 1 Strukturna formula kofeinske kiseline 11



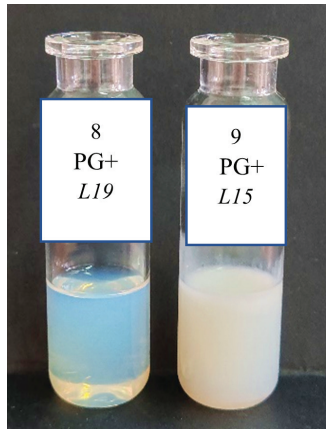
Slika br. 2 Strukturna formula ferulinske kiseline



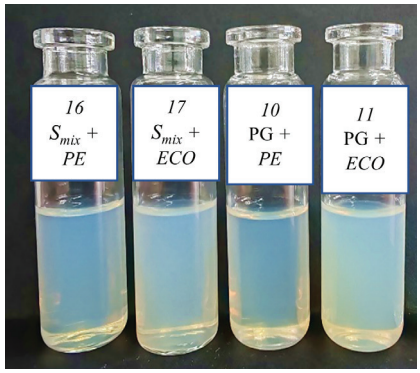
Slika br. 3 Blanko nanoemulzije na bazi polisorbata 80 i sorbitan oleata (S_{mix} NE)



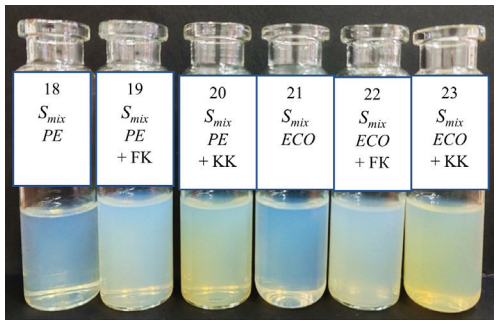
Slika br. 4 Blanko nanoemulzije na bazi smeše poliglicerilskih estara (PG NE) neposredno nakon izrade



Slika br. 5 Vizuelni izgled PG nanoemulzije izrađene sa *Emogreen L19* (stabilna) i *Emogreen L15* (nestabilna – kremiranje)



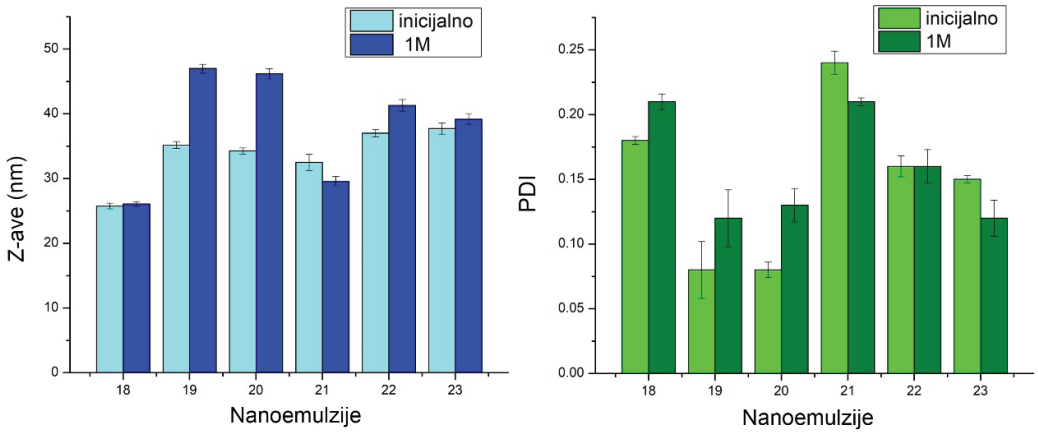
Slika br. 6 Vizuelni izgled stabilnih S_{mix} i PG nanoemulzija izrađenih sa *Emogreen L19* i različitim multifuncionalnim aditivima – *Euxyl PE* i *Euxyl ECO*



Slika br. 7 Optimalne niskoenergetske nanoemulzije (NE) na bazi S_{mix} smeše surfaktanata sa multifuncionalnim aditivom *Euxyl PE* (18 – blanko NE, 19 – NE sa 0,3% FK, 20 – NE sa 0,3% KK) odnosno *Euxyl ECO* (21 – blanko NE, 22 – NE sa 0,3% FK, 23 – NE sa 0,3% KK) i 80% vode, nakon mesec dana čuvanja na sobnoj temperaturi

Sastojci formulacije (% m/m)	**18 S_{mix} NE**	**19 S_{mix} NE**	**20 S_{mix} NE**	**21 S_{mix} NE**	**22 S_{mix} NE**	**23 S_{mix} NE**
Masna faza						
Emogreen L19	8	7,7	7,7	8	7,7	7,7
Polisorbat 80	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
Sorbitan oleat	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
PEG 400	1	1	1	1	1	1
Euxyl PE	1	1	1	/	/	/
Euxyl ECO	/	/	/	1	1	1
Ferulinska kiselina	/	0,3	/	/	0,3	/
Kofeinska kiselina	/	/	0,3	/	/	0,3
Vodena faza						
Visoko prečišćena voda	80	80	80	80	80	80

Tabela br. 1 Sastav odabranih optimalnih formulacija niskoenergetskih nanoemulzija na bazi polisorbata 80 (Smix NE), sa i bez ferulinske / kofeinske kiseline



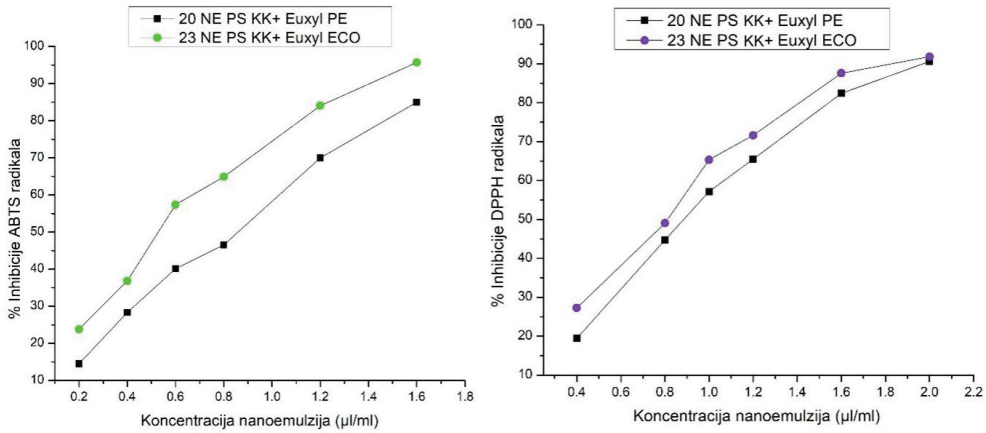
Slika br. 8 Levo: Pregled promene prosečne veličine kapi (Z-ave) optimizovanih formulacija S_{mix} NE tokom mesec dana čuvanja na sobnoj temperaturi. Desno: Pregled promene indeksa polidisperznosti (PDI) optimizovanih formulacija Smix NE tokom mesec dana čuvanja na sobnoj temperaturi

Nanoemulzije	% transparencije		pH vrednost		El. provodljivost (µS/cm)	
	Inic.	1M	Inic.	1M	Inic.	1M
18 S_{mix} NE *Euxyl PE*	82,17 ± 2,74	81,74 ± 0,03	6,53 ± 0,04	6,50 ± 0,02	118,47± 0,81	118,37 ± 0,23
19 S_{mix} NE FK+*Euxyl PE*	46,01 ± 0,04	30,81 ± 0,01	4,55 ± 0,02	4,41 ± 0,02	136,20 ± 0,40	134,83 ± 0,46
20 S_{mix} NE KK+*Euxyl PE*	52,26 ± 0,04	32,13 ± 0,05	4,66 ± 0,02	4,58 ± 0,04	134,33 ± 0,93	134,17 ± 0,46
21 S_{mix} NE *Euxyl ECO*	58,77 ± 0,04	61,59 ± 0,03	6,47 ± 0,04	6,25 ± 0,032	125,27 ± 0,86	127,30 ± 0,36
22 S_{mix} NE FK+*Euxyl ECO*	19,63 ± 0,01	7,23 ± 0,01	4,60 ± 0,02	4,57 ± 0,05	132,50 ± 0,82	134,37 ± 0,32
23 S_{mix} NE KK+*Euxyl ECO*	39,26 ± 0,03	35,45 ± 0,02	4,59 ± 0,06	4,47 ± 0,09	141,03 ± 0,76	143,30 ± 0,50

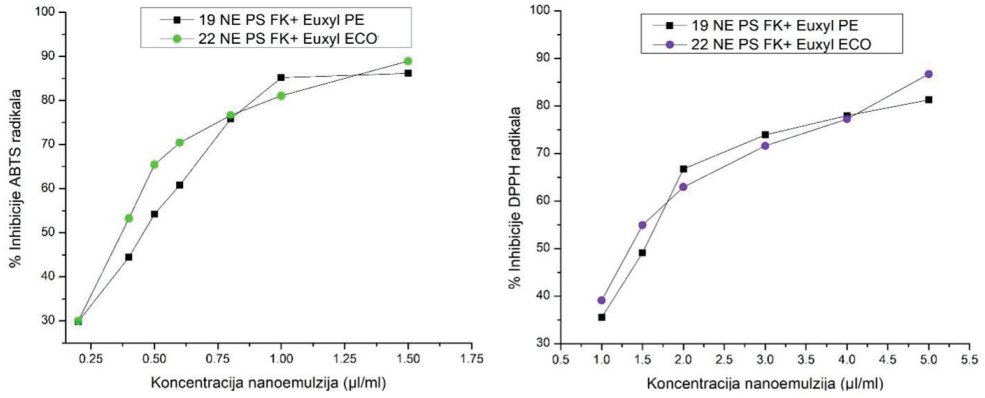
Tabela br. 2 Praćenje odabranih parametara stabilnosti tokom mesec dana čuvanja optimizovanih S_{mix} nanoemulzija

Čiste kiseline (K):	ABTS test (IC_{50} - µg K / mL)	DPPH test (IC_{50} - µg K / mL)
Ferulinska kiselina (FK)	1,34	3,47
Kofeinska kiselina (KK)	2,18	1,42
Nanoemulzije sa FK/KK:	µL NE / mL = µg K/mL	µL NE / mL = µg K/mL
19 S_{mix} NE+FK+*Euxyl PE*	0,37 / 1,22	1,36 / 4,08
22 S_{mix} NE+FK+ *Euxyl ECO*	0,46 / 1,39	1,54 / 4,62
20 S_{mix} NE+KK+*Euxyl PE*	0,87 / 2,61	0,89 / 2,67
23 S_{mix} NE+KK+*Euxyl ECO*	0,53 / 1,59	0,81 / 2,43

Tabela br. 3 Uporedna analiza antioksidativne aktivnosti ferulinske i kofeinske kiseline pre i nakon inkorporiranja u nanoemulzije na bazi polisorbata 80 i sorbitan oleata (PS NE) izrađenih sa različitim multifunkcionalnim aditivima (*Euxyl PE* i *Euxyl ECO*)

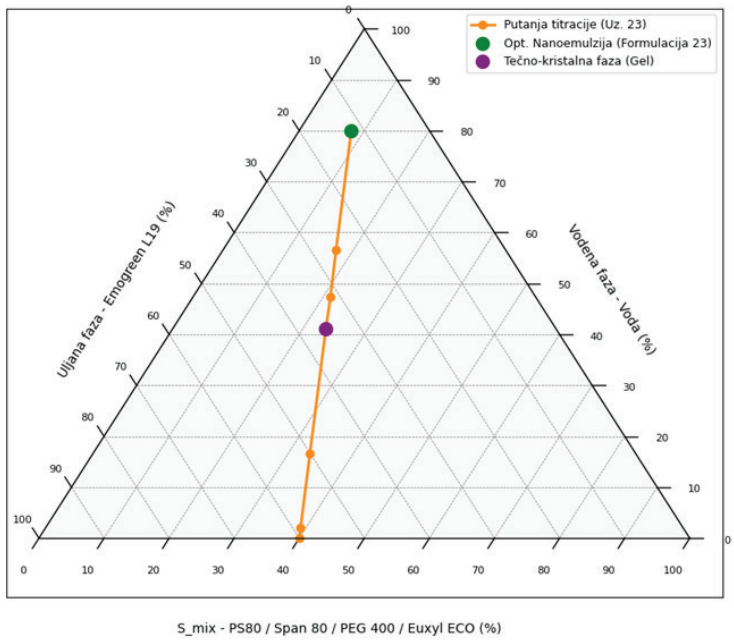


Slika br. 9 Antioksidativna aktivnost izražena kao % inhibicije ABTS i DPPH slobodnih radikala u zavisnosti od koncentracije nanoemulzija sa kofeinskom kiselinom.



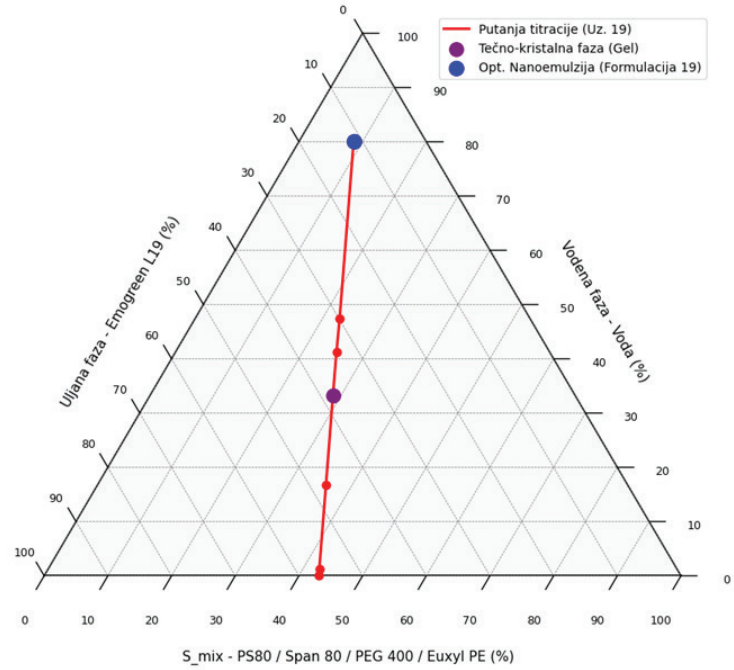
Slika br. 10 Antioksidativna aktivnost izražena kao % inhibicije ABTS i DPPH slobodnih radikala u zavisnosti od koncentracije nanoemulzija sa ferulinskom kiselinom

Pseudoternarni fazni dijagram (Kofeinska kiselina + Euxyl ECO)



Slika br. 11 Pseudoternarni fazni dijagram S_{mix} sistema sa kofeinskom kiselinom *Euxyl ECO*-om; putanja titracije za optimalnu formulaciju 23

Pseudoternarni fazni dijagram (Ferulinska kiselina + Euxyl PE)



Slika br. 12 Pseudoternarni fazni dijagram S_{mix} sistema sa ferulinskom kiselinom *Euxyl PE*-om; putanja titracije za potencijalno optimalnu formulaciju 19

LOW-ENERGY NANOEMULSIONS WITH FERULIC AND CAFFEIC ACID – FORMULATION STUDIES AND ANTIOXIDANT POTENTIAL

Author: NEVENA SIMOVIĆ
E-mail: nevena.s.0123@gmail.com
Mentors: Full Prof. Snežana Savić, PhD; Research Associate Ana Gledović, PhD
Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade

Introduction: Ferulic and caffeic acids, emerging natural raw materials with antioxidant properties, are promising candidates for treating oxidative stress that occurs daily in the skin due to various harmful factors. However, their use is limited by poor solubility, instability, and low bioavailability, highlighting the need for innovative formulations.

Aim: Development of low-energy nanoemulsions as carriers for ferulic and caffeic acids, combined with new ingredients certified for natural cosmetics, and assessment of antioxidant potential and nanoemulsion stability.

Materials and Methods: Nanoemulsions were prepared using a low-energy phase inversion method at room temperature. Based on the obtained parameters, a pseudoternary phase diagram was constructed to graphically confirm the formation range and stability of the optimal nanoemulsions. Characterization and stability assessment of the nanoemulsions were performed by measuring droplet size and size distribution, pH value, electrical conductivity, transparency percentage, and by conducting microscopic analysis. Antioxidant activity was evaluated using DPPH and ABTS assays.

Results: A conventional surfactant mixture based on polysorbate 80 and sorbitan oleate was a superior choice compared to natural polyglyceryl esters. New raw materials certified for natural cosmetics—Emogreen L19 (emollient) and Euxyl ECO (multifunctional additive)—successfully replaced synthetic oils and additives. Optimal nanoemulsions with ferulic and caffeic acids had small droplet sizes below 40 nm, a narrow droplet size distribution, and efficiently inhibited ABTS and DPPH free radicals (≥ 85%).

Conclusion: The nanoemulsion containing caffeic acid and Euxyl ECO demonstrated the best stability and antioxidant activity and is the preferred formulation for further investigation. With adequate system optimization, the nanoemulsion formulation containing ferulic acid and Euxyl PE retains significant potential as an additional candidate for future research.

Keywords: natural cosmetics; low-energy nanoemulsions; caffeic acid; ferulic acid; antioxidant potential