



BABEȘ-BOLYAI TUDOMÁNY EGYETEM KOLOZSVÁR

KÉMIA ÉS VEGYÉSZMÉRNÖKI KAR



UV-sugárzás elleni védelem: A fényvédők elemzése spektrofotometriás módszerrel

TDK dolgozat

Szerző: Mezey Kinga - Noémi¹

¹I. évfolyam, Korszerű Eljárások a Kémiai Szintézisben szak, MSc

Témavezető: Muntean Norbert - Thomas¹

¹Egyetemi adjunktus, Analitika Tanszék

Lezárva: ~2023. márciusa-áprilisa (kísérleti rész, illetve eredeti pályamunka megírása, mely a XXVI. ETDK-ra készült)

2024.05.12. (formátum módosítása a 37. OTDK-ra)

Tartalmi összefoglaló.

A bőr termális szabályozóként működik. Az UV-sugárzás károsíthatja a bőrt felépítő struktúrákat. Több mint egy évszázada fényvédő krémeket használunk az UV-sugárzás elleni védelemre. Két típusú fényvédő létezik. A kémiai fényvédő, mely szerves UV-szűrőket (pl. avobenzon, benzofenon-3) és oktokrilént tartalmaz, ezek bejuthatnak a véráramba lipofil jellemük miatt. A második a fizikai vagy ásványi fényvédő, mely jellemzően szervetlen UV-szűrőket (pl. TiO_2 , ZnO) tartalmaz, amelyek visszaverik és szétszórják a napfényt. A kutatás témája a naptejek és napolajok UV védő hatásának vizsgálata spektrofotometriás módszerek segítségével, kvantitatív és kvalitatív jellemzőket megfigyelve. A téma aktualitását az egyre gyakoribb, a Nap UV sugarai miatt kialakuló betegségek szolgáltatják, legyenek ezek a használatuk hiánya által okozva (melanoma, napfoltok, ráncosodás) vagy a használatuk által kialakulva (komponensek felhalmozódása miatti allergia, fotoszenzitivitás). A kutatás által felhívjuk a figyelmet a megfelelő napvédő használatára a minden napokban. A Nap visszafordíthatatlan károsodást okozhat a népesség bőrében, súlyos betegségeket tudnánk megelőzni, ha szélesebb körökben lenne ismert a fényvédők hatékonysága. A legelső naptej 1932-ben látott napvilágot, H.A. Milton Blake alkotta fenil-szalicilát 10%-os koncentrációjú UV-szűrő alkalmazásával. Azóta sokat fejlődtek a napvédők formulái, kijáratlan kutatási utakat jelent hogyan mérhetjük hatékonyságát in vitro, etikailag korrekt módszerekkel. A cél egy olyan in-vitro módszert kidolgozni, amellyel egyértelműen lehet sorrendet felállítani a különböző termékek hatékonysága között.

1. Eméleti rész

1.1 UV fény és bőr kapcsolata

Amit fénynek nevezünk, az valójában elektromágneses sugárzás „köteg”, amelynek az emberi szem csak egy korlátozott részét érzékeli. A fényt úgy is tudjuk értelmezni, hogy egy hullám, amely a vákuumban is terjed. Minden hullámnak van bizonyos amplitúdója, amely a fényességre (intenzitásra) utal, és egy hullámhossza amely meghatározza a színét. A napfény teljes optikai spektruma magában foglalja az ultraibolya, a látható és az infravörös sugárzást. Az UV tartományban lévő rövid hullámhosszú sugárzások nagyobb energiájúak, ezért potenciálisan károsabbak. [1]

1.1.1. Ultraibolya sugárzás

UV-C-ből (200-290 nm), UV-B-ből (290-320 nm) és UV-A-ból (320-400 nm) áll. Légkörünk blokkolja az UV-C sugarakat, így csak az UV-B és az UV-A jut el a föld felszínére. Általában az UV-B csak az epidermiszbe hatol, míg az UV-A egészen a dermiszig. Mindkét fénysugár típus bőrelváltozásokat okoz, azonban az UV-B körülbelül 50-100-szor erőteljesebb változásokat idéz elő, mint az UV-A. Ezek a sugarak káros hatásokat okoznak a bőr szintjén, váltokozó súlyosságban: bőrpír, melanin-képződés, DNS-károsodás és laphámsejtes karcinóma. [2]

UV-C: Az UV-sugarak a teljes napspektrumnak csak 5%-át teszik ki, de óriási hatással vannak a bőrre. A nagyenergiájú UV-C sugárzást általában könnyen kiszűri a légköri ózon. Ez előnyünkre válik, mivel az UV-C olyan erős, hogy képes elpusztítani az egysejtű szervezeteket. A sztratoszférikus ózonréteg pusztulása, mint a fokozott UV-sugárzás forrása, a 70-es évek óta aggodalomra ad okot [1].

UV-B: Az UVB sugarakat részben kiszűri az ózonréteg. Az UV-B sugárzás biológiailag aktív, behatol a bőr felületi rétegeibe, egészen az epidermisz bazális rétegéig, ahol káros reaktív oxigén- és nitrogénfajokat (ROS és RNS) termel, gyulladást és leégést okozva, valamint kiváltja a bőr öregedését. A ROS az energiaszabadulás során keletkezik, miután a fényt a bőrben lévő kromoforok (például a melanin) elnyelik. A NER (Nucleotide Excision Repair - az emlősök által használt fő útvonal a terjedelmes DNS-léziók, például az UV-fény, a környezeti mutagének és néhány rák kemoterápiás adduktum DNS-ből történő eltávolítására) meghibásodása vagy

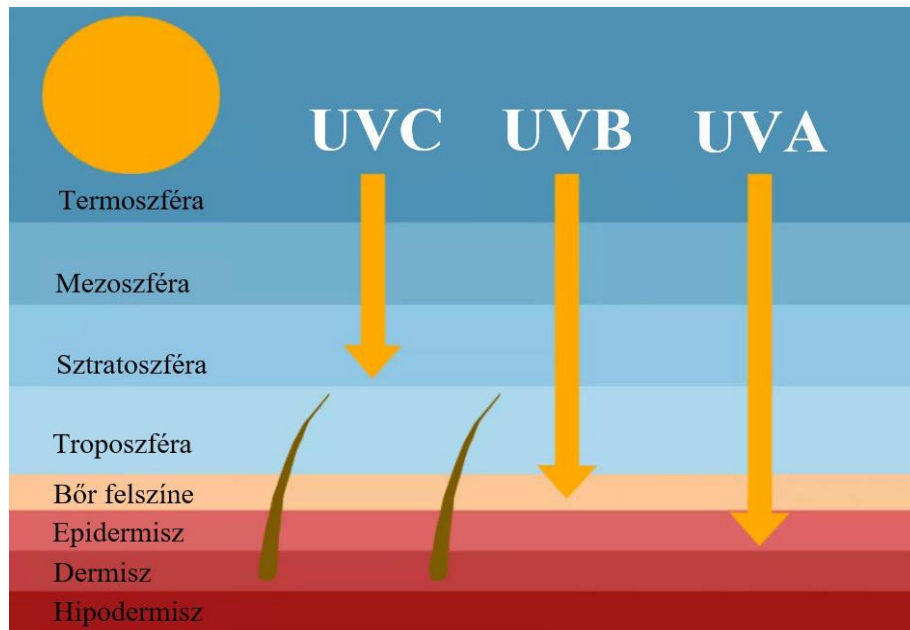
javítóképességének túllépése mutációk felhalmozódását eredményezi a bőrsejtekben, és fontos lépés az UV-sugárzással összefüggő bőrrák kialakulásában [1].

UV-A: Az UV-B-nél kisebb energiájú, de nagyobb mennyiségben jut el a bőrfelületre, mélyebbre hatol a bőrbe, eléri a dermiszt. A melanin mellett a riboflavin tartalmú FAD és az FMN fontos endogén bőrkromoforok, amelyek elnyelik az UV-A-energiát. Annak ellenére, hogy az UVA áthatolóbb, kisebb károkat okoz, mint az UV-B, és egészen a közelmúltig meglehetősen ártalmatlannak tartották. Azonnali, de rövid ideig tartó barnulás alakul ki nagy dózisú UVA-sugárzásnak való kitettség után. Lehet tudni, hogy az UV-A ROS-t és RNS-t generál, amelyek megváltoztatják a fehérjéket, lipideket és DNS-t.

Az oxidatív károsodás jelentősen hozzájárul a bőr idő előtti öregedéséhez és a ráncok kialakulásához, valamint közvetve növeli a rákos megbetegedések kockázatát az oxidált DNS-bázisok (főleg 8-oxo-7,8-dihidroguanin) képződése révén. Továbbá az UV-A 360–380 nm-es tartománya immunszuppresszív, tovább támogatja a bőrrák kialakulását. Fontos, hogy az UV-A által kiváltott azonnali pigmentáció főként a meglévő melanin fotoxidációján, nem pedig új pigmentek szintéziséen keresztül következik be [1].

1.1.2. A bőr

Két meghatározott szövetsávból áll, amelyeket vékony membrán választ el egymástól. A dermisz a belső sáv. Az epidermisz, a külső sáv négy rétegből áll: stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum és stratum corneum. A stratum corneum az epidermisz legkülső rétege, és szabad szemmel is látható. Körülbelül 20 sejtréteg vastagságú, nincs benne életképes sejt és nincs vérellátása. A stratum corneum védőréteget, úgynevezett savköpenyt biztosít (bőrünk tulajdonsága, hogy a felszíne enyhén savas, emiatt a bőr felületén elhárítja a betegségeket előidéző kórokozókat), amely megtartja a nedvességet a testben, illetve némi védelmet is nyújt az UV sugárzás ellen, alkalmazkodik szükség esetén. Az 1. ábrán megfigyelhető melyik UV sugár mennyire mélyre hatol [2].



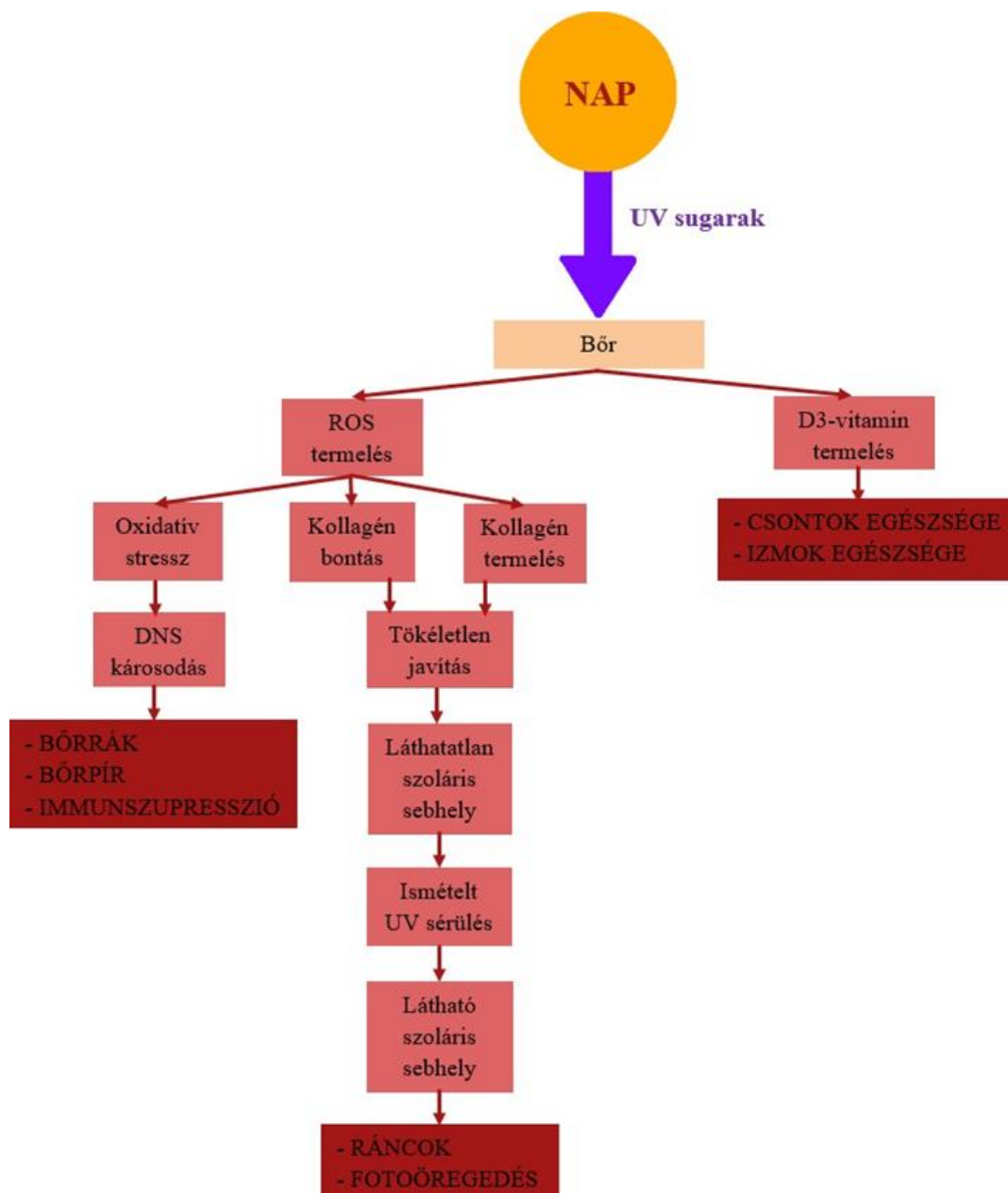
1. ábra - UV sugarak bőrbe hatolásának mélysége

1.1.3. UV sugarak és a bőr kölcsönhatása

Több szemszögből közelíthető meg. A bőrfelületet érő UV-sugárzás visszaverődhet a környezet felé, elnyelődhet a stratum corneum felszínén lévő anyagok által, vagy mélyebben a bőrbe juthat. A stratum corneum megvastagodik, ahogy alkalmazkodik az UV-sugárzáshoz (prokollagén termelését serkenti az UV sugárzás), így több UV-t képes elnyelni [2]. Az ultraibolya sugárzásnak van néhány jótékony egészségügyi hatása, mint például a D3-vitamin képződése vagy gyógyszerekkel kombinált alkalmazása bőrbetegségek, köztük a pikkelysömör és a vitiligo kezelésében [3]. Az UV-sugárzás akut hatásai a DNS-károsodás, a lipidek peroxidációja és a fehérje térhálósodása, amelyek bőrpírhoz és immunszuppresszióhoz vezetnek. Az UV-sugárzásnak való ismételt expozíció hatására bőröregedés és végül bőrrák lép fel [4].

Paradox módon, ha a bőrt ultraibolya sugárzás stimulálja, a bőr önvédelmi mechanizmusa kétszeres. Először is, az epidermisz UV-B-sugárzás általi duzzanata 3-4-szeresére növeli a védelmet. Másodszor, az UV-B és UV-A sugárzás által kiváltott melanin szintézis (barnulás) fokozódása 2-3-szor nagyobb védelmet biztosít a bőrnek [5].

A bőrfelület által elnyelt UV-sugárzás (UVR) káros vegyületeket, úgynevezett szabad gyököket vagy reaktív oxigénfajtákat (ROS) termelhet, amelyek bőrrákot és korai öregedést okozhatnak. A ROS képződésének és károsodásának csökkentése érdekében a kutatók napvédő krém használatát javasolják, hogy megvédjék a bőrt a káros UV-sugárzástól [5]. A 2. ábra összesíti az UV sugarak és a bőr kölcsönhatásait.



2. ábra - UV sugarak és bőr kölcsönhatásai

1.1.4. UV-sugárzás és a fényvédő hatóanyagok közötti kölcsönhatás

A hatóanyagok háromféle módon végezhetik el feladatukat, hogy csökkentsék vagy megakadályozzák az UV-sugárzás okozta égést. Az egyik módszer (kémiai) az UV-sugárzás elnyelése, hogy a sugárzás ne károsítsa az életképes szöveteket. A második (fizikai) módszer az UV-sugárzás visszaverése. A harmadik (biológiai) módszer a gyulladás csökkentése a biológiai gyulladásos válasz blokkolásával vagy a biológiai helyreállítás fokozásával. Egyes fényvédő aktív anyagok egynél több módon is működhetnek. [2]

Míg a kémiai vagy fizikai fényvédő hatóanyagnak a stratum corneumon kell maradnia ahhoz, hogy hatékony legyen, a biológiai fényvédő hatóanyagnak el kell érnie az életképes szöveteket, hogy hatásos legyen. Úgy gondolják, hogy a kémiai fényvédő aktívan védi az életképes szöveteket azáltal, hogy elnyeli az UV-sugárzást, és kevésbé káros sugárzássá alakítja át, például hővé vagy fénné. A kémiai fényvédő hatóanyagok az UV-sugárzás hatására is szabad gyököket termelhetnek. A mechanizmustól függetlenül a kémiai fényvédő hatóanyagoknak el kell nyelnie az UV-sugárzást, mielőtt az elérné az életképes szöveteket. Ahhoz, hogy ez megtörténjen, a napvédő hatóanyagnak több órán keresztül magas koncentrációt kell fenntartania a stratum corneumban. [2]

1.2. SPF érték

A fényvédő faktor az FDA 1978-as javaslata szerint a 2 mg/cm² mennyiségben alkalmazott fényvédővel védett bőr minimális bőrpír dózisa (Minimal Erythema Dose - MED) és a nem védett bőr minimális bőrpír dózisa közötti számarányként határozható meg. Ez egy matematikai összefüggés, amely a következő egyenlettel értelmezhető [6]:

$$SPF = \frac{MED_{védett\ bőr}}{MED_{nem\ védett\ bőr}} \quad (1)$$

Az UV-szűrő összetétele és a bőrön lévő szabálytalan filmrétegre vonatkozó feltételezések alapján a fényvédők teljesítménye szimulálható. Az (1) egyenlet megállapítja az összefüggést az egyik oldalon lévő SPF és a bőrpír hatásspektruma, az UV-forrás besugárzási spektruma és a másik oldalon a fényvédő fényáteresztő képessége között. Míg az $S_s(\lambda)$ besugárzási adatok és a bőrpír hatásspektrum $S_r(\lambda)$ adatok az irodalomból szerezhetők be, a $T(\lambda)$ transzmittanciát kísérletileg in vitro SPF módszerekkel kell meghatározni.

$$SPF = \frac{\sum_0^{tMED} \sum_{290}^{400} S_s(\lambda) \cdot s_{er}(\lambda)}{\sum_0^{tMED} \sum_{290}^{400} S_s(\lambda) \cdot s_{er}(\lambda) \cdot T(\lambda)} \quad (2)$$

A (2) egyenlet figyelembe veszi a besugárzás során fellépő fotoinstabilitásból adódó transzmissziós változásokat, ahol a tMED azt az időt jelenti, amely után egy minimális bőrpír dózis (1 MED) átkerül a fényvédő filmen [7].

A fényvédő krémek hatékonyságát általában a fényvédő faktorról (SPF) fejezik ki, amely a védett bőrben a minimális bőrpír dózis (MED) előállításához szükséges UV-energia aránya a védett bőrhöz viszonyítva. Eddigi kutatások szerint egyik módszer az SPF in vitro kiszámításához a termék abszorbanciájának mérése 290-320 nm között 5 nm-es időközönként. A konkrét mérést úgy végzik, hogy kis mennyiségű terméket feloldanak szerves oldószerben és az így elkészített mintának mérik az abszorbanciáját. Az SPF a következő Mansur-egyenletként ismert képlet alkalmazásával számítható ki [8]:

$$SPF = CF \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda) \quad (3)$$

Ahol:

CF = korrekciós tényező (10)

EE (λ) = λ hullámhosszú sugárzás eritmogén hatása

Abs (λ) = spektrofotometriás abszorbancia értékek λ hullámhosszon

Az EE x I értékei állandók.

1. Táblázat EE x I értékek hullámhossz függvényében

Hullámhossz	EE x I
290	0.015
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0837
320	0.0180
Össz	1

In vivo mérések esetén ideális esetben több Fitzpatrick bőrtípust is tesztelnek (I - halványfehér bőr, mindig leég, nem barnul; II – világosfehér, általában leég, nehezen barnul; III – sötétebb fehér bőr, a kezdeti leégés után barnul; IV – világosbarna bőr, minimálisan ég, könnyen leburnul; V – barna bőr, ritkán ég le, könnyen barnul; VI – sötétbarna vagy fekete bőr, soha nem ég le, mindig sötétben barnul [9]), önkéntes tesztalanyokon. A bőrt szoláris ultraibolya szimulátorok segítségével sugározzák be UV sugarakkal. Az alkalmazási területet az önkéntes hátán egy sablon segítségével különítik el a tesztelni nem kívánt bőrterületektől, így azokat nem éri UV sugárzás. A fényvédő mennyiséget lemérik, majd egyenletesen felviszik a bőrre $2,0 \text{ mg/cm}^2$ -es területen. A termék felvitele és a besugárzás között eltelt idő általában 15 perc. A vizsgálati helyeket UV sugarakkal világítják meg 45-60 másodpercig, az UV-dózisok 25%-os progressziójával. A minimális bőrpír dózisokat (MED) vizuálisan becslik meg 22-24 óra elteltével bőrgyógyász segítségével. Továbbá a védetlen bőrre vonatkozó MED (millijoule (mj)/ cm^2) értéket is meghatározzák minden önkéntesnél. A vizsgált termék SPF értékét ezután a védett bőr MED termeléséhez szükséges UV sugárzási dóziséból és a nem védett bőr MED termeléséhez szükséges UV sugárzás dózisából számítják ki az (1) képlet alapján [10].

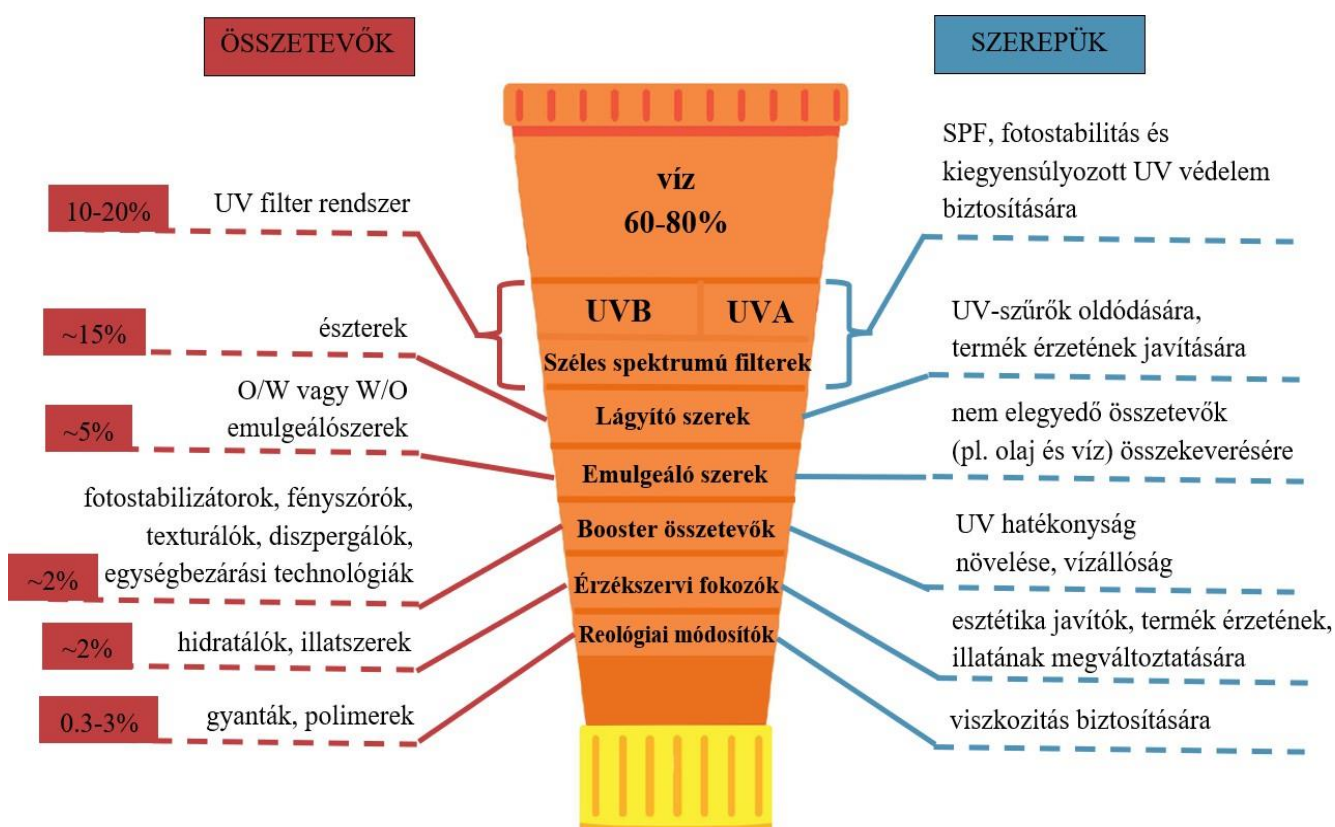
Összességében az in vivo tesztelések többnyire megbízhatóak, viszont nem etikusak, míg az in vitro kísérletek nagyobb bizonytalansági faktorral rendelkeznek, azonban etikusak. A kutatások ellentmondó eredményeket szolgáltatnak, cáfolva vagy megerősítve a Mansur képlet érvényességét, illetve az in vivo és in vitro módszerek közötti létező vagy nem létező korrelációt. E. P. Santos et al. [11] kutatásában összehasonlította a két módszert, az eredmények azt mutatják, hogy fellelhető korreláció van a termékek in vitro és in vivo meghatározásai között. Állításai szerint a in vitro módszer sokkal gyorsabb és olcsóbb, mint az in vivo. Ennek ellenére nem cáfolja az in vivo tesztelés szükségességét, csupán a termék végső formulázási stádiumára ajánlja, miután már átesett a termék in vitro teszteléseken. Megemlíti hátrányként, hogy az in vitro módszereknél a különböző részecskék, például TiO_2 és ZnO zavarják a mérést és ezáltal az eredményeket is. Az ilyen eredmények nem korrelálnak jól a tényleges SPF értékkel.

1.4. Napvédők komponensei

1.4.1 Napvédők általános komponensei

A fényvédőkben az elsődleges három összetevő kategória az UV-szűrők, a lágyító szerek és az emulgeálószerke; a másodlagos komponensek pedig a fotostabilizátorok, filmképzők, boosterek és szenzoros erősítők. A 3. ábrán megfigyelhető a napvédőszerek általános összetétele és ezeknek szerepei [7].

Az UV-védelem eléréséhez szükséges alapvető hatóanyagok elkerülhetetlenül az UV- szűrők. Az UV-szűrők megfontolt kombinációja magas UV-védelmi teljesítmény elérését teszi lehetővé, miközben megőrzi a kellemes formulázási esztétikát.



3. ábra - Egy tipikus fényvédő összetevői és ezeknek szerepei O/W - olaj a vízben; W/O - víz az olajban

Lágyító szerek: Az UV-szűrők mellett a lágyítószer (bőrpuhítók, emollientek) a fényvédők kulcsfontosságú összetevői. Három szerepük van, amely magában foglalja az oldódást elősegítő, a fotostabilizáló és az érzékszervi fokozási tulajdonságokat. Először is, a lágyítók lehetővé teszik a kristályos UV-szűrők oldhatóságát, ami előfeltétele UV-elnyelőként való működésüknek, és az UV-szűrők homogén eloszlását magában a készítményben. Pl. benzoát-észterek, fenetil-benzoát. Egyes lágyítókról kimutatták, hogy segítik a fotoinstabil UV-szűrők fotostabilizálását, különösen az avobenzont (BMBM), amely UV-sugárzás hatására molekuláris lebomláson megy keresztül, ami nem felszívódó melléktermékekhez vezet. Pl. etil-hexil-metoxi-krilén, dietihexil- 2,6-naftalát, butiloktil-szalicilát, a tridecil-szalicilát. A lágyítók befolyásolják a bőr érzetét, a könnyű szétterülés, zsírosodás, ragadoóság stb. tekintetében. Pl. dibutil-adipát, dikapril-karbonát, kókusz-kaprilát, propil-heptil-kaprilát

Emulgeáló szerek: Az emulgeáló rendszer határozza meg az emulzió típusát, olaj a vízben (O/W) vagy víz az olajban (W/O) rendszert. Általában az O/W rendszereket részesítik előnyben, mivel könnyebben szétterülnek és kellemesebb a bőrérzetük. Pl. kálium-cetil-foszfát, nátrium-cetearil-szulfát. Ezek lehetővé teszik szerves UV-szűrők beépítését és stabilizálását. Ezenkívül az anionos és nemionos emulgeálószer, köztük a PEG-100-sztearát, a cetearith-típusok és a gliceril-sztearát kombinációja lehetővé teszi a magas olajfázis-tartalmak stabilizálását, amelyek gyakran szükségesek a magas SPF-értékek eléréséhez.

Reológiai módosítók: A végtermék viszkozitási és kenhetőségi tulajdonságait erősen befolyásolják a reológiai módosítók. A W/O rendszerekben a külső olajfázisba bevitt sűrítőszer közé tartozik a szilícium-dioxid, az organofil agyagok és leggyakrabban a viaszok, például a zsíralkoholok, zsírsavak, gliceridek és észterviaszok. Óvatosan kell eljárni a szintetikus polimer sűrítő és a szerves UV-szűrő minőségének megválasztásakor ha mindkettő jelen van egy készítményben, mivel ezek kompatibilitása korlátozott. Ezenkívül a természetes gumik, például a xantángumi bevezetése többnyire stabilizáló, nem pedig sűrítő hatású.

Booster összetevők: A fényvédő hatásának növeléséhez további segítséget nyújt az UV-elnyelő rendszer hatékonyságának növelése vagy a bőr filmképző tulajdonságainak javítása. A sztirol/akrilát kopolimerből álló üreges részecskék szóródási tulajdonságaik miatt növelik a sugárzás optikai úthosszát, ezáltal növelik annak valószínűségét, hogy az UV fény egy UV-elnyelő molekulával

találkozzon, mielőtt elérné a bőrfelületet. Ezzel szemben a filmképzők fokozzák az UV-teljesítményt azáltal, hogy javítják a fényvédő filmképző tulajdonságait az alkalmazás során, ami így az UV-aktív anyagok egyenletesebb eloszlását eredményezi a bőrön, vagy növeli a vízállósági tulajdonságokat. A filmképzők különböző osztályai közé tartoznak a hidrofób vagy vízben diszpergálható összetevők, például a vinil-pirrolidon-származékok, illetve akril polimer alapú filmképzők.

Érzékszervi fokozók: Végül érzékszervi fokozók is hozzáadhatók az esztétikailag vonzó készítmény létrehozásához. Az érzékszervi fokozó szerek elsősorban porok vagy szilikon folyadékok/szilikonporok, amelyek javítják a szórást, csökkentik a tapadást és a zsírosodást. Részecskeméretüktől és részecskeformájuktól függően a porok adszorbeálhatják az olajat, megkönnyíthetik a kenhetőséget, matt és púderes felületet biztosítanak, csökkentik a ragadóságot vagy bársonyos tapintást kölcsönözhetnek. Az általánosan használt porok a nejlon alapú vegyületek, kukoricakeményítő-származékok, polimetil-sziliszesszkvioxánok, polimetil- metakrilát szilícium-dioxid, HDI/trimetilol-hexillakton keresztpolimer, szilícium-dioxid, bór- nitrid.

1.4.2. Napvédők UV szűrő komponensei

A fényvédőben használt UV-szűrővel kapcsolatban teljesülniük kell a következő feltételnek: legyen hatékony és biztonságos. A hatékonyság mindenekelőtt azt jelenti, hogy a fényvédők a releváns spektrális tartományában (290–400 nm) magas abszorbanciával/reflektanciával rendelkeznek. Ez azt is jelenti, hogy az anyagot elegendő mennyiségben be lehet építeni a kozmetikai készítménybe.

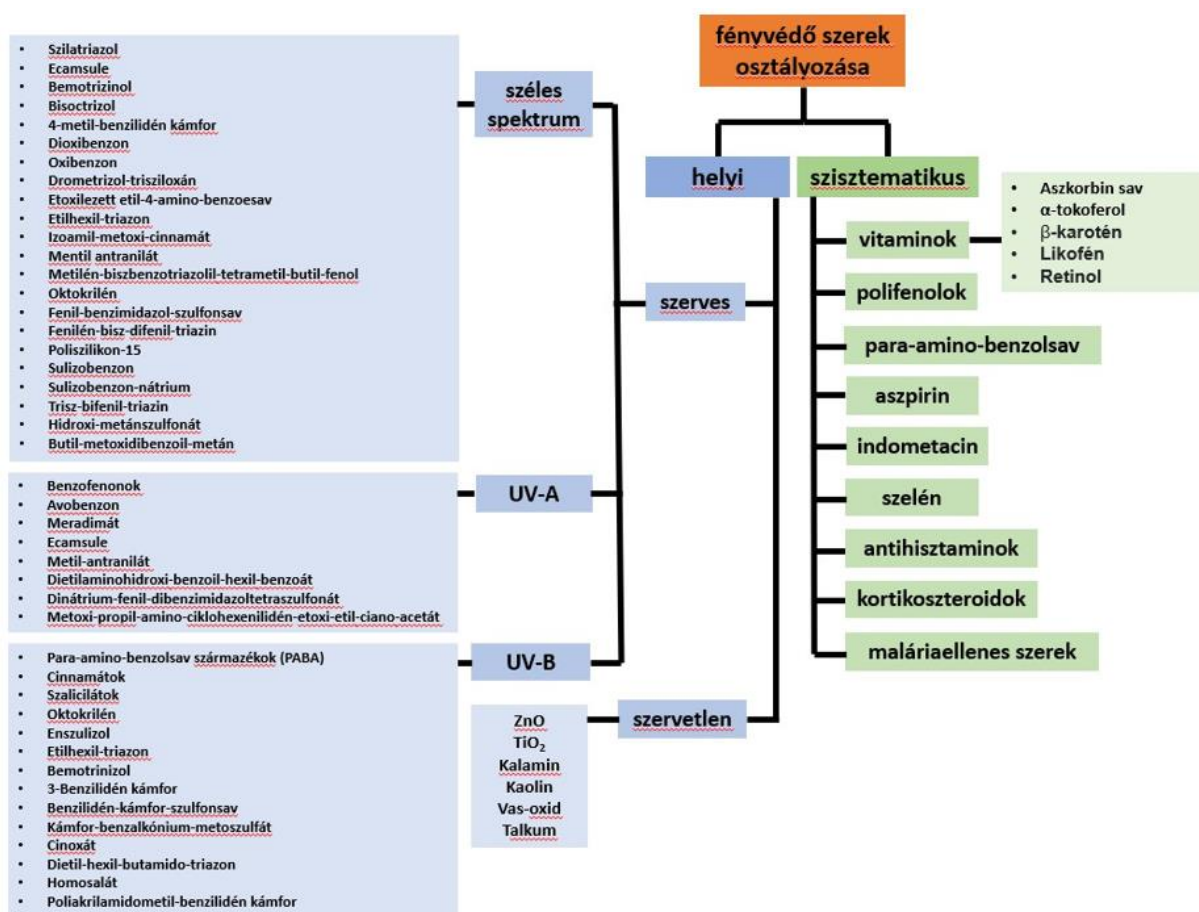
Az UV-szűrőknek feloldhatónak kell lenniük a fényvédő készítmények olajfázisában vagy vízfázisában, így a megfelelő oldhatóságnak elég nagynak kell lennie. Egy másik lehetőség az abszorbeáló anyagok finom részecskéinek diszperzióinak alkalmazása. Az új UV-szűrők minden országban forgalomba hozatal előtti jóváhagyást igényelnek. Egy kiterjedt toxikológiai vizsgálati program segítségével, beleértve az állatokon végzett in vivo tesztek is, be kell mutatni az új UV-szűrők biztonságosságát. Eddig a Fogyasztóvédelmi Tudományos Bizottság által kiadott, a biztonságról szóló európai tudományos vélemény volt a viszonyítási alap a világ legtöbb országában [7].

1.4.2.1. Szerves fényvédők. Az organikus fényvédő krémek évtizedek óta a fényvédő készítmények fő pillérei, és bár a szerves fényvédők egyre népszerűbbek, a szerves fényvédőket még mindig nagyobb mennyiségben használják. A szerves fényvédőket gyakran az antranilátok, benzofenonok, kámforok, cinnamátok, dibenzoilmetánok, p-aminobenzoátok vagy szalicilátok származékaiként osztályozzák. Ezek a vegyületek elnyelik az UV-spektrum egy meghatározott részét, amely visszaemittálódik kevésbé energikusan, hosszabb hullámhosszon (pl. hő, fény formájában) vagy fotokémiai reakciókban használódik el (pl. cisz-transz, keto-enol fotokémiai izomerizációban).

A szerves fényvédőket szinte mindig kombinálva használják, mert egyetlen szerves fényvédő sem tud magas fényvédő faktort (SPF) biztosítani. Ezenkívül az egyes szerves fényvédők viszonylag szűk abszorpciós spektrummal rendelkeznek, amely kombinálva bővíthető. Az organikus fényvédők speciális kombinációit az alapján határozzák meg, hogy mi a tervezett felhasználása a terméknek, rekreációs vagy napi fényvédelemre alkalmas, illetve hogy a kívánt tulajdonságokat (pl. vízállóság, izzadságállóság) érje el. Legutóbb a szerves és szerves fényvédők kombinációja vált egyre népszerűbbé a fényvédő termékekben [12].

1.4.2.2. Szerves fényvédők. Ebben az évtizedben egyre gyakrabban használtak szerves fényvédőket tartalmazó termékek. Ennek oka részben a biztonságuk és hatékonyságuk, különösen az UV-A-sugárzás blokkolása terén, valamint a szerves fényvédők lehetséges káros hatásaival kapcsolatos aggodalom. A szerves fényvédő krémeket általában ártalmatlan pigmenteknek tekintik, amelyek nem tudnak bejutni a bőrbe és nagyrészt nincs hatással rájuk a fényenergia, mint például a szerves fényvédőkre. A két leggyakrabban használt szerves fényvédő a titán-dioxid (TiO_2) és a cink-oxid (ZnO). A TiO_2 és a ZnO szagtalan fehér por formájában léteznek, részecskeméret-eloszlásuk Gauss vagy normál típusú. A fényvédő termékekben használt mikrofinom porok átlagos részecskemérete körülbelül 0,20 μm vagy kisebb. Fontos megjegyezni, hogy a kozmetikai termékekben évek óta használt fém-oxidok hagyományos pigment minőségeihez képest a mikrofinom porok nem tartalmaznak kisebb részecskéket, hanem speciális gyártási eljárásokkal a normál szemcseméret-eloszlás alsó határát növelik. Másképp fogalmazva, a mikrofinom porok mindig is jelen voltak a TiO_2 és ZnO tartalmú termékekben, viszont optikailag túlterhelték őket a nagyobb részecskék. Így a mikrofinom részecskék nem jelentenek teljesen új részecskeméretet, csupán a meglévő részecskeméret-eloszlás finomítását. Minden részecskének van egy olyan mérete, amelynél maximálisan szórja a látható fényt.

Fényvédő termékekben nem kívánatos minden szín, amelyet egy összetevő biztosít, így a fémoxid átlagos részecskemérete az optimális fényszórási méret alá csökken, lehetővé téve a látható fény áteresztését és így gyakorlatilag láthatatlannak tűnik a bőrön. Ezt a tulajdonságot használták a fém-oxidok mikrofinomságú minőségének előállítására, amelyeket manapság széles körben használnak fényvédőkben és napi bőrápoló készítményekben. A napvédő készítményekben használt TiO_2 és ZnO vegyületeket gyakran bevonják más anyagokkal, például szilikonokkal, zsírsavakkal vagy alumínium-, szilícium-, cirkónium- oxidokkal, hogy elősegítsék a diszperziót. A bevonatokat a festékipar a részecskék agglomerációjának csökkentésére fejlesztette ki, ami javítja a részecskék eloszlását, ha vékony filmként alkalmazzzák a felületen. A megfelelő bevonat jobb kompatibilitást biztosít a részecske és a diszperziós közeg között, ami végső soron javítja az esztétikát és csökkenti a feldolgozási költségeket. Ezen kívül a bevonat csökkentheti a fém-oxidok esetleges fotoreaktivitását [12]. A fényvédő szerek osztályozását az 4. ábrán lehet látni [13], [14], [15], [16], [17].



4. ábra - Fényvédő szerek osztályozása

2. Gyakorlati rész

Az in vitro módszerek általában két típusúak. Módszerek, amelyek magukban foglalják az UV-sugárzás abszorpciójának vagy reflektanciájának mérését a kvarclemezekben vagy biomembránokban lévő fényvédő termékfilmeken keresztül, valamint olyan módszerek, amelyekben a fényvédő szerek abszorpciós jellemzőit híg oldatok spektrofotometriás elemzése alapján határozzák meg [18].

A fényvédő készítmény hatékonyságának értékelését hosszú ideje in vivo teszttel értékelték, amelyet emberi önkéntesekkel végeznek. Az in vivo teszt időigényes, általában bizonyos mértékű változékonyságnak van kitéve, nem beszélve az emberrel végzett tesztelés etikai problémáiról. Az in vitro SPF hasznos a termékfejlesztés során végzett szűrővizsgálatokhoz, kiegészítve az in vivo SPF-mérést [18].

2.1. Célmeghatározás

Kutatásunk célja, hogy olyan eljárást dolgozzunk ki amely könnyen/olcsón/egyszerűen alkalmazható, hogy egyértelműen/pontosan tudjuk jellemezni/összehasonlítani különböző naptejek/napolajok UV védő hatását.

Az extrakciós eljárás alapja egy ultrahanggal asszisztált szerves oldószeres kinyerés. Az optimalizálás során a szerves oldószer minőségét illetve a hőmérsékletet változtatjuk, továbbá savval elősegített feltárást is vizsgálunk. Az alábbi oldószereket haását vizsgáltuk: metanol, etanol, izopropanol, ciklohexán. Fontos, hogy ezek ne tartalmazzanak UV elnyelő szennyeződések (toluol, acetone, stb.), emiatt csakis nagy tisztaságú vegyszerek jöhetnek szóba. Ez után különböző márkájú termékeket jellemeztünk a kiválasztott módszerrel. Ellentétben a Mansur féle módszerrel, mi nem az adott minta abszorpciójából számolt SPF-el dolgozunk, hanem a kalibrálási görbéből számolt abszorptivitás segítségével jellemezzük a mintát. A feltárt mintát hígítottuk, oldat sorozatot készítettünk, majd 290-320 nm tartományban 5 nanométerenként lemértünk az oldat abszorpcióját. Az így kapott adatsorokból kalibrálási görbét készítettünk, melynek a meredeksége egyenlő lesz az abszorptivitással. Ezeknek az átlagát használtuk fel a minták jellemzésére.

Oldataink koncentrációja alacsonyabb, mint az irodalomban a Mansur módszer által javasolt értékek. Ez azért is előnyös, mert a hígítással a mátrix hatás lecsökken, viszont emiatt a számított SPF értékek jelentősen kisebbek lesznek, ezért ezek megadására nem tértünk ki.

2.2. Műszerek és felhasznált vegyszerek

A laboratóriumi kutatáshoz használt UV-Vis spektrofotométer egy egyutas, T70+ UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltd) modellű műszer. A küvetták kvarcból készültek, ISOLAB Laborgeräte GmbH, 3.50ml – macro típusúak, az úthossz lévén 1 cm. Az adatok számítógéphez voltak vezérelve, UVWin Software v5.1.1 programmal lettek feldolgozva.

A használt vegyszerek az alábbiak:

- Oldószerek:
 - Metanol; Sigma Aldrich, pro analysis
 - Etanol; Sigma Aldrich, pro analysis
 - Izopropanol; Sigma Aldrich, pro analysis
 - Ciklohexán; Sigma Aldrich, pro analysis
- Sósav; Sigma Aldrich
- Minták:
 - Naptejek, különböző SPF értékkel: 6, 10, 15, 30, 50
 - Napolajok különböző SPF értékkel: 6, 10, 15

A fényvédő minták kereskedelemből lettek beszerezve. A mintákat a felhasználásig a saját palackukban, szoba hőmérsékleten, fénytől elzárva tároltuk.

2. Táblázat Minták típusa, márkája, alkategóriája, SPF értéke, beszerzési helye és tárolása

Minta kódja	Fényvédő típusa	Fényvédő márkája	Termék név	SPF érték
Z6	naptej	Ziaja	Sopot SUN	6
Z10	naptej	Ziaja	Sopot SUN	10
Z15	naptej	Ziaja	Sopot SUN	15
Z30	naptej	Ziaja	Sopot SUN	30
Z50	naptej	Ziaja	Sopot SUN	50
DMaa50	naptej	dm SUN dance	Anti-age sonnenfluid	50
DMSb50	naptej	dm SUN dance	Schutz & bräune	50
Nps50	naptej	Nivea	protect & sensitive	50
Npb50	naptej	Nivea	protect & bronze	50
Npr50	naptej	Nivea	protect & refresh	50
Npm50	naptej	Nivea	protect & moisture	50
Skf50	naptej	Sensive	Kids Formula	50
Tbs50	naptej	TOP TEN	Baby's sunscreen	50
Mscp6	napolaj	Multiactiv	Sun care & protect	6
Paec10	napolaj	Plant activ	etera cosmetice	10
Ees15	napolaj	Elmiplant	Elmiplant SUN	15

A mintákat a Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyészmérnöki karának analitika laboratóriumaiban dolgoztam fel és készítettem elő a vizsgálatra.

2.3. Minta feltárása

Ahhoz, hogy a mérések folyamán kapott eredmények helyesek legyenek, vagyis ténylegesen tudjunk következtetni a minta napvédő hatására, szükséges az, hogy optimalizáljuk a minta feltárást,

hisz ez a lépés jelenti az alapját egy használható módszernek. Feltárás alatt azt értjük, hogy a szilárd mintát oldatba visszük annak érdekében, hogy azt UV-Vis-el tudjuk mérni. Ehhez az szükséges, hogy a mintában lévő napvédő anyagok teljes mértékben feloldódjanak, illetve az esetleges zavaró komponensek, pl. ZnO és TiO₂ mennyisége jelentősen lecsökkenjen.

Mintavételezés első lépését a homogenizálás jelentette, mely során egy nagyobb adag fényvédőt vettünk ki a flakonból egy Berzelius-pohárba, majd egy üvegbottal ezt összekevertük.

Ebből vettünk ki 0.04 g fényvédő mintát, majd feloldottuk 10 vagy 20 mL szerves oldószerben. Ezt követően hígítási sorozatot készítettünk 0.01-0.08 g/L tartományban.

A hígítási sorozatoknak az abszorbanciáját lemértük UV-Vis spektrofotométeren a 290- 320 nm tartományban, majd minden egyes vizsgált hullámhosszon készítettünk egy kalibrálási görbét, amelynek a meredeksége egyenlő lesz az abszorptivitással. Az így kapott 7 abszorptivitás átlagából tudunk következtetni a minta fényelnyelő képességére.

Az eljárás hatékonyságát a módszer precizitásának mérésével is jellemezzük, több mérés alapján. Azonos minták és azonos feltárások esetén a relatív szórás nem lehet nagyobb mint 10- 15%. Ennek érdekében az ismételhetőséget a következő módon vizsgáltuk: három azonos mintát feltártunk és mértük az abszorbanciáját, majd következtettünk az átlag abszorptivitást. Az ebből számolt relatív szórás 2.1% volt, bizonyítva azt, hogy a módszerünk precizitása megfelelő.

Ezen kívül vizsgáltuk a feltáráshoz szükséges oldószer mennyiségét (10 vagy 20 mL oldószer) és azt vettük észre, hogy a meredekség közel azonos volt mindkét feltárás esetén, bizonyítva azt, hogy 10 mL oldószer is elegendő ahhoz, hogy a teljes mennyiség az oldatba kerüljön egy magas, 50 SPF értékű naptej esetén is.

2.4. Minta feltárásának optimalizálása

A feltárás optimalizálása érdekében több paraméter változtatásával is próbálkoztunk, és pedig oldószer típus változtatása, savval elősegített feltárás, illetve hőmérséklet variálása.

2.4.1. Oldószer optimalizálása

A III.1. pontnál említett oldószereket sorra leteszteltük 15 SPF értékű naptejnél illetve napolajnál, annak érdekében, hogy megállapítsuk melyik biztosít hatékonyabb feltárást. Ennek mértékét aszerint határoztuk meg, hogy a különböző oldószerek milyen hatással vannak a feltárt analitikai minta fényvédő képességére. Célunk volt kiválasztani azt az oldószert, amelynél nagyobb az átlag abszorptivitás, hisz ez bizonyítja azt, hogy az adott eljárással sikeresen oldatba vittünk minden olyan komponenst, amely képes UV-ban elnyelni.

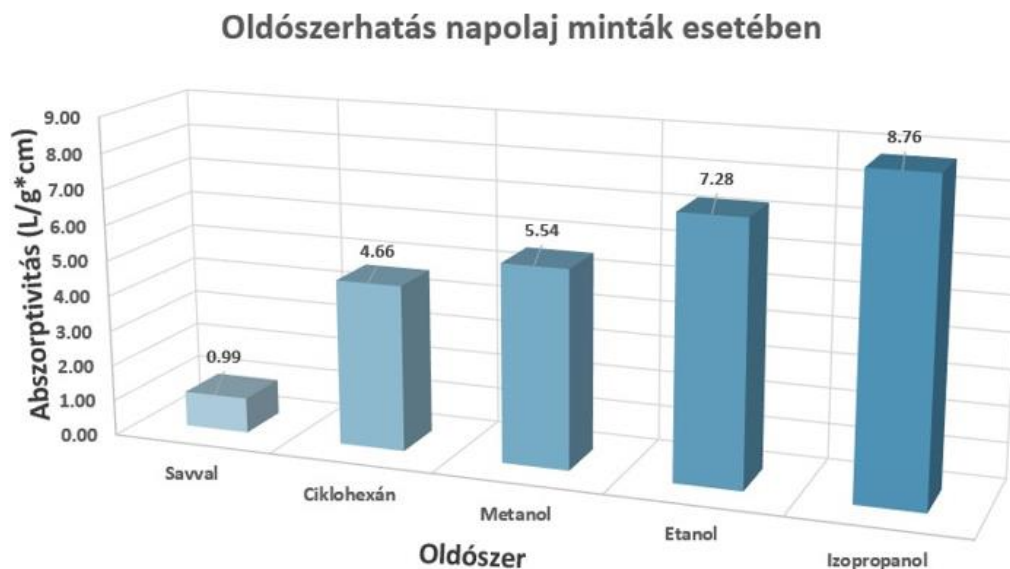
Teszteltünk egy savval elősegített feltárási módszert is, mely során 2%-os sósavat használunk. Ez bontja az emulziót, illetve a ZnO és a TiO₂ által okozott interferenciát megszünteti.

Az eljárás első lépését a sav felmelegítése képezi, majd ennek a kimért mintára (0.04 g) való öntése, 20 ml mennyiségben. Az elegyedés és diszperzió végett ultrahangfürdőbe helyeztem kb. 10 percig.

Ezek után 2x15 ml ciklohexánt is adagoltunk hozzá, majd elválasztó tölcser segítségével elkülönítettük a két fázist. A ciklohexános fázist alávetettük UV-Vis spektrofotometriás méréseknek, miután hígítási sorozatot készítettünk úgy hogy azonos koncentrációkat kapjunk mint az eddigi méréseknél. A mérések során kapott értékek az 5. és 6. ábrákon tekinthetők meg.



5. ábra - Oldószerhatás eredményei 15 SPF értékű naptej minták esetén



6. ábra - Oldószerhatás eredményei 15 SPF értékű napolaj minták esetén

2.4.2. Hőmérséklet optimalizálás

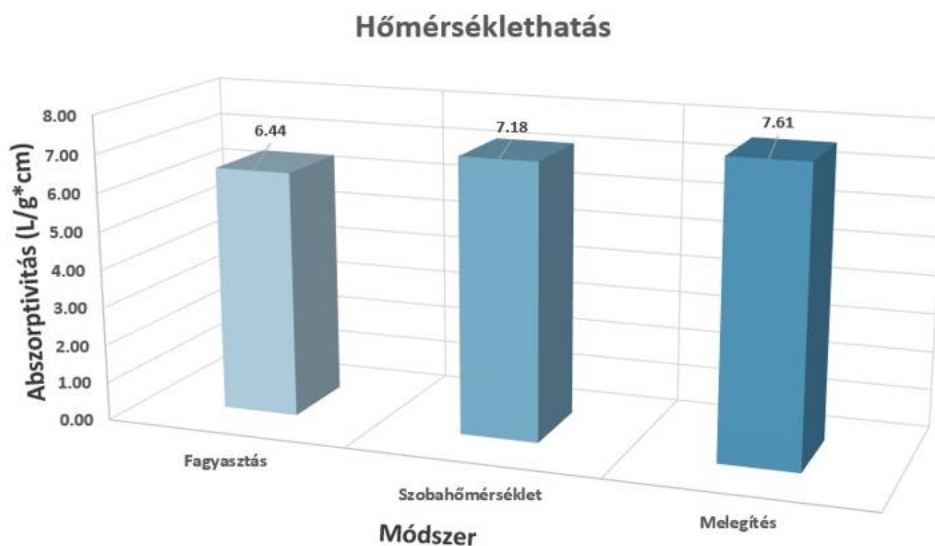
A hőmérséklet befolyással van a fényvédők emulziójára, mátrixára. Fagyasztásos, illetve melegítéses módszereket is alkalmaztunk egyaránt, a kívánt feltárás elérése érdekében. Ezek a módszerek roncsolják a mátrixot, lehetőséget adva a komponensek szétválására.

Melegítés esetében az eljárás első lépéseként az 50 SPF értékű, Ziaja márkájú naptejet kimértem (0.04 g), majd 100 °C-os vízfürdőbe helyeztem. Mikor elérte a kívánt konzisztenciát (körülbelül 5 percig tartott), feloldottuk 10 ml oldószerben, majd hígítási sorozatot készítettünk. UV-Vis spektrofotométerrel mértük a készített mintákat.

A kapott adatokat összehasonlítottuk egy ugyanilyen eljáráson keresztül vitt mintán (szintén 50 SPF Ziaja), kihagyva a melegítéses lépést.

Hasonlóképpen jártunk el fagyasztásos módszernél is, ahol szintén 50 SPF értékű Ziaja naptejet helyeztünk a mélyhűtőbe, majd kiolvasztás után 10 ml oldószerben oldottunk fel 0.04 g-ot. UV-Vis spektrofotometriás méréssel vizsgáltuk egy fagyasztott és egy szobahőmérsékleten tárolt naptej közötti különbségeket feltárás szempontjából.

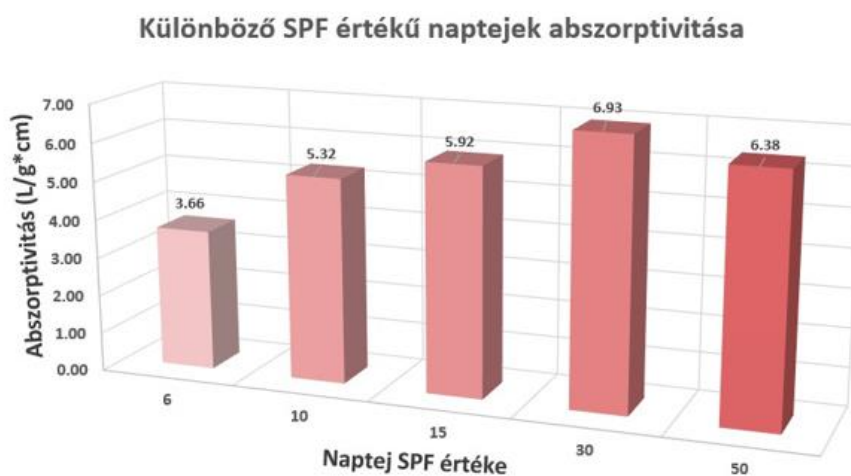
A mért eredmények megtekinthetők a 7. ábrán.



7. ábra - Hőmérséklet hatás eredményei 50 SPF értékű naptej minták esetén

2.5. Különböző SPF értékű, azonos márkájú minták mérése

A Ziaja márkájú naptej esetén vizsgáltuk azt, hogy a termékre írt SPF érték és a mért abszorptivitás között milyen összefüggés van. Elvileg növekvő SPF növekvő abszorptivitást is feltételez abban az esetben, ha csak kémiai fényvédőt tartalmaz az adott termék. Lemérve 6-50 SPF értékű termékeket, a 8. ábrát kaptuk.



8. ábra - Különböző SPF értékű naptejek abszorptivitása

2.6. Különböző márkájú, 50 SPF értékű minták mérése

A módszerünket 9 féle, különböző márkájú és azonos 50-es SPF értékű naptejekre alkalmaztuk. Az analitikai minták feltárását és mérését a fentebb leírt módon végeztük el. Az 9. ábrán megfigyelhető a felállított sorrend az abszorptivitás növekvése szerint.



9. ábra - Különböző márkájú, azonos SPF értékű naptejek abszorptivitása

2.7. Optimalizálási adataink kiértékelése

2.7.1. Oldószer optimalizálási eredményei

A négy felsorolt oldószer közül az etanol és az izopropil jelentett előnyt feltárás szempontjából, főként napolaj esetén. A többi oldószer egymáshoz közeli értéket mutat, illetve naptej esetén mind a négy hasonló értékeket szolgáltat.

Továbbá a térfogat módosítása azonos eredményekhez vezetett, azaz nem befolyásolja a feltárás mértékét.

Savval elősegített feltárás eredményei azt mutatják, hogy jelentősen csökken a feltárás hatékonysága sav adagolása esetén.

A továbbiakban 10 mL izopropil-alkoholt használtunk egy-egy mérés folyamán.

2.7.2. Hőmérséklet optimalizálási eredményei

Megvizsgálva mindkét esetet kijelenthető az, hogy a hőmérséklet változtatása, legyen az melegítéses vagy fagyasztásos eljárás, nem tekinthető számottevőnek. A feltárás hőmérséklete nem okozott jelentős változást a számított abszorptivitás értékére. Ezért a továbbiakban szobahőmérsékleten tártuk fel a mintáinkat.

3. Következtetések

Dolgozatunk célja volt egy olyan módszert kidolgozni, mellyel egyszerűen hasonlíthatóak össze in vitro a fényvédő termékek, így következtetéseket levonva a hatékonyságuk szempontjából – avagy egyszerű szavakkal kifejezve, egy olyan módszerre törekedtünk, melynek segítségével a felhasználó el tudja dönteni, hogy melyik termék biztosít számára több védelmet a Nap által kibocsátott UV sugarak ellen.

Ennek érdekében egy könnyű/olcsó/egyszerűen alkalmazható eljárás kifejlesztésére törekedtünk, mellyel egyértelműen/pontosan tudjuk jellemezni/összehasonlítani különböző naptejek/napolajok UV védő hatását. Egy ultrahanggal asszisztált, szerves oldószeres extrakciót alkalmaztunk, melynek során az UV tartományban abszorbeáló anyagok oldatba kerültek. Ebből a törzsoldatból hígítási sorozatot készítettünk, majd mértük az abszorbanciát.

Kalibrálási görbékből meghatároztuk az abszorptivitást (illetve ezek átlagát) és ennek segítségével jellemeztük a mintánkat. Az abszorptivitásnak az előnye, hogy egy elméletileg jól értelmezhető minőségi információ, ellentétben az SPF-el, amelynek az elmélete nincs megfelelően kidolgozva (legalábbis in vitro mérésre). Az így kapható minőségi információk segítségével lehet sorrendet állítani különböző minták esetén.

A kutatásunk első részében az extrakciós eljárást optimalizáltuk megállapítva azokat a körülményeket, ahol a legmegfelelőbb az elválasztás. Először a hőmérséklet hatását vizsgáltuk és arra a következtetésre jutottunk, hogy a szobahőmérséklet elegendő a kioldáshoz. Ezt követően különböző oldószerek hatását vizsgáltuk. Az alkalmazott oldószerek közül az izopropanol és az etanol jelentett

előnyt a ciklohexánnal és a metanollal szemben, illetve elmondható, hogy a savval elősegített extrakció hátránnyal jár.

A kidolgozott eljárás segítségével megvizsgáltunk öt különböző SPF értékű, azonos márkájú (Ziaja) terméket. A kapott eredményből arra lehet következtetni, hogy az abszorptivitás egy adott értékig nő, majd stagnál. Ennek magyarázatára több lehetőség is van, egyrészt feltételezhető, hogy a magas SPF értékű termékek esetén az általunk nem mért fizikai védelem egyre nagyobb mértékben befolyásolja a napvédő hatást, másrészt pedig az a lehetőség is fennáll, hogy ezen márkáknak nincs jelentős különbség egy 15-ös és egy 30-as SPF értékű naptej összetétele között. Harmadik eshetőségként, azt is számba lehet venni, hogy a termék tartalmazhat olyan komponenseket, amelyeket nem sikerült módszerünkkel extrahálni a mintából.

Ezt követően azonos SPF értékű (50), különböző márkájú és típusú naptejeket vizsgáltunk. Ebben a kísérleti részben sorrendet tudtunk állítani a számított abszorptivitás alapján, arra a következtetésre jutva, hogy a termékek között jelentős abszorptivitásbeli különbséget tapasztaltunk. A legjobb értéket a Nivea protect & sensitive esetén mértünk, közel 3-szor nagyobb értéket mint a leggyengébben szereplő Sensitive kids formula. A vizsgált termékek átlagos abszorptivitása $6.67 \text{ L/g}\cdot\text{cm}$, a különböző Nivea termékek esetén ez az érték $8.19 \text{ L/g}\cdot\text{cm}$.

4. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék nyilvánítani dr. Muntean Norbert - Thomas egyetemi adjunktus témavezetőmnek, hogy kitartóan segített e dolgozat megírásában, szem előtt tartva a hatékony és igényes munkát, megosztva szakmai tudását. A dolgozat színvonalas kivitelezése miatt is hálás vagyok, köszönöm a belefektetett idejét és tudását.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani a Kolozsvári Babeş-Bolyai Tudomány Egyetem, Kémia és Vegyészmérnöki Kar oktatóinak, kik megosztották konstruktív véleményüket és ötleteiket a választott, majd kidolgozott témával kapcsolatban. Azt is köszönöm, hogy kisegítettek e dolgozathoz szükséges alapanyagokkal szükség esetén.

Összességében köszönöm az összes fent említett személynek, hogy hozzájárultak céljaim eléréséhez.

5. Függelék

3. Táblázat Oldószerhatás eredményei 15 SPF értékű naptej minták esetén

oldószer λ (nm)	290	295	300	305	310	315	320
	abszorptivitás (L/g*cm)						
Metanol	3.23	3.88	4.61	5.05	5.39	5.57	4.44
Etanol	3.36	4.02	4.85	5.46	5.83	6.27	5.54
Izopropanol	3.63	4.27	5.07	5.74	6.09	6.44	6.02
Ciklohexán	3.36	3.97	4.64	4.74	4.56	3.65	2.84
Savval	3.39	3.80	3.84	4.40	3.02	1.73	1.77

4. Táblázat Oldószerhatás eredményei 15 SPF értékű napolaj minták esetén

oldószer λ (nm)	290	295	300	305	310	315	320
	abszorptivitás (L/g*cm)						
Metanol	5.12	5.42	5.63	5.75	5.76	5.66	5.45
Etanol	6.64	7.04	7.37	7.51	7.61	7.54	7.28
Izopropanol	7.95	8.48	8.88	9.12	9.15	9.03	8.68
Ciklohexán	4.24	4.53	4.72	4.86	4.89	4.79	4.59
Savval	0.93	0.98	1.00	1.03	1.03	1.00	0.96

5. Táblázat Hőmérséklet hatás eredményei 50 SPF értékű napolaj minták esetén

módszer λ (nm)	290	295	300	305	310	315	320
	abszorptivitás (L/g*cm)						
Fagyasztás	3.98	5.04	6.25	7.20	7.59	7.86	7.19
Sima	4.62	5.94	7.34	8.17	8.62	8.68	6.88
Melegítés	4.96	6.33	7.78	8.65	9.12	9.15	7.27

6. Táblázat Különböző SPF értékű naptejek abszorptivitása

SPF λ (nm)	290	295	300	305	310	315	320
	abszorptivitas (L/g*cm)						
6	2.71	3.05	3.53	3.93	4.11	4.33	3.96
10	3.63	4.27	5.07	5.74	6.09	6.44	6.02
15	4.06	4.74	5.63	6.37	6.77	7.18	6.65
30	4.48	5.52	6.70	7.63	8.06	8.36	7.80
50	3.78	4.89	6.17	7.18	7.60	7.89	7.16

7. Táblázat Különböző márkájú, azonos SPF értékű naptejek abszorptivitása

Kód λ (nm)	290	295	300	305	310	315	320
	abszorptivitas (L/g*cm)						
Skf50	3.30	3.29	3.29	3.22	3.28	3.21	2.97
Tbs50	5.36	5.53	5.60	5.71	5.88	5.71	5.14
DMaa50	3.89	4.69	5.56	6.28	6.58	6.71	6.33
Z50	3.78	4.89	6.17	7.18	7.60	7.89	7.16
DMsb50	4.51	5.55	6.57	7.29	7.51	7.30	6.51
Npm50	5.20	5.82	6.42	7.00	7.35	7.64	7.75
Npb50	6.10	6.82	7.46	7.95	8.09	7.95	7.54
Npr50	7.02	8.06	8.93	9.58	9.70	9.32	8.89
Nps50	6.78	8.23	9.70	10.89	11.34	11.43	10.63

6. Irodalomjegyzék

- 1 E. Dupont, J. Gomez, D. Bilodeau, Journal of Cosmetic Science, 2013, **35**, 224-232
- 2 M. Caswell et al., Allured's Cosmetics & Toiletries magazine, 2001, **116**, 49-60
- 3 A. Svobodova et al., Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2006, **150**, 25–38
- 4 Melnikova V., Ananthaswamy N., Mutat Res, 2005, **251**, 91–106
- 5 A.K. Mishra, A. Mishra, P. Chattopadhyay, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2011, **10**, 351-360
- 6 S. Schalka, V. M. Silva dos Reis, Anais Brasileiros de Dermatologia, 2011, **86**, 507-515
- 7 U. Osterwalder et al., Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine, 2014, **30**, 62-80
- 8 C. Malsawmtluangi et al., Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2013, **3**, 150-151
- 9 M. H. Ravnbak, Danish Medical Bulletin, 2010, **57**, 4153
- 10 S. Ming-Thau et al., Journal of Food and Drug Analysis, 2003, **11**, 128-132
- 11 E. P. Santos et al., International Journal of Cosmetic Science, 1999, **21**, pp. 1-5
- 12 F.P. Gasparro, M. Mitchnick, J.F. Nash, Photochemistry and Photobiology, 1998, **68**, 243-256
- 13 V.R. Gadgil et al., Journal of the Indian Chemical Society, 2023, 100858
- 14 W. Zou et al., TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022, **157**, 116724,
- 15 A. Lorquin et al., Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2021, **24**, 100539
- 16 K. Geoffrey et al., Saudi Pharmaceutical Journal, 2019, **27**, 1009-1018
- 17 M.S. Latha et al., J Clin Aesthet Dermatol., 2013, **6**, 16-26
- 18 E.A. Dutra et al., Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2004, **40**, 381–385