

# Primjena elektronske mikroskopije u kozmetici

---

**Bazianec, Petra**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:796532>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ**

Petra Bazianec

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, srpanj 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja **Petra Bazianec**

Predala je izrađen završni rad dana: 3. srpnja 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

doc. dr. sc. Iva Movre Šapić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Vladimir Dananić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred  
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 8. srpnja 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ  
KEMIJSKO INŽENJERSTVO

Petra Bazianec

**PRIMJENA ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE U KOZMETICI**

ZAVRŠNI RAD

Mentorica: doc. dr. sc. Iva Movre Šapić

Članovi ispitnog povjerenstva:

doc. dr. sc. Iva Movre Šapić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Vladimir Dananić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

**Zagreb, srpanj 2024.**

*Završni rad izrađen je na Zavodu za fiziku Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivi Movre Šapić na ukazanoj prilici, strpljenju i korisnim uputama prilikom izrade ovoga rada.*

*Zahvaljujem svojim prijateljicama, dečku, a posebno svojim roditeljima na svojoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog mog školovanja.*

# SAŽETAK

U ovom završnom radu opisuje se osnovni princip rada elektronskog mikroskopa, razlike između skenirajućeg i transmisijskog elektronskog mikroskopa. Dan je pregled u koje svrhe se danas koriste elektronski mikroskopi, s naglaskom na upotrebu u pripremi i analizi kozmetičkih preparata.

Primjena elektronske mikroskopije u kozmetici ima značajnu ulogu u razvoju, analizi i kontroli kvalitete kozmetičkih proizvoda. Elektronski mikroskopi, uključujući skenirajući elektronski mikroskop (SEM) i transmisijski elektronski mikroskop (TEM), omogućuju detaljno proučavanje mikrostrukture i površinskih karakteristika kozmetičkih preparata.

SEM se koristi za analizu površinske topografije i sastava kozmetičkih uzoraka, omogućujući istraživačima da identificiraju i optimiziraju sastojke koji doprinose željenim svojstvima proizvoda, kao što su tekstura i izgled. TEM, s druge strane, omogućuje proučavanje unutarnje strukture kozmetičkih sastojaka na molekularnoj razini, što je ključno za razumijevanje kako različiti sastojci djeluju na kožu i kosu.

Primjenom elektronske mikroskopije, znanstvenici mogu identificirati mikroskopske čestice i nečistoće, poboljšati formulacije, te osigurati konzistentnu kvalitetu i sigurnost kozmetičkih proizvoda. Ova tehnologija također pomaže u istraživanju novih sastojaka i njihovih učinaka, te doprinosi razvoju inovativnih kozmetičkih rješenja koja zadovoljavaju visoke standarde učinkovitosti i sigurnosti.

**Ključne riječi:** elektronska mikroskopija, SEM, TEM, kozmetika, kvaliteta proizvoda, analiza sastojaka

## SUMMARY

In this thesis, the basic principles of electron microscopy, the differences between scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), are described. An overview of the current applications of electron microscopes is provided, with a focus on their use in the preparation and analysis of cosmetic products.

The application of electron microscopy in cosmetics plays a significant role in the development, analysis, and quality control of cosmetic products. Electron microscopes, including SEM and TEM, enable detailed examination of the microstructure and surface characteristics of cosmetic preparations.

SEM is used for analyzing the surface topography and composition of cosmetic samples, allowing researchers to identify and optimize ingredients that contribute to the desired properties of products, such as texture and appearance. TEM, on the other hand, enables the study of the internal structure of cosmetic ingredients at the molecular level, which is crucial for understanding how different ingredients interact with the skin and hair.

Through the application of electron microscopy, scientists can identify microscopic particles and impurities, improve formulations, and ensure consistent quality and safety of cosmetic products. This technology also aids in the research of new ingredients and their effects, contributing to the development of innovative cosmetic solutions that meet high standards of effectiveness and safety.

**Keywords:** electron microscopy, SEM, TEM, cosmetics, product quality, ingredient analysis



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. MIKROSKOP</b> .....	3
<b>2.1. OPĆENITO O MIKROSKOPU</b> .....	3
<b>2.1.1. Mikroskopija</b> .....	3
<b>2.1.2. Razvoj svjetlosnih (optičkih) mikroskopa</b> .....	3
<b>2.1.3. Optički mikroskop</b> .....	4
<b>3. ELEKTRONSKI MIKROSKOP</b> .....	9
<b>3.1. PRINCIP RADA ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA</b> .....	9
<b>3.2. DIJELOVI ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA</b> .....	10
<b>3.3. VRSTE ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA</b> .....	11
<b>3.3.1. Skenirajući elektronski mikroskop</b> .....	11
<b>3.3.2. Transmisijski elektronski mikroskop</b> .....	15
<b>3.3.3. Razlika između skenirajućeg i transmisijskog mikroskopa</b> .....	17
<b>4. PRIMJENA ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE U KOZMETICI</b> .....	19
<b>4.1. ANORGANSKE NANOČESTICE U KOZMETIČKIM PROIZVODIMA</b> ....	20
<b>4.2. ANALIZA NANOČESTICA U KOMERCIJALNIM KREMAMA ZA SUNČANJE</b> .....	25
<b>4.3. KOZMETIČKI UČINCI I MORFOLOGIJA KOŽE POMOĆU SEM-a</b> .....	28
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	33
<b>6. POPIS SIMBOLA I KRATICA</b> .....	34
<b>7. LITERATURA</b> .....	36
Popis slika .....	39

# 1. UVOD

Integracija mikroskopa u kozmetologiju jedno je od najzanimljivijih dostignuća u industriji ljepote. Mikroskopi i nova medicinska tehnologija mijenjaju način rada stručnjaka za ljepotu. Ovaj alat ne samo da omogućuje točniju dijagnozu, već i bolje razumijevanje tretmana i njihove učinkovitosti.

Elektronska mikroskopija postala je nezamjenjiv alat u modernoj kozmetologiji, pružajući ključne uvide u sastav i djelovanje kozmetičkih proizvoda na nanometarskoj i mikrometarskoj razini. Razvojem naprednih tehnika poput transmisijske elektronske mikroskopije (TEM) i skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), kozmetička industrija dobila je moćne analitičke metode za karakterizaciju sastojaka, procjenu učinkovitosti i optimizaciju formulacija.

Jedno od najvažnijih područja primjene elektronske mikroskopije u kozmetologiji je proučavanje nanočestica koje se sve više koriste kao aktivne komponente u proizvodima za njegu kože i zaštitu od sunca. Primjena elektronske mikroskopije u kozmetologiji nije ograničena samo na analizu nanočestica i kožnih replika. Ove tehnike također se koriste za proučavanje mehanizama djelovanja različitih kozmetičkih sastojaka, ispitivanje interakcija s kožom te osiguravanje kvalitete i sigurnosti proizvoda.

Mikroskop je optički uređaj koji omogućuje pristup mikroskopskom svijetu i naširoko se koristi u biologiji i medicini. Ovaj uređaj omogućuje promatranje strukture stanica, nekih bakterija, vlakana, kose i drugih tvari. Njegova uporaba u području ljepote otvara mnoge mogućnosti opisane u ovom završnom radu.

Poglavlje poslije uvodnog opisuje razvoj mikroskopa i njegov temeljni utjecaj. Navedene su vrste mikroskopa te je opisan pojam mikroskopa, mikroskopije, optičkog mikroskopa i dan je pregled njegove primjene.

Treće poglavlje opisuje osnovni princip rada elektronskog mikroskopa, dijelove elektronskog mikroskopa. Također, opisuje skenirajući i transmisijski elektronski mikroskop, njihovu primjenu, te razlike između skenirajućeg i transmisijskog elektronskog mikroskopa.

U četvrtom poglavlju je dan pregled primjene elektronske mikroskopije s naglaskom na primjenu u kozmetologiji i pripremi i analizi kozmetičkih proizvoda.

U petom poglavlju nalazi se zaključak koji se odnosi na cjelokupan rad te se donosi konačno mišljenje autora o temi završnog rada.

## **2. MIKROSKOP**

### **2.1. OPĆENITO O MIKROSKOPU**

**Mikroskop** je instrument koji daje jako uvećane slike predmeta, suviše sitnih da bi se mogli promatrati golim okom. Oko ima mogućnost raspoznavanja predmeta na približno 25 centimetara udaljenosti. Objekti čiju sliku oko ne može izoštriti uglavnom su bliži od 10 centimetara. Udaljeniji objekti izgledaju manji, a bliži izgledaju veći, ali nejasni, jer ih oko ne može fokusirati. Mikroskop omogućuje promatranje predmeta pod širokim vidnim kutom, kao da je maksimalno približen oku, a da njegova slika pri tome ostane jasna i oštra. Takav se efekt može postići i jakom sabirnom lećom (lupom ili povećalom) [1].

#### **2.1.1. Mikroskopija**

**Mikroskopija** je tehnika promatranja sitnih objekata pomoću mikroskopa. Ova tehnika omogućuje opisivanje oblika čestica, njihove strukture, broja i drugih karakteristika. U biološkim istraživanjima, uzorci se prvo moraju fiksirati, smrznuti ili uklopiti u parafin, zatim se režu u vrlo tanke ploške posebnim nožem zvanim mikrotom, boje organskim bojilima i postavljaju na staklenu podlogu.

U medicini, mikroskopiranje je važno za analizu krvnih razmaza, taloga mokraće, razmaza stolice, ispljuvka i drugih uzoraka. Mikroskopiranje je također značajno u mnogim drugim znanstvenim i tehničkim područjima, uključujući mikrobiologiju, histologiju, citologiju, genetiku, botaniku, zoologiju, farmakognoziju, mikrokemiju, kristalografiju, metalografiju, mikroradiografiju, kao i u proizvodnji tekstilnih vlakana, papira i plastike [2].

#### **2.1.2. Razvoj svjetlosnih (optičkih) mikroskopa**

Ne zna se pouzdano tko je izumio prvi mikroskop, no prvi zapisi o mikroskopu datiraju iz 17. stoljeća i povezuju se s imenima Roberta Hookea (1635.-1703.) i Antona van Leeuwenhoek (1630.-1723.). Van Leeuwenhoek je koristio mikroskop s jednom snažnom konveksnom lećom i podesivim držačem za promatrani objekt. S ovim vrlo jednostavnim mikroskopom, Van Leeuwenhoek je mogao povećati objekte do 500 puta. Njime je otkrio

eritrocite, leukocite, spermatozoide, bakterije itd. Daljnji razvoj mikroskopa išao je u smjeru dodavanja leće kako bi se povećala slika prve leće.

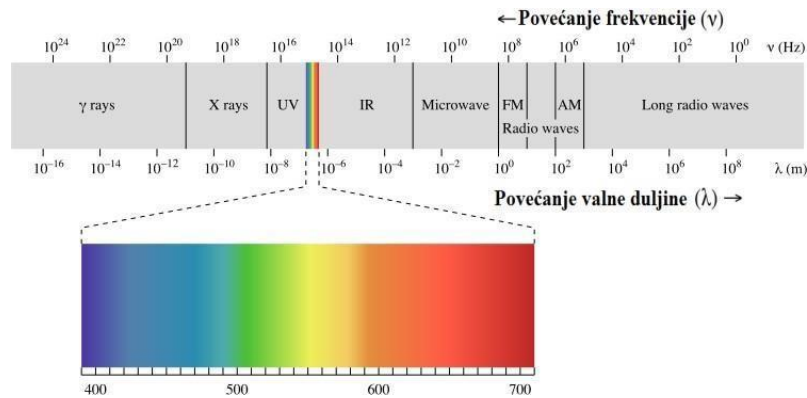
Danas se složeni optički instrumenti s dva sustava leća (objektiv i okular) koji imaju sustav leća na svakom kraju metalne cijevi (tubusa) obično nazivaju mikroskopima. Na donjem kraju iznad promatranog objekta nalazi se objektiv, a na gornjem okular. Objektiv modernih mikroskopa sastoji se od nekoliko leća male žarišne duljine pa djeluje kao konveksna leća. Svi optički mikroskopi rade na istom principu. Oni koriste zraku svjetlosti za stvaranje uvećane slike predmeta. Snop svjetlosti osvjetljava predmet koji gledamo i zatim prolazi kroz optički sustav mikroskopa koji omogućuje stvaranje njegove uvećane slike. Moderni svjetlosni mikroskopi mogu postići povećanje do 3000x i omogućiti oku razlikovanje objekata koji su međusobno udaljeni do 0,0002 mm. U nastojanju da se postigne što bolja razlučivost i time omogući promatranje još manjih struktura, utvrđeno je da moć razlučivosti mikroskopa nije ograničena samo brojem i kvalitetom leća, već i valnom duljinom svjetlosti koja služi za osvjetljavanje promatranog objekta [3].

Prvi složeni mikroskop napravio je 1590. Nizozemac Zacharias Janssen. Njegov instrument imao je konveksnu leću (objektiv) i konkavnu leću (okular). Slijedeći ideje J. Keplera, C. Scheiner je 1628. stvorio mikroskop s obje konveksne leće. Taj mikroskop je imao mnogo šire vidno polje i preteča je modernih optičkih mikroskopa. R. Hooke je prvi upotrijebio umjetno svjetlo za osvjetljavanje predmeta i dao prvi opis biljnih stanica (1665.). Oko 1684. Ch. Huygens je konstruirao okular koji se sastojao od dvije leće koji je i danas u upotrebi [4].

Ovisno o načinu dobivanja slike promatranog objekta, postoji više vrsta mikroskopa. Razlikujemo dva osnovna tipa mikroskopa: **svjetlosni ili optički i elektronski mikroskop.**

### 2.1.3. Optički mikroskop

Za rad sa svjetlosnim ili optičkim mikroskopom koristimo elektromagnetsko zračenje vidljivog dijela spektra valne duljine od 400 nm (ultraljubičasti dio spektra), do 700nm (infracrveni dio spektra) (Slika 1).

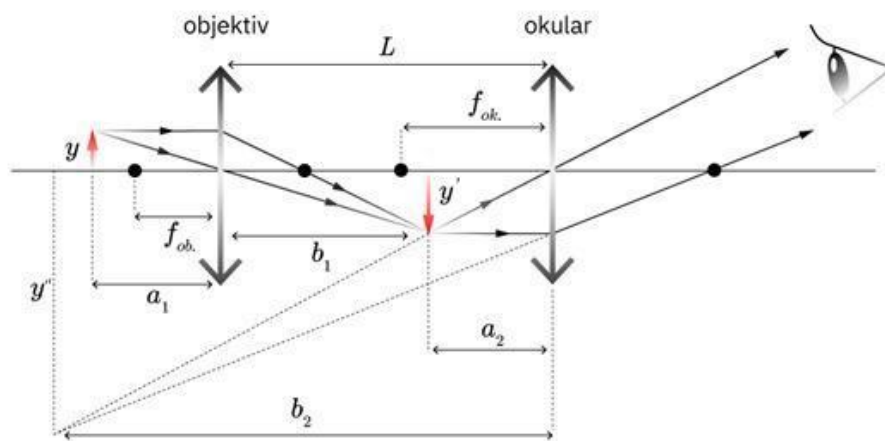


**Slika 1.** Shematski prikaz elektromagnetskog spektra s istaknutim vidljivim dijelom [5]

Svjetlosne zrake koje emitira preparat prolaze kroz sustav staklenih leća, dajući uvećanu sliku predmeta koji se proučava. Tako dobivene slike mogu se promatrati izravno kroz okular mikroskopa ili snimiti kao fotografije ili digitalni prikazi [5].

Na Slici 2. prikazana je konstrukcija virtualne slike predmeta koju daje mikroskop. Predmet duljine  $y$  nalazi se ispred objektivna na udaljenosti većoj od njegove žarišne duljine, ali manjoj od dvostruke žarišne duljine. Tako se dobiva uvećana, realna i obrnuta slika duljine  $y'$ . Ovu sliku promatramo okularom kao lupom, što znači da je ona realni predmet ispred okulara na udaljenosti manjoj od njegove žarišne duljine. Na taj način dobiva se uvećana, obrnuta i virtualna slika predmeta duljine  $y''$ .

Za mjerenje duljine predmeta  $y$  mikroskopom, potrebno je u ravnini okulara postaviti izbaždarenu mjernu skalu, koja se naziva okularni mikrometar [6].



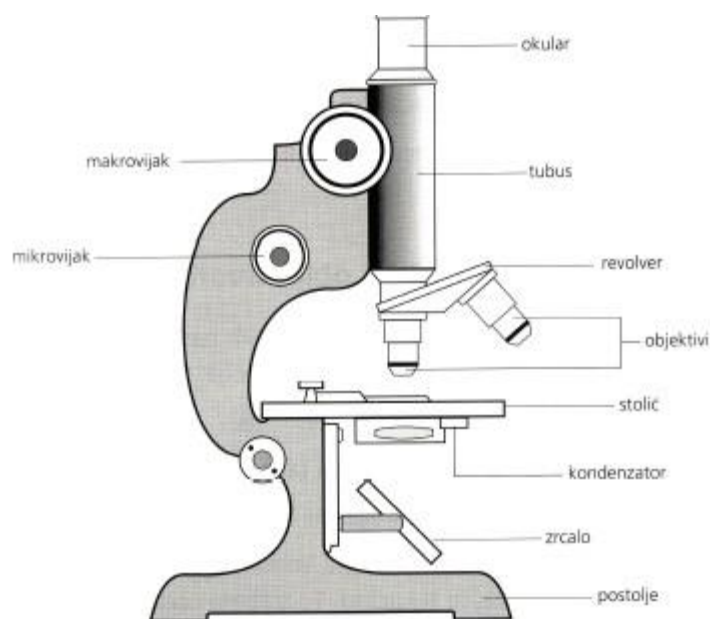
**Slika 2.** Nastajanje slike u mikroskopu [6]

S obzirom na valnu duljinu svjetlosnog snopa koji se koristi za osvjetljavanje i njegovu interakciju s uzorkom (propuštena, lomljena ili reflektirana svjetlost), te tehnike korištene za povećanje kontrasta unutar promatranog uzorka, razlikujemo nekoliko podvrsti optičkog mikroskopa. Neke od vrsta optičkog mikroskopa su: mikroskop sa svijetlim vidnim poljem, s tamnim vidnim poljem, fazno-kontrastni mikroskop, fluorescencijski, polarizacijski i stereomikroskop (lupa).

Bez obzira na vrstu mikroskopa i elektromagnetsko zračenje koje koristi, glavna funkcija svih mikroskopa je ista. Svi mikroskopi moraju ispuniti tri glavne funkcije: prikazati uvećanu sliku predmeta, jasno odvojiti pojedine detalje promatranog objekta te učiniti ih vidljivima ljudskom oku [5].

Osnovni dijelovi optičkog mikroskopa su postolje, stativ, tubus, stolić mikroskopa, makrovijak i mikrovijak, izvor svjetlosti, okular te objektiv (Slika 3).

Stativ je metalni dio mikroskopa proširen u donjem dijelu, služi kao postolje te daje stabilnost mikroskopu. Savijeni dio stativa služi za držanje i prenošenje mikroskopa. Preparat se postavlja na stolić mikroskopa i osvjetljavaju ga svjetlosne zrake koje prolaze kroz otvor na stoliću. Preparat pomičemo rukom, ako stolić nije pokretan. Metalna cijev na čijem vrhu se nalazi okular naziva se tubus, a na dnu je pričvršćen revolver s objektivima. Makrovijak koristimo pri manjim povećanjima jer služi za traženje slike predmeta, a mikrovijkom izoštravamo sliku promatranog predmeta. Množenjem povećanja objektivna povećanjem okulara dobiva se ukupno povećanje mikroskopa. Objektiv daje obrnutu, realnu i povećanu sliku predmeta, a okular, poput lupe, tu sliku još povećá [7].



**Slika 3.** Dijelovi svjetlosnog mikroskopa [7]

Optički mikroskopi koriste se u širokom rasponu primjena u raznim znanstvenim područjima. Ovdje su neke od glavnih namjena optičkih mikroskopa.

**Biološka istraživanja:** Optička mikroskopija naširoko se koristi u biološkim istraživanjima za proučavanje stanica, tkiva i živih organizama. Oni omogućuju istraživačima vizualizaciju i istraživanje staničnih struktura, staničnih procesa i interakcija. Optička mikroskopija je od velike važnosti u područjima kao što su stanična biologija, razvojna biologija, mikrobiologija i histologija.

**Medicinska dijagnoza:** Optički mikroskopi imaju važnu ulogu u medicinskoj dijagnozi. Koriste se za ispitivanje uzoraka krvi, tjelesnih tekućina i biopsija tkiva kako bi se identificirale abnormalne stanice, patogeni i druge promjene povezane s bolešću. Optička mikroskopija neophodna je u područjima kao što su patologija, hematologija, mikrobiologija i citologija.

**Obrazovanje:** Optički mikroskopi naširoko se koriste u obrazovnim okruženjima za podučavanje učenika o strukturi stanica i svijetu mikroskopije. Oni se koriste u školama, na sveučilištima kako bi pomogli studentima da razumiju biologiju, anatomiju i druge biološke znanosti.

**Kontrola kvalitete i industrijske primjene:** Optički mikroskopi se koriste u industriji za kontrolu kvalitete i inspeksijske svrhe. Mogu se koristiti za ispitivanje kvalitete i integriteta materijala, analizu površinskih struktura, mjerenje veličine čestica i inspekciju proizvodnih procesa.



Forenzička znanost: Optički mikroskopi koriste se u forenzičkim laboratorijima za analizu tragova dokaza kao što su vlakna, dlake, mrlje krvi i otisci prstiju. Omogućuju forenzičkim znanstvenicima identificiranje i usporedbu mikroskopskih značajki, pomažući u kaznenim istragama i sudskim slučajevima.

Znanost o materijalima: Optička mikroskopija koristi se u znanosti o materijalima za analizu mikrostrukture materijala. Pomaže istraživačima da razumiju svojstva, sastav i nedostatke materijala na mikroskopskoj razini. Ove informacije su ključne za razvoj novih materijala i poboljšanje postojećih.

Znanost o okolišu: Optički mikroskopi koriste se u znanosti o okolišu za analizu uzoraka tla, vode i bioloških uzoraka iz ekosustava. Oni pomažu u proučavanju mikroorganizama, zagađivača i ekoloških interakcija, dajući uvid u zdravlje i očuvanje okoliša.

Konzervacija umjetnina: Optički mikroskopi nalaze primjenu u konzervaciji i restauraciji umjetnina. Koriste se za analizu pigmenata, proučavanje slojeva boje, utvrđivanje autentičnosti i ispitivanje stanja umjetničkog djela. To pomaže u očuvanju i restauraciji vrijednih kulturnih artefakata.

Nanotehnologija: Optički mikroskopi igraju ulogu u nanotehnološkim istraživanjima omogućujući znanstvenicima vizualizaciju i manipuliranje nanostrukturama. Tehnike kao što su skenirajuća optička mikroskopija bliskog polja (NSOM) i mikroskopija super rezolucije doprinose razumijevanju i razvoju nanomaterijala i nanouređaja.

Astronomija: Optički mikroskopi, posebno specijalizirane varijante kao što su interferentni mikroskopi, mogu se koristiti u astronomiji za proučavanje površina nebeskih objekata kao što su Mjesec i drugi planeti. Oni pomažu u analizi geoloških značajki i provođenju komparativne planetologije.

Ovo je samo nekoliko primjera raznolike primjene optičkih mikroskopa. Svestranost i pristupačnost optičke mikroskopije čine je vrijednim alatom u brojnim znanstvenim disciplinama, olakšavajući otkrića, napredak i praktične primjene u višestrukim područjima studija [8].

### 3. ELEKTRONSKI MIKROSKOP

Zbog simetrije u prirodi nameće se pitanje zašto elektron i ostale materijalne čestice ne bi pokazivale i valna, osim čestičnih svojstava. Prvi je na tu ideju došao Louis de Broglie; on je 1924. godine postavio hipotezu prema kojoj svaka čestica koja se kreće ima i čestična i valna svojstva. Njegova je pretpostavka kasnije potvrđena mnogim eksperimentima.

De Broglie je pretpostavio da za materijalne čestice vrijede slične relacije kao i za fotone. Elektron i foton slični su po tome što oba imaju čestična i valna svojstva. Analogno relacijama za fotone, de Broglie je pretpostavio da svaka materijalna čestica (elektron, proton, neutron, atom ili molekula) mase  $m$  koja se kreće brzinom  $v$  ima valna svojstva, posebno valnu duljinu  $\lambda$  i frekvenciju  $\nu$  dane s:

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad i \quad \nu = \frac{E}{h} \quad (1.1)$$

Tri godine nakon de Broglieove hipoteze, Davisson i Germer u SAD-u, te G.P. Thomson u Engleskoj, opazili su interferenciju i ogib elektrona na kristalima metala. Time su eksperimentalno pokazali da elektroni u gibanju imaju valna svojstva. Valna duljina određena u tim pokusima slagala se s onom koja proizlazi iz de Broglieove teorijske relacije (1.1). Tako je de Broglieova relacija bila eksperimentalno potvrđena, čime je otklonjena svaka sumnja u njezinu ispravnost [9].

#### 3.1. PRINCIP RADA ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA

**Elektronski mikroskop** je uređaj kojim dobivamo uvid u mikrostrukturu promatranog uzorka pomoću uskog snopa elektrona. On se koristi za detalje koji su previše sitni da bi se promatrali optičkim mikroskopom. Kod elektronskih mikroskopa se koristi snop elektrona koji pada na uzorak, za razliku od optičkih koji koriste svjetlost. Osim toga, koriste tzv. elektronske leće umjesto staklenih. Elektronske leće su sustavi elektroda koji stvaraju oštro fokusirani snop elektrona svojim simetričnim električnim i magnetskim poljem [10].

Valna svojstva elektrona našla su praktičnu primjenu u elektronskom mikroskopu. Poznato je da granica rezolucije (moć razlučivanja) optičkih sustava ovisi o valnoj duljini: ako je udaljenost između dviju točaka koje promatramo mikroskopom manja od oko pola valne duljine

svjetlosti kojom se služimo, nikakvim povećanjem nećemo uspjeti razlučiti te dvije točke. Moć razlučivanja mikroskopa možemo povećati smanjenjem valne duljine. Pomoću elektronskih leća (električnih ili magnetskih polja) snop brzih elektrona usmjerava se u elektronskom mikroskopu kao svjetlosne zrake u običnom mikroskopu. Budući da je valna duljina elektrona manja od 0,1 nm (npr. 0,01 nm pri 15.000 V), moć razlučivanja elektronskog mikroskopa bit će tisuću puta veća nego kod običnog mikroskopa [9].

Postoje mnoge moguće interakcije između visokoenergetskog elektronskog snopa i atoma u uzorku. Ako je uzorak vrlo tanak, tada se elektroni mogu prenositi kroz njega neapsorbirani i koristiti za formiranje slike u TEM-u. Ako je uzorak deblji, tada se elektroni više ne prenose pa nam informacije mogu dati samo čestice (elektroni, x-zrake i fotoni) koje izlaze s površine. Ovo su signali koji se koriste u konvencionalnom SEM-u [10].

### **3.2. DIJELOVI ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA**

Sastavni dijelovi elektronskog mikroskopa su: izvor elektrona, elektronske leće, vakuumski uređaj, držač uzorka i detektor.

Izvor elektrona: katoda emitira slobodne elektrone, dok anoda (u obliku prstena) ubrzava te elektrone. Razlika napona mora biti velika između katode i anode, obično između nekoliko tisuća i tri milijuna volti.

Elektronske leće služe za usmjeravanje elektrona. Najčešće se upotrebljavaju magnetske leće, ali se ponekad koriste i elektrostatičke leće. Funkcija elektronske leće slična je funkciji optičke leće u svjetlosnom mikroskopu. Međutim, za razliku od optičkih leća čiji je fokus fiksiran, fokus elektronskih leća može se podešavati, čime se eliminira potreba za sustavom pomičnih leća kao kod svjetlosnog mikroskopa.

Vakuumski uređaj služi za stvaranje vakuumskih uvjeta unutar mikroskopa kako bi se spriječilo apsorbiranje ili skretanje elektrona.

Uzorci se mogu stabilno postaviti u držač uzorka. Često postoje alati koji se mogu koristiti za manipulaciju uzorcima (kao što su premještanje, rotacija, zagrijavanje, hlađenje, rastezanje itd.).

Detektor prikuplja signal ili sekundarne elektrone. U transmisijском elektrоnskom mikroskopu (TEM) projekcija uzorka može se dobiti izravno jer elektroni prolaze kroz uzorak, koji mora biti vrlo tanak. Debljina uzorka, koja može varirati od nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara, ovisi o atomskoj težini elemenata u uzorku, naponu ubrzanja elektrona i željenoj rezoluciji. Što je veća atomska masa i niži napon, uzorak mora biti tanji.

Promjenom sustava leća objektivа, slika u žarišnoj točki objektivа može se izravno povećati. Kao rezultat, dobiva se slika difrakcije elektrona. Ova se slika može koristiti za analizu kristalne strukture uzorka.

Transmisijска elektrоnska mikroskopija s filtriranjem energije (EFTEM) mjeri promjenu brzine elektrona tijekom prolaza kroz uzorak. Na temelju toga može se izvući zaključak o kemijskom sastavu uzorka, kao što je raspodjela kemijskih elemenata unutar uzorka [11].

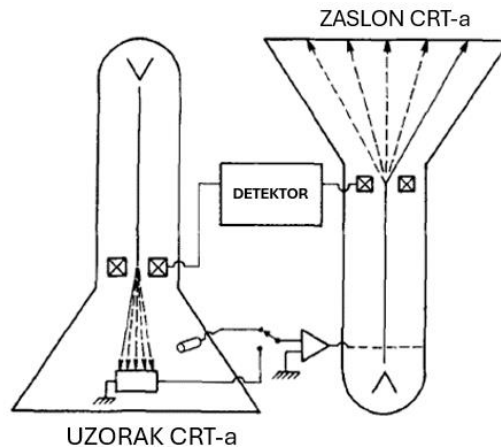
### **3.3. VRSTE ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA**

Prema načinu rada i primjeni, elektrоnski mikroskopi dijele se na dvije osnovne vrste: transmisijски elektrоnski mikroskopi (*engl. transmission electron microscope - TEM*), kod kojih snop elektrona prolazi kroz uzorak, te skenirajući elektrоnski mikroskopi (*engl. scanning electron microscope - SEM*), koji skeniraju površinu uzorka i stvaraju sliku detekcijom elektrona raspršenih po površini uzorka. Elementi za skeniranje također se mogu ugraditi u transmisijски elektrоnski mikroskop. Takav mikroskop se naziva skenirajući transmisijски mikroskop (*engl. scanning transmission microscope - STEM*) i ima karakteristike i TEM i SEM mikroskopa [12].

#### **3.3.1. Skenirajući elektrоnski mikroskop**

Pretražni elektrоnski mikroskop (SEM), koji je s vremenom postao nezamjenjiv alat u fizikalnim znanostima, je u principu izuzetno jednostavan uređaj. Uglavnom se sastoji od dvije katodne cijevi (CRT). U jednoj je predmet koji se ispituje bombardiran fokusiranim snopom elektrona. Učinci ovoga bombardiranja se detektiraju odgovarajućim detektorom i signal proporcionalnog napona dovodi se na drugu koordinatnu mrežu ili CRT. Kako oba CRT-a skeniraju istovremeno, konstruirana je slika uzorka, točku po točku, na zaslonu CRT-a kao što je shematski prikazano na Slici 4. Smjer gledanja slijedi smjer upadne sonde. Velika prednost

ove metode snimanja točka po točka je u tome što se mogu prilagoditi detektori različitih tipova SEM-a i raditi istovremeno na proizvodnji raznovrsnih "slika", od kojih svaka na drugačiji način ovisi o interakciji uzorka i snopa elektrona. Također, detektori propuštenih elektrona i rendgenskih zraka proizvode većinu uobičajeno korištenih SEM slikovnih signala [13].



**Slika 4.** Shematski prikaz SEM-a [13]

SEM može pružiti informacije o površinskoj topografiji, kristalnoj strukturi, kemijskom sastavu i električnom ponašanju uzorka. Uz vrlo jednostavno korištenje, moguće je prikupiti podatke u vrlo kratkom vremenskom razdoblju (oko 5 minuta). Neki moderni SEM-ovi mogu generirati digitalne podatke koji su prenosivi.

Razne specijalizirane faze (npr. vruće, hladno ili dizajniran da omogući *in situ* mehaničko ispitivanje) mogu se priključiti kako bi se omogućilo ispitivanje ponašanja pri različitim uvjetima. Na primjer, katodoluminiscencija (emisija svjetlosti) pri temperaturama blizu apsolutne nule je mnogo jača nego na sobnoj temperaturi, pa su slike nastale pri svjetlosti koju emitira hladan uzorak manje mutne.

Daljnje prednosti SEM-a nad optičkom mikroskopijom uključuje: SEM koristi veliku dubinu polja pa je većina površine uzorka istovremeno u fokusu bez obzira na hrapavost. Optički mikroskopi koji rade na visokom povećanju imaju vrlo malu dubinu polja, što značajno ovisi o hrapavosti površine. SEM može postići mnogo veće povećanje (do 1.000.000x), s konačnom rezolucijom od 1 nm. Maksimalno korisno povećanje optičkog mikroskopa je oko 1000x.

Upadni elektroni obično imaju energiju od 2 do 40 keV. Postoje tri tipa izvora elektrona (elektronskih topova) koji se općenito koriste:

- 1) **Volframova nit u obliku ukosnice** (ona je najčešća) koja se zagrijava na preko 2500°C, propuštanjem struje kroz nju, čime se proizvodi termička emisija elektrona s njenog vrha.
- 2) **Filamenti lantanovog heksaborida (LaB<sub>6</sub>)** također rade termioničke emisije, ali nude veću maksimalnu struju snopa i dulji vijek trajanja. Iako su skuplji, imaju prednosti kao što je "svjetliji" snop zbog niže radne funkcije od volframa.
- 3) **Pištolji za emisiju polja (emiteri s "hladnom katodom")** pružaju svjetliji snop s vrlo malim pomacima u energiji elektrona primjenom jakog električnog polja do fino zašiljenog vrha, što omogućuje kvantno-mehaničko tuneliranje elektrona. Ovi topovi zahtijevaju vakuum od približno  $10^{-10}$  Torr za očuvanje vrha, što povećava troškove FEG mikroskopa.

Dvije ili tri elektromagnetske leće kondenzora fokusiraju elektronski snop na tanku sondu koja se skenira na odabranom području površine uzorka u rasteru pomoću zavojnica. Elektroni prodiru kroz uzorak u volumen u obliku suze čije su ukupne dimenzije određene energijom elektronskog snopa, atomskim masama elemenata u uzorku i kutom pod kojim snop elektrona pogađa uzorak. "Dubina prodiranja" se povećava s većom energijom elektronskog snopa, kutom upada i lakšom atomskom masom, npr. 1 μm u GaAs za 20 keV elektrona normalne učestalosti [10].

Na Slici 5. prikazan je princip rada, odnosno dijelovi skenirajućeg elektronskog mikroskopa.

Izvor elektrona i elektromagnetske leće potječu od volframovih žarulja koje se nalaze na vrhu stupca, slično kao kod transmisijskog elektronskog mikroskopa. Elektroni se emitiraju nakon primjene toplinske energije na izvor elektrona i kreću se velikom brzinom prema anodi koja ima pozitivan naboj.

Snop elektrona aktivira emisiju primarnih raspršenih elektrona s visokim energetske razinama i sekundarnih elektrona s niskim energetske razinama s površine uzorka. Snop elektrona stupa u interakciju s uzorkom, stvarajući signale koji pružaju informacije o površinskoj topografiji i sastavu uzorka.

Uzorku nije potrebna posebna obrada za vizualizaciju pomoću SEM-a; čak se i uzorci osušeni na zraku mogu izravno ispitivati. Međutim, mikrobnii uzorci zahtijevaju fiksaciju, dehidraciju i sušenje kako bi se očuvale strukturne značajke stanica i spriječilo njihovo urušavanje kada su izloženi visokom vakuumu mikroskopa.

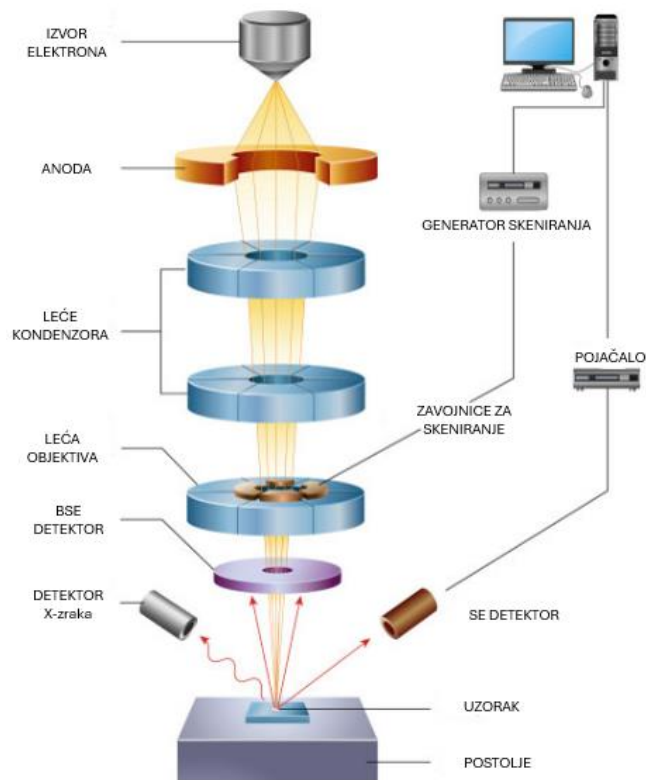
Uzorci se montiraju i premazuju tankim slojem elemenata teških metala kako bi se omogućilo prostorno raspršivanje električnih naboja na površini uzorka, čime se postiže bolja kvaliteta slike s visokom jasnoćom. Skeniranje mikroskopom postiže se pomicanjem snopa elektrona naprijed-natrag preko tankog dijela uzorka. Kada elektroni dosegnu uzorak, površina oslobađa male količine elektrona poznatih kao sekundarni elektroni, koji se zatim hvataju pomoću posebnog detektora.

Kada sekundarni elektroni dođu do BSE detektora, udaraju u detektor x-zraka (materijal koji emitira svjetlost kada ga pogodi nabijena čestica ili foton visoke energije). On emitira bljeskove svjetlosti koji se pretvaraju u električnu struju pomoću SE detektora, šaljući signal na katodnu cijev. To stvara sliku nalik televizijskoj slici koja se može gledati i fotografirati.

Količina sekundarnih elektrona koja ulazi u detektor uvelike ovisi o prirodi uzorka; izdignute površine primaju velike količine elektrona koji ulaze u detektor, dok udubljene površine imaju manje elektrona koji dosežu površinu i stoga manje elektrona ulazi u detektor. Dakle, izdignute površine će se na ekranu prikazivati svjetlije, dok će udubljene površine biti tamnije.

SEM se, uz istraživanje topografije elemenata korištenih u industriji, primjenjuje za točkastu analizu u energijsko-disperzivnoj rendgenskoj spektroskopiji, koristi se za analizu vrlo sitnih kozmetičkih sastojaka, proučava strukture filamenata mikroorganizama.

Koristi se u raznim područjima u industriji, biomedicini, mikrobiologiji i proučavanju struktura i molekula veličine između 1 i 100 nm [14].



**Slika 5.** Shematski prikaz dijelova SEM-a [10]

### 3.3.2. Transmisijski elektronski mikroskop

Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM), dugo je bila važan alat u rastućem području mikrobiologije. Glavna vrlina TEM-a je potencijalna rezolucija koju omogućuju elektronske zrake ubrzane na visokom naponu s efektivnim valnim duljinama koje su kraće za faktor  $10^5$  od vidljive svjetlosti. U načelu, elektronski mikroskopi su sposobni za molekularnu rezoluciju ako se uzme u obzir samo ograničenje valne duljine (difrakcije). U praksi, drugi čimbenici ograničavaju postizanje rezolucije, uključujući sam uzorak. Ostala ograničenja elektronske mikroskopije proizlaze iz činjenice da uzorci moraju biti tanki, suhi, i sposobni raspršiti elektrone u vakuumu. Obično je za to potrebna fiksacija ili stabilizacija uzorka i uvođenje mrlja teških metala koje raspršuju elektrone za stvaranje kontrasta za fotografiranje [15].

TEM je vrsta elektronskog mikroskopa koji ima tri osnovna sustava:

- 1) **Elektronski top (izvor elektrona) i sustav kondenzora** – elektronski top proizvodi snop elektrona, a sustav kondenzora usmjerava snop elektrona na objekt koji promatramo.



- 2) **Sustav za stvaranje slike** - sastoji se od leća objektiva, pomičnog postolja i intermedijarnih leća koje fokusiraju elektrone koji prolaze kroz uzorak u obliku prave, jako uvećane slike.
- 3) **Sustav za snimanje slike** - pretvara elektronsku sliku u oblik vidljiv ljudskom oku. Obično se sastoji od fluorescentnog ekrana za gledanje i fokusiranje slike te digitalne kamere za trajno snimanje (fotografiranje). Osim toga, potreban je vakuumski sustav koji se sastoji od pumpi, njihovih pridruženih mjerača i ventila, te napajanja [16].

Na Slici 6. prikazan je princip rada, a ujedno i shema transmisijskog elektronskog mikroskopa.

Zagrijana volframova nit u elektronskom topu stvara elektrone koji se fokusiraju na uzorak kroz kondenzorsku leću. Za fokusiranje elektronske zrake na uzorak koristi se magnetska leća. Uz pomoć stupca kondenzorske leće u vakuumu, elektroni mogu proizvesti oštre slike bez sudara s molekulama zraka koje bi ih mogle skrenuti. Nakon što dođu do uzorka, uzorak raspršuje elektrone i fokusira ih na magnetsku leću, tvoreći veliku, oštru sliku. Također stvara višebojnu sliku kada se prođe kroz fluorescentni ekran.

Što je uzorak gušći, to se više elektrona raspršuje i manje elektrona dolazi do zaslona za promatranje, tvoreći tamniju sliku, dok tanak, proziran uzorak izgleda svjetlije.

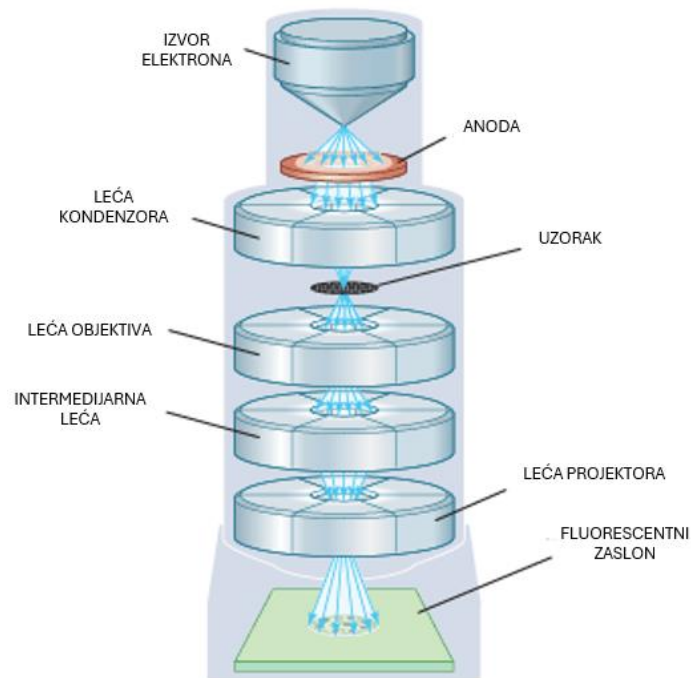
Ako odmaknemo zaslon, fotografija može biti snimljena piksel po piksel i formirati trajnu sliku [17].

Transmisijski elektronski mikroskop koristi se za različita područja kao što su prirodne znanosti, nanotehnologija, medicina, biološka istraživanja, forenzička analiza, metalurgija, industrija i edukacija.

TEM-ovi pružaju topografske, morfološke, sastavne i informacije o kristalnoj strukturi. Slike omogućuju istraživačima pregled uzoraka na molekularnoj razini, omogućujući analizu strukture i teksture. Ove informacije su korisne u proučavanju kristala i metala, ali također imaju industrijsku primjenu.

TEM-ovi se mogu koristiti u proizvodnji i analizi poluvodiča te u proizvodnji računalnih i silicijskih čipova. Tehnološke tvrtke koriste TEM-ove za prepoznavanje nedostataka, lomova i oštećenja na mikro objektima; ti podaci mogu pomoći u rješavanju problema i/ili u izradi trajnijih i učinkovitijih proizvoda. Fakulteti i sveučilišta mogu koristiti TEM-ove za istraživanja

i studije. Iako elektronski mikroskopi zahtijevaju specijaliziranu obuku prije korištenja, studenti mogu pomagati profesorima i učiti TEM tehnike. Na taj način, studenti imaju priliku promatrati svijet nano veličine u nevjerojatnoj dubini i detaljima [18].



**Slika 6.** Shematski prikaz dijelova TEM-a [16]

### 3.3.3. Razlika između skenirajućeg i transmisijskog mikroskopa

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) dvije su najčešće vrste elektronske mikroskopije. Iako obje tehnike dijele iste temeljne principe, postoje nekoliko značajnih razlika u njihovoj instrumentaciji i signalima koji se analiziraju. U SEM-u se sekundarni elektroni (SE) i povratno raspršeni elektroni (BSE) koriste za dobivanje slika površine uzorka, dok se u TEM-u detektiraju transmisijski elektroni kako bi se proizvela projekcijska slika unutrašnjosti uzorka.

Osim glavnih operativnih i instrumentalnih razlika, postoji još nekoliko ključnih razlika između SEM-a i TEM-a koje vrijedi spomenuti:

Obuka i podrška: SEM-i su jednostavniji instrumenti od TEM-a. Obuka je puno lakša i postoji manje mogućnosti za nastanak problema. SEM će imati vrlo malo planiranih zastoja osim redovitih zamjena izvora elektrona. Moguće je obučiti veliki broj korisnika bez brige o

nedostupnosti instrumenta, što ga čini vrlo vrijednim alatom u industrijskim ili istraživačkim i razvojnim okruženjima. S druge strane, da bi TEM dosljedno isporučivao kvalitetne slike visoke rezolucije, potrebni su vješti operateri i mogućnost podrške češćim rješavanjem problema i potencijalno skupim popravcima. Općenito, korisnička baza za TEM bit će ograničena na grupu visoko obučanih pojedinaca.

**Automatizacija:** Za dobro definirane tijekove rada, neki SEM modeli pružaju mogućnost automatizacije prikupljanja i analize podataka. Potpuno automatizirani SEM može obaviti sve, od automatskog poravnjanja do odabira područja od interesa, dobivanja visokokvalitetnih slika, analize podataka i generiranja sažetka rezultata. Neki uobičajeni primjeri gdje je automatizirani SEM vrijedan uključuju praćenje tehničke čistoće proizvedenih dijelova, analizu tragova dokaza (npr. ostatke pucanja), analizu inkluzija u čeliku i kontrolu kvalitete materijala za baterije. Što se tiče TEM-a, postoji sve veći broj rješenja za automatizaciju koja omogućuju mikroskopistima učinkovitije prikupljanje podataka za napredne eksperimente poput in situ TEM-a. Međutim, potpuno automatizirane rutine na razini onih koje su trenutno dostupne za SEM nisu tako lako dostupne.

**Priprema uzoraka:** SEM-i imaju veću komoru za uzorke od TEM-a stoga mogu obraditi uzorke u raspršenom stanju koji su veličine do nekoliko kvadratnih centimetara. Mnogi uzorci mogu se analizirati bez daljnje pripreme, što ga čini prikladnom ne destruktivnom tehnikom. Analiza istog uzorka u TEM-u može zahtijevati opsežnu pripremu. Raspršeni materijali moraju se stanjiti na manje od 100 nm kako bi bili prozirni za elektrone, a priprema tako tankog uzorka zahtijeva specijalizirane alate za stanjivanje i završno čišćenje.

Elektronska mikroskopija omogućuje znanstvenicima vizualizaciju materijala na izuzetno malim razinama. Između SEM-a i TEM-a, odabir prave tehnike za primjenu u konačnici se svodi na to koje informacije pokušavate saznati o uzorku. U nekim slučajevima, mogućnost korištenja obje tehnike pružit će komplementarnu analizu koja je potrebna.

Nekoliko ključnih stvari koje treba imati na umu u procesu nabavke nove opreme za elektronsku mikroskopiju: Koje vrste struktura analizirate i koja je potrebna rezolucija? Pokušavate li saznati nešto o površini ili unutarnjoj strukturi, ili oboje? Je li vaš tijek rada dobro definiran i omogućuje li automatizaciju? Koje vrste objekata imate na raspolaganju i je li prostor ograničen [19]?

## 4. PRIMJENA ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE U KOZMETICI

**Kozmetologija** je znanstvena i stručna disciplina koja obuhvaća proučavanje i primjenu znanstvenih spoznaja čiji je cilj prvenstveno zaštita zdravlja kože, ali i drugih aspekata ljudskog zdravlja i ljepote.

Kozmetološke znanosti proučavaju zdravlje kože, kose i noktiju te izradu i pravilnu upotrebu kozmetičkih i srodnih preparata. Kozmetolozi su osposobljeni za rad na različitim radnim mjestima u javnim i privatnim ustanovama u kojima se provode procesi proizvodnje kozmetike, u ustanovama koje se bave ljudskim zdravljem i ljepotom, u tvornicama kozmetičke industrije te u području kozmetološke regulative. Kozmetolozi također moraju biti educirani za korištenje opasnih kemikalija i poznavati njihovu pravilnu upotrebu, skladištenje, rukovanje i odlaganje. Mnoge kemikalije prisutne u kozmetičkim pripravcima predstavljaju potencijalne zdravstvene rizike. Neke od opasnih kemikalija koje se nalaze u uobičajenim tretmanima (npr. boje za kosu, sredstva za opuštanje, sredstva za smirenje, tretmani keratinom, njega noktiju) uključuju formaldehid, dibutil ftalat, natrijev hidroksid (lužinu), katran ugljena i amonijak.

U području ljepote i kozmetologije, neki kozmetički preparati koji se koriste za bojenje kose i noktiju sadrže kemikalije za koje se pokazalo da nepovoljno utječu na zdravlje kozmetičara, kozmetologa kao i na krajnjeg korisnika. Kemijska kombinacija poznata kao "toksični trio" često je dio popisa sastojaka lakova za nokte, boja za kosu i odstranjivača laka za nokte. Stoga je važno omogućiti obrazovanje i stručno osposobljavanje za one koji su izloženi takvim opasnim kemikalijama [20].

U kozmetologiji, značajnu primjenu imaju već i optički mikroskopi. Jedna od glavnih namjena mikroskopa je procjena kožnih tkiva. To znači, stručnjaci na temelju pregleda kože pomoću mikroskopa utvrđuju kvalitetu kože. Profesionalci mogu pomoću mikroskopa vidjeti sve čestice koje su golim okom nevidljive, kao što su lojne žlijezde, fine linije, razine kolagena, bore itd. To omogućuje precizniju dijagnozu, kako bi stručnjak mogao odrediti koji je najbolji kozmetički tretman za pacijenta.

Druga upotreba mikroskopa u kozmetologiji je analiza sastojaka kozmetičkih preparata. Budući da mikroskop može povećati veličinu sastojaka, praktičari mogu detaljnije vidjeti učinke spojeva. To znači da mogu utvrditi jesu li proizvodi sigurni za korištenje, kao i postoji li

potencijalni rizik. Uz pomoć ove vrste informacija može se poboljšati formulacija kozmetičkih proizvoda.

Mikroskop se također koristi za povećanje procesa bojenja. To znači da stručnjaci mogu koristiti mikroskop kako bi točnije vidjeli učinke pigmenata na kosu. To im omogućuje stvaranje točnih i predvidljivih rezultata koji poštuju željeni stil korisnika.

Jedno od najnovijih dostignuća u kozmetičkoj mikroskopiji je fluorescentna mikroskopija. Ova tehnologija omogućuje stručnjacima trenutno provođenje biokemijskih testova kako bi dobili više informacija o koži. Ove informacije omogućuju praktičarima da lako prepoznaju stanja kao što su akne, suha koža i znakovi starenja. Ova se tehnologija također koristi za provjeru statusa pigmenta kako bi se odredio najučinkovitiji tretman.

Naravno, mikroskop se također može koristiti za pregled folikula dlake. To znači da se folikuli dlake mogu trenutno pregledati za liječenje ćelavosti ili opadanja kose. Frizeri i stručnjaci za njegu kose mogu pratiti učinke tretmana i prilagoditi način primjene proizvoda kako bi optimizirali rezultate. Ukratko, kombinacija mikroskopije i kozmetologije revolucionarizira industriju.

U tom smislu, ovaj alat omogućuje profesionalcima da pogledaju unutrašnjost kože i vlakana kose na potpuno novi način. Ovo poboljšava dijagnostičke mogućnosti i tretmane, što znači da pacijenti sada imaju pristup visokokvalitetnoj skrbi. To sugerira da će kombinacija mikroskopije i kozmetologije i dalje igrati važnu ulogu, a profesionalci će i dalje biti prvi koji će koristiti prednosti ovog sve korisnijeg alata [21].

#### **4.1. ANORGANSKE NANOČESTICE U KOZMETIČKIM PROIZVODIMA**

Za analizu nanočestica u kozmetičkim proizvodima, s obzirom na njihovu veličinu i potrebu za većim povećanjima kako bi se proučili sastojci, potreban nam je elektronski mikroskop.

Anorganski nanomaterijali različitih kemijskih sastava i morfologija primijenjeni su u kozmetičkim proizvodima zbog svojih svojstava koja ovise o veličini i obliku, a koja mogu poboljšati učinkovitost proizvoda. Ovo poglavlje raspravlja o primjeni anorganskih nanočestica u kozmetičkim proizvodima s naglaskom na karakteristične značajke nanočestica prikladnih za kozmetičke primjene. Posebno su detaljno razmotrene primjene anorganskih nanočestica kao

UV filtera i antimikrobnih materijala uz osnovni pregled temeljnih znanstvenih osnova vezanih uz ove primjene. Nabrojani su tipovi nanočestica korištenih u komercijalnim kozmetičkim proizvodima, što odražava raspon primjena i modifikacija svojstava. Također se raspravlja o primjeni anorganskih nanočestica u kozmetičkim formulacijama kao aktivnih komponenti i nosača nanočestica, zajedno s relevantnim primjerima.

Nanočestice (*engl. nanoparticles* - NP) se smatraju vrijednim dodacima repertoaru industrijski relevantnih materijala zbog raznolikosti, prilagodljivosti i mogućnosti integracije njihovih svojstava koja su relevantna za širok raspon primjena. Zanimanje za funkcionalnost i korisnost nanočestica proizlazi iz njihovih jedinstvenih karakteristika kao što su visok omjer površine i volumena, tvrdoća, kvantni efekti zatvaranja, elektronska i magnetska svojstva, katalitička svojstva i biološka aktivnost, koja se ne manifestiraju u masovnom stanju niti na molekularnoj razini. Anorganske nanočestice su među najopsežnije proučavanom klasom materijala zbog potencijalnih primjena koje mogu ostvariti kao funkcionalne i strukturne sastavnice u materijalima i uređajima. Raznolikost anorganskih materijala koji mogu formirati čestice nanometarskih dimenzija proširena je umnožavanjem fizičkih i kemijskih metoda primjenjivih na sintezu nanomaterijala [22].

Posebno su neka svojstva NP-a pogodna za poboljšanje performansi u kozmetičkim proizvodima koji se koriste za dermatološke, proizvode za njegu kose i dentalnu njegu [23]. Sukladno tome, komercijalni kozmetički proizvodi koji koriste potencijale nanomaterijala već su stigli na tržište. Nanočestice se općenito koriste u kozmetičkim proizvodima kako bi se iskoristile prednosti svojstava povezanih s veličinom i oblikom. Nanomaterijali se uglavnom koriste kao aktivne komponente, nanonositelji i kao pomoć u formulaciji raznih kozmetičkih proizvoda.

Dvije vrste nanosustava općenito se koriste u kozmetičkim primjenama:

- 1) sustavi koji se razgrađuju do molekularnog oblika nakon nanošenja na kožu
- 2) netopive čestice koje zadržavaju svoju strukturu čak i nakon nanošenja na kožu.

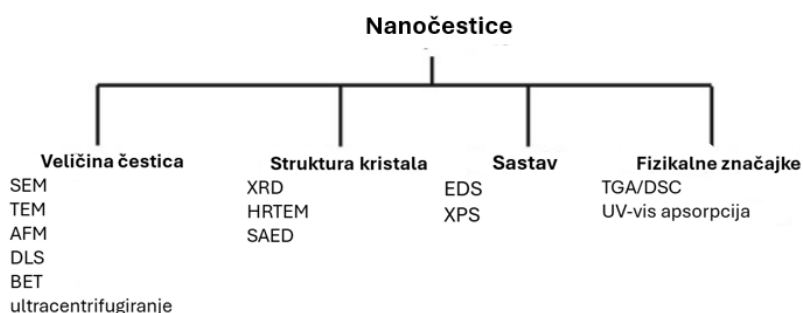
Dok prvu kategoriju uglavnom čine nanosustavi kao što su liposomi i niosomi, većina anorganskih nanočestica korištenih u kozmetičkim formulacijama spada u drugu kategoriju.

Iako su terminologija i koncepti nanotehnologije postali uobičajeni tek prije nekoliko desetljeća, materijali nanometarskih dimenzija korišteni su u davnim vremenima za kozmetičke

primjene. Nedavna studija otkrila je da je recept za boju za kosu star 2000 godina, korišten u grčko-rimskom razdoblju, koristio PbS NP (nanočestice) za promjenu boje ljudske kose [24].

U modernom dobu, publikacije vezane za proučavanje potencijalne primjene nanomaterijala u kozmetičkim proizvodima počele su se pojavljivati ranih 1980-ih [25]. Kozmetički materijali koji sadrže titanijev dioksid predstavljeni su u patentnoj prijavi 1983. godine, a patent za uporabu ZnO nanopraha u zaštiti kože od ultraljubičastog (UV) zračenja objavljen je 1985. godine [25]. Postoji brz porast broja znanstvenih publikacija vezanih uz nanosastojke u kozmetičkim materijalima. Značajan dio istraživanja u ovom području posvećen je proučavanju zdravstvenog/biološkog utjecaja NP-a. Smjernice i ograničenja za korištenje nanomaterijala u potrošačkim proizvodima uspostavljaju se, nadziru i ponovno procjenjuju od strane različitih tijela i agencija u različitim dijelovima svijeta.

Karakterizacija anorganskih nanomaterijala uključuje analizu veličine, raspodjele veličina, oblika, fizičkih svojstava, kristaliničnosti, površinskih naboja i sastava. Za ovu analizu koriste se razne spektroskopske i mikroskopske metode (Slika 7).



**Slika 7.** Analitičke tehnike korištene za karakterizaciju anorganskih nanočestica [22]

Tehnike elektronske mikroskopije kao što su skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) mogu pružiti informacije o veličini i morfologiji čestica. Vizualni prikaz čestica dobiva se kao digitalne slike, koje se mogu dodatno analizirati softverom za analizu slika kako bi se kvantificirala veličine i raspodjele veličina čestica. SEM koristi sekundarne elektrone koje emitiraju atomi nakon pobude visokoenergetskim snopom elektrona, dok TEM koristi elektronske snopove koji prolaze kroz uzorak za stvaranje slike. Uzorak za analizu u SEM-u obično se priprema sušenjem razrijeđene otopine nanočestica na čvrstoj površini. U slučaju materijala koji nisu električno vodljivi, metalni premaz obično se

nanosi tehnikom raspršivanja prije SEM analize. TEM uzorci se obično pripremaju sušenjem razrijeđene otopine čestica na metalnoj mreži.

Mikroskopija atomskih sila (AFM) je tehnika skenirajuće sonde koja djeluje mjerenjem sila između vrha sonde veličine atoma i površine kao funkcije razmaka između njih. U kontaktnoj AFM, topografski grafikon se generira dodirrom sonde na površinu, dok se u ne kontaktnoj AFM, sonda pomiče preko površine bez fizičkog kontakta. AFM slike mogu pružiti informacije o 3D morfologiji analiziranih nanočestica. AFM mjerenja se obično provode na uzorcima deponiranim na glatkoj čvrstoj površini.

Analiza dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) je učinkovit alat za dobivanje raspodjele veličina čestica u uzorku. Ovo mjerenje temelji se na Brownovom gibanju nanočestica u otopini. Kada snop monokromatskog lasera pogodi otopinu ili disperziju nanočestica, nasumično gibanje čestica uzrokuje promjene u intenzitetu raspršene svjetlosti.

Hidrodinamički promjer čestice može se procijeniti mjerenjem koeficijenta translacijske difuzije putem DLS-a pri određenoj temperaturi i viskoznosti medija. Softver povezan s DLS instrumentima izvodi ove izračune, a raspodjela veličine čestica prikazuje se kao rezultat. Budući da prikuplja podatke od velikog broja čestica istovremeno, DLS može pružiti sveobuhvatan prikaz raspodjele veličine čestica u jednom eksperimentu i u kraćem vremenu, za razliku od tehnika elektronske mikroskopije (SEM, TEM) i AFM-a. Raspršenje zračenja (lasera) također se može koristiti za kvantificiranje površinskog naboja čestice (zeta potencijala). Kada se električno polje primijeni na otopinu nanočestica, one se kreću kao odgovor na primijenjeno polje. Brzina kretanja čestica povezana je s površinskim nabojem čestice, a to se može kvantificirati analizom raspršenja čestica i standardnim jednadžbama. Postoje DLS instrumenti s kombiniranim mogućnostima mjerenja veličine čestica i zeta potencijala nanočestica. Brunauer-Emmett-Teller (BET) analiza površine je tehnika za dobivanje specifične površine uzoraka proučavanjem adsorpcije plinova. Ona daje informacije o veličini pora čvrstih uzoraka i može se koristiti za izračunavanje prosječne veličine čestica uzorka nanočestica. Analitičke ultracentrifugacijske tehnike kao što su diferencijalna sedimentacijska analiza i integralna sedimentacijska analiza također se mogu koristiti za dobivanje mjere prosječne veličine čestica. Princip ovih tehnika je da brzina sedimentacije čestice ovisi o njezinoj masi i veličini. Ultracentrifugacija otopine nanočestica uzrokuje frakcioniranje uzorka jer čestice različitih veličina sedimentiraju različitim brzinama. Brzine sedimentacije različitih frakcija mogu se mjeriti optičkim metodama, a te brzine mogu se izravno povezati s česticama koje čine svaku frakciju.



Kristalna struktura nanočestica može se analizirati pomoću rendgenske difrakcije praha (XRD). U ovoj tehnici, suhi uzorak nanočestica analizira se kako bi se dobili vrhovi koji odgovaraju specifičnim kristalografskim ravninama. Dobiveni XRD uzorak zatim se uspoređuje s uzorcima u standardnoj XRD bazi podataka kako bi se identificirala kristalna struktura nanočestica. Visokorezolucijska transmisijnska elektronska mikroskopija (HRTEM) pomaže izravnoj vizualizaciji kristalnih ravnina u kristalnom uzorku nanočestica. Razmak između ravnina dobiven iz ovih slika ukazat će na kristalnu strukturu nanočestica. Difrakcija odabranog područja elektrona (SAED) je još jedan alat za istraživanje kristalne prirode uzorka nanočestica. SAED mjerenje se obično izvodi u TEM-u, a odgovarajući difrakcijski uzorak elektrona analizira se pomoću odgovarajućeg analitičkog softvera i baze podataka.

Elementarni sastav nanočestica može se kvantitativno analizirati pomoću energijski disperzivne rendgenske spektroskopije (EDS). U ovoj tehnici, snop visokoenergetskih elektrona koristi se za stimuliranje karakterističnih rendgenskih emisija elemenata prisutnih u uzorku. Analiza rezultirajuće rendgenske emisije daje informacije o vrstama elemenata prisutnih u uzorku. Relativni postotci različitih elemenata dobivaju se usporedbom intenziteta karakterističnih vrhova svakog elementa. EDS analitički sustav obično je povezan sa SEM-om ili TEM-om. Analiza specifična za lokaciju na pojedinačnim nanostrukturama također je moguća fokusiranjem snopa elektrona na odabrano područje strukture. Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS) može se koristiti za identifikaciju oksidacijskih stanja različitih iona prisutnih u anorganskoj nanočestici. XPS analiza se dobiva ozračivanjem materijala snopom rendgenskih zraka i mjerenjem kinetičke energije i broja elektrona koji izlaze s površine materijala. Mjerenje kinetičke energije elektrona dat će mjeru njihove vezne energije, koja je karakteristična za element u određenom elektronskom stanju ili oksidacijskom stanju. Usporedba relativnih postotaka atomskih vrsta prisutnih u uzorku također se može dobiti iz XPS-a.

Toplinska stabilnost i termokemija uzorka nanočestica mogu se analizirati pomoću termogravimetrijske analize (TGA) i diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), koja se obično izvodi istovremeno jednim instrumentom. TGA analizira promjenu težine u uzorku pri povećanju temperature. To daje informacije kao što su temperatura razgradnje čestica, temperatura pri kojoj se organski ligandi uklanjaju iz sustava. DSC bilježi toplinske promjene koje se događaju u sustavu pri povećanju temperature. To omogućuje praćenje egzotermnih i endotermnih procesa koji se događaju u uzorku pri povećanju temperature.

Svojstva apsorpcije ili transmisije anorganskih nanočestica mogu se dobiti iz UV-Vis apsorpcijske spektroskopije. Otopina uzorka ili film uzorka napravljen na odgovarajućem supstratu mogu se koristiti za snimanje apsorpcije ili transmisije. Iz apsorpcijskih spektara također se može procijeniti energetski procjep anorganskih nanokristala [26].

## **4.2. ANALIZA NANOČESTICA U KOMERCIJALNIM KREMAMA ZA SUNČANJE**

Nanočestice titanijevog dioksida ( $\text{TiO}_2$ ) i cinkovog oksida ( $\text{ZnO}$ ) postale su popularne kao anorganski fizički zaštitni faktori od sunca jer mogu reflektirati i raspršivati UVA i UVB zračenje, dok sprječavaju iritaciju kože i poremećaje endokrinog sustava koje obično uzrokuju kemijski UV filteri. Također, ove nanočestice mogu biti prozirne i ugodne na dodir [27]. Međutim, nedavno su se pojavili sigurnosni problemi vezani za njihovu uporabu u potrošačkim proizvodima. Izvještaji su sugerirali da nanočestice u kremama za sunčanje uzrokuju cito- i genotoksičnost Q3 putem oksidativnog stresa [28]. Zvyagin i sur. [29] i Tilman i sur. [30] pokazali su da  $\text{TiO}_2$  i  $\text{ZnO}$  nanočestice ne mogu prodrijeti u duboke slojeve zdrave kože odraslih osoba. Suprotno tome, Wu i sur. [31] su pokazali da  $\text{TiO}_2$  nanočestice mogu ući u duboke slojeve epidermisa svinja kao i kože bezdlakih miševa. Budući da je utjecaj nanočestica na ljude slabo shvaćen, među međunarodnim tijelima nisu implementirani jasni propisi za nanočestice.

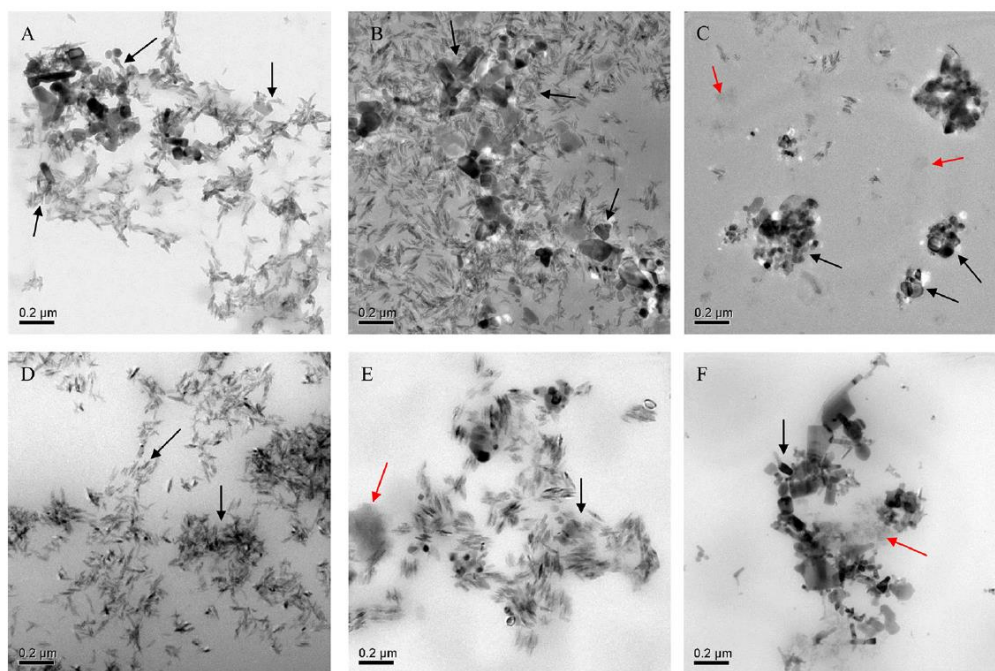
Formulacije krema za sunčanje vrlo su složene i neprozirne, što otežava detekciju i karakterizaciju nanočestica. Tyner i sur. [32] su procijenili sposobnost 20 analitičkih metoda za detekciju  $\text{TiO}_2$  i  $\text{ZnO}$  nanočestica u neizmijenjenim komercijalnim kremama za sunčanje. Skenirajuća elektronska mikroskopija, AFM, laserska skenirajuća konfokalna mikroskopija (LSCM) i rendgenska difrakcija (XRD) smatrani su primjenjivima i komplementarnima za karakterizaciju nanočestica u kremama za sunčanje. Smjernice o sigurnosnoj procjeni nanomaterijala u kozmetici od strane Znanstvenog odbora za sigurnost potrošača sugerirale su upotrebu najmanje dvije metode, od kojih bi jedna trebala biti elektronska mikroskopija, po mogućnosti visoko-rezolucijska transmisivna elektronska mikroskopija (TEM), kako bi se odredili parametri veličine nanomaterijala [33].

## Priprema uzorka

Nakon što su protresli komercijalne kreme za sunčanje, uzeti su uzorci (oko 0,05 g) iz boce i razrijeđeni s etanolom (8 mL) [34]. Kap (10 mL) dobivenih disperzija nanijeta je na bakrenu rešetku presvučenu ugljikom, obrisana pomoću filter papira i sušena na zraku na sobnoj temperaturi. Veličine i oblici čestica analizirani su pri naponu ubrzanja od 200 kV i povećanja od 10.000 do 20.000 puta. Elementarni sastavi određeni su spektroskopijom energijski disperzivnih rendgenskih zraka (EDS).

## TEM analiza

Veličina, oblik i sastav čestica komercijalnih kreme za sunčanje istraživani su kombiniranjem TEM-a s EDS-om. Uzorci su morali biti razrijeđeni prije snimanja TEM/EDS-a. Elektronski mikrografi uzoraka jasno su pokazali nanočestice jer ostatak formulacije nije utjecao na rezoluciju (Slika 8). Otkrivene su razlike u obliku čestica između uzoraka. Konkretno, igličaste čestice pronađene su u COM 1, 2 i 4, dok su u COM 5 primijećene i igličaste i sferične čestice. Kompozicijska analiza anorganskih ostataka EDS-om pokazala je prisutnost signala Si ili Al koji se blisko podudaraju sa signalom anorganskog filtera u većini uzoraka. Izvještaji su zabilježili da su površine  $\text{TiO}_2$  nanočestica modificirane silicijevim dioksidom i aluminijskim oksidom kako bi se smanjila foto reaktivnost i minimizirala formacija reaktivnih vrsta kisika [34]. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) uparen je s EDS-om kako bi se analizirali komercijalni preparati za sunčanje. Uzorci su morali biti razrijeđeni prije snimanja SEM/EDS-a, ali čini se da je naboj okolne organske matrice smanjio rezoluciju (podaci nisu prikazani). Zbog svoje visoke rezolucije, TEM je prikladniji od SEM-a za analizu nanočestica u ovim uzorcima. U skladu s kriterijima Međunarodne suradnje o regulaciji kozmetičkih proizvoda, šest uzoraka sadržavalo je  $\text{TiO}_2$  i  $\text{ZnO}$  čestice koje su pokazivale barem jednu dimenziju manju od 100 nm. COM 1 i COM 2 sastoje se od mješavine  $\text{TiO}_2$  i  $\text{ZnO}$  nanočestica. XRD i TEM mjerenja pružila su konzistentne veličine i komplementarne karakteristike nanomaterijala (Slika 9) [35]. Nanočestice rutilnog  $\text{TiO}_2$  pokazale su igličasti oblik u COM 1, COM 2 i COM 4. Stoga se u COM 5 zaključilo da anatas i rutilni  $\text{TiO}_2$  nanočestice pokazuju redom sferični i igličasti oblik. Ti rezultati pokazuju da su se podaci XRD-a preklapali s podacima TEM-a. I XRD i TEM su prikladni za analizu povezanu s veličinom u preparatima za sunčanje.



**Slika 8.** Transmisijnska elektronska mikroskopija komercijalnih krema za sunčanje koje sadržavaju anorganske nanočestice, COM 1-6 (A-F) [34]

Product No.	XRD			TEM		
	Particle	Phase	PPS (estimate)	Particle size (nm)	Particle shape	Elements detected by EDS
COM 1	TiO <sub>2</sub>	Rutile	15 nm	30–85 (length) 10–20 (width)	Needle shaped	Ti, Zn, C, O, Al, Si, (Cu)
	ZnO	Wurtzite	56 nm	50–110 (length) 25–90 (width)	various	
COM 2	TiO <sub>2</sub>	Rutile	12 nm	45–85 (length) 10–15 (width)	Needle shaped	Ti, Zn, C, O, Al, Si, (Cu)
	ZnO	Wurtzite	59 nm	35–245 (length) 20–65 (width)	various	
COM 3	ZnO	Wurtzite	64 nm	20–290 (length) 20–85 (width)	various	Zn, C, O, Al, Si, (Cu)
COM 4	TiO <sub>2</sub>	Rutile	?	45–95 (length) 10–20 (width)	Needle shaped	Ti, C, O, Al, Si, (Cu)
COM 5	TiO <sub>2</sub>	Anatase	93 nm	25–100 (length) 20–80 (width)	Spherical	Ti, C, O, Al, Si, (Cu)
		Rutile	33 nm	60–95 (length) 10–15 (width)	Needle shaped	Ti, C, O, Al, Si, (Cu)
COM 6	ZnO	Wurtzite	47 nm	20–285 (length) 15–85 (width)	various	Zn, C, O, Si, (Cu)
TiO <sub>2</sub> NP standard	TiO <sub>2</sub>	Anatase	23 nm	4–48 (length)	various	Ti, C, O, (Cu)
		Rutile	31 nm	3–40 (width)		
ZnO NP standard		Wurtzite	29 nm	8–47 (length) 8–47 (width)	Spherical	Zn, C, O, (Cu)

EDS = energy-dispersive X-ray spectroscopy, PPS = primary particle size.  
\* Unavailable information.

**Slika 9.** Rezultati XRD i TEM analize uzoraka komercijalnih krema za sunčanje [35]

Na komercijalne preparate za sunčanje primijenjeno je nekoliko analitičkih metoda; međutim, neke od njih nisu bile prikladne za otkrivanje nanočestica u ovim formulacijama. Nasuprot tome, XRD i TEM su identificirali TiO<sub>2</sub> i ZnO u uzorcima i pružili komplementarne informacije o karakterizaciji nanočestica. XRD je mogao pokazati kristalnu strukturu i prosječnu veličinu čestica u neizmijenjenim preparatima za sunčanje; TEM je mogao pokazati veličinu, oblik i

sastav čestica komercijalnih preparata za sunčanje. Iako su obje metode bile konstantne u rezultatima veličine, imale su nekih ograničenja. XRD nije metoda za slikanje koja bi mogla opaziti nanočestice u formulacijama i ne može odrediti veličinu iznad približno 200 nm. TEM može razlučiti nanočestice u uzorku, ali su uzorci morali biti razrijeđeni prije promatranja. Uvjet razrjeđivanja može promijeniti nanočestice te se ne može analizirati stanje agregacije/aglomeracije u konačnim proizvodima. Unatoč ograničenim metodama, nove tehnike se stalno razvijaju [36].

### **4.3. KOZMETIČKI UČINCI I MORFOLOGIJA KOŽE POMOĆU SEM-a**

Za TEM studije, uzorak biopsije mora biti "fiksiran" (očvrstnut kako bi se spriječila degradacija); ugrađen (kako bi se mogao rezati); rezan; "obojen" kako bi se istaknuo kontrast; i fotografiran unutar visokog vakuuma elektronskog mikroskopa. Jednostavno rečeno, promjene uzrokovane fiksiranjem, ugrađivanjem i bojenjem su ogromne u usporedbi s relativno suptilnim promjenama uzrokovanim primjenom kozmetičkog proizvoda. U stvari, čak i masni materijal nanesen na površinu uzorka biopsije ima tendenciju difuzije u ugrađeni materijal i ne ostaje na uzorku. Zbog svih ovih razloga, SEM je alat izbora za većinu studija kože.

Prve SEM studije na ljudskoj koži uključivale su uzorke biopsija, kako životinjskih tako i ljudskih. Teški učinci dehidracije unutar ultra visokog vakuuma SEM-a ostavljali su uzorke toliko skupljene, iskrivljene i promijenjene da bi svaka veza između stvarnosti i onoga što se vidjelo bila slučajna. Čak ni novije i sofisticiranije metode pripreme uzoraka, kao što su sušenje na kritičnoj točki ili sušenje zamrzavanjem, nisu bile osobito bolje. Iz tog razloga su se Garber [37] i suradnici usmjerili na postupke koji koriste replike kože, koje imaju prednost što možemo karakterizirati SEM-om *in vivo* stanje područja stratum corneuma, a također možemo pratiti identično područje na mikrografijama kao funkciju vremena, na neki način, poput visoko povećane vremenske fotografije. Na taj se način može pratiti učinak proizvoda kao funkcija vremena i procijeniti učinkovitost ovog proizvoda u odnosu na kontrolu. Facq i Bernstein su još kasnih 1960-ih saznali da normalna silikonska smola, bilo tipa RTV-11 ili čak materijali za otiske korišteni u stomatologiji, mogu napraviti "prihvatljive" (relativno bez artefakata) replike rožnatog sloja kože (stratum corneuma ili gornjeg sloja epiderme). Nakon dobivanja "otiska" ili "negativa", negativ se sam replicira, dajući "pozitivnu" repliku površine kože. Također je

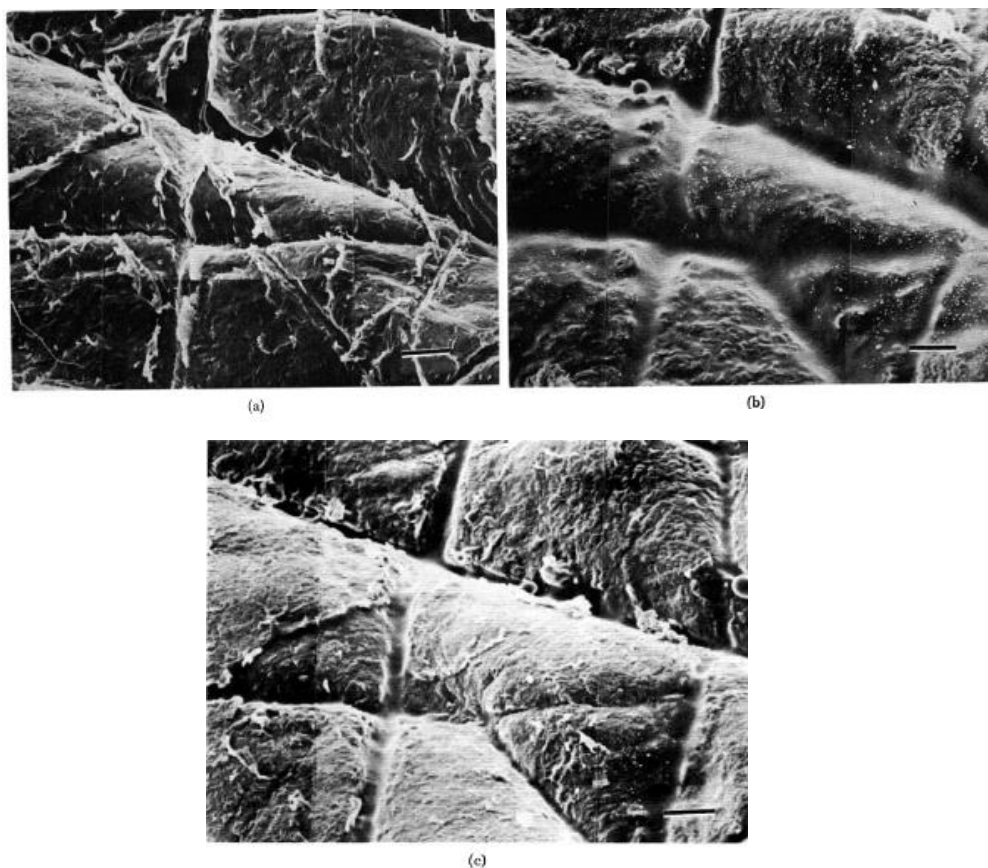
postojao problem s artefaktima u replikama, kao što su zračni mjehurići, koji su imali tendenciju ograničiti, u određenim aspektima, korisnost.

Nažalost, artefakti nisu bili jedini nedostaci izvorno korištenih metoda. Prvo, bila je kritika da je proučavano područje premalo; kako se znalo da je to malo područje doista reprezentativno za proučavanje stratum corneuma u cjelini? Osim toga, ogromne heterogenosti prisutne od točke do točke na stratum corneumu bile su takve da se gotovo moglo dokazati ili opovrgnuti bilo što pažljivim odabirom područja.

Pristup Garbera i suradnika [37] bio je razviti postupak koji bi omogućio sljedeće: proizvesti visoko rezolucijske negativne replike bez artefakata; pretvoriti negativne replike u visoko rezolucijske pozitivne replike; fotografirati ista identična područja, prije i nakon tretmana, kao funkciju vremena, i praćenjem istog identičnog područja izbjeći neke probleme heterogenosti od točke do točke; napraviti velike montaže, radije nego nasumično odabrane slike, tako da bi bilo očito da je proučavano dovoljno veliko područje; kvantificirati dobivene slike ručno ili pomoću računala za analizu slike; korelirati rezultate, kvantitativno kao i kvalitativno, s poznatim kliničkim stanjima.

Primjena mnogih uobičajenih losiona i krema koje su trenutno dostupne donosi olakšanje osobama sa suhom ili ispucalom kožom. Jesu li ti "hidratantni" proizvodi zaista dodavanje vlage u rožnati sloj kože ili su njihovi korisni učinci postignuti nekim drugim mehanizmom?

Slika 10. pruža izvrstan uvid u mehanizam onoga što se zaista događa [37]. Prvo, dolazi do potpune pokrivenosti; iako se proizvod utrljava, na ovim povećanjima vrlo jasno vidimo pokrivanje. Je li ovo hidratacija? Možda jest, možda nije, ovisno o tome kako se definira hidratacija, ali jasno je da je ukupni učinak daleko iznad onoga što će voda sama po sebi učiniti. U svakom slučaju, možemo definirati određeno poboljšanje mjereno smanjenjem uzdignutih podslojeva rožnatog sloja kože (gornjeg sloja epiderme), čak i ako njihova odsutnost proizlazi iz toga što su prekriveni. Tijekom eksperimenta, ispitanik je sigurno doživio koristan klinički učinak, koža je postala mekša, i općenito, ispitanik je osjetio da je koža hidratizirana.



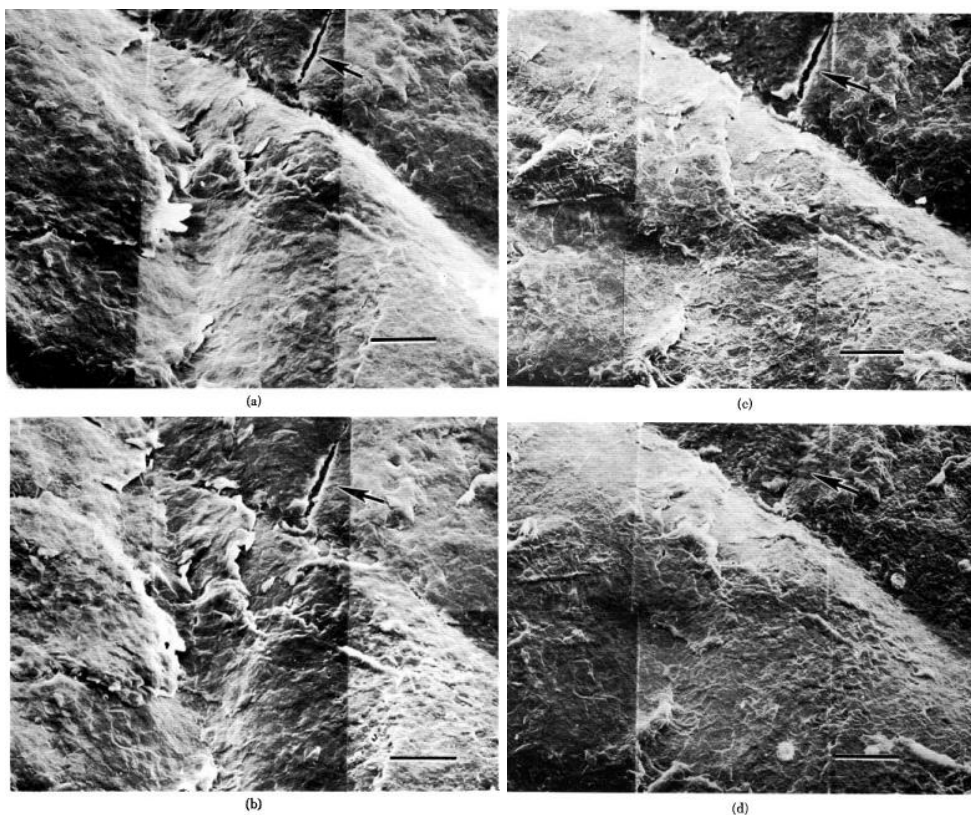
**Slika 10.** SEM prikazi ispucane kože: (a) prije, (b) nakon 1 sat, i (c) nakon 5 sati nanošenja "hidratantnog" losiona. Primijetite prekrivanje povišenih slojeva nakon 1 sata i početak njihovog ponovnog pojavljivanja nakon 5 sati. Skale predstavljaju 300  $\mu\text{m}$ . [37]

Velika pažnja usmjerena je na učinkovitost određenih aktivnih sastojaka koji se koriste u proizvodima za njegu kože. Za neke se čini da imaju učinak, te možemo pratiti promjene koje su izazvane ovim materijalima kroz studije replika. Jedna takva studija provedena je u suradnji s Kurtom Neulingerom, na ispitaniku s ispucalom kožom.

1. Gornji dio dlana ruke bio je namočen 10 minuta u 5%-tnoj otopini natrijevog lauril sulfata kako bi koža dodatno ogrubjela. Nakon 20 minuta, napravljena je REPLIKA PRIJE (Slika 11.a).
2. Zatim je na taj dio ruke natapkana voda, te nakon čekanja 10 minuta, napravljena je REPLIKA NAKON VODE (Slika 11.b).
3. Collasol je nježno utapkavan na gornji dio dlana dio ruke kao što je bilo učinjeno za kontrolu vode, nakon čega je uslijedilo nježno ispiranje. Nakon 20 minuta, napravljena je REPLIKA NAKON COLLASOLA I VODE (Slika 11.c).

4. "Collasol" je ponovno nanijet, ali nije ispran, te nakon 20 minuta napravljena je REPLIKA NAKON COLLASOLA (Slika 11.d).

Najuočljivija je razlika u općem izgledu između dvije replike sa (Slika 11 (c, d)) i dvije bez (Slika 11 (a, b)) "Collasola". REPLIKE PRIJE i SAMO VODE pokazuju manifestacije suhe kože zbog prisutnosti nekih uzdignutih podslojeva epiderme, ali i REPLIKE NAKON COLLASOL PLUS VODE i REPLIKE NAKON COLLASOL pokazuju poboljšanje u odnosu na SAMO VODU. Takva promatranja sigurno pružaju dokaze da je ovaj sastojak učinkovit za ljudsku kožu. Kada se Collasol nanese i ne ispiru, postoji još očitije zaglađivanje.



**Slika 11.** SEM montaze prikazuju učinke Croda "Collasol-a" kada se nanosi na blago suhu kožu: (a) prije, (b) nakon samo vode, (c) nakon Collasol-a s ispiranjem vodom, i (d) nakon Collasol-a (bez ispiranja). Obratite pažnju na naznake zaglađene teksture kože i činjenicu da samo voda gotovo ništa ne čini. Ljestvice predstavljaju 100 µm. [37]

Jesu li to hidratizirajući učinci? Očito, voda sama po sebi gotovo ništa ne čini kao što možemo vidjeti. Postoje oni koji vjeruju da materijali poput Collasola privlače vlagu, tako "zadržavajući" ju na koži. U svakom slučaju, očito se doživljava klinički učinak s Collasolom i replike podržavaju tu kliničku činjenicu.



Da sažmemo, ovi rezultati pokazuju da bilo koji kozmetički tretman koji smanjuje broj ili veličinu uzdignutih podslojeva rožnatog sloja kože te rezultira korisnim kliničkim učinkom, a kvantitativno mjerenje učinkovitosti proizvoda može se dobiti mjerenjem broja prisutnih uzdignutih podslojeva [37].

Jasno je da skenirajući elektronski mikroskop, kada se koristi za fotografiranje replika ljudske kože, može biti snažan alat za procjenu učinkovitosti proizvoda za njegu kože. Povezivanjem koncentracije i veličine uzdignutih podslojeva s kvalitetom kože, možemo procijeniti dugoročnu (ili kratkoročnu) korist određene kozmetičke formulacije.

Konačno pitanje i dalje se odnosi na "hidrataciju". Iz predstavljenih podataka, čini se da djelovanje većine tipičnih hidratantnih sredstava će prodrijeti u (ali ne nužno kroz) rožnati sloj kože, zaglađujući inače suhi rožnati sloj. Bilo da govorimo o ovlaživačima, lipidima ili nečemu tako običnom kao mineralnom ulju, mehanizam se čini isti, tj. prekrivanje, koje zatim prati difuzija lokalno primijenjenih materijala u uzdignuta mjesta rožnatog sloja. Jednom kad je tako otečen, kombinacija površinskih napetosti (koje drže uzdignute podslojeve spuštene na ravninu rožnatog sloja) i učinci podmazivanja dovode do percipiranih kliničkih učinaka. Neki materijali, poput Collasola, određenih proteina i polimera dobivenih od celuloze, mogu djelovati prvenstveno povezivanjem vode s gornjom površinom, nakon čega prevladavaju učinci površinske napetosti. Jasno je da, bez prisutnosti masnog sloja, takvi materijali mogu postići željene kliničke učinke bez masnoće istovremeno. Za tipične hidratantne proizvode trenutno prisutne na tržištu, iako može biti uključena voda, primarni učinak je zbog ulja i dodataka osim vode [37].

## 5. ZAKLJUČAK

Elektronska mikroskopija, posebno skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i transmisijska elektronska mikroskopija (TEM), pokazala se vrlo korisnom u primjeni u kozmetologiji i procjeni učinaka kozmetičkih proizvoda. Ove tehnike omogućuju detaljan uvid u strukturu i morfologiju kože na nanometarskoj razini, što je od velike važnosti za razumijevanje djelovanja kozmetičkih proizvoda.

SEM analiza replika kože pruža vizualne dokaze o promjenama u strukturi rožnatog sloja izazvanima kozmetičkim proizvodima. Kvantifikacija broja i veličine uzdignutih podslojeva rožnatog sloja kože omogućuje objektivnu procjenu učinkovitosti hidratantnih preparata i drugih formulacija. Ova metoda također pomaže u praćenju dugoročnih učinaka i postojanosti proizvoda na koži.

S druge strane, TEM u kombinaciji sa spektroskopijom energije raspršenih X-zraka (EDS) omogućuje detaljnu karakterizaciju nanočestica poput titanijevog dioksida i cink oksida koje se koriste u proizvodima za zaštitu od sunca. Ove tehnike pružaju informacije o veličini, obliku, kristalnoj strukturi i sastavu nanočestica prisutnih u komercijalnim proizvodima.

Ukratko, elektronska mikroskopija revolucionirala je mogućnosti karakterizacije i procjene kozmetičkih proizvoda, pružajući uvid na nanometarskoj razini. Integracijom ovih naprednih analitičkih tehnika s drugim znanstvenim disciplinama, kozmetologija nastavlja napredovati u razvoju učinkovitijih i sigurnijih formulacija prilagođenih specifičnim potrebama potrošača.

## 6. POPIS SIMBOLA I KRATICA

$m$  – masa

$\lambda$  – valna duljina

$\nu$  – frekvencija

$h$  – Planckova konstanta

$E$  – energija fotona

AFM – mikroskopija atomskih sila

BET – Brunauer-Emmett-Teller analiza

BSE – raspršeni elektroni

CRT – katodna cijev

DLS – dinamičko raspršenje svjetlosti

DSC – diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

EDS – energijski disperzivna rendgenska spektroskopija

EFTEM – transmisijaska elektronska mikroskopija s filtriranjem energije

LSCM – laserska skenirajuća konfokalna mikroskopija

NP – nanočestice

NSOM – skenirajuća optička mikroskopija bliskog polja

SAED – difrakcija odabranog područja elektrona

SE – sekundarni elektroni

SEM – skenirajući elektronski mikroskop

STEM – skenirajući transmisijski mikroskop

TEM – transmisijski elektronski mikroskop

TGA – termogravimetrijska analiza

UV – ultraljubičasto

XPS – rendgenska fotoelektronska spektroskopija

XRD – rendgenska difrakcija

## 7. LITERATURA

- [1] M. Krleža, Enciklopedija leksikografskog zavoda, Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 1968., str. 344-345.
- [2] N. Cikron, K. Schauer, Opća i nacionalna enciklopedija u 20 knjiga, XIII. knjiga, PRO LEXIS d.o.o., VEČERNJI LIST d.o.o., Zagreb, 2007., str. 286.
- [3] G. Mršić, S. Žugaj, (2007). Analiza GSR čestica upotrebom elektronskog mikroskopa (SEM/EDX). Policija i sigurnost, 16 (3-4), str. 179-200.
- [4] <https://hr.gvda-instrument.com/info/components-of-an-electron-microscope-84016161.html> (pristup 21.5.2024.)
- [5] F. Paić, Metode proučavanja stanice – Mikroskop, Medicinska biologija Praktikum, str. 2.
- [6] Katedra za biofiziku i radiologiju, Mikroskop, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 2.
- [7] <http://os-pavao-belas.skole.hr/upload/os-pavao-belas/images/static3/769/attachment/Mikroskopiranje.pdf> (pristup 23.5.2024.)
- [8] <https://www.microscopeworld.com/p-4463-a-comprehensive-guide-to-the-light-microscope-how-to-use-a-light-microscope.aspx> (pristup 26.5.2024.)
- [9] P. Kulišić, V. Lopac, Elektromagnetske pojave i struktura tvari, Temelji suvremene kvantne fizike, Zavod za fiziku, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
- [10] K.D., Vernon-Parry, Scanning Electron Microscopy: an introduction, Centre for Electronic Materials, UMIST, France, III-Vs Review, 13 (4), 40-44. (2000.)
- [11] Mikroskop. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024.; <https://www.enciklopedija.hr/clanak/40775> (pristup 20.5.2024.)
- [12] M. Trnak, Diplomski rad, ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA, Odjel za fiziku Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2010.
- [13] H. J. Leamy, Pretražna elektronska mikroskopija prikupljanja naboja, J. Appl. Phys. 53, R51-R80, (1982.)
- [14] <https://microbenotes.com/scanning-electron-microscope-sem/> (pristup 30.5.2024.)

- [15] R. C. Burghardt, R. Droleskey, *Transmission Electron Microscopy*, *Current Protocols in Microbiology*, 2006.
- [16] <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope> (pristup 1.6.2024.)
- [17] <https://microbenotes.com/transmission-electron-microscope-tem/> (pristup 1.6.2024.)
- [18] <https://www.microscopemaster.com/transmission-electron-microscope.html> (pristup 3.6.2024.)
- [19] <https://www.nanoscience.com/blogs/whats-the-difference-between-sem-and-tem/> (pristup 3.6.2024.)
- [20] <https://farf.sum.ba/kozmetologija/> (pristup 19.5.2024.)
- [21] <https://kalstein.us/blog/2023/02/03/how-is-the-integration-of-the-microscope-in-cosmetology/> (pristup 19.5.2024.)
- [22] T. P. Vinod & R. Jelinek, *Inorganic Nanoparticles in Cosmetics. Nanocosmetics*, 2019., 29–46.
- [23] A. Mihranyan, N. Ferraz & M. Strømme, *Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics*, *Progress in Materials Science*, 2012., 57(5), 875–910.
- [24] P. Walter, E. Welcomme, P. Hallégot, N. J. Zaluzec, C. Deeb, J. Castaing, G. Tsoucaris, *Early Use of PbS Nanotechnology for an Ancient Hair Dyeing Formula*. *Nano Letters*, 2006., 6(10), 2215–2219.
- [25] H. A. Epstein & A. Kielbassa, *Nanotechnology in Cosmetic Products*, *Bio-Nanotechnology*, 2013., 414–423.
- [26] T. G. Singh, N. Sharma, *Nanobiomaterials in cosmetics: current status and future prospects*, *Nanobiomaterials in galenic formulations and cosmetics*, 2016., 149–74.
- [27] C. Lorenz, K. Tiede, S. Tear, A. Boxall, N. Von Goetz, K. Hungerbühler, *Imaging and characterization of engineered nanoparticles in sunscreens by electron microscopy, under wet and dry conditions*. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 2010., 16(4), 406–428.
- [28] T. G. Smijs, S. Pavel, *Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness*, *Nanotechnoly, Science and Application*, 2011., 4. 95-112.

- [29] A. V. Zvyagin, X. Zhao, A. Gierden, W. Sanchez, J. A. Ross & M. S. Roberts, Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin in vitro and in vivo, *Journal of Biomedical Optics*, (2008). 13(6), 064031.
- [30] A. Z. Kiss, Z. Kertesz, Z. Szikszai, T. Biro, G. Czifra, B. I. Toth, I. Juhasz, B. Kiss & J. Hunyadi, NANODERM Quality of skin as a barrier to ultra-fine particles, 2007., *ATOMKI Annual Report*, (22), 71.
- [31] J. Wu, W. Liu, C. Xue, S. Zhou, F. Lan, L. Bi, H. Xu, X. Yang, F. D. Zeng, Toxicity and penetration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure, 2009., *Toxicology Letters*, 191(1), 1–8.
- [32] K. M. Tyner, A. M. Wokovich, W. H. Doub, L. F. Buhse, L. P. Sung, S. S. Watson, N. Sadrieh, Comparing methods for detecting and characterizing metal oxide nanoparticles in unmodified commercial sunscreens, *Nanomedicine*, 2009., 4(2), 145–159.
- [33] Scientific Committee on Consumer Safety, Guidance on the safety assessment of nanomaterials in cosmetics, 2012.
- [34] Z. A. Lewicka, A. F. Benedetto, D. N. Benoit, W. W. Yu, J. D. Fortner & V. L. Colvin, The structure, composition, and dimensions of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanomaterials in commercial sunscreens, *Journal of Nanoparticle Research*, 2011., 13(9), 3607–3617.
- [35] International Cooperation on Cosmetic Regulation, Report of the ICCR Joint Ad Hoc Working Group on Nanotechnology in Cosmetic Products: Criteria and Methods of Detection - ICCR4. 2010.
- [36] P. Lu, S. Huang, Y. Chen, L. Chiueh & D.Y. Shih, Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics, *Journal of Food and Drug Analysis*, 2015., 23, 587 - 594.
- [37] C. A. Garber, C. T. Nightingale, Characterizing cosmetic effects and skin morphology by scanning electron microscopy, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1976., 27: 509-531.

## Popis slika

<b>Slika 1.</b> Shematski prikaz elektromagnetskog spektra s istaknutim vidljivim dijelom [5].....	5
<b>Slika 2.</b> Nastajanje slike u mikroskopu [6] .....	5
<b>Slika 3.</b> Dijelovi svjetlosnog mikroskopa [7] .....	7
<b>Slika 4.</b> Shematski prikaz SEM-a [13].....	12
<b>Slika 5.</b> Shematski prikaz dijelova SEM-a [10].....	15
<b>Slika 6.</b> Shematski prikaz dijelova TEM-a [16] .....	17
<b>Slika 7.</b> Analitičke tehnike korištene za karakterizaciju anorganskih nanočestica [22] .....	22
<b>Slika 8.</b> Transmisijska elektronska mikroskopija komercijalnih krema za sunčanje koje sadržavaju anorganske nanočestice, COM 1-6 (A-F) [34].....	27
<b>Slika 9.</b> Rezultati XRD i TEM analize uzoraka komercijalnih krema za sunčanje [35] .....	27
<b>Slika 10.</b> SEM prikazi ispucane kože: (a) prije, (b) nakon 1 sat, i (c) nakon 5 sati nanošenja "hidratantnog" losiona. Primijetite prekrivanje povišenih slojeva nakon 1 sata i početak njihovog ponovnog pojavljivanja nakon 5 sati. Skale predstavljaju 300 $\mu\text{m}$ . [37].....	30
<b>Slika 11.</b> SEM montaže prikazuju učinke Croda "Collasol-a" kada se nanosi na blago suhu kožu: (a) prije, (b) nakon samo vode, (c) nakon Collasol-a s ispiranjem vodom, i (d) nakon Collasol-a (bez ispiranja). Obratite pažnju na naznake zaglađene teksture kože i činjenicu da samo voda gotovo ništa ne čini. Ljestvice predstavljaju 100 $\mu\text{m}$ . [37] .....	31