



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Aleksandra Zielińska

**Synteza i charakterystyka stałych nanocząstek
oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych
przeznaczonych do celów kosmetycznych i farmaceutycznych**

***Synthesis and characterization of solid lipid nanoparticles
and nanostructured lipid carriers
dedicated to cosmetic and pharmaceutical applications***

Promotor: prof. dr hab. Izabela Nowak

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Feliczak-Guzik

Poznań 2018

Serdecznie dziękuję

Pani Profesor dr hab. Izabeli Nowak

*za wieloletnią współpracę i wprowadzenie w świat nauki
oraz za opiekę merytoryczną i możliwość zdobywania doświadczenia.*

Pani Doktor Agnieszce Feliczak-Guzik

za współpracę, pomoc i wszystkie cenne wskazówki.

Ukochanym Rodzicom
za miłość i wsparcie każdego dnia.

*„Trzeba mieć wytrwałość i wiarę w siebie.
Trzeba wierzyć, że człowiek jest do czegoś zdolny
i osiągnąć to za wszelką cenę.”*

Maria Skłodowska-Curie
(1867-1934)

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów	1
1. WSTĘP	5
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	7
2.1. Przenikanie substancji aktywnych przez skórę.....	7
2.1.1. Struktura i rola warstwy rogowej naskórka	8
2.1.2. Wpływ lipidów, w tym kwasów tłuszczowych na absorpcję przezskórną	10
2.1.2.1. Podział kwasów tłuszczowych	12
2.1.3. Charakter fizykochemiczny substancji aktywnej	14
2.1.4. Forma fizykochemiczna podłoża	14
2.1.5. Drogi transportu przezskórnego	15
2.1.5.1. Kinetyka transportu	17
2.1.6. Metody oceny szybkości przenikania substancji aktywnej przez skórę	18
2.1.6.1. Komora Franza i test PAMPA	19
2.1.6.2. Komora Bronaugh	20
2.2. Nowoczesne nośniki substancji aktywnych.....	21
2.2.1. Charakterystyka stałych nanocząstek lipidowych (SLN)	22
2.2.2. Charakterystyka nanostrukturalnych nośników lipidowych (NLC)	25
2.2.3. Oleje roślinne, stanowiące naturalną matrycę lipidową, stosowane w syntezie NLC	26
2.2.3.1. Olej z nasion Meadowfoam	27
2.2.3.2. Olej z nasion Marula.....	28
2.2.3.3. Ocena działania olejów roślinnych na skórę z wykorzystaniem testów <i>in vivo</i>	28
2.2.4. Przenikanie nanocząstek lipidowych przez skórę.....	29
2.3. Toksyczność nanocząstek lipidowych	31
2.4. Substancje aktywne enkapsulowane w nanocząstki lipidowe	33
2.4.1. Próby enkapsulacji monoterpenu w nanocząstki lipidowe	34
2.4.2. Enkapsulacja retinolu w nanocząstki lipidowe	38
2.4.3. Enkapsulacja koenzymu Q ₁₀ w nanocząstki lipidowe	39
2.4.4. Enkapsulacja α -tokoferolu w nanocząstki lipidowe	40
2.5. Metody otrzymywania SLN i NLC	40
2.5.1. Homogenizacja wysokociśnieniowa (HPH)	41
2.5.1.1. Rodzaje homogenizacji wysokociśnieniowej	43
2.5.2. Inne możliwe metody syntezy SLN i NLC.....	45
2.6. Najważniejsze metody statystyczne i fizykochemiczne stosowane do optymalizacji i charakterystyki otrzymanych nanocząstek lipidowych	46
2.6.1. Dobór lipidów	46
2.6.2. Analiza statystyczna: projekt czynnikowy 2 ²	47
2.6.3. Metody statystyczne	48
2.6.4. Spektroskopia korelacji fotonów (PCS)	48
2.6.5. Dyfrakcja laserowa	49

2.6.6.	Potencjał zeta	50
2.6.7.	Przyspieszona analiza stabilności	51
2.6.8.	Szybkość przenikania substancji aktywnej.....	53
2.6.9.	Charakterystyka matrycy lipidowej	53
2.6.9.1.	Dyfrakcja promieni rentgenowskich (XRD)	53
2.6.9.2.	Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)	54
2.6.9.3.	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	54
2.7.	Linie komórkowe do badań <i>in vitro</i>	54
2.8.	Zastosowanie SLN i NLC w kosmetologii i farmacji	55
3.	CEL PRACY	62
4.	METODYKA PRACY	65
4.1.	Optymalizacja metody syntezy nanocząstek lipidowych	65
4.1.1.	Dobór lipidów dla monoterpenów inkorporowanych do SLN	65
4.1.2.	Dobór lipidów dla wybranych składników aktywnych inkorporowanych do NLC	66
4.1.3.	Analiza statystyczna	68
4.1.3.1.	Analiza wariancji (ANOVA).....	68
4.1.3.2.	Diagram Pareto i trójwymiarowy wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi.....	68
4.2.	Synteza SLN	69
4.2.1.	Preparatyka SLN inkorporowanych monoterpenami	70
4.2.1.1.	Preparatyka SLN inkorporowanych α -pinenem	70
4.2.1.2.	Preparatyka SLN inkorporowanych cytralem	71
4.2.1.3.	Preparatyka SLN inkorporowanych geraniolem	71
4.2.1.4.	Preparatyka SLN inkorporowanych limonenem	72
4.2.1.5.	Preparatyka SLN bez enkapsulowanego składnika aktywnego (próba odniesienia).....	72
4.3.	Synteza NLC.....	73
4.3.1.	Preparatyka NLC inkorporowanych Retinolem 50 C.....	74
4.3.1.1.	Preparatyka NLC inkorporowanych Retinolem 50 C z wykorzystaniem półsyntetycznego lipidu (Miglyol 812)	75
4.3.1.2.	Preparatyka NLC inkorporowanych Retinolem 50 C z wykorzystaniem naturalnego lipidu (olej z nasion Meadowfoam)	75
4.3.1.3.	Preparatyka NLC syntezowanych z wyłącznie półsyntetycznych lub organicznych składników oraz inkorporowanych Retinolem 50 C.....	76
4.3.2.	Preparatyka NLC inkorporowanych koenzymem Q ₁₀	77
4.3.2.1.	Preparatyka NLC syntezowanych z wyłącznie półsyntetycznych lub organicznych składników oraz inkorporowanych koenzymem Q ₁₀	78
4.3.3.	Preparatyka NLC inkorporowanych α - tokoferolem	79
4.3.3.1.	Dobór optymalnych parametrów procesu HPH przy użyciu homogenizatora Panda Plus 2 000 (liczba cykli, wysokość ciśnienia, homogenizacja wstępna)	80
4.3.3.2.	Preparatyka α - tokoferolu enkapsulowanego w NLC metodą mikroemulgowania.....	81

4.3.3.3. Preparatyka α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC metodą homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco	81
4.3.4. Badania stabilności fizykochemicznej otrzymanych NLC	82
4.4. Ocena skuteczności działania oleju z nasion Meadowfoam na podstawie testów <i>in vivo</i>	82
4.4.1. Preparatyka kremów do testów aplikacyjnych	83
4.4.1.1. Preparatyka kremu I (próba referencyjna)	83
4.4.1.2. Preparatyka kremu II (zawierającego MSO)	83
4.4.2. Pomiar właściwości fizykochemicznych otrzymanych preparatów do testów <i>in vivo</i>	84
4.4.3. Badania właściwości fizykochemicznych otrzymanych preparatów kosmetycznych	85
4.4.3.1. Pomiar pH otrzymanych preparatów kosmetycznych	85
4.4.3.2. Pomiar lepkości otrzymanych preparatów kosmetycznych	85
4.4.3.3. Analiza rozkładu wielkości cząstek otrzymanych preparatów kosmetycznych	85
4.4.3.4. Pomiar potencjału zeta otrzymanych preparatów kosmetycznych	85
4.4.4. Badania aplikacyjne	85
4.4.4.1. Pomiar przesnaskórkowej utraty wody (TEWL)	85
4.4.4.2. Pomiar stopnia nawilżenia skóry	86
4.5. Liofilizacja otrzymanych nanocząstek lipidowych	87
4.6. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych nanocząstek lipidowych	88
4.6.1. Pomiar wielkości cząstek za pomocą spektroskopii korelacji fotonów oraz pomiar potencjału zeta z wykorzystaniem techniki elektroforetycznego rozpraszania światła	88
4.6.2. Pomiar rozkładu wielkości cząstek za pomocą dyfrakcji laserowej	89
4.6.3. Ocena stabilności chemicznej Retinolu 50 C oraz koenzymu Q ₁₀ enkapsulowanego w NLC z wykorzystaniem techniki HPLC	90
4.6.4. Badanie stabilności SLN za pomocą analizy separacji odśrodkowej z wykorzystaniem analizatora dyspersji LUMiSizer®	90
4.6.5. Badanie kinetyki uwalniania monoterpenów inkorporowanych do SLN za pomocą komór dyfuzyjnych Franza	91
4.6.6. Badanie kinetyki uwalniania koenzymu Q ₁₀ enkapsulowanego w NLC za pomocą aparatu łopatkowego z dyskiem nośnym	91
4.6.7. Efektywność enkapsulacji inkorporowanych monoterpenów z wykorzystaniem chromatografii gazowej	92
4.6.8. Analiza krystaliczności matrycy lipidowej SLN za pomocą dyfrakcji monochromatycznego promieniowania rentgenowskiego	93
4.6.9. Badania temperatury przejść fazowych za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej	94
4.6.10. Analiza morfologii nanocząstek za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)	95
4.7. Badania <i>in vitro</i> otrzymanych nanocząstek inkorporowanych monoterpenami	96

4.7.1.	Badanie aktywności przeciwzapalnej monoterpenów	96
4.7.2.	Badanie cytotoksyczności za pomocą testu kolorymetrycznego z wykorzystaniem resazury (Alamar Blue [®] , AB).....	97
5.	WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA (cz. 1 – SLN)	100
5.1.	Dobór lipidów dla monoterpenów	100
5.1.1.	Dobór odpowiedniego lipidu dla α -pinenu	100
5.1.2.	Dobór odpowiedniego lipidu dla cytralu	101
5.1.3.	Dobór odpowiedniego lipidu dla geraniolu	102
5.1.4.	Dobór odpowiedniego lipidu dla limonenu	102
5.2.	Analiza statystyczna jako narzędzie optymalizacji syntezy nanocząstek lipidowych inkorporowanych monoterpenami	104
5.2.1.	Plany czynnikowych eksperymentów dla α -pinen-SLN	104
5.2.1.1.	Analiza wariancji dla α -pinen-SLN	105
5.2.1.2.	Diagram Pareto i wykres powierzchniowy dla α -pinen-SLN	106
5.2.2.	Plany czynnikowych eksperymentów dla cytral-SLN	109
5.2.2.1.	Analiza wariancji dla cytral-SLN	109
5.2.2.2.	Diagram Pareto i wykres powierzchniowy dla cytral-SLN	111
5.2.3.	Plany czynnikowych eksperymentów dla geraniol-SLN	113
5.2.3.1.	Analiza wariancji dla geraniol-SLN	114
5.2.3.2.	Diagram Pareto i wykres powierzchniowy dla geraniol – SLN	115
5.2.4.	Plany czynnikowych eksperymentów dla limonen-SLN	118
5.2.4.1.	Analiza wariancji dla limonen-SLN	118
5.2.4.2.	Diagram Pareto i wykres powierzchniowy dla limonen-SLN	120
5.2.5.	Plany czynnikowych eksperymentów dla SLN bez enkapsulowanego składnika aktywnego	122
5.2.5.1.	Analiza wariancji dla SLN bez enkapsulowanego składnika aktywnego	123
5.2.5.2.	Diagram Pareto i wykres powierzchniowy dla SLN bez enkapsulowanego składnika aktywnego	124
5.3.	Porównanie Z-Ave, PDI i ZP wszystkich otrzymanych SLN inkorporowanych monoterpenami	127
5.4.	Analiza i porównanie stabilności dla otrzymanych SLN inkorporowanych monoterpenami z wykorzystaniem analizatora dyspersji LUMiSizer [®]	131
5.4.1.	Analiza zjawisk niestabilności na podstawie uzyskanych profili transmisyjnych	131
5.4.2.	Porównanie indeksów niestabilności wszystkich analizowanych monoterpenów enkapsulowanych w SLN	143
5.4.3.	Analiza prędkości sedymentacji cząstek w otrzymanych próbkach SLN inkorporowanych monoterpenami	146
5.5.	Badanie uwalniania monoterpenów z nanocząstek lipidowych z wykorzystaniem komór dyfuzyjnych Franza	150
5.6.	Obliczenie efektywności enkapsulacji SLN inkorporowanych monoterpenami	153
5.7.	Analiza SLN inkorporowanych monoterpenami z wykorzystaniem dyfrakcji promieni rentgenowskich (XRD)	154

5.7.1.	Analiza dyfraktogramów w zakresie niskokątowym.....	155
5.7.2.	Analiza dyfraktogramów w zakresie wysokokątowym	156
5.8.	Analiza stanu krystaliczności SLN inkorporowanych wybranym monoterpenem.....	157
5.8.1.	Analiza termogramów DSC w procesie ogrzewania	158
5.8.2.	Analiza termogramów DSC w procesie chłodzenia	159
5.9.	Morfologia otrzymanych SLN.....	161
5.10.	Badania <i>in vitro</i> wybranych monoterpenów enkapsulowanych w SLN.....	163
5.10.1.	Aktywność przeciwzapalna cytralu i geraniolu	163
5.10.2.	Badania cytotoksyczności SLN enkapsulowanych cytralem z wykorzystaniem nienowotworowej linii komórkowej HaCaT	166
5.10.3.	Porównanie działania cytralu enkapsulowanego w SLN na linie komórek skóry: nienowotworowe HaCaT oraz nowotworowe A431	167
5.10.4.	Porównania wielokrotne za pomocą poprawki Bonferroniego (testy <i>post-hoc</i>)	169
6.	WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA (cz. 2 – NLC)	171
6.1.	Dobór odpowiedniego lipidu dla Retinolu 50 C.....	171
6.2.	Porównanie Z-Ave, PDI oraz ZP otrzymanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C.....	173
6.2.1.	NLC inkorporowane Retinolem 50 C, zawierające półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid	173
6.2.2.	Półsyntetyczne i organiczne NLC inkorporowane Retinolem 50 C.....	176
6.3.	Porównanie rozkładu wielkości cząstek otrzymanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C techniką dyfrakcji laserowej.....	179
6.3.1.	NLC inkorporowane Retinolem 50 C, zawierające półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid	179
6.3.2.	Półsyntetyczne i organiczne NLC inkorporowane Retinolem 50 C.....	182
6.4.	Zdjęcia matrycy lipidowej NLC inkorporowanych Retinolem 50 C wykonane za pomocą mikroskopu stereoskopowego	184
6.4.1.	NLC inkorporowane Retinolem 50 C, zawierające półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid	184
6.4.2.	Półsyntetyczne i organiczne NLC inkorporowane Retinolem 50 C.....	185
6.5.	Ocena stabilności chemicznej Retinolu 50 C enkapsulowanego w NLC.....	186
6.5.1.	NLC inkorporowane Retinolem 50 C, zawierające półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid	186
6.5.2.	Półsyntetyczne i organiczne NLC inkorporowane Retinolem 50 C.....	187
6.6.	Dobór odpowiedniego lipidu dla koenzymu Q ₁₀	189
6.7.	Porównanie Z-Ave, PDI oraz ZP otrzymanych NLC inkorporowanych koenzymem Q ₁₀	191
6.8.	Porównanie rozkładu wielkości cząstek otrzymanych NLC inkorporowanych koenzymem Q ₁₀ techniką dyfrakcji laserowej	194
6.9.	Zdjęcia matrycy lipidowej NLC inkorporowanych koenzymem Q ₁₀ wykonane za pomocą mikroskopu stereoskopowego	196
6.10.	Ocena stabilności chemicznej koenzymu Q ₁₀ enkapsulowanego w NLC	197

6.10.1.	Półsyntetyczne i organiczne NLC inkorporowane koenzymem Q ₁₀	197
6.11.	Badanie uwalniania koenzymu Q ₁₀ z nanocząstek lipidowych z wykorzystaniem aparatu łopatkowego z dyskiem nośnym	199
6.12.	Dobór odpowiedniego lipidu dla α -tokoferolu	201
6.13.	Porównanie Z-Ave, PDI oraz ZP otrzymanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem	202
6.14.	Porównanie rozkładu wielkości cząstek za pomocą techniką dyfrakcji laserowej dla NLC inkorporowanych α -tokoferolem otrzymanych z wykorzystaniem dwóch różnych metod syntezy	205
6.15.	Morfologia otrzymanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem	209
6.16.	Badania aplikacyjne i ocena skuteczności działania MSO	211
6.16.1.	Analiza właściwości fizykochemicznych badanych preparatów kosmetycznych	211
6.16.2.	Testy <i>in vivo</i>	214
7.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	217
8.	Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim	229
9.	Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim	232
10.	Dorobek naukowy	235
10.1.	Lista publikacji	235
10.2.	Konferencje naukowe	237
10.3.	Staże i stypendia naukowe	240
10.4.	Nagrody	240
11.	Spis załączników	241
12.	Literatura	271

Wykaz skrótów

SKRÓT	ROZWIĘCIE SKRÓTU	WYJAŚNIENIE
A431	<i>Model Human Cell Line (Epidermoid Carcinoma)</i>	ludzka linia komórkowa nowotworu skóry
AB	<i>Alamar Blue[®]</i>	wskaźnik zawierający resazurynę
ALA	<i>Alfa-Linolenic Acid</i>	kwas alfa-linolenowy
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>	analiza wariancji
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>	adenozyno-5'-trifosforan
BALB/c	<i>Albino, Laboratory Strain of the House Mouse</i>	gatunek myszy albinotycznych
BBB	<i>Blood-Brain Barrier</i>	bariera krew – mózg
CCD	<i>Charge-Coupled Device Line</i>	przyrząd o sprzężeniu ładunkowym (monolityczne układy scalone)
CE	<i>Cornified Envelope</i>	koperta rogowa
CSA	<i>Centrifugal Separation Analysis</i>	analiza separacji odśrodkowej
DDS	<i>Drug Delivery System</i>	system dostarczania leków
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>	dynamiczne rozpraszanie światła
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	modyfikowana pożywka Eagle'a Dulbecco
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>	dimetylosulfotlenek
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>	skaningowa kalorymetria różnicowa
EE	<i>Encapsulation Efficiency</i>	efektywność enkapsulacji
EFA	<i>Essential Fatty Acids</i>	niezbędne kwasy tłuszczowe
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	czynnik wzrostu naskórka
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	receptor czynnika wzrostu naskórka
ELS	<i>Electrophoretic Light Scattering</i>	elektroforetyczne rozpraszanie światła
EOC	<i>Epithelial Ovarian Cancer</i>	nabłonkowy rak jajnika
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>	plodowa surowica bydlęca
FD	<i>Factorial Design</i>	analiza statystyczna; badanie czynnikowe
FDA	<i>American Food and Drug Administration</i>	Amerykańska Agencja Żywności i Leków
GA	<i>Glicolid Acid</i>	kwas glikolowy
GC	<i>Gas Chromatography</i>	chromatografia gazowa
GLA	<i>Gamma-Linolenic Acid</i>	kwas gamma-linolenowy
GRAS	<i>Generally Recognised As Safe</i>	ogólnie uznane za bezpieczne

SKRÓT	ROZWINIĘCIE SKRÓTU	WYJAŚNIENIE
HaCaT	<i>Immortalized Human Keratinocytes</i>	unieśmiertelniona linia komórkowa keratynocytów człowieka
HPH	<i>High Pressure Homogenization</i>	homogenizacja wysokociśnieniowa
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>	wysokosprawna chromatografia cieczowa
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>	międzynarodowe nazewnictwo składników kosmetyków
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
LA	<i>Linoleic Acid</i>	kwas linolowy
LB	<i>Lamellar Bodies</i>	ciałka blaszkowate
LC	<i>Loading Capacity</i>	pojemność załadunkowa
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>	lipopolisacharyd
ME	<i>Microemulsion Method</i>	metoda mikroemulsji
MR	<i>Modified Released Dosage Form</i>	postać leku o zmodyfikowanym uwalnianiu
MSO	<i>Meadowfoam Seed Oil</i>	olej z nasion Meadowfoam
NIBS	<i>Non-Invasive Back Scattering</i>	nieinwazyjne rozproszenie wsteczne
NIR	<i>Near-Infrared</i>	bliska podczerwień
NLC	<i>Nanostructured Lipid Carriers</i>	nanostrukturalne nośniki lipidowe
NMF	<i>Natural Moisturizing Factor</i>	naturalny czynnik nawilżający
NO	<i>Nitric Oxide</i>	tlenek azotu(II)
O/W	<i>Oil in Water</i>	emulsja typu olej w wodzie
OA	<i>Oleic Acid</i>	kwas oleinowy
PAMPA	<i>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i>	równoległy test przepuszczalności sztucznej błony
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>	sól fizjologiczna buforowana fosforanem(V)
PCA	<i>Pyroglutamic Acid</i>	kwas piroglutaminowy
PCS	<i>Photon Correlation Spectroscopy</i>	spektroskopia korelacji fotonów
PDI	<i>Polydispersity Index</i>	współczynnik polidispersyjności
PLA	<i>Polylactic Acid, Polylactide</i>	polilaktyd (poli(kwas mlekowy))
RAW 264.7	<i>Abelson Leukemia Virus Transformed Cell Line Derived From BALB/c</i>	linia komórkowa mysich makrofagów
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>	reaktywne formy tlenu
SAXD	<i>Small Angle X-Ray Diffraction</i>	dyfrakcja niskokątowa
SCCP	<i>Scientific Committee on Consumer Products</i>	Europejski Komitet Naukowy ds. Produktów Konsumenckich

SKRÓT	ROZWINIĘCIE SKRÓTU	WYJAŚNIENIE
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>	Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów
SD	<i>Standard Deviation</i>	odchylenie standardowe
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>	skaningowa mikroskopia elektronowa
SLN	<i>Solid Lipid Nanoparticles</i>	stałe nanocząstki lipidowe
SPC	<i>Surfactant</i>	środek powierzchniowo czynny
SS	<i>Sum of Squares</i>	suma kwadratów
STEP	<i>Space- and Time-resolved Extinction Profiles</i>	profile ekstynkcji w przestrzeni i czasie, tzw. profile transmisyjne
TEWL	<i>Trans Epidermal Water Loss</i>	przezskórkowa utrata wody
UT	<i>Ultra-Turrax</i>	homogenizacja wysokoobrotowa
UV	<i>Ultraviolet</i>	nadfiolet; promieniowanie nadfioletowe (ultrafioletowe)
UV-Vis	<i>Ultraviolet/Visible Spectroscopy</i>	spektroskopia w nadfiolecie i w świetle widzialnym
W/O	<i>Water in Oil</i>	emulsja typu woda w oleju
W/O/W	<i>Water in Oil in Water</i>	emulsja wielokrotna (woda/ olej/ woda)
WAXD	<i>Wide Angle X-Ray Diffraction</i>	dyfrakcja wysokokątowa
XRD	<i>X-Ray Diffraction</i>	dyfrakcja promieni rentgenowskich
Z-Ave	<i>Z-Average, Average particle size Z</i>	średnia wielkość cząstek
ZP	<i>Zeta Potential</i>	potencjał zeta

WSTEP

1. WSTĘP

W centrum zainteresowań ośrodków naukowo-badawczych na świecie znajdują się obecnie nośniki składników kosmetycznych w postaci cząstek o wielkości mierzonej w nanometrach. Dotychczas w lecznictwie zastosowanie znalazły emulsje submikronowe, liposomy oraz mikrosfery i nanosfery zbudowane z polimerów biodegradowalnych. Najnowsze badania ukazują szczególne zainteresowanie nanocząstkami, których bazą są lipidy, a obecne czasy określa się nawet „erą nośników lipidowych”. To właśnie ta szeroko stosowana grupa substancji może odegrać kluczową rolę we współczesnej medycynie. Jeszcze do niedawna niezwykle obiecującymi nośnikami substancji aktywnych były liposomy – kuliste pęcherzyki wielkości 0,01 – 1,0 μm , których rdzeń tworzy mikrokropelka wody otoczona podwójną warstwą fosfolipidową, dzięki czemu mogą one stanowić nośnik substancji hydrofilowych i hydrofobowych. Liposomy posiadają wiele zalet, wśród których można wymienić ochronę przed wpływem środowiska zewnętrznego lub przed rozkładem enzymatycznym dla zamkniętej wewnątrz pęcherzyka substancji, jak również dostarczanie substancji do określonego narządu (tzw. terapia celowana). Jednak niewielka trwałość fizyczna, a tym samym krótki okres przydatności, jak również wrażliwość na podwyższoną temperaturę czy kosztowna technologia produkcji na skalę przemysłową spowodowały, że obecność liposomów w produktach kosmetycznych jest znikoma. Z upływem czasu, alternatywą na wszystkie niedoskonałości wcześniejszych nośników okazały się nanocząstki lipidowe tzw. pierwszej i drugiej generacji.

W ciągu ostatnich 20-u lat najpopularniejszymi nośnikami składników aktywnych w produktach kosmetycznych zostały stałe nanocząstki lipidowe (ang. *Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) oraz nanostrukturalne nośniki lipidowe (ang. *Nanostructured Lipid Carriers*, NLC). W zależności od metody syntezy, ich rozmiar waha się przeważnie od 100 do 500 nm. Nośniki te charakteryzuje szereg korzystnych właściwości użytkowych, w tym m.in. budowa oparta na lipidach dobrze tolerowanych przez organizm ludzki, wysoka stabilność, a także zdolność do przenoszenia związków hydro- oraz lipofilowych. Nanocząstki lipidowe cechują również właściwości adhezyjne i okluzyjne, dzięki czemu na powierzchni skóry zostaje utworzony film ochronny, który ogranicza przeznaskórkową utratę wody oraz zapewnia utrzymanie odpowiedniego poziomu nawilżenia.

Nanocząstki lipidowe stosowane w produktach kosmetycznych ułatwiają penetrację inkorporowanych składników aktywnych w głąb skóry, a następnie modulują uwalnianie w miejscu docelowym. W dodatku odznaczają się wysoką stabilnością oraz są dobrze tolerowane przez skórę, a tym samym z powodzeniem mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, m.in. w kosmetyce pielęgnacyjnej (wzrost nawilżenia skóry), kosmetyce kolorowej (poprawa jednolitości koloru preparatów), perfumach (przedłużone uwalnianie substancji zapachowych) czy produktach promieniochronnych (synergistyczny efekt filtrów UV umieszczonych w nanocząstkach oraz samych SLN i NLC jako filtrów fizycznych). Prekursorem zastosowania nanocząstek lipidowych jako nośników substancji czynnych w preparatach kosmetycznych była firma Dr. Rimpler GmbH, która w 2005 roku wprowadziła na rynek pierwszy preparat przeciwzmarszczkowy na bazie nanocząstek lipidowych inkorporowanych koenzymem Q₁₀.

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

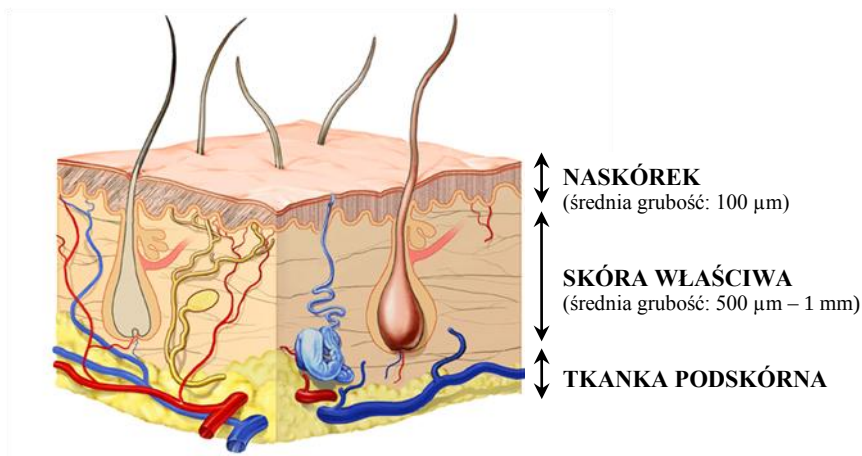
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. Przenikanie substancji aktywnych przez skórę

Przenikanie substancji aktywnych przez skórę stanowi bardzo ważną kwestię w badaniach nad efektywnością działania związków stosowanych w kosmetyce i farmacji. Otrzymanie właściwego stopnia penetracji substancji aktywnych, jak również potwierdzenie ich skuteczności klinicznej jest jednym z kluczowych wyzwań dla współczesnego przemysłu kosmetycznego [1]. Efektywność działania kosmetyku uwarunkowana jest bowiem zarówno jego oddziaływaniem na lipidy cementu międzykomórkowego warstwy rogowej naskórka, jak i na błony komórkowe [2].

Główną barierą, która utrudnia przenikanie substancji aktywnej kosmetyku przez skórę jest warstwa rogowa (łac. *stratum corneum*), zbudowana z płaskich i zrogowaciałych komórek [3]. Dlatego też, aby możliwy był efektywny transport substancji biologicznie czynnych w głąb skóry, zaczęto tworzyć i stosować różnego rodzaju nowatorskie nośniki, w których zamyka się niewielkie ilości substancji aktywnej. W zależności od budowy i składu, nośniki posiadają różną zdolność penetracji i przekazują substancję czynną do miejsca docelowego, w którym następnie dochodzi do jej uwolnienia [4].

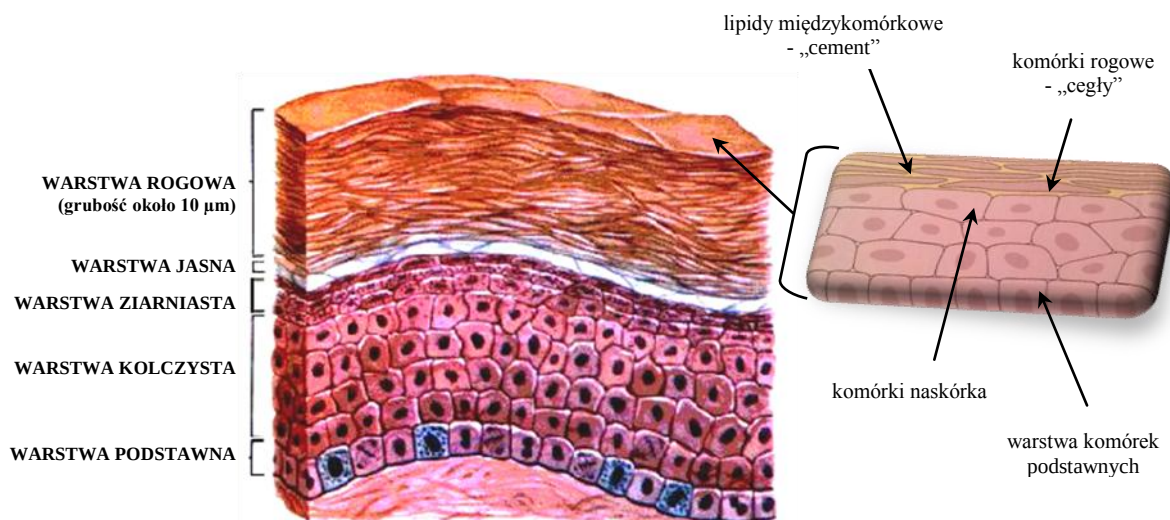
Przenikanie przez skórę polega na „wędrowce” cząsteczki substancji przez kolejne warstwy skóry (rys. 1). Proces ten rozpoczyna się od związania cząsteczki substancji w pierwszych warstwach naskórka, a kończy się w momencie jej wnikięcia do ustroju. Ważne jest, aby cząsteczki substancji aktywnych nie przedostawały się do krążenia ogólnego, dlatego niezwykle istotna jest znajomość ich struktury, właściwości oraz zdolności penetracji. Na określony przebieg absorpcji przezskórnej wpływa odpowiednio stan skóry, charakter fizykochemiczny substancji aktywnej i samej formułacji kosmetycznej [3].



Rysunek 1. Schemat budowy skóry człowieka [5].

2.1.1. Struktura i rola warstwy rogowej naskórka

Najbardziej zewnętrzną warstwę skóry stanowi naskórek, składający się głównie z keratynocytów – żywych komórek, które w trakcie procesu keratynizacji przekształcają się w różne warstwy o odmiennej strukturze (rys. 2). Struktura warstwy rogowej zapewnia jej rolę bariery ochronnej, bowiem w jej skład wchodzi korneocyty – martwe komórki o silnie spłaszczonym kształcie, tworzące wielowarstwowy układ bezjądrzastych komórek, wypełnionych niemal wyłącznie keratyną. Dodatkowo posiadają pewną liczbę enzymów, które uczestniczą w procesach metabolicznych oraz zawierają mieszaninę substancji (mniej lub bardziej higroskopijnych) umożliwiających wiązanie wody [3].



Rysunek 2. Schemat budowy naskórka (po lewej) i „ceglanego muru” warstwy rogowej – widok z góry (po prawej) [6].

Struktura warstwy rogowej określana jest często mianem „ceglanego muru”, którego podstawę („cegły”) stanowią korneocyty. Z kolei wypełnione pomiędzy nimi przestrzenie tworzą swoistą macierz lipidową („cement”), w skład której wchodzi mieszanina kwasów tłuszczowych wielonienasyconych, cholesterol i ceramidy [3, 7]. Ponadto, cement międzykomórkowy uzupełnia struktura ciekłokrystaliczna, zbudowana z laminarnie ułożonych blaszek lipidowych, dzięki czemu ogranicza przeznaskórkową utratę wody (ang. *Transepidermal Water Loss*, TEWL) oraz zapewnia prawidłowe nawilżenie skóry [8].

Zawartość poszczególnych składników cementu międzykomórkowego została przedstawiona w tabelach 1 i 2. Lipidy warstwy rogowej, wymienione w tabeli 1, tworzą płaszcz hydrolipidowy skóry (zbudowany z wody i lipidów), który stanowi barierę odpowiedzialną za odpowiednie uwodnienie naskórka, ale przede wszystkim utrzymuje kwaśne pH skóry [7, 9]. Ponadto, płaszcz hydrolipidowy pełni rolę skutecznej zapory dla docierających z zewnątrz bakterii, jak również zmniejsza TEWL [10]. Optymalnie nawilżony naskórek może prawidłowo spełniać wszystkie swoje funkcje fizjologiczne, pełniąc zarazem rolę pierwszej bariery ochronnej w organizmie [6].

Tabela 1. Skład lipidów warstwy rogowej naskórka [11, 12].

SKŁADNIK	ZAWARTOŚĆ [% WAG.; ± 0,1]
ceramidy	40,0
sterole i ich pochodne (głównie cholesterol, wolny i zestryfikowany)	25,0
wolne kwasy tłuszczowe (długołańcuchowe)	18,0
węglowodory	11,0
inne	6,0

Wśród właściwości ceramidów, czyli sfingolipidów, złożonych z nasyconego kwasu tłuszczowego i sfingozyny (alkohol aminowy), warto zwrócić uwagę na ich ułożenie w warstwach lamelarnych, przypominające strukturę błon komórkowych. Dzięki temu, ceramidy mogą łatwo wbudować się w struktury cementu międzykomórkowego [7].

Ceramidy zawierają na ogół znaczną ilość kwasów tłuszczowych, nasyconych i nienasyconych. Przykładowo, ceramid 1 (acylceramid) posiada w swej strukturze kwas linolowy (ang. *Linoleic Acid*, LA, C18:2, omega-6), który odpowiada za tworzenie odpowiedniej geometrii lipidowych ciał blaszkowatych N-O-acylceramidu, jak również wspomaga utrzymywanie ciekłokrystalicznej struktury cementu międzykomórkowego. W przypadku obniżonej zawartości kwasu linolowego, mogą występować zaburzenia zdolności ochronnych w warstwie rogowej naskórka [9].

Tabela 2. Skład naturalnego czynnika nawilżającego
(ang. *Natural Moisturizing Factor*, NMF) [3, 11, 12].

SKŁADNIK	ZAWARTOŚĆ [% WAG.; ± 0,1]
wolne aminokwasy (zwłaszcza seryna i cytrulina)	40,0
kwas piroglutaminowy (ang. <i>Pyroglutamic Acid</i> , PCA)	12,0
mleczany	12,0
jony sodowe i potasowe	9,0
cukry proste, kwasy organiczne i peptydy (cukry m.in. glukoza, fruktoza, mannoza, galaktoza)	8,5
mocznik	7,0
jony chlorkowe	6,0
jony wapniowe i magnezowe	3,0
organiczne związki azotu	1,5
cytryniany i inne sole organiczne	0,5
jony fosforanowe(V)	0,5

Za spoistą strukturę cementu międzykomórkowego odpowiadają oddziaływania pomiędzy poszczególnymi jego składnikami o charakterze:

- polarnym – poprzez tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody i polarnymi fragmentami lipidów,
- niepolarnym – między łańcuchami alkilowymi lipidów [11].

W bliskim otoczeniu korneocytów, niezwykle bogatych w keratynę, znajduje się głównie NMF, który zawiera mieszaninę substancji higroskopijnych, potrafiących wiązać

wodę. W efekcie dochodzi do jej zatrzymywania przez *stratum corneum*, które tym samym wpływa na regulację poziomu nawilżenia skóry [3].

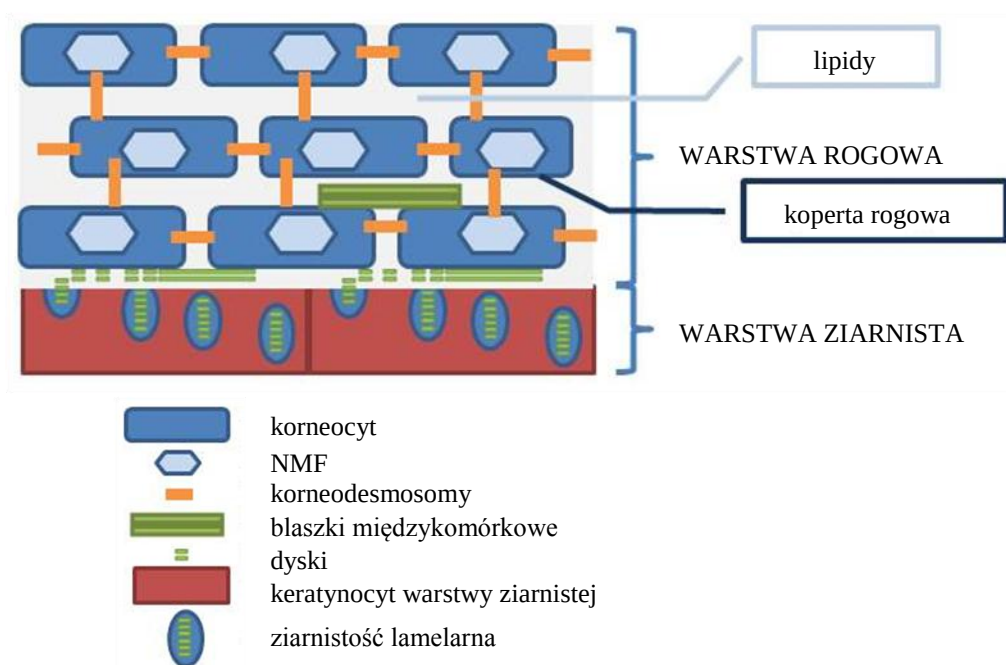
Na zaburzenia prawidłowego składu lipidów i związanych z nimi funkcji bariery naskórkowej mogą wpływać różne czynniki. Wśród czynników egzogennych wymienia się przede wszystkim detergenty, promieniowanie UV oraz pozostałe czynniki atmosferyczne, podczas gdy endogenne obejmują głównie procesy chorobowe skóry; stany zapalne oraz zaburzenia metabolizmu ceramidów i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [7].

2.1.2. Wpływ lipidów, w tym kwasów tłuszczowych na absorpcję przezskórną

Pomiędzy warstwą ziarnistą a rogową wytwarzana jest bariera lipidowa, w której ziarnistości lamelarne tworzą agregaty. W rezultacie dochodzi do fuzji błon i uwolnienia ich zawartości w postaci dysków i blaszek [13], jak przedstawiono na rysunku 3. Ponadto, wśród podstawowych elementów strukturalnych, tworzących barierę ochronną *stratum corneum* wymienia się:

- kopertę rogową (ang. *Cornified Envelope*, CE), którą stanowi nierozpuszczalna struktura, zapewniająca korneocytom wytrzymałość mechaniczną,
- kompleksy keratyn i filagryny w obrębie korneocytów,
- blaszki lipidowe (międzykomórkowe), wypełniające przestrzeń między korneocytami,
- korneodesmosomy, będące połączeniami komórkowymi odpowiedzialnymi za ścisłe przyleganie do siebie korneocytów [14].

W wytworzeniu i utrzymaniu tych elementów biorą udział białka strukturalne (w tym głównie keratyna, inwolukryna, lorykryna oraz korneodesmozyna), a także enzymy i organelle zwane ciałkami blaszkowatymi (ang. *Lamellar Bodies*, LB), które uczestniczą w transporcie lipidów w obrębie keratynocytów [14].



Rysunek 3. Schemat budowy warstwy rogowej i ziarnistej naskórka wraz z procesem tworzenia lipidów [13, 15].

Proces odnowy lipidów w ziarnistościach lamelarnych zachodzi wolniej wraz z upływem lat. Z kolei przyspieszenie tego procesu jest widoczne w obecności lipidów zawierających kwasy tłuszczowe, zwłaszcza należące do szeregu omega-6 [13]. Aby przyspieszyć proces odnowy bariery lipidowej, w przypadku skóry młodej zaleca się stosowanie preparatów zawierających pojedynczy lipid (np. cholesterol), natomiast dla skóry starszej warto użyć mieszaniny potrójnych lipidów, tj. kwasów tłuszczowych w połączeniu z cholesterolem i ceramidami lub też preparatów kosmetycznych bogatych wyłącznie w cholesterol [6, 13]. Stężenia dla poszczególnych składników łoju skórniego (sebum) człowieka na powierzchni skóry i gruczołów łojowych [16] przedstawiono w tabeli 3. Wolne kwasy tłuszczowe powstają na powierzchni naskórka w wyniku rozkładu trójglicerydów przez bakterie. Naskórek wytwarza więcej lipidów w ciałkach lamelarnych warstwy ziarnistej skóry, zarówno podczas uszkodzenia bariery ochronnej, jak i na skutek wzrostu TEWL. Stosowanie lipidów zawierających kwasy tłuszczowe, zwłaszcza te należące do rodziny omega-6, przyspiesza odtwarzanie lipidów w ciałkach lamelarnych, które z wiekiem ulegają powolnemu rozpadowi [17].

Tabela 3. Wybrane składniki lipidowe ludzkiego sebum [13, 17].

GRUPA LIPIDÓW	ZAWARTOŚĆ [% WAG.; ± 0,1]	
	na powierzchni skóry	w gruczołach łojowych
trójglicerydy kwasów tłuszczowych	19,5 – 49,4	24,0 – 34,0
wolne kwasy tłuszczowe	7,9 – 39,0	–
woski i estry cholesterolu	24,1 – 32,1	17,7 – 21,5
Skwalen	10,1 – 13,9	25,6 – 31,6

Zawarte w lipidach kwasy tłuszczowe, odgrywają niezwykle ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu skóry. Jednym z nich jest wspomniany już kwas linolowy, zawarty m.in. w ceramidzie 1. Niedobór kwasu linolowego (LA) w skórze powoduje zastąpienie go kwasem oleinowym (ang. *Oleic Acid*, OA, C18:1, omega-9), co w konsekwencji wpływa na zaburzenia funkcjonowania ceramidu, jednocześnie obniżając właściwości ochronne warstwy rogowej [7]. Kwas linolowy reguluje metabolizm skóry. W przypadku cery suchej, wzmacnia on nie tylko barierę lipidową naskórka, ale także chroni przed transepidermalną utratą wody. Ponadto, LA stanowi również naturalny składnik łoju skórniego, wydzielanego przez gruczoły łojowe. Efekt zablokowanych porów oraz tworzenie się zaskórników, a w rezultacie wyprysków jest wynikiem spadku zawartości LA w sebum u osób z cerą trądzikową [13]. Stosowanie kwasu linolowego do pielęgnacji cery tłustej i problematycznej powoduje poprawę pracy gruczołów łojowych, ułatwia odblokowanie porów oraz znacząco zmniejsza ilość zaskórników [7]. W dodatku kwas ten może zostać wbudowany w strukturę błony komórkowej bądź też uczestniczyć w tworzeniu cementu międzykomórkowego.

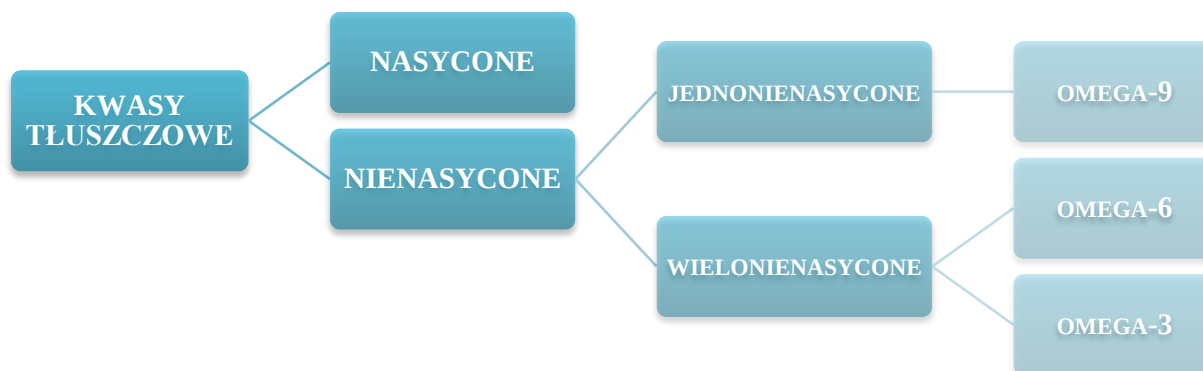
Z kwasu linolowego mogą być syntetyzowane w organizmie człowieka pozostałe kwasy z rodziny omega-6, w tym m.in. kwas gamma-linolenowy (ang. *Gamma-Linolenic Acid*, GLA, γ -linolenowy, C18:3). GLA powstaje na szlaku przemian metabolicznych kwasu linolowego, pod wpływem działania enzymu delta-6-desaturazy [18]. Warto zaznaczyć, że poziom delta-6 desaturazy naturalnie obniża się w procesie starzenia organizmu, co skutkuje jednoczesnym zmniejszaniem się stężenia GLA. To właśnie wszelkie niedobory LA lub GLA

mogą spowodować występowanie licznych problemów skóry, a przede wszystkim nadmiernego jej wysuszenia. Uważa się, że zaburzenia metabolizmu kwasów tłuszczowych stanowią główną przyczynę powstawania łuszczycy, a z kolei niedobór enzymu delta-6-desaturazy i ceramidów objawia się atopowym zapaleniem skóry [7, 13].

Należący do szeregu omega-3, kwas alfa-linolenowy (ang. *Alfa-Linolenic Acid*, ALA, α -linolenowy, C18:3) razem z GLA są fizjologicznymi składnikami błony komórkowej lub mitochondrialnej ludzkich komórek. Natomiast kwasy tłuszczowe omega: ω -9 (OA), ω -6 (LA) i ω -3 (ALA) ograniczają przeznaskórkową utratę wody, wpływając przy tym korzystnie na stopień nawilżenia skóry [13]. Ponadto, stymulują procesy regeneracyjne uszkodzonej bariery lipidowej naskórka oraz redukują stany zapalne, stabilizując tym samym metabolizm skóry. Jedną z najistotniejszych funkcji wszystkich wspomnianych kwasów tłuszczowych jest uaktywnianie syntezy lipidów barierowych skóry i białek – prekursorów NMF [13, 19].

2.1.2.1. Podział kwasów tłuszczowych

Kwasy tłuszczowe pełnią w organizmie człowieka wiele znaczących funkcji [20] (m.in. stanowią źródło energii, są substratami w syntezie tłuszczów, fosfolipidów czy eikozanoidów [21]) oraz stanowią 20% wag. całości jednej z trzech głównych klas lipidów warstwy rogowej naskórka [22]. Według powszechnie obowiązującej klasyfikacji, kwasy tłuszczowe można podzielić w zależności od stopnia nasycenia łańcucha węglowodorowego na nasycone oraz na jedno- i wielonienasycone, wśród których wyróżnia się tzw. szereg omega-3, omega-6 i omega-9 (rys. 4), będący kluczem do określania kosmetycznej przydatności trójglicerydów [7, 23].



Rysunek 4. Podział kwasów tłuszczowych [13].

W 1929 roku po raz pierwszy użyto nazwy *Essential Fatty Acids* (EFA, z ang. niezbędne kwasy tłuszczowe) jako związków tłuszczowych ważnych dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu człowieka. W przyrodzie znanych jest ponad 100 naturalnych kwasów tłuszczowych, z czego ponad 40 występuje powszechnie [20], a do najpopularniejszych z nich zaliczamy:

- wśród nasyconych – kwas palmitynowy i stearynowy, obecne praktycznie we wszystkich tłuszczach pochodzenia roślinnego,
- wśród nienasyconych – kwas linolowy i oleinowy, stanowiące blisko 70% wag. wszystkich nienasyconych kwasów tłuszczowych, występujących w przyrodzie.

Podstawowe informacje dotyczące kwasów tłuszczowych zostały zebrane i przedstawione w tabeli 4. Największe działanie kosmetyczne wykazują kwasy omega-6 i omega-3. W kosmetykach do pielęgnacji cery szczególne znaczenie ma wysoka zawartość LA (ω -6) i ALA (ω -3), bowiem to właśnie one są najmniej komedogenne i ograniczają powstawanie zaskórników, a dodatkowo regenerują uszkodzoną barierę lipidową naskórka i ograniczają utratę wody. Nienasycone kwasy tłuszczowe mają duże znaczenie we wspomaganiu leczenia wielu dermatoz, w tym atopowego zapalenia skóry czy łuszczycy [13].

Tabela 4. Kwasy tłuszczowe – podstawowe informacje [13, 24].

	NASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE		NIENASYCONE (JEDNO- I WIELO-) KWASY TŁUSZCZOWE
Wzór ogólny	$C_nH_{2n}O$ gdzie n jest liczbą parzystą		$C_nH_{2n-2}O$ (dla kwasów jednonienasyconych) gdzie n jest liczbą parzystą
Charakterystyka	wszystkie atomy węgla w łańcuchu węglowodorowym są nasycone atomami wodoru		obecność wiązań podwójnych
	brak wiązań podwójnych		monoenowe - jedno wiązanie podwójne; polienowe (wielonienasycone) - dwa lub więcej wiązań podwójnych
Właściwości fizykochemiczne	poniżej 10 atomów węgla	powyżej 10 atomów węgla	przeważnie bezbarwne ciecze
	lotne z parą wodną ciecze, o nieprzyjemnym zapachu, rozpuszczalne w wodzie	białe ciała stałe, nietlne, bezzapachowe, nierozpuszczalne w wodzie	
Nomenklatura	nazwy zwyczajowe, nawiązujące przeważnie do nazwy surowca, z którego wyizolowano dany kwas tłuszczowy, np. kwas masłowy		nazwy zwyczajowe, nawiązujące przeważnie do nazwy surowca, z którego wyizolowano dany kwas tłuszczowy, np. kwas linolowy
	nazwa systematyczna, tworzona od nazwy wyjściowego węglowodoru (o takiej samej liczbie atomów węgla, co dany kwas tłuszczowy), poprzez dodanie określenia kwas i końcówki <i>-anowy</i>		nazwa systematyczna, tworzona od nazwy wyjściowego węglowodoru (o takiej samej liczbie atomów węgla, co dany kwas tłuszczowy), poprzez dodanie określenia kwas i końcówki <i>-enowy</i> ; z zaznaczeniem lokalizacji oraz konfiguracji wiązania podwójnego
			przedstawienie położenia wiązań podwójnych notacja delta - $k,l,m... (\Delta^{k,l,m...})$, gdzie $k,l,m...$ oznaczają położenie wiązania podwójnego, licząc od grupy karboksylowej notacja omega-i (ω -i lub n -i), gdzie „i” oznacza położenie ostatniego wiązania podwójnego, licząc od końca łańcucha węglowego,

			na którym znajduje się grupa metylowa
	W celu uproszczenia, liczbę atomów węgla oraz liczbę ewentualnych wiązań podwójnych w kwasie tłuszczowym przedstawia się za pomocą umownych skrótów, np.: skrót 18:0 – kwas zawierający 18 atomów węgla w łańcuchu, brak wiązań podwójnych, skrót 18:3 – kwas zawierający 18 atomów węgla w łańcuchu, 3 wiązania podwójne		

2.1.3. Charakter fizykochemiczny substancji aktywnej

Wielkość, kształt oraz charakter chemiczny cząsteczki są jednymi z najważniejszych czynników, od których zależy skuteczny transport przez skórę [25]. Mniejsza masa cząsteczkowa, tj. w granicach 500 – 1 000 Da znacząco ułatwia przenikanie [3]. Z kolei biorąc pod uwagę kształt należy pamiętać, że długa liniowa struktura (mniej lub bardziej rozgałęziona) ogranicza przenikanie przeznaskórkowe cząsteczki. W dodatku charakter lipofilowy substancji ułatwia nie tylko jej wniknięcie, ale i pozostanie w strukturach cementu międzykomórkowego [11]. Jednak substancje lipofilowe trudno uwalniają się z bazy o charakterze lipidowym, podczas gdy substancje hydrofilowe pozostają w podłożach wodnych i odznaczają się największą zdolnością przenikania w czasie maksymalnego uwodnienia skóry [3]. Najłatwiejsze przenikanie możliwe jest zatem dla cząsteczek amfifilowych, a ponieważ środki powierzchniowo czynne wpływają na strukturę cementu międzykomórkowego, będą miały jednoczesny wpływ na przenikanie przez komórki *stratum corneum* [25].

2.1.4. Forma fizykochemiczna podłoża

Podłoża posiadają na ogół niewielką zdolność przenikania, ale w zależności od zawartych w nim składników oraz od formy fizykochemicznej mogą ułatwiać bądź utrudniać przenikanie substancji aktywnych. Tym samym określenie szybkości transportu cząsteczki pozostaje cechą indywidualną [3].

Wśród składników działających powierzchniowo i tworzących okluzję, można wymienić: węglowodory (np. olej parafinowy, wazelina stała) parafiny, silikon, woski czy alkohole tłuszczowe (alkohol stearylowy, alkohol cetylowy). Inny rodzaj podłoża mogą stanowić żele, tworzące na skórze film po uprzednim odparowaniu z niej wody oraz polimery kationowe – umożliwiające wiązanie keratyny, która tworzy tym samym dodatkową barierę na powierzchni naskórka [3]. Aby usprawnić przenikanie do głębszych warstw skóry, można zastosować substancje pomocnicze, takie jak np.:

- oleje roślinne – linolowe, posiadające reszty nienasyconych kwasów tłuszczowych o dwóch podwójnych wiązaniach (m.in. olej słonecznikowy, z pestek winogron czy z makadamii); linolenowe, zawierające reszty nienasyconych kwasów tłuszczowych o trzech podwójnych wiązaniach (m.in. olej z ogórecznika lekarskiego, wiesiołka czy z pestek czarnej porzeczki),
- środki powierzchniowo czynne (SPC) – pełniące rolę emulgatorów i ułatwiających przenikanie cząsteczek aktywnych; z uwagi na swój amfifilowy charakter potrafią także samodzielnie przenikać do warstwy rogowej [25].

Odpowiednio dobrana forma podłoża wpływa na skuteczną penetrację substancji aktywnych. Dlatego też, warto pamiętać o zachowaniu zgodności pomiędzy cechami fizykochemicznymi transportowanej cząsteczki a rodzajem emulsji.

Na rysunku 5 przedstawiono różne układy form fizykochemicznych, za pomocą których można nanosić substancję aktywną na skórę.

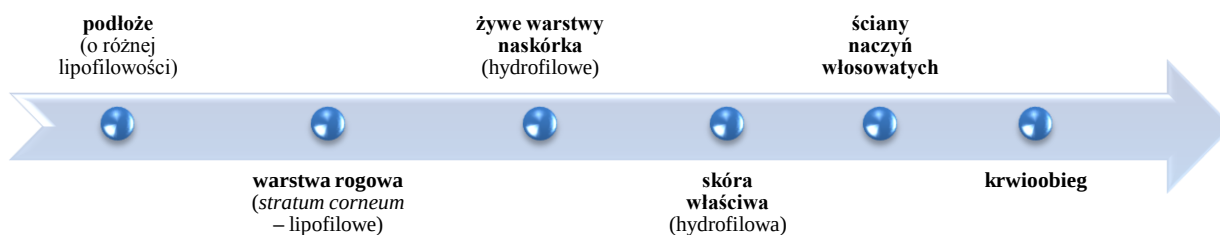
MIKROEMULSJE ▪ typu: O/W lub W/O ▪ wielkość cząstek zdyspergowanych: 10 - 100 nm ▪ termodynamicznie stabilne o niskiej lepkości ▪ napięcie międzyfazowe: około 0 mN/m ▪ wygląd: transparentny ▪ wykazują izotropię optyczną ▪ ułatwiają wnikanie substancji czynnej ▪ zawierają wysokie stężenie SPC (15-30% wag.)	MAKROEMULSJE ▪ tzw. emulsje klasyczne ▪ wielkość cząstek zdyspergowanych: powyżej 500 nm ▪ termodynamicznie niestabilne ▪ napięcie międzyfazowe: około 50 mN/m ▪ wygląd: mleczny ▪ nie wykazują izotropii optycznej
NANOEMULSJE ▪ tzw. miniemulsje albo submikroemulsje ▪ wielkość cząstek zdyspergowanych: 20 - 500 nm ▪ termodynamicznie niestabilne ▪ stabilność kinetyczna ▪ wygląd: transparentny ▪ wykazują izotropię optyczną	PODŁOŻA BEZWODNE ▪ są lipofilowe i okluzyjne ▪ potrafią zatrzymywać substancje lipofilowe (dyfundujące z podłoża) ▪ działają na zasadzie opatrunku okluzyjnego ▪ zwiększają stopień uwodnienia skóry, ułatwiając przenikanie cząsteczek hydrofilowych
NANOCZĄSTKI LIPIDOWE ▪ mogą transportować zarówno składniki hydrofilowe (stałe nanocząstki lipidowe), jak i lipofilowe (stałe nanocząstki lipidowe oraz nanostrukturalne nośniki lipidowe) ▪ znacząco ułatwiają przenikanie na skutek wnikania między korneocyty (podobnie jak liposomy) poprzez struktury cementu	ŻELE HYDROFILOWE ▪ tworzą na powierzchni skóry film okluzyjny ▪ zazwyczaj nie ułatwiają przenikania przez barierę skórną ▪ mogą zawierać etanol, który ułatwia przenikanie

Rysunek 5. Przykłady form fizykochemicznych podłoża, wpływające na absorpcję przezskórną [3, 11].

2.1.5. Drogi transportu przezskórnego

W latach 80-tych XX wieku, po raz pierwszy przedstawiono warstwę rogową jako membranę o charakterze lipofilowym, wykluczając jednocześnie możliwość dyfuzji związków zdysocjowanych przez tę warstwę. Jednak niedługo po tym, powstał pierwszy model kinetyczny skóry, który tłumaczył obecność dwóch możliwych dróg transportu: „drogi lipofilowej” – poprzez cement międzykomórkowy oraz „drogi hydrofilowej” – poprzez mikropory [11, 26].

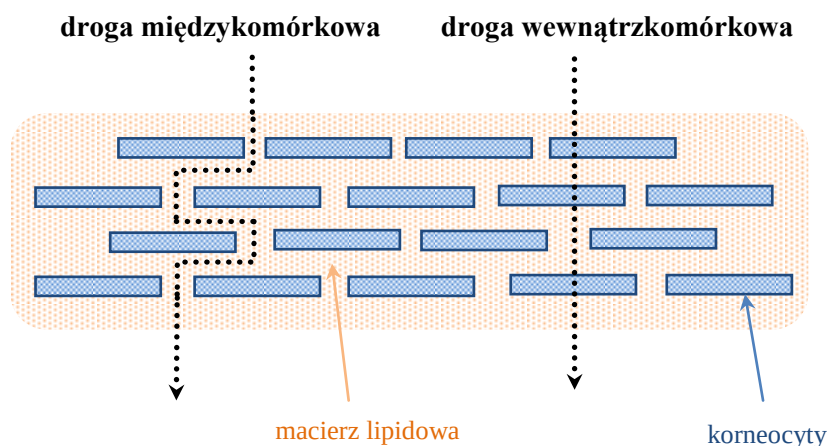
Obecnie uważa się, że absorpcja przez skórę odbywa się na zasadzie dyfuzji biernej (rys. 6). Proces ten polega na zasadzie wyrównywania stężeń i nie wymaga nakładu energii [2].



Rysunek 6. Schematyczna droga dyfuzji substancji aktywnej przez skórę [2].

Po przeniknięciu przez skórną barierę lipidową, cząsteczki mogą dyfundować (zgodnie z gradientem stężeń, co uzależnione jest jedynie od sił fizycznych: dyfuzji, osmozy i ich energii kinetycznej) przez uwodnione warstwy naskórka aż do skóry właściwej, w której zostają częściowo wchłaniane przez sieć naczyń włosowatych [25]. W rezultacie, substancja może przeniknąć do krążenia ogólnego, a następnie wywołać działanie ogólnoustrojowe. Warto zaznaczyć, że w kolejnych etapach dyfuzja może zachodzić również w tkance podskórnej oraz w tkankach położonych jeszcze głębiej [3].

Dyfuzja substancji aktywnych przez skórę może zachodzić na dwa sposoby: drogą wewnątrzkomórkową (intercelularną) lub międzykomórkową (transcelularną) [2], co zostało schematycznie przedstawione na rysunku 7.



Rysunek 7. Drogi transportu przez skórę [11].

Przenikanie wewnątrzkomórkowe, zwane niekiedy również przenikaniem przezkomórkowym, jest bezpośrednią a zarazem najczęstszą drogą transportu dla cząsteczek o niewielkich rozmiarach. Droga ta przebiega przez korneosomy (przekształcone desmosomy), tworzące między komórkami mostki. Z kolei przenikanie międzykomórkowe zachodzi krętą drogą lipidowego cementu międzykomórkowego, którą najczęściej „podążają” wszystkie cząsteczki amfifilowe lub lipofilowe [11]. Badania naukowe potwierdziły,

że cząsteczki polarne nie mogą przenikać przez skórę poprzez drogę międzykomórkową, podczas gdy cząsteczki niepolarne, których masa cząsteczkowa jest mniejsza niż < 500 Da i $\log P = 1 - 4$ j.u., mogą z łatwością dyfundować przez skórę [27, 28].

Wśród dróg transportu przez przydatki skórne można wyróżnić trzy drogi przenikania [3], przez:

- mieszki włosowe (tzw. przemieszkowe) – umożliwiające docieranie cząsteczek substancji aktywnej do warstwy siateczkowej skóry,
- gruczoły łojowe – utrudniające przenikanie z powodu zarówno właściwości do wychwytywania substancji lipofilowych, jak i z uwagi na łój skórny, który wypływa z gruczołu w kierunku przeciwnym do substancji egzogennych,
- gruczoły potowe – a dokładniej przez kanał potowy gruczołów ekrynowych (przenikanie rzadko spotykane).

2.1.5.1. *Kinetyka transportu*

Analiza kinetyki transportu cząsteczki przenikającej przez skórę wskazuje na osiągnięcie wartości stałej przez przepływ po tzw. okresie utajenia. Czas ten jest zmienny dla różnych substancji i jest ściśle skorelowany ze współczynnikiem dyfuzji. Z kolei dyfuzja substancji aktywnej jest proporcjonalna do jej różnicy stężeń, które występują po obu stronach błony półprzepuszczalnej [3]. Tym samym, proces transportu przez skórę można określić za pomocą I prawa dyfuzji Ficka [3, 11] (równanie 1):

$$J = \frac{DK(c_V - c_R)}{h} = k_p(c_V - c_R) \quad (1)$$

gdzie:

J – przepływ składnika aktywnego przez skórę [μg lub cm^2/h],

K – współczynnik podziału *stratum corneum*/podłoże,

$(c_V - c_R)$ – różnica stężeń po obu stronach błony półprzepuszczalnej (składnika aktywnego pomiędzy nośnikiem i *stratum corneum*),

k_p – współczynnik przenikania składnika aktywnego [cm/h],

D – współczynnik dyfuzji [cm^2/s],

$$D = \frac{h^2}{6T_L} \quad (2)$$

h – grubość warstwy rogowej (wyrażany w μm),

T_L – czas utajenia (okres opóźnienia).

Na podstawie równania 1 można wywnioskować, że na szybkość dyfuzji wpływa stężenie aplikowanej na skórę substancji aktywnej (im wyższe stężenie, tym dyfuzja zachodzi szybciej). Dzieje się tak na skutek przepływu substancji z nośnika do skóry (J), będącym wprost proporcjonalnym do gradientu stężeń ($c_V - c_R$). Ponadto, współczynnik przenikania (k_p), obrazujący tempo dyfuzji, nie zależy od stężenia, a m.in. od grubości membrany (h), tj. szybsze przenikanie zachodzi przez mniejszą grubość i odwrotnie. Natomiast wysoka wartość współczynnika podziału (K), może wskazywać na dobre powinowactwo do *stratum corneum*. Ruchliwość przenikającej substancji przez różne warstwy skóry, określona mianem

współczynnika dyfuzji (D), jest odwrotnie proporcjonalna do masy cząsteczkowej dyfundującej substancji [11]. Zatem cząsteczki o dużym rozmiarze i wysokiej masie będą przenikały znacznie wolniej. Według doniesień naukowych szacuje się, że średnia wartość przenikania może być zbliżona do 10^{-9} cm²/s w *stratum corneum* oraz 10^{-6} cm²/s w skórze właściwej [3]. Oznacza to, że warstwa rogowa jest 1 000 razy trudniejsza do przeniknięcia w porównaniu z warstwami głębszymi. Podsumowując, szybkość przenikania przez skórę jest wypadkową kilku równoczesnych procesów wymienionych na rysunku 8.



Rysunek 8. Szybkość przenikania przez skórę w zależności od różnych procesów [3].

2.1.6. Metody oceny szybkości przenikania substancji aktywnej przez skórę

Umiejętność oceny szybkości przenikania substancji aktywnej przez skórę ma istotne znaczenie w przypadku jej stosowania miejscowego. W przypadku terapii służy bowiem do określenia miejsca działania (np. naskórek, skóra właściwa) oraz procenta wagowego dyfundującej substancji w stosunku do podanej ilości. Z kolei w kosmetologii najistotniejsze jest poznanie ilości danej substancji, która dociera do poszczególnych warstw skóry, aby uniknąć jej ewentualnego przedostania się do krążenia ogólnego [3]. W celu oznaczania przenikalności przez skórę powstały liczne modele matematyczne oraz różne metody empiryczne, służące do przewidywania ilości zaabsorbowanej substancji aktywnej [29, 30].

Systemy komór dyfuzyjnych są obecnie najpopularniejszymi urządzeniami stosowanymi do określania szybkości przenikania substancji aktywnych przez skórę. Wśród najczęściej stosowanych wymienia się:

- a. dyfuzyjną komorę statyczną, znaną jako **komora Franza**,
- b. dyfuzyjną komorę przepływową, tzw. **komorę Bronaugh**.

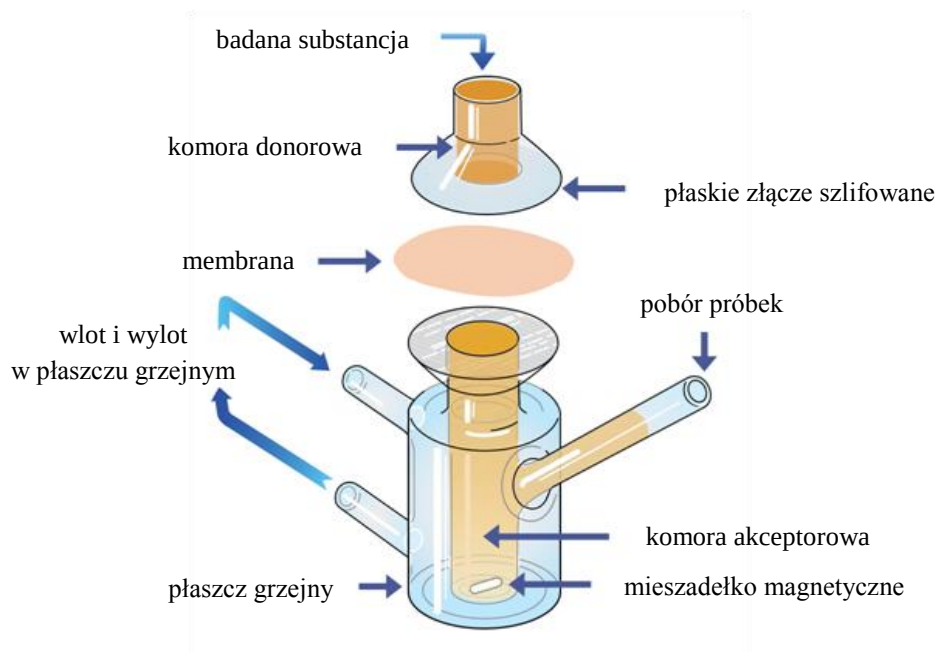
Zasada działania obu systemów polega na określaniu stopnia dyfuzji składnika aktywnego przez błonę półprzepuszczalną, tzw. membranę, którą stanowić może: skóra ludzka (np. pobrana śródoperacyjnie), skóra zwierzęca (np. skóra z ucha świnińskiego) lub skóra sztuczna [31]. W przypadku obu systemów dyfuzyjnych, próbki pobierane są w określonych odstępach czasu z komory akceptorowej, wypełnionej buforem fizjologicznym o pH = 7,4. Istnieją dwie możliwości dozowania substancji aktywnej [2]:

- sposobem ograniczonym: $< 10 \text{ ml/cm}^3$ lub 10 mg/cm^3 ,
- sposobem nieograniczonym: $> 10 \text{ } \mu\text{l/cm}^3$ lub 10 mg/cm^3 , w którym aplikowana jest maksymalna dawka substancji, co zapewnia powtarzalność otrzymanych wyników [31].

2.1.6.1. Komora Franza i test PAMPA

Pojedyncza komora Franza złożona jest z części: donorowej i akceptorowej oddzielonych membraną (rys. 9) [32]. W komorze donorowej znajduje się badana substancja, natomiast w komorze akceptorowej mieści się roztwór mieszany z dużą intensywnością za pomocą mieszadła magnetycznego. Kinetykę przenikania badanych substancji aktywnych określa się za pomocą analizy ich zawartości w roztworze pobieranym poprzez boczne ramię komory za pomocą strzykawki. Następnie pobraną ilość płynu akceptorowego uzupełnia się świeżą porcją buforu [31, 33].

Komorę Franza umieszcza się w tzw. bemarze wodnym (z franc. *bain marie*) w temperaturze 37°C , dzięki czemu możliwe jest utrzymanie temperatury ok. 32°C na poziomie skóry [3]. Ponadto, skóra lub modelowa membrana w systemie komór statycznych, nie jest chroniona przed działaniem czynników zewnętrznych, stanowiąc tym samym rodzaj tzw. powierzchni otwartej, umożliwiającą bezpośrednie nanoszenie cienkich warstw preparatów kosmetycznych lub farmaceutycznych [33]. Tym samym, umożliwia to tworzenie warstw okluzyjnych na powierzchni membrany, podobnych do tych, które powstają na skórze.



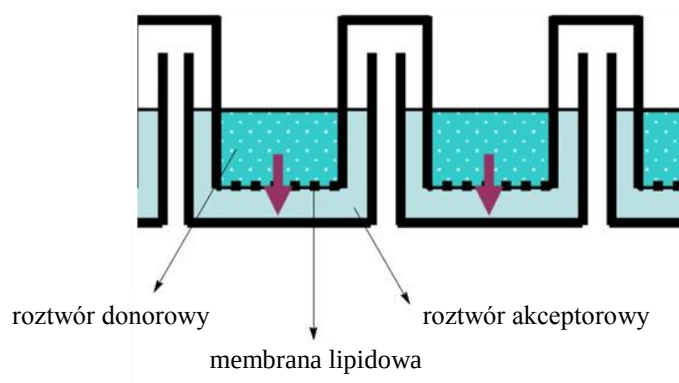
Rysunek 9. Schematycznie przedstawiona pojedyncza komora dyfuzyjna Franza [34].

Stosowanie komór dyfuzyjnych Franza zapewnia szybką i precyzyjną analizę szybkości przenikania substancji aktywnej. Ewentualnym problemem może okazać się słaba rozpuszczalność niektórych substancji aktywnych w środowisku wodnym. W takiej sytuacji, zaleca się zastosowanie związków organicznych (np. niejonowe środki powierzchniowo czynne, białka, cyklodekstryny), które przyczynią się do wzrostu rozpuszczalności, ale

jednocześnie mogą niekorzystnie wpłynąć na właściwości membrany – zwłaszcza te dotyczące jej przepuszczalności [2].

W późniejszych latach, na podstawie komór dyfuzyjnych Franza został opracowany również test PAMPA (ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* – dosł. równoległy test przepuszczalności sztucznej błony) [35], składający się z dwóch podstawowych elementów (rys. 10), które po połączeniu umieszcza się na wytrząsarce, a po upływie określonego czasu można analizować znajdujące się w nich roztwory [36]. Są to:

- płyta podstawowa – zawierająca 72 zagłębienia napelniane roztworem nadawczym,
- płytka zamykająca – dopasowana do płyty podstawowej oraz także wyposażona w 72 zagłębienia, na których dnie umieszczona jest membrana lipidowa, o strukturze podobnej do cementu międzykomórkowego (zawiera ceramidy, wolne kwasy tłuszczowe, sterole) [37].

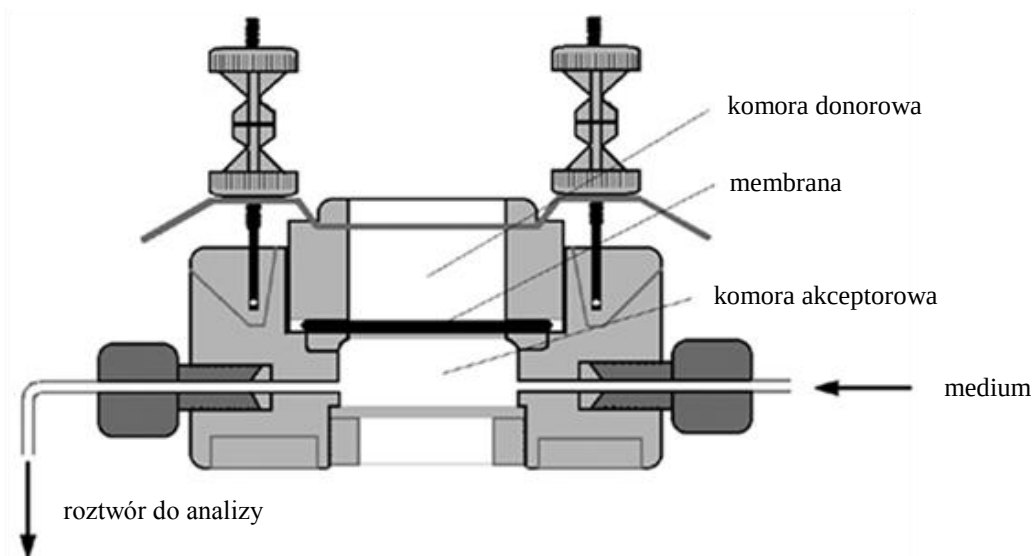


Rysunek 10. Schemat urządzenia do oceny transportu przezskórnego metodą PAMPA [38].

Dotychczas technika PAMPA znalazła pomyślne zastosowanie w modelowaniu przenikania substancji aktywnych w układzie pokarmowym oraz w barierze krew – mózg (ang. *Blood-Brain Barrier*, BBB) [36], jak również w badaniu absorpcji przezskórnej [33]. Warto zaznaczyć, że otrzymane tą metodą wyniki pozostawały w całkowitej zgodności z wynikami uzyskiwanymi przy wykorzystaniu komór dyfuzyjnych Franza. Test PAMPA zalecany jest głównie do badań wstępnych (przesiewowych). Do największych zalet tej metody zaliczana jest prostota wykonywania oraz powtarzalność pomiarów, natomiast mogą pojawić się trudności w uzyskaniu wystarczającej ilości danych, niezbędnych do określenia pełnej kinetyki przenikania [33].

2.1.6.2. Komora Bronaugh

Zasada działania dyfuzyjnej komory przepływowej Bronaugh polega na nieustannym przepływie buforu przez komorę akceptorową [39]. Technika ta umożliwia badanie dużej ilości związków, po uprzednim ustaleniu optymalnej szybkości przepływu [31]. Budowa pojedynczej komory Bronaugh została przedstawiona na rysunku 11.



Rysunek 11. Schematyczna budowa dyfuzyjnej komory przepływowej Bronaugh [2].

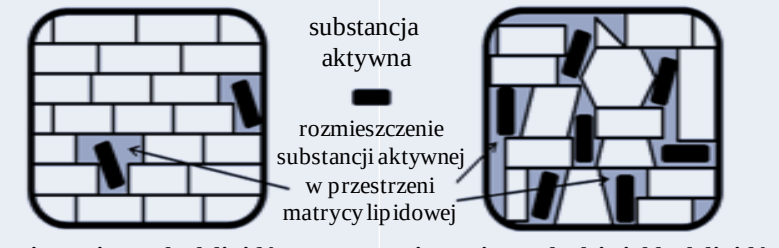
Przedstawiony typ komór dyfuzyjnych stosuje się najczęściej w przypadku wysokiej absorpcji substancji aktywnej, dla której rozpuszczalność w fazie akceptorowej jest niska [40]. W celu prawidłowego przeprowadzenia analizy absorpcji, należy wcześniej określić minimalną szybkość przepływu fazy [41]. Dzięki temu, zostanie zapewniona odpowiednia intensywność mieszania, jak również nieustanny przepływ związku przez komorę [2].

Dotychczas zbadano, że na ogół absorpcja nie zależy od zwiększonej szybkości przepływu [41]. Wyjątek mogą stanowić związki słabo rozpuszczalne. Niemniej jednak, z powodu ciągłej wymiany fizjologicznego roztworu akceptorowego, przydatność skóry do użycia jest w tym przypadku znacznie dłuższa [40, 42]. Warto również zaznaczyć, że nieustanny przepływ płynu, zawierającego donor, może spowodować usunięcie ze skóry substancji hydrofobowych przez fazę akceptorową. W konsekwencji przepuszczalność skóry zostanie zwiększona na skutek zmiany jej właściwości [2].

2.2. Nowoczesne nośniki substancji aktywnych

Nanocząstki lipidowe są obecnie jednymi z najnowszych i najbardziej skutecznych nośników substancji aktywnych na rynku kosmetyczno-farmaceutycznym [43-45]. Ich głównym zadaniem jest zwiększenie biodostępności inkorporowanego leku [46, 47]. Wśród nanocząstek lipidowych rozróżnia się tzw. I generację, którą stanowią stałe nanocząstki lipidowe (ang. *Solid Lipid Nanoparticles*, SLN), zbudowane wyłącznie z tłuszczów stałych [48, 49], jak również tzw. II generację, do której należą nanostrukturalne nośniki lipidowe (ang. *Nanostructured Lipid Carriers*, NLC), w których budowie obecne są nie tylko tłuszcze stałe, ale i tłuszcze ciekłe (oleje). Obie generacje nanocząstek lipidowych złożone są z dwóch niemieszalnych faz: lipidowej i wodnej, dlatego też do ich syntezy konieczne jest zastosowanie substancji powierzchniowo czynnych [50, 51]. Kolejną różnicą w budowie obu nanostruktur jest także odmienne rozmieszczenie substancji aktywnej w przestrzeni matrycy lipidowej [52, 53] (tab. 5).

Tabela 5. Rodzaje nanocząstek lipidowych [54].

Rodzaje nanocząstek	STAŁE NANOCZĄSTKI LIPIDOWE	NANOSTRUKTURALNE NOŚNIKI LIPIDOWE
Nazwa w języku angielskim	solid lipid nanoparticles	nanostructured lipid carriers
Skrót	SLN	NLC
Budowa	tłuszcze stałe	tłuszcze stałe i ciekłe (oleje)
Schemat budowy		

Wśród właściwości, jakie wykazują nanocząstki lipidowe warto wymienić m.in. zdolności adhezyjne prowadzące do wytworzenia na skórze filmu hydrofobowego [55], który ogranicza przeznaskórkową utratę wody [56], a także zdolności do modyfikowanego uwalniania [57]. Ponadto, nanocząstki lipidowe są stosunkowo łatwe do otrzymania i wprowadzenia na rynek, z uwagi na dużą dostępność lipidów [58]. Jednak do największych zalet tych innowacyjnych nośników zaliczana jest ich nietoksyczność, która jest efektem biodegradowalnej struktury lipidowej [56]. Obecnie zarówno w przemyśle kosmetycznym jak i farmaceutycznym, nanocząstki lipidowe stosowane są głównie jako nośniki [59]: filtrów przeciwsłonecznych [60-62], substancji aktywnych w kosmetykach [48], substancji zapachowych [63, 64] czy substancji aktywnych w farmaceutykach [65].

2.2.1. Charakterystyka stałych nanocząstek lipidowych (SLN)

Stałe nanocząstki lipidowe (SLN) to koloidalne nośniki lipidowe, pozostające w formie stałej w temperaturze pokojowej i w temperaturze ciała. Pierwsze prace nad otrzymywaniem SLN zaczęły się ukazywać w latach 90-tych XX wieku [66, 67], w odpowiedzi na inne powszechnie stosowane wówczas nośniki substancji leczniczych, do których należały głównie liposomy, ale także emulsje typu o/w, mikroemulsje czy nanocząstki polimerowe [68]. Niska stabilność wymienionych układów, znacząco utrudniała sformułowanie ostatecznej postaci leku. Dzięki dynamicznemu rozwojowi nanotechnologii, w 1991 r. pojawiły się pierwsze nanocząstki, oparte na budowie stałych lipidów, z czasem udoskonalone poprzez dodanie do ich struktury także lipidów ciekłych. Tym samym, powstała tzw. „pierwsza generacja” stałych nanocząstek lipidowych oraz udoskonalona tzw. „druga generacja” nanostrukturalnych nośników lipidowych.

Dzięki niewielkim rozmiarom i właściwościom aplikacyjnym [69], nanocząstki lipidowe stały się częstym obiektem badań nad modyfikowanym uwalnianiem leków [70].

Ponadto, oprócz wielu potencjalnych zastosowań w farmacji i medycynie, zwłaszcza jako nośniki leków, SLN wzbudziły szczególne zainteresowanie przemysłu kosmetycznego [59], gdzie z uwagi na możliwość przyłączania substancji aktywnych do lipidowych matryc oraz łatwość wprowadzenia na rynek [48], mogą one pełnić rolę nośników filtrów przeciwsłonecznych, składników aktywnych w kremach czy związków zapachowych w perfumach.

Stale nanocząstki lipidowe są sferycznymi cząstkami o wielkości w przedziale od minimum 40 do maksimum 1 000 nm, zbudowanymi z lipidów, które pozostają w formie stałej zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w temperaturze ciała oraz są rozproszone w fazie wodnej, zawierającej emulgatory. Skład pojedynczej struktury SLN stanowi inkorporowana substancja aktywna wraz z lipidem stałym, a także emulgator i woda (rys. 12). Do syntezy zawiesiny nanocząstek lipidowych wykorzystywane są następujące grupy lipidów [71]:

- triacyloglicerydy (tristearynian glicerolu, tripalmitynian glicerolu),
- częściowe glicerydy (monostearynian glicerolu, dibehenianglicerolu),
- kwasy tłuszczowe (stearynowy, palmitynowy),
- steroidy (cholesterol),
- woski (palmitynian cetylu).

Zawartość lipidów w zawiesinie waha się między 0,1 a 30,0% wag., jednakże wzrost stężenia lipidów powyżej 5,0 – 10,0% wag. powoduje wzrost wielkości samych cząstek. Do matrycy lipidowej możliwe jest przyłączenie substancji aktywnych poprzez rozpuszczenie lub zawieszenie [46]. Jedną z zalet SLN jest pozyskiwanie matrycy lipidowej z lipidów fizjologicznych, co wpływa na zmniejszenie ryzyka wystąpienia reakcji niepożądanych.



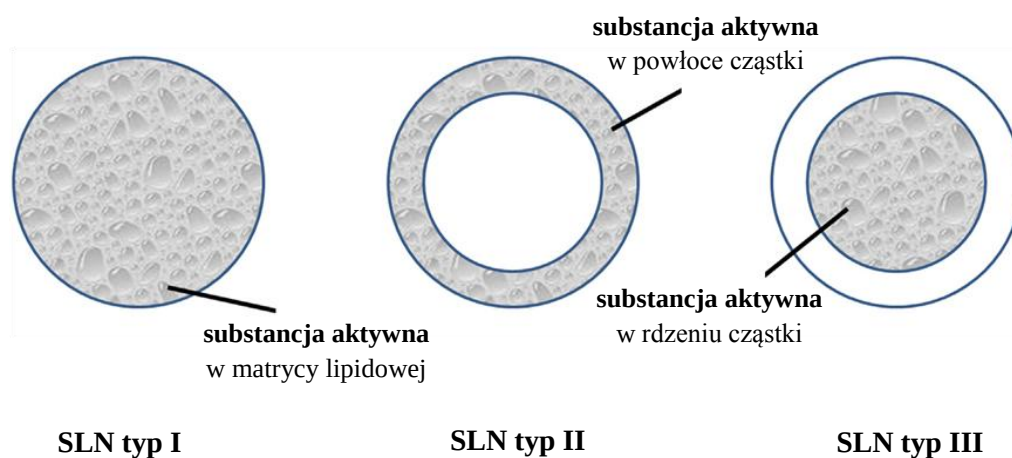
Rysunek 12. Schemat budowy SLN. Opracowanie na podstawie [68].

Dobór emulgatora ogranicza sposób przyszłego wykorzystania SLN i jest on dużo bardziej znaczący w przypadku podania pozajelitowego [66]. Zawartość emulgatorów stosowanych do syntezy SLN powinna wynosić 0,5 – 5,0% wag., przy czym możliwe jest także użycie kilku emulgatorów jednocześnie w celu ograniczenia wystąpienia zjawiska agregacji cząstek [46]. Spośród najczęściej wykorzystywanych do syntezy SLN emulgatorów [72] w produktach przeznaczonych do pielęgnacji skóry najczęściej wymienia się m.in.:

- Poloxamer 188 (liniowy trójblokowy polimer polioksyetyleno-polioksypropyleno-polioksyetylen) – znany też pod nazwami handlowymi jako Synperonic[®] PE/P68, Pluronic[®] F68 lub Lutrol[®] F68, Kolliphor[®] P188,
- Polisorbat (estry kwasów tłuszczowych i polioksyetylenosorbitolu) – pochodna sorbitolu zestryfikowana kwasami tłuszczowymi o nazwach firmowych Alkest[®], Canarcel[®] oraz Tween[®],
- Tego[®] Care 450 (distearynian poliglicerylo-3-metyloglukozy),
- Miranol[®] Ultra C32 (kokoamfooctan sodu),
- Tyloxapol (niejonowy polimer alkoholu alkiloarylowego i alkoholu polieterowego),

- lecytyna,
- estry kwasów tłuszczowych,
- pochodne sacharozy.

Wszystkie lipidy i surfaktanty, które znalazły się na liście GRAS (ang. *Generally Recognised As Safe* – uważane za bezpieczne), zostały uznane za substancje biokompatybilne i biodegradowalne, z uwagi na przynależność do lipidów fizjologicznych, naturalnie występujących w organizmie [73, 74]. Tym samym, utworzona w wyniku syntezy SLN biodegradowalna matryca lipidowa ulega enzymatycznemu rozkładowi do składników naturalnie występujących w ludzkim organizmie [74]. Dzięki temu SLN mogą być z powodzeniem stosowane nie tylko na skórę [66], ale także w wielu innych miejscach docelowych poprzez systemy dostarczania leków (ang. *Drug Delivery System*, DDS). Stałe nanocząstki lipidowe mogą pełnić rolę nośników dla wielu substancji aktywnych i leków, które zostają rozpuszczone bądź zawieszone w cząstce [75]. Wysoce uporządkowana struktura krystaliczna SLN może być przeszkodą w inkorporacji dużych ilości leku. Utrzymujący się początkowo wysoki stopień enkapsulacji może z czasem ulec zmniejszeniu na skutek wypychania substancji czynnej z cząstki. Proces ten znacząco przyspiesza zarówno zmiana temperatury, jak i proces odparowywania wody z zawiesiny. Przekształceniu ulegają budujące matrycę lipidy. Utworzona zostaje bardziej stabilna forma o niższej energii [76]. W zależności od struktury chemicznej wprowadzonego składnika aktywnego, jak również metody syntezy, wyróżnia się trzy typy SLN (rys. 13) [56].



Rysunek 13. Rozmieszczenie substancji aktywnej w nanocząstce lipidowej, w zależności od typu SLN [37].

Inkorporowane substancje mogą być włączone pomiędzy łańcuchy kwasów tłuszczowych, bądź pomiędzy warstwy lipidowe, a ich ostateczna lokalizacja ma wpływ na ich dalsze uwalnianie [49]. Typ I można otrzymać metodą homogenizacji na zimno. Tak powstały SLN odznacza się równomiernym rozkładem składnika aktywnego w całej objętości matrycy lipidowej. Z kolei typ II charakteryzuje się obecnością substancji aktywnej na powłoce nanocząstki, warunkując natychmiastowe uwalnianie leku (ang. *burst release*). Natomiast typ III SLN cechuje obecność substancji aktywnej w rdzeniu nanocząstki [56, 77, 78].

2.2.2. Charakterystyka nanostrukturalnych nośników lipidowych (NLC)

Drugi rodzaj nanocząstek lipidowych stanowią nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC), posiadające zdolność do zwiększania skuteczności przenikania transportowanych leków w głąb skóry. Nośniki te zwiększają rozpuszczalność substancji aktywnych oraz poprawiają ich biodostępność [79]. W odróżnieniu od SLN, NLC cechuje obecność w budowie nie tylko tłuszczów stałych, ale także ciekłych (olejów) (rys. 14). Z uwagi na fakt, że rozpuszczalność lipofilowych składników aktywnych jest znacznie wyższa w olejach niż w tłuszczach stałych, NLC posiadają większe zdolności transportowe. Mieszanka ciekłych i stałych tłuszczów prowadzi do utworzenia mniej uporządkowanej struktury wewnętrznej, co umożliwia lepsze wiązanie substancji aktywnej z matrycą, wpływając jednocześnie na większą trwałość kompleksu i prowadząc do braku lub jedynie niewielkiej utraty składnika aktywnego w trakcie jego przechowywania [68].



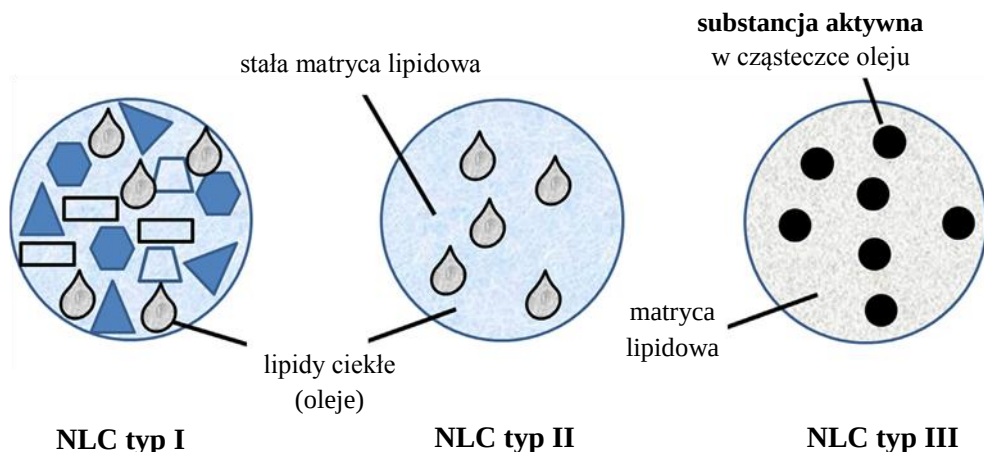
Rysunek 14. Schemat budowy NLC. Opracowanie na podstawie [68].

Podobnie jak w SLN, inkorporowana substancja aktywna bądź lek mogą być umieszczone między warstwami lipidowymi i/bądź łańcuchami kwasów tłuszczowych [80]. NLC zostały opracowane w celu przezwyciężenia niektórych potencjalnych ograniczeń w stosowaniu SLN, jednak nie mogą być one stosowane do enkapsulacji substancji aktywnych i leków o charakterze hydrofilowym [81]. NLC wykazują większą zdolność transportu substancji czynnych, niższą zawartość wody oraz minimalizują bądź całkowicie eliminują potencjalne uwalnianie się substancji czynnych w trakcie przechowywania [82, 83]. Ponadto, te nanostrukturalne nośniki zwiększają przenikalność transportowanych substancji przez skórę. Z uwagi na obecne w budowie nanocząstek oleje, NLC umożliwiają zwiększenie rozpuszczalności substancji aktywnych, wpływając tym samym na ich większą biodostępność [79]. Badania naukowe dowiodły, że zmiany w stężeniach stałego i ciekłego lipidu, wchodzących w struktury NLC, wpływają na uwalnianie, aktywność farmakologiczną i przenikanie inkorporowanej substancji aktywnej lub leku [84].

Nanostrukturalne nośniki lipidowe zbudowane są z biodegradowalnej i biokompatybilnej matrycy lipidowej, której wielkość nie przekracza 200 nm i która podobnie jak w SLN jest stała zarówno w temperaturze ciała, jak i w temperaturze pokojowej [79]. Budowa wewnętrznej struktury NLC różni się od budowy SLN stopniem uporządkowania, a tym samym obecnością tłuszczów ciekłych (olejów) w budowie matrycy nanostrukturalnych nośników. Mieszanka tłuszczów stałych i ciekłych prowadzi do otrzymania mniej uporządkowanej struktury wewnętrznej cząstki [80]. Lipidowa matryca NLC posiada również niższą temperaturę topnienia w stosunku do matrycy SLN. Struktura wewnętrzna nie ma uporządkowanej struktury kryształu, natomiast wykazuje budowę amorficzną oraz występuje w formie niedoskonałego kryształu. Nanostrukturalne nośniki lipidowe mogą występować w formie wielokrotnych systemów takich jak zawiesina olej/stały

lipid/woda, powstających poprzez zmieszanie dużych ilości oleju ze stałym lipidem i poddanych wysokociśnieniowej homogenizacji na gorąco.

Nanostrukturalne nośniki lipidowe, podobnie jak w przypadku pierwszej generacji nanocząstek, mogą występować w trzech różnych typach (rys. 15) [56], będących efektem licznych badań naukowców nad zwiększeniem możliwości transportowania inkorporowanych substancji.



Rysunek 15. Typy NLC: I – model nieuporządkowanego kryształu, II – model amorficzny, III – model złożony [4].

Typ I NLC charakteryzuje się wysoce nieuporządkowaną strukturą, która powstaje przez zmieszanie stałych lipidów z niewielką ilością oleju, tworząc tzw. model nieuporządkowanego kryształu, który cechuje najwyższa pojemność ładunkowa. Badania naukowe dowiodły, że najwyższą pojemność ładunkową otrzymuje się mieszając lipidy stałe z lipidami ciekłymi [70]. Typ II NLC, nazywany modelem amorficznym, pozwala zminimalizować utratę substancji czynnej podczas przechowywania, ponieważ substancje o większej rozpuszczalności w lipidach ciekłych zostają wcześniej otoczone lipidami stałymi, zapewniającymi dodatkową ochronę przed degradacją. Z kolei typ III NLC, określany również mianem modelu złożonego (lub wielokrotnego), został stworzony na wzór emulsji wielokrotnej typu W/O/W i jest wytwarzany na skutek połączenia stałego lipidu z maksymalną ilością ciekłych lipidów. Zwiększa to pojemność NLC dla aktywnych składników [54, 85].

2.2.3. Oleje roślinne, stanowiące naturalną matrycę lipidową, stosowane w syntezie NLC

Ze względu na swoje naturalne pochodzenie, zawartość cennych lipidów oraz szereg korzystnych właściwości leczniczo-pielęgnacyjnych, oleje roślinne cieszą się nieustannie dużym zainteresowaniem w przemyśle kosmetyczno-farmaceutycznym. Związki te stanowią bogate źródło kwasów tłuszczowych, które tworzą na skórze warstwę okluzyjną, hamując TEWL [9]. Dzięki temu, przyczyniają się one do utrzymania prawidłowego nawilżenia w naskórku, ale także regenerują uszkodzoną barierę lipidową, zmniejszając stany zapalne i odpowiadają za właściwą strukturę cementu międzykomórkowego skóry [23].

Oleje roślinne można sklasyfikować według kilku zasad, np. ze względu na obecność reszt różnych kwasów tłuszczowych wyróżnia się oleje typu oleinowego, linolowego i linolenowego [13]. Powszechnie stosowany jest także podział ze względu na przenikalność przez warstwę rogową oraz na zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (schnące, półschnące i nieschnące). Oleje mogą być również izolowane z różnych części roślin, dlatego też można zastosować klasyfikację ze względu na ich pochodzenie [9, 13]. W dalszej części pracy doktorskiej zostały opisane oleje stosowane podczas syntezy NLC, tj.: olej z nasion Meadowfoam oraz olej z nasion Marula.

2.2.3.1. Olej z nasion Meadowfoam

Wśród licznych olejów zimnotłoczonych, swoim składem wyróżnia się olej Meadowfoam (ang. *Meadowfoam Seed Oil*, MSO), występujący pod nazwą INCI (ang. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*): *Limnanthes alba* (*Meadowfoam*) *Seed Oil*. Określenie „olej z Perły Prerii” nawiązuje do pochodzenia rośliny, którymi są południowe tereny Oregonu i północnej Kalifornii (Ameryka Północna). Tłumaczenie angielskich słów *meadow-foam* (ang. *meadow* – łąka; *foam* – piana) oznacza dosłownie „łąkową pianę”, co ściśle wiąże się z morfologią kwiatów *L. alba* (tab. 6), które podczas ich pełnego rozkwitu, wyglądem przypominają unoszącą się nad łąką białą piankę [86, 87].

Rzadko spotykana kompozycja długołańcuchowych (C20-C22) kwasów tłuszczowych (98% wag.) oraz obecność naturalnych antyoksydantów (m.in. witamina A i E) odpowiada za pełną biogodność oleju ze strukturami lipidowymi skóry oraz za poprawę jej parametrów biomechanicznych [86, 88]. Ponadto, wysoka stabilność termiczna oleju zapewnia zwiększenie trwałości zawierających go formułacji [89]. Niewielkie nasiona *Limnanthes alba* zawierają około 20 – 30% wag. czystego oleju, z których, w wyniku tłoczenia na zimno pozyskiwany jest przezroczysty produkt o ciekłej konsystencji i bursztynowo-złotej barwie [90].

Wśród kwasów tłuszczowych zdecydowaną większość stanowią jednonienasycone kwasy tłuszczowe, takie jak m.in. kwas gondolowy (C20:1; ω -9) oraz kwas erukowy (C22:1; ω -9), których obecność zapewnia MSO wysoką odporność na utlenianie [13]. W tabeli 6 przedstawiono procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju Meadowfoam.

Tabela 6. Morfologia kwiatów oraz skład kwasów tłuszczowych MSO [13, 91].

Kwiaty <i>Limnanthes alba</i> [92] w okresie pełnego rozkwitu [93]	Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna	Symbol numeryczny	Zawartość % wag. w MSO
	kwas gondolowy	kwas (Z)-11- ikozenowy	C20:1	63
	kwas erukowy	kwas (Z)-13- dokozenowy	C22:1	16
	–	kwas (Z)-5- dokozenowy	C22:1	17
	–	kwas (Z,Z)- 5,13- dokozydienowy	C22:2	4

2.2.3.2. Olej z nasion Marula

Olej Marula (INCI: *Sclerocarya Birrea (Marula) Seed Oil*) otrzymywany jest w procesie tłoczenia na zimno owoców z drzewa Marula (*Sclerocarya birrea*), występującego jedynie na terenach południowej Afryki (tab. 7). Owoce tego drzewa są tamtejszym przysmakiem, a z ich bogatych w białko nasion wyłaczany jest olej o licznych właściwościach kosmetycznych [94].

Olej Marula silnie nawilża i oczyszcza skórę oraz zmiękcza i wygładza naskórek [95]. W dodatku, łagodzi podrażnienia, redukuje zaczerwienienia, a także przywraca naturalną barierę ochronną skóry. Olej ten nawilża, chroni i nabłyszcza również włosy. Ponadto jest dobrze przyswajalny przez skórę, spłyca zmarszczki, redukuje cellulit, rozjaśnia cerę i niweluje brunatne plamy na skórze oraz potrafi wiązać wolne rodniki głównie za sprawą obecności w swym składzie kwasu oleinowego (silny przeciwutleniacz) [94, 96].

Świeżo tłoczony olej Marula odznacza się przejrzystą, żółto-brązową barwą oraz delikatnym orzechowym zapachem. Skład oleju stanowią przede wszystkim jednonienasycone kwasy tłuszczowe, zapewniające olejowi wysoką stabilność oksydacyjną, porównywalną do oliwy z oliwek [97]. W skład oleju wchodzi także tokoferole, których ilość szacuje się na około 14 mg/100 g oleju oraz sterole, których zawartość wynosi 287 mg/100 g oleju [96].

Tabela 7. Owoce Marula oraz skład kwasów tłuszczowych oleju [94].

Owoce i drzewo Marula [98]	Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna	Symbol numeryczny	Zawartość % wag. w oleju
	kwas palmitynowy	kwas heksadekanowy	C16:0	9-12
	kwas stearynowy	kwas oktadekanowy	C18:0	5-8
	kwas oleinowy	kwas (Z)-9-oktadekanoowy	C18:1	70-78
	kwas linolowy	kwas (Z,Z)-9,12-oktadekadienowy	C18:2	4-7
	kwas α-linolenowy	kwas (Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienowy	C18:3	0,1-0,7
	kwas arachidonowy	kwas eikozanowy	C20:0	0,3-0,7

2.2.3.3. Ocena działania olejów roślinnych na skórę z wykorzystaniem testów *in vivo*

Mianem testów *in vivo* (tj. z aplikacją na skórę człowieka) określa się badania aplikacyjno-aparaturowe przeprowadzane z wykorzystaniem testów naskórkowych oraz nieinwazyjnej aparatury pomiarowej. Za pomocą testów aplikacyjnych możliwa jest ocena działania pielęgnacyjnego/leczniczego badanej substancji aktywnej na skórę człowieka [24].

W zależności od rodzaju analizowanego składnika, okres trwania testów *in vivo* może wynosić od kilku godzin do kilku tygodni. Uczestnikiem badań (probandem) staje się każdy zdrowy ochotnik, który świadomie i dobrowolnie wyrazi zgodę na udział w badaniu. Następnie probanci dobierani są pod kątem wieku, płci lub też innych wymogów w zależności od celu badania [99]. Testy *in vivo* poprzedzane są na ogół wywiadem dermatologicznym dotyczącym zwłaszcza stanu skóry pacjenta i jej skłonnościom do podrażnień. Ponadto pacjent wypełnia formularz, odnoszący się m.in. do stylu życia, ogólnego stanu zdrowia oraz sposobów pielęgnacji skóry [100, 101]. Przed rozpoczęciem testów konieczne jest podpisanie przez probantów świadomej zgody na udział w badaniu. Z kolei po zakończonych testach, probanci poddawani są zazwyczaj ocenie klinicznej, dotyczącej oceny stanu skóry pod kątem pojawienia się ewentualnych zmian o charakterze złuszczeniowym lub rumieniowym. Oprócz tego, przeprowadza się pomiar właściwości biofizycznych skóry za pomocą odpowiednich urządzeń pomiarowych [102, 103].

Badania aparaturowe, będące nieinwazyjnymi metodami badawczymi, stanowią uzupełnienie badań aplikacyjnych [24] i są przeprowadzane przy użyciu specjalistycznych sond do pomiarów takich parametrów jak: poziom nawilżenia i elastyczności skóry oraz ilość przesnaskórkowej utraty wody [100, 104].

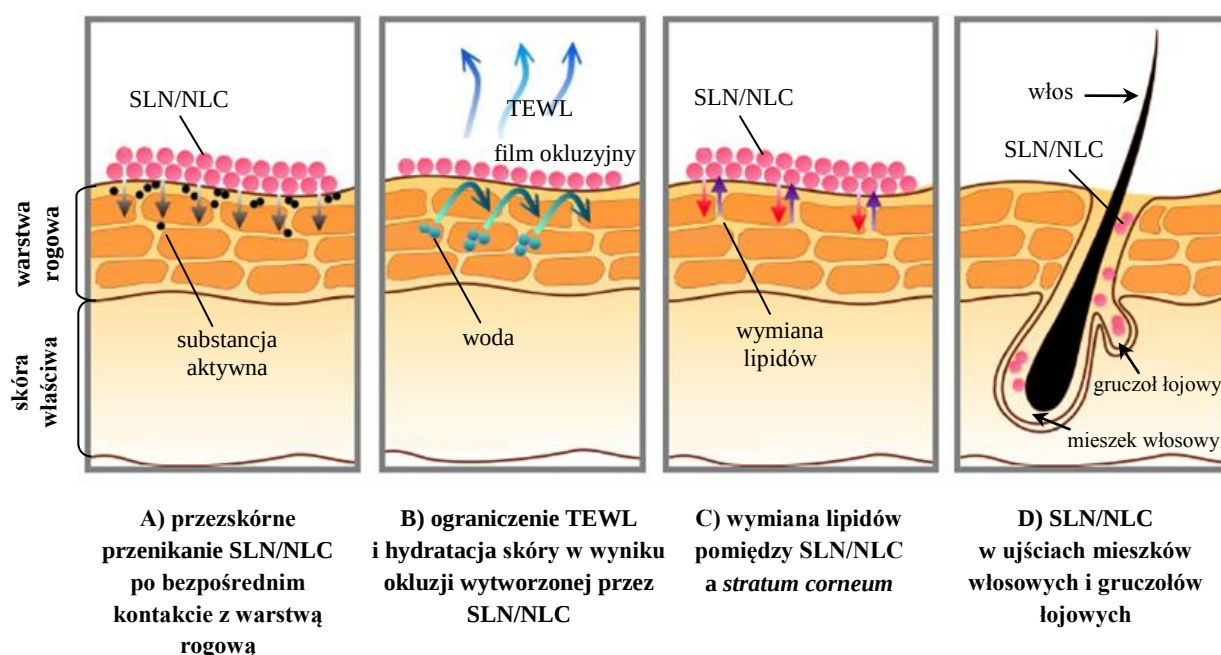
2.2.4. Przenikanie nanocząstek lipidowych przez skórę

Przed współczesną dermatologią pojawia się coraz więcej wyzwań, dotyczących poszukiwania nowatorskich a zarazem skutecznych metod w leczeniu m.in. nowotworów skóry, stanów zapalnych czy też różnego rodzaju infekcji skórnych, wymagających długotrwałego leczenia [105]. Substancje lecznicze są na ogół przeznaczone do podawania doustnego lub w poważniejszych przypadkach – do podawania pozajelitowego [27]. Wśród wielu form dostarczania substancji aktywnych enkapsulowanych w SLN/NLC, podawanie przezskórne wydaje się być jednym z najbardziej obiecujących zarówno pod względem terapeutycznym [106], jak i kosmetycznym [105, 107]. Dotychczas udało się przeprowadzić i ocenić skuteczność przezskórnego dostarczania substancji aktywnych inkorporowanych do nanocząstek lipidowych [108, 109]. Jednymi z pierwszych preparatów, których skład wzbogacono obecnością nanocząstek lipidowych była seria kosmetyków nawilżających i przeciwzmarszczkowych. Do najbardziej znanych produktów komercyjnych, opartych głównie na NLC był m.in. krem Nanobase[®] (Yamanouchi) oraz Cutanova[®] (Dr. Rimpler GmbH) [107, 110].

Nanocząstki lipidowe do podawania przezskórnego wykazują kilka zalet w zakresie zwiększenia skuteczności przenikania substancji aktywnych [109]. Enkapsulacja w SLN/NLC nie tylko zapewnia substancji aktywnej chemiczną ochronę i zwiększenie jej stabilności podczas transportu, ale także poprawę jej biodostępności [27, 111] (zob. rozdz. 2.4.). Grupa badawcza prof. R.H. Müllera udowodniła, że podanie przez skórę substancji aktywnej enkapsulowanej w nanocząstki lipidowe sprzyja zwiększeniu nawilżenia (hydratacji) skóry na skutek działania dwóch mechanizmów [48, 108]:

- wytworzenia filmu okluzyjnego na powierzchni warstwy rogowej, który zapobiega TEWL [112],
- wzmocnienia bariery warstwy lipidowej skóry przez nanocząstki przyleganie do *stratum corneum*.

Tym samym, dzięki zdolnościom adhezyjnym nanocząstek lipidowych, mają one nie tylko łatwość przylegania do warstwy rogowej, umożliwiając enkapsulowanym substancjom dotarcie do głębszych warstw skóry (rys. 16-A), ale również skóry prowadzą do utworzenia filmu okluzyjnego, który skutecznie ogranicza przelnaskórkową utratę wody [76, 113] (rys. 16-B). Ponadto, uzyskane większe uwodnienie *stratum corneum* [112] może również wiązać się ze zmniejszeniem wypełnienia korneocytów i poszerzeniem szczelin pomiędzy nimi, ułatwiając w ten sposób przenikanie substancji do głębszych warstw skóry [59, 76, 114]. Z kolei podobieństwo SLN/NLC związane z fizjologicznym składem lipidowym skóry, umożliwia nośnikom interakcje z warstwą rogową, tworząc tym samym przegrupowania lipidowe, co również ułatwia przenikanie substancji aktywnej [115] (rys. 16-C). Także z powodu niewielkich (nanometrycznych) wielkości cząstek SLN/NLC, zostaje udostępniona duża powierzchnia właściwa do absorpcji substancji czynnej przez skórę, co również zwiększa skuteczność przenikania [116]. Mały rozmiar cząstek wpływa w dodatku na zwiększenie przyczepności nanocząstek lipidowych do powierzchni warstwy rogowej, ułatwiając transport transdermalny [27, 105]. Jednym ze sposobów podawania substancji czynnej jest także dyfuzja przez mieszki włosowe [117-119] (rys. 16-D), stanowiących około 0,1% powierzchni skóry. Przenikanie SLN/NLC przez mieszki włosowe ułatwia zarówno cieńsza w tych miejscach struktura warstwy rogowej, jak również obecność sieci naczyń włosowatych, wspomagających dyfuzję substancji aktywnej [117]. Z kolei, naturalny ruch włosa przesuwającego dodatkowo nanocząstki lipidowe w kierunku gruczołu łojowego, stanowiącego dla nich rodzaj „zbiornika” oczyszczonego wcześniej przez sebum [27].



Rysunek 16. Możliwe mechanizmy zwiększonego przenikania składników aktywnych przez skórę za pomocą nanocząstek lipidowych [115].

2.3. Toksyczność nanocząstek lipidowych

Nanocząstki lipidowe zbudowane są z biodegradowalnej matrycy lipidowej, która ulega rozkładowi enzymatycznemu do związków naturalnie występujących w ludzkim organizmie. Potencjalna toksyczność nanocząstek lipidowych może zależeć od trzech aspektów: rozmiaru cząstki, inkorporowanej substancji aktywnej oraz od rodzaju surfaktantu [120].

Zakłada się, że cząstki o wielkości przekraczającej 40 nm nie są zdolne przeniknąć do żywych komórek naskórka ani do krwioobiegu [121], a tym samym nie wywołują działań niepożądanych dla organizmu [68]. Z kolei w zależności od właściwości fizykochemicznych zastosowanej substancji czynnej, a przede wszystkim od sposobu jej uwalniania do krwioobiegu – w przypadku procesu niekontrolowanego i nieodpowiednio mierzzonego, może dojść do wywołania natychmiastowej reakcji nadwrażliwości organizmu (anafilaksja) [119].

Ostatnim, niezwykle istotnym czynnikiem warunkującym bezpieczeństwo stosowania nanocząstek lipidowych jest odpowiedni dobór surfaktantu. Przeprowadzone dotychczas badania naukowe dowiodły, że najbezpieczniejsze w użyciu są surfaktanty niejonowe [122], jednakże wszystkie substancje pomocnicze, wchodzące w skład SLN/NLC powinny wykazywać działanie obojętne na ludzki organizm. W tym celu, do syntezy nanocząstek lipidowych można stosować jedynie związki, które zostały zaakceptowane przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. *American Food and Drug Administration*, FDA) i znajdują się na liście GRAS. W dodatku, w syntezie nanocząstek możliwe jest również wykorzystanie lipidów oraz środków powierzchniowo czynnych stosowanych w przemyśle spożywczym [123]. W Unii Europejskiej, w tym w Polsce, przepisy prawa dotyczące kosmetyków reguluje Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 roku [124]. Dokument ten m.in. określa szczegółowe wymagania prawne dotyczące składu kosmetyków, mające na celu zapewnienie bezpieczeństwa konsumentowi podczas stosowania kosmetyku. W odróżnieniu od przepisów obowiązujących w USA, prawo europejskie nie sporządza listy substancji dozwolonych do stosowania w kosmetykach [125], ale określa szczegółowo jakich substancji nie wolno stosować w kosmetykach oraz jakie substancje mogą być stosowane wyłącznie w określonych warunkach oraz stężeniu [126, 127].

Grupa badawcza profesora R.H. Müllera przeprowadziła badania *in vitro* na kulturach komórkowych, mające na celu zbadanie cytotoksyczności nanocząstek lipidowych w zależności od składu lipidów i zastosowanych emulgatorów [120]. Po przeprowadzeniu analizy SLN na podstawie porównania toksyczności liposfer, które zawierały w swym składzie mirystynian i behenian glicerolu (Compritol ATO 888) oraz lecytynę, Polisorbat 80, Poloxamer i glikochloran sodu jako emulgatory, okazało się, że działanie cytotoksyczne liposfer na bazie ww. związków jest dużo niższe w stosunku do tych, w skład których wchodziły w pełni biodegradowalne PLA/GA [128], czyli polilaktyd (poli(kwas mlekowy) (ang. *Polylacticacid*, *Polylactide*, PLA) oraz kwas glikolowy (ang. *Glicolid Acid*, GA). Jednocześnie wykazano, że w odróżnieniu od surfaktantów, rodzaj lipidów nie miał wpływu na żywotność komórek. Dowiedziono również, że surfaktanty, które łączą się z powierzchnią nanocząstek, wykazują przy tym dużo mniejszą toksyczność dla komórek niż w postaci wolnej [120].

Dzięki badaniom prowadzonym przez R.H. Müllera i C. Keck udało się także wyróżnić cztery grupy nanonośników, w zależności od ich szkodliwości [122]:

- I grupa – o najmniejszym stopniu toksyczności, obejmuje cząstki biodegradowalne (tj. nanoemulsje, liposomy, nanocząstki lipidowe) o wielkości 100 – 1000 nm,
- II grupa – o średniej toksyczności, obejmuje cząstki nieulegające biodegradacji, o wielkości powyżej 100 nm,
- III grupa – o średniej toksyczności, obejmuje cząstki biodegradowalne o wielkości poniżej 100 nm,
- IV grupa – o największej toksyczności, obejmuje cząstki nieulegające biodegradacji, o wielkości poniżej 100 nm.

Jednak oprócz wielkości i biodegradowalności cząstek, należy zwracać uwagę na drogę podania nanocząstek. Współczesne doniesienia naukowe wskazują podawanie przezskórne jako najmniej inwazyjny system dostarczania leków [122, 129-131]. W przypadku podawania miejscowego SLN, dozwolone jest wykorzystywanie wszystkich powszechnie stosowanych w przemyśle farmaceutycznym substancji pomocniczych. Natomiast w podawaniu doustnym nanocząstek, dopuszczalne jest stosowanie lipidów i surfaktantów używanych do produkcji tabletek, granulatów oraz kapsułek [132].

W 2007 roku, Europejski Komitet Naukowy ds. Produktów Konsumenckich (SCCP, z ang. *Scientific Committee on Consumer Products*) wystosował oświadczenie pt: „Bezpieczeństwo nanomateriałów w kosmetykach”. W dokumencie zwrócono szczególną uwagę na nanocząsteczkowe formy: tlenku cynku(II) (ang. *Zinc Oxide*) i tlenku tytanu(IV) (ang. *Titanium Dioxide*), pełniących powszechnie rolę filtrów przeciwsłonecznych. W oświadczeniu tym nie ma zbyt wielu informacji dotyczących nanocząstek lipidowych, jednak istnieją zdania, w których wspomniane są nanomateriały takie jak lipidy i surfaktanty, mogące samodzielnie przenikać do *stratum corneum* (po rozpadzie na powierzchni) i zmieniać ułożenie międzykomórkowych lipidów wewnątrz skóry [81].

Biorąc pod uwagę nieustanny rozwój w dziedzinie nanotechnologii, Komisja Europejska musiała dostosować wszystkie rozporządzenia do rozwoju naukowego i technologicznego oraz zobowiązała się uzgodnić definicje na szczeblu międzynarodowym [126]. Na podstawie decyzji (WE/721/2008) z dnia 5 sierpnia 2008 r. SCCP został zastąpiony przez nowo powołany Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów (SCCS, z ang. *Scientific Committee for Consumer Safety*) [126], który jako niezależny organ ekspertów działający przy Komisji Europejskiej odpowiedzialny jest obecnie za dokonanie oceny bezpieczeństwa w zakresie działania wybranych składników stosowanych w kosmetykach [133]. Tym samym, wraz z postępującym rozwojem nanotechnologii oraz licznymi pytaniami dotyczącymi potencjalnego ryzyka dla zdrowia ludzkiego w przypadku stosowania nanocząstek, wydano nowe Rozporządzenie Komisji Europejskiej (WE/1223/2009) w sprawie produktów kosmetycznych [124]. Głównym celem tego rozporządzenia było wydanie pierwszego aktu prawnego opisującego szereg szczególnych wymagań dotyczących nanomateriałów, w tym dokładną techniczną definicję tego terminu, która brzmiała następująco: „Nanomateriał oznacza nierozpuszczalny lub trwały i celowy wyprodukowany materiał o jednym lub większej liczbie zewnętrznych wymiarów, lub struktura wewnętrzna w skali od 1 do 100 nm.” [134-136]. W dokumencie tym omówiono także szczegółowo skład produktów kosmetycznych oraz aspekty technologiczne i regulacyjne w dziedzinie kosmetyki [137]. Za przyczyną europejskiego rozporządzenia, FDA wydała w 2014 r. poradnik dla przemysłu pt.: „Bezpieczeństwo nanomateriałów w produktach kosmetycznych” (z ang. *Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products*) [138], którego celem była pomoc

w identyfikacji potencjalnych problemów związanych z bezpieczeństwem nanomateriałów w produktach kosmetycznych, przy jednoczesnym opracowaniu kryteriów do ich odpowiedniej oceny.

Wykorzystanie nanomateriałów w kosmetykach podlega wysokiemu poziomowi ochrony zdrowia ludzkiego zgodnie z rozporządzeniem w sprawie kosmetyków (WE/1223/2009) [139]. Dzieje się tak za sprawą nowych form „nano” niektórych substancji/nośników, które mogą znacząco różnić się od ich konwencjonalnych postaci pod względem właściwości fizykochemicznych, zachowania biokinetycznego i/lub efektów biologicznych [140, 141]. W szczególności interakcje nanocząstek ze skórą stanowią efektywną, choć nieustannie poddawaną licznym badaniom, drogę dostarczania substancji aktywnych o właściwościach kosmetycznych/farmaceutycznych [137, 140].

SCCS opublikował szczegółowy poradnik na temat oceny ryzyka nanomateriałów (ang. *Guidance on Risk Assessment of Nanomaterials*: SCCS/1484/12) [134, 142], jak również memorandum w sprawie zgodności, adekwatności i jakości danych w zakresie bezpieczeństwa nanomateriałów (ang. *Memorandum on the Relevance, Adequacy and Quality of the Data Expected in Safety Dossiers on Nanomaterials*: SCCS/1524/13; z 27.03.2014 r.) [125, 143, 144]. Według SCCS dane dostarczone w dokumentacji, odnoszące się do ocenianych nanomateriałów, są wystarczająco odpowiedniej jakości do ułatwienia oceny potencjalnego ryzyka [134, 135, 144].

2.4. Substancje aktywne enkapsulowane w nanocząstki lipidowe

Ważnym czynnikiem charakteryzującym zdolność do enkapsulacji substancji aktywnych w nanocząstki lipidowe jest pojemność załadunkowa (ang. *Loading Capacity*, LC) – wyrażana w procentach i określająca ilość substancji aktywnej, która może być związana z fazą lipidową. Warunkiem koniecznym do uzyskania odpowiedniej pojemności załadunkowej nanocząstek lipidowych jest m.in. wysoka rozpuszczalność badanej substancji w stopionym lipidzie, mieszalność stopionej substancji aktywnej ze stopionym lipidem, chemiczna i fizyczna struktura stałej matrycy lipidowej oraz stan polimorficzny lipidów [145]. Zazwyczaj rozpuszczalność enkapsulowanej substancji powinna być wyższa niż wymagana, ponieważ ulega ona obniżeniu w trakcie chłodzenia mieszaniny. W celu zwiększenia rozpuszczalności substancji aktywnej, do stopionego lipidu dodaje się zazwyczaj solubilizator [145].

Nie bez znaczenia jest także odpowiednie „rozmieszczenie” inkorporowanej substancji aktywnej w nanocząstce lipidowej, które zależy od właściwości poszczególnych składników SLN/NLC (lipidów, surfaktantów i substancji leczniczej) oraz od metody otrzymywania. Warto pamiętać, że lokalizacja substancji leczniczej w nanocząstce wpływa na szybkość uwalniania [118]. Tym samym, w zależności od stężenia i rozpuszczalności substancji aktywnych, mogą być one inkorporowane w rdzeniu (ang. *drug-enriched core*) lub w powłoce nośnika (ang. *drug-enriched shell*), lub też mogą zostać molekularnie rozproszone w całej matrycy (ang. *solid solution*) [146]. Na podstawie typu inkorporacji, można wyróżnić najważniejsze postacie leku: o przedłużonym, opóźnionym, pulsacyjnym oraz przyspieszonym uwalnianiu [49, 147], tj. o modyfikowanym uwalnianiu (ang. *modified released dosage form*, MR). Działanie ww. form zależy od wielu czynników m.in. od składników formulacji oraz od sposobu jej wytwarzania. Najszybciej uwalniane są

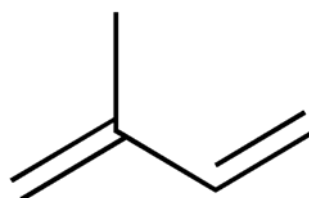
substancje aktywne, które zostały zdyspergowane w całej matrycy SLN. Znacznie wolniej zachodzi natomiast uwalnianie substancji terapeutycznej inkorporowanej w rdzeniu [147]. Ten model uwalniania wykazują cząstki wytworzone metodą homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco. Początkowo szybsze uwalnianie leku zachodzi pod wpływem działania wysokiej temperatury procesu i spowodowane jest większą rozpuszczalnością składników aktywnych w wodzie o wyższej temperaturze [148]. Badania pokazują, że zmiany w stężeniach stałego i ciekłego lipidu w NLC mogą modyfikować uwalnianie, aktywność farmakologiczną i przenikanie substancji czynnej [84]. Dzięki swoim właściwościom oraz zdolności do przedłużonego uwalniania, SLN i NLC są dobrymi nośnikami dla środków odstraszających owady, które powinny jak najdłużej utrzymywać się na skórze oraz dla perfum zapewniając ich długotrwałą wonność [46].

2.4.1. Próby enkapsulacji monoterpenu w nanocząstki lipidowe

Terpeny (izoprenoidy) to węglowodory pochodzenia roślinnego o wzorze ogólnym $(C_5H_8)_n$, stanowiące jedną z największych klas naturalnych substancji chemicznych [20, 149]. Ponad 30 000 tych związków zostało wyizolowanych z drobnoustrojów, roślin oraz zwierząt [149-151]. Zdecydowana większość z nich to składniki olejków eterycznych oraz żywic drzew iglastych. Szacuje się, że ponad milion ton terpenoidów wydzielanych jest rocznie do atmosfery przez same drzewa i krzewy iglaste. Duże ilości tych związków produkowane są również przez organizmy morskie. Zwierzęta jednak wytwarzają terpenoidy bardzo rzadko i w śladowych ilościach, głównie pod postacią feromonów oraz repelentów [20, 150].

W izoprenoidach reszty izoprenowe połączone są w sposób ogon-głowa, według tzw. reguły Rużicki (reguły izoprenowej) [20]. Terpeny i ich pochodne zaliczane są do rodziny lipidów [152]. W zależności od stopnia polimeryzacji wyróżnia się kilka grup terpenów [20, 151].

Jednymi z najszerzej rozpowszechnionych w świecie roślin są monoterpény, będące formalnie dimerami izoprenu (2-metylobuta-1,3-dienu), który traktowany jest jako hemiterpen (rys. 17) [149]. Związek ten jest lotną cieczą, otrzymywaną poprzez odwodornienie mieszaniny izopentanu i izopentenu lub też przez odwodnienie produktu kondensacji izobutenu z formaldehydem [149, 150]. Monoterpeny określa się ogólnie sumarycznym wzorem $C_{10}H_{16}$ [150, 153]. Z kolei ich wzór strukturalny może być albo liniowy (acykliczny), albo pierścieniowy (cykliczny). Modyfikacje biochemiczne, takie jak utlenianie lub przegrupowanie, wytwarzają najczęściej pochodne tlenowe monoterpenu zwane monoterpenoidami [20].



Rysunek 17.
Wzór strukturalny
izoprenu (C_5H_8).

Monoterpeny stanowią główny składnik olejków eterycznych, w których odpowiedzialne są za określony zapach danego surowca [151-154]. Wśród występujących w tej grupie węglowodorów (terpenów) można wymienić np. mircen (olejek bajowy, laurowy, chmielowy), **limonen** (olejek pomarańczowy, cytrynowy), terpinen (olejek cytrynowy), **pinen** (olejek sosnowy) oraz kamfen (terpentyna, olejek jodłowy, lawendowy). Z kolei do terpenowych alkoholi (terpenoidów) należą m.in. nerol (olejek bergamotowy, różany, kolendrowy), **geraniol** (olejek różany i pelargoniowy), cytronelol (olejek różany) czy linalol (olejek pomarańczowy i konwaliowy). Przykładem aldehydów są

cytral (olejek cytrynowy) i cytronelal (olejek eukaliptusowy), a spośród kwasów najczęściej wymienia się geraniowy oraz cytronelowy (olejek cyprysowy) [20, 152-154].

Monoterpeny, wchodzące w skład olejków eterycznych, wykazują szeroki zakres bioaktywności przeciwbakteryjnej, antywirusowej oraz przeciwutleniającej [155]. Najczęściej używane są jako zapachy w farmaceutykach i w produktach kosmetycznych [156]. Najnowsze badania naukowe wykazały, że monoterpeny skutecznie redukują objętość guza, a także hamują proliferację komórek nowotworowych [157, 158]. Pomimo szerokiego zakresu zastosowań terapeutycznych [159], monoterpeny cechują się niską biodostępnością, która wynika głównie ze słabej rozpuszczalności w wodzie oraz wysokiej lotności [160]. Aby zapewnić odpowiednio wysoki indeks terapeutyczny monoterpenów, zaczęto próbować enkapsulować te lotne substancje w różnych systemach dostarczania leków (DDS) [111]. Badania naukowe dowiodły bowiem, że enkapsulacja tych substancji nie tylko wpływa na poprawę ich stabilności fizycznej, ale także zapobiega przedwczesnej degradacji oraz umożliwia modyfikowanie uwalniania, a następnie dostarczenie substancji do miejsca docelowego (ang. *targeted drug delivery*) [111, 160].

Spośród najczęściej stosowanych do enkapsulacji nośników wymienia się głównie mikroemulsje, nanoemulsje czy liposomy [161-163], jednak od kilku lat w centrum zainteresowania wielu naukowców znalazły się zwłaszcza nanocząstki lipidowe (SLN i NLC) [48, 164], które z uwagi m.in. na swoją zdolność do modyfikowanego uwalniania substancji aktywnych mogą zapewnić liczne zastosowania biomedyczne monoterpenów.

Biorąc pod uwagę fakt, że nowością współczesnych badań farmaceutycznych i kosmetycznych jest stosowanie nanocząstek, opartych na lipidach i składnikach pochodzenia roślinnego do celów terapeutyczno-pielęgnacyjnych, główną ideą badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej było inkorporowanie nanocząstek lipidowych monoterpenami o istotnym znaczeniu dla przemysłu kosmetyczno-farmaceutycznego [156], wśród których wyróżnia się:

- **α -Pinen** ($C_{10}H_{16}$; zgodnie z nomenklaturą Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej – ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC – nazywany 2,6,6-trimetylobicyklo[3.1.1]-hept-2-enem), jest jednym z najczęściej wykorzystywanych surowców do syntezy produktów szeroko wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i aromatyzującym [165, 166]. Przykładowo, oksydacja α -pinenu prowadzi do powstania tlenku α -pinenu, werbeni i werbenolu, które stosuje się do produkcji sztucznych aromatów, substancji zapachowych oraz leków [167]. α -Pinen obecny jest w olejku drzew iglastych (rodzaj *Pinus*) [166, 168], lawendy [168], rozmarynu (*Rosmarinus officinalis* L. – rodzina *Lamiaceae*) [169] oraz w wielu innych gatunkach roślin. Dodatkowo, można go również ekstrahować z oleju z mandarynki (*Citrus reticulata*, rodzina *Rutaceae*) [170]. Poza cenionym w kosmetyce charakterystycznym dla drzew iglastych (tj. jodła, sosna) zapachem, α -pinen wykazuje szereg aktywności zarówno biologicznych, jak i medycznych, wśród których wyróżnia się właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz przeciwutleniające. Ponadto, ten bicykliczny monoterpen może działać przeciwzapalnie, przeciwkonwulsyjnie, relaksacyjnie i uspokajająco oraz przeciwnowotworowo [166, 171].
- **Cytral** ($C_{10}H_{16}O$; IUPAC: 3,7-dimetylookta-2,6-dienal), jest mieszaniną dwóch izomerów geometrycznych: geranialu, tzw. *trans*-cytralu lub cytralu A (ok. 55 – 70% wag.) oraz neralu, tzw. *cis*-cytralu lub cytralu B (ok. 35 – 45% wag.) [172]. Naturalna forma cytralu składa się z cytralu A i cytralu B w stosunku 3:2. Cytral, będący składnikiem wielu

olejków eterycznych, stanowi 70 – 85% wag. oleju z trawy cytrynowej [157, 173]. Ponadto obecny jest w olejku cytrynowym i smakach cytrusowych [172]. Ze względu na silny cytrynowy zapach, ten niestabilny chemicznie monotерpen z łatwością ulegający biodegradacji do kwasu geraniowego, może być z powodzeniem stosowany w przemyśle chemicznym i perfumeryjnym, a także do syntezy witaminy A [174]. Naukowcy dowiedli również, że geranial (cytral A) może stanowić związek wyjściowy dla kolejnych substancji chemicznych, takich jak np. jonony, witamina A, witamina E oraz karotenoidy [175].

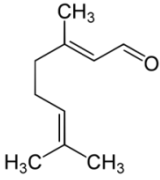
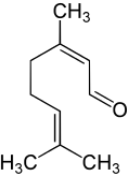
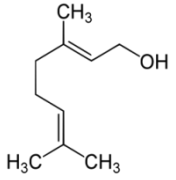
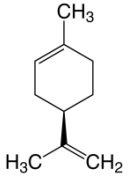
- **Geraniol** ($C_{10}H_{18}O$; IUPAC: (Z)-3,7-dimetylo-2,6-oktadien-1-ol), występuje głównie w oleju różanym, oleju z palmarosy lub oleju cytronelowym [176]. Ze względu na silny kwiatowy zapach (róży), geraniol stał się istotnym składnikiem szerokiej gamy produktów kosmetycznych [172], ze szczególnym uwzględnieniem perfum, ale także półproduktów farmaceutycznych [175]. Według badań przeprowadzonych przez Hagvalla i Christenssona [172, 176], głównymi produktami reakcji autoutleniania geraniolu są izomery cytralu: geranial oraz neral. Warto dodać, że geraniol jest izomerem geometrycznym (o konfiguracji *trans*-) nerolu (o konfiguracji *cis*-) [177].

Z uwagi na obecność grupy hydroksylowej (grupy wodorotlenowej; -OH) w strukturze geraniolu, która odpowiada za hydrofilowy charakter cząsteczki tego związku, przeprowadzenie syntezy nanostrukturalnych nośników lipidowych (NLC) inkorporowanych geraniolem w ramach badań niniejszej pracy doktorskiej okazało się niemożliwe. Fakt ten można tłumaczyć zwiększoną tendencją geraniolu do tworzenia miceli na skutek łączenia się grup -OH z niepolarnymi łańcuchami węglowodorowymi surfaktantu, zamiast ich rozproszeniem w matrycy lipidowej. Tym samym, zarówno wysokie powinowactwo do fazy wodnej, jak i dodatkowo wysoka lotność związku, uniemożliwiły jego dyspersję w fazie lipidowej, a w konsekwencji również syntezę NLC.

- **Limonen** ($C_{10}H_{16}$; IUPAC: 3,1-metylo-4-(1-metyloetenilo)-cykloheksen lub 4-izopropenylo-1-metylocykloheksen), jest chiralną cząsteczką bezbarwnego ciekłego węglowodoru, klasyfikowanego do grupy cyklicznych terpenów [178]. Limonen jest głównym składnikiem olejków eterycznych owoców cytrusowych (od 30 do 70% wag. w zależności od gatunku). Ponadto, związek ten posiada dwa izomery [179]: R-(+)-limonen lub L-limonen - występujący głównie w oleju miętowym i odznaczający się aromatem terpentyny oraz S-(-)-limonen lub D-limonen - bardziej rozpowszechniony i charakteryzujący się silnym pomarańczowym aromatem [172].

Wzory strukturalne wszystkich omówionych powyżej monoterpénów zostały przedstawione w tabeli 8.

Tabela 8. Struktury chemiczne inkorporowanych monoterpénów.

MONOTERPEN	α -pinen	cytral		geraniol	limonen
WZÓR SUMARYCZNY	$C_{10}H_{16}$	$C_{10}H_{16}O$		$C_{10}H_{18}O$	$C_{10}H_{18}O$
IZOMER	---	cytral A (geranial)	cytral B (neral)	geraniol	D-limonen
WZÓR STRUKTURALNY		 			

Warto pamiętać, że warstwa rogowa (*stratum corneum*) jest najbardziej zewnętrzną warstwą skóry i pełni funkcję bariery ochronnej [180], ale też ogranicza penetrację podawanych substancji czynnych [181]. Niektóre związki terpenowe mogą ułatwiać przenikanie substancji czynnych (w tym leków) w głąb skóry. Badania naukowe przeprowadzone przez Subongkota i in. (2012) dowiodły, że dodanie terpenów enkapsulowanych w liposomy, otrzymane techniką ultrasonikacji, zwiększyło penetrację leków hydrofilowych do głębszych warstw skóry [182]. Z kolei badania prowadzone przez Hoppel, Caneri i in. (2015) wykazały, że mikroemulsja zawierająca R-(+)-limonen zwiększała przenikanie przez skórę diklofenaku sodu (pochodnej kwasu aminofenylooctowego o silnym działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwgorączkowym) [183]. Ponadto, badania innych naukowców dowiodły, że nanoemulsje zawierające np. D-limonen były skutecznymi nośnikami w podawaniu przezskórnym [169, 184].

Stopień zaawansowania nowotworu, jak również oporność komórek nowotworowych na konwencjonalnie stosowane chemioterapeutyki powodują poszukiwanie przez naukowców nowych terapii przeciwnowotworowych [185]. Jak wcześniej wspomniano, monoterpény, takie jak m.in. α -pinen, cytral, geraniol oraz limonen odznaczają się silnymi właściwościami antyproliferacyjnymi [186] i przeciwnowotworowymi [187, 188], dlatego wydają się być idealnymi naturalnymi „lekami” [189] do farmaceutycznego opracowania nowych terapii przeciwnowotworowych. Najnowsze badania z enkapsulacją linalolu wykazały, że pomimo słabej rozpuszczalności w wodzie i wysokiej lotności tego monoterpenu, jego enkapsulacja spowodowała zwiększenie przepuszczalności i retencję leku, ograniczając efekty

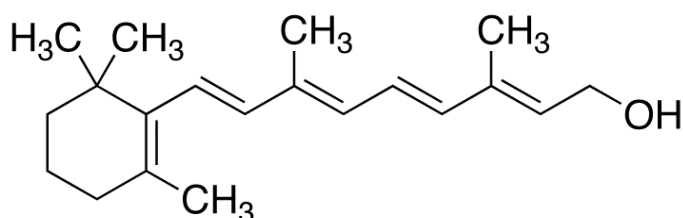
cytotoksyczne w normalnych (zdrowych) komórkach, a w konsekwencji zwiększając stężenie linalolu w tkance docelowej [190, 191].

Grupa naukowców Han, Cho i in. (2016) jako jedna z pierwszych podjęła próbę enkapsulacji linalolu w nanocząstki lipidowe, a następnie przeprowadziła testy cytotoksyczne i proapoptotyczne w komórkach nabłonkowego raka jajnika (ang. *Epithelial Ovarian Cancer*, EOC) [190]. Okazało się, że linalol zwiększał wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) w komórkach EOC. W rezultacie potencjał błonowy mitochondriów został zmniejszony, a z kolei nastąpił wzrost poziomu kaspazy-3 indukującej apoptozę, a w konsekwencji śmierć komórek rakowych.

W modelach *in vivo* połączenie linalol-nanocząstki lipidowe z konwencjonalnym środkiem chemioterapeutycznym, takim jak np. paklitaksel (organiczny związek chemiczny z grupy alkaloidów terpenowych typu taksanów o działaniu cytostatycznym, należący do grupy leków przeciwnowotworowych), prowadzi do zmniejszenia masy nowotworu [190, 192].

2.4.2. Enkapsulacja retinolu w nanocząstki lipidowe

Retinol (akseroftol; $C_{20}H_{29}OH$; rys. 18), będący alkoholem zaliczanym do grupy karotenoidów, pełni razem z innymi retinoidami funkcję witaminy A_1 oraz znajduje zastosowanie w wielu preparatach stosowanych na skórę [193, 194]. Retinol i retinoidy należą do jednych z najbardziej skutecznych substancji opóźniających procesy starzenia skóry. Stosowanie retinolu pobudza aktywność i zwiększa liczbę fibroblastów w skórze, co przekłada się w konsekwencji na zwiększenie jej elastyczności. Ponadto, retinol pobudza produkcję włókien kolagenowych, zapewniając tym samym skórze sprężystość i młody wygląd. Ten organiczny związek chemiczny jest powszechnie stosowany w przemyśle kosmetycznym m.in. w preparatach anti-aging oraz w kremach na noc i na dzień [194].



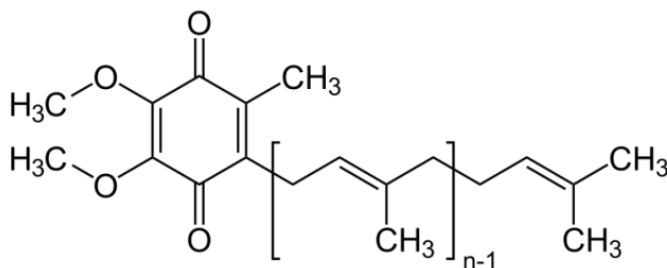
Rysunek 18. Wzór strukturalny retinolu.

Rozpuszczalne w tłuszczach witaminy, takie jak witamina A_1 mają korzystny wpływ na ludzkie zdrowie. Retinol dostarczany jest głównie z pożywieniem. W farmakologicznych dawkach może być stosowany w leczeniu chorób skóry i procesów starzenia. Aby zapobiec chemicznej degradacji substancji czynnej, postanowiono dokonać enkapsulacji retinolu w nanocząstki lipidowe [48]. Ponadto, nie bez znaczenia jest także sposób podania substancji czynnej (doustnie w postaci m.in. tabletek; przezskórnie w postaci plastrów; itp.), od którego zależy inna wielkość cząstek oraz inny profilu uwalniania. Enkapsulacja retinolu w nanocząstki lipidowe pozwoliłaby na transport przezskórny i wykorzystanie właściwości tego składnika w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym [195]. Z uwagi na hydrofilowy charakter cząsteczki, możliwa jest jedynie synteza SLN inkorporowanych retinolem [196, 197]. Dlatego też, w 2007 r. grupa badawcza profesora Müllera opracowała metodologię inkorporowania do matrycy lipidowej (*drug-enriched shell*) - palmitynianu

retinyłu, będącego najłagodniejszą formą witaminy A₁ w postaci estrowej [76]. Warto dodać, że palmitynian retinyłu był pierwszą substancją czynną, dla której podjęto próby enkapsulacji w NLC [48]. Naukowcy dowiedli jednak wówczas, że dla utrzymania dobrej stabilności chemicznej tej substancji czynnej [198, 199], maksymalna pojemność załadunkowa wynosiła zaledwie 1% [76]. Obecnie, prowadzone są liczne badania nad zwiększeniem pojemności załadunkowej NLC inkorporowanych roztworami retinolu w estrach tłuszczowych (najpowszechniej stosuje się roztwór kryształów *trans*-retinolu w estrach tłuszczowych sorbitanu) [200], jak również nad enkapsulacją jego pochodnych, jak np. tretynoiny (kwasu *trans*-retinowego) [201].

2.4.3. Enkapsulacja koenzymu Q₁₀ w nanocząstki lipidowe

Koenzym Q₁₀ (Ubichinon, CoQ₁₀; C₅₉H₉₀O₄; rys. 19) to organiczny związek chemiczny z grupy chinonów, który odpowiada za przenoszenie elektronów w łańcuchu oddechowym. CoQ₁₀ obecny jest w mitochondriach komórek roślinnych i zwierzęcych [202]. Ubichinon, obecny w mitochondriach człowieka, posiada łańcuch boczny zbudowany z 10 jednostek izoprenowych. W kosmetyce CoQ₁₀ znany jest jako silny przeciwutleniacz, który skutecznie usuwa także zalegające w organizmie trucizny [203]. Najefektywniejsze odtruwanie komórek z toksyn zachodzi w połączeniu CoQ₁₀ z witaminą E (α-tokoferol) [204].

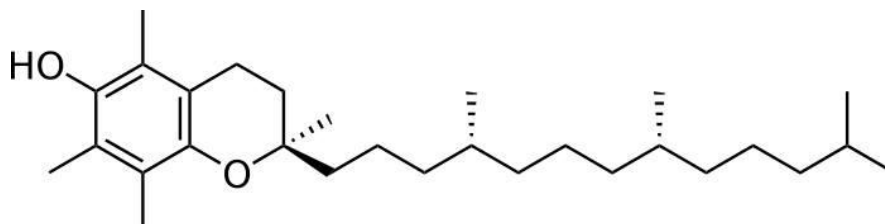


Rysunek 19. Wzór strukturalny koenzymu Q₁₀.

Koenzym Q₁₀ był jedną z pierwszych substancji aktywnych inkorporowanych do NLC [205]. Warto dodać, że w październiku 2005 r. naukowcy opatentowali enkapsulację CoQ₁₀ w NLC oraz z sukcesem wdrożyli na rynek kosmetyczny pierwszy krem, zawierający w swym składzie nanostrukturalne nośniki lipidowe [76]. Innowacyjny produkt o nazwie Cutanova Nanorepair Q₁₀ Cream należał do firmy Dr. Rimpler GmbH (Niemcy), a przeprowadzone badania *in vivo* wykazały, że po 7 dniach stosowania tego produktu nastąpił znaczący wzrost nawilżenia skóry [203]. Ponadto, po 28 dniach stosowania kremu Cutanova Nanorepair Q₁₀ otrzymano wyższe wyniki stopnia nawilżenia w porównaniu do kremu stanowiącego próbę kontrolną [203, 205]. Z kolei inne badania, dotyczące transportu koenzymu Q₁₀ wykazały, że przy użyciu nanocząstek o rozmiarze 230 nm przenikanie substancji aktywnej przez skórę było zadowalające, jednak zmniejszenie rozmiaru cząstek do 80 nm stanowczo polepszyło otrzymane wyniki. Oprócz tego udowodniono, że dzięki zastosowaniu NLC zostaje zwiększona nie tylko penetracja przez skórę koenzymu Q₁₀, ale także ogólna stabilność fizykochemiczna emulsji [203].

2.4.4. Enkapsulacja α -tokoferolu w nanocząstki lipidowe

α -Tokoferol (α -T, 5,7,8-trimetylotokol; $C_{29}H_{50}O_2$; rys. 20), będący najbardziej biologicznie aktywną formą witaminy E, jest silnym przeciwutleniaczem lipofilowym, który zapobiega powstawaniu chorób przewlekłych spowodowanych stresem oksydacyjnym [206]. α -Tokoferol jest odporny na działanie wysokich temperatur, natomiast ulega rozkładowi pod wpływem światła i tlenu [207]. W strukturze α -tokoferolu kluczową rolę pełnią trzy dodatkowe grupy $-CH_3$ (w położeniach 5, 7 i 8 pierścienia), warunkujące aktywność biologiczną. α -Tokoferol wykazuje znaczące działanie fotoprotekcyjne, a także stymulujące syntezę kolagen [208]. Ponadto, witamina E wspomaga gojenie się ran i nawilża skórę, dzięki czemu znajduje zastosowanie w leczeniu atopowego zapalenia skóry [206, 207].



Rysunek 20. Wzór strukturalny α -tokoferolu.

Dotychczas naukowcy podjęli próby enkapsulacji α -tokoferolu w nanostrukturalne nośniki lipidowe za pomocą m.in. techniki z wykorzystaniem kontaktora membranowego [209]. Średnia wielkość otrzymanych nanocząstek wynosiła 253 nm. Efektywność enkapsulacji α -tokoferolu zbadano za pomocą techniki HPLC po upływie 3 i 6 miesięcy od dnia syntezy. Okazało się, że 96% wag. analizowanej substancji aktywnej wciąż znajdowała się w NLC po 3 miesiącach oraz 89% wag. po 6 miesiącach od dnia syntezy, co świadczyło o wysokiej stabilności otrzymanych nanocząstek lipidowych inkorporowanych α -tokoferolem [209].

Z kolei naukowcy A Laouini i in. (2012) z Uniwersytetu Claude Bernard Lyon we Francji przeprowadzili skuteczną enkapsulację witaminy E w SLN. Otrzymane nanocząstki charakteryzował m.in. wysoki potencjał zeta, świadczący o dobrej stabilności próbek. Za pomocą obrazu uzyskanego przy użyciu mikroskopu elektronowego zaobserwowano kulisty kształt cząstek oraz brak zjawiska agregacji [210].

W tym samym roku, inna grupa badawcza próbowała otrzymać nanocząstki lipidowe inkorporowane α -tokoferolem z wykorzystaniem metody nanostrącania, która polegała na przeprowadzeniu wstępnej dyspersji polimeru. Proces ten zachodził na skutek „osadzenia się” polimeru na granicy faz woda/lipid. Otrzymane tą metodą nanocząstki okazały się stabilne (również po 3 i 6 miesiącach od dnia syntezy), a średnica cząstek mieściła się w granicach 160 nm [211].

2.5. Metody otrzymywania SLN i NLC

Proces syntezy NLC przebiega dokładnie tak samo jak proces syntezy SLN [212]. Stały lipid, bądź mieszanina lipidów zostaje stopiona, a następnie dodaje się substancję aktywną o określonych właściwościach farmaceutycznych bądź kosmetycznych, rozpuszczającą się w fazie tłuszczowej. W kolejnym etapie, podczas nieustannego mieszania na mieszadle

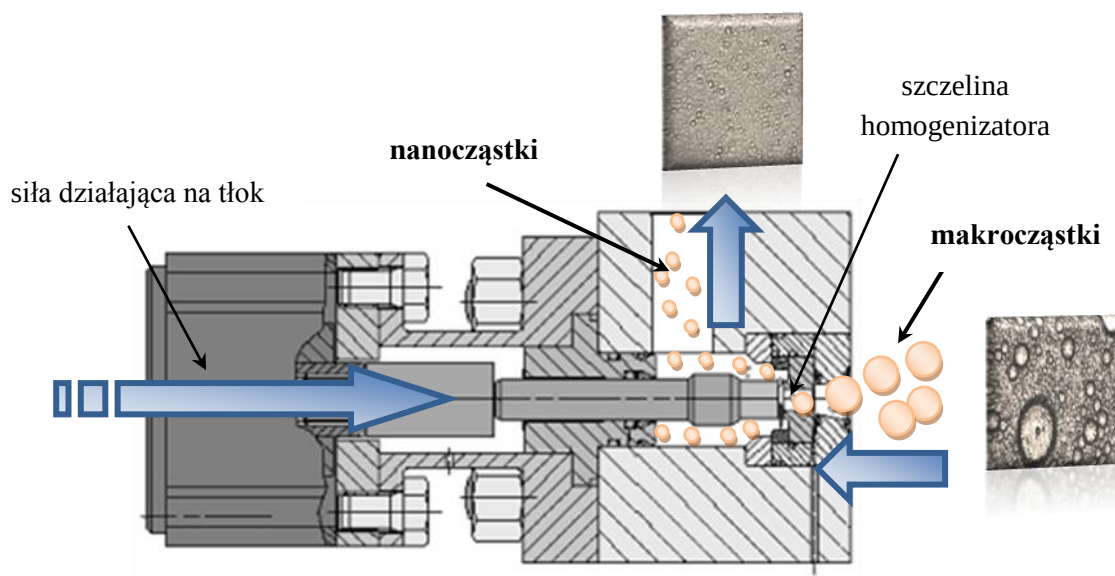
magnetycznym, faza lipidowa zostaje rozproszona w gorącym, wodnym roztworze emulgatora (czyli odpowiednio dobranego surfaktantu). Temperatury fazy lipidowej i fazy wodnej powinny być zbliżone i mieścić się w granicy 5 – 10 °C powyżej temperatury topnienia stałego lipidu. Otrzymaną preemulsję poddaje się procesowi homogenizacji wysokociśnieniowej, otrzymując tym samym gorącą nanoemulsję. Czasami ten etap poprzedzony jest dodatkowo homogenizacją wysokoobrotową (ang. *Ultra-Turrax*, UT), w celu ułatwienia dalszych procesów homogenizacji. W etapie końcowym, na skutek chłodzenia nano-zawiesiny, jej krople krystalizują tworząc tym samym nanocząstki lipidowe. W zależności od materiałów wyjściowych otrzymuje się SLN lub NLC [76].

Za najskuteczniejszą metodę otrzymywania nanocząstek lipidowych uważa się obecnie homogenizację wysokociśnieniową (ang. *High Pressure Homogenization*, HPH) [123]. Wśród innych mniej skomplikowanych i mniej kosztownych technik metod do syntezy SLN i NLC należy wymienić metodę mikroemulsji, metodę z wykorzystaniem ultradźwięków, metodę odparowania rozpuszczalnika czy metodę z użyciem kontaktora membranowego. Jednak z czasem wszystkie te techniki wykazały szereg wad i okazały się znacznie mniej skuteczne niż HPH [69].

2.5.1. Homogenizacja wysokociśnieniowa (HPH)

Jedną z najskuteczniejszych metod, wykorzystywaną do syntezy nanocząstek lipidowych jest homogenizacja wysokociśnieniowa (ang. *High Pressure Homogenization*, HPH) [123]. Przed przystąpieniem do HPH, za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego Ultra-Turrax® T25 przygotowuje się wcześniej tzw. emulsję wstępną (preemulsję lipidów), zwaną także makroemulsją, w celu zwiększenia wydajności procesu syntezy nanocząstek lipidowych. Zasada działania tego urządzenia oparta jest o technologię *rotor-stator*, dzięki której dokonuje się rozdrabniania preparatów o objętości nawet do 2 000 ml przy prędkościach od 3 400 do 24 000 obrotów na minutę. Optymalna prędkość obwodowa układu *rotor-stator* mieści się zazwyczaj w zakresie 10-24 m/s [60]. Tym samym, na skutek działania wysokiej prędkości obrotowej rotora, dyspergowana emulsja zasysana jest przez końcówkę homogenizatora, a następnie zostaje przetłoczona przez szczeliny układu *rotor-stator*. W rezultacie wszystkie składniki poddane zostają silnemu działaniu sił tnących, a powstałe w następstwie dużych prędkości turbulencje doprowadzają do dokładnego wymieszania emulsji. Na jakość produktu końcowego wpływa w dużym stopniu jakość emulsji wstępnej.

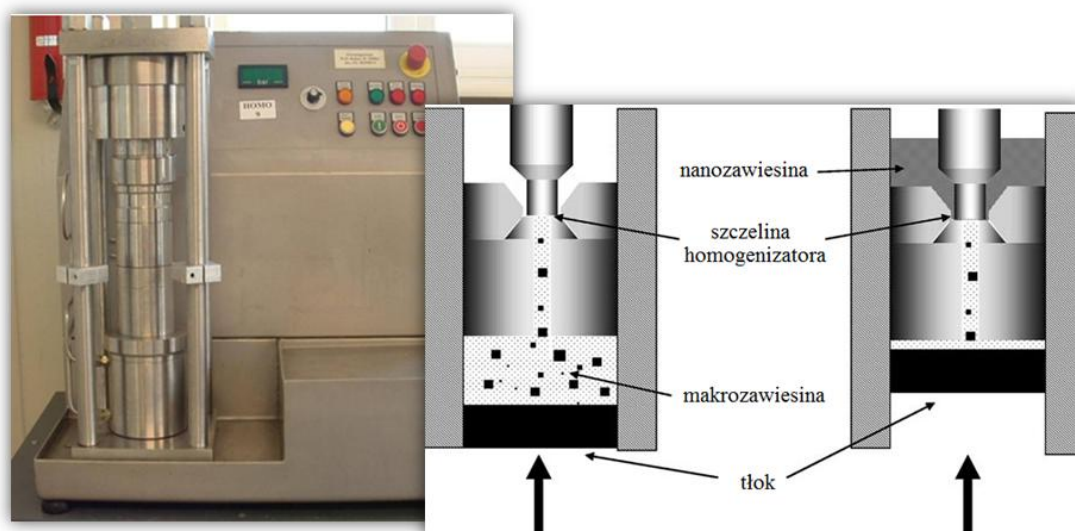
Otrzymana tym sposobem makroemulsja lipidowa zostaje następnie poddana działaniom wysokiego ciśnienia za pomocą homogenizacji wysokociśnieniowej [213]. Zasada działania tego procesu polega na przetłaczaniu preemulsji przez szczelinę urządzenia pod ciśnieniem od 300 do nawet 2 000 bar (w zależności o rodzaju HPH). W ten sposób, na skutek działania wysokiego ciśnienia, makrocząstki ulegają rozdrobnieniu do wielkości nanometrycznych (rys. 21). Dodatkowo, oprócz otrzymania niewielkich rozmiarów cząstek, za pomocą wysokiego ciśnienia możliwa jest sterylizacja oraz eliminacja komórek bakterii obecnych w emulsji. Średnia wielkość otrzymywanych nanocząstek zależy nie tylko od wielkości użytego ciśnienia, ale również od wielokrotności powtarzanych cykli, rodzaju i ilości użytych lipidów oraz emulgatorów [214].



Rysunek 21. Schemat pracy homogenizatora – otrzymywanie nanocząstek [Na podstawie materiałów szkoleniowych firmy Gea Niro Soavi Poland].

Obecnie istnieje kilka typów homogenizatorów wysokociśnieniowych, wykorzystywanych do celów laboratoryjnych i przemysłowych. Ich nadrzędnym zadaniem jest dokładne wymieszanie dwóch faz emulsji, a przede wszystkim zmniejszenie rozmiarów cząstek kropeł fazy zdyspergowanej. W rezultacie otrzymywana jest stabilna nanoemulsja.

Homogenizator wysokociśnieniowy składa się na ogół z zaworu homogenizującego oraz z pompy tłokowej. Zawór posiada dwie głowice: górną i dolną, które na skutek przyłożenia odpowiedniej siły tworzą szczelinę, przez którą następnie przetłaczany jest produkt poddany procesowi homogenizacji. Otrzymane jednocześnie przy tym wysokie ciśnienie jest tym większe, im węższa jest wytworzona szczelina. Najstarszym, a zarazem jednym z najskuteczniejszych tego typu urządzeń jest homogenizator tłokowo-szczelinowy (rys. 22).



Rysunek 22. Homogenizator tłokowo-szczelinowy Micron LAB 40 (APV-Gaulin; po lewej) [Zdjęcie wykonane w Freie Universität Berlin]. Zasada działania homogenizatora (po prawej) [215].

Inne typy homogenizatorów mogą być zaopatrzone np. w pompę wysokociśnieniową, napędzaną powietrzem/gazem, która umożliwia homogenizację makroemulsji. Przykładem tego typu aparatu może być homogenizator EmulsiFlex[®]-C3 (Avestin), powszechnie stosowany w pracowniach naukowych na całym świecie.

Z kolei jednymi z najnowszych aparatów dostępnych obecnie na rynku są homogenizatory GEA (Panda Plus 2 000 czy Ariete 5 400 – odznaczający się potwierdzoną badaniami najwyższą wydajnością na świecie). Każdy z homogenizatorów GEA składa się z dwóch podstawowych elementów, tj. bloku sprężającego, umożliwiającego pompie tłokowej wytwarzanie wysokiego ciśnienia oraz zaworu homogenizującego, który odpowiada za mikronizację rozproszonych cząstek (rys. 23). Wielkość otrzymanych cząstek (rzędu mikro- lub nanometrów) zależy od właściwości emulsji i zamierzonych rezultatów.



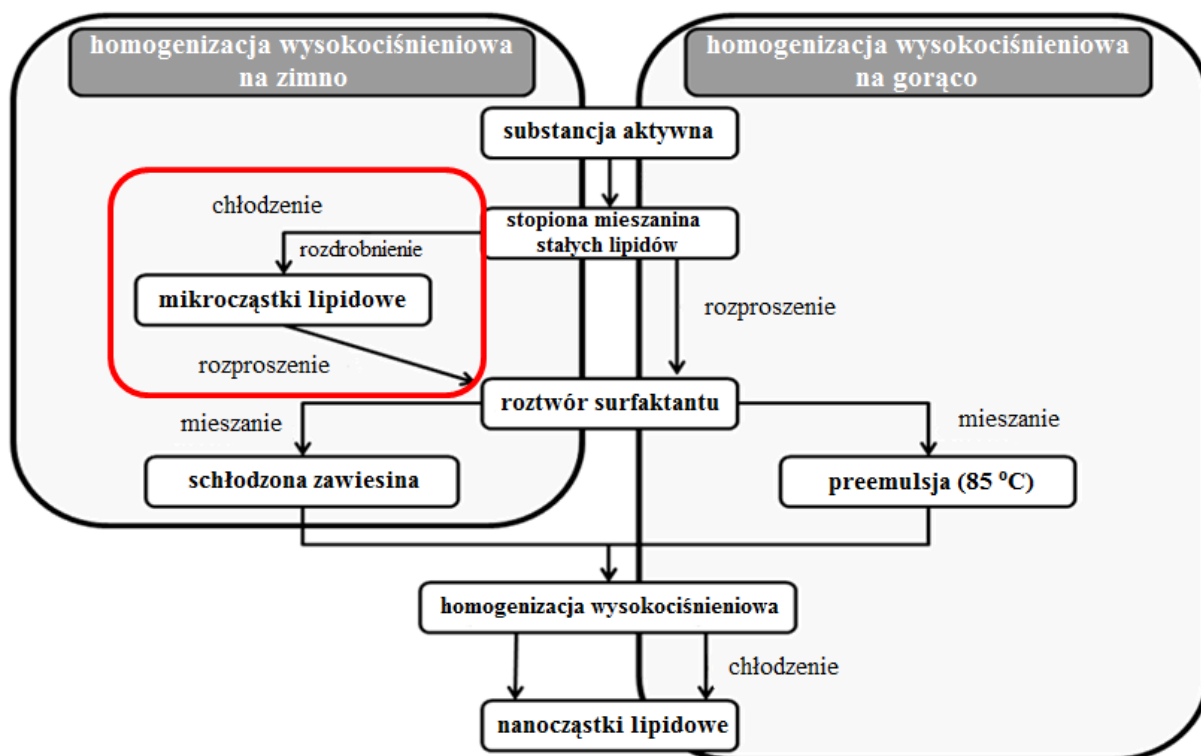
Rysunek 23. Homogenizator Panda Plus 2000 (GEA, Polska) [Zdjęcie urządzenia wykonane na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu]. Schemat pracy homogenizatora opracowano na podstawie materiałów szkoleniowych firmy Gea Niro Soavi Poland.

2.5.1.1. Rodzaje homogenizacji wysokociśnieniowej

Homogenizacja wysokociśnieniowa, uznawana obecnie za jedną z najskuteczniejszych a zarazem najszybszych metod do syntezy SLN i NLC, zapewnia niezwykłą łatwość w sprawnym przeprowadzaniu syntezy nanocząstek na dużą skalę [212]. Przepuszczane przez bardzo cienkie rurki o średnicy kilku mikronów ciecze, mają możliwość osiągnięcia bardzo wysokich prędkości (do ponad 1 000 km/h) na bardzo krótkich dystansach [215]. Typowa wykorzystywana zawartość lipidu wynosi od 5 do 10% wag. i nie stwarza żadnych trudności dla homogenizatora [216].

Istnieją dwa rodzaje homogenizacji wysokociśnieniowej: na zimno i na gorąco. Oba rodzaje HPH, schematycznie przedstawione na rysunku 24, mają taki sam etap przygotowawczy, w którym składnik aktywny wprowadzany jest do lipidów poprzez rozpuszczenie lub rozproszenie substancji w ciekłej masie lipidowej. Zasadniczą różnicą pomiędzy procesami jest etap występujący w homogenizacji na zimno, w którym stopiona mieszanina lipidów wraz ze składnikiem aktywnym ulegają ochłodzeniu i rozdrobnieniu przed dodaniem do zimnego roztworu surfaktantu. Z kolei w procesie na gorąco, stopiona mieszanina lipidów ze składnikiem aktywnym zostaje bezpośrednio dodana do gorącego roztworu surfaktantu. Homogenizacja wysokociśnieniowa na zimno jest metodą wykorzystywaną w przypadku substancji wrażliwych na wysoką temperaturę oraz substancji

hydrofilowych, które w procesie homogenizacji na gorąco mogą przechodzić z fazy lipidowej do fazy wodnej [217].



Rysunek 24. Porównanie homogenizacji wysokociśnieniowej na zimno i na gorąco [54].

- **Homogenizacja wysokociśnieniowa na zimno** polega na chłodzeniu mieszaniny stopionych wcześniej lipidów wraz z dodatkiem składnika aktywnego i w rezultacie zestalona masa lipidowa rozdrabniania jest na mikrocząstki, które z kolei zostają zdyspergowane w zimnym roztworze surfaktantu. Następnym etapem tego procesu jest przeprowadzanie homogenizacji wysokociśnieniowej pod ciśnieniem 1 500 bar, która skutkuje otrzymaniem nanocząstek. Stosując ten rodzaj HPH ważne jest kontrolowanie wzrostu temperatury, utrzymującej stan stały lipidów. Homogenizacja wysokociśnieniowa na zimno powstała w celu uniknięcia trzech problemów, dotyczących homogenizacji na gorąco, a mianowicie: rozpadu substancji czynnej spowodowanego wysoką temperaturą, rozkładu substancji czynnej w fazie wodnej oraz złożonej krystalizacji nanoemulsji prowadzącej do wielu modyfikacji.
- **Homogenizacja wysokociśnieniowa na gorąco** polega na stapieniu lipidów podgrzanych do temperatury o 5 – 10 °C wyższej niż wynosi tzw. punkt topnienia (ang. *melting point*) charakterystyczny dla danego lipidu stałego. Następnie, do tak przygotowanej fazy lipidowej dodaje się składnik aktywny, wykazujący właściwości lipofilowe i niewrażliwy na działanie wysokiej temperatury [214]. Jednocześnie w tej samej temperaturze należy podgrzewać wodny roztwór emulgatora po to, aby kolejno móc połączyć obie fazy (lipidową i wodną) i poddać je działaniu mieszadła szybkoobrotowego UT. W ten sposób uzyskuje się zdyspergowaną makrozawiesinę, którą poddaje się działaniu wysokiego ciśnienia. W homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco, najczęściej stosuje się ciśnienie w granicach 500 – 800 bar, a cały proces przeprowadzany jest przynajmniej

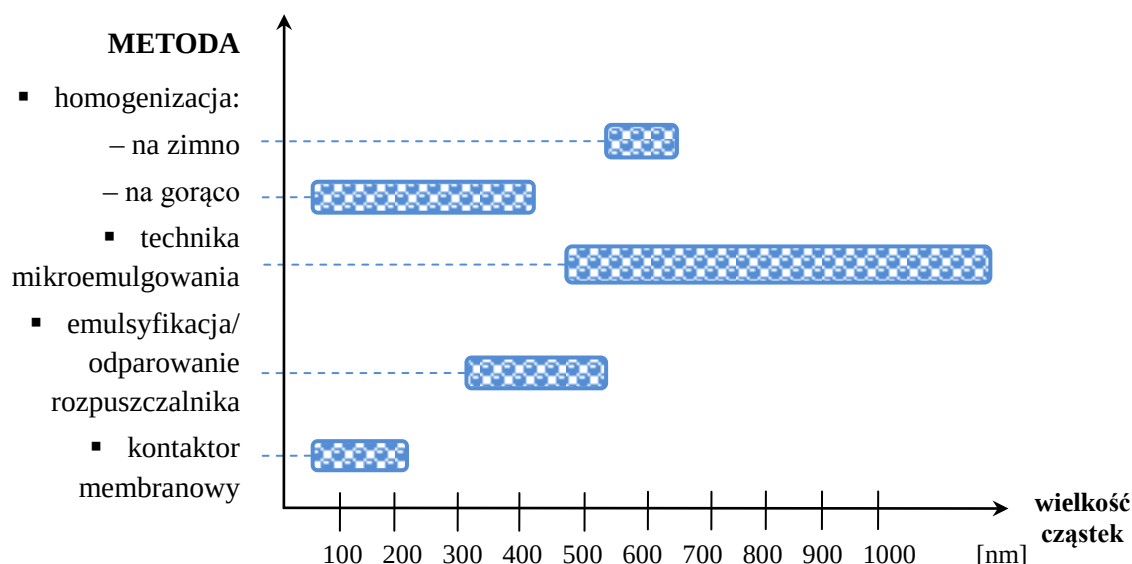
dwu- lub trzykrotnie. Maksymalna liczba powtarzanych cykli zależy od początkowo przygotowanej objętości mieszaniny wodno-lipidowej. Końcowym etapem procesu homogenizacji jest chłodzenie do temperatury pokojowej bądź niższej, w wyniku którego powstaje nanozawiesina.

2.5.2. Inne możliwe metody syntezy SLN i NLC

Otrzymywanie nanocząstek lipidowych może być prowadzone za pomocą różnych metod. Oprócz techniki HPH, w syntezie nanocząstek znalazły zastosowanie:

- **Metoda mikroemulgowania**, której istotą jest rozcieńczenie mikroemulsji. Aby uzyskać mikroemulsję, zawierającą stałe w temperaturze pokojowej lipidy, temperaturę procesu należy utrzymać na poziomie wyższym niż temperatura topnienia danego lipidu. Stopione lipidy mieszane są następnie z wodą, podczas gdy emulgatory (takie jak np. Polisorbat 20, lecytyna sojowa) lub koemulgatory (alkohole np. butanol) podgrzewa się do temperatury lipidów, a następnie całość miesza się w łagodnych warunkach aż do momentu otrzymania stabilnego termodynamicznie, przezroczystego kompleksu. Ciepło mikroemulsji, dyspergowanej w wodzie o temperaturze około 2 lub 3 °C, rozprasza się podczas ciągłego mieszania mechanicznego, które zapewnia otrzymanie cząstek o niewielkich rozmiarach. Krople te mają zwykle wielkość kilkuset nanometrów. Stosunek gorącej mikroemulsji do schłodzonej wody powinien wynosić od 1:25 do 1:50 [82].
- **Metoda emulgowania i odparowania rozpuszczalnika**, będąca jedną z pierwszych metod syntezy nanocząstek lipidowych [218], polega na zmieszaniu fazy lipidowej, rozpuszczonej w niemieszającym się z wodą rozpuszczalniku organicznym, takim jak np. cykloheksan, który jest emulgowany w fazie wodnej. Podczas odparowywania rozpuszczalnika (pod ciśnieniem obniżonym do około 0,04 – 0,06 bar) lipidy rozpuszczają się w fazie wodnej, tworząc zawiesinę nanocząstek. Średnia wielkość otrzymanych cząstek zależy od stężenia lipidów w fazie organicznej. Niewątpliwą zaletą tej metody jest unikanie wysokich temperatur. Natomiast wśród największych wad wymienia się: możliwe pozostałości rozpuszczalnika organicznego, rozkłady polidispersyjne, energochłonność procesu [68, 82].
- **Metoda z użyciem kontaktora membranowego**, coraz rzadziej wykorzystywana do syntezy SLN/NLC na skalę przemysłową [68], pomimo możliwości kontrolowania wielkości nanocząstek poprzez odpowiedni dobór parametrów przyrządu. W tej metodzie, faza lipidowa przepychana jest przez pory membrany w temperaturze wyższej od temperatury topnienia danego lipidu w celu wytworzenia kropli lipidowych. Otrzymane krople są następnie oddzielane od porów membrany przez fazę wodną przepływającą w kierunku stycznym w stosunku do powierzchni membrany. Nanocząstki lipidowe powstają w wyniku stopniowego ochładzania mieszaniny, najpierw do temperatury poniżej temperatury topnienia lipidów, a następnie do temperatury pokojowej.

Warto zaznaczyć, że w rezultacie wielkość otrzymywanych nanocząstek zależy w dużej mierze od rodzaju zastosowanej metody, co schematycznie przedstawiono na rysunku 25.



Rysunek 25. Wielkości nanocząstek lipidowych w zależności od stosowanej metody syntezy [219].

2.6. Najważniejsze metody statystyczne i fizykochemiczne stosowane do optymalizacji i charakterystyki otrzymanych nanocząstek lipidowych

Strategie optymalizacji to procedury, za pomocą których znajduje się optymalne warunki (parametry) procesu lub metody analitycznej, biorąc pod uwagę wiele czynników lub zmiennych niezależnych (m.in. ilość stałego/ciekłego lipidu, ilość surfaktantu) [220]. Mianem czynników określa się parametry, które można ustawić na danych poziomach (takich jak np. stężenie składników lub czas homogenizacji), mających wpływ na zmienną zależną (średnią wielkość cząstek, współczynnik polidispersyjności, potencjał zeta itp.). To one odpowiadają za wynik metody lub procedury. Złożone systemy zwykle wymagają podejścia wielowymiarowego, w którym występuje kilka zróżnicowanych pod wieloma względami czynników. W przemyśle, podstawowym celem jest z reguły uzyskanie maksymalnej ilości wyników opisujących czynniki wpływające na proces produkcji, dodatkowo przy jak najmniejszej liczbie pomiarów (koszty) [221].

2.6.1. Dobór lipidów

Odpowiedni dobór lipidów (ang. *lipid screening*) to jeden z najistotniejszych etapów poprzedzających syntezę nanocząstek lipidowych. Jego głównym celem jest wybór najbardziej jednolitej mieszaniny, którego dokonuje się na podstawie obserwacji rozpuszczalności inkorporowanej substancji czynnej w określonym lipidzie, zmieszanych ze sobą w optymalnym stosunku: substancja czynna/stały lipid. Innym możliwym sposobem na dokonanie wyboru właściwego lipidu jest obserwacja mieszaniny wybranego lipidu i substancji czynnej (po zmieszaniu ich z wodą) z wykorzystaniem mikroskopu optycznego. Energiczne mieszanie, któremu towarzyszą mechanizmy dyfuzji występujące na granicy woda/preparat mogą wskazywać na skuteczną emulgację [222].

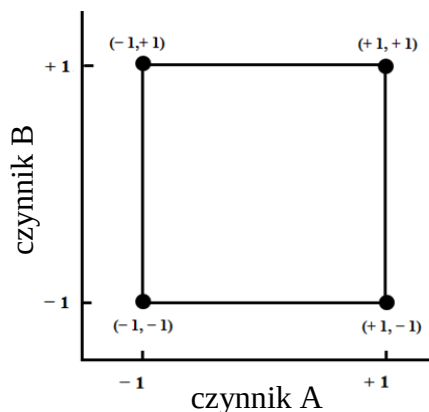
2.6.2. Analiza statystyczna: projekt czynnikowy 2^2

Przed przystąpieniem do syntezy nanocząstek lipidowych, warto wykonać także analizę statystyczną [223, 224], tzw. badanie przesiewowe czynników (ang. *screening factors*) – tzn. lipidów, co umożliwi dobór optymalnych parametrów syntezy [220, 223]. Jedną z najbardziej podstawowych analiz statystycznych jest projekt czynnikowy 2^2 , złożony z dwóch czynników: A i B, badanych na dwóch poziomach [224]. Dla pojedynczego cyklu projektu 2^2 , wymagane jest przeprowadzenie czterech wariantów badawczych (powtórzeń), w celu zbadania zależności pomiędzy wszystkimi czynnikami i poziomami: A, B oraz oddziaływaniami tworzącymi interakcyjny charakter AB [225]. Wszystkie możliwe powtórzenia przedstawia tabela 9. Poziomy zawierają odpowiednio wartości niższe (–1) oraz wyższe (+1), stanowiące tym samym kolumny ortogonalne.

Tabela 9. *Experimental Factorial Design* - projekt czynnikowy 2^2 [225].

Ilość powtórzeń	Możliwa kombinacja	I	A	B	AB
1	I	+1	–1	–1	+1
2	A	+1	+1	–1	–1
3	B	+1	–1	+1	–1
4	AB	+1	+1	+1	+1

Ponadto, projekt czynnikowy 2^2 można również przedstawić sposobem geometrycznym za pomocą kwadratu, którego cztery narożniki stanowią będą cztery możliwe warianty badawcze (rys. 26). W tym wypadku, zależności pomiędzy dwoma czynnikami A i B ponownie rozpatruje się na dwóch poziomach [225]. Poziom dolny zawiera odpowiednio wartości niższe (–1), natomiast poziom górny obejmuje wartości wyższe (+1), dając tym samym cztery różne kombinacje.



Rysunek 26. Projekt czynnikowy 2^2 w ujęciu geometrycznym [225].

Poszczególne wartości matrycy projektowej uzyskuje się przez pomnożenie wartości dla każdego z czynników, np. dla eksperymentu (–1, –1), wartość interakcji wynosi: (–1) × (–1) = (+1). W ten sposób możliwe jest zestawienie wszystkich interakcji zachodzących na poszczególnych poziomach [224, 226].

2.6.3. Metody statystyczne

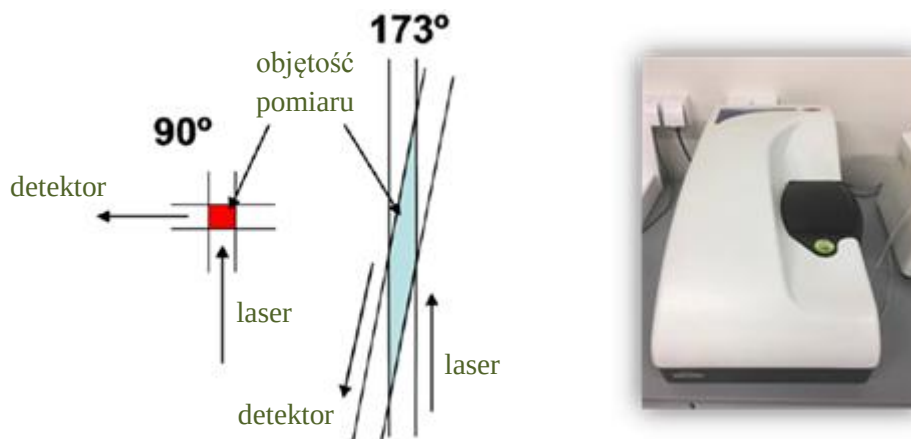
Test nieparametryczny analizy wariancji (ang. *Analysis of Variance*, ANOVA) jest metodą statystyczną [227], która pomaga oszacować prawdopodobieństwo, z jakim wyodrębnione czynniki mogą być powodem różnic między obserwowanymi średnimi grupowymi [223]. Wpływ czynników zależnych na czynniki niezależne przedstawia się za pomocą diagramu Pareto (ang. *Pareto Chart*, *Pareto Diagram*), nazywanego niekiedy również diagramem Pareto-Lorenza. Jest to rodzaj wykresu, zawierającego zarówno słupki lub też wykres liniowy [228]. Słupki pokazują wartości w porządku malejącym, natomiast wykres liniowy przedstawia skumulowane sumy każdej kategorii od lewej do prawej [223]. Według danych literaturowych, istotność statystyczna ustalana jest najczęściej w zakresie od 80% ($\alpha = 0,20$) do 95% ($\alpha = 0,05$) [223, 229], chociaż w wielu dziedzinach badań jako typową wartość graniczną poziomu istotności przyjmuje się $\alpha = 0,05$ [229]. Trójwymiarowy (3D) wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi (ang. *response surface plot*) ukazuje powierzchnię odpowiedzi tworzoną przez odpowiednio dopasowany model [230]. Dopasowanie (adekwatność, zgodność) może być najlepiej uwidocznione zarówno na wykresach warstwicznych (dwuwymiarowych, 2D), jak i na wykresach przestrzennych powierzchni (trójwymiarowych, 3D) w odpowiedzi dla wyznaczonego modelu [231, 232].

2.6.4. Spektroskopia korelacji fotonów (PCS)

W celu określenia średniej wielkości otrzymanych nanocząstek lipidowych stosuje się spektroskopię korelacji fotonów (ang. *Photon Correlation Spectroscopy*, PCS), nazywaną zamiennie metodą dynamicznego rozpraszania światła (ang. *Dynamic Light Scattering*, DLS) z uwagi na zdolność do mierzenia fluktuacji intensywności rozproszonego światła, które wywoływane jest na skutek ruchu cząstek. Metoda ta obejmuje zakres wielkości cząstek od kilku nanometrów do około 3 mikronów i jest powszechnie uważana za jedną z najskuteczniejszych technik stosowanych do określania rozmiarów nanocząstek [233].

Zasada pomiaru dla próbki analizowanej za pomocą urządzenia Zetasizer Nano ZS polega na przejściu przez nią światła lasera, które następnie ulega rozproszeniu i rejestrowane jest przez detektor. Sygnał odbierany przez detektor, ulega nieustannym zmianom na skutek działających ruchów Browna, którym podlegają cząstki [233]. Za pomocą tej metody, zmierzona zostaje także szybkość poruszania się cząstek, a następnie obliczany jest rozkład wielkości cząstek z wykorzystaniem równania Stokesa-Einsteina [234].

W celu zwiększenia objętości próbki oświetlonej przez laser, a tym samym zapewnieniu aż 8-krotnego wzrostu objętości pomiaru (w porównaniu do ustawienia detektora pod kątem 90°), Zetasizer Nano ZS stosuje opatentowaną technikę nieinwazyjnego rozproszenia wstecznego (ang. *Non-Invasive Back Scattering*, NIBS), w której światło rozproszone przez próbkę mierzone jest pod kątem rozproszenia wstecznego o 173° [234] (rys. 27).



Rysunek 27. Porównanie objętości pomiaru dla ustawienia detektora pod kątem 90° i 173° (po lewej) w urządzeniu Zetasizer Nano ZS firmy Malvern Instruments (po prawej).

Oprócz wielkości cząstek, z wykorzystaniem Zetasizera Nano ZS dokonuje się jednoczesnego pomiaru tzw. współczynnika polidispersyjności (ang. *Polydispersity Index*, PDI), który dla stabilnych emulsji powinien mieścić się w granicach 0 – 0,30 j.u. Współczynnik PDI oznacza stopień dyspersyjności, czyli statystyczny rozrzut masy cząstek [235]. Dyspersyjność, oznaczana symbolem $\bar{D}$, odnosi się do masy cząsteczkowej oraz do stopnia polimeryzacji. Obliczana jest ona poprzez dzielenie średniej masy cząsteczkowej (M_w) przez średnią masę molową (M_n), co wyrażane jest wzorem: $\bar{D} = M_w/M_n$.

Im większa wartość stopnia dyspersyjności tym większy rozrzut mas, dlatego ważne jest osiągnięcie jak najmniejszych wartości PDI, co równocześnie potwierdzi stabilność badanej formulacji [234].

2.6.5. Dyfrakcja laserowa

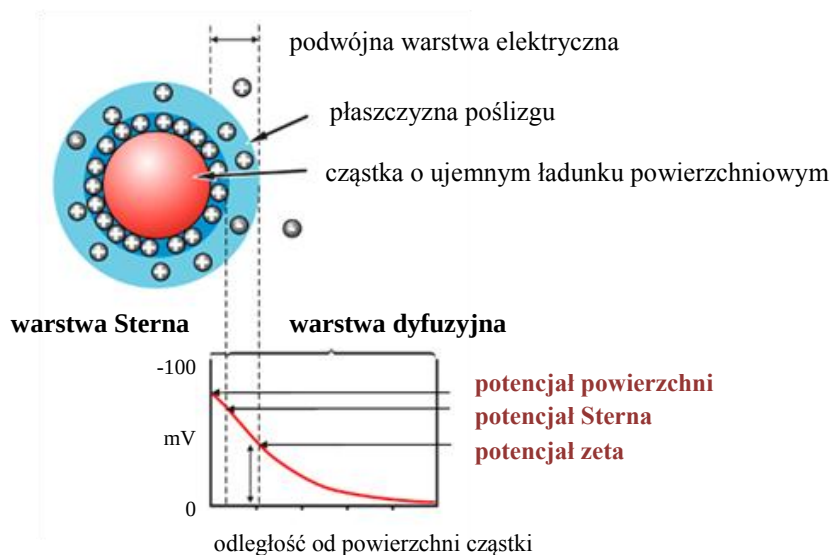
Alternatywną metodą analityczną do PCS jest technika dyfraktometrii laserowej (ang. *Laser Diffraction*, LD), służąca do pomiaru rozkładu wielkości cząstek. Analizę rozkładu wielkości otrzymanych cząstek przeprowadza się za pomocą laserowego analizatora wielkości cząstek o nazwie Mastersizer 2 000 (nowsze wersje to 2 000 E lub 3 000). Metoda ta pozwala zauważyć niestabilność próbki oraz skłonność do aglomeracji/agregacji cząstek, dlatego też technika LD jest niezwykle istotna do wstępnej oceny trwałości preparatu. Ponadto, zastosowanie tej metody umożliwia otrzymanie powtarzalnych wyników w stosunkowo krótkim czasie. Zasada działania techniki dyfraktometrii laserowej polega na wykorzystaniu zjawiska rozpraszania światła laserowego na cząstkach badanej próbki. Przyjmuje się, że rozproszenie to jest determinowane właściwościami optycznymi, strukturą przestrzenną cząstek, jak również rozkładem ich wielkości [236]. W dyfrakcji laserowej, wiązka światła przedostaje się przez celę pomiarową, a następnie zostaje rozproszona na cząstkach badanej formulacji. Na skutek tego zjawiska, światło rozproszone i pomiar jego natężenia zostają rozpoznane przez układ detektorów rozpraszania wysokokątowego i w efekcie zebrane dane pomiarowe są kolejno przeliczane w oprogramowaniu urządzenia na wielkość cząstek na podstawie założeń matematycznych – modelu Fraunhofera i teorii Mie [236]. Wyniki otrzymuje się w postaci różnych zakresów wielkości cząstek, które określają kolejno [99]:

- $d(0,1)$ – 10% udziału objętościowego ma średnicę mniejszą niż otrzymana wartość,
- $d(0,5)$ – mediana, 50% udziału objętościowego ma średnicę większą lub mniejszą niż otrzymana wartość,
- $d(0,9)$ – 90% udziału objętościowego ma średnicę mniejszą niż podana wartość.

Metoda LD odznacza się szerokim zakresem pomiarowym w zakresie 20 – 2 000 nm, jak również szybkimi pomiarami (wyniki są generowane w ciągu 1 – 2 min) [4], co umożliwia wykrycie potencjalnie większych cząstek, w analizowanym rozkładzie wielkości [233]. Odpowiedni dobór parametrów optycznych, w tym m.in. współczynnika załamania światła (ang. *Refractive Index*, RI) czy absorpcji promieniowania przyczynia się do uzyskania wiarygodnych wyników pomiarowych [236].

2.6.6. Potencjał zeta

Aby określić potencjalną stabilność otrzymanych nanocząstek lipidowych dokonuje się pomiaru potencjału zeta, będącego jednym z kluczowych parametrów opisujących proces zachowania się cząstek w zawiesinie oraz służy do analizy właściwości elektrostatycznych zawiesin. Potencjał zeta, oznaczany symbolem ζ (ang. *Zeta Potential*, ZP) i wyrażany w miliwoltach [mV], tłumaczony jest często jako potencjał elektryczny, występujący na tzw. płaszczyźnie poślizgu (granicy podwójnej warstwy elektrycznej cząstki, kontaktującej się z otaczającym ją elektrolitem) [237] (rys. 28). Celkę napełnia się zgodnie z zaleceniami producenta, tj. do wysokości pomiędzy 10 – 15 mm (poziom minimalny stanowi ok. 1 ml próbki; zalecane minimum, czyli 10 mm mierzone jest od dna celki, a pomiar wykonywany jest na wysokości 8 mm). Przekroczenie wartości maksimum może spowodować pojawienie się gradientów termicznych w próbce, które przyczyniłyby się do zmniejszenia dokładności kontroli temperatury [238]. Otrzymana wartość ZP oznacza stopień odpychania elektrostatycznego między sąsiednimi, podobnie naładowanymi cząstkami w dyspersji SLN [4].



Rysunek 28. Podwójna warstwa elektryczna [239].

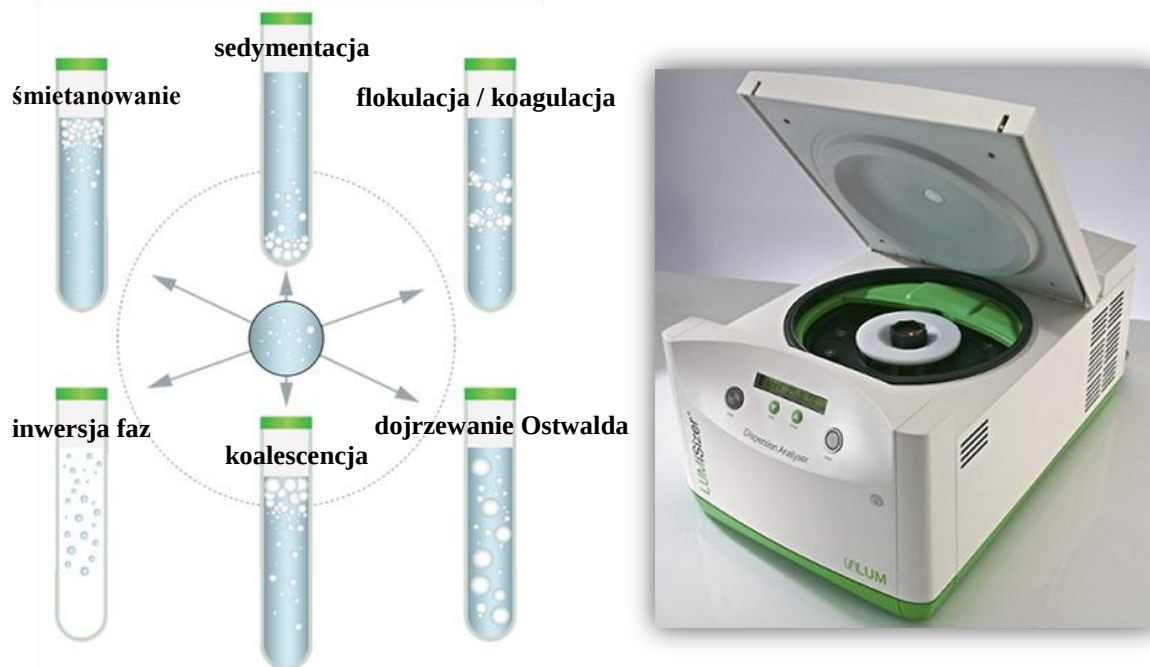
Zasada pomiaru potencjału zeta, mierzonego za pomocą urządzenia Zetasizer Nano ZS, polega na wykorzystaniu techniki elektroforetycznego rozpraszania światła (ang. *Electrophoretic Light Scattering*, ELS), zwanej spektroskopią przesunięcia Dopplera

(ang. *Doppler Shift Spectroscopy*) i bazującą na dynamicznym rozpraszaniu światła [240]. Technika ELS polega na wyznaczaniu ZP na podstawie pomiarów elektroforetycznych, związanych z ruchliwością cząstek w polu elektrycznym, dla których prędkość pomiędzy elektrodami (wbudowanymi w celkę pomiarową) mierzona jest przy wykorzystaniu efektu/zjawiska Dopplera (ang. *Laser Doppler Velocimetry, LDV*) [4, 237].

Zakłada się, że badaną próbkę można uznać za stabilną, jeżeli wartość bezwzględna potencjału zeta jest większa od $|\pm 30 \text{ mV}|$. Stabilność zawiesiny cząstek jest wypadkową sumy sił przyciągających (van der Waalsa) i odpychających (elektrostatycznych), którym poddawane są cząstki wzajemnie zbliżające się do siebie [241]. Aby uniknąć agregacji i tym samym braku wystąpienia procesu flokulacji, pomiędzy cząstkami zawiesiny musi zachodzić odpychanie. W przeciwnym razie, siły przyciągania wywołają agregację, a w konsekwencji koagulację cząstek [60, 237].

2.6.7. Przyspieszona analiza stabilności

W celu wykrycia wszelkich zjawisk niestabilności otrzymywanych nanodyspersji, coraz powszechniej stosowany jest analizator dyspersji znany jako LUMiSizer[®] (rys. 29). Bazując na tzw. analizie separacji odśrodkowej (ang. *Centrifugal Separation Analysis, CSA*) urządzenie to umożliwia wczesne wykrycie najczęściej powstających procesów, do których należy m.in. śmietanowanie, sedymentacja, flokulacja i koagulacja, dojrzewanie Ostwalda (ang. *Ostwald ripening*), koalescencja czy inwersja faz [242], schematycznie przedstawionych na rysunku 29. Ta wielofunkcyjna wirówka analityczna, nazywana także przyspieszoną analizą stabilności (ang. *accelerated stability analysis*), pozwala na obliczenie rozkładu prędkości w polu wirowania, a także rozkładu wielkości cząstek [243].



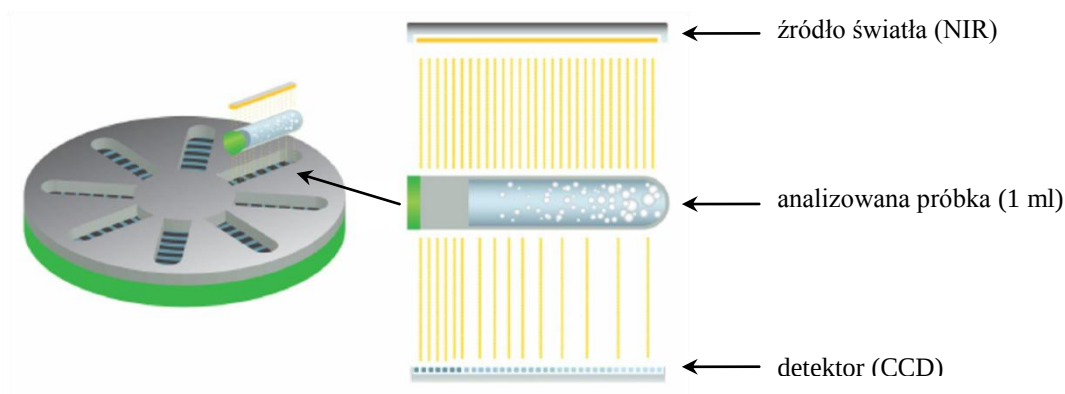
Rysunek 29. Możliwe zjawiska niestabilności dyspersji (po lewej) wykrywane za pomocą analizatora dyspersji LUMiSizer[®] (po prawej) [244].

Zasada działania urządzenia LUMiSizer[®] oparta jest na opatentowanym systemie STEP-Technology[®] (ang. *Space- and Time-resolved Extinction Profiles*), który umożliwia analizę 12 różnych próbek jednocześnie ze stałą lub zmienną siłą odśrodkową [245]. Światło

bliskiej podczerwieni (ang. *near-infrared*, NIR) lub światło niebieskie równoległe pada na całą próbkę, po czym transmitowane światło rejestrowane jest przez 2 087 czujników detektora linii sprzężonej z ładunkiem (ang. *Charge-Coupled Device Line* – linia CCD) (rys. 30) [246]. Uzyskany kształt i przebieg profili transmisyjnych zawiera informacje na temat kinetyki procesu rozdzielania i ułatwia charakterystykę cząstek. Zakładając sferyczny kształt cząstek, możliwe jest zastosowanie następującego równania 3:

$$k \cdot r^2 = v_m \quad (3)$$

Równanie 3 definiuje zależność pomiędzy prędkością sedymentacji, a kwadratem promienia cząstki, gdzie k jest stałą, r – promieniem cząstki, a v_m – prędkością sedymentacji [242].



Rysunek 30. Schemat analizy próbki za pomocą urządzenia LUMiSizer® [244].

Śledząc zmiany w transmisji światła w dowolnej części próbki lub też ruch dowolnej granicy faz, można porównać i dokładnie przeanalizować ewentualne pojawienie się wszelkich zjawisk niestabilności dla każdej z analizowanych równocześnie próbek. Ewolucja profili transmisyjnych pozwala na analizę ich zachowania i stabilności w szerokim zakresie.

Za pomocą urządzenia LUMiSizer® następuje natychmiastowe oszacowanie trwałości dyspersji w ich pierwotnym stężeniu, w minutach/godzinach zamiast miesięcy/lat [242]. Co więcej, przyspieszenie odśrodkowe wywołuje różne prędkości sedymentacji cząstek o różnych zakresach wielkości. Niestabilność zjawisk jest bezpośrednio związana z migracją cząstek (np. sedymentacja, flotacja) i zmianami w rozkładzie wielkości cząstek (np. z powodu interakcji cząstek) [242]. Badania polegające na analizie krótko- i długoterminowej prowadzi się zazwyczaj bezpośrednio po syntezie nanocząstek, jak również po upływie czasu (np. miesiąca) przechowywania próbek w różnych temperaturach (stabilność temperaturowa). Naukowcy dowiedli bowiem, że wybrane parametry, tj. czas przechowywania, temperatura i światło, mogą znacząco wpływać na stabilność nanodyspersji [106, 240]. W celu rejestrowania ewolucji profili transmisyjnych i zjawisk niestabilności urządzenie wyposażone jest w oprogramowanie SEPView®, które umożliwia również porównywanie różnych próbek i dostarcza informacji o indeksie niestabilności (ang. *instability index*) dla każdej badanej próbki [247].

2.6.8. Szybkość przenikania substancji aktywnej

Do określenia szybkości przenikania substancji aktywnej przez skórę, wykorzystuje się najczęściej system komór dyfuzyjnych Franza (rys. 31), szczegółowo opisanych w rozdziale 2.1.6.1.



Rysunek 31. System komór dyfuzyjnych Franza

[Zdjęcie wykonane w Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugalia].

2.6.9. Charakterystyka matrycy lipidowej

Badania przeprowadzone przez Bunjesa i Unruha wykazały, że stosując kombinację technik XRD i DSC, zapewnia się najbardziej komplementarne informacje na temat analizowanych preparatów, ponieważ obie techniki są niezwykle przydatne do kompleksowej charakteryzacji matrycy lipidowej, polimorfizmu lub zachowania fazowego nanocząstek, zależnego od np. wielkości cząstek lub składu chemicznego [248].

Analiza matrycy lipidowej nanocząstek lipidowych wymaga wcześniejszego poddania próbek procesowi liofilizacji (suszeniu sublimacyjnemu), będącego procesem dehydratacji, polegającym na zamrożeniu próbki pod wpływem ciekłego azotu [249]. Innym powszechnie znanym sposobem jest również chłodzenie z wykorzystaniem suchego lodu w wodnym roztworze etanolu [249]. Proces suszenia sublimacyjnego jest szczególnie zalecany do preparatów o zastosowaniu kosmetycznym lub farmaceutycznym, z uwagi na możliwość zwiększenia okresu przydatności preparatów na wiele miesięcy/lat [249, 250].

2.6.9.1. Dyfrakcja promieni rentgenowskich (XRD)

Na podstawie charakterystyki matrycy lipidowej za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) można zaobserwować czy proces degradacji występuje w krystalicznych obszarach cząstki lub też czy wolniejsza degradacja zachodzi w obszarach amorficznych [251]. Według badań naukowych, potwierdzonych przez W.N. Omwoyo i współpracowników [252], krystaliczność może wpływać na szybkość degradacji, a tym samym kinetykę uwalniania leku. Naukowcy dowiedli, że lek jest na ogół wolniej uwalniany w postaci amorficznej niż w nanocząstkach krystalicznych [251, 253], co również potwierdzono w tej pracy. Ze względu na różne możliwości ułożenia łańcuchów alifatycznych, lipidy mogą występować w różnych postaciach polimorficznych [254, 255], dlatego też niezwykle ważne jest wykrycie istnienia polimorfizmu przed wprowadzeniem SLN do przemysłu.

Struktura polimorficzna lipidów może nie tylko bezpośrednio wpływać na uwalnianie substancji aktywnej podczas przechowywania, ale także na skuteczność enkapsulacji [255]. Aby zidentyfikować strukturę otrzymanych nanocząstek lipidowych, stosuje się technikę dyfrakcji rentgenowskiej (ang. *X-ray diffraction*, XRD), za pomocą której możliwe jest porównanie otrzymanych wykresów (dyfraktogramów) z odpowiednim wzorcem z bazy danych.

Wyróżnia się dwa rodzaje XRD, różniące się przede wszystkim zakresem kątów dyfrakcji 2θ [254]. Są to:

- dyfrakcja niskokątowa (ang. *small angle X-ray diffraction*, SAXD),
- dyfrakcja wysokokątowa (ang. *wide angle X-ray diffraction*, WAXD) [248].

2.6.9.2. Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

Skaningowa kalorymetria różnicowa (ang. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC), jest techniką termoanalityczną, polegającą na utrzymywaniu tych samych temperatur dla próbki badanej i próbki odniesienia oraz pomiarze różnicy strumienia ciepła dostarczanego do obu próbek. Za pomocą tej techniki można zmierzyć różnice między przepływami ciepła, które powstają, gdy próbka pochłania lub uwalnia ciepło z powodu efektów cieplnych (takich jak topienie, krystalizacja, reakcje chemiczne, przemiany polimorficzne lub proces parowania) [256]. Wymiana ciepła podczas programów o temperaturze kontrolowanej zapewnia uzyskanie informacji o właściwościach strukturalnych próbki [248]. Badanie może być przeprowadzane w warunkach izotermicznych lub w warunkach narastającej temperatury [248]. Za pomocą DSC zmierzona zostaje entalpia (ΔH) oraz zmiana mocy cieplnej (ΔCp) efektów termicznych [257].

2.6.9.3. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Skaningowa mikroskopia elektronowa jest niezwykle użyteczną techniką, służącą do obrazowania mikrostruktur powierzchniowych [258]. Zasada pomiaru za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (ang. *Scanning Electron Microscope*, SEM) polega na poddaniu próbki ekspozycji na wiązkę elektronów, uformowaną przez elektrono-optyczny układ mikroskopu, która jednocześnie skanuje powierzchnię próbki linia po linii. Pod wpływem wiązki elektronów, próbka emituje różne sygnały, które odbierane są przez detektor, a następnie otrzymany sygnał zostaje przetworzony na obraz próbki. Uzyskany obraz jest obrazem wirtualnym, zbudowanym na podstawie sygnałów emitowanych przez próbkę [258]. Sygnały wytwarzane podczas interakcji elektron – próbka dostarczają wielu informacji na temat badanej próbki, takich jak: morfologia, pokrój i rozmiar badanego związku, skład chemiczny czy struktura krystaliczna [258].

2.7. Linie komórkowe do badań *in vitro*

Badania, mające wykazać aktywność przeciwzapalną substancji aktywnej prowadzi się najczęściej w stymulowanych lipopolisacharydem (ang. *Lipopolysaccharide*, LPS) komórkach RAW 264.7, wysianych na mikropłytkę [259, 260]. RAW 264.7 są komórkami makrofagów myszy BALB/c – albinotycznych, powszechnie stosowanych w badaniach

immunologicznych oraz w pracach badawczych nad nowotworami [261]. Komórki te otrzymuje się z komórek płynu wodobrzusza myszy zainfekowanych wirusem leukemii (ang. *Abselon leukemia virus*) [262].

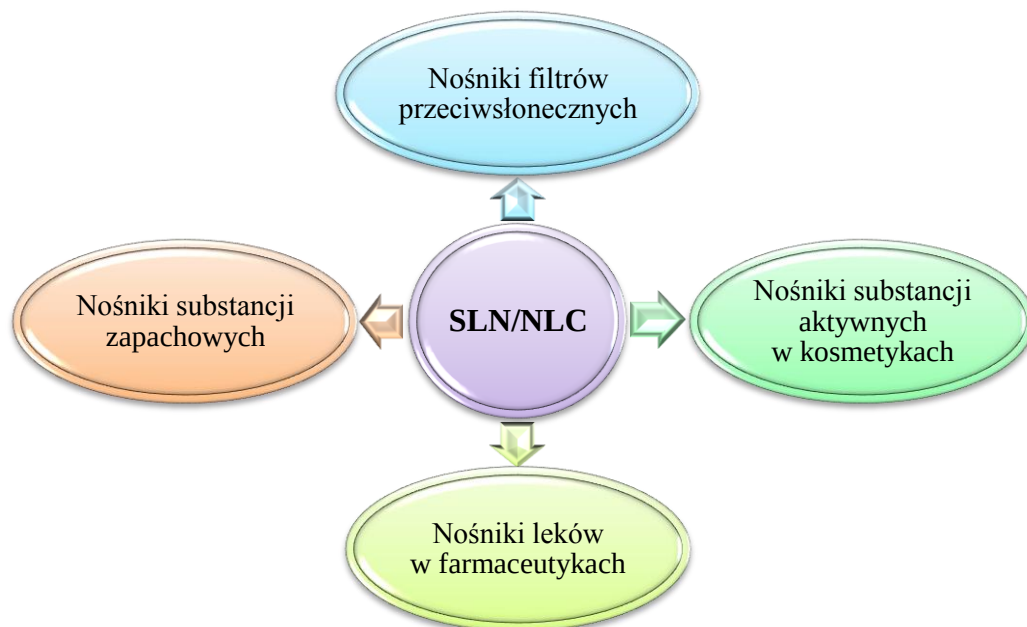
Do badań cytotoksyczności, w zależności od rodzaju nowotworu, stosuje się różne modele linii komórkowych. Linia A431 stanowi przykładowo modelową ludzką linię komórkową (nowotwór naskórkowy), wykorzystywaną w badaniach cyklu komórkowego i szlaków sygnalizacji komórkowej związanych z nowotworem skóry [263]. Komórki tej linii odznaczają się bardzo wysokim poziomem receptora czynnika wzrostu naskórka (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR). Komórki nabłonka, stymulujące czynnik wzrostu naskórka (ang. *Epidermal Growth Factor*, EGF), wywołują szybką fosforylację tyrozyny wewnątrzkomórkowych białek sygnałowych, które odpowiedzialne są za kontrolę procesów komórkowych, takich jak wzrost, proliferacja oraz apoptoza [264, 265].

Z kolei linia HaCaT jest wspólnie najczęściej stosowaną nienowotworogenną i nieśmiertelną linią komórkową keratynocytów człowieka, wykorzystywaną do analiz dotyczących skóry. To pierwsza trwała linia keratynocytów dorosłego człowieka, która prezentuje normalne zróżnicowanie [266, 267]. Komórki tej linii hoduje się zazwyczaj w pożywce syntetycznej z dodatkiem 10% wag. surowicy bydlęcej, w temperaturze 37 °C. „Ha” oznacza pochodzenie linii od dorosłego człowieka (ang. *human adult*), „Ca” informuje o przechowywaniu keratynocytów przy niewielkim zagęszczeniu jonów wapnia (Ca), natomiast „T” oznacza temperaturę hodowli, podwyższoną do 38,5 °C [268].

Dane literaturowe, dotyczące testów cytotoksyczności wykazały, że testy z użyciem resazuryny (10-tlenku 7-hydroksy-3-okso-3*H*-fenoksazyny) są jednymi z najdokładniejszych przy ocenie żywotności komórek [269-271]. Test kolorymetryczny, określany jako test Alamar Blue[®], wykorzystuje resazurynę (jako składnik czynny odczynnika AB), będącą niebieskim, nietoksycznym, jak również przepuszczalnym dla komórek związkiem, niewykazującym właściwości fluorescencyjnych (mierzonym przy długości fali 570 nm) [272]. Z kolei w kontakcie z komórkami, resazuryna ulega redukcji do resorufiny – związku o różowej, a następnie intensywnie czerwonej barwie o silnej fluorescencji (mierzonym przy długości fali 620 nm) [272].

2.8. Zastosowanie SLN i NLC w kosmetologii i farmacji

Nanocząstki lipidowe uznawane są obecnie za jedno z najbardziej efektywnych, a zarazem nietoksycznych nośników substancji aktywnych (rys. 32) [45]. Przykładem mogą być badania, których celem było zastosowanie nanocząstek lipidowych, jako nośników koenzymu Q₁₀, będącym silnym przeciwutleniaczem. Badania nad transportem koenzymu Q₁₀ inkorporowanego do nanocząstek lipidowych o rozmiarze 230 nm wykazały, że przenikanie koenzymu przez skórę było zadowalające, a zmniejszenie rozmiaru cząstek do 80 nm znacząco polepszyło otrzymane wyniki [80]. Warto jednak pamiętać, że nanocząstki lipidowe o wielkości poniżej 100 nm mogą przedostać się do krążenia ogólnego i wywołać działania niepożądane. Udowodniono także, że dzięki wykorzystaniu nanoemulsji polepszone zostaje przenikanie przez skórę i penetracja koenzymu Q₁₀ oraz stabilność fizykochemiczna emulsji [203].



Rysunek 32. Najczęstsze możliwe funkcje nanocząstek lipidowych. Opracowanie własne.

Nanocząstki lipidowe jako nośniki substancji czynnych mogą mieć zastosowanie m.in. w preparatach nawilżających skórę [273]. Dodatek nanocząstek do preparatów kosmetycznych, takich jak kremy na dzień, zwiększa ich właściwości okluzyjne, nie wpływając na lekki charakter konsystencji kremu [123]. Dzięki zdolnościom nanocząstek do zmniejszania utraty wody przez skórę, przyczyniają się one do zwiększenia jej elastyczności, dlatego też możliwe jest wykorzystanie właściwości nanocząstek w preparatach przeciwstarzeniowych [46]. Aby potwierdzić działanie zapobiegające starzeniu się skóry dla preparatów kosmetycznych, zawierających w swym składzie nanocząstki lipidowe, przeprowadzono testy *in vivo* [45]. Głównym celem badań było porównanie działania preparatów przeciwmarszczkowych, których skład zawierał lub był pozbawiony SLN [61]. W rezultacie potwierdzono silniejsze właściwości okluzyjne kremu, zawierającego 4% wag. SLN. Ponadto, wyniki dowiodły, że krem pozbawiony SLN zwiększył nawilżenie skóry o 24%, natomiast z dodatkiem nanocząstek o 32%. Co więcej, głębokość zmarszczek po aplikacji kremu bez nanocząstek uległa zredukowaniu do 89,7%, podczas gdy krem z dodatkiem SLN zredukował głębokość zmarszczek do 95,9% [61, 68].

Nanocząstki lipidowe mogą również pełnić funkcję nośników filtrów przeciwsłonecznych (fizycznych i chemicznych), ponieważ potrafią zapewnić synergiczny efekt ochrony poprzez skuteczne odbijanie promieniowania [274]. Dzięki temu, ilość filtra UV umieszczonego w preparacie, a tym samym ryzyko wystąpienia podrażnień oraz także koszty produkcji mogą zostać znacząco zmniejszone [275]. Z uwagi na większy stopień krystalizacji matrycy lipidowej w SLN, a tym samym bardziej skuteczne odbijanie promieni UV [276], stosowanie stałych nanocząstek jest dużo bardziej korzystne niż NLC. Z kolei NLC okazało się bardziej skuteczne w rozpraszaniu promieniowania UVA i UVB, ze względu na zdolność do większego rozpuszczenia cząsteczek filtra chemicznego w matrycy [81, 273].

Dzięki zdolnościom adhezyjnym oraz możliwości do przedłużonego uwalniania, zarówno SLN, jak i NLC stanowią doskonałe nośniki związków zapachowych oraz preparatów odstraszających owady [54, 59]. Sferyczny kształt nanocząstek nadaje im

właściwości antypoślizgowe oraz możliwość utworzenia na skórze bariery mechanicznej, dzięki czemu mogą być stosowane przy skórze podrażnionej i skłonnej do alergii [68].

Nanocząstki lipidowe są coraz powszechniej stosowane w przemyśle kosmetyczno-farmaceutycznym w różnego rodzaju produktach. Tabela 10 przedstawia ich wielokierunkowe możliwości, które znalazły zastosowanie m.in. w preparatach nawilżających, kondycjonujących, filtrach przeciwsłonecznych czy kremach przeciwstarzeniowych.

Tabela 10. Przykłady produktów zawierających w składzie różne typy nanocząstek [4].

Rodzaj produktu	Funkcja	Typ nanocząstek
kosmetyki nawilżające	dostarczanie substancji nawilżających, takich jak kwas hialuronowy, kolagen itp.	nanokapsułki kolasfery* nanosfery
	naprawa bariery naskórkowej poprzez dostarczanie wolnych kwasów tłuszczowych i ceramidów	SLN i NLC nanoemulsje
	tworzenie okluzji	SLN i NLC
preparaty kondycjonujące	dostarczanie substancji wygładzających, odżywczych i regenerujących (ta grupa preparatów została opracowana dla zniszczonych włosów)	nanokapsułki nanoemulsje
	działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwlupieżowe	nanocząstki nieorganiczne (srebro, miedź)
	przenoszenie zapachów	SLN i NLC nanokapsułki
kosmetyki do opalania	redukcja plam słonecznych i starczych, usuwanie przebarwień	filtry fizyczne: nieorganiczne nanocząstki tlenku tytanu(IV) i tlenku cynku(II)
	zwiększenie ochrony przeciwsłonecznej	filtry fizyczne: nieorganiczne nanocząstki tlenku tytanu(IV) i tlenku cynku(II)
		filtry chemiczne i fizyczne: SLN, NLC
		filtry chemiczne: nanokapsułki, nanosfery, liposomy uwodornionej fosfatydylocholiny (mniejsza skuteczność)
	zmniejszenie podrażnienia i ryzyka wystąpienia alergii	filtry chemiczne: nanokapsułki, nanosfery, liposomy uwodornionej fosfatydylocholiny (mniejsza skuteczność)
preparaty przeciwstarzeniowe	ochrona substancji wrażliwych na utlenianie	przeciwutleniacze: witamina E, witamina C, koenzym Q ₁₀ , SLN, NLC, nanoemulsje, nanokapsułki, nanosfery

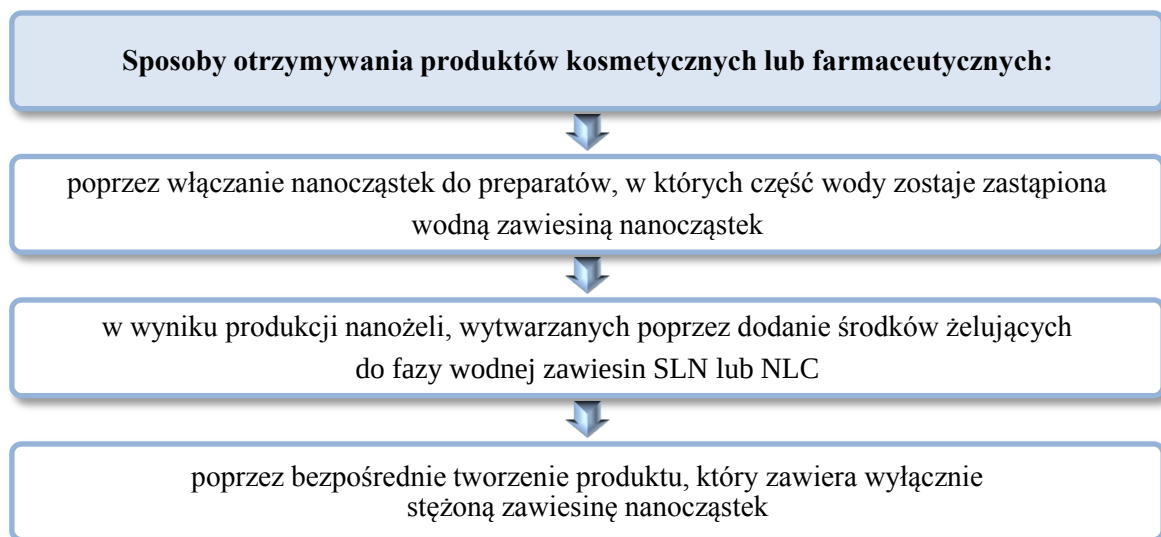
Rodzaj produktu	Funkcja	Typ nanocząstek
	modyfikowane uwalnianie	witamina A i pochodne – SLN, nanokapsułki
	dostarczanie składników aktywnych do głębszych warstw naskórka.	witamina K – nanosomy substancje poprawiające elastyczność: kwas hialuronowy, kolagen, elastyna, lipidy – nanokapsułki
	zmniejszanie podrażnień	substancje przeciwstarzeniowe: wyciągi roślinne – nanokapsułki

- Kolasfery to rodzaj nanocząstek, których powłoka wykonana jest z substancji fizjologicznie obecnych w ludzkiej skórze, takich jak kolagen i glikozoaminoglikany. Są to systemy biokompatybilne i biodegradowalne, które rozkładają się na powierzchni skóry przez enzym kolagenazę. Wyróżnia się: kolasfery H – przenoszące w swoim wnętrzu aktywne substancje hydrofobowe; kolasfery A – przenoszące substancje o charakterze hydrofilowym.

Na ogół formuła produktu kosmetycznego do stosowania miejscowego zawierająca SLN lub NLC jest identyczna. Produkty takie otrzymywane są poprzez dodanie SLN/NLC do istniejącego składu wraz z emulgatorami. Proces produkcji preparatu prowadzony jest do momentu uzyskania odpowiedniej konsystencji. Dodanie SLN/NLC do gotowego produktu np. kremu lub balsamu realizowane jest poprzez zastąpienie fazy wodnej stężonym roztworem zdyspergowanych nanocząstek. Aby utrzymać odpowiednie stężenie lipidów w produkcie końcowym, zawartość lipidów w oryginalnym produkcie powinna zostać zmniejszona o ilość włączonych nanocząstek zastępujących lipidy [277]. Porównanie formuł zawierających nanocząstki lipidowe przeznaczone do aplikacji naskórnej w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym wykazało, że ich aspekty technologiczne są bardzo do siebie zbliżone. Mimo wielu podobieństw, czas badania i wprowadzenia danego produktu na rynek jest dużo krótszy w przypadku produktów kosmetycznych. Wynika to z niezwykle zastrzonych regulacji prawnych w przemyśle farmaceutycznym [45].

Niemniej jednak, stałe nanocząstki lipidowe skupiają coraz większą uwagę także przemysłu farmaceutycznego jako koloidalne nośniki substancji czynnych podawanych dożylnie. SLN występują w postaci stałej w temperaturze pokojowej, stąd też mobilność inkorporowanego składnika aktywnego jest ograniczona. Jest to podstawą do wstępnego modyfikowanego uwalniania inkorporowanej substancji. SLN są w tym przypadku stabilizowane nietoksycznymi surfaktantami np. poloxamerem lub lecytyną. Dotychczas zostały podjęte badania, dotyczące stabilności długoterminowej SLN inkorporowanych substancją czynną oraz ich skłonnościami do rekryształizacji. Charakterystyka morfologiczna oraz określenie toksyczności *in vivo* umożliwiły dostarczenie wiedzy pozwalającej na wykorzystanie tych nanocząstek w przemyśle [76, 278].

Preparaty kosmetyczne lub farmaceutyczne, zawierające w swym składzie SLN i NLC mogą być otrzymywane na kilka sposobów [273], co przedstawiono na rysunku 33.



Rysunek 33. Możliwe sposoby otrzymywania preparatów zawierających nanocząstki lipidowe.

Wśród składników aktywnych najczęściej inkorporowanych do nanocząstek lipidowych znalazły się dotychczas następujące substancje, przeznaczone do celów kosmetycznych i/lub farmaceutycznych: avobenзон, koenzym Q₁₀, kurkuminydy, kwas alfa-liponowy, kwas ferulowy, N,N-dietyl-m-toluamid (DEET), nikotynamid, oksybenzon, olejek jałowcowy, palmitynian askorbylu i retinyłu, tokoferol, tretynoina oraz izotretynoina [68, 279].

Niektóre z wymienionych składników aktywnych, inkorporowanych do nanocząstek lipidowych zostały z powodzeniem wdrożone na rynek w postaci preparatów kosmetycznych znanych producentów (tabela 11).

Tabela 11. Przykłady produktów kosmetycznych zawierających nanocząstki lipidowe dostępne na rynku [4].

Nazwa producenta	Nazwa produktu	Główny składnik aktywny
Dr. Rimpler	Cutanova® Cream Nano Repair Q ₁₀ , Intensive Serum NanoRepair Q ₁₀	koenzym Q ₁₀ , polipeptyd
Dr. Rimpler	Cutanova® Cream NanoVital Q ₁₀	koenzym Q ₁₀ , TiO ₂ , polipeptyd
Isabelle Lancray	SURMER® Crème Legère Nano-Protection, Crème Riche Nano-Restructurante, Elixir du Beauté Nano-Vitalisant, Masque Crème Nano-Hydratant	olej z orzechów kukui, olej Monoi (Tiare Tahiti®), pseudopeptyd, ekstrakt mleka z orzecha kokosowego, dzikie indygo, wyciąg z noni (morwy indyjskiej)
Isabelle Lancray	SURMER® Creme Contour Des Yeux Nano-Remodelante	olej z orzechów kukui, olej Monoi (Tiare Tahiti®), pseudopeptyd, hydrolizowane białko pszenicy
Dr. Kurt Richter (CLR)	Nanolipid Q ₁₀ CLR	koenzym Q ₁₀ , olej z nasion czarnej porzeczki
Beate Johnen	NLC Deep Effect Eye Serum	koenzym Q ₁₀ , wysokoaktywne oligosacharydy

Nazwa producenta	Nazwa produktu	Główny składnik aktywny
Beate Johnen	NLC Deep Effect Repair Cream	koenzym Q ₁₀ , TiO ₂ , wysokoaktywne oligosacharydy
Beate Johnen	NLC Deep Effect Reconstruction Cream	koenzym Q ₁₀ , acetylo- heksapeptyd-3, zmikronizowany kolagen roślinny, wysokoaktywne oligosacharydy w matrycy polisacharydowej
Amore Pacific	SuperVital Cream, Serum	koenzym Q ₁₀ , nienasycone kwasy tłuszczowe (ω-3 i ω-6)
Scholl	Regenerations Creme Intensiv	olej z nasion Makadamia, olej z awokado, mocznik, olej z czarnej porzeczki
La Prairie	Swiss Cellular White Illuminating Eye Essence, Swiss Cellular White Intensive Ampoules	glikoproteiny, ekstrakt z korzenia żeń-szenia, ekstrakt z prosowicy, ekstrakt z liści <i>Camellia sinensis</i> (herbaty chińskiej), ekstrakt z fiołka trójbarwnego
Dr. Theiss	Olivenöl Anti Falten Pflegekonzentrat	olej z oliwki europejskiej, D-pantenol, akacja senegalska, octan tokoferylu
Dr. Theiss	Olivenöl Augenpflegebalsam	olej z oliwki europejskiej, olej ze słodkich migdałów, zhydrolizowane białko mleka, octan tokoferylu, ekstrakt z korzenia <i>rhodiola rosea</i> (różeniec górski), kofeina
Farmona	Skin Lift Extreme	witamina A, C, E, F
Bellamora	Collagen Cellular Repair Cream, Advanced Skin Exfoliant	witamina A, C, E, F
Naturalia Sintesi	Regenatur Progressive Correttore delle macchie cutanee	witamina C
Keenwell	Biologics Revital	dimetyloaminoetanol (DMAE, naturalny prekursor acetylocholino)

CEL PRACY

3. CEL PRACY

Celem badań naukowych prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pt. **„Synteza i charakterystyka stałych nanocząstek oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych przeznaczonych do celów kosmetycznych i farmaceutycznych”** było opracowanie powtarzalnej metodyki otrzymywania stałych nanocząstek lipidowych (ang. *Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych (ang. *Nanostructured Lipid Carriers*, NLC), inkorporowanych wybranymi składnikami aktywnymi, mającymi szczególne znaczenie w przemyśle kosmetycznym oraz farmaceutycznym, m.in. ze względu na szeroki zakres bioaktywności przeciwbakteryjnej, przeciwwirusowej oraz przeciwutleniającej. Cel pracy został podzielony na dwie części: pierwszą – dotyczącą enkapsulacji monoterpenu (α -pinen, cytral, geraniol, limonen) w SLN oraz drugą – dotyczącą enkapsulacji retinolu (w postaci roztworu z estrami tłuszczowymi sorbitanu; tzw. Retinol 50 C), koenzymu Q₁₀ i α - tokoferolu w NLC.

Mając na uwadze powszechnie panujący trend „zielonej chemii” w przemyśle kosmetyczno-farmaceutycznym, w ramach prezentowanej dysertacji opracowano syntezę nanocząstek lipidowych inkorporowanych Retinolem 50 C oraz koenzymem Q₁₀ z wykorzystaniem naturalnego odpowiednika dla półsyntetycznego lipidu. Tym samym, matrycę lipidową NLC stanowił olej roślinny o wysokiej stabilności (olej z nasion Meadowfoam, MSO). Badania te miały na celu nie tylko poprawę kompatybilności NLC, ale przede wszystkim jednoczesną poprawę stabilności zarówno Retinolu 50 C, jak i koenzymu Q₁₀, które zazwyczaj bardzo szybko ulegają degradacji pod wpływem przechowywania. W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono także testy *in vivo*, sprawdzające skuteczność działania MSO na wybrane parametry skóry, takie jak stopień nawilżenia czy elastyczności skóry.

Kolejnym celem badań, było opracowanie powtarzalnej metodyki syntezy NLC inkorporowanych Retinolem 50 C oraz koenzymem Q₁₀, w której wszystkie półsyntetyczne składniki zostały zastąpione składnikami pochodzenia roślinnego. Dzięki temu, chciano wyjść naprzeciw oczekiwaniom współczesnych konsumentów, którzy wybierają swoje produkty bardzo świadomie, preferując zwłaszcza kosmetyki zawierające „czyste” naturalne składniki. Stanowi to niemałe wyzwanie dla przemysłu kosmetycznego z uwagi na tendencję do ulegania procesowi „jelenienia” w wyniku degradacji oksydacyjnej przez organiczne lipidy i oleje, mające wysokie stężenie nienasyconych kwasów tłuszczowych.

W pracy doktorskiej przeprowadzono również syntezę nanocząstek lipidowych inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem dwóch najpowszechniej stosowanych metod – mikroemulgowania oraz homogenizacji wysokociśnieniowej. Celem tych badań było porównanie właściwości fizykochemicznych otrzymanych nanocząstek, jak również porównanie efektywności procesu syntezy nanocząstek lipidowych przy użyciu dwóch odmiennych technik.

Oprócz przeprowadzenia syntez nanocząstek lipidowych (SLN/NLC), celem pracy była również analiza właściwości fizykochemicznych, takich jak średnia wielkość otrzymanych cząstek (ang. *Z-Average*, *Average particle size Z*, *Z-Ave*), współczynnik polidispersyjności (ang. *Polydispersity Index*, PDI) czy wartość potencjału zeta (ang. *Zeta Potential*, ZP). Następnie, określono wpływ inkorporowania do SLN/NLC na szybkość uwalniania i przenikania przez skórę enkapsulowanych substancji aktywnych, a ponadto oznaczono

efektywność enkapsulacji, dokonano analizy stabilności oraz kompleksowej charakterystyki matrycy lipidowej otrzymanych nanocząstek.

W badaniach prowadzonych w ramach prezentowanej dysertacji, cele pracy zrealizowano w następujących etapach:

- dobór odpowiedniego lipidu do badanych substancji aktywnych (ang. *lipid screening*),
- przeprowadzenie analizy statystycznej w celu wyboru odpowiedniego stosunku poszczególnych składników formułacji przy jednoczesnym zredukowaniu liczby eksperymentów (ang. *Experimental Factorial Design*, FD),
- opracowanie powtarzalnej metody syntezy SLN inkorporowanych wybranymi monoterpenami (α -pinenem, cytralem, geraniolem, limonenem) z wykorzystaniem homogenizatora wysokoobrotowego (Ultra-Turrax® T25) oraz homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco (ang. *High Pressure Homogenization*, HPH),
- opracowanie powtarzalnej metody syntezy NLC inkorporowanych wybranymi składnikami aktywnymi (Retinol 50 C, koenzym Q₁₀, α -tokoferol) z zastosowaniem dwóch najpowszechniej stosowanych metod – mikroemulgowania oraz homogenizacji wysokociśnieniowej,
- opracowanie powtarzalnej metody syntezy NLC zbudowanych wyłącznie ze składników pochodzenia roślinnego do enkapsulacji Retinolu 50 C oraz koenzymu Q₁₀,
- analiza właściwości fizykochemicznych samodzielnie przygotowanych preparatów kosmetycznych (kremów), zawierających wybrany olej roślinny,
- przeprowadzenie testów *in vivo*, mających na celu dokonanie oceny skuteczności działania MSO na wybrane parametry skóry (m.in. stopień nawilżenia i elastyczności skóry),
- analiza właściwości fizykochemicznych (m.in. Z-Ave, PDI, ZP, przyspieszona analiza stabilności) wszystkich otrzymanych nanocząstek lipidowych (SLN/NLC),
- badanie aktywności przeciwzapalnej i przeciwnowotworowej monoterpenów,
- ocena szybkości uwalniania składnika aktywnego, z wykorzystaniem komór dyfuzyjnych Franza i spektroskopii UV-Vis (ang. *Ultraviolet/ Visible Spectroscopy*),
- oznaczenie efektywności enkapsulacji (ang. *Encapsulation Efficiency*, EE) oraz ilości zainkorporowanej substancji aktywnej za pomocą chromatografii gazowej (ang. *Gas Chromatography*, GC) lub z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC),
- kompleksowa charakterystyka matrycy lipidowej za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej (ang. *X-ray diffraction*, XRD), różnicowej kalorymetrii skaningowej (ang. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) oraz skaningowej mikroskopii elektronowej (ang. *Scanning Electron Microscope*, SEM).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4. METODYKA PRACY

4.1. Optymalizacja metody syntezy nanocząstek lipidowych

Przed przystąpieniem do badań prowadzonych w ramach przedstawianej pracy doktorskiej, wykonano tzw. badania przesiewowe lipidów, a następnie eksperymentalne projektowanie czynnikowe (ang. *Design of Experiment*, dosł. planowanie doświadczeń), umożliwiające dokonanie jednoczesnej oceny kilku czynników przy określonej (minimalnej) liczbie eksperymentów.

4.1.1. Dobór lipidów dla monoterpenów inkorporowanych do SLN

W badaniach do pracy doktorskiej, dotyczących enkapsulacji monoterpenów w SLN testowano 8 różnych lipidów stałych, przedstawionych w tabeli 12.

Tabela 12. Lipidy i ich temperatury topnienia (ang. *melting point*).

Nazwa handlowa	Nazwa chemiczna	Temperatura topnienia [°C]	Producent	Kraj pochodzenia
Compritol® 888 ATO	Behenian glicerolu (mieszanina mono-, di- i tri-)	70	Gattefossé	Polska
Dynasan® 116	Tripalmitynian glicerolu	61 – 65	Cremer Oleo GmbH & Co. KG company	Niemcy
Dynasan® 118	Tristearynian glicerolu	70 – 73	Cremer Oleo GmbH&Co. KG company	Niemcy
Dynasan® P 60 (F)	Triacyloglicerydy palmitynowe/stearynowe	68	Cremer Oleo GmbH&Co. KG company	Niemcy
Imwitor® 900 K	Monostearynian glicerolu, Typ II	54 – 64	Cremer Oleo GmbH&Co. KG company	Polska
Kolliwax® GMS II	Monostearynian glicerolu 40, 55 Typ II	58 – 61	BASF	Niemcy
Precirol® ATO 5	Distearynian glicerolu Typ I EP	55 – 66	Gattefossé	Hiszpania
Witepsol® E85 (pastylki)	Tłuszcz twardy, tłuszcz stały (mieszanina mono-, di-, triacyloglicerydów nasyconych kwasów tłuszczowych C10-C18)	31 – 33	Cremer Oleo GmbH&Co. KG company	Niemcy

Dobór lipidów (*lipid screening*) przeprowadzono dla wszystkich składników aktywnych, które przedstawia tabela 13. Wszystkie monoterpeny zostały zakupione od firmy SAFC Supply Solutions Sigma-Aldrich (Polska).

Tabela 13. Inkorporowane monotereny [280-283].

Nazwa handlowa	Nazwa chemiczna i wzór	Temperatura topnienia/krzepnięcia [°C]	Producent	Kraj pochodzenia
(+)- α -Pinene 98% (pl. α -Pinen)	2,6,6-trimetylobicyklo[3.1.1]-hept-2-en / $C_{10}H_{16}$	-64	Sigma-Aldrich	Polska
Citral 95% (pl. Cytral)	3,7-dimetylookta-2,6-dienal / $C_{10}H_{16}O$	< -20	Sigma-Aldrich	Polska
Geraniol 97%	(Z)-3,7-dimetylo-2,6-oktadien-1-ol / $C_{10}H_{18}O$	-15	Sigma-Aldrich	Polska
(R)-(+)-Limonene 97% (pl. Limonen)	3,1-metylo-4-(1-metyloetenilo)-cykloheksen; 4-izopropenilo-1-metylocykloheksen / $C_{10}H_{16}$	-74	Sigma-Aldrich	Polska

Przed przystąpieniem do syntezy nanocząstek lipidowych, dokonano wyboru rodzaju lipidu, najodpowiedniejszego dla wszystkich monoterenów. W tym celu, do każdej z 8 szklanych fiolek odważono 1 g każdego z testowanych lipidów stałych (tab. 12). Następnie, do każdej z fiolek dodano 0,01 g odważonego składnika aktywnego (tab. 13). Czynności te powtórzono dla wszystkich czterech badanych monoterenów.

Fiolki umieszczano kolejno na mieszadle magnetycznym, a ich zawartość podgrzewano do temperatury powyżej punktu topnienia lipidu (ang. *melting point*), odpowiedniej dla każdego z lipidów (tab. 13). Stopiony lipid wraz ze składnikiem aktywnym nieustannie mieszano do momentu uzyskania mieszaniny jednorodnej. Po schłodzeniu mieszaniny do temperatury 25 °C, odnotowywano obserwacje w określonych odstępach czasu (15 min, 30 min, 1 h, 24 h, 72 h).

Ocena rozpuszczalności polegała na obserwacji zabarwienia mieszaniny lipidu i substancji aktywnej. Przyjmuje się, że badana substancja aktywna może być inkorporowana do nanocząstek lipidowych, jeśli zestalona mieszanina lipidu wraz ze składnikiem aktywnym przyjmuje białe zabarwienie. Natomiast jakakolwiek inna barwa mieszaniny może wskazywać na albo zbyt dużą ilość substancji aktywnej, albo na nieodpowiedni charakter chemiczny zastosowanego lipidu (względem badanego składnika aktywnego).

4.1.2. Dobór lipidów dla wybranych składników aktywnych inkorporowanych do NLC

Przed przystąpieniem do syntezy NLC, dokonano wyboru najbardziej kompatybilnego rodzaju stałego lipidu (*lipid screening*) dla poszczególnych składników aktywnych. W tym celu, do fiolek odważono każdego z testowanych lipidów stałych, przedstawionych w tabeli 14 oraz dodano wybranego składnika aktywnego w trzech różnych stosunkach (np. 9:1/ 7:3/ 6:4) lipid-składnik aktywny.

Tabela 14. Lipidy i ich temperatury topnienia (ang. *melting point*).

Nazwa handlowa	Nazwa chemiczna	Temperatura topnienia [°C]	Producent	Kraj pochodzenia
Apifil® CG	Wosk pszczele	59 – 70	Gattefossé	Hiszpania
Carnauba Wax	Wosk Carnauba (także karnauba)	82 – 86	Sigma-Aldrich	Niemcy
Compritol® 888 ATO	Behenian glicerolu (mieszanka mono-, di- i tri-)	70	Gattefossé	Polska
Cutina® CP	Palmitynian cetylu	54	BASF Care Creations	Niemcy
Dynasan® 114	Trójacylogliceryd kwasu mirystynowego	56 – 57	Cremer Oleo GmbH & Co. KG company	Niemcy
Dynasan® 118	Tristearynian glicerolu	70 – 73	Cremer Oleo GmbH&Co. KG company	Niemcy
Imwitor® 312	Monogliceryd kwasu laurynowego	56 – 60	Sasol Germany GmbH	Niemcy
Imwitor® 900 (F) P	Stearynian glicerolu, Typ I	54 – 64	Cremer Oleo GmbH&Co. KG company	Niemcy
Imwitor® 900 K	Monostearynian glicerolu, Typ II	54 – 64	Cremer Oleo GmbH&Co. KG company	Polska
Precirol® ATO 5	Distearynian glicerolu Typ I EP	55 – 66	Gattefossé	Hiszpania
Softisan® 601	Stearynian glicerolu	40 – 45	Cremer Oleo GmbH&Co. KG company	Polska

Fiolki umieszczano kolejno na mieszadle magnetycznym, a ich zawartość podgrzewano do temperatury powyżej punktu topnienia lipidu, charakterystycznego dla każdego z lipidów (tab. 14). Stopiony lipid wraz ze składnikiem aktywnym nieustannie mieszano do momentu uzyskania mieszaniny jednorodnej. Po schłodzeniu mieszaniny do temperatury 25 °C, dokonano oceny rozpuszczalności poprzez obserwację wzrokową zabarwienia zestalonych lipidów w określonych odstępach czasu (15 min, 30 min, 1 h, 24 h, 72 h). Dodatkowo, każdy z lipidów wraz z badanym składnikiem aktywnym (w poszczególnym stosunku) umieszczano na szkiełku podstawowym, a następnie po podgrzaniu i stopieniu lipidu dokonano oceny jednolitości matrycy lipidowej za pomocą mikroskopu stereoskopowego (Leitz Orthoplan Widefield, Niemcy), przedstawionego na rysunku 34 [284].

**Rysunek 34.** Mikroskop stereoskopowy Leitz Orthoplan Widefield.

4.1.3. Analiza statystyczna

W badaniach w ramach niniejszej dysertacji przeprowadzono analizę statystyczną (ang. *Experimental Factorial Design* – dosł. plany czynnikowych eksperymentów), która została wykorzystana jako „narzędzie” optymalizacyjne, umożliwiające znalezienie odpowiedniego stosunku składników i parametrów do syntezy SLN.

W tym celu badano wpływ czynników niezależnych i zależnych dla syntezy SLN inkorporowanych monoterpenami. We wszystkich przypadkach, zmiennymi niezależnymi były: surfaktant (Poloxamer 188) oraz stały lipid (Imwitor® 900 K – wybrany podczas *lipid screening*), natomiast na zmienne zależne wybrano: wielkość cząstek (Z-Ave), wskaźnik polidispersyjności (PDI) i potencjał zeta (ZP).

Tym samym powstał projekt czynnikowy 2^2 , składający się z 2 czynników niezależnych, ustalonych na 2 poziomach (tab. 15). Dla każdego czynnika niezależnego ustalono odpowiednie wartości poziomów: dolnego (–1) i górnego (+1). Punkt centralny (0) został trzykrotnie powtórzony dla oszacowania błędu eksperymentalnego [242]. Wszystkie dane analizowano za pomocą oprogramowania STATISTICA 7.0 (Stafsoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Tabela 15. Wyjściowy 2 – poziomy projekt czynnikowy, zawierający wartości: niższe (–1), wyższe (+1) i wartości poziomu centralnego (0) dla każdej zmiennej.

Czynniki niezależne	Poziomy		
	– 1	0	+ 1
Imwitor® 900 K	2,00% wag.	4,00% wag.	8,00% wag.
Poloxamer 188	1,25% wag.	2,50% wag.	5,00% wag.

4.1.3.1. Analiza wariancji (ANOVA)

W celu przetestowania istotności różnic pomiędzy średnimi, w ramach niniejszej dysertacji przeprowadzono porównanie (tzn. analizę) wariancji ANOVA. Analizie została poddana wariancja, przypadająca na każdy z analizowanych czynników, jak również wariancja błędu. Wariancja została obliczona, a następnie przedstawiona jako suma kwadratów (ang. *Sum of Squares*, SS) odchyleń od średniej ogólnej, a następnie dzielona przez $n-1$ (wielkość próby minus jeden). Tym samym, przy danym n , wariancja stanowiła funkcję sum kwadratów (SS). Wszystkie otrzymane dane analizowano za pomocą oprogramowania STATISTICA 7.0 (Stafsoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Wartości istotne statystycznie zostały wyróżnione w tabelach kolorem pomarańczowym.

4.1.3.2. Diagram Pareto i trójwymiarowy wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi

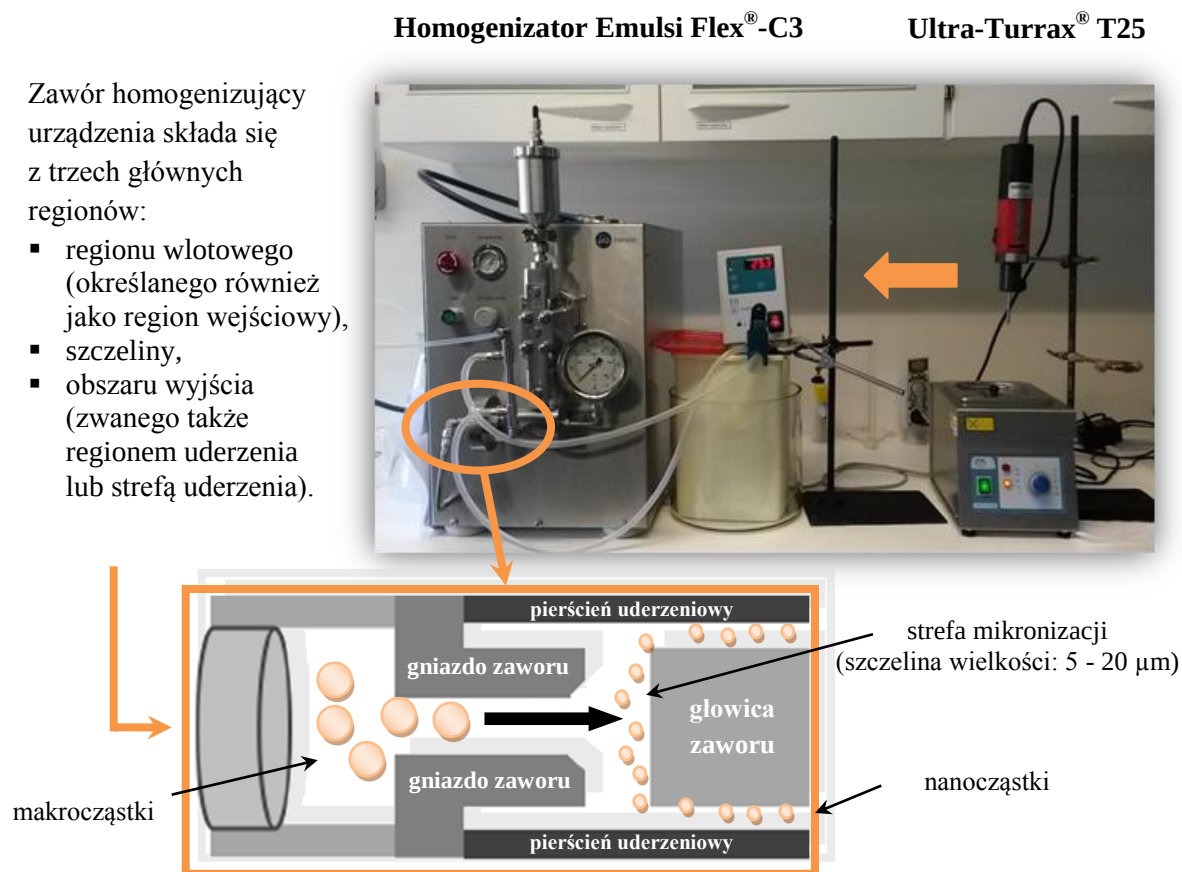
W ramach niniejszej pracy doktorskiej sporządzono także diagram Pareto, który obrazował wpływ czynników zależnych (Z-Ave, PDI, ZP) na czynniki niezależne (tj. surfaktant oraz wybrany lipid) oraz wskazywał na istotność statystyczną otrzymanych wyników. Istotność statystyczna została obliczona w zakresie od 80% ($\alpha = 0,20$) do 95% ($\alpha = 0,05$). W przypadku każdej analizowanej próbki wyniki omówiono dla największej

istotności statystycznej, a porównanie wszystkich rezultatów umieszczono w odpowiednio numerowanych załącznikach. Wszystkie wykresy zostały sporządzone za pomocą oprogramowania STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

W celu optymalizacji powierzchni wydajności syntezy stałych nanocząstek lipidowych, zastosowano wykres przestrzenny tzw. trójwymiarowy (3D) wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi, wykonany dla dwóch czynników niezależnych: stałego lipidu (Imwitor® 900 K) i surfaktantu (Poloxamer 188) względem każdej analizowanej zmiennej zależnej (Z-Ave, PDI, ZP). W celu zobrazowania dopasowania powierzchni odpowiedzi, dla każdej próbki wykonano dodatkowo wykresy warstwowe (2D), które zostały przedstawione w odpowiednio numerowanych załącznikach. Wszystkie wykresy (2D i 3D) zostały wykonane za pomocą oprogramowania STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

4.2. Synteza SLN

Po przeprowadzeniu licznych syntez i procedur eksperymentalnych, najskuteczniejszą metodą umożliwiającą powtarzalną syntezę SLN inkorporowanych monoterpunami była homogenizacja wysokociśnieniowa na gorąco. Badania w ramach pracy doktorskiej prowadzono głównie na homogenizatorze EmulsiFlex®-C3 (Avestin, Inc., Ottawa, Kanada) na Wydziale Farmacji Uniwersytetu w Coimbrze, w Portugalii (rys. 35).



Rysunek 35. Schematyczne przedstawienie HPH na gorąco z wykorzystaniem Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Ystral GmbH D-7801, Dottingen, Niemcy; po prawej) oraz homogenizatora Emulsi Flex®-C3 (Avestin, Inc., Ottawa, Kanada; po lewej) [Zdjęcie wykonane w Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugalia].

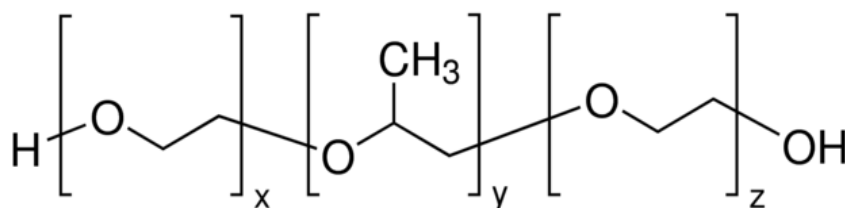
4.2.1. Preparatyka SLN inkorporowanych monoterpenami

Po dokonaniu optymalizacji metod syntezy, wybrano jednakowy skład dla wszystkich wybranych monoterpenów, aby następnie móc porównać właściwości wszystkich inkorporowanych nanocząstek lipidowych. Tym samym, każda z przygotowanych formułacji SLN zawierała odpowiednio: 1% wag. składnika aktywnego (wybrany monoterpene), jak również 2; 4 lub 8% wag. stałego lipidu (Imwitor[®] 900 K) oraz 1,25; 2,5 lub 5% wag. surfaktantu (Poloxamer 188).

W badaniach w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano następujące składniki:

- **Imwitor[®] 900 K**, monostearynian glicerolu, typ II – jako stały lipid;
- **Poloxamer 188** (rys. 36), nazwa handlowa: Kolliphor[®] P188 – jako środek powierzchniowo czynny (surfaktant); jest niejonowym kopolimerem trójblokowym, złożonym z centralnego hydrofobowego polioksypopylenu [poli(tlenek propylenu) PPOx, gdzie $x = 28$], otoczonego dwoma hydrofilowymi łańcuchami polioksyetylenu [poli(tlenek etylenu, PEOy, gdzie $y = 79$]. Poloxamer 188 został kupiony od firmy BASF (Ludwigshafen, Niemcy);
- monoterpeny: **α -pinen**, **cytral**, **geraniol** oraz **limonen** – jako substancje aktywne;
- oczyszczoną wodę przefiltrowano przez filtr nylonowy 0,22 μm z systemu **Milli-Q[®] Plus** (Millipore, Niemcy), uzyskując tym samym wodę wysoce demineralizowaną – o rezystywności powyżej 18,2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ (w temp. 25 °C).

Wszystkie odczynniki były analitycznie czyste i zostały użyte bez dalszej obróbki.



Rysunek 36. Wzór strukturalny Poloxameru 188.

Syntezę SLN prowadzono za pomocą homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH) na gorąco z wykorzystaniem homogenizatora Emulsi Flex[®]-C3 (Avestin, Inc., Ottawa, Kanada) w czasie 30 minut pod ciśnieniem 300 bar. Aby zwiększyć wydajność procesu syntezy nanocząstek lipidowych, przed przystąpieniem do HPH, przygotowano preemulsję lipidów dla każdego z wybranych monoterpenów. W tym celu, zastosowano homogenizator wysokoobrotowy Ultra-Turrax[®] T25 Digital Homogenizer (Ystral GmbH D-7801, Dottingen, Niemcy) przy prędkości 10 000 rpm w czasie 10 minut.

4.2.1.1. Preparatyka SLN inkorporowanych α -pinenem

Stale nanocząstki lipidowe otrzymywano na skutek zdyspergowania fazy lipidowej w wodnym roztworze Poloxameru 188 (1,25; 2,5; 5% wag.) przy użyciu homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco. Fazę lipidową stanowił α -pinen (1% wag.) oraz Imwitor[®] 900 K (2; 4; 8% wag.) zmieszane ze sobą w jednakowej temperaturze 70 °C (tj. 5-10 °C

powyżej temperatury topnienia lipidu). Następnie, tak otrzymaną preemulsję poddano homogenizacji wstępnej za pomocą Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Ystral GmbH D-7801, Dottingen, Niemcy) przy prędkości 10 000 rpm, w czasie 10 minut. Dzięki temu wszystkie składniki zostały poddane silnemu działaniu sił tnących, co w rezultacie doprowadziło do dokładnego wymieszania emulsji. Tak przygotowana makroemulsja lipidowa została kolejno homogenizowana pod ciśnieniem 300 bar przez 30 minut za pomocą homogenizatora Emulsi Flex®-C3 (Avestin, Inc., Ottawa, Kanada).

Skład chemiczny, opracowany na podstawie analizy statystycznej *Experimental Factorial Design* dla wszystkich syntezowanych stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych α -pinenem (α -pinen-SLN) został przedstawiony w tabeli 16.

4.2.1.2. Preparatyka SLN inkorporowanych cytralem

Stale nanocząstki lipidowe ponownie otrzymywano metodą homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco. W tym celu przygotowano fazę lipidową, którą stanowił cytral (1% wag.) oraz Imwitor® 900 K (2; 4; 8% wag.). Oba składniki zmieszano ze sobą w temperaturze 70 °C, która stanowiła 5-10 °C powyżej temperatury topnienia lipidu. Równocześnie przygotowano wodny roztwór Poloxameru 188 (1,25; 2,5; 5% wag.), który podgrzewano do temperatury podobnej do fazy lipidowej. Następnie oba roztwory zmieszano ze sobą, a otrzymaną preemulsję homogenizowano ponownie za pomocą Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Ystral GmbH D-7801, Dottingen, Niemcy) przy prędkości 10 000 rpm, w czasie 10 minut. Po dokładnym wymieszaniu, otrzymaną makroemulsję lipidową homogenizowano pod ciśnieniem 300 bar przez 30 minut z wykorzystaniem homogenizatora Emulsi Flex®-C3 (Avestin, Inc., Ottawa, Kanada).

Skład chemiczny, opracowany na podstawie analizy statystycznej *Experimental Factorial Design* dla wszystkich syntezowanych stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych cytralem (cytral-SLN) został przedstawiony w tabeli 16.

4.2.1.3. Preparatyka SLN inkorporowanych geraniolem

W celu otrzymania stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych kolejnym monoterpenem, ponownie przygotowano dwie fazy: wodną, którą stanowił Poloxamer 188 (1,25; 2,5; 5% wag.) i woda wysoce demineralizowana (Milli-Q® Plus), jak również tzw. lipofaza, która zawierała geraniol (1% wag.) oraz Imwitor® 900 K (2; 4; 8% wag.), zmieszane ze sobą w jednakowej temperaturze 70 °C. Po uzyskaniu przez obie fazy tych samych temperatur, zmieszano je ze sobą, a następnie poddano homogenizacji wstępnej za pomocą Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Ystral GmbH D-7801, Dottingen, Niemcy) przy prędkości 10 000 rpm. Po 10 minutach otrzymano makroemulsję lipidową, którą poddano procesowi homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco. Aby otrzymać nanodyspersję SLN, zastosowano homogenizator Emulsi Flex®-C3, (Avestin, Inc., Ottawa, Kanada) oraz ciśnienie 300 bar przez 30 minut.

Skład chemiczny, opracowany na podstawie analizy statystycznej *Experimental Factorial Design* dla wszystkich syntezowanych stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych geraniolem (geraniol-SLN) został przedstawiony w tabeli 16.

4.2.1.4. Preparatyka SLN inkorporowanych limonenem

Składniki fazy lipidowej, zawierającej limonen (1% wag.) oraz Imwitor® 900 K (2; 4; 8% wag.), zdyspergowano w wodnym roztworze Poloxameru 188 (1,25; 2,5; 5% wag.) w temperaturze 70 °C, będącej o 5–10 °C wyższą od temperatury topnienia lipidu. Po otrzymaniu preemulsji, rozpoczęto homogenizację wstępną. W tym celu zastosowano Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Ystral GmbH D-7801, Dottingen, Niemcy). Prędkość obrotów mieszadła wynosiła 10 000 rpm w ciągu 10 minut. Tym sposobem, otrzymana makroemulsja lipidowa została następnie poddana homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco za pomocą homogenizatora Emulsi Flex®-C3, (Avestin, Inc., Ottawa, Kanada). Dyspersje stałych nanocząstek lipidowych otrzymano po 30 minutach homogenizacji pod ciśnieniem 300 bar.

Skład chemiczny, opracowany na podstawie analizy statystycznej *Experimental Factorial Design* dla wszystkich syntezowanych stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych limonenem (limonen–SLN) został przedstawiony w tabeli 16.

Tabela 16. Skład SLN inkorporowanych monoterpenami.

Skład SLN	Stały lipid	Składnik aktywny	Surfaktant	Woda
	Imwitor® 900 K [% wag.; ± 0,01]	α-Pinen/ Cytral/ Geraniol/ Limonen [% wag.; ± 0,01]	Poloxamer 188 [% wag.; ± 0,01]	Milli-Q® Plus [% wag.; ± 0,01]
Nazwa próbki				
SLN1	2,00	1,00	1,25	95,75
SLN2	8,00	1,00	1,25	89,75
SLN3	2,00	1,00	5,00	92,00
SLN4	8,00	1,00	5,00	86,00
SLN5	4,00	1,00	2,50	92,50
SLN6	4,00	1,00	2,50	92,50
SLN7	4,00	1,00	2,50	92,50

4.2.1.5. Preparatyka SLN bez enkapsulowanego składnika aktywnego (próba odniesienia)

Po przeprowadzeniu analizy statystycznej *Experimental Factorial Design* dla wszystkich syntezowanych SLN nieinkorporowanych monoterpenami dokonano wyboru najbardziej optymalnego składu. Na tej podstawie, przygotowano próbę odniesienia, którą stanowiły „puste–SLN”, tzn. nanocząstki niezawierające substancji aktywnej (monoterpeny). Brak składnika aktywnego (1% wag.) w fazie lipidowej dyspersji SLN, został „uzupełniony” tą samą ilością lipidu.

Tabela 17 przedstawia skład chemiczny dla próby odniesienia, tzn. SLN nieinkorporowane żadnym składnikiem aktywnym (puste–SLN).

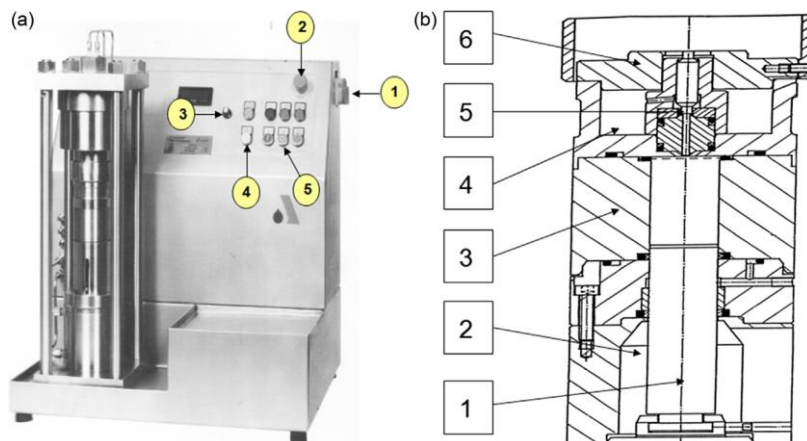
Tabela 17. Skład SLN bez składnika aktywnego.

Skład SLN	Stały lipid	Składnik aktywny	Surfaktant	Woda
Nazwa próbki	Imwitor® 900 K [% wag.; ± 0,01]	BRAK	Poloxamer 188 [% wag.; ± 0,01]	Milli-Q® Plus [% wag.; ± 0,01]
SLN1	3,00	–	1,25	95,75
SLN2	9,00	–	1,25	89,75
SLN3	3,00	–	5,00	92,00
SLN4	9,00	–	5,00	86,00
SLN5	5,00	–	2,50	92,50
SLN6	5,00	–	2,50	92,50
SLN7	5,00	–	2,50	92,50

Ostatecznie skład fazy lipidowej stanowił Imwitor® 900 K (5% wag.), który podgrzano do temperatury 70 °C, a następnie dodano do niego wodny roztwór surfaktantu, zawierający Poloxamer (2,5% wag.), podgrzany do tej samej temperatury co faza lipidowa. Tak otrzymana preemulsja została poddana homogenizacji wstępnej za pomocą Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Ystral GmbH D-7801, Dottingen, Niemcy) przy prędkości 10 000 rpm, w czasie 10 minut. Do syntezy SLN zastosowano metodę homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco z wykorzystaniem homogenizatora Emulsi Flex®-C3, (Avestin, Inc., Ottawa, Canada). Podobnie jak w przypadku syntezy SLN inkorporowanych monoterpenami, ustawiono makroemulsję lipidową homogenizowano pod ciśnieniem 300 bar przez 30 minut.

4.3. Synteza NLC

W ramach niniejszej pracy doktorskiej, NLC inkorporowane retinolem (stabilizowanym Polisorbatem 20, tj. Retinol 50 C) i koenzymem Q₁₀ syntezowano przy użyciu homogenizatora tłokowo-szczelinowego Micron LAB 40 (APV-Gaulin) w Instytucie Farmacji Freie Universität Berlin, w Niemczech (zob. rozdz. 2.5.1, rys. 22), bowiem po przeprowadzeniu licznych syntez i procedur eksperymentalnych, najskuteczniejszą metodą do otrzymywania i optymalizacji NLC inkorporowanych wybranymi składnikami aktywnymi okazała się homogenizacja wysokociśnieniowa na gorąco. Na rysunku 37 przedstawiono schemat budowy homogenizatora tłokowo-szczelinowego zastosowanego w badaniach prezentowanej dysertacji. Z kolei w przypadku enkapsulacji α -tokoferolu w NLC zastosowano homogenizator Panda Plus 2 000 (GEA, Polska), będący na wyposażeniu Pracowni Chemii Stosowanej, Wydziału Chemii UAM w Poznaniu (zob. rozdz. 2.5.1, rys. 21 i 23).



Rysunek 37. Schematyczna budowa homogenizatora tłokowo-szczelinowego Micron LAB 40 (APV-Gaulin) [4]:

- (a) 1: główny przełącznik elektryczny, 2: awaryjny przycisk wyłączania, 3: regulator ciśnienia, 4: przycisk homogenizacji, 5: włączanie, wyłączenie, przyciski awarii;
 (b) 1: tłok, 2: uchwyt tłoka, 3: cylinder, 4: pojemnik zbiorczy, 5: uchwyt zaworu, 6: pokrywa.

4.3.1. Preparatyka NLC inkorporowanych Retinolem 50 C

W ramach niniejszych badań prezentowanej pracy doktorskiej, składniki dla poszczególnych próbek NLC zostały wymienione w tabeli 18.

Tabela 18. Skład półsyntetycznych i organicznych nanostrukturalnych nośników lipidowych.

Nazwa próbki	NLC	Opis składnika	NLC	Opis składnika
Skład	półsyntetyczne		organiczne	
substancja aktywna	Retinol 50 C; INCI: Retinol (and) Polysorbate 20	roztwór kryształów <i>trans</i> -retinolu w Polisorbacie 20 („witamina A ₁ ”)	Retinol 50 C; INCI: Retinol (and) Polysorbate 20	roztwór kryształów <i>trans</i> -retinolu w Polisorbacie 20 („witamina A ₁ ”)
stały lipid	Compritol® 888 ATO	behenian glicerolu (mieszanina mono- (12-18% wag.), di- (45-54% wag.) i tri- (28-32% wag.))	Wosk Carnauba	wosk Carnauba; naturalny wosk roślinny pozyskiwany z liści brazylijskiej palmy kopernicji (<i>Copernicia cerifera</i>)
ciekły lipid	Miglyol 812	frakcjonowany olej kokosowy	MSO	tłoczony na zimno olej z nasion Meadowfoam
surfaktant	Miranol Ultra C32	ultra czysty amfoteryczny SPC, pochodna imidazoliny	Plantacare 2000 UP	decyloglikozydowy niejonowy SPC
woda	Milli-Q® Plus	woda wysoce demineralizowana	Milli-Q® Plus	woda wysoce demineralizowana

Retinol 50 C oraz surfaktant decyloglikozydowy **Plantacare 2000 UP** zostały zakupione od firmy BASF (Ludwigshafen, Niemcy). **Compritol® 888 ATO** został sprowadzony z firmy Gattefossé (Polska). Zimnotłoczony olej z nasion *Limnathes alba* – **MSO** został zakupiony od firmy Natural Plant Products Inc. (Oregon, USA), natomiast **Miglyol 812**, będący mieszaniną estrów nasyconych kwasów tłuszczowych pozyskiwanych z olejów kokosowych i palmowych, nafty, gliceryny (nazwa handlowa: Coco Caprylate/Caprata) został zakupiony od firmy Caelo (Hilden, Niemcy). Pozostałe składniki, tj. **Miranol Ultra C32** oraz naturalny воск roślinny – **Wosk Carnauba**, zostały zakupione od firmy Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Niemcy). Wszystkie odczynniki były analitycznie czyste i zostały użyte bez dalszej obróbki.

Syntezę NLC prowadzono z wykorzystaniem homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco przy użyciu homogenizatora tłokowo-szczelinowego Micron LAB 40 (APV-Gaulin). Proces syntezy prowadzono ostatecznie w 3 cyklach, każdy pod ciśnieniem 500 bar oraz w niezmienniej temperaturze utrzymanej w granicach 85 °C. Warto dodać, że jeden cykl syntezy polegał na „przetłoczeniu” przez szczelinę homogenizatora przygotowanej wcześniej preemulsji lipidów (50 ml). W celu przygotowania preemulsji lipidów zastosowano homogenizator wysokoobrotowy Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Jahnke & Kunkel, Niemcy) przy prędkości 10 000 rpm w czasie 20 sekund.

4.3.1.1. Preparatyka NLC inkorporowanych Retinolem 50 C z wykorzystaniem półsyntetycznego lipidu (Miglyol 812)

Nanostrukturalne nośniki lipidowe otrzymywano na skutek zdyspergowania fazy lipidowej w wodnym roztworze surfaktantu Miranolu Ultra C32 (1,5% wag.) z wykorzystaniem homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco. W zlewce odważano fazę lipidową, którą stanowił Compritol® 888 ATO (10% wag.) oraz Miglyol 812 (4,5% wag.). Oba lipidy mieszano następnie na mieszadle magnetycznym w temperaturze powyżej punktu topnienia behenianu glicerolu (mieszanina mono-, di- i tribehenianów glicerolu, 70 °C). Po osiągnięciu temp. 85 °C, dodano 2% wag. Retinolu 50 C, a następnie wodny roztwór surfaktantu (83,5% wag.). Wszystkie składniki nieustannie mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego. Otrzymaną preemulsję poddano po chwili homogenizacji wstępnej z wykorzystaniem Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Jahnke & Kunkel, Niemcy) przy prędkości 10 000 rpm w czasie 20 sekund. Poddając wszystkie składniki silnemu działaniu sił tnących, otrzymano w ten sposób dokładnie wymieszaną emulsję, która została następnie poddana 3-krotnej homogenizacji pod ciśnieniem 500 bar za pomocą homogenizatora tłokowo-szczelinowego Micron LAB 40 (APV-Gaulin).

Skład chemiczny i ilościowy syntezowanych nanostrukturalnych nośników lipidowych inkorporowanych Retinolem 50 C oraz półsyntetycznym lipidem Miglyol 812 (Ret–NLC/Mig) został przedstawiony w tabeli 19.

4.3.1.2. Preparatyka NLC inkorporowanych Retinolem 50 C z wykorzystaniem naturalnego lipidu (olej z nasion Meadowfoam)

Nanostrukturalne nośniki lipidowe otrzymywano identycznie jak poprzednio; tzn. na skutek zdyspergowania fazy lipidowej w wodnym roztworze surfaktantu Miranolu Ultra C32 (1,5% wag.) z wykorzystaniem homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco. Jedyną różnicą polegała na odważeniu naturalnego lipidu MSO (4,5% wag.) - zamiast jego półsyntetycznego

odpowiednika (Miglyol 812), a następnie na dodaniu go do zlewki z behenianem glicerolu (10% wag.). Oba lipidy mieszano ponownie na mieszadle magnetycznym w temperaturze powyżej punktu topnienia Compritol® 888 ATO. Po osiągnięciu temp. 85 °C, dodano 2% wag. Retinolu 50 C, a następnie wodny roztwór surfaktantu (83,5% wag.). Wszystkie składniki ponownie mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego. W celu dokładnego wymieszania składników, otrzymaną preemulsję poddano homogenizacji wstępnej z wykorzystaniem Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Jahnke & Kunkel, Niemcy) przy prędkości 10 000 rpm w czasie 20 sekund. Następnie zastosowano 3-krotną homogenizację wysokociśnieniową (500 bar) przy użyciu homogenizatora tłokowo-szczelinowego Micron LAB 40 (APV-Gaulin).

Skład chemiczny i ilościowy syntezowanych nanostrukturalnych nośników lipidowych inkorporowanych Retinolem 50 C oraz zimnotłoczonym olejem roślinnym z nasion Meadowfoam (Ret–NLC/MSO) został przedstawiony w tabeli 19.

Tabela 19. Skład NLC inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierające półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid.

Nazwa próbki	Ret–NLC/Mig	Ret–NLC/MSO	Ilość [% wag.; ± 0,01]
Skład			
stały lipid	Compritol® 888 ATO	Compritol® 888 ATO	10,00
ciekły lipid	Miglyol 812	MSO	4,50
substancja aktywna	Retinol 50 C	Retinol 50 C	2,00
surfaktant	Miranol Ultra C32	Miranol Ultra C32	1,50
woda	Milli-Q® Plus	Milli-Q® Plus	82,00

4.3.1.3. *Preparatyka NLC syntezowanych z wyłącznie półsyntetycznych lub organicznych składników oraz inkorporowanych Retinolem 50 C*

Nanostrukturalne nośniki lipidowe, których skład stanowiły wyłącznie składniki półsyntetyczne (NLC półsyntetyczne), jak NLC zbudowane wyłącznie ze składników naturalnych (NLC organiczne) otrzymywano metodą homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco z wykorzystaniem homogenizatora tłokowo-szczelinowego Micron LAB 40 (APV-Gaulin) (2 cykle, 800 bar, 85 °C). Otrzymana wcześniej preemulsja została poddana homogenizacji wysokoobrotowej Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Jahnke & Kunkel, Niemcy) przy prędkości 8 000 rpm w czasie 30 sekund.

Skład fazy lipidowej półsyntetycznych NLC (Ret–NLC/Synt) stanowił Compritol® 888 ATO (10% wag.) i Miglyol 812 (4,5% wag.), które odważono do zlewki o pojemności 50 ml, a następnie umieszczono na mieszadle magnetycznym do momentu stopienia behenianu glicerolu. W kolejnym etapie dodano 1% wag. Retinolu 50 C. Po dokładnym wymieszaniu wszystkich składników dodano 1,5% wag. surfaktantu (Miranol Ultra C32) rozpuszczonego w 83% wag. wody wysoce demineralizowanej (Milli-Q® Plus).

Z kolei skład fazy lipidowej organicznych NLC (Ret–NLC/Org) stanowił Wosk Carnauba (10% wag.) i MSO (4,5% wag.), które także odważono do zlewki o pojemności 50 ml, a następnie umieszczono na mieszadle magnetycznym do momentu stopienia wosku roślinnego. Następnie dodano 1% wag. Retinolu 50 C. Po dokładnym wymieszaniu

wszystkich składników dodano 1,5% wag. surfaktantu (Plantacare 2000 UP) rozpuszczonego w 83% wag. Milli-Q® Plus.

Skład chemiczny i ilościowy zarówno półsyntetycznych, jak i organicznych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C przedstawiono w tabeli 20.

Tabela 20. Półsyntetyczny i organiczny skład NLC inkorporowanych Retinolem 50 C.

Nazwa próbki	Ret–NLC/Synt	Ret–NLC/Org	Ilość [% wag.; ± 0,01]
Skład			
stały lipid	Compritol® 888 ATO	Wosk Carnauba	10,00
ciekły lipid	Miglyol 812	MSO	4,50
substancja aktywna	Retinol 50 C	Retinol 50 C	1,00
surfaktant	Miranol Ultra C32	Plantacare 2000 UP	1,50
woda	Milli-Q® Plus	Milli-Q® Plus	83,00

4.3.2. Preparatyka NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀

W ramach niniejszych badań prezentowanej pracy doktorskiej opracowano metodykę porównującą ponownie dwa rodzaje NLC, zbudowanych wyłącznie z półsyntetycznych lub organicznych składników. Tym razem enkapsulowaną substancją aktywną był koenzym Q₁₀. Wszystkie składniki dla poszczególnych próbek NLC zostały wymienione w tabeli 21.

Tabela 21. Skład półsyntetycznych i organicznych nanostrukturalnych nośników lipidowych.

Nazwa próbki	NLC półsyntetyczne	Opis składnika	NLC organiczne	Opis składnika
Skład				
substancja aktywna	Koenzym Q₁₀ INCI: Ubiquinone	synonimy: CoQ ₁₀ ; Ubichinon; 2,3-dimetoksy-5-metylo-6-poliizoprenylobenzo-1,4 benzochinon	Koenzym Q₁₀ INCI: Ubiquinone	synonimy: CoQ ₁₀ ; Ubichinon; 2,3-dimetoksy-5-metylo-6-poliizoprenylobenzo-1,4 benzochinon
stały lipid	Cutina® CP	palmitynian cetylu	Apifil® CG	wosk pszczeli
ciekły lipid	Miglyol 812	frakcjonowany olej kokosowy	MSO	tłoczony na zimno olej z nasion Meadowfoam
surfaktant	Tego Care 450 INCI: Sorbitan Laurate (and) Polyglyceryl-4 Laurate (and) Dilauryl Citrate	SPC posiadający wysoką stabilność w szerokim zakresie temperaturowym: od 25 do 50 °C	Plantacare 2000 UP	decyloglikozydowy niejonowy SPC
woda	Milli-Q® Plus	woda wysoce demineralizowana	Milli-Q® Plus	woda wysoce demineralizowana

Koenzym Q₁₀ został zakupiony od firmy Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Niemcy). **Cutina® CP** oraz surfaktant decyloglikozydowy **Plantacare 2000 UP** zostały zakupione od firmy BASF (Ludwigshafen, Niemcy). Z kolei surfaktant **Tego Care 450** pochodził z firmy Evonik Nutrition & Care GmbH, BL Personal Care (Niemcy), a wosk pszczeli **Apifil® CG**

został zakupiony od firmy Gattefossé (Hiszpania). Zimnotłoczony olej z nasion *Limnathes alba* – **MSO** został zakupiony od firmy Natural Plant Products, Inc. (Oregon, USA), natomiast **Miglyol 812** został zakupiony od firmy Caelo (Hilden, Niemcy). Wszystkie odczynniki były analitycznie czyste i zostały użyte bez dalszej obróbki.

Syntezę NLC prowadzono ponownie metodą homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco przy użyciu homogenizatora tłokowo-szczelinowego Micron LAB 40 (APV-Gaulin). Proces syntezy prowadzono w 2 cyklach, każdy pod ciśnieniem 800 bar oraz w niezmienniej temperaturze utrzymanej w granicach 85 °C. W celu przygotowania preemulsji lipidów zastosowano homogenizator wysokoobrotowy Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Jahnke & Kunkel, Niemcy) przy prędkości 10 000 rpm w czasie 20 sekund.

4.3.2.1. *Preparatyka NLC syntezowanych z wyłącznie półsyntetycznych lub organicznych składników oraz inkorporowanych koenzymem Q₁₀*

Nanostrukturalne nośniki lipidowe, których skład stanowiły wyłącznie składniki półsyntetyczne (CoQ₁₀–NLC/Synt), jak NLC zbudowane wyłącznie ze składników naturalnych (CoQ₁₀–NLC/Org) otrzymywano metodą homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco z wykorzystaniem homogenizatora tłokowo-szczelinowego Micron LAB 40 (APV-Gaulin) (2 cykle, 800 bar, 85 °C). Otrzymana wcześniej preemulsja została poddana homogenizacji wysokoobrotowej Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Jahnke & Kunkel, Niemcy) przy prędkości 10 000 rpm w czasie 20 sekund.

Skład fazy lipidowej półsyntetycznych NLC stanowił stały lipid Cutina® CP (8% wag.) i Miglyol 812 (2,5% wag.), które odważono do zlewki o pojemności 50 ml, a następnie umieszczono na mieszadle magnetycznym do momentu stopienia palmitynianu cetylu. W kolejnym etapie dodano 2% wag. CoQ₁₀. Po dokładnym wymieszaniu wszystkich składników dodano 1,80% wag. surfaktantu (Tego Care 450) rozpuszczonego w 85,70% wag. wody wysoce demineralizowanej (Milli-Q® Plus).

Z kolei skład fazy lipidowej organicznych NLC stanowił воск pszczeli (8% wag.) i MSO (2,5% wag.), które także odważono do zlewki o pojemności 50 ml, a następnie umieszczono na mieszadle magnetycznym do momentu stopienia wosku roślinnego. Następnie dodano 2% wag. CoQ₁₀. Po dokładnym wymieszaniu wszystkich składników dodano 1,80% wag. surfaktantu (Plantacare 2000 UP) rozpuszczonego w 85,70% wag. Milli-Q® Plus.

Skład chemiczny i ilościowy zarówno półsyntetycznych, jak i organicznych NLC inkorporowanych CoQ₁₀ przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Półsyntetyczny i organiczny skład NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀.

Nazwa próbki	CoQ ₁₀ –NLC/Synt	CoQ ₁₀ –NLC/Org	Ilość [% wag.; ± 0,01]
Skład			
stały lipid	Cutina® CP	Apifil® CG	8,00
ciekły lipid	Miglyol 812	MSO	2,50
substancja aktywna	Koenzym Q ₁₀	Koenzym Q ₁₀	2,00
surfaktant	Tego Care 450	Plantacare 2000 UP	1,80
woda	Milli-Q® Plus	Milli-Q® Plus	85,70

4.3.3. Preparatyka NLC inkorporowanych α -tokoferolem

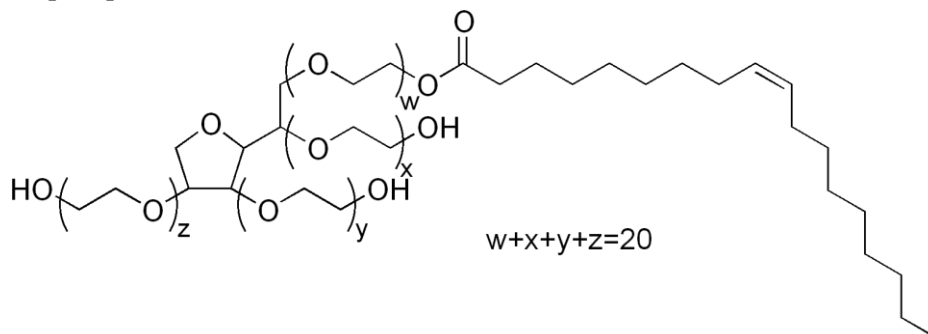
W ramach badań do pracy doktorskiej opracowano również metodykę syntezy nanocząstek lipidowych inkorporowanych α -tokoferolem. W tym celu porównano właściwości fizykochemiczne próbek α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC otrzymanych za pomocą dwóch najpowszechniej stosowanych metod: mikroemulgowania (ME) oraz homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH). Wszystkie składniki dla poszczególnych próbek NLC zostały wymienione w tabeli 23.

Tabela 23. Skład α -tokoferol–NLC otrzymanych za pomocą techniki mikroemulgowania oraz homogenizacji wysokociśnieniowej.

Nazwa próbki	α -T–NLC(ME) / α -T–NLC(HPH)	Opis składnika
Skład		
substancja aktywna	α -Tokoferol	α -tokoferol
stały lipid	Compritol® 888 ATO	behenian glicerolu
ciekły lipid	olej Marula	tłoczony na zimno olej z nasion owoców Marula
surfaktant	Tween 80	monooleinian polioksyetylenosorbitolu
woda	Milli-Q® Plus	woda wysoce demineralizowana

α -Tokoferol został zakupiony od firmy BASF (Ludwigshafen, Niemcy). **Compritol® 888 ATO** został sprowadzony z firmy Gattefossé (Polska). Zimnotłoczony olej z nasion owoców **Marula** otrzymano od firmy Oceanic SA (Polska), natomiast surfaktant **Tween 80** (rys. 38), został zakupiony od firmy Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Niemcy).

W celu otrzymania NLC prowadzono dwie syntezy, do których użyto identyczny skład jakościowy i ilościowy. Różnica polegała na zastosowaniu dwóch odmiennych metod syntezy nanocząstek lipidowych – metody mikroemulgowania (ME) oraz homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH) na gorąco za pomocą homogenizatora Panda Plus 2000 (GEA, Polska), którego schemat i zasadę działania przedstawiono na rys. 21 i 23 (zob. rozdz. 2.5.1). Proces syntezy metodą HPH prowadzono w 3 cyklach, każdy pod ciśnieniem 500 bar oraz w temperaturze utrzymanej w granicach 85 °C. Z uwagi na ultrawysoką wydajność urządzenia Panda Plus 2000, pominięto etap przygotowania preemulsji lipidów przy użyciu homogenizatora wysokoobrotowego Ultra-Turrax® DI 25, co uzasadniono wynikami próbnymi, otrzymanymi po przeprowadzonych próbach z wykorzystaniem obu etapów syntezy NLC [285].

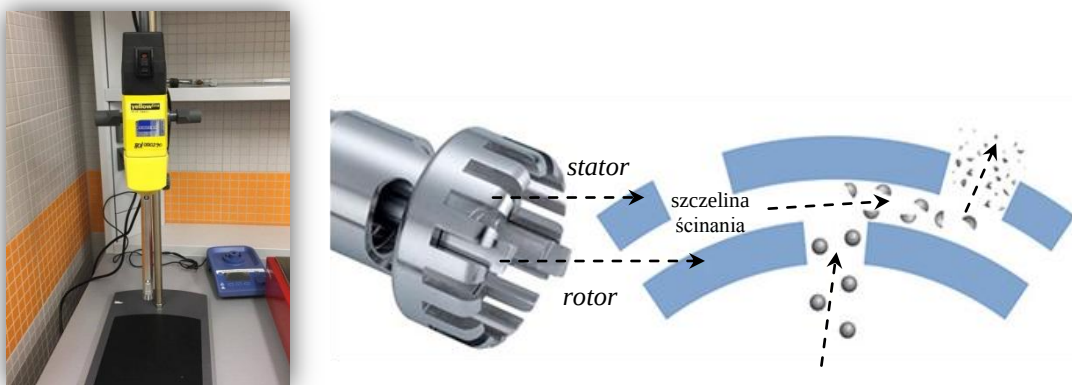


Rysunek 38. Wzór strukturalny monooleinianu polioksyetylenosorbitolu (Tween 80).

4.3.3.1. Dobór optymalnych parametrów procesu HPH przy użyciu homogenizatora Panda Plus 2 000 (liczba cykli, wysokość ciśnienia, homogenizacja wstępna)

Aby dobrać optymalne warunki pomiaru przygotowano 3 identyczne próbki, które następnie poddawano 2-/3- krotnej homogenizacji z wykorzystaniem różnych ciśnień (300, 500, 1 000 bar). Na podstawie otrzymanych wyników zauważono, że najmniejsze średnie wielkości cząstek, wartości PDI oraz ZP uzyskano w wyniku trzykrotnej homogenizacji (różnica wartości Z-Ave wynosiła 32 nm po syntezie nanocząstek oraz 100 nm po 30 dniach) [285] pod ciśnieniem 500 bar. Zastosowanie wyższego ciśnienia tj. 1000 bar spowodowało wzrost Z-Ave dla otrzymanych NLC o 83 nm w porównaniu do wielkości uzyskanych pod ciśnieniem 500 bar. Zjawisko to tłumaczono natychmiastową agregacją cząstek, będącą efektem nadmiernych sił rozdrabniających cząstki przy tak dużym ciśnieniu [285].

Oprócz tego przeprowadzono doświadczenie, w którym zbadano konieczność stosowania homogenizacji wstępnej (Ultra-Turrax® DI 25, rys. 39) w przypadku wysokosprawnego homogenizatora Panda Plus 2 000 (GEA, Polska). W tym celu przygotowano identyczne formułacje próbne, z których jedną poddano wcześniejszej homogenizacji wstępnej, a drugą nie. Otrzymane wyniki Z-Ave wykazały, że zastosowanie homogenizacji wstępnej przed HPH spowodowało wzrost wielkości cząstek o 30 nm [285], natomiast w przypadku PDI nie odnotowano znaczących zmian. Z kolei różnica wartości ZP wynosiła $|\pm 10 \text{ mV}|$, a bardziej stabilne próbki były widoczne po otrzymaniu wcześniejszej preemulsji przy użyciu Ultra-Turrax® DI25. Jednak ostatecznie zdecydowano się pominąć etap homogenizacji wstępnej na korzyść otrzymania mniejszych wielkości cząstek, których niewielki rozmiar ma znaczenie w przypadku skutecznej aplikacji przezskórnej [56, 76].



Rysunek 39. Zasada działania homogenizatora Ultra-Turrax® DI25 Basic firmy IKA® [286].

Dobór optymalnych parametrów procesu homogenizacji wysokociśnieniowej przy użyciu homogenizatora Panda Plus 2 000 (w tym liczba cykli, wysokość ciśnienia, homogenizacja wstępna) przeprowadzono w Pracowni Chemii Stosowanej Wydziału Chemii UAM w Poznaniu w ramach pracy magisterskiej, której byłam opiekunem w roku akademickim 2016/2017 [285].

4.3.3.2. *Preparatyka α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC metodą mikroemulgowania*



Rysunek 40. Myjka ultradźwiękowa Elmasonic X-tra 150 H firmy Elma.

Do zlewki o pojemności 50 ml, umieszczonej na mieszadle magnetycznym, odważono kolejno składniki fazy lipidowej: stały lipid Compritol® 888 ATO (8% wag.), olej Marula (2% wag.) oraz substancję aktywną: α -tokoferol (2% wag.). Wszystkie składniki mieszano do momentu stopienia behenianu glicerolu. Następnie dodano podgrzaną do tej samej temperatury fazę wodną, skład której stanowił Tween 80 (1% wag.) rozpuszczony w 87% wag. wody wysoce demineralizowanej (Milli-Q® Plus). W kolejnym etapie, powstałą emulsję poddano homogenizacji wysokoobrotowej Ultra-Turrax® DI 25 Basic Homogenizer (IKA®, Niemcy) przy prędkości 10 000 rpm w czasie 10 minut. Tak otrzymana preemulsja lipidów została poddana sonifikacji

przez kolejne 10 minut za pomocą myjki ultradźwiękowej Elmasonic X-tra 150 H Elma (rys. 40), a następnie chłodzona w lodzie przez 24 godziny. W rezultacie otrzymano dyspersję nanocząstek lipidowych.

Skład chemiczny i ilościowy NLC inkorporowanych α -tokoferolem otrzymywanych metodą mikroemulgowania przedstawiono w tabeli 24.

4.3.3.3. *Preparatyka α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC metodą homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco*

Skład fazy lipidowej ponownie stanowił stały lipid Compritol® 888 ATO (8% wag.), olej Marula (2% wag.) oraz α -tokoferol (2% wag.), które odważono do zlewki o pojemności 50 ml, a następnie umieszczono na mieszadle magnetycznym do momentu stopienia behenianu glicerolu. Po dokładnym wymieszaniu wszystkich składników dodano wodny roztwór surfaktantu, którego skład stanowił 1% wag. Tweenu 80 (1% wag.) rozpuszczony w 87% wag. wody wysoce demineralizowanej (Milli-Q® Plus), podgrzany do tej samej temperatury co faza lipidowa. Nanostrukturalne nośniki lipidowe otrzymywano metodą homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco z wykorzystaniem homogenizatora Panda Plus 2 000 (3 cykle, 500 bar, 85 °C) z pominięciem etapu przygotowania emulsji wstępnej z wykorzystaniem homogenizacji wysokoobrotowej Ultra-Turrax® DI 25 Basic Homogenizer (IKA®, Niemcy).

Tabela 24. Skład chemiczny i ilościowy NLC inkorporowanych α -tokoferolem otrzymanych za pomocą techniki mikroemulgowania oraz homogenizacji wysokociśnieniowej.

Nazwa próbki	α -T-NLC(ME) / α -T-NLC(HPH)	Ilość [% wag.; $\pm 0,01$]
Skład		
stały lipid	Compritol [®] 888 ATO	8,00
ciekły lipid	olej Marula	2,00
substancja aktywna	α -Tokoferol	2,00
surfaktant	Tween 80	1,00
woda	Milli-Q [®] Plus	87,00

4.3.4. Badania stabilności fizykochemicznej otrzymanych NLC

W celu zbadania stabilności fizycznej i chemicznej, wszystkie przygotowane próbki NLC (Retinol 50 C/CoQ₁₀/ α -Tokoferol) przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C. Otrzymane nanocząstki obserwowano pod mikroskopem optycznym (Leitz Wetzlar, Niemcy) w celu wykrycia potencjalnych aglomeratów. Średnią wielkość cząstek (Z-Ave) i współczynnik polidispersyjności (PDI) otrzymanych NLC mierzono za pomocą spektroskopii korelacji fotonów (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK). Ponadto, rozkład wielkości cząstek mierzono z wykorzystaniem dyfrakcji laserowej (ang. *Light Diffraction*, LD) przeprowadzono przy użyciu urządzenia Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK). Natomiast potencjał zeta składników aktywnych enkapsulowanych w NLC mierzono zarówno w wodzie Milli-Q[®] Plus (pH = 5,5; przewodność 50 μ S/cm), jak i w wodnym roztworze surfaktantu (ang. *original dispersion medium*), stosując ponownie Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Efektywność enkapsulacji substancji czynnej do matrycy lipidowej nanocząstek (ang. *Entrapment Efficiency*) oceniano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Wszystkie pomiary przeprowadzono w dniu syntezy NLC oraz po 3, 7, 15 i 30 dniach przechowywania w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

4.4. Ocena skuteczności działania oleju z nasion Meadowfoam na podstawie testów *in vivo*

Badania nad oceną właściwości i skuteczności działania oleju z nasion Meadowfoam w formułacjach kosmetycznych zostały przeprowadzone głównie w celu sprawdzenia działania na skórę tego naturalnego oleju w postaci składnika aktywnego kremów. Mając na uwadze cel pracy, dotyczący syntezy i charakterystyki nanocząstek lipidowych, postanowiono opracować powtarzalną metodykę NLC z wykorzystaniem naturalnego oleju roślinnego, który najlepiej sprawdziłby się w roli zamiennika dla olejów półsyntetycznych, pełniących rolę matrycy. Tym sposobem, naturalna matryca lipidowa zapewniłaby większą kompatybilność otrzymanych nanocząstek względem skóry, wykazując przy tym dodatkowe działanie, zależne od właściwości zastosowanego oleju. Aby poznać właściwości zimnotłoczonego oleju z nasion Meadowfoam jako substancji czynnej w preparatach kosmetycznych, postanowiono przeprowadzić badania reologiczne kremów, a następnie sprawdzić jak ich działanie wpłynęło na wybrane parametry skóry.

4.4.1. Preparatyka kremów do testów aplikacyjnych

W celu przeprowadzenia testów *in vivo* i dokonaniu oceny skuteczności działania na skórę oleju roślinnego, przygotowano dwa typy kremów, z których jeden zawierał badany składnik aktywny – olej naturalny (np. olej z nasion Meadowfoam), a drugi stanowił próbę referencyjną. Skład obu preparatów przedstawiono w tabeli 25.

Tabela 25. Skład kremów do testów aplikacyjnych.

KREM	Nazwa handlowa	Nazwa chemiczna	Producent	Ilość [% wag., ± 0,01]
I. próba referencyjna 	Creagel® EZ 7	poliakrylamid	Creations Couleur	9,80
		uwodniony polidecen		
		eter laurylowy polioksyetyleny		
	Alphaflow® 20	uwodniony polidecen	Creations Couleur	16,70
	woda	woda destylowana	—	73,50
II. zawierający MSO 	Creagel® EZ 7	poliakrylamid	Creations Couleur	9,40
		uwodniony polidecen		
		eter laurylowy polioksyetyleny		
	Alphaflow® 20	uwodniony polidecen	Creations Couleur	15,90
	Meadowfoam Seed Oil™	olej z nasion Meadowfoam, MSO	Natural Plant Products, Inc.	4,50
	woda	woda destylowana	—	70,20

4.4.1.1. Preparatyka KREMU I (próba referencyjna)

Skład fazy tłuszczowej stanowił Creagel® EZ 7 (9,80% wag.) i Alphaflow® 20 (16,70% wag.) odważone do szklanej zlewki o pojemności 400 ml. Następnie dodano wodę destylowaną (73,50% wag.) i wszystkie składniki mieszano w zlewce do momentu utworzenia konsystencji kremu. Tak przygotowany preparat rozdzielano do mniejszych pojemników kosmetycznych o pojemności 100 ml.

4.4.1.2. Preparatyka KREMU II (zawierającego MSO)

Do szklanej zlewki o pojemności 400 ml odważono Creagel® EZ 7 (9,40% wag.) i Alphaflow® 20 (15,90% wag.) oraz MSO (4,50% wag.). Następnie, do tak przygotowanej fazy tłuszczowej dodano wodę destylowaną (70,20% wag.) i nieustannie mieszano wszystkie składniki do momentu utworzenia konsystencji kremu.

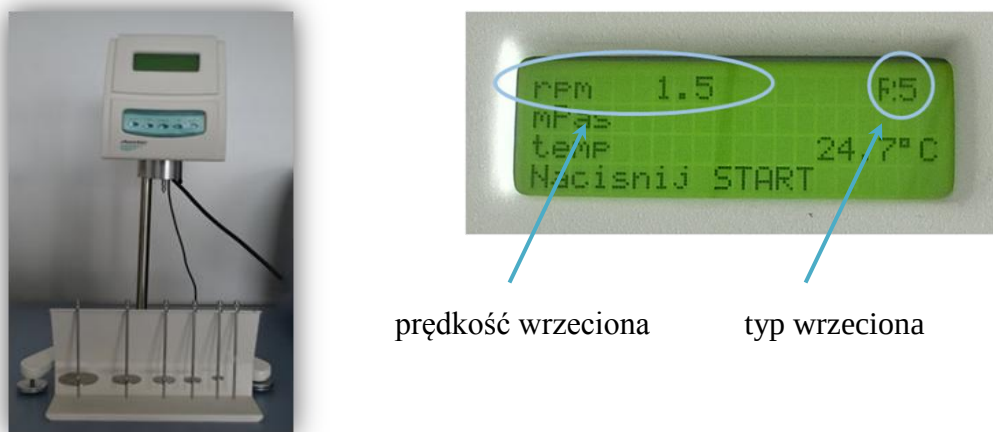
Preparatyka obu kremów została wykonana w Pracowni Chemii Stosowanej Wydziału Chemii UAM w Poznaniu w ramach pracy magisterskiej, której byłam opiekunem w roku akademickim 2014/2015 [24].

Oba preparaty otrzymywano w takich samych warunkach temperatury (22-25 °C) i wilgotności powietrza (40-60%).

4.4.2. Pomiar właściwości fizykochemicznych otrzymanych preparatów do testów *in vivo*

W celu analizy parametrów fizykochemicznych oraz oceny stabilności przygotowanych preparatów kosmetycznych przeprowadzono:

- pomiary pH przy użyciu pehametru z serii EcoSense® – pH 10 pH/Temperature Meter, Pen Style firmy *VMR International*,
- badanie lepkości otrzymanych kremów z wykorzystaniem wiskozymetru rotacyjnego RC02 firmy *Rheotec* (rys. 41),
- analizę rozkładu wielkości cząstek za pomocą laserowego analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 E firmy *Malvern Instruments Ltd*,
- pomiar potencjału zeta za pomocą urządzenia Zetasizer Nano Z firmy *Malvern Instruments Ltd*.



Rysunek 41. Wiskozymetr rotacyjny RC02 firmy *Rheotec*.

Ponadto, aby dokonać oceny stabilności termicznej, przygotowane preparaty przechowywano w trzech różnych temperaturach (4, 25 i 40 °C) przez okres dwóch miesięcy. Wszystkie pomiary, dotyczące właściwości reologicznych badanych formułacji, przeprowadzono za pomocą ww. metod fizykochemicznych zarówno w dniu syntezy (dzień 0), jak i po 7, 15, 30 oraz 60 dniu od dnia ich otrzymania.

W kolejnym etapie przeprowadzono testy aplikacyjne. Badania *in vivo*, wykonywane z udziałem ochotników płci żeńskiej, polegały na aplikacji skórnej kremu I i II, przechowywanych w temperaturze 25 °C [24]. Następnie badano ilość przelnaskórkowej utraty wody (TEWL) za pomocą sondy Tewameter® TM 300 oraz stopień nawilżenia skóry za pomocą sondy Corneometr® CM 825 (obie firmy Courage & Khazaka).

4.4.3. Badania właściwości fizykochemicznych otrzymanych preparatów kosmetycznych

4.4.3.1. Pomiar pH otrzymanych preparatów kosmetycznych

Pomiar pH poległ na zanurzeniu w badanym preparacie elektrody pomiarowej pehametru, a następnie na odczytaniu wartości. Pomiar pH dla każdego badanego kremu przeprowadzono trzykrotnie, a następnie obliczano średnią arytmetyczną.

4.4.3.2. Pomiar lepkości otrzymanych preparatów kosmetycznych

Pomiar lepkości otrzymanych formułacji przeprowadzono za pomocą wiskozymetru RC02 firmy Rheotec, wyposażonego w sześć wrzecion pomiarowych (oznaczonych symbolami R2 – R7). Zasada pomiaru lepkości polegała na zanurzeniu odpowiedniego wrzeciona w badanym kremie, a następnie na doborze parametrów pomiarów, takich jak m.in. symbol czy prędkość wrzeciona. Po naciśnięciu przycisku „START”, urządzenie dokonywało pomiaru, a obliczona wartość lepkości [mPa·s] pojawiała się na wyświetlaczu. Dla każdego badanego kremu przeprowadzono trzykrotny pomiar lepkości, a następnie obliczano średnią arytmetyczną.

4.4.3.3. Analiza rozkładu wielkości cząstek otrzymanych preparatów kosmetycznych

Pomiar rozkładu wielkości cząstek został szczegółowo omówiony w rozdziale 4.6.2. Po pięciu powtórzeniach dla każdego badanego kremu, obliczano średnią arytmetyczną z otrzymanych wyników dla poszczególnych parametrów, tj. d(0,1), d(0,5) oraz d(0,9).

4.4.3.4. Pomiar potencjału zeta otrzymanych preparatów kosmetycznych

Pomiar potencjału zeta został dokładniej omówiony w rozdziale 4.6.1. Wartość ZP była mierzona trzykrotnie podczas jednego cyklu, a następnie została obliczona na podstawie równania Helmholtza-Smoluchowskiego, zawartego w oprogramowaniu systemu. Po zakończeniu pomiarów, obliczono średnią arytmetyczną dla wartości bezwzględnej ZP.

4.4.4. Badania aplikacyjne

4.4.4.1. Pomiar przesnaskórkowej utraty wody (TEWL)

Pomiaru TEWL dokonywano przy użyciu sondy Tewametr[®] TM 300 firmy Courage & Khazaka sprzężonego z jednostką centralną MPA5 oraz z komputerem (rys. 42).



Rysunek 42. Tewametr[®] TM 300 firmy Courage & Khazaka.

Zasada pomiaru polegała na wykonaniu 20-u pomiarów, na każdym badanym obszarze skóry po przyłożeniu sondy do wewnętrznej strony przedramienia. Pomiarów dokonywano na lewym oraz prawym przedramieniu w miejscach aplikacji badanych preparatów. Otrzymane wartości TEWL poddano analizie statystycznej, obliczono średnią arytmetyczną i błąd pomiaru, a następnie interpretowano zgodnie z wynikami przedstawionymi w tabeli 26.

Tabela 26. Interpretacja wyników pomiaru wartości TEWL [24, 99].

TEWL [$\text{g/h}\cdot\text{m}^2$]	Charakterystyka skóry
0 – 10	bardzo zdrowa
10 – 15	zdrowa
15 – 25	normalna
25 – 30	w złym stanie
> 30	w stanie krytycznym

4.4.4.2. Pomiar stopnia nawilżenia skóry

Pomiaru stopnia nawilżenia skóry dokonywano przy zastosowaniu sondy Corneometr[®] CM 825 firmy Courage & Khazaka sprzężonego z jednostką centralną MPA5 oraz z komputerem (rys. 43).



Rysunek 43. Corneometr[®] CM 825 firmy Courage & Khazaka.

Zasada pomiaru polegała na wertykalnym przyłożeniu głowicy sondy pomiarowej do skóry. Pomiar następował na skutek lekkiego „dociśnięcia” głowicy do powierzchni skóry na wewnętrznej stronie przedramienia (lewej i prawej ręki). Na każdym badanym obszarze wykonano w rezultacie 20 pomiarów, a otrzymane wartości poddano analizie statystycznej, obliczono średnią arytmetyczną i błąd pomiaru, a następnie interpretowano zgodnie z wynikami przedstawionymi w tabeli 27.

Tabela 27. Interpretacja wyników pomiaru stopnia nawilżenia skóry [24, 99].

Nawilżenie [CM]	Charakterystyka skóry
< 30	bardzo sucha
30 – 45	sucha
> 45	dostatecznie nawilżona

4.5. Liofilizacja otrzymanych nanocząstek lipidowych

W ramach niniejszej dysertacji, wszystkie otrzymane SLN poddano uprzednio procesowi liofilizacji z wykorzystaniem liofilizatora (*Freeze Dryer Scanvac Cool Safe*, rys. 44) w temperaturze $-54\text{ }^{\circ}\text{C}$ i pod ciśnieniem 0,046 bar, przed wykonaniem dalszych analiz (tj. GC, XRD, DSC, SEM).

Proces liofilizacji polegał na umieszczeniu preparatu w kolbie liofilizacyjnej. Następnie podczas obracania kolby w urządzeniu do tzw. zamrażania skorupowego (ang. *shell freezing device*) próbki ulegały chłodzeniu pod wpływem ciekłego azotu. W rezultacie otrzymane liofilizaty (w formie proszku) dokładnie zabezpieczono przed wchłanianiem wilgoci, aby można je było przechowywać w temperaturze pokojowej, bez chłodzenia. Proces suszenia sublimacyjnego trwał 12 godzin, a otrzymane próbki miały postać białego proszku. Wszystkie liofilizaty SLN przechowywano w temperaturze $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Warto zaznaczyć, że w efekcie suszenia sublimacyjnego, na skutek znacznie zmniejszonej zawartości wody zachodzi hamowanie działania mikroorganizmów, które powodują na ogół rozkład substancji. Tym samym, dzięki procesowi liofilizacji zostało znacząco zmniejszone ryzyko uszkodzenia substancji – w porównaniu z innymi sposobami odwadniania (przy wyższych temperaturach).



Rysunek 44. Liofilizator *Freeze Dryer Scanvac Cool Safe*
[Wydział Chemii UAM w Poznaniu, Zakład Fizyki Chemicznej].

4.6. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych nanocząstek lipidowych

4.6.1. Pomiar wielkości cząstek za pomocą spektroskopii korelacji fotonów oraz pomiar potencjału zeta z wykorzystaniem techniki elektroforetycznego rozpraszania światła

W celu określenia średniej wielkości cząstek (ang. *Z-average*, *Average particle size Z*, *Z-Ave*) oraz współczynnika polidispersyjności (ang. *Polydispersity Index*, *PDI*) w badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej zastosowano spektroskopię korelacji fotonów (PCS). Każda z badanych próbek została poddana analizie za pomocą urządzenia Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), który obejmował zakres wielkości cząstek od 0,3 nm do 10 μm , wiązki laserowej ($\lambda = 633 \text{ nm}$, 4 mW) i detektora światła rozproszonego ustawionego pod kątem 173° (nieinwazyjne rozproszenie wsteczne, NIBS) w celu precyzyjnego wykrycia rozproszonych sygnałów świetlnych o niskiej intensywności mogących pochodzić z mniejszych cząstek.

Przed przystąpieniem do analizy, każdą z dyspersji SLN rozcieńczono 100-krotnie w wodzie wysoce demineralizowanej (Milli-Q[®] Plus, a następnie tak przygotowaną próbkę umieszczano w celce pomiarowej wykonanej z polistyrenu (rys. 45). Celkę napełniano do wysokości pomiędzy 10 – 15 mm. Podczas jednego cyklu przeprowadzono trzykrotny pomiar dla każdej z wartości *Z-Ave* i *PDI*. Po zakończeniu pomiarów, obliczono średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe z uzyskanych wyników.



Rysunek 45. Standardowa celka pomiarowa do pomiaru wielkości cząstek (po lewej), komora pomiarowa urządzenia Zetasizer Nano ZS [w środku; fotografia własna], U-kształtna celka kapilarna (DTS1070) do pomiaru potencjału zeta (po prawej) [238].

Pomiary potencjału zeta (ang. *Zeta Potential*, *ZP*) – określanego często różnicą potencjałów między ośrodkiem dyspersyjnym a stacjonarną warstwą płynu, przyłączoną do zdyspergowanej cząstki – dokonywano ponownie za pomocą urządzenia Zetasizer Nano ZS

(Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Przed przystąpieniem do pomiaru, każdą z dyspersji SLN rozcieńczono 100-krotnie w wodzie wysoce demineralizowanej (Milli-Q® Plus). W następnej kolejności, minimum 1 ml odpowiednio przygotowanej wcześniej próbki przenoszono za pomocą strzykawki do U-kształtnej celki kapilarnej (DTS1070), którą po szczelnym zamknięciu umieszczano w komorze pomiarowej urządzenia (rys. 45). Wartość ZP była mierzona trzykrotnie podczas jednego cyklu, a następnie została obliczona na podstawie równania Helmholtza-Smoluchowskiego, zawartego w oprogramowaniu systemu. Po zakończeniu pomiarów, obliczono średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe z uzyskanych wyników.

4.6.2. Pomiar rozkładu wielkości cząstek za pomocą dyfrakcji laserowej

Za pomocą laserowego analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 E (Malvern Instruments Ltd., UK), przedstawionego na rysunku 46, dokonano analizy rozkładu wielkości cząstek otrzymanych NLC inkorporowanych wybranym składnikiem aktywnym w badaniach niniejszej pracy doktorskiej.



Rysunek 46. Mastersizer 2000E firmy Malvern Instruments Ltd [Wydział Chemii UAM w Poznaniu, Pracownia Chemii Stosowanej].



Aby zapewnić wiarygodny pomiar wyników, przed rozpoczęciem analizy rozkładu wielkości cząstek dokonano pomiaru współczynnika refrakcji badanej próbki za pomocą urządzenia pomiarowego – refraktometr *REFRACTO 30PX* firmy Mettler Toledo (rys. 47).

Rysunek 47. Refraktometr REFRACTO 30 PX firmy Mettler Toledo.

W celu przeprowadzenia pomiaru, do 1000-mililitrowej zlewki wiano około 800 ml wody destylowanej, uruchomiono pompę i ustawiono odpowiednie parametry pomiarowe, takie jak m.in.: prędkość obrotów pompy (1 900 rpm), parametry optyczne próbki, współczynnik RI (ok. 1,34 j.u.) oraz absorpcję promieniowania (ok. 0,001 j.u.). Następnie, do zlewki zawierającej wodę destylowaną stopniowo (kroplami) dodawano badanych

nanodyspersji NLC za pomocą jednorazowej pipety Pasteura, zwracając przy tym uwagę, aby nie przekroczyć zakresu obskurancji (ang. *Laser Obscuration*) wyświetlanej na monitorze w oprogramowaniu urządzenia. Wykonano 5 pomiarów, z których obliczono średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe dla trzech parametrów: $d(0,1)$, $d(0,5)$ oraz $d(0,9)$.

4.6.3. Ocena stabilności chemicznej Retinolu 50 C oraz koenzymu Q₁₀ enkapsulowanego w NLC z wykorzystaniem techniki HPLC

W ramach niniejszej dysertacji opracowano metodykę ilościowego oznaczania efektywności enkapsulacji do matrycy lipidowej nanocząstek (ang. *Entrapment Efficiency*) Retinolu 50 C oraz koenzymu Q₁₀ enkapsulowanych w NLC z wykorzystaniem techniki HPLC. W tym celu zastosowano chromatograf Kroma System 2000 version 1.7 (Kontron Instruments GmbH, Niemcy) wyposażony w automatyczny dozownik próbek (model 560), pompę dostarczającą rozpuszczalnik oraz w detektor UV model 430 (Kontron Instruments SpA, Włochy) przy długości fali 325 nm (Retinol 50 C) oraz 275 nm (CoQ₁₀). Kolumną analityczną była LiChrosphere-60 RP select B 5 (140 x 4 nm) z szybkością przepływu 1 ml/min w 25 °C. Próbkę nanoczątek lipidowych inkorporowanych Retinolem 50 C lub CoQ₁₀ rozpuszczono w acetonitrylu. Faza ruchoma składała się z mieszaniny acetonitrylu i buforu (0,01 M KH₂PO₄) w stosunku 70:30 przy pH = 5,7. Stężenie Retinolu 50 C lub CoQ₁₀ oznaczano za pomocą krzywych kalibracji ($R^2 = 0,99$). Czas retencji Retinolu 50 C wynosił 3,3 minuty, natomiast dla koenzymu Q₁₀ był równy około 8,4 minut.

4.6.4. Badanie stabilności SLN za pomocą analizy separacji odśrodkowej z wykorzystaniem analizatora dyspersji LUMiSizer®

Badanie przyspieszonej analizy stabilności otrzymanych SLN inkorporowanych monoterpenami zostało przeprowadzone z wykorzystaniem urządzenia LUMiSizer® (L.U.M. GmbH, Niemcy). Do rejestrowania zmienności profili transmisyjnych, jak również w celu monitorowania zjawisk niestabilności zostało użyte oprogramowanie SEPView®. W tym celu, badane nanodyspersje umieszczano w celkach pomiarowych w ilości 0,5 ml tak, aby nie dopuścić do powstania pęcherzyków powietrza (rys. 48). Po odpowiednim przygotowaniu próbek, umieszczono je w urządzeniu pomiarowym, poddając prędkości 4 000 rpm.



Rysunek 48. Cele pomiarowe urządzenia LUMiSizer® (L.U.M. GmbH, Niemcy), zawierające dyspersje SLN po przeprowadzonej przyspieszonej analizie stabilności [Zdjęcie wykonane w Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugalia].

W rezultacie dla pojedynczej próbki SLN zarejestrowano 1 000 profili transmisyjnych, w odstępach co 10 sekund. Ponadto, z wykorzystaniem oprogramowania SEPView[®] dla każdej analizowanej próbki wyznaczono indeks niestabilności (ang. *instability index*) oraz obliczono prędkość sedymentacji (ang. *sedimentation velocity*). Badania przeprowadzono zarówno w dniu syntezy SLN, jak i po 24 godzinach, po tygodniu oraz po miesiącu przechowywania próbek w różnych temperaturach (4, 25 i 40 °C).

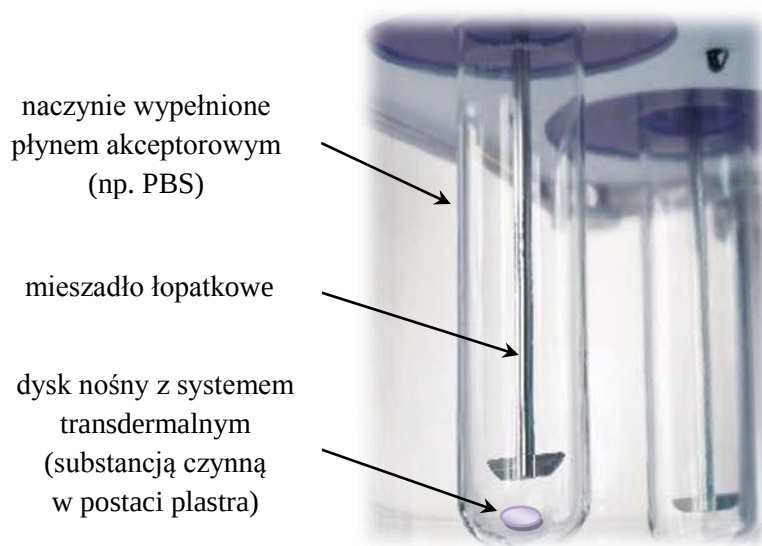
4.6.5. Badanie kinetyki uwalniania monoterpenów inkorporowanych do SLN za pomocą komór dyfuzyjnych Franza

W pracy przeprowadzono także badania kinetyki uwalniania SLN inkorporowanych monoterpenami. W tym celu zostały użyte komory dyfuzyjne Franza, wykonane z dwóch części szkła borokrzemianowego: komór donorowych i akceptorowych.

Membrany celulozowe o średniej wielkości porów 0,22 µm (Merck KGaA, Niemcy) moczono przez kilka godzin w świeżo przygotowanej soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) o pH = 7,40, zanim umieszczono ją w obszarze dyfuzji receptora. Następnie, dyspersje SLN, zawierające 1% wag. każdego z inkorporowanych monoterpenów (α -pinen, cytral, geraniol oraz limonen), naniesiono w ilości 1 ml na odpowiednio uwodnioną wcześniej membranę. Komorę receptorową, zawierającą 5 ml buforu, utrzymywano w temperaturze 37 °C podczas całego doświadczenia. Aby zapobiec parowaniu PBS, wszystkie porty do pobierania próbek zostały zamknięte parafilmem. Następnie w określonych odstępach czasu (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h), pobierano za pomocą strzykawki 200 µl każdej z próbek i tę samą objętość natychmiast zastępowano PBS. Zawartość każdej komory nieustannie mieszało mieszadło magnetyczne. Ilość uwolnionych monoterpenów analizowano za pomocą spektroskopii UV-Vis z wykorzystaniem Synergy[™] HT Multi-Mode Microplate Reader, przy określonej długości fali dla każdego składnika aktywnego, tj. α -pinen przy 230 nm, cytral przy 280 nm, geraniol przy 290 nm i limonen przy 290 nm.

4.6.6. Badanie kinetyki uwalniania koenzymu Q₁₀ enkapsulowanego w NLC za pomocą aparatu łopatkowego z dyskiem nośnym

Badanie uwalniania koenzymu Q₁₀ z NLC przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu łopatkowego z dyskiem nośnym (rys. 49) USP Dissolution Apparatus 2 (USP, 1995). Ilość uwolnionej substancji czynnej badano za pomocą testu *Pharma model PTW S III* (Pharma Test Apparatebau AG, Niemcy) wyposażonego w sześć naczyń. Do każdego naczynia zawierającego roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanem(V) (PBS o pH = 7,50) o objętości 900 ml (szybkość mieszania = 100 obrotów na minutę; temperatura = 37 °C) dodano 1 ml zawiesiny NLC. Następnie, w określonych odstępach czasu (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h) z każdego naczynia pobierano 200 µl próbki CoQ₁₀-NLC, a pobraną objętość zastępowano PBS. Stężenie uwolnionego CoQ₁₀ oceniano za pomocą HPLC.



Rysunek 49. Aparat łopatkowy z dyskiem nośnym [287].

4.6.7. Efektywność enkapsulacji inkorporowanych monoterpenów z wykorzystaniem chromatografii gazowej

W ramach pracy doktorskiej opracowano metodykę ilościowego oznaczania monoterpenów inkorporowanych do nanocząstek lipidowych. W tym celu obliczono efektywność enkapsulacji (ang. *Encapsulation Efficiency, EE*), która pomogła określić ilość ostatecznie znajdującego się w SLN monoterpenu [g], w stosunku do jego początkowo inkorporowanej ilości [g].

Badania rozpoczęto od przygotowania krzywych kalibracyjnych dla wszystkich badanych substancji. W tym celu sporządzono roztwory wzorcowe każdego analizowanego monoterpenu poprzez rozpuszczenie go w ilości 0,1 g w 1,5 ml etanolu (EtOH). Następnie roztwory umieszczono w myjce ultradźwiękowej (Ultrasonic Cleaner Elmasonic X-tra 50H) w temperaturze 40 °C przez 15 minut. W celu wyznaczenia krzywej kalibracyjnej, każdy monoterpen rozpuszczono w EtOH, aby otrzymać roztwory o stężeniach: 0,25; 0,5; 0,75; 1 i 2% wag. Świeżo przygotowane roztwory analizowano kolejno za pomocą techniki chromatografii gazowej (ang. *Gas Chromatography, GC*). Aby obliczyć efektywność enkapsulacji monoterpenów inkorporowanych do SLN, zastosowano poniższe równanie 4 [288, 289]:

$$EE [\%] = \frac{\text{masa (g) inkorporowanego monoterpenu}}{\text{masa (g) odważonego monoterpenu}} \times 100 \quad (4)$$

W badaniach z wykorzystaniem GC ustalono parametry analityczne, które zostały zestawione w tabeli 28.

Tabela 28. Parametry analityczne chromatografii gazowej.

dozownik		
temperatura dozownika		300 °C
piec kolumny		
narost temperatury [°C/min]	temperatura [°C]	czas [min]
początkowy	100	2:00
2	140	8:50
10	280	1:50
całkowity czas: 32:00 min		
detektor		
temperatura detektora		350 °C

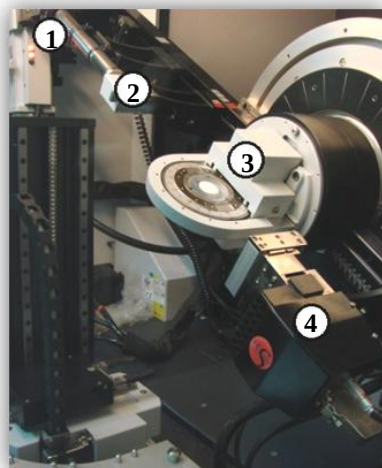
Efektywność enkapsulacji oznaczono za pomocą chromatografu gazowego firmy VARIAN CP-3800 GC zaopatrzonego w automatyczny podajnik próbek, detektor płomieniowo-jonizacyjny (ang. *Flame Ionization Detector*, FID), 30-metrową kolumnę o średnicy wewnętrznej 0,530 mm VF-5 MS. Szybkość przepływu gazu nośnego - helu wynosiła 8 cm³ na minutę.

4.6.8. Analiza krystaliczności matrycy lipidowej SLN za pomocą dyfrakcji monochromatycznego promieniowania rentgenowskiego

W ramach niniejszej pracy dokonano analizy krystaliczności otrzymanych nanocząstek lipidowych inkorporowanych monoterpenami. Badania zostały wykonane w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej (ŚLUACH) na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu.

Krystaliczną strukturę wszystkich SLN (inkorporowanych lub nie monoterpenami) analizowano za pomocą dyfraktometru proszkowego z promieniowaniem rentgenowskim (Bruker D8 Advance), który został wyposażony w monochromator Johanssona ($\lambda_{\text{Cu-K}\alpha 1} = 0,15406 \text{ nm}$) i detektor półprzewodnikowy paskowy (192 paski) LynxEye (rys. 50). Wszystkie badane próbki zostały poddane uprzednio procesowi liofilizacji. Następnie, wprowadzano je do obszaru pomiarowego za pomocą automatycznego dozownika oraz skanowano w dwóch zakresach z wykorzystaniem promieniowania Cu-K α :

- w zakresie niskich kątów (SAXD: 0,6° – 0,8°) z szybkością skanowania 0,02°/3s,
- w zakresie wysokich kątów (WAXD: 6° – 60°) z szybkością skanowania 0,05°/1s.



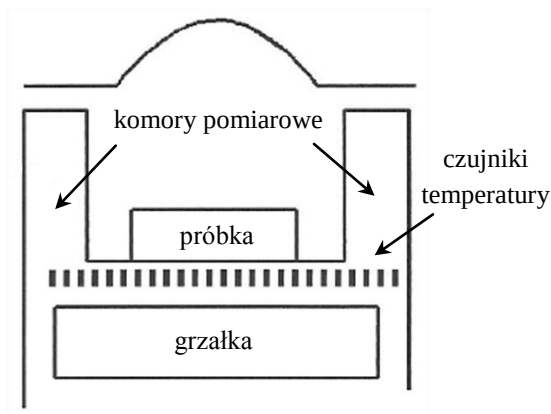
1. lampa rentgenowska z monochromatorem
2. szczeliny Sollera
3. stolik z próbką
4. detektor półprzewodnikowy paskowy

Rysunek 50. Dyfraktometr Bruker D8 Advance w trakcie wykonywania pomiaru [290]
[Wydział Chemii UAM w Poznaniu, ŚLUACH].

4.6.9. Badania temperatury przejść fazowych za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej

W pracy określono również temperatury przejść fazowych lipidów, wchodzących w skład SLN, stosując w tym celu różnicową kalorymetrię skaningową (DSC). Badania zostały przeprowadzone w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej (ŚLUACH) na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu.

W celu przeprowadzenia analiz, zastosowano różnicowy kalorymetr skaningowy (DSC XP-10, THASS, rys. 51) wykorzystujący strumień cieplny i czułość kalorymetryczną ($1 \mu\text{W}$) oraz czułość termometryczną. Temperaturę pieca mierzono za pomocą platynowego czujnika PT 100, który zapewniał znacznie większą dokładność i rozdzielczość niż inne powszechnie stosowane termopary. Aby opisać stan krystaliczności SLN inkorporowanych wybranym monoterpenem, próbki stopniowo ogrzano, a następnie schłodzono w aparacie DSC po to, by móc następnie umożliwić porównanie termogramów DSC. Tym samym wszystkie próbki skanowano w temperaturze od 20 do 120 °C z szybkością ogrzewania 5 °C/min oraz od 120 do 20 °C z szybkością chłodzenia -5 °C/min (z okresem próbkowania 0,5 s). Stałe nanocząstki lipidowe, które nie były inkorporowane składnikiem aktywnym zostały użyte jako próbki odniesienia.



Rysunek 51. Schematyczna budowa kalorymetru skaningowego (po lewej).
Różnicowy kalorymetr skaningowy DSC XP-10 (THASS)
[Wydział Chemii UAM w Poznaniu, ŚLUACH] [291].

4.6.10. Analiza morfologii nanocząstek za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)



Morfologię nanocząstek lipidowych określono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, *Carl Zeiss SMT Evo Series*) (rys. 52). Zdjęcia zostały wykonane w Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej na Wydziale Biologii UAM w Poznaniu.

W tym celu próbki umieszczono na powleczonej węglem kratownicy miedzianej o 400-u oczkach. Pod wpływem wiązki elektronów próbka emitowała różne sygnały, które odbierane były przez detektor, a odebrany sygnał przetwarzany był na obraz próbki.

Rysunek 52. Skaningowy mikroskop elektronowy *Carl Zeiss SMT Evo Series* [Wydział Biologii UAM w Poznaniu].

4.7. Badania *in vitro* otrzymanych nanocząstek inkorporowanych monoterpenami

W ramach niniejszej dysertacji badano aktywność przeciwzapalną wybranych monoterpenów enkapsulowanych w SLN. W tym celu użyto adherentnych komórek RAW 264.7 - makrofagów myszy monocytowych (ang. *mouse monocyte macrophages*), wywołanych przez wirusa mysiej białaczki (dosł. transformowany wirus mysiej białaczki Abelsona), które zostały zakupione w firmie Cell Lines Services, w Eppelheim (Niemcy). Ponadto, na przykładzie cytralu, przedstawiono badania wpływu monoterpeny na żywotność komórek. W tym celu użyto modelu komórkowego skóry człowieka tj. linii komórkowej nienowotworowej HaCaT (Cell Line Service, Eppelheim, Niemcy), jak również modelu guza nowotworowego płaskokomórkowego, tj. linii komórkowej nowotworowej A431 (Cell Lines Services, Eppelheim, Niemcy).

Wszystkie linie komórkowe były utrzymywane w specjalnym medium do hodowli komórek, tj. modyfikowanej pożywce Eagle'a Dulbecco (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) z dodatkiem 10% obj. płodowej surowicy bydlęcej (ang. *Fetal Bovine Serum*, FBS), antybiotyków (100 jednostek/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny) oraz 1 mm L-glutaminy w warunkach: 5% obj. CO₂/95% obj. powietrza, w temperaturze 37 °C przy kontrolowanej wilgotności.

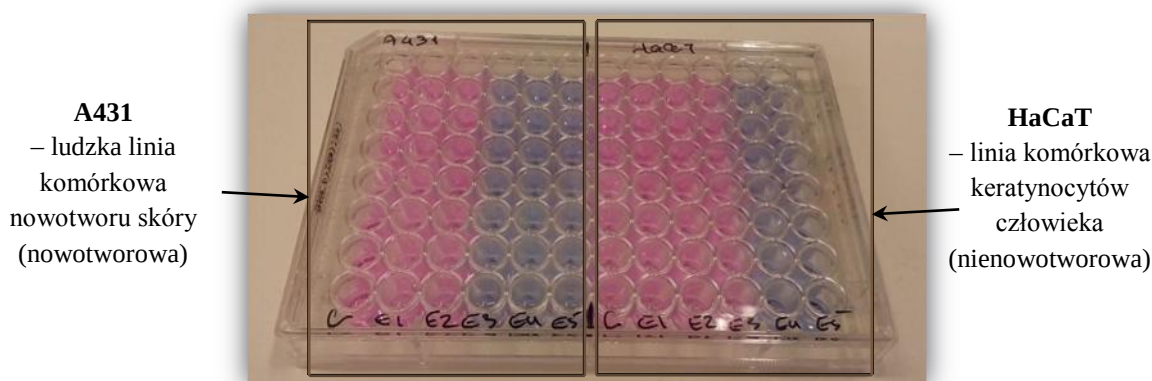
4.7.1. Badanie aktywności przeciwzapalnej monoterpenów

W pracy przeprowadzono badania dotyczące działania przeciwzapalnego wybranych monoterpenów – cytralu i geraniolu, w stymulowanych lipopolisacharydem (Sigma-Aldrich, USA) komórkach RAW 264.7, wysianych w 96-studzienkowej mikropłytkę. Roztwór wyjściowy lipopolisacharydu (LPS), służący do indukowania ekspresji NO w komórkach RAW 264.7, przygotowano przez rozpuszczenie 1,0 mg LPS w 1 ml dimetylosulfotlenku (ang. *Dimethyl Sulfoxide*, DMSO, (CH₃)₂SO; Sigma-Aldrich, USA). Otrzymany roztwór wytrząsano do momentu całkowitego rozpuszczenia.

W celu zbadania aktywności przeciwzapalnej wybranych monoterpenów, cytral i geraniol rozcieńczono dimetylosulfotlenkiem (ang. *Dimethyl Sulfoxide*, DMSO, (CH₃)₂SO; Sigma-Aldrich, USA) o końcowym roztworze 0,4% obj. DMSO. Pożywkę do hodowli komórek pobrano kolejno z każdej studzienki i dodano 50 µl supernatantu. Tak przygotowane roztwory przeniesiono na nową 96-studzienkową płytkę, do której dodano tę samą objętość odczynnika Griessa: 0,1% wag./obj. N-(1- Naftylo)etylenodiaminy chlorowodoru i 1% obj. sulfanilamidu wytworzonego w 5% wag./obj. H₃PO₄ (Sigma-Aldrich, USA). Po 10 minutach inkubacji w ciemności, zmierzono absorbancję przy długości fali 550 nm za pomocą czytnika mikropłatek Multiskan EX (MTX Lab Systems, USA). Dla porównania przeprowadzono również próbę bez stymulacji 1 µg/ml LPS.

4.7.2. Badanie cytotoksyczności za pomocą testu kolorymetrycznego z wykorzystaniem resazuryny (Alamar Blue®, AB)

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono również testy cytotoksyczności, które rozpoczęto od przygotowania podłoża do hodowli komórek (DMEM), ponownie z dodatkiem 10% obj. FBS, antybiotyków (100 jednostek/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny) oraz 1 mm L-glutaminy w warunkach: 5% obj. CO₂/95% obj. powietrza, w temperaturze 37 °C i przy kontrolowanej wilgotności. Następnie za pomocą trypsyny, komórki HaCaT (nienowotworowe) oraz A431 (nowotworowe) oddzielono od płatków hodowlanych i wysiewano na 96-studzienkowych płytkach do hodowli tkankowej przy gęstości wynoszącej 5×10^4 komórek/ml, w objętości 100 µl na studzienkę (rys. 53).



Rysunek 53. Badanie cytotoksyczności cytralu na dwóch modelach komórkowych skóry: nienowotworowym HCaT oraz nowotworowym A431
[Zdjęcie wykonane w Departamentos de Biologia e Ambiente da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugalia].

Każdy z wybranych monoterpénów enkapsulowanych w SLN rozcieńczono za pomocą DMSO (Sigma-Aldrich, USA) o końcowym roztworze 0,4% obj. DMSO. Pożywkę do hodowli komórek pobrano kolejno z każdej studzienki i dodano 100 µl testowanych roztworów. Tym sposobem komórki wystawiono na działanie badanych roztworów na okres 24 godzin. Po czasie ekspozycji, uzyskano roztwory testowe i w końcowym etapie dodano 100 µl roztworu AB (Invitrogen, Alfacene, Portugalia), rozcieńczonego w 10% obj. DMEM. Po 5 godzinach ekspozycji na AB, zmierzono absorbancję w czytniku mikropłytek Multiskan EX (MTX Lab Systems, USA) przy długości fali 570 nm oraz 620 nm. Redukcja AB została obliczona przy użyciu następującego równania 5 [292, 293]:

$$\% \text{ redukcja AB} = \frac{(\varepsilon_{ox} \lambda_2)(A \lambda_1) - (\varepsilon_{ox} \lambda_1)(A \lambda_2)}{(\varepsilon_{red} \lambda_1)(A' \lambda_2) - (\varepsilon_{red} \lambda_2)(A' \lambda_1)} \times 100 \quad (5)$$

gdzie:

$(\varepsilon_{ox} \lambda_1)$ – molowy współczynnik ekstynkcyjności utlenionego AB przy 570 nm,

$(\varepsilon_{ox} \lambda_2)$ – molowy współczynnik ekstynkcyjności utlenionego AB przy 620 nm,

$(\varepsilon_{red} \lambda_1)$ – molowy współczynnik ekstynkcyjności zredukowanego AB przy 570 nm,

$(\varepsilon_{red} \lambda_2)$ – molowy współczynnik ekstynkcyjności zredukowanego AB przy 620 nm,

$(A\lambda_1)$ i $(A\lambda_2)$ – absorbancja studzienek testowych odpowiednio przy 570 i 620 nm,
 $(A'\lambda_1)$ i $(A'\lambda_2)$ – absorbancja studzienek kontroli negatywnej odpowiednio przy 570 i 620 nm.

Otrzymane rezultaty stanowiły żywotność komórek, wyrażoną w procentach kontroli, będącą jednocześnie średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń ($n = 4$) $\pm$ odchylenia standardowe. Wyniki wyrażono średnią arytmetyczną, obliczono odchylenie standardowe, a następnie dokonano analizy statystycznej za pomocą testu ANOVA, jak również przeprowadzono porównania wielokrotne za pomocą tzw. poprawki Bonferroniego (testy *post-hoc*), stanowiące dodatkowe testy dla analizy wariancji. Wszystkie wykresy i analizę statystyczną przeprowadzono w oprogramowaniu GraphPad Prism[®] wersja 6.00 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornia, USA). Wartość $p < 0,05$ została uznana za istotną statystycznie.

WYNIKI BADAŃ I ICH DYSKUSJA

CZEŚĆ I

STAŁE NANOCZĄSTKI LIPIDOWE (SLN) INKORPOROWANE MONOTERPENAMI

5. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA (cz. 1 – SLN)

5.1. Dobór lipidów dla monoterpenu

W celu wyboru najodpowiedniejszego lipidu, przeprowadzono *lipid screening* z wykorzystaniem 8 różnych lipidów stałych (zob. rozdz. 4.1.1., tab. 12) dla każdej z badanych substancji aktywnych. Wśród wybranych ostatecznie lipidów znalazł się:

- Compritol® 888 ATO (temp. topnienia = 70 °C)
- Dynasan® 116 (temp. topnienia = 61 – 65 °C)
- Dynasan® 118 (temp. topnienia = 70 – 73 °C)
- Dynasan® P 60 (F) (temp. topnienia = 68 °C)
- Imwitor® 900 K (temp. topnienia = 54 – 64 °C)
- Kolliwax® GMS II (temp. topnienia = 58 – 61 °C)
- Precirol® ATO 5 (temp. topnienia = 55 – 66 °C)
- Witepsol® E85 (temp. topnienia = 31 – 33 °C)

Po dokonaniu obserwacji rozpuszczalności każdego monoterpenu w określonych odstępach czasu (15 min, 30 min, 1 h, 24 h, 72 h), otrzymane rezultaty przedstawiono w tabelach 29-32.

5.1.1. Dobór odpowiedniego lipidu dla α -pinenu

Stosunek wszystkich testowanych lipidów w połączeniu z α -pinenem w stosunku 1:100, obserwowanych w określonych odstępach czasu przedstawiono w tabeli 29.

Tabela 29. Dobór lipidu dla α -pinenu.

Nazwa lipidu + α -pinen (stosunek 1:100)	Rozpuszczalność α -pinenu (obserwacja wzrokowa)				
	15 min	30 min	1 h	24 h	72 h
Compritol® 888 ATO	☑	☑	☑	☑	☑
Dynasan® 116	☒	☒	☒	☒	☒
Dynasan® 118	☒	☒	☒	☒	☒
Dynasan® P 60 (F)	☑	☑	☑	☑	☒
Imwitor® 900 K	☑	☑	☑	☑	☑
Kolliwax® GMS II	☒	☒	☒	☒	☒
Precirol® ATO 5	☒	☒	☒	☒	☒
Witepsol® E85	☑	☑	☑	☑	☒

☒ - nierozpuszczalny; ☑ - rozpuszczalny

Tabela 29 przedstawia rozpuszczalność α -pinenu w każdym z testowanych lipidów. Warto zwrócić uwagę, że w ciągu pierwszych 15 minut od momentu przekroczenia temperatury topnienia, charakterystycznej dla każdego z analizowanych lipidów (tab. 13), α -pinen był rozpuszczalny w czterech lipidach (Compritol® 888 ATO, Dynasan® P 60 (F),

Imwitor[®] 900 K oraz Witepsol[®] E85). W ciągu kolejnych 30 minut i zestaleniu lipidów, wszystkie cztery mieszaniny pozostawały jednorodne. Wskazywało to na dobre powinowactwo lipidów do badanej substancji aktywnej. Efekt ten utrzymywał się w ciągu 24 h. W rezultacie najwyższą kompatybilnością względem α -pinenu odznaczał się Compritol[®] 888 ATO oraz Imwitor[®] 900 K.

α -Pinen jest przykładem związku niepolarnego z grupy węglowodorów, dlatego może być łatwo rozpuszczalny w związkach posiadających łańcuchy alkilowe. Uzasadnia to fakt, że Compritol[®] 888 ATO (dibehenian gliceryny) mógłby być również potencjalnym, odpowiednim lipidem stałym do syntezy SLN inkorporowanych tym monoterpenem.

5.1.2. Dobór odpowiedniego lipidu dla cytralu

Stosunek wszystkich testowanych lipidów w połączeniu z cytralem w stosunku 1:100, obserwowanych w określonych odstępach czasu przedstawiono w tabeli 30.

Tabela 30. Dobór lipidu dla cytralu.

Nazwa lipidu + cytral (stosunek 1:100)	Rozpuszczalność cytralu (obserwacja wzrokowa)				
	15 min	30 min	1 h	24 h	72 h
Compritol [®] 888 ATO	☒	☒	☒	☒	☒
Dynasan [®] 116	☑	☑	☑	☒	☒
Dynasan [®] 118	☒/☑	☑	☑	☒/☑	☒/☑
Dynasan [®] P 60 (F)	☒	☒	☒	☒	☒
Imwitor [®] 900 K	☒/☑	☒/☑	☒/☑	☑	☑
Kolliwax [®] GMS II	☒	☒	☒	☒	☒
Precirol [®] ATO 5	☒	☒	☒	☒/☑	☒/☑
Witepsol [®] E85	☒	☒	☒	☒	☒

☒ - nierozpuszczalny; ☑ - rozpuszczalny; ☒/☑ - trudno rozpuszczalny (lub rozpuszczalny po dłuższym czasie)

W tabeli 30 przedstawiono przebieg rozpuszczalności cytralu w każdym z testowanych lipidów. Warto zauważyć, że w przeciwieństwie do α -pinenu, cytral był nierozpuszczalny lub trudno rozpuszczalny w większości lipidów od momentu osiągnięcia przez nich temperatury topnienia (tab. 13). W ciągu pierwszych 15 minut, monoterpen rozpuszczał się jedynie w tripalmitynianie glicerolu (Dynasan[®] 116) oraz początkowo słabo jeszcze w dwóch lipidach, tj. Dynasan[®] 118 oraz Imwitor[®] 900 K. W ciągu kolejnych minut, rozpuszczalność cytralu poprawiła się jedynie w przypadku Dynasanu[®] 118, natomiast dla pozostałych lipidów nie zaobserwowano większych zmian. Dopiero po czasie 24 h, pojawiły się zauważalne zmiany w przypadku obu tripalmitynianów glicerolu (Dynasan[®] 116 oraz Dynasan[®] 118), które zaczęły wykazywać coraz słabsze powinowactwo w stosunku do cytralu, podczas gdy odwrotna sytuacja miała miejsce dla Imwitoru[®] 900 K. Ten monostearynian glicerolu okazał się w rezultacie najbardziej kompatybilnym lipidem w połączeniu z cytralem.

5.1.3. Dobór odpowiedniego lipidu dla geraniolu

Stosunek wszystkich testowanych lipidów w połączeniu z geraniolem w stosunku 1:100, obserwowanych w określonych odstępach czasu przedstawiono w tabeli 31.

Tabela 31. Dobór lipidu dla geraniolu.

Nazwa lipidu + geraniol (stosunek 1:100)	Rozpuszczalność geraniolu (obserwacja wzrokowa)				
	15 min	30 min	1 h	24 h	72 h
Compritol [®] 888 ATO	☒/☑	☒/☑	☒/☑	☑	☑
Dynasan [®] 116	☒	☒	☒	☒	☒/☑
Dynasan [®] 118	☒	☒	☒	☒	☒
Dynasan [®] P 60 (F)	☒	☒	☒	☒/☑	☒/☑
Imwitor [®] 900 K	☑	☑	☑	☑	☑
Kolliwax [®] GMS II	☒/☑	☒/☑	☒/☑	☒/☑	☒/☑
Precirol [®] ATO 5	☒	☒	☒	☒/☑	☒/☑
Witepsol [®] E85	☒	☒	☒	☒	☒

☒ - nierozpuszczalny; ☑ - rozpuszczalny; ☒/☑ - trudno rozpuszczalny (rozpuszczalny po dłuższym czasie)

Tabela 31 przedstawia rozpuszczalność geraniolu, po zmieszaniu go z każdym z testowanych lipidów. W przypadku tego monoterpenu zaobserwowano, że od momentu stopienia lipidów jedynie Imwitor[®] 900 K tworzył z geraniolem mieszaninę jednorodną. Ponadto, cytral rozpuścił się początkowo słabo również w dwóch innych lipidach (Compritol[®] 888 ATO oraz Kolliwax[®] GMS II). W ciągu kolejnych minut i godzin nie zauważono żadnych zmian. Dopiero po 24 h okazało się, że oprócz Imwitoru[®] 900 K, także Compritol[®] 888 ATO jest kompatybilnym lipidem wobec geraniolu, podczas gdy lipidy takie jak Dynasan[®] P 60 (F), Kolliwax[®] GMS II czy Precirol[®] ATO 5 mogą jedynie częściowo rozpuszczać ten monoteren. Rezultaty te utrzymywały się w ciągu kolejnych godzin obserwacji.

5.1.4. Dobór odpowiedniego lipidu dla limonenu

Stosunek wszystkich testowanych lipidów w połączeniu z limonenem w stosunku 1:100, obserwowanych w określonych odstępach czasu przedstawiono w tabeli 32.

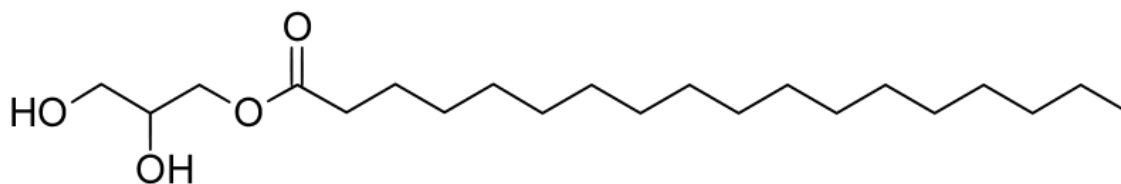
Tabela 32. Dobór lipidu dla limonenu.

Nazwa lipidu + limonen (stosunek 1:100)	Rozpuszczalność limonenu (obserwacja wzrokowa)				
	15 min	30 min	1 h	24 h	72 h
Compritol® 888 ATO	☑	☑	☑	☑	☑
Dynasan® 116	☑	☑	☒	☒	☒
Dynasan® 118	☑	☑	☑	☑	☒/☑
Dynasan® P 60 (F)	☑	☑/☒	☒	☒	☒
Imwitor® 900 K	☑	☑	☑	☑	☑
Kolliwax® GMS II	☑	☒	☒	☒	☒
Precirol® ATO 5	☑	☑/☒	☒	☒	☒
Witepsol® E85	☑	☑	☑	☑	☒

☒ - nierozpuszczalny; ☑ - rozpuszczalny; ☒/☑ - trudno rozpuszczalny (rozpuszczalny po dłuższym czasie)

Z kolei w tabeli 32 przedstawiono kompatybilność każdego z testowanych lipidów w stosunku do limonenu. Monoterpen ten okazał się początkowo rozpuszczalny we wszystkich badanych lipidach, jednak po 30 minutach obserwacji od momentu stopienia lipidów, zauważono pierwsze zmiany w fiolce z trzema lipidami; a mianowicie Dynasan® P 60 (F) oraz Precirol® ATO 5 jako pierwsze spośród wszystkich lipidów zaczęły wykazywać coraz słabszą przystawalność względem limonenu. W dodatku, w fiolce zawierającej Kolliwax® GMS II, monoterpen przestał się rozpuszczać. Po godzinie, podobne zmiany dotyczące coraz słabszej rozpuszczalności limonenu były także widoczne w przypadku innych lipidów, takich jak Dynasan® 116, Dynasan® P 60 (F) i Precirol® ATO 5. W ciągu kolejnych godzin, rozpuszczalność monoterpenu była widocznie zmniejsza także w połączeniu z Dynasanem® 118 oraz Witepsolem® E85 (po 72 h). W rezultacie najbardziej kompatybilnym lipidem w połączeniu z limonenem pozostał Compritol® 888 ATO i podobnie jak w przypadku pozostałych monoterpenów – Imwitor® 900 K.

Na podstawie przeprowadzonego testu doboru lipidów, najbardziej przystawalnym lipidem dla wszystkich badanych monoterpenów okazał się **Imwitor® 900 K**, dlatego to właśnie on został wybrany do syntezy wszystkich SLN. Wysoką kompatybilność tego lipidu można tłumaczyć obecnością długiego łańcucha alkilowego oraz amfifilowego charakteru struktury chemicznej monostearynianu glicerolu (rys. 54), zapewniającego dobrą stabilność dla wszystkich polarnych i niepolarnych związków.



Rysunek 54. Wzór strukturalny monostearynianu glicerolu (Imwitor® 900 K).

5.2. Analiza statystyczna jako narzędzie optymalizacji syntezy nanocząstek lipidowych inkorporowanych monoterpenami

W ramach niniejszej pracy wykonano plany czynnikowych eksperymentów (*Experimental Factorial Design*), w celu znalezienia najbardziej odpowiednich parametrów do syntezy SLN, dla każdego z enkapsulowanych monoterpenów. W rezultacie dla każdej substancji aktywnej ustalono identyczny projekt czynnikowy 2^2 , w którym czynnikami niezależnymi były: stały lipid (Imwitor® 900 K) oraz surfaktant (Poloxamer 188). Dzięki zastosowaniu analizy statystycznej oszacowano wpływ czynników niezależnych (takich jak: ilość stałego lipidu oraz ilość surfaktantu) na czynniki zależne (tj. średnia wielkość cząstek: Z-Ave; współczynnik polidispersyjności: PDI; potencjał zeta: ZP), które ostatecznie określały właściwości fizykochemiczne SLN.

Dla każdego monoterpeny przeprowadzono łącznie siedem syntez SLN (SLN1 – SLN7), z których trzy ostatnie (SLN5 – SLN7) oznaczały punkt centralny (0) – trzykrotnie powtórzony dla oszacowania błędu eksperymentalnego. Następnie wszystkie dyspersje SLN przechowywano w temperaturze pokojowej (25 °C), natomiast Z-Ave, PDI i ZP zmierzono 24 godziny od momentu syntezy.

5.2.1. Plany czynnikowych eksperymentów dla α -pinen-SLN

W celu zoptymalizowania SLN inkorporowanych α -pinenem opracowano projekt czynnikowy 2^2 . Przygotowane formuły wraz z otrzymanymi wartościami dla Z-Ave, PDI i ZP (zmierzonymi po 24 h od syntezy) przedstawiono w tabeli 33. Otrzymane próbki SLN przechowywano w temperaturze pokojowej (25 °C).

Tabela 33. Czynniki niezależne i zależne dla siedmiu syntezowanych SLN inkorporowanych α -pinenem.

SLN	Czynniki niezależne		Czynniki zależne		
	Imwitor® 900 K	Poloxamer 188	Z-Ave [nm] $\pm$ SD	PDI [j.u.] $\pm$ SD	ZP [mV] $\pm$ SD
1	–1	–1	212 $\pm$ 2,04	0,34 $\pm$ 0,02	$ \pm 0,02 \pm 0,01$
2	+1	–1	3002 $\pm$ 268,88	0,78 $\pm$ 0,29	$ \pm 0,05 \pm 0,12$
3	–1	+1	158 $\pm$ 0,79	0,27 $\pm$ 0,00	$ \pm 0,09 \pm 0,01$
4	+1	+1	184 $\pm$ 0,85	0,33 $\pm$ 0,01	$ \pm 0,09 \pm 0,02$
5	0	0	136 $\pm$ 0,70	0,17 $\pm$ 0,01	$ \pm 0,06 \pm 0,00$
6	0	0	143 $\pm$ 1,21	0,28 $\pm$ 0,01	$ \pm 0,12 \pm 0,01$
7	0	0	137 $\pm$ 0,95	0,27 $\pm$ 0,01	$ \pm 0,03 \pm 0,01$

SD – odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)

Na podstawie wyników zebranych w tabeli 33 stwierdzono, że średnia wielkość cząstek spośród wszystkich SLN wahała się w granicach od 136 $\pm$ 0,70 nm (SLN5) do 3002 $\pm$ 268,88 nm (SLN2), przy współczynniku polidispersyjności wynoszącym odpowiednio 0,17 $\pm$ 0,01 j.u. (SLN5) oraz 0,78 $\pm$ 0,29 j.u. (SLN2). Warto dodać, że najmniejsze średnie wielkości cząstek otrzymywano dla SLN5-7. Wynosiły one kolejno 136; 143 i 137 nm, przy równie najniższych wartościach PDI, wynoszących odpowiednio 0,17; 0,28 i 0,27 j.u.

Tym samym wykazano, że do otrzymania jak najmniejszych wielkości SLN inkorporowanych α -pinenem (1,00% wag.), najkorzystniejszy stosunek dla czynników niezależnych wynosi 4,00% wag. Imwitor[®] 900 K oraz 2,50% wag. Poloxameru 188. Warto zaznaczyć, że wartości potencjału zeta wynosiły około $|\pm 0 \text{ mV}|$ dla wszystkich analizowanych SLN. Fakt ten można tłumaczyć niejonowym charakterem zastosowanego surfaktantu (Poloxamer 188), który utworzył stabilizowaną sferycznie zaadsorbowaną warstwę polimeru na powierzchni SLN [294].

5.2.1.1. Analiza wariancji dla α -pinen–SLN

Dla każdej ze zmiennych zależnych przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA), początkowo z poziomem istotności statystycznej wynoszącym 95% ($\alpha = 0,05$), jednak przy takim założeniu otrzymano wyniki nieistotne statystycznie (zob. zał. 1). Dlatego też wykonano ponowny test ANOVA przy użyciu istotności statystycznej równej 90% ($\alpha = 0,1$), a wyniki przedstawiono w tabelach 34 – 36. Dzięki temu dowiedziono, że zarówno zmiany stężenia lipidu stałego (Imwitor[®] 900 K), jak i surfaktantu (Poloxamer 188), a także interakcje pomiędzy nimi a zmienną zależną Z-Ave miały statystycznie istotny wpływ (wartość $p < 0,1$), co przedstawiono w tabeli 34. Z kolei stężenia tych samych czynników (Imwitor[®] 900 K, Poloxamer 188), jak również ich wzajemne oddziaływania nie miały statystycznie istotnego wpływu na PDI (tabela 35). Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku ostatniej analizowanej zmiennej zależnej ZP, dla której zarówno żaden z pojedynczych czynników niezależnych, jak również interakcja między nimi nie miały znaczącego wpływu (wartość $p > 0,1$) (tabela 36).

Dodatkowo wykonano analizę wariancji, dla której wartość graniczną poziomu istotności ustalono $\alpha = 0,15$. Tym samym ponownie otrzymano wyniki istotne statystycznie (zob. zał. 3), jak w przypadku omówionego założenia z wartością graniczną $\alpha = 0,1$ (tab. 34 – 36 oraz zał. 2).

Tabela 34. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,1$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,86065.

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor [®] 900 K	1984717	1	1984717	6,173713	0,088900
(2) Poloxamer 188	2062096	1	2062096	6,414409	0,085225
(1)na (2)	1909648	1	1909648	5,940199	0,092727
Błąd	964436	3	321479		
Suma	6920897	6			

Tabela 35. Analiza współczynnika polidispersyjności (PDI) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,1$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,70496.

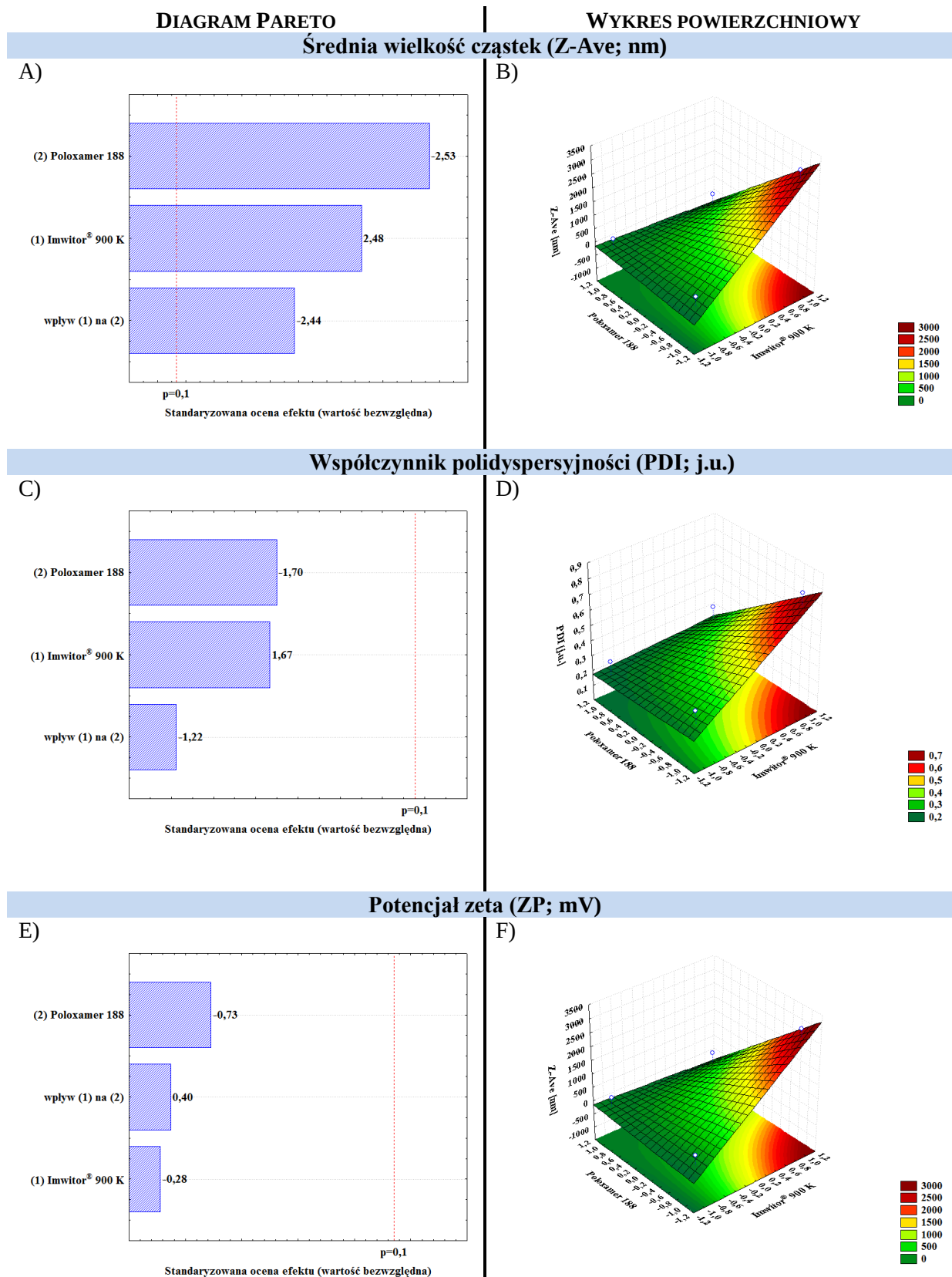
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) <i>Imwitor</i> [®] 900 K	0,063504	1	0,063504	2,779458	0,194071
(2) <i>Poloxamer 188</i>	0,066049	1	0,066049	2,890848	0,187643
(1) na (2)	0,034225	1	0,034225	1,497968	0,308339
<i>Błąd</i>	0,068543	3	0,022848		
<i>Suma</i>	0,232321	6			

Tabela 36. Analiza potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,1$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,19882.

Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) <i>Imwitor</i> [®] 900 K	0,000784	1	0,000784	0,078011	0,798159
(2) <i>Poloxamer 188</i>	0,005329	1	0,005329	0,530259	0,519189
(1) na (2)	0,001369	1	0,001369	0,136221	0,736577
<i>Błąd</i>	0,030149	3	0,01005		
<i>Suma</i>	0,037631	6			

5.2.1.2. Diagram Pareto i wykres powierzchniowy dla α -pinen-SLN

Obliczone za pomocą testu ANOVA współczynniki determinacji (r^2) dla ocenianych czynników (*Imwitor*[®] 900 K, *Poloxamer 188*) i interakcji zachodzących pomiędzy nimi na analizowane zmienne zależne (Z-Ave, PDI, ZP) przedstawiono za pomocą diagramu Pareto, ukazującego wartości współczynników odpowiedzi tzw. wartość t (ang. *t-value of effect*) dla $\alpha = 0,1$. Wartości te są ściśle związane z trójwymiarowymi wykresami powierzchniowymi dopasowanej odpowiedzi (obraz 3D), dlatego wspólnie zostały przedstawione na rysunkach 55 A-F. Dodatkowo, w zał. 4 przedstawiono wykresy warstwiczne, ukazujące powierzchnię odpowiedzi tworzoną dla Z-Ave, PDI oraz ZP.



Rysunek 55. Diagram Pareto i trójwymiarowy wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla próbki α -pinen–SLN, obrazujący efekt oddziaływania zmienności stężenia surfaktantu: Poloxamer188 (2), stałego lipidu: Imwitor® 900 K (1) oraz interakcji obu składników (1 na 2) na Z-Ave, PDI oraz ZP.

▪ Średnia wielkość cząstek

Na rysunku 55-A pokazano efekt oddziaływania zmienności stężenia stałego lipidu: Imwitor® 900 K (1), surfaktantu: Poloxamer 188 (2) oraz interakcje obu składników (1 na 2) na Z-Ave. Okazało się, że wzrost stężenia Poloxameru 188 miał negatywny wpływ na wielkość cząstek (wartość $t = -2,53$), powodując zmniejszenie ich rozmiaru. Podobna sytuacja dotyczyła interakcji, w której wzrost stężenia surfaktantu oraz wzrost stężenia lipidu miały znaczący negatywny wpływ na wielkość cząstek (wartość $t = -2,44$), co również zobrazowano za pomocą trójwymiarowych wykresów powierzchniowych dopasowanej odpowiedzi (rys. 55-B). Z drugiej strony, stężenie stałego lipidu miało dominujący dodatni wynik (wartość $t = 2,48$) na średnią wielkość cząstek, co powodowało wzrost wartości Z-Ave. Tym samym, na podstawie obrazów 3D zauważono, że zwiększenie stężenia surfaktantu (Poloxamer 188) spowodowało zmniejszenie średniej wielkości cząstek do wartości poniżej 500 nm, podczas gdy wzrost stężenia lipidu (Imwitor® 900 K) znacząco zwiększył wartości Z-Ave, powodując nawet przekroczenie zakresu nanometrycznego (rys. 55-B). Dotychczas udowodniono, że wzrost stężenia lipidu stałego może wpłynąć na zwiększenie lepkości otrzymanej nanodyspersji. W rezultacie następuje wzrost napięcia powierzchniowego, co w konsekwencji może przyczynić się do aglomeracji cząstek, wpływając ostatecznie na wartość Z-Ave [223].

▪ Współczynnik polidispersyjności

W przypadku oddziaływania czynników i interakcji między nimi na PDI, stężenie surfaktantu (wartość $t = -1,70$) i interakcja między czynnikami (wartość $t = -1,22$) miały negatywny wpływ na PDI (rys. 55-C), podczas gdy stężenie lipidu wykazało wpływ pozytywny (wartość $t = 1,67$). Na podstawie obrazu 3D zaobserwowano, że wzrost stężenia Imwitoru® 900 K spowodował przekroczenie wartości granicznej: $PDI = 0-0,30$ j.u. Natomiast wzrost stężenia Poloxameru 188 obniżył wartości PDI do poniżej 0,40 j.u. (rys. 55-D). Efekt ten może wiązać się z wywołaną przez surfaktant redukcją napięcia powierzchniowego między fazą wodną a fazą organiczną [82, 106, 295].

▪ Potencjał zeta

Na podstawie rys. 55-E stwierdzono, że negatywny wpływ na wartość ZP, a tym samym mniejszą stabilność badanej próbki, powodował zarówno wzrost stężenia Poloxameru 188 (wartość $t = -0,73$), jak i wzrost stężenia Imwitoru® 900 K (wartość $t = -0,28$). Pozytywny wpływ na ZP i większą stabilność próbki α -pinenu-SLN może powodować wpływ stężenia surfaktantu na lipid (wartość $t = 0,40$) – zielony kolor na wykresie powierzchniowym (rys. 55-F). Warto dodać, że na podstawie otrzymanych wyników ZP, utrzymywanych na poziomie $|\pm 0 \text{ mV}|$ we wszystkich analizowanych próbkach SLN wywnioskowano, że zmienne niezależne (Poloxamer 188 i Imwitor® 900 K) oraz ich interakcje na dwóch testowanych poziomach, nie miały wpływu na ładunek elektryczny α -pinenu enkapsulowanego w SLN.

Podsumowując, za pomocą analizy statystycznej potwierdzono, że do syntezy najbardziej optymalnych wartości SLN inkorporowanych 1,00% wag. α -pinenu należy zastosować 4,00% wag. Imwitoru® 900 K oraz 2,50% wag. Poloxameru 188. Dzięki przeprowadzonym planom czynnikowych eksperymentów, do dalszych badań wybrano próbkę SLN5, dla której średnia wielkość cząstek wynosiła 136 nm przy $PDI = 0,17$ j.u.

5.2.2. Plany czynnikowych eksperymentów dla cytral–SLN

W celu zoptymalizowania SLN inkorporowanych cytralem opracowano projekt czynnikowy 2^2 . Tabela 37 przedstawia wszystkie syntezowane próbki SLN wraz z otrzymanymi wartościami dla Z-Ave, PDI i ZP (zmierzonymi po 24 h od syntezy). Otrzymane próbki SLN przechowywano w temperaturze pokojowej (25 °C).

Tabela 37. Czynniki niezależne i zależne dla siedmiu syntezowanych SLN inkorporowanych cytralem.

SLN	Czynniki niezależne		Czynniki zależne		
	Imwitor® 900 K	Poloxamer 188	Z-Ave [nm] ± SD	PDI [j.u.] ± SD	ZP [mV] ± SD
1	–1	–1	106 ± 0,10	0,22 ± 0,06	± 0,02 ± 0,37
2	+1	–1	441 ± 143,60	0,49 ± 0,10	± 0,06 ± 0,18
3	–1	+1	164 ± 0,51	0,52 ± 0,03	± 0,15 ± 0,56
4	+1	+1	173 ± 0,92	0,38 ± 0,01	± 0,01 ± 0,25
5	0	0	155 ± 1,70	0,52 ± 0,02	± 0,07 ± 0,19
6	0	0	113 ± 0,61	0,27 ± 0,05	± 0,07 ± 0,25
7	0	0	98 ± 1,20	0,25 ± 0,03	± 0,01 ± 0,16

SD – odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)

Na podstawie wyników zebranych w tabeli 37 stwierdzono, że średnia wielkość cząstek spośród wszystkich SLN wahała się w granicach od 98 ± 1,20 nm (SLN7) do 441 ± 143,60 nm (SLN2), przy współczynniku polidispersyjności wynoszącym odpowiednio 0,25 ± 0,03 j.u. (SLN7) oraz 0,49 ± 0,10 j.u. (SLN2). Warto dodać, że wysoki PDI występował dla SLN3 (0,52 ± 0,03 j.u.), SLN4 (0,38 ± 0,01 j.u.), a także dla SLN5 (0,52 ± 0,02 j.u.). Z wyjątkiem SLN2, średnie wielkości cząstek dla wszystkich pozostałych próbek SLN były mniejsze niż 200 nm. Za najkorzystniejszą wielkość cząstek do potencjalnej aplikacji przezskórnej uznano dla SLN1: 106 ± 0,10 nm, przy PDI = 0,22 ± 0,06 j.u., jak również dla SLN6: 113 ± 0,61 nm, przy PDI = 0,27 ± 0,05 j.u. Warto przypomnieć, że nanocząstki mniejsze niż 100 nm mogą przeniknąć do krwioobiegu, wywołując przy tym reakcje niepożądane w organizmie (rozdział 2.3. Toksyczność nanocząstek lipidowych). Ponadto, wyniki dla potencjału zeta osiągały ponownie wartości około |± 0 mV| dla wszystkich analizowanych SLN, co wynikało z niejonowego charakteru zastosowanego surfaktantu (Poloxamer 188) [294].

Dzięki przeprowadzeniu planów czynnikowych eksperymentów wykazano, że do otrzymania najbardziej użytecznych wielkości SLN inkorporowanych cytralem (1,00% wag.) można zastosować dwa różne stosunki czynników niezależnych. Tym samym, może to być zarówno 2,00% wag. Imwitoru® 900 K oraz 1,25% wag. Poloxameru 188, jak i 4,00% wag. Imwitoru® 900 K oraz 2,50% wag. Poloxameru 188.

5.2.2.1. Analiza wariancji dla cytral–SLN

Analizę ANOVA dla próbki cytral–SLN rozpoczęto od ustalenia istotności statycznej wynoszącej 95% ($\alpha = 0,05$). W rezultacie otrzymano wyniki nieistotne statystycznie (zob. zał. 5). W związku z tym, tak jak w przypadku α -pinen–SLN, zdecydowano o przeprowadzeniu ponownej analizy wariancji ze zmianą poziomu istotności statystycznej

na 90% ($\alpha = 0,1$), jednak ponownie otrzymano wyniki nieistotne statystycznie (zob. zał. 6). Dopiero po zmniejszeniu poziomu istotności statystycznej do 85% ($\alpha = 0,15$), otrzymano wyniki istotne statystycznie, przedstawione w tabelach 38 – 40 (oraz w zał. 7).

Tym samym dowiedziono, że zmiany stężenia lipidu stałego (Imwitor® 900 K), jak również interakcje zachodzące pomiędzy lipidem a surfaktantem (Poloxamer 188) miały statystycznie istotny wpływ (wartość $p < 0,15$) na zmienną zależną Z-Ave, co przedstawiono w tabeli 38. Natomiast w przypadku stężenia tych samych czynników oraz ich interakcji (Imwitor® 900 K i Poloxamer 188) nie zaobserwowano statystycznie istotnego wpływu (wartość $p > 0,15$) zarówno na PDI (tabela 39), jak i na ZP (tabela 40).

Tabela 38. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,15$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,78265.

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	29412,25	1	29412,25	4,729584	0,117928
(2) Poloxamer 188	11067,04	1	11067,04	1,779616	0,274425
(1) na (2)	26699,56	1	26699,56	4,293375	0,129987
Błąd	18656,34	3	6218,78		
Suma	85835,19	6			

Tabela 39. Analiza współczynnika polidispersyjności (PDI) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,15$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,51292.

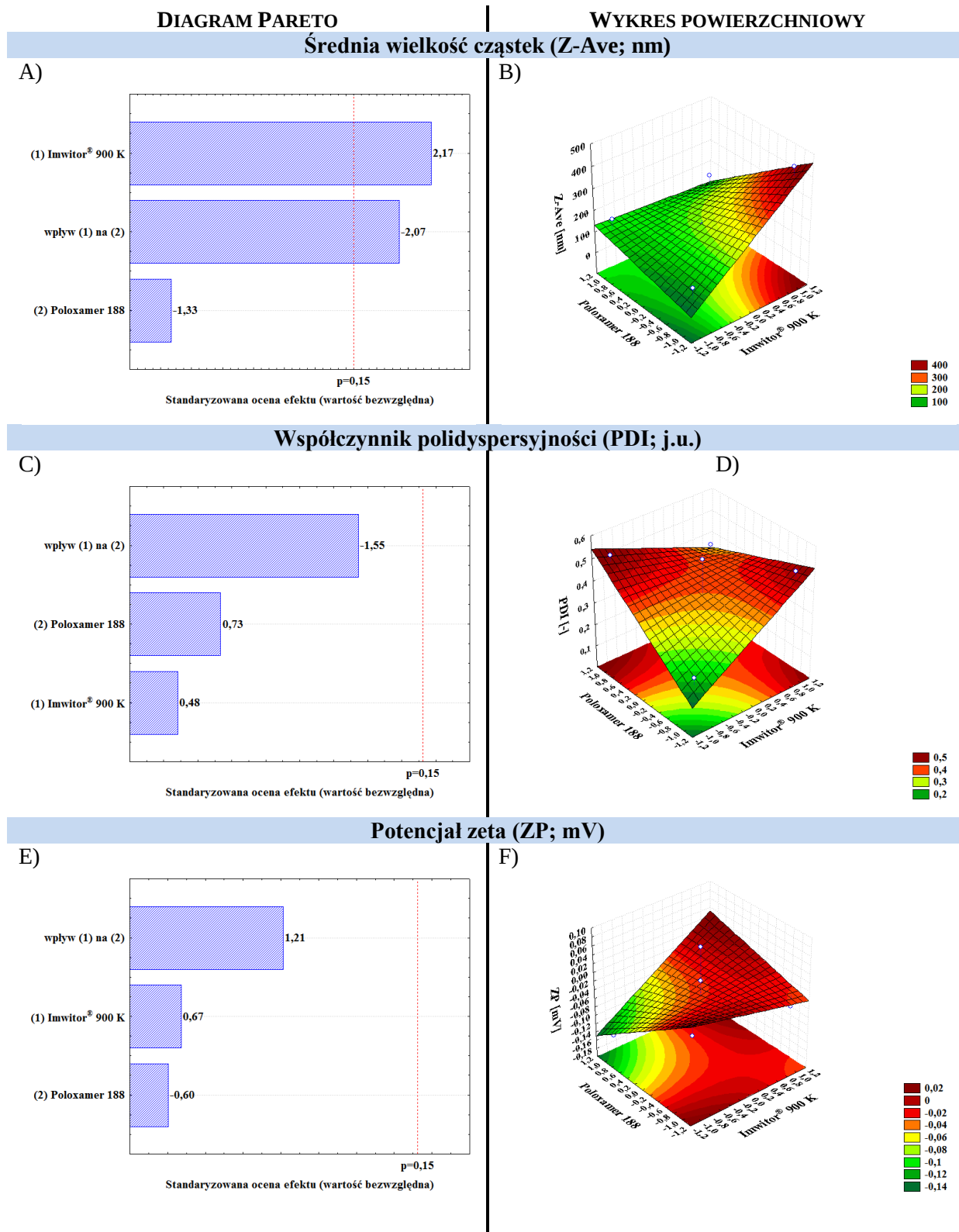
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,003969	1	0,003969	0,232242	0,662839
(2) Poloxamer 188	0,009216	1	0,009216	0,539264	0,515929
(1) na (2)	0,040804	1	0,040804	2,387602	0,220013
Błąd	0,051270	3	0,017090		
Suma	0,105259	6			

Tabela 40. Analiza potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,15$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,43253.

Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,002256	1	0,002256	0,453649	0,548855
(2) Poloxamer 188	0,001806	1	0,001806	0,363170	0,589258
(1) na (2)	0,007310	1	0,007310	1,469823	0,312141
Błąd	0,014921	3	0,004974		
Suma	0,026293	6			

5.2.2.2. Diagram Pareto i wykres powierzchniowy dla cytral-SLN

Na rysunkach 56 A-F przedstawiono diagramy Pareto, ukazujące wartości współczynników odpowiedzi (wartość t) dla $\alpha = 0,15$ oraz trójwymiarowe wykresy powierzchniowe dopasowanej odpowiedzi dla próbki cytral-SLN, ukazujące wpływ stałego lipidu (Imwitor® 900 K) i surfaktantu (Poloxamer 188) na Z-Ave, PDI oraz ZP. Dodatkowo, wykonano wykresy warstwowe, które przedstawiono w załączniku 8.



Rysunek 56. Diagram Pareto i trójwymiarowy wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla próbki cytral-SLN, obrazujący efekt oddziaływania zmienności stężenia surfaktantu: Poloxamer188 (2), stałego lipidu: Imwitor® 900 K (1) oraz interakcji obu składników (1 na 2) na Z-Ave, PDI oraz ZP.

▪ *Średnia wielkość cząstek*

Na rysunku 56-A przedstawiono efekt oddziaływania zmienności stężenia stałego lipidu: Imwitor® 900 K (1), surfaktantu: Poloxamer 188 (2) oraz interakcje obu składników (1 na 2) na Z-Ave. Mając na uwadze istotność wyników przy założonym poziomie istotności statystycznej ($\alpha = 0,15$) zaobserwowano, że wzrost stężenia Imwitoru® 900 K spowodował pozytywny wpływ na wielkość cząstek (wartość $t = 2,17$). Zależność ta została pokazana na obrazie 3D (rys. 56-B), z którego odnotowano, że wzrost stężenia lipidu (Imwitor® 900 K) znacząco zwiększył wartości Z-Ave (> 400 nm). Co więcej, ponownie wywnioskowano, że wzrost stężenia lipidu stałego mógł wpłynąć na zwiększenie lepkości otrzymanej nanodyspersji, powodując jednocześnie wzrost napięcia powierzchniowego, który przyczynił się do aglomeracji cząstek, a w rezultacie do zwiększenia wartości Z-Ave [223]. Z kolei w przypadku wzajemnych interakcji czynników niezależnych, wzrost stężenia lipidu oraz wzrost stężenia surfaktantu miały znaczący negatywny wpływ na wielkość cząstek (wartość $t = -2,07$) – zależność tą określa obszar czerwony, znajdujący się na wykresie powierzchniowym (rys. 56-B). Podobny rezultat otrzymano dla Poloxameru 188, którego wzrost stężenia powodował negatywny wpływ na Z-Ave (wartość $t = -1,33$). Na obrazie 3D zauważono, że zwiększenie stężenia surfaktantu (Poloxamer 188) spowodowało otrzymanie średniej wielkości cząstek do wartości około 100 nm.

▪ *Współczynnik polidispersyjności*

W przypadku efektu oddziaływania czynników i ich interakcji na PDI okazało się, że negatywny wpływ (wartość $t = -1,55$), czyli zmniejszenie wartości PDI, występował podczas interakcji między czynnikami niezależnymi (rys. 56-C). Natomiast zarówno wzrost stężenia surfaktantu bądź lipidu wykazywał niewielki pozytywny wpływ na PDI (Poloxamer 188: wartość $t = 0,73$ oraz Imwitor® 900 K: wartość $t = 0,48$), powodując w rezultacie wzrost wartości PDI. Zależności te przedstawiono za pomocą obrazu 3D na rys. 56-D, na którym widać, że zarówno wzrost stężenia Imwitoru® 900 K, jak również wzrost stężenia Poloxameru 188 spowodował przekroczenie wartości granicznej: $PDI = 0-0,30$ j.u. (ciemnoczerwony obszar na wykresie), natomiast najmniejszą wartość PDI, wynoszącą 0,22 j.u., uzyskano przy jak najmniejszych stężeniach obu czynników (zielony obszar na wykresie).

▪ *Potencjał zeta*

Na podstawie rys. 56-E zauważono, że pozytywny wpływ na wartość ZP, skutkujący wzrostem wartości ZP, spowodował zarówno wzrost stężenia Imwitoru® 900 K (wartość $t = 0,67$), jak również wzrost interakcji lipid-surfaktant (wartość $t = 1,21$) – czerwony obszar na wykresie powierzchniowym (rys. 56-F), charakterystyczny dla próbki niestabilnej. Z kolei wzrost stężenia Poloxameru 188 powodował nieznaczny negatywny wpływ na ZP (wartość $t = -0,60$), powodując zwiększenie stabilności próbki – zielony kolor na obrazie 3D. Na podstawie otrzymanych wyników ZP, utrzymywanych na poziomie $|\pm 0$ mV| ponownie wywnioskowano, że zmienne niezależne (Poloxamer 188 i Imwitor® 900 K) oraz ich

interakcje na dwóch testowanych poziomach, nie miały wpływu na ładunek elektryczny cytralu enkapsulowanego w SLN.

Właściwości fizykochemiczne dla SLN inkorporowanych cytralem były najbardziej optymalne, gdy zależność pomiędzy stężeniem surfaktantu a stężeniem stałego lipidu była wprost proporcjonalna. Identyfikację wniosku potwierdziło w swoich badaniach dwóch naukowców: Harms i Müller-Goymann, którzy dowiedli, że zmniejszenie stężenia lipidu, wymaga zmniejszenia również stężenia środka powierzchniowo czynnego [296].

Podsumowując, za pomocą analizy statystycznej potwierdzono, że do syntezy najbardziej optymalnych wartości SLN inkorporowanych 1,00% wag. cytralu najlepiej zastosować 2,00% wag. Imwitoru[®] 900 K oraz 1,25% wag. Poloxameru 188 (SLN1). Przy zastosowaniu takiego stosunku wagowego składników otrzymano bowiem, że wielkość cząstek może wynieść 106 nm, przy PDI = 0,22 j.u. Dzięki przeprowadzonym planom czynnikowych eksperymentów wykazano, że alternatywnym wyborem do syntezy cytral-SLN może być także: 1,00% wag. cytralu oraz 4,00% wag. Imwitoru[®] 900 K i 2,50% wag. Poloxameru 188. W przypadku takiego stosunku wszystkich składników uzyskano większą o zaledwie ok. 6 nm wielkość cząstek, której wartość była równa 113 nm, przy PDI = 0,27 j.u. (SLN6).

5.2.3. Plany czynnikowych eksperymentów dla geraniol-SLN

W celu zoptymalizowania SLN inkorporowanych geraniolem opracowano identyczny jak w przypadku α -pinenu czy cytralu projekt czynnikowy 2². W tabeli 41 przedstawiono wszystkie syntezowane próbki geraniolu enkapsulowanego w SLN wraz z otrzymanymi wartościami dla Z-Ave, PDI i ZP (zmierzonymi po 24 h od syntezy). Otrzymane próbki SLN przechowywano w temperaturze pokojowej (25 °C).

Tabela 41. Czynniki niezależne i zależne dla siedmiu syntezowanych SLN inkorporowanych geraniolem.

SLN	Czynniki niezależne		Czynniki zależne		
	Imwitor [®] 900 K	Poloxamer 188	Z-Ave [nm] $\pm$ SD	PDI [j.u.] $\pm$ SD	ZP [mV] $\pm$ SD
1	-1	-1	400 $\pm$ 0,75	0,48 $\pm$ 0,48	$ \pm 0,02 \pm 0,11$
2	+1	-1	369 $\pm$ 0,67	0,28 $\pm$ 0,28	$ \pm 0,10 \pm 0,15$
3	-1	+1	105 $\pm$ 0,42	0,17 $\pm$ 0,17	$ \pm 0,13 \pm 0,02$
4	+1	+1	385 $\pm$ 0,80	0,23 $\pm$ 0,23	$ \pm 0,09 \pm 0,04$
5	0	0	128 $\pm$ 0,71	0,17 $\pm$ 0,17	$ \pm 0,13 \pm 0,01$
6	0	0	130 $\pm$ 0,56	0,17 $\pm$ 0,17	$ \pm 0,13 \pm 0,00$
7	0	0	126 $\pm$ 0,44	0,17 $\pm$ 0,17	$ \pm 0,13 \pm 0,00$

SD – odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)

Na podstawie wyników zebranych w tabeli 41 stwierdzono, że średnia wielkość cząstek spośród wszystkich SLN wahała się w granicach od 105 $\pm$ 0,42 nm (SLN3) do 400 $\pm$ 0,75 nm (SLN1), przy współczynniku polidispersyjności wynoszącym odpowiednio 0,17 $\pm$ 0,17 j.u. (SLN3) oraz 0,48 $\pm$ 0,48 j.u. (SLN1). Warto dodać, że z wyjątkiem SLN1, prawidłowy PDI (< 0,30 j.u.) uzyskano dla wszystkich pozostałych próbek geraniol-SLN, a jego wartość

mieściła się w zakresie $0,17 \pm 0,17$ j.u. do $0,28 \pm 0,28$ j.u. W dodatku, dla połowy próbek otrzymano zbliżone wartości Z-Ave wynoszące < 130 nm (SLN3, 4-7), natomiast dla trzech pozostałych (SLN1, 2, 4) średnia wielkość cząstek była znacząco większa tj. > 360 nm.

Z kolei wartości potencjału zeta osiągały ponownie wartości około $|\pm 0 \text{ mV}|$ dla wszystkich analizowanych SLN, co tłumaczono niejonowym charakterem zastosowanego surfaktantu (Poloxamer 188) [294].

Dzięki przeprowadzeniu planów czynnikowych eksperymentów dowiedziono, że do otrzymania najmniejszych wielkości nanocząstek inkorporowanych geraniolem (1,00% wag.), najbardziej optymalny stosunek lipidu i surfaktantu wynosił odpowiednio: 2,00% wag. Imwitoru[®] 900 K oraz 5,00% wag. Poloxameru. Warto jednak pamiętać, że zawartość surfaktantów stosowanych do syntezy SLN nie powinna przekraczać 5% wag. (rozdział 2.2.1. Charakterystyka stałych nanocząstek lipidowych) [46]. Ponadto im niższa zawartość SPC, tym mniejsze ryzyko wystąpienia ewentualnych podrażnień [77, 297]. Biorąc pod uwagę znaczenie właściwości surfaktantu, równie optymalnym stosunkiem składników dla SLN inkorporowanych geraniolem (1% wag.) jest 4,00% wag. Imwitoru[®] 900 K oraz 2,50% wag. Poloxameru 188.

5.2.3.1. Analiza wariancji dla geraniol–SLN

Przeprowadzając test ANOVA z poziom istotności statycznej ustalonym początkowo na 95% ($\alpha = 0,05$) dla próbki geraniol–SLN, otrzymano wyniki nieistotne statystycznie (zob. zał. 9), podobnie jak dla poprzednich monoterpenów. W związku z tym, przeprowadzono ponowną analizę wariancji, w której za poziom istotności statycznej przyjęto 90% ($\alpha = 0,1$), jednak po ponownym uzyskaniu wyników nieistotnych statystycznie (zob. zał. 10), przeprowadzono test ANOVA z poziomem istotności statycznej równym 85% ($\alpha = 0,15$). Otrzymane rezultaty przedstawiono w tabelach 42 – 44 (oraz w zał. 11).

Na podstawie otrzymanych wyników, dla których wartość graniczna poziomu istotności stanowiła $\alpha = 0,15$ zauważono, że zarówno zmiany stężenia lipidu stałego (Imwitor[®] 900 K), jak i zmiany stężenia surfaktantu (Poloxamer 188) oraz interakcje między nimi nie mają statystycznie istotnego wpływu (wartość $p < 0,15$) na zmienną zależną Z-Ave, co przedstawiono w tabeli 42. Jednak w stosunku do PDI, zaobserwowano statystycznie istotny wpływ (wartość $p > 0,15$) związany jedynie ze zmianą stężenia Poloxameru 188 (tabela 43). Zmiana stężenia Imwitoru[®] 900 K oraz wzajemne reakcje pomiędzy ocenianymi czynnikami nie wpływały na PDI. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku ostatniej analizowanej zmiennej zależnej ZP, dla której zarówno żaden z pojedynczych czynników niezależnych, jak również interakcja między nimi nie miały znaczącego wpływu (wartość $p > 0,15$) (tabela 44).

Tabela 42. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,15$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,49759.

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	15487,8	1	15487,80	0,776744	0,443035
(2) Poloxamer 188	19530,1	1	19530,06	0,979471	0,395291
(1) na (2)	24226,9	1	24226,92	1,215028	0,350832
Błąd	59818,2	3	19939,40		
Suma	119063,0	6			

Tabela 43. Analiza współczynnika polidispersyjności (PDI) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,15$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,68934.

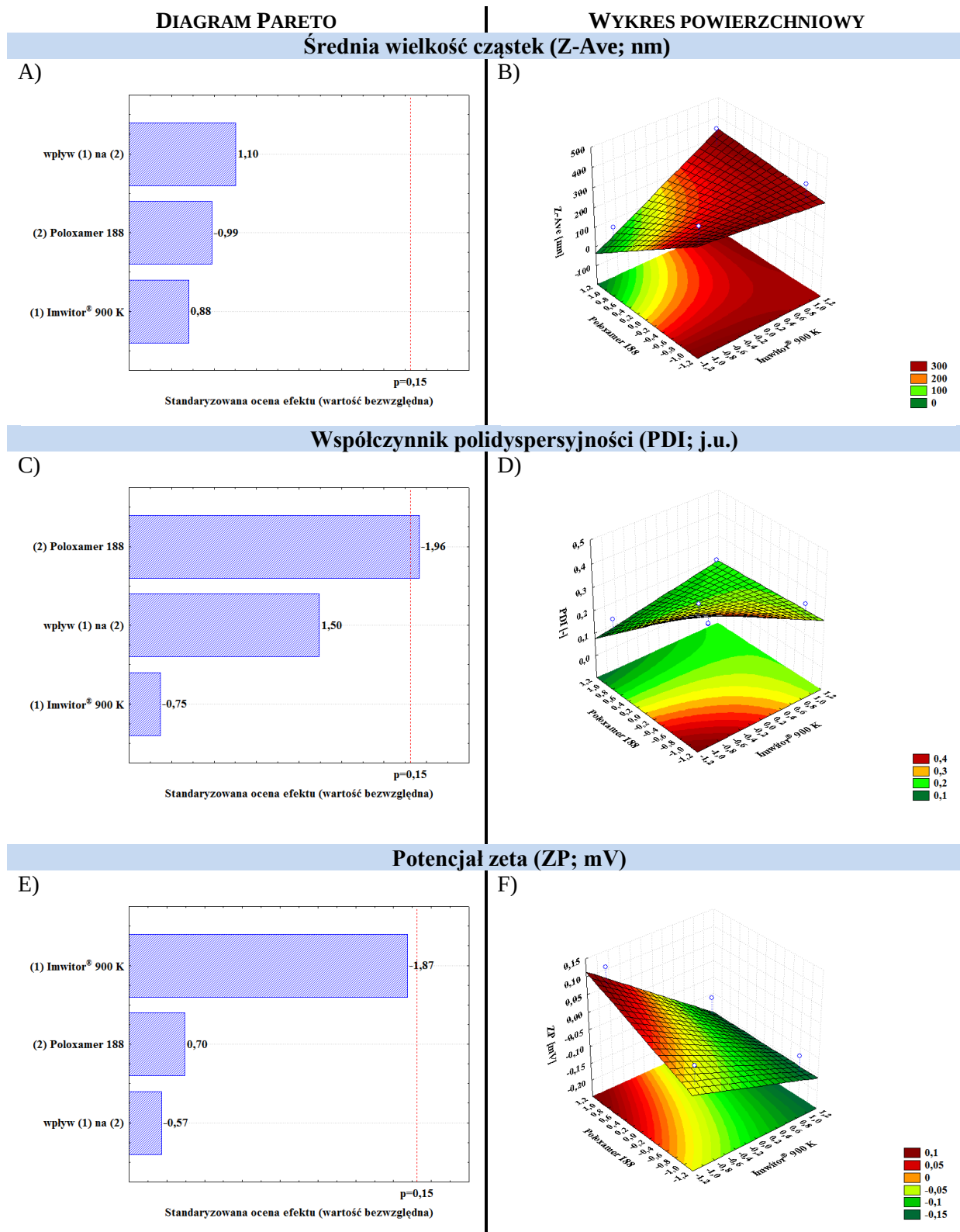
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,004489	1	0,004489	0,559390	0,508798
(2) Poloxamer 188	0,030976	1	0,030976	3,860029	0,144190
(1) na (2)	0,017956	1	0,017956	2,237561	0,231583
Błąd	0,024074	3	0,008025		
Suma	0,077495	6			

Tabela 44. Analiza potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,15$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,59001.

Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,027390	1	0,027390	3,506460	0,157854
(2) Poloxamer 188	0,003782	1	0,003782	0,484198	0,536589
(1) na (2)	0,002550	1	0,002550	0,326479	0,607741
Błąd	0,023434	3	0,007811		
Suma	0,057157	6			

5.2.3.2. Diagram Pareto i wykres powierzchniowy dla geraniol – SLN

Diagramy Pareto, ukazujące wartości współczynników odpowiedzi (wartość t) dla $\alpha = 0,15$, jak również trójwymiarowe wykresy powierzchniowe dopasowanej odpowiedzi dla próbki geraniol–SLN, obrazujące interaktywne efekty wszystkich analizowanych zmiennych, przedstawiono na rysunkach 57 A-F. Dodatkowo, przygotowano wykresy warstwowe, ukazujące powierzchnię odpowiedzi tworzoną dla Z-Ave, PDI oraz ZP (zob. zał. 12).



Rysunek 57. Diagram Pareto i trójwymiarowy wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla próbki geraniol–SLN, obrazujący efekt oddziaływania zmienności stężenia surfaktantu: Poloxamer188 (2), stałego lipidu: Imwitor® 900 K (1) oraz interakcji obu składników (1 na 2) na Z-Ave, PDI oraz ZP.

▪ Średnia wielkość cząstek

Na rysunku 57-A pokazano efekt oddziaływania zmienności stężenia stałego lipidu: Imwitor® 900 K (1), surfaktantu: Poloxamer 188 (2) oraz interakcje obu składników (1 na 2) na Z-Ave. Pomimo braku istotności statystycznej dla analizowanych czynników i ich interakcji zaobserwowano, że wzrost stężenia Poloxameru 188 miał nieznaczny negatywny wpływ na wielkość cząstek (wartość $t = -0,99$), co oznaczało w rezultacie mniejsze rozmiary cząstek. Z kolei zmiana stężenia Imwitoru® 900 K lub też zachodzące pomiędzy czynnikami interakcje wykazywały pozytywny wpływ na Z-Ave (wartość $t = 0,88$ oraz $t = 1,10$), a w konsekwencji większe wielkości cząstek. Zależności te przedstawiono za pomocą wykresu powierzchniowego dopasowanej odpowiedzi, na którym widać, że zwiększenie stężenia surfaktantu (Poloxamer 188) spowodowało zmniejszenie średniej wielkości cząstek do wartości ≤ 100 nm, podczas gdy wzrost stężenia lipidu (Imwitor® 900 K) znacząco zwiększył wartości Z-Ave do powyżej 300 nm (rys. 57-B) – kolor ciemnoczerwony na wykresie.

▪ Współczynnik polidispersyjności

Wzrost stężenia surfaktantu wykazał znaczący negatywny wpływ a w konsekwencji niskie wartości PDI (wartość $t = -1,95$), co przedstawiono na rys. 57-C. Z kolei stężenie lipidu (wartość $t = -0,75$) miało niewielki, także negatywny wpływ na PDI, powodując uzyskanie niskich wartości PDI, podczas gdy wartość $t = 1,50$ dla interakcji między czynnikami wykazywała wpływ pozytywny, co wiązało się z większymi wartościami PDI. Na podstawie obrazu 3D stwierdzono, że zarówno wzrost stężenia Imwitoru® 900 K, jak i Poloxameru 188 spowodował uzyskanie prawidłowego PDI, tj. w granicach 0,10 - 0,20 j.u. (rys. 57-D).

▪ Potencjał zeta

Analizując diagram Pareto (rys. 57-E) stwierdzono, że pozytywny wpływ na wartość ZP, oznaczający wzrost wartości ZP powodował jedynie Poloxamer 188 (wartość $t = 0,70$) – na wykresie 3D zauważono znaczący obszar w kolorze czerwonym, charakterystyczny dla próbki niestabilnej, bowiem ZP nie przekraczał wartości dla próbki stabilnej, tzn. powyżej $|\pm 30$ mV|. Z kolei wzrost stężenia Poloxameru 188 (wartość $t = -1,87$) oraz wzrost interakcji pomiędzy surfaktantem a lipidem (wartość $t = -0,57$) spowodowały negatywny wpływ na ZP, co oznaczało otrzymanie niższych wartości ZP – zielony kolor na obrazie 3D (rys. 57-F). Wartości ZP utrzymywane na poziomie $|\pm 0$ mV| we wszystkich analizowanych próbkach SLN wskazywały, że zmiany stężenia zmiennych niezależnych nie mają znaczącego wpływu na ładunek elektryczny geraniolu enkapsulowanego w SLN. W dodatku zauważono, że wzrost stężenia Poloxameru 188 może przyczynić się do wzrostu wartości ZP w kierunku dodatniego ładunku ($> |0,1$ mV|), a z kolei wzrost stężenia Imwitoru® 900 K może wpłynąć na uzyskanie ujemnych wartości ZP ($> |-0,1$ mV|) (rys. 57-F).

Podsumowując, za pomocą analizy statystycznej potwierdzono, że do syntezy najbardziej optymalnych wartości SLN inkorporowanych geraniolem (1% wag.) należy zastosować 2,00% wag. Imwitoru® 900 K oraz 5,00% wag. Poloxameru 188. W przypadku późniejszej aplikacji przezskórnej nanocząstek warto również rozważyć stosunek składników w postaci 1% wag. geraniolu oraz 4,00% wag. Imwitoru® 900 K i 2,50% wag. Poloxameru 188, w celu ograniczenia ewentualnego działania drażniącego w przypadku większej ilości surfaktantu [46].

5.2.4. Plany czynnikowych eksperymentów dla limonen–SLN

W celu zoptymalizowania SLN inkorporowanych limonenem, podobnie jak w przypadku pozostałych monoterpenu, opracowano projekt czynnikowy 2^2 . W tabeli 45 przedstawiono wszystkie syntezowane próbki SLN wraz z otrzymanymi wartościami dla Z-Ave, PDI i ZP (zmierzonymi po 24 h od syntezy). Otrzymane próbki SLN przechowywano w temperaturze pokojowej (25 °C).

Tabela 45. Czynniki niezależne i zależne dla siedmiu syntezowanych SLN inkorporowanych limonenem.

SLN	Czynniki niezależne		Czynniki zależne		
	Imwitor® 900 K	Poloxamer 188	Z-Ave [nm] ± SD	PDI [j.u.] ± SD	ZP [mV] ± SD
1	–1	–1	203 ± 2,47	0,28 ± 0,03	± 0,04 ± 0,05
2	+1	–1	1295 ± 36,42	0,75 ± 0,22	± 0,06 ± 0,09
3	–1	+1	178 ± 2,31	0,27 ± 0,00	± 0,10 ± 0,78
4	+1	+1	194 ± 8,95	0,34 ± 0,05	± 0,08 ± 0,05
5	0	0	143 ± 0,42	0,16 ± 0,01	± 0,00 ± 0,26
6	0	0	142 ± 0,55	0,16 ± 0,00	± 0,19 ± 0,27
7	0	0	143 ± 0,25	0,16 ± 0,02	± 0,21 ± 0,20

SD – odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)

Na podstawie wyników zebranych w tabeli 45 stwierdzono, że średnia wielkość cząstek spośród wszystkich SLN wahała się w granicach od 142 ± 0,55 nm (SLN6) do 1295 ± 36,42 nm (SLN2), przy współczynniku polidispersyjności wynoszącym odpowiednio 0,16 ± 0,00 j.u. (SLN6) oraz 0,75 ± 0,22 j.u. (SLN2). Oprócz SLN2 i SLN1 (203 ± 2,47 nm), średnie wielkości cząstek dla pozostałych próbek SLN były mniejsze niż 200 nm. Warto również dodać, że PDI przekroczył dopuszczalną granicę normy 0,30 j.u. jedynie w przypadku SLN2 oraz SLN4 (0,34 ± 0,05 j.u.). Wartości potencjału zeta osiągały ponownie wartości około |± 0 mV| dla wszystkich analizowanych SLN, co tłumaczono niejonowym charakterem zastosowanego surfaktantu (Poloxamer 188) [294].

Za pomocą planów czynnikowych eksperymentów wykazano, że do otrzymania SLN inkorporowanych limonenem najbardziej optymalnym stosunkiem składników były wartości tzw. punktu centralnego (SLN5-7), w którym oprócz 1% wag. limonenu użyto 4,00% wag. Imwitoru® 900 K oraz 2,50% wag. Poloxameru 188.

5.2.4.1. Analiza wariancji dla limonen–SLN

Za poziom istotności statycznej w analizie wariancji dla próbki limonen–SLN przyjęto początkowo 95% ($\alpha = 0,05$), jednak tak jak dla pozostałych monoterpenu otrzymano wyniki nieistotne statystycznie (zob. zał. 13). W związku z tym, przeprowadzono ponowny test ANOVA, w którym za poziom istotności statycznej przyjęto 90% ($\alpha = 0,1$). Po ponownym uzyskaniu wyników nieistotnych statystycznie (zob. zał. 14), przeprowadzono analizę wariancji, dla której wartość graniczną poziomu istotności ustalono $\alpha = 0,15$ (85%). Dzięki temu otrzymano wyniki istotne statystycznie, które przedstawiono w tabelach 46 – 48 oraz w załączniku 15.

Na podstawie uzyskanych wyników z poziomem istotności równym $\alpha = 0,15$ zauważono, że wszystkie oceniane czynniki (Imwitor® 900 K, Poloxamer 188) i ich interakcje miały statystycznie istotny wpływ (wartość $p < 0,15$) na zmienną zależną Z-Ave, co przedstawiono w tabeli 46. Jednak w stosunku do pozostałych zmiennych zależnych tj. PDI oraz ZP, żaden z pojedynczych czynników niezależnych, jak również interakcja między nimi nie miały znaczącego wpływu: wartość $p > 0,15$ (tabela 47 i 47).

Tabela 46. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,15$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,83472.

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	307027	1	307026,8	5,093607	0,109238
(2) Poloxamer 188	316969	1	316969,0	5,258549	0,105650
(1) na (2)	289229	1	289228,8	4,798337	0,116199
Błąd	180831	3	60276,9		
Suma	1094055	6			

Tabela 47. Analiza współczynnika polidispersyjności (PDI) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,15$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,60299.

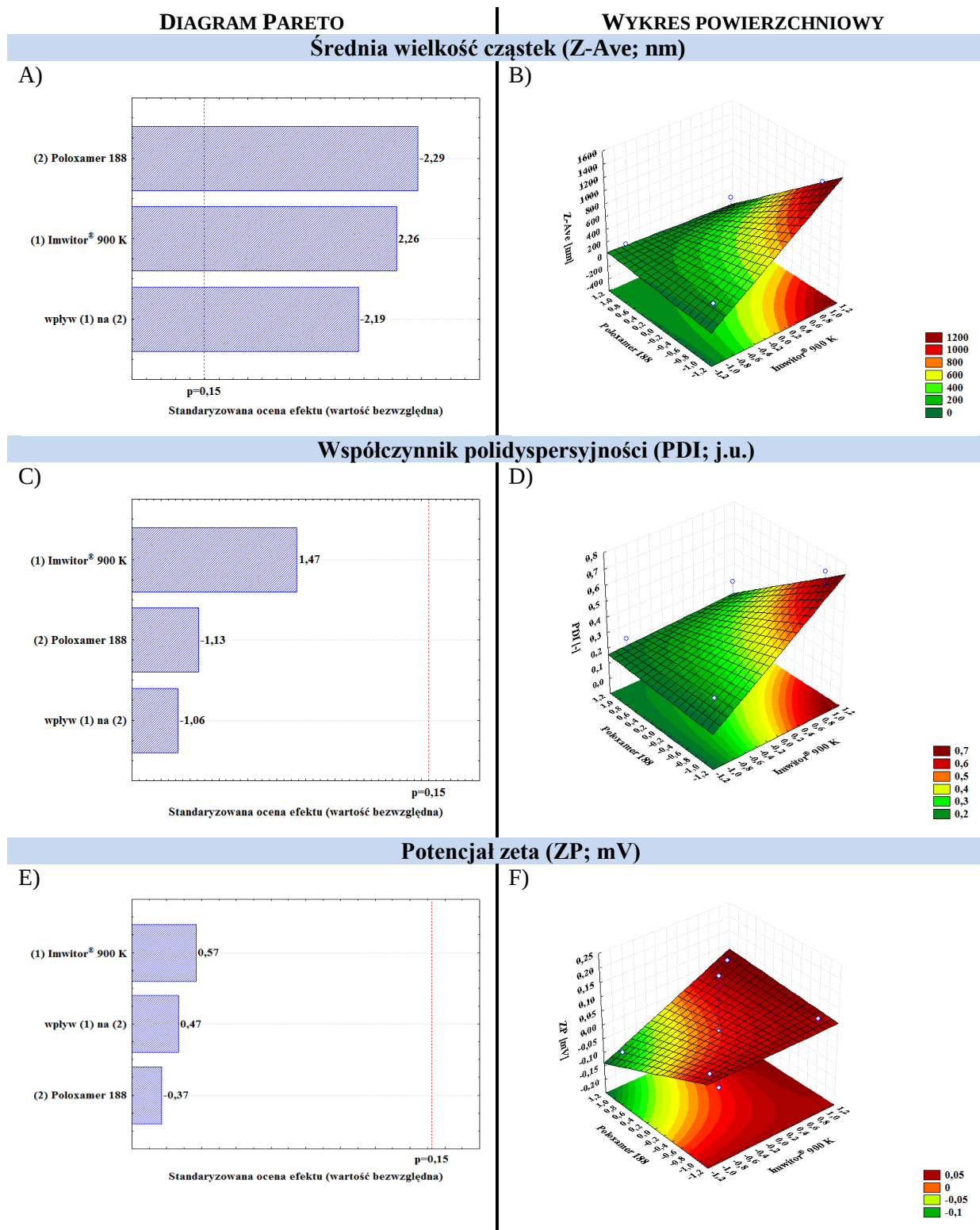
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,073984	1	0,073984	2,159807	0,238002
(2) Poloxamer 188	0,043681	1	0,043681	1,275175	0,340936
(1) na (2)	0,038416	1	0,038416	1,121474	0,367319
Błąd	0,102765	3	0,034255		
Suma	0,258846	6			

Tabela 48. Analiza potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,15$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,18471.

Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,008836	1	0,008836	0,324865	0,608587
(2) Poloxamer 188	0,003721	1	0,003721	0,136807	0,736045
(1) na (2)	0,005929	1	0,005929	0,217986	0,672395
Błąd	0,081597	3	0,027199		
Suma	0,100083	6			

5.2.4.2. Diagram Pareto i wykres powierzchniowy dla limonen-SLN

Wartości współczynników odpowiedzi (wartość t) dla $\alpha = 0,15$ na diagramach Pareto oraz trójwymiarowe wykresy powierzchniowe dopasowanej odpowiedzi dla limonen-SLN, za pomocą których przedstawiono wpływ oddziaływań wszystkich analizowanych zmiennych, przedstawiono na rysunkach 58 A-F. Dodatkowo, wykonano wykresy warstwowe, ukazujące powierzchnię odpowiedzi dla Z-Ave, PDI oraz ZP (zob. zał. 16).



Rysunek 58. Diagram Pareto i trójwymiarowy wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla próbki limonen–SLN, obrazujący efekt oddziaływania zmienności stężenia surfaktantu: Poloxamer188 (2), stałego lipidu: Imwitor® 900 K (1) oraz interakcji obu składników (1 na 2) na Z-Ave, PDI oraz ZP.

▪ *Średnia wielkość cząstek*

Na podstawie diagramu Pareto, przedstawionego na rys. 58-A zaobserwowano, że wzrost stężenia Poloxameru 188 powodował negatywny wpływ na wielkość cząstek (wartość $t = -2,29$), oznaczający zmniejszenie ich rozmiaru. Podobna sytuacja dotyczyła interakcji, w której wzrost stężenia surfaktantu oraz wzrost stężenia lipidu miały również negatywny wpływ na wartość Z-Ave (wartość $t = -2,19$), co powodowało otrzymywanie mniejszych cząstek. Zmiana z niskiej do wysokiej wartości stężenia stałego lipidu miała znaczący dodatni wpływ (wartość $t = 2,26$) na średnią wielkość cząstek. Na podstawie obrazów 3D zaobserwowano te zależności i potwierdzono, że zwiększenie stężenia surfaktantu spowodowało zmniejszenie średniej wielkości cząstek do wartości poniżej 200 nm, w przeciwieństwie do wzrostu stężenia lipidu (Imwitor® 900 K), którego większe ilości powodowały znaczące zwiększenie wartości Z-Ave, do nawet $> 1\ 000$ nm (rys. 58-B). Powstałe zależności tłumaczono zwiększeniem lepkości otrzymanej nanodyspersji, powstałej na skutek wzrostu stężenia lipidu stałego. W rezultacie nastąpił wzrost napięcia powierzchniowego, który w konsekwencji mógł przyczynić się do aglomeracji cząstek, wpływając ostatecznie na wartość Z-Ave [223].

▪ *Współczynnik polidispersyjności*

Zmiana stężenia lipidu wykazała wpływ pozytywny (wartość $t = 1,47$) na PDI, powodując zwiększenie otrzymywanych wartości współczynnika polidispersyjności, podczas gdy stężenie surfaktantu (wartość $t = -1,13$) i interakcja między czynnikami (wartość $t = -1,06$) wykazały negatywny wpływ na PDI, wpływając na uzyskanie mniejszych PDI (rys. 58-C). Analizując wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi potwierdzono te założenia. Odnotowano, że wzrost stężenia Poloxameru 188 powodował otrzymanie wartości $PDI < 0,20$ j.u., podczas gdy wzrost stężenia Imwitoru® 900 K znacząco zwiększał wartość PDI do nawet 0,70 j.u. (rys. 58-D).

▪ *Potencjał zeta*

Na rys. 58-E przedstawiono, że zarówno Imwitor® 900 K (wartość $t = 0,57$), jak i wzajemne interakcje pomiędzy czynnikami (wartość $t = 0,47$) wykazały niewielki, lecz pozytywny wpływ na wartość ZP, oznaczający wzrost wartości ZP. Pomimo tego, na wykresie 3D przeważał kolor czerwony (rys. 58-F), charakterystyczny dla próbki niestabilnej, a ZP nie osiągnął wartości charakterystycznej dla próbki stabilnej (tj. ± 30 mV). Z kolei wzrost stężenia Poloxameru 188 (wartość $t = -0,37$) spowodował negatywny wpływ na ZP, co oznaczało otrzymanie niższych wartości ZP, które w ciągu całego okresu badań utrzymywały się na poziomie ± 0 mV we wszystkich analizowanych próbkach SLN. Dlatego też ponownie wywnioskowano, że zmiany stężenia Poloxameru 188 i Imwitoru® 900 K nie miały znaczącego wpływu na ładunek elektryczny limonenu enkapsulowanego w SLN.

Podsumowując, za pomocą analizy statystycznej potwierdzono, że do syntezy najbardziej optymalnych wartości SLN inkorporowanych 1,00% wag. limonenu należy zastosować 4,00% wag. Imwitoru[®] 900 K oraz 2,50% wag. Poloxameru 188. Dzięki przeprowadzonym planom czynnikowych eksperymentów, do dalszych badań wybrano skład próbki SLN5-7, dla których otrzymana średnia wielkość cząstek wahała się w granicach od 142 do 143 nm przy PDI < 0,20 j.u.

5.2.5 Plany czynnikowych eksperymentów dla SLN bez enkapsulowanego składnika aktywnego

W celu zoptymalizowania próby odniesienia (puste-SLN), podobnie jak w przypadku SLN inkorporowanych monoterpunami, opracowano projekt czynnikowy 2². Brak składnika aktywnego w fazie lipidowej dyspersji SLN, został „uzupełniony” tą samą ilością lipidu (zob. tab. 17, rozdz. 4.2.1.5). Dotychczasowe badania naukowe dowiodły bowiem, że nanodyspersje mogą okazać się niestabilne i skłonne do agregacji zarówno przy zbyt dużej, jak i zbyt małej zawartości lipidów [82, 298]. Stężenie lipidów wyższe niż 10-12% wag. prowadzi do zwiększenia lepkości dyspersji [299]. W konsekwencji powstaje wysokie napięcie powierzchniowe, które indukuje aglomerację i sedymentację cząstek [223, 299]. Z drugiej strony warto pamiętać, że nadmiar cząsteczek surfaktantu może spowodować jego obecność w postaci miceli. Ryzyko utworzenia miceli zwiększa się, gdy stosuje się SPC o wysokim ciężarze cząsteczkowym, taki jak np. Poloxamer 188 [300]. Dlatego też zastosowanie surfaktantów o wysokiej masie cząsteczkowej i dodatkowo w wysokich stężeniach zwiększa prawdopodobieństwo powstawania miceli, zwiększając przy tym niestabilność układu [82]. Co więcej, tworzenie miceli wpływa zasadniczo na PDI, ponieważ wielkość cząstek tego układu mieści się w zakresie 10 – 100 nm, a wielkość SLN jest większa niż 100 nm [223].

W niniejszych badaniach wykazano, że interakcja między różnymi stężeniami lipidu stałego a surfaktantem zasadniczo wpływają na wielkość cząstek. Koncepcja Harmsa i Müllera-Goymanna głosi [296], że stężenia lipidów i surfaktantów są wprost proporcjonalne, tzn. wzrost stężenia lipidów wymaga zwiększenia także stężenia surfaktantu, co również potwierdzono w badaniach w ramach niniejszej dysertacji.

W tabeli 49 przedstawiono przykłady syntezy SLN wraz z otrzymanymi wartościami dla Z-Ave, PDI i ZP (zmierzonymi po 24 h od syntezy). Otrzymane próbki SLN przechowywano w temperaturze pokojowej (25 °C).

Tabela 49. Czynniki niezależne i zależne dla syntezowanych SLN nieinkorporowanych składnikiem aktywnym (monoterpenem).

SLN	Czynniki niezależne		Czynniki zależne		
	Imwitor® 900 K	Poloxamer 188	Z-Ave [nm] ± SD	PDI [j.u.] ± SD	ZP [mV] ± SD
1	-1	-1	439 ± 230,70	0,48 ± 0,02	± 0,01 ± 0,95
2	+1	-1	332 ± 25,01	0,38 ± 0,01	± 0,16 ± 0,11
3	-1	+1	99 ± 0,92	0,11 ± 0,00	± 0,33 ± 0,12
4	+1	+1	294 ± 5,96	0,33 ± 0,02	± 0,01 ± 0,22
5	0	0	217 ± 0,35	0,26 ± 0,02	± 0,03 ± 0,04
6	0	0	217 ± 0,54	0,27 ± 0,00	± 0,03 ± 0,16
7	0	0	217 ± 0,52	0,27 ± 0,02	± 0,03 ± 0,15

SD – odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)

Na podstawie wyników zebranych w tabeli 49 stwierdzono, że średnia wielkość cząstek spośród wszystkich SLN wahała się w granicach od 99 ± 0,92 nm (SLN3) do 439 ± 230,70 nm (SLN1), przy współczynniku polidispersyjności wynoszącym odpowiednio 0,11 ± 0,00 j.u. (SLN3) oraz 0,48 ± 0,02 j.u. (SLN1). W dodatku zauważono, że większe stężenie surfaktantu może wpłynąć na redukcję wielkości cząstek [301]. Z kolei wartości PDI korelowały z wartościami Z-Ave. Najniższe PDI posiadała próbka o najmniejszej wielkości cząstek, natomiast największe (> 0,30 j.u.) próbki o największych rozmiarach (SLN1/SLN2). Wartości potencjału zeta osiągały wartości około |± 0 mV| dla wszystkich analizowanych SLN – podobnie jak w przypadku SLN inkorporowanych monoterpunami, co tłumaczono niejonowym charakterem zastosowanego surfaktantu (Poloxamer 188) [294].

Za pomocą planów czynnikowych eksperymentów potwierdzono, że do otrzymania próby odniesienia o najbardziej optymalnym składzie należy zastosować 5,00% wag. Imwitor® 900 K oraz 2,50% wag. Poloxameru 188 (SLN5-7).

5.2.5.1. Analiza wariancji dla SLN bez enkapsulowanego składnika aktywnego

Dla wszystkich zmiennych zależnych przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA) z poziomem istotności statycznej równej 95% ($\alpha = 0,05$). W rezultacie otrzymano wyniki istotne statystycznie, które przedstawiono w tabelach 50 – 52. Podobnie jak dla monoterpenu enkapsulowanego w SLN, przeprowadzono także test ANOVA z poziomem istotności statycznej wynoszącej 90% ($\alpha = 0,1$) oraz 85% ($\alpha = 0,15$), a otrzymane rezultaty przedstawiono w załącznikach 17 – 19.

Na podstawie otrzymanych wyników z poziomem istotności równym $\alpha = 0,05$ dowiedziono, że spośród ocenianych czynników i ich interakcji czynniki jedynie zmiana stężenia surfaktantu (Poloxamer 188) miała istotny statystycznie wpływ (wartość $p < 0,05$) na zmienną zależną Z-Ave (tabela 50). Warto dodać, że wraz ze zmniejszeniem poziomu istotności do 90% ($\alpha = 0,1$) lub 85% ($\alpha = 0,15$) również wzajemne interakcje czynników niezależnych (tzn. Imwitor® 900 K, Poloxamer 188) miały statystycznie istotny wpływ na zmienną zależną Z-Ave tj. wartość $p < 0,1$ dla $\alpha = 0,1$ oraz wartość $p < 0,15$ dla $\alpha = 0,15$, co przedstawiono w załącznikach 18 i 19. Ponadto, zarówno zmiany stężenia Poloxameru 188, jak i interakcje zachodzące pomiędzy czynnikami niezależnymi miały statystycznie istotny wpływ (wartość $p < 0,05$) na zmienną zależną PDI, co przedstawiono w tabeli 51.

W przypadku ostatniej zmiennej zależnej okazało się, że nie tylko zmiany stężenia surfaktantu (Poloxamer 188), ale również lipidu stałego (Imwitor® 900 K) miały statystycznie istotny wpływ (wartość $p < 0,05$) na ZP (tabela 52).

Tabela 50. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,05$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,86614.

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	1962,49	1	1962,49	0,62716	0,486241
(2) Poloxamer 188	35948,16	1	35948,16	11,48808	0,042794
(1) na (2)	22831,21	1	22831,21	7,29625	0,073714
Błąd	9387,51	3	3129,17		
Suma	70129,37	6			

Tabela 51. Analiza współczynnika polidispersyjności (PDI) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,05$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,92589.

Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,003782	1	0,003782	1,89461	0,262426
(2) Poloxamer 188	0,044310	1	0,044310	22,19595	0,018103
(1) na (2)	0,026732	1	0,026732	13,39075	0,035261
Błąd	0,005989	3	0,001996		
Suma	0,080814	6			

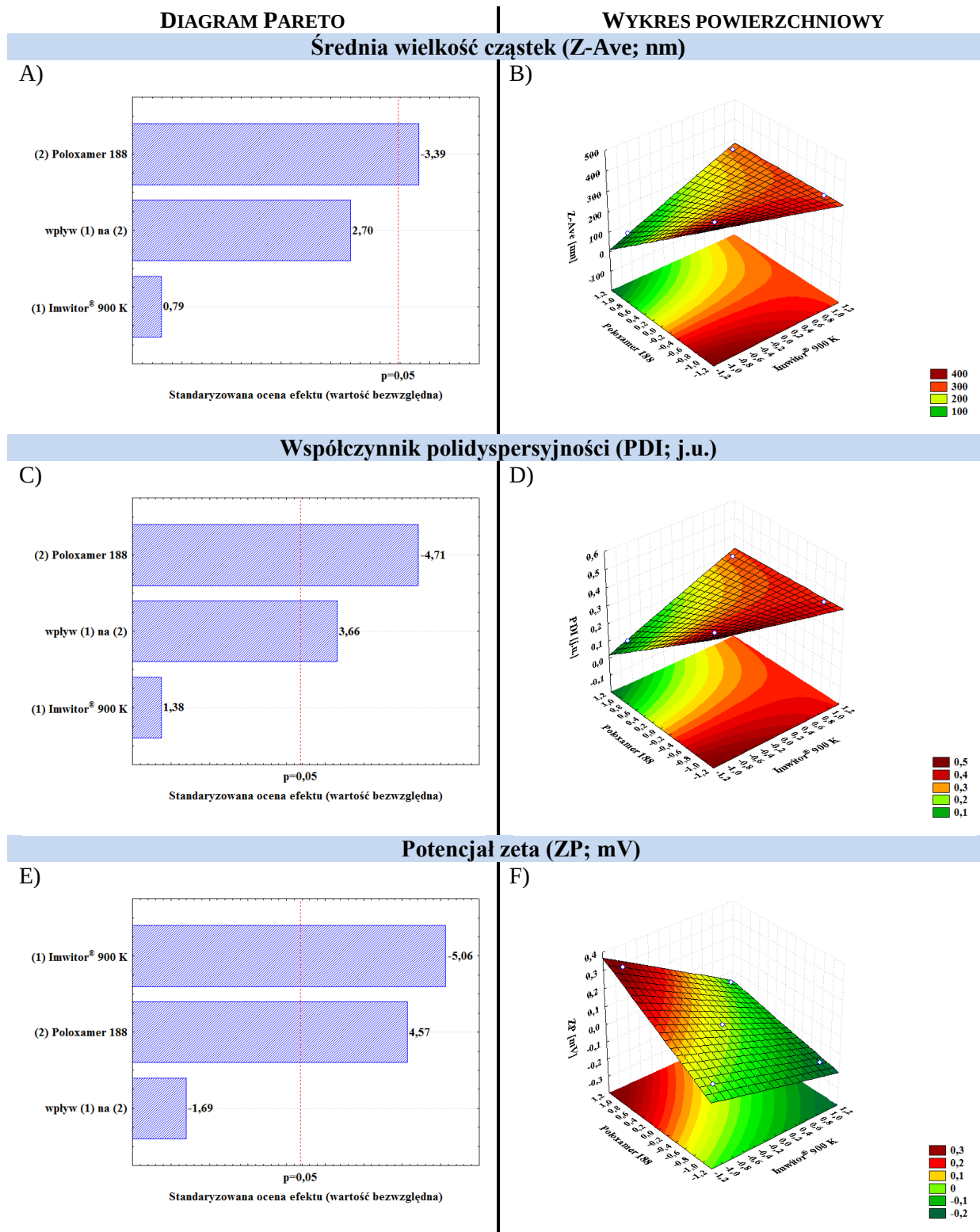
Tabela 52. Analiza potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA ($\alpha = 0,05$). Współczynnik determinacji (r^2) = 0,94272.

Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,064516	1	0,064516	25,64909	0,014861
(2) Poloxamer 188	0,052441	1	0,052441	20,84853	0,019703
(1) na (2)	0,007225	1	0,007225	2,87238	0,188683
Błąd	0,007546	3	0,002515		
Suma	0,131728	6			

5.2.5.2. Diagram Pareto i wykres powierzchniowy dla SLN bez enkapsulowanego składnika aktywnego

Za pomocą diagramów Pareto, ukazujących wartości współczynników odpowiedzi (wartość t) dla $\alpha = 0,05$ oraz z wykorzystaniem wykresów 3D dla próbki SLN bez enkapsulowanego składnika aktywnego przedstawiono wpływ surfaktantu (Poloxamer 188) i stałego lipidu (Imwitor® 900 K) na zmienne zależne (Z-Ave, PDI, ZP), a otrzymane wyniki

przedstawiono na rysunkach 59 A-F. Dodatkowo, wykonano wykresy warstwiczne, ukazujące powierzchnię odpowiedzi tworzoną dla Z-Ave, PDI oraz ZP (zob. zał. 20).



Rysunek 59. Diagram Pareto i trójwymiarowy wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla próbki puste-SLN, obrazujący efekt oddziaływania zmienności stężenia surfaktantu: Poloxamer188 (2), stałego lipidu: Imwitor® 900 K (1) oraz interakcji obu składników (1 na 2) na Z-Ave, PDI oraz ZP.

▪ Średnia wielkość cząstek

Na rysunku 59-A pokazano efekt oddziaływania zmienności stężenia stałego lipidu (1), surfaktantu (2) oraz interakcje obu składników (1 na 2) na Z-Ave. Zaobserwowano, że wzrost stężenia Poloxameru 188 miał negatywny wpływ na wielkość cząstek (wartość $t = -3,39$), powodując zmniejszenie ich rozmiaru, podczas gdy wzrost stężenia lipidu (wartość $t = 0,79$) oraz interakcja między czynnikami (wartość $t = 2,70$) wykazały pozytywny wpływ na wielkość cząstek, wpływając na wzrost wartości Z-Ave. Zależności te były widoczne na obrazie 3D, na podstawie którego odnotowano, że zwiększenie stężenia surfaktantu (Poloxamer 188) w przeciwieństwie do zwiększenia stężenia lipidu (Imwitor® 900 K) spowodowało zmniejszenie średniej wielkości cząstek do wartości poniżej 100 nm. Z kolei wprost proporcjonalne stężenia obu składników powodowały otrzymanie wartości Z-Ave w granicach 200 nm (rys. 59-B).

▪ Współczynnik polidispersyjności

Na rysunku 59-C, wzrost stężenia surfaktantu wpływał negatywnie (wartość $t = -4,71$) na PDI, powodując otrzymanie niższych wartości współczynnika polidispersyjności, natomiast wzrost stężenia lipidu (wartość $t = 1,38$) oraz interakcja między czynnikami (wartość $t = 3,66$) miały pozytywny wpływ na PDI, powodując w konsekwencji większe wartości PDI. Zależności te zaobserwowano także na wykresie dopasowania powierzchni, gdzie wzrost stężenia Poloxameru 188 obniżał wartości $PDI < 0,20$ j.u., podczas gdy wzrost stężenia Imwitoru® 900 K zwiększał wartość $PDI > 0,30$ j.u. (rys. 59-D).

▪ Potencjał zeta

Z kolei rys. 59-E przedstawia znaczący negatywny wpływ wzrostu stężenia lipidu (wartość $t = -5,06$) oraz równie negatywny wpływ podczas interakcji czynników (wartość $t = -1,69$) na ZP, co oznacza otrzymanie mniejszych wartości ZP. Ponadto, wzrost stężenia surfaktantu wykazał znaczący wpływ pozytywny (wartość $t = 4,57$) na potencjał zeta, powodując wzrost wartości ZP. Pomimo iż z przeprowadzonej analizy statystycznej wynikało, że obie zmienne niezależne (Poloxamer 188 i Imwitor® 900 K) miały znaczący wpływ na ładunek elektryczny SLN, a zwiększenie ilości lipidu powinno wpłynąć na zwiększenie stabilności nanodyspersji (rys. 59-F), po raz kolejny okazało się, że wszystkie wartości ZP były utrzymywane na poziomie $|\pm 0 \text{ mV}|$ w przypadku wszystkich analizowanych próbek SLN.

Podsumowując, za pomocą analizy statystycznej wybrano najbardziej optymalny skład SLN pozbawionych składnika aktywnego (monoterpeny). Dzięki przeprowadzonym planom czynnikowym eksperymentów, do dalszych badań wybrano skład próbki SLN5-7, których skład zawierał 5% wag. Imwitoru® 900 K oraz 2,50% wag. Poloxameru 188.

5.3. Porównanie Z-Ave, PDI i ZP wszystkich otrzymanych SLN inkorporowanych monoterpenami

Za pomocą przeprowadzonych planów czynnikowych eksperymentów oraz dogłębnej analizy statystycznej wybrano najbardziej optymalny, a zarazem jednakowy skład dla wszystkich SLN, który stanowił 1% wag. danego monoterpenu (α -pinen, cytral, geraniol, limonen), 4,00% wag. Imwitoru[®] 900 K, 2,50% wag. Poloxameru 188 oraz 92,50% wag. wody wysoce demineralizowanej (Milli-Q[®] Plus). Następnie dokonano ponownej syntezy SLN. Wszystkie nanocząstki lipidowe inkorporowane monoterpenami otrzymywano z wykorzystaniem techniki homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco. Każda otrzymana makroemulsja lipidowa została kolejno homogenizowana pod ciśnieniem 300 bar przez 30 minut za pomocą homogenizatora Emulsi Flex[®]-C3 (Avestin, Inc., Ottawa, Kanada) - dokładna preparatyka nanocząstek została opisana w rozdziale 4.2.1.

W tabeli 53 przedstawiono otrzymane wyniki dla Z-Ave, PDI oraz ZP, które zostały zmierzone bezpośrednio po syntezie, po 24 godzinach, tygodniu oraz miesiącu od dnia syntezy nanocząstek. Wszystkie próbki SLN przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

Tabela 53. Porównanie Z-Ave, PDI i ZP dla wszystkich SLN inkorporowanych monoterpenami oraz dla próbki odniesienia (puste-SLN) po syntezie, po 24 godzinach oraz po tygodniu i miesiącu przechowywania w temperaturze 4, 25 i 40°C.

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Z-Ave [nm] $\pm$ SD	PDI [j.u.] $\pm$ SD	ZP [mV] $\pm$ SD
α -pinen-SLN	po syntezie	25	90 $\pm$ 0,31	0,17 $\pm$ 0,01	$\pm$ 0,00 $\pm$ 0,01
	po 24 h	4	101 $\pm$ 0,15	0,15 $\pm$ 0,02	$\pm$ 0,09 $\pm$ 0,05
		25	106 $\pm$ 0,10	0,22 $\pm$ 0,06	$\pm$ 0,02 $\pm$ 0,38
		40	109 $\pm$ 0,21	0,21 $\pm$ 0,01	$\pm$ 0,01 $\pm$ 0,18
	po tygodniu	4	111 $\pm$ 0,10	0,18 $\pm$ 0,02	$\pm$ 0,02 $\pm$ 0,01
		25	116 $\pm$ 0,23	0,27 $\pm$ 0,05	$\pm$ 0,04 $\pm$ 0,22
		40	209 $\pm$ 2,80	0,25 $\pm$ 0,01	$\pm$ 0,08 $\pm$ 0,01
	po miesiącu	4	115 $\pm$ 1,50	0,20 $\pm$ 0,02	$\pm$ 0,06 $\pm$ 0,15
		25	127 $\pm$ 0,21	0,19 $\pm$ 0,01	$\pm$ 0,07 $\pm$ 0,01
		40	291 $\pm$ 11,49	0,28 $\pm$ 0,10	$\pm$ 0,12 $\pm$ 0,02
cytral-SLN	po syntezie	25	125 $\pm$ 1,04	0,22 $\pm$ 0,05	$\pm$ 0,00 $\pm$ 0,09
	po 24 h	4	130 $\pm$ 0,51	0,19 $\pm$ 0,03	$\pm$ 0,02 $\pm$ 0,15
		25	150 $\pm$ 1,70	0,25 $\pm$ 0,01	$\pm$ 0,04 $\pm$ 0,09
		40	210 $\pm$ 9,61	0,31 $\pm$ 0,05	$\pm$ 0,01 $\pm$ 0,22
	po tygodniu	4	289 $\pm$ 10,21	0,28 $\pm$ 0,02	$\pm$ 0,06 $\pm$ 0,05
		25	441 $\pm$ 143,60	0,49 $\pm$ 0,10	$\pm$ 0,06 $\pm$ 0,12
		40	656 $\pm$ 458,51	0,65 $\pm$ 0,25	$\pm$ 0,03 $\pm$ 0,01
	po miesiącu	4	392 $\pm$ 163,01	0,30 $\pm$ 0,05	$\pm$ 0,12 $\pm$ 0,03
		25	431 $\pm$ 19,47	0,40 $\pm$ 0,20	$\pm$ 0,13 $\pm$ 0,14
		40	3279 $\pm$ 500,70	0,80 $\pm$ 0,01	$\pm$ 0,10 $\pm$ 0,51

geraniol-SLN	po syntezie	25	$120 \pm 1,05$	$0,18 \pm 0,02$	$ \pm 0,00 \pm 0,02$
	po 24 h	4	$468 \pm 257,52$	$0,63 \pm 0,26$	$ \pm 0,09 \pm 0,06$
		25	$128 \pm 0,90$	$0,21 \pm 0,03$	$ \pm 0,00 \pm 0,86$
		40	$120 \pm 0,50$	$0,14 \pm 0,27$	$ \pm 0,03 \pm 0,18$
	po tygodniu	4	$500 \pm 175,02$	$0,48 \pm 0,52$	$ \pm 0,05 \pm 0,02$
		25	$164 \pm 0,50$	$0,52 \pm 0,03$	$ \pm 0,15 \pm 0,51$
		40	$192 \pm 1,65$	$0,49 \pm 0,52$	$ \pm 0,04 \pm 0,19$
	po miesiącu	4	$2687 \pm 455,06$	$0,30 \pm 0,06$	$ \pm 0,06 \pm 0,11$
		25	$175 \pm 1,70$	$0,47 \pm 0,02$	$ \pm 0,20 \pm 0,15$
		40	$202 \pm 12,61$	$0,31 \pm 0,12$	$ \pm 0,11 \pm 0,14$
limonen-SLN	po syntezie	25	$141 \pm 1,62$	$0,34 \pm 0,08$	$ \pm 0,00 \pm 0,01$
	po 24 h	4	$151 \pm 0,60$	$0,16 \pm 0,02$	$ \pm 0,04 \pm 0,18$
		25	$142 \pm 0,55$	$0,26 \pm 0,01$	$ \pm 0,05 \pm 0,02$
		40	$290 \pm 0,50$	$0,30 \pm 0,02$	$ \pm 0,02 \pm 0,02$
	po tygodniu	4	$159 \pm 0,65$	$0,21 \pm 0,01$	$ \pm 0,05 \pm 0,15$
		25	$143 \pm 26,01$	$0,31 \pm 0,10$	$ \pm 0,06 \pm 0,12$
		40	$320 \pm 10,51$	$0,36 \pm 0,02$	$ \pm 0,03 \pm 0,18$
	po miesiącu	4	$181 \pm 0,50$	$0,22 \pm 0,01$	$ \pm 0,06 \pm 0,18$
		25	$173 \pm 0,90$	$0,38 \pm 0,01$	$ \pm 0,01 \pm 0,27$
		40	$470 \pm 100,02$	$0,49 \pm 0,02$	$ \pm 0,04 \pm 0,02$
puste-SLN	po syntezie	25	$147 \pm 1,30$	$0,40 \pm 0,01$	$ \pm 0,01 \pm 0,02$
	po 24 h	4	$189 \pm 3,20$	$0,53 \pm 0,08$	$ \pm 0,00 \pm 0,09$
		25	$201 \pm 12,61$	$0,53 \pm 0,12$	$ \pm 0,12 \pm 0,11$
		40	$392 \pm 165,01$	$0,49 \pm 0,52$	$ \pm 0,05 \pm 0,02$
	po tygodniu	4	$190 \pm 1,02$	$0,48 \pm 0,01$	$ \pm 0,01 \pm 0,09$
		25	$189 \pm 3,20$	$0,31 \pm 0,02$	$ \pm 0,01 \pm 0,01$
		40	$540 \pm 130,01$	$0,58 \pm 0,02$	$ \pm 0,04 \pm 0,02$
	po miesiącu	4	$179 \pm 29,81$	$0,30 \pm 0,06$	$ \pm 0,03 \pm 0,08$
		25	$147 \pm 1,31$	$0,26 \pm 0,02$	$ \pm 3,23 \pm 5,70$
		40	$804 \pm 151,01$	$0,74 \pm 0,15$	$ \pm 0,02 \pm 0,01$

Na podstawie wyników zebranych w tabeli 53 zaobserwowano, że średnia wielkość cząstek tuż po syntezie wszystkich SLN inkorporowanych lub nie monoterpunami wahała się od $90 \pm 0,31$ nm (α -pinen-SLN) do $141 \pm 1,62$ nm (limonen-SLN) oraz $147 \pm 1,30$ nm (puste-SLN), podczas gdy PDI wahał się od $0,17 \pm 0,01$ j.u. (α -pinen-SLN) do $0,34 \pm 0,08$ j.u. (limonen-SLN) oraz $0,40 \pm 0,01$ j.u. (puste-SLN). Tym samym wywnioskowano, że enkapsulowane składniki aktywne, takie jak np. monoterpény, mogą w pewnym stopniu wpływać na mniejszą wielkość otrzymywanych nanocząstek lipidowych, o czym dowiodły także najnowsze badania związane z enkapsulacją linalolu w SLN [302].

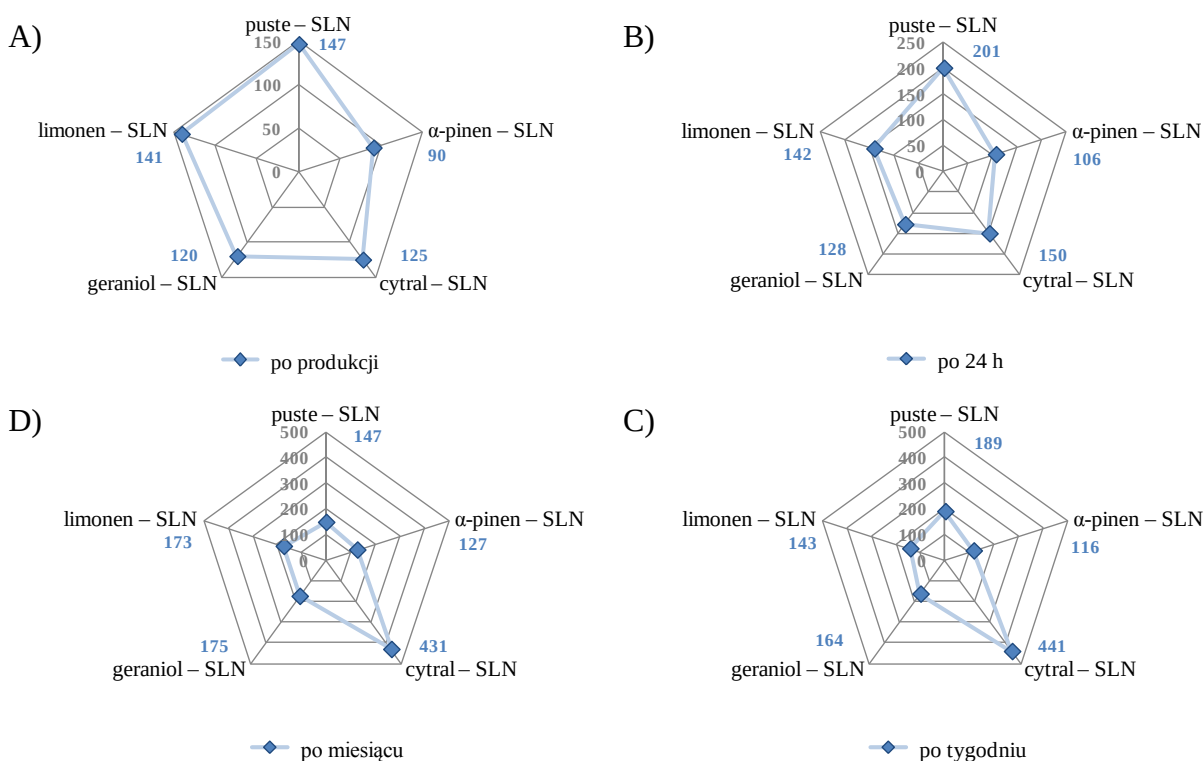
Po 24 godzinach przechowywania wszystkich próbek w różnych temperaturach tj. 4, 25 i 40 °C zauważono, że średnia wielkość cząstek we wszystkich przypadkach była większa niż

bezpośrednio po syntezie, co mogło świadczyć o stopniowo rozpoczynającej się aglomeracji cząstek. Najmniejsze różnice wielkości obserwowano w granicach od zaledwie ok. 1 nm (limonen-SLN) do nawet 54 nm (puste-SLN) dla wszystkich SLN przechowywanych w temperaturze pokojowej. Próbkę przechowywaną w obniżonej temperaturze (4 °C) po 24 h odznaczały się podobną wielkością do SLN przechowywanych w 25 °C, a różnice wielkości w porównaniu z wartościami zmierzonymi w dniu syntezy wynosiły od ok. 5 nm (cytral-SLN) do ok. 43 nm (puste-SLN); za wyjątkiem próbki geraniol-SLN, w której cząstki w 4 °C wzrosły aż o 348 nm. Tak znaczące różnice wskazywały na negatywny wpływ niskiej temperatury na przechowywanie geraniolu enkapsulowanego w SLN. Efekt ten utrzymywał się również w kolejnych tygodniach badań, a po miesiącu wartość Z-Ave próbki z geranielem znacząco przekroczyła średnią wielkość cząstek o wymiarach nanometrycznych ($2687 \pm 455,06$ nm). Z kolei większość SLN przechowywanych w podwyższonej temperaturze (40 °C) po 24 h odznaczała się wyższą wielkością cząstek w stosunku do swoich odpowiedników przechowywanych w 25 °C. Różnice wahały się w granicach od ok. 20 nm (α -pinen-SLN) do 245 nm (puste-SLN), natomiast warto zaznaczyć, że dla próbki z geranielem nie zaobserwowano żadnych zmian.

Po tygodniu przechowywania wszystkich próbek w 4, 25 i 40 °C odnotowano wzrost wielkości cząstek dla wszystkich analizowanych SLN, co wskazywało na postępujący proces aglomeracji [303], a tym samym świadczyło o pojawiających się procesach niestabilności takich jak np. śmietanowanie czy sedymentacja (rozdział 5.4. Analiza i porównanie stabilności dla otrzymanych SLN inkorporowanych monoterpunami z wykorzystaniem analizatora dyspersji LUMiSizer®). Największe zmiany były widoczne dla próbki cytral-SLN, dla której wielkość cząstek w temperaturze 25 °C wyniosła $441 \pm 143,60$ nm (wzrost o 291 nm w stosunku do pomiarów po 24 h), a w 40 °C odnotowano wielkość $656 \pm 458,51$ nm (wzrost aż o 445 nm), przy równie wysokich PDI, wynoszących odpowiednio $0,49 \pm 0,10$ j.u. (25 °C) oraz $0,65 \pm 0,25$ j.u. (po tygodniu pomiarów). Z kolei w temperaturze 4 °C, cytral-SLN posiadał najniższe wielkości $289 \pm 10,21$ (po tygodniu) oraz $392 \pm 163,01$ (po miesiącu), co wskazywało na korzystny wpływ niskiej temperatury dla cytralu enkapsulowanego w SLN. Warto dodać, że cytral uważany jest powszechnie za jeden z najbardziej niestabilnych monoterpenu i cechuje się krótkim okresem przydatności [304]. Ponadto, jako główny składnik aromatu olejków cytrusowych łatwo ulega degradacji chemicznej, prowadząc do utraty zapachu [305]. W przypadku pozostałych próbek, przechowywanych przez okres tygodnia w temperaturze 4 °C, zaobserwowano wzrost wielkości cząstek o ok. 10 nm (α -pinen-SLN i limonen-SLN) oraz o 1 nm dla próby odniesienia. Także niewielkie zmiany Z-Ave dla tych samych próbek były widoczne po przechowywaniu w 25 °C, przy czym wzrost wielkości cząstek o 10 nm odnotowano dla α -pinen-SLN, 1 nm dla limonen-SLN, natomiast dla próbki bez składnika aktywnego wielkość cząstek uległa redukcji z $201 \pm 12,61$ nm do $189 \pm 3,20$ nm. Największy wzrost Z-Ave (> 100 nm) dla próbek z α -pinenem, limonenem oraz pozbawionej składnika aktywnego odnotowano w temperaturze 40 °C, tak samo jak w przypadku cytralu. Na tej podstawie wywnioskowano, że wysoka temperatura może przyspieszać proces aglomeracji/agregacji cząstek w SLN inkorporowanych lotnymi substancjami (np. monoterpemy), a wraz z upływem czasu może spowodować nasilone występowanie procesów niestabilności, takich jak m.in. śmietanowanie czy sedymentacja [306].

Przypuszczenia te potwierdziły się również po miesiącu badań, kiedy ponownie dokonano analizy wszystkich próbek. Zaobserwowano, że po przechowywaniu SLN

w temperaturze 40 °C, nastąpił znaczący wzrost Z-Ave dla wszystkich próbek za wyjątkiem geraniolu enkapsulowanego w SLN, dla którego najbardziej niekorzystnie wpłynęło przechowywanie w 4 °C. Warto dodać, że najbardziej optymalną temperaturą dla wszystkich próbek była temp. 25 °C, bowiem średnia wielkość cząstek spośród wszystkich SLN wahała się w granicach od $127 \pm 0,21$ nm dla α -pinen-SLN do $431 \pm 19,47$ nm dla cytral-SLN, przy współczynniku polidispersyjności wynoszącym odpowiednio $0,19 \pm 0,01$ j.u. (α -pinen) oraz $0,40 \pm 0,20$ j.u. (cytral). Przebieg zmian Z-Ave zachodzących dla wszystkich badanych próbek w temperaturze 25 °C, w trakcie całego okresu badań, przedstawiono na rysunku 60.



Rysunek 60. Porównanie średnich wielkości cząstek dla wszystkich badanych SLN po syntezie (A), po 24 godzinach (B) oraz po tygodniu (C) i miesiącu (D) przechowywania w temperaturze 25 °C – uznanej za najbardziej optymalną dla analizowanych próbek.

Wartości potencjału zeta wynosiły około $|\pm 0$ mV dla wszystkich analizowanych SLN zarówno bezpośrednio po syntezie, jak i po 24 godzinach, po tygodniu oraz po miesiącu przechowywania próbek w różnych temperaturach (4, 25 i 40 °C).

Niezmiennosc otrzymanych wartości, utrzymującą się w granicach $|\pm 0$ mV można tłumaczyć niejonowym charakterem zastosowanego surfaktantu (Poloxamer 188), który utworzył stabilizowaną sferycznie zaadsorbowaną warstwę polimeru na powierzchni SLN [294].

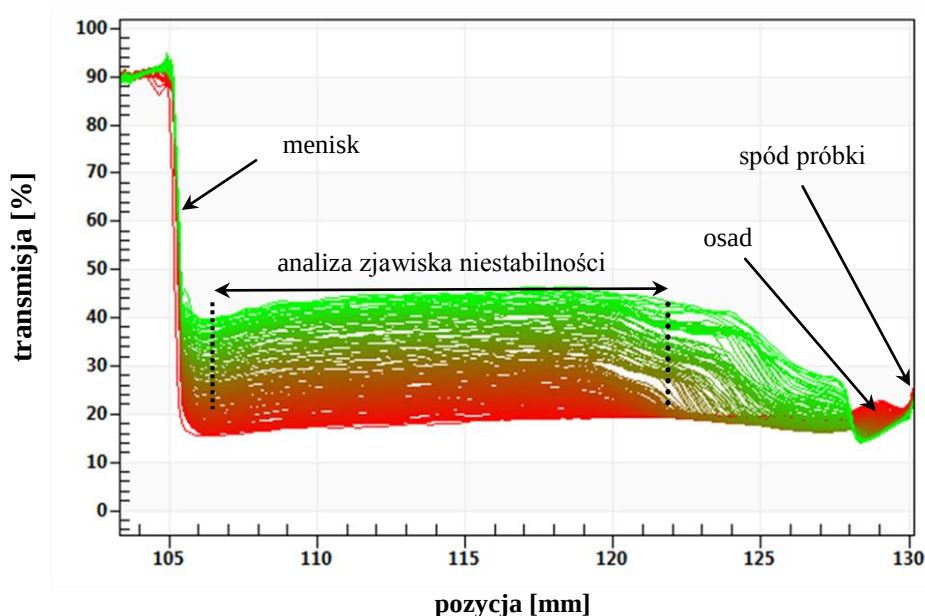
5.4. Analiza i porównanie stabilności dla otrzymanych SLN inkorporowanych monoterpenami z wykorzystaniem analizatora dyspersji LUMiSizer®

W celu oszacowania i porównania stabilności (temperaturowej, jak również długoterminowej) wytworzonych dyspersji monoterpenów enkapsulowanych w SLN zastosowano analizator dyspersji LUMiSizer®. Za pomocą tego urządzenia zarejestrowano zmiany transmitowanego światła w czasie i przestrzeni w postaci profili transmisyjnych (ang. *Space- and Time-resolved Extinction Profiles*, STEP), obliczono indeks niestabilności oraz dostarczono informacji na temat kinetyki procesu rozdzielania, obliczając prędkość migracji cząstek, która jest ściśle związana z rozkładem wielkości cząstek [307, 308].

5.4.1. Analiza zjawisk niestabilności na podstawie uzyskanych profili transmisyjnych

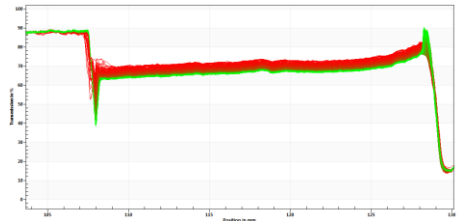
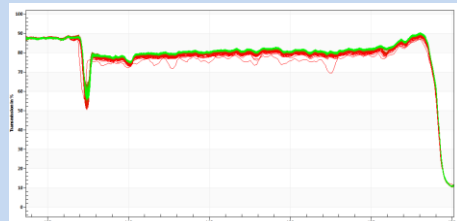
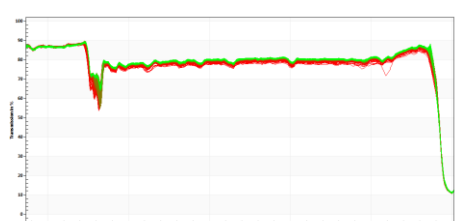
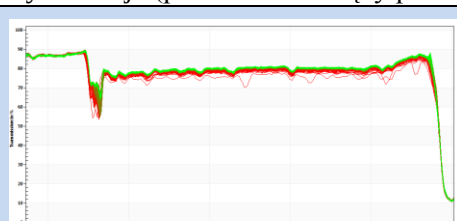
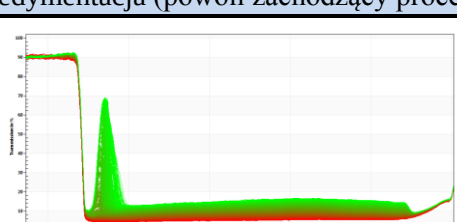
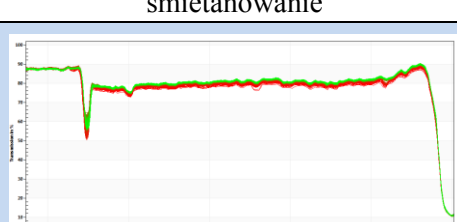
Przyjmuje się, że stabilne dyspersje koloidalne tworzą profil transmisyjny w postaci tzw. „płaskiego złoża” (ang. *'flat-bed'*), natomiast cząstki, które ulegają agregacji zwykle tworzą tzw. „profil skokowy” (ang. *'step-profile'*). Dzieje się tak za sprawą różnych prędkości sedymentacji cząstek, różniących się dodatkową wielkością [245].

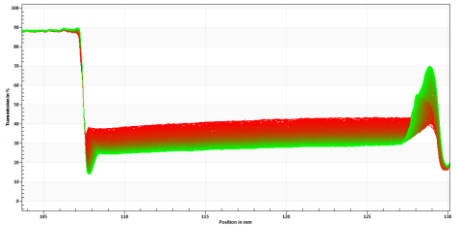
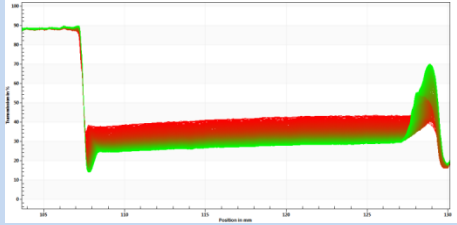
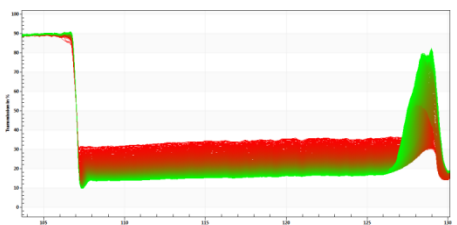
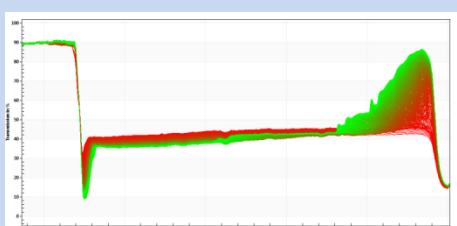
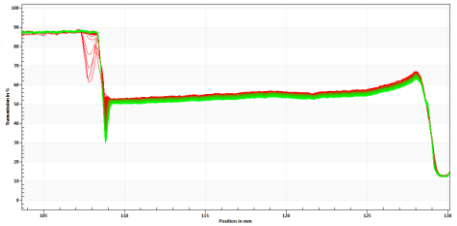
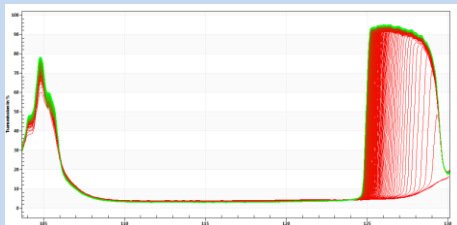
Na rysunku 61 przedstawiono przykładową analizę widma transmisyjnego otrzymywanego dla analizowanych nanocząstek lipidowych. Natomiast dane przedstawione w tabeli 54 przedstawiają profile transmisyjne badanych monoterpenów enkapsulowanych w SLN jak również próby odniesienia. Wszystkie próbki zostały poddane zarówno analizie stabilności temperaturowej, bowiem były przechowywane w temperaturze 4, 25 i 40 °C, jak również długoterminowej, gdyż zachodzące w nich zmiany rejestrowano do 30 dni od momentu syntezy. Na każdy z otrzymanych obrazów składało się łącznie 1 000 profili transmisyjnych, rejestrowanych w odstępach co 10 sekund przy przyspieszeniu odśrodkowym wynoszącym 4 000 rpm.

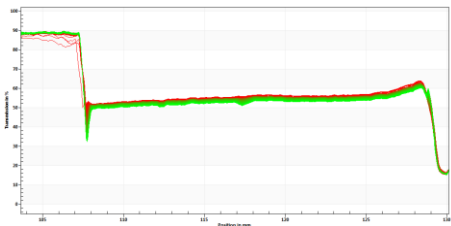
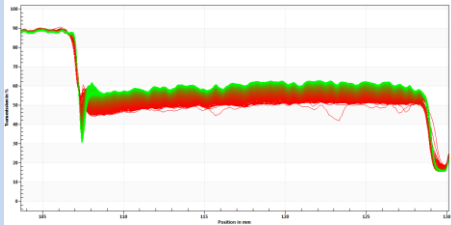
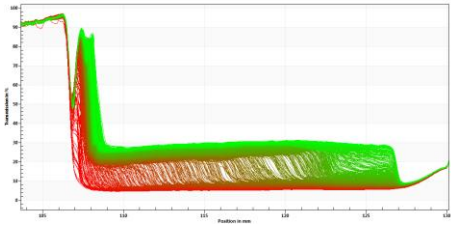
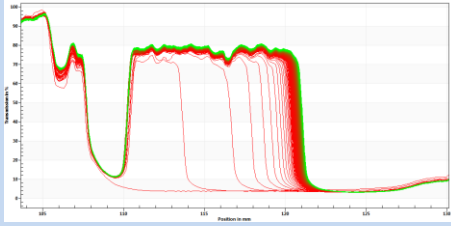
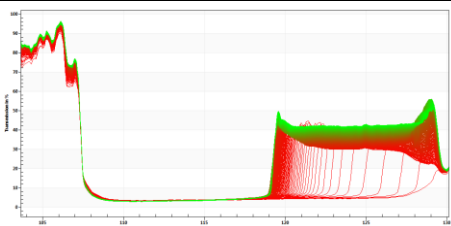
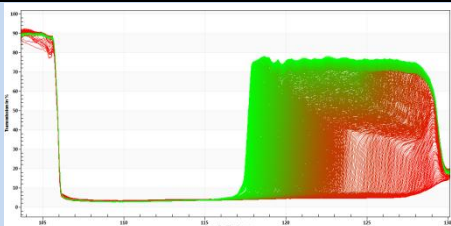


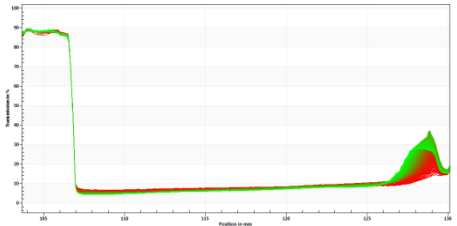
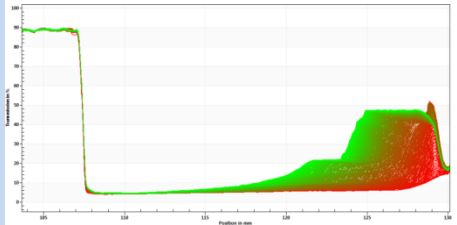
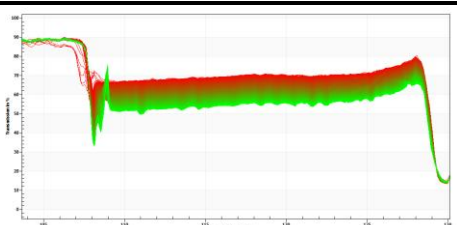
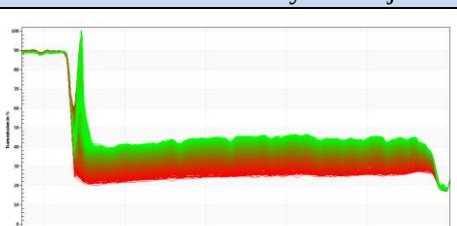
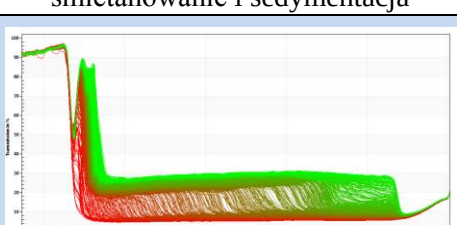
Rysunek 61. Przykładowy profil transmisyjny próbki monoterpen-SLN, obrazujący separację, w wyniku której powstaje osad na dnie celki pomiarowej, a w konsekwencji zachodzi proces sedymentacji.

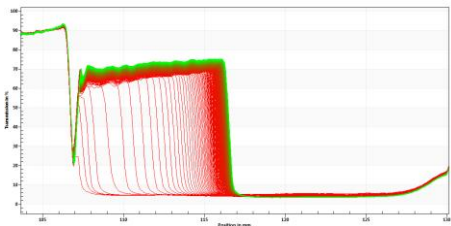
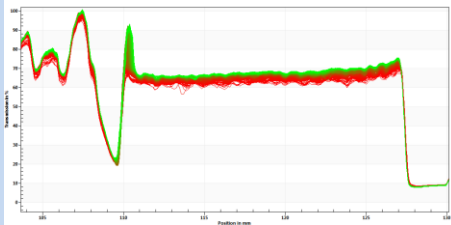
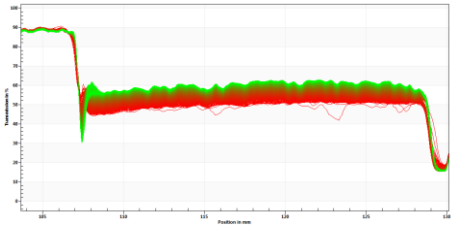
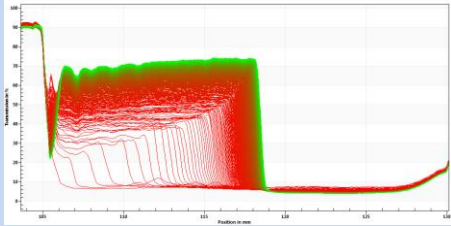
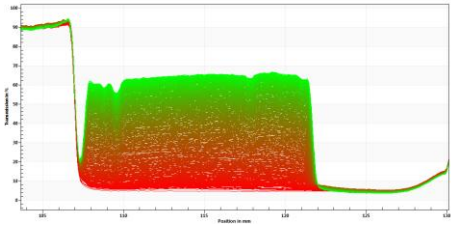
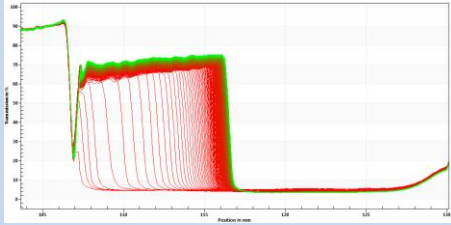
Tabela 54. Porównanie otrzymanych zjawisk niestabilności na podstawie profili transmisyjnych dla wszystkich SLN inkorporowanych monoterpenami oraz dla próbki odniesienia (puste-SLN).

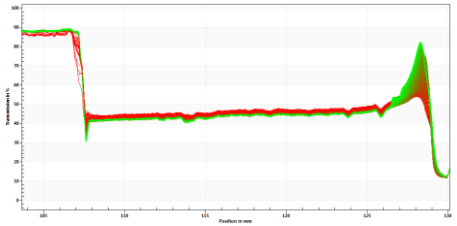
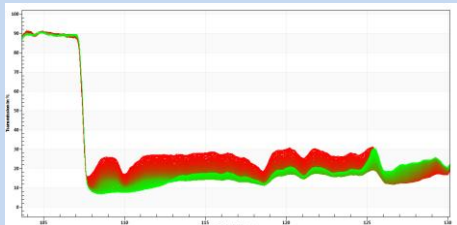
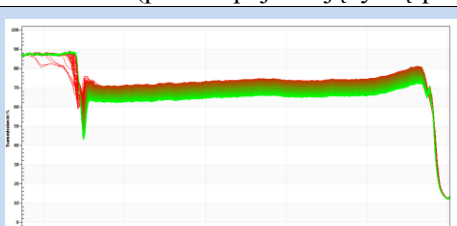
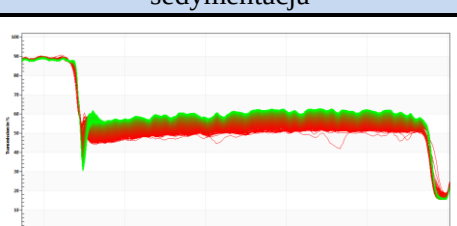
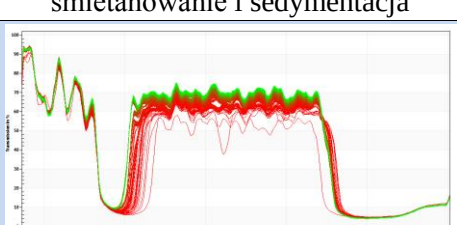
Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Profile transmisyjne i rozpoznanie zjawiska niestabilności
A) α -pinen-SLN	po syntezie	25	 śmietanowanie
	po 24 h	4	 sedymantacja (powoli zachodzący proces)
		25	 sedymantacja (powoli zachodzący proces)
		40	 sedymantacja (powoli zachodzący proces)
	po tygodniu	4	 śmietanowanie
		25	 sedymantacja (powoli zachodzący proces)

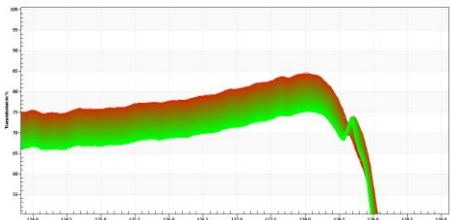
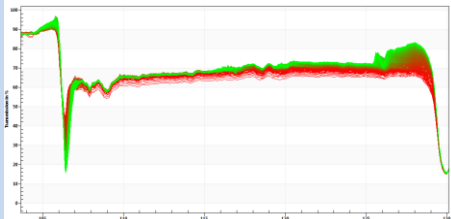
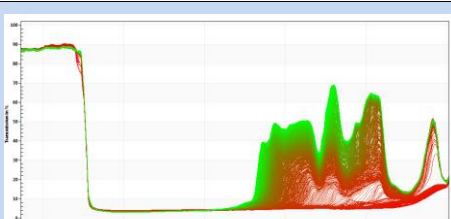
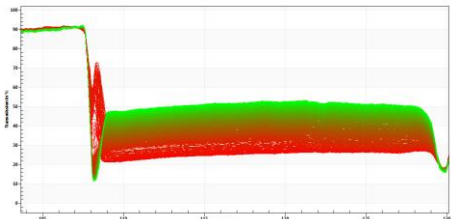
Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Profile transmisyjne i rozpoznanie zjawiska niestabilności
		40	 śmietanowanie i sedymentacja
	po miesiącu	4	 śmietanowanie i sedymentacja
		25	 śmietanowanie i sedymentacja
		40	 śmietanowanie i sedymentacja
B) cytral-SLN	po syntezie	25	 śmietanowanie (powoli pojawiający się proces)
	po 24 h	4	 rozpoczynający się proces agregacji/flokulacji

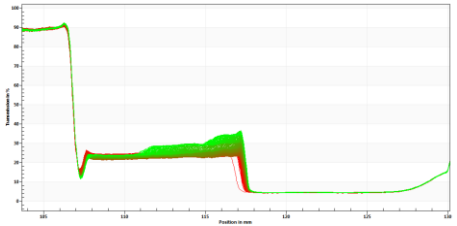
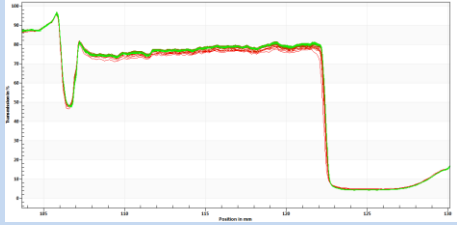
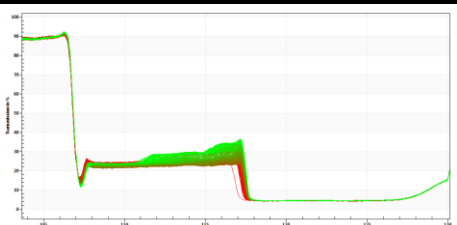
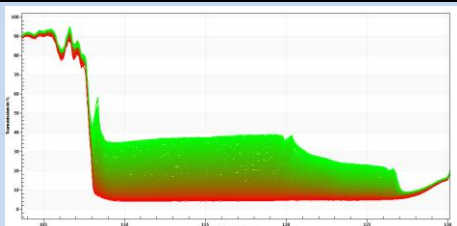
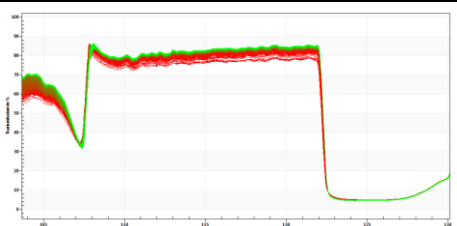
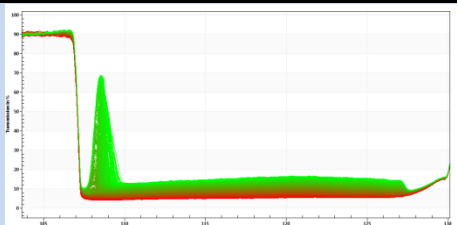
Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Profile transmisyjne i rozpoznanie zjawiska niestabilności
		25	 śmietanowanie (powoli zachodzący proces)
		40	 śmietanowanie ze stopniowo zachodzącą sedymentacją cząstek
	po tygodniu	4	 śmietanowanie z agregacją/flokulacją
		25	 śmietanowanie i sedymentacja z agregacją/flokulacją
		40	 powoli pojawiający się proces śmietanowania ze stopniowo zachodzącą sedymentacją cząstek
	po miesiącu	4	 śmietanowanie z wyraźną agregacją/flokulacją cząstek

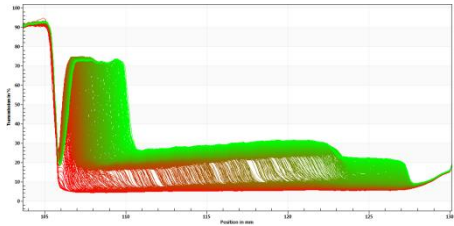
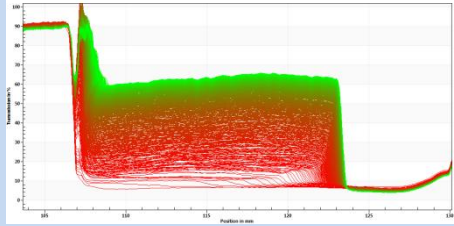
Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Profile transmisyjne i rozpoznanie zjawiska niestabilności
		25	 śmietanowanie (powoli zachodzący proces)
		40	 śmietanowanie (powoli zachodzący proces)
C) geraniol-SLN	po syntezie	25	 śmietanowanie i sedymentacja
	po 24 h	4	 śmietanowanie i sedymentacja
		25	 śmietanowanie i sedymentacja
		40	 śmietanowanie ze stopniowo zachodzącą sedymentacją cząstek

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Profile transmisyjne i rozpoznanie zjawiska niestabilności
	po tygodniu	4	 śmietanowanie i sedymentacja
		25	 sedymentacja
		40	 sedymentacja
	po miesiącu	4	 śmietanowanie i sedymentacja z agregacją/flokulacją cząstek
		25	 śmietanowanie i sedymentacja
		40	 śmietanowanie i sedymentacja

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Profile transmisyjne i rozpoznanie zjawiska niestabilności
D) limonen-SLN	po syntezie	25	 śmietanowanie (powoli pojawiający się proces)
	po 24 h	4	 śmietanowanie
		25	 śmietanowanie (powoli pojawiający się proces)
		40	 sedymentacja
	po tygodniu	4	 śmietanowanie i sedymentacja
		25	 śmietanowanie i sedymentacja

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Profile transmisyjne i rozpoznanie zjawiska niestabilności
		40	 sedymentacja
	po miesiącu	4	 śmietanowanie i sedymentacja
		25	 śmietanowanie i sedymentacja
		40	 sedymentacja z agregacją/flokulacją cząstek
E) puste-SLN	po syntezie	25	 śmietanowanie
	po 24 h	4	 śmietanowanie

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Profile transmisyjne i rozpoznanie zjawiska niestabilności
		25	 śmietanowanie
		40	 powoli pojawiające się procesy śmietanowania i sedymentacji
	po tygodniu	4	 śmietanowanie
		25	 śmietanowanie
		40	 sedymentacja
	po miesiącu	4	 śmietanowanie

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Profile transmisyjne i rozpoznanie zjawiska niestabilności
		25	 równoczesne procesy śmietanowania i sedymentacji z powoli zachodzącą agregacją/flokulacją cząstek
		40	 równoczesne procesy śmietanowania i sedymentacji z wyraźną agregacją/flokulacją cząstek

W przypadku próbki α -pinen-SLN (tab. 54-A), na podstawie analizy przeprowadzonej w dniu syntezy zaobserwowano rozpoczęcie procesu śmietanowania. Zdecydowana większość profili wykazywała niższy % transmisji w porównaniu z pierwszym profilem otrzymanym w pobliżu menisku. Wskazywało to na migrację cząstek od dołu do góry próbki, co jest charakterystycznym zjawiskiem dla procesu śmietanowania [242, 309]. Po 24 godzinach przechowywania próbki α -pinen-SLN w temperaturze 4, 25 oraz 40 °C okazało się, że pod wpływem każdej temperatury rozpoczął się proces sedymentacji, bowiem % transmisji ostatnich profili były wyższe od początkowych. Proces wskazywał, że cząsteczki nanodyspersji zaczęły przesuwac się na dno próbki, co jest charakterystyczne dla zjawiska sedymentacji [242, 310]. Proces stopniowo zachodzącej sedymentacji utrzymywał się także po tygodniu dla próbki pozostawionej w 25 °C. Dla próbki w 4 °C pojawiło się wyraźne śmietanowanie, a z kolei α -pinen-SLN przechowywany przez tydzień w temperaturze 40 °C uległ obu procesom: śmietanowania i sedymentacji. Te same równocześnie pojawiające się procesy były zauważalne we wszystkich próbkach (tzn. w 4, 25 i 40 °C) po miesiącu przechowywania w różnych warunkach temperaturowych, przy czym w 40 °C zjawiska niestabilności były najmniejsze. Warto dodać, że we wszystkich próbkach zaobserwowano także wytrącenie osadu, co potwierdziło obecność rozpoznanych zjawisk niestabilności (sedymentacja) [311].

Otrzymane w dniu syntezy profile separacji próbki cytral-SLN (tab. 54-B) wskazywały na powoli pojawiający się proces śmietanowania, podobny do wcześniej analizowanej próbki α -pinen-SLN (tab. 54-A, po syntezie). Analiza próbki cytral-SLN po 24 godzinach wykazała, że proces śmietanowania utrzymywał się jedynie w temp. 25 °C, podczas gdy w temp. 4 °C zaobserwowano proces agregacji cząstek (zjawisko flokulacji), natomiast w 40 °C oprócz śmietanowania rozpoczął się także proces sedymentacji. Po tygodniu, próbka enkapsulowanego cytralu przechowywana w 25 °C wykazała bardzo wyraźny proces separacji

z obecnością zarówno zjawiska śmietanowania, jak i sedymentacji, z dodatkową równoczesną agregacją/flokulacją cząstek. W efekcie w próbce widoczne były duże agregaty (tzw. „kłaczk”, z ang. *flocs*), które wyodrębniły się z roztworu koloidalnego tworząc osad [312]. Fakt wystąpienia równocześnie obu procesów (śmietanowania i sedymentacji) tłumaczono tym, że z upływem czasu widoczne były dwa obszary o niskim % transmisji – jeden blisko menisku, a drugi blisko dna próbki, co wskazywało na obecność odpowiednio: śmietanowania i sedymentacji. Z kolei na obecność agregacji/flokulacji wskazywało zmniejszanie się odstępów pomiędzy każdym profilem, co oznaczało, że wraz z upływem czasu cząstki poruszały się wolniej i zaczynały się zagęszczać, tworząc „kłaczk” [312, 313]. Po tygodniu przechowywania w temp. 4 °C, w próbce cytral–SLN zaobserwowano znaczący proces śmietanowania z równocześnie postępującym procesem agregacji/flokulacji, podczas gdy w 40 °C rozpoznano powoli pojawiający się proces śmietanowania ze stopniowo zachodzącą sedymentacją cząstek. Po miesiącu badań, we wszystkich próbkach (tzn. w 4, 25 i 40 °C) wszędzie utrzymywał się proces śmietanowania, z dodatkowo zaawansowanym procesem agregacji/flokulacji dla próbki pozostawionej w temp. 4 °C. Najmniejszy stopień niestabilności wykazywała próbka cytralu w temperaturze pokojowej, na co wskazywał otrzymany profil transmisyjny.

Analiza próbki geraniol–SLN (tab. 54-C) wykazała najbardziej widoczne zmiany, zarejestrowane już od pierwszego dnia analizy. Początkowa analiza próbki geraniol–SLN wykazywała podobny proces separacji po syntezie, który występował także dla próbki α -pinen–SLN (tab. 54-A). Podobne ułożenie profili transmisyjnych w obu przypadkach wskazywało na występowanie zjawiska śmietanowania, z dodatkowo rozpoznany proces sedymentacji dla próbki geraniol–SLN. Po 24 godzinach oraz po tygodniu przechowywania próbki geraniolu w temp. 4, 25 i 40 °C, układ profili transmisyjnych wskazywał na występowanie zjawiska sedymentacji podczas przechowywania we wszystkich odmiennych temperaturach. Warto dodać, że efekt ten utrzymywał się także po miesiącu analiz. W próbce geraniol–SLN przechowywanej w 4 °C zaobserwowano najbardziej nasilony proces separacji, z dodatkową agregacją/flokulacją cząstek, co mogło tłumaczyć znaczący wzrost wielkości cząstek (tab. 53) odnotowany za pomocą analizy spektroskopii korelacji fotonów (rozdział 5.3.).

Z kolei próbka limonen–SLN (tab. 54-D) wykazała bardzo podobne ułożenie profili transmisyjnych w porównaniu z próbą cytral–SLN (tab. 54-C), zarówno w analizie bezpośredniej po syntezie, po 24 godzinach czy po tygodniu przechowywania próbek w temperaturze pokojowej. Tym samym, w próbce limonen–SLN wykryto po syntezie powoli postępujący proces śmietanowania, podczas gdy po 7 dniach w 25 °C zauważono pojawienie się równoczesnego procesu sedymentacji. Dla limonenu enkapsulowanego w SLN i przechowywanego przez 24 godziny w temp. 4 °C widoczny był znaczący proces śmietanowania, podczas gdy w temp. 40 °C pojawił się proces sedymentacji (utrzymujący się w kolejnych dniach). Po tygodniu, w próbce przechowywanej w 4 °C zaobserwowano dodatkowy równoczesny proces sedymentacji, który utrzymywał się także po miesiącu badań – podobnie jak w przypadku próbki w 25 °C. Jedyne zmiany po miesiącu analiz zaobserwowano dla próbki limonen–SLN w temp. 40 °C, w której oprócz sedymentacji widoczny był niewielki stopień agregacji/flokulacji cząstek.

W przypadku próbki SLN niezawierającej składnika aktywnego (tab. 54-E) zaobserwowano początkowy proces śmietanowania, który utrzymywał się również po przechowywaniu próbki w temp. 4 i 25 °C w ciągu 24 godzin od dnia syntezy. Tymczasem

pod wpływem temperatury 40 °C zarejestrowano zmiany ułożenia profili transmisyjnych, świadczące o dodatkowo pojawiającym się procesie sedymentacji. Po tygodniu analizy SLN bez składnika aktywnego odnotowano utrzymujące się procesy śmietanowania w temperaturach 4 i 25 °C, a w 40 °C – proces sedymentacji. Ostatnia analiza przeprowadzona po miesiącu od dnia syntezy potwierdziła obserwowane wcześniej zjawiska niestabilności. Największe zmiany były widoczne po przechowywaniu „pustego SLN” w temp. 40 °C, gdzie oprócz równoczesnych procesów śmietanowania i sedymentacji widoczna była agregacja/flokulacja cząstek. Proces ten pojawił się również dodatkowo w temp. 25 °C, ale z dużo mniejszym nasileniem, podczas gdy w temp. 4 °C zaobserwowano jedynie proces śmietanowania, który utrzymywał się niezmiennie od momentu syntezy.

Reasumując, we wszystkich analizowanych próbkach, najpóźniej po tygodniu od dnia syntezy SLN, profile transmisyjne wskazywały na wyższą niestabilność w porównaniu analizą w dniu syntezy. Zjawisko to można tłumaczyć wysoką lotnością wszystkich testowanych monoterpenu, która znacząco wpływała na stabilność produkowanych nanodyspersji [314]. Ponadto, pojawiający się z upływem czasu nieodwracalny proces flokulacji, spowodowany m.in. na skutek zmian wielkości cząstek [315] (zwłaszcza dla próbek: cytral/limonen–SLN) mógł zostać nasilony przez surfaktant (Poloxamer 188), który posiadał zależne od stężenia właściwości destabilizujące i stabilizujące [316]. Aby zapobiec flokulacji w dyspersjach SLN, zaleca się dodawanie kosurfaktantu [240]. Warto podkreślić, że ZP mógł również przyczynić się do powstania rozpoznanych procesów niestabilności [241]. Dyspersja SLN jest stabilna, jeśli odpychanie elektrostatyczne przeważa nad siłami van der Waalsa, podczas gdy brak odpychania elektrostatycznego (z powodu niskich wartości ZP) sprzyja aglomeracji cząstek. Ponadto, zmiany w energii kinetycznej zmniejszające odpychanie elektrostatyczne działające na ZP mogła spowodować temperatura przechowywania [241].

Na podstawie przeprowadzonej analizy stabilności dowiedziono, że monoterpenu enkapsulowane w SLN mają ograniczoną stabilność podczas przechowywania w różnym zakresie temperatur. Niemniej jednak, temperatura 25 °C okazała się najbardziej optymalną do przechowywania nanocząstek inkorporowanych lotnymi substancjami aktywnymi. W celu zwiększenia stabilności SLN inkorporowanych monoterpenu warto zarówno dodać kosurfaktant, jak np. sole żółciowe (ang. *bile salts*) [82] lub też zmodyfikować powierzchnię, poprzez powlekanie SLN inkorporowanych monoterpenu polimerem (naturalnym lub syntetycznym), takim jak alginian sodu, chitozan lub glikol polietylenowy. W ten sposób zostanie zwiększone odpychanie elektrostatyczne cząstek, wpływając na wzrost wartości ZP [223, 317]. Proces dodatkowego powlekania SLN może również skutecznie zapobiegać natychmiastowemu uwalnianiu („*burst release*”), powszechnie występującego dla SLN inkorporowanych lotnymi substancjami [317].

Stabilność dyspersji koloidalnych, takich jak m.in. SLN, związana jest zarówno z migracją cząstek i występującymi w rezultacie procesami niestabilności (np. śmietanowanie, sedymentacja, flokulacja), jak i zmianami w rozkładzie wielkości cząstek, które następują na skutek ich wzajemnego oddziaływania [318]. Określenie długoterminowej stabilności SLN i NLC jest kluczowe przy rozważaniu stosowania tych nośników w celach terapeutycznych. Stabilne dyspersje SLN i NLC charakteryzuje przede wszystkim zachowanie stałego rozmiaru cząstek, a także PDI oraz ZP. Wysoka wartość PDI zazwyczaj sprzyja wzrostowi kryształów i zjawisku dojrzewania Ostwalda [82, 123], czyli tak zwanej krystalizacji izotermicznej [319].

Dojrzewanie Ostwalda jest procesem termodynamicznym, który zachodzi w układach nasyconych, gdzie mniejsze cząstki osadzają się na powierzchni większych i rekrystalizują, co w konsekwencji prowadzi do ponownego wzrostu („dojrzewania”) dużych kropeł kosztem mniejszych [319].

W syntezie nanocząstek lipidowych istotną rolę odgrywa bezpośrednia ocena możliwych procesów rozdzielania dyspersji (separacji) [245]. Aby zoptymalizować i zapewnić długotrwałą stabilność SLN/NLC, stosuje się analizatory dyspersji, takie jak TurbiscanTM lub LUMiSizer[®], dzięki którym możliwe jest znaczące przyspieszenie zjawisk niestabilności, takich jak sedimentacja i śmietanowanie, znane również jako flotacja, czy dojrzewanie Ostwalda [245, 320, 321].

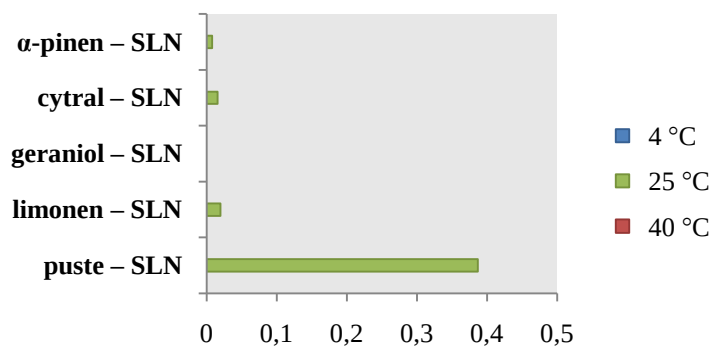
5.4.2. Porównanie indeksów niestabilności wszystkich analizowanych monoterpenów enkapsulowanych w SLN

Aby móc dokonać ilościowej oceny stabilności wraz z upływem czasu, na podstawie uzyskanych wcześniej profili transmisyjnych obliczono indeks niestabilności (ang. *instability index*) dla każdej z badanych próbek SLN inkorporowanych monoterpenami.

W ramach niniejszej dysertacji, parametr ten obliczono na podstawie podziału przyrostu transmisji (spowodowanej separacją faz na skutek sedimentacji lub śmietanowania) przez transmisję maksymalną w danym czasie rozdzielania. Indeks niestabilności to parametr bezwymiarowy, którego wartość waha się na ogół od 0 (bardziej stabilny) do 1 (bardziej niestabilny) [242]. Za pomocą oprogramowania LUMiView[®] sporządzono wyniki, które przedstawiono na rysunku 62, natomiast w załączniku 21 przedstawiono wartości indeksów niestabilności z dokładnością do trzech cyfr znaczących po przecinku.

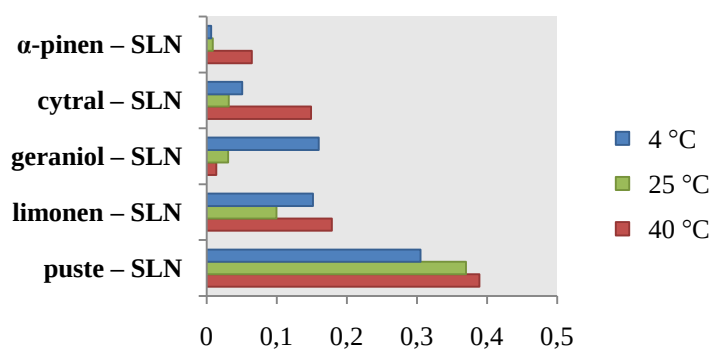
A)

po produkcji



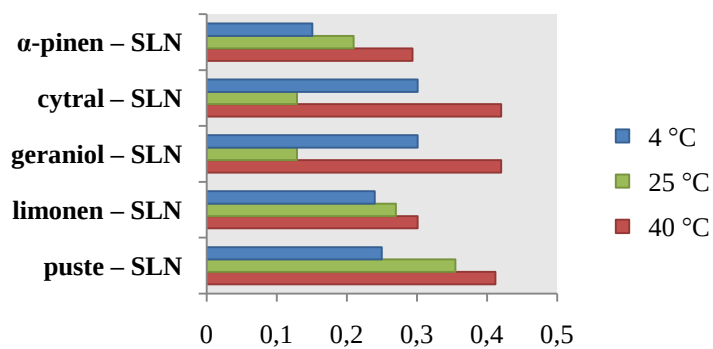
B)

po 24 h



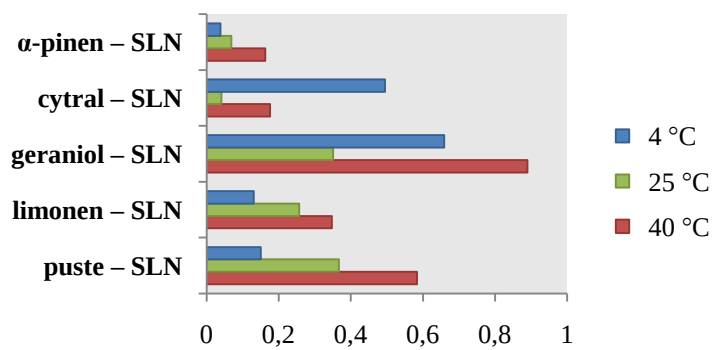
C)

po tygodniu



D)

po miesiącu



Rysunek 62. Porównanie indeksów niestabilności wszystkich SLN inkorporowanych monoterpenami oraz próbki odniesienia (puste-SLN) po syntezie (A), po 24 godzinach (B) oraz po tygodniu (C) i miesiącu (D) przechowywania w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

W oparciu o przedstawione wyniki indeksu niestabilności dla wszystkich badanych SLN stwierdzono, że wartości indeksów niestabilności były nieznacznie wyższe (przyrost o około 0,10) po 24 godzinach przechowywania próbek we wszystkich temperaturach (tzn. 4, 25 i 40 °C) w porównaniu do próbek analizowanych bezpośrednio po syntezie (rys. 62-A i B). Warto zaznaczyć, że otrzymane bezpośrednio po syntezie bardzo niskie wartości indeksu dla wszystkich analizowanych próbek wskazują na ich początkowo bardzo wysoką stabilność. Ponadto, dla większości monoterpenów enkapsulowanych w SLN oraz dla próby odniesienia obserwowano większy wzrost indeksu niestabilności pod wpływem temperatury 40 °C w porównaniu z wartościami indeksu w pozostałych temperaturach. Wyjątek stanowił geraniol-SLN, dla którego niższa temperatura wpływała na niższą stabilność próbki, co potwierdzono także na podstawie wcześniejszej analizy profili transmisyjnych (tab. 54-C).

Po przeprowadzeniu kolejnych analiz zauważono, że przechowywanie SLN inkorporowanych monoterpenami w temperaturze pokojowej przez okres minimum jednego tygodnia spowodowało znaczące zmiany w stabilności próbek, na co wskazują stosunkowo wyższe indeksy niestabilności (rys. 62-C). Szczególne zmiany były widoczne dla próbki cytral-SLN, dla której zachodzące zjawiska niestabilności zostały wcześniej zidentyfikowane za pomocą analizy profili transmisyjnych (tab. 54-B). Znaczący przyrost wartości indeksu z 0,02 do 0,75 (liczony od dnia syntezy) potwierdzał najniższą stabilność dla cytral-SLN. Najmniejsze różnice wartości indeksu niestabilności zaobserwowano dla próbki geraniol-SLN (przyrost: o 0,14) oraz α -pinen-SLN (przyrost o 0,20), podczas gdy dla próbki limonen-SLN wartość indeksu wzrosła o 0,25 po tygodniu przechowywania w temp. 25 °C. Dla próby odniesienia indeks niestabilności utrzymywał się na stosunkowo równym poziomie, pomimo spadku wartości indeksu o 0,03. Z kolei indeks niestabilności mierzony po tygodniu dla próbek przechowywanych w temperaturze 4 °C odznaczał się na ogół niższymi wartościami w porównaniu z wynikami otrzymanymi po pozostawieniu SLN w 40 °C. Nawet niestabilna w temp. 25 i 40 °C próbka cytralu posiadała najwyższą stabilność po przechowywaniu w temp. 4 °C (0,20). Z kolei niska temperatura wpłynęła niekorzystnie na stabilność geraniolu enkapsulowanego w SLN, dla którego indeks niestabilności w 4 °C (0,30) wskazywał wyższe wartości niż w temp. 25 °C (0,14). W temperaturze 40 °C zarówno dla geraniolu (0,42), jak i wszystkich pozostałych SLN uzyskano najwyższe indeksy niestabilności, w granicach od 0,29 (α -pinen-SLN) do 0,89 (cytral-SLN). Otrzymane wartości indeksu niestabilności porównano z profilami transmisyjnymi, w wyniku czego zaobserwowano korelację – wyższa wartość indeksu niestabilności wskazywała na występowanie dużych zjawisk niestabilności (próbka: cytral-SLN i limonen-SLN: śmietanowanie i sedymentacja ze stopniową z agregacją/flokulacją cząstek – zob. tab. 54-B i 54-D).

Indeksy niestabilności po miesiącu analiz w temp. 4 °C utrzymywały się dla cytralu/geraniolu-SLN na podobnym wysokim poziomie (odpowiednio 0,50 i 0,89), natomiast dla pozostałych SLN odnotowano niższe wartości w tej temperaturze w porównaniu do wyników otrzymanych po tygodniu analizy. Z kolei w temp. 40 °C najwyższe indeksy niestabilności posiadały próbki geraniol/limonen-SLN (odpowiednio 0,42 i 0,35) oraz puste-

SLN (0,58). Dla wszystkich SLN najwyższą stabilność po miesiącu analizy (indeks niestabilności < 0,40) zaobserwowano w temperaturze 25 °C (rys. 62-D). Tym samym otrzymane wyniki dowiodły, że monoterpeny enkapsulowane w SLN mogą być stabilne do zaledwie kilku dni od momentu ich otrzymania.

5.4.3. Analiza prędkości sedymentacji cząstek w otrzymanych próbkach SLN inkorporowanych monoterpenami

Sedymentacja jest procesem rozdzielania zawiesiny na czystą ciecz i osad w wyniku działania siły grawitacji lub sił bezwładności [322]. W tabeli 55 przedstawiono wyniki dotyczące prędkości migracji cząstek wposzczególnych próbkach SLN inkorporowanych monoterpenami. Analizę prędkości sedymentacji rozpoczynano od pomiaru tzw. próbki homogenicznej, a dla każdego otrzymanego profilu transmisyjnego (prędkość rozdzielania), redukcja stężenia cząstek była mierzona na podstawie ekstynkcji. W konsekwencji uzyskano skumulowany rozkład [323]. Podane zakresy rozkładu (ang. *distribution*, d) prędkości migracji (śmietanowania/sedymentacji) cząstek oznaczały kolejno [323, 324]:

- d10% – 10% cząstek ma prędkość sedymentacji mniejszą niż otrzymana wartość,
- d50% – mediana, 50% cząstek ma prędkość sedymentacji większą lub mniejszą niż otrzymana wartość,
- d90% – 90% cząstek ma prędkość sedymentacji mniejszą niż podana wartość.

Tabela 55. Porównanie rozkładu (d) prędkości sedymentacji cząstek wszystkich SLN inkorporowanych monoterpenami oraz próbki odniesienia (puste-SLN) po syntezie, po 24 godzinach oraz po tygodniu i miesiącu przechowywania w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	d10% [µm/s]	d50% [µm/s]	d90% [µm/s]
α -pinen-SLN	po syntezie	25	2,211	2,598	5,435
	po 24 h	4	2,314	2,600	6,328
		25	2,715	2,969	6,134
		40	2,230	4,355	47,021
	po tygodniu	4	36,900	66,970	96,230
		25	3,945	53,461	511,210
		40	30,060	72,960	189,002
	po miesiącu	4	1,413	2,102	4,732
		25	1,356	2,270	4,555
		40	1,570	8,535	296,800
cytral-SLN	po syntezie	25	1,953	2,082	2,205
	po 24 h	4	1,863	2,589	2,360
		25	0,221	0,510	6,227
		40	1,752	3,315	11,989
	po tygodniu	4	1,921	7,162	52,551
		25	173,500	519,600	1203,000
		40	1,671	27,159	896,570

	po miesiącu	4	1,262	5,859	22,460
		25	0,182	0,610	8,529
		40	1,156	2,347	10,690
geraniol-SLN	po syntezie	25	1,797	1,798	1,798
	po 24 h	4	1,701	1,715	1,894
		25	1,802	1,699	1,755
		40	1,797	1,798	1,798
	po tygodniu	4	2,704	3,150	22,946
		25	1,904	7,344	98,420
		40	2,811	17,344	28,510
	po miesiącu	4	40,920	46,570	100,530
		25	2,569	7,898	11,563
		40	2,623	12,344	35,712
limonen-SLN	po syntezie	25	2,155	2,785	18,120
	po 24 h	4	2,159	2,901	3,542
		25	2,160	2,824	16,134
		40	2,213	2,945	27,021
	po tygodniu	4	9,520	520,009	36,529
		25	7,019	479,300	1626,000
		40	20,156	17,170	65,450
	po miesiącu	4	8,019	3,887	34,270
		25	7,216	4,311	14,215
		40	26,900	47,170	85,320
puste-SLN	po syntezie	25	1,392	3,109	6,949
	po 24 h	4	1,401	3,070	7,110
		25	1,650	3,395	6,512
		40	1,590	2,960	8,535
	po tygodniu	4	1,822	3,540	7,110
		25	1,751	3,401	7,019
		40	1,550	2,732	16,680
	po miesiącu	4	0,972	1,919	12,490
		25	1,989	11,790	62,200
		40	0,272	2,283	55,050

Na podstawie otrzymanych wyników, dotyczących rozkładu prędkości sedymentacji dla poszczególnych próbek SLN inkorporowanych monoterpunami zaobserwowano, że korelują one zarówno z kształtem zarejestrowanych profili transmisyjnych (tab. 54), jak również z wartościami indeksów niestabilności (rys. 62 oraz zał. 21). Zakładając sferyczny kształt cząstek, ustalono proporcjonalną zależność między rozmiarem cząstek a prędkością śmietanowania/sedymentacji. Następnie obliczono prędkość migracji cząstek, aby otrzymane wyniki móc porównać z relatywnym rozmiarem cząstek [307, 308].

Uzyskane rezultaty dla próbek, które analizowano bezpośrednio po syntezie oraz po 24 godzinach przechowywania w temperaturze 4, 25 i 40 °C posiadały znacznie mniejszą prędkość sedymentacji/śmietanowania w porównaniu z próbkami SLN, które były przechowywane w takich samych warunkach temperaturowych przez okres minimum jednego tygodnia. W przypadku wszystkich SLN inkorporowanych monoterpenami zauważono również, że prędkość sedymentacji we wszystkich badanych temperaturach (4, 25 i 40 °C) znacząco wzrosła szczególnie dla d90%, w tym największy jej wzrost odnotowano w 25 °C.

Tym samym obliczono, że prędkość sedymentacji po tygodniu była około 100 razy [$\mu\text{m/s}$] większa od wartości początkowej (po syntezie/po 24 h) dla α -pinen-SLN w temp. 25 °C, podczas gdy w temp. 4 °C nastąpił ok. 16-krotny przyrost prędkości, a w temp. 40 °C prędkość sedymentacji wzrosła ok. 4-krotnie. Co więcej, w przypadku frakcji d10% w temp. 25 °C nie zaobserwowano większych zmian, a w 4 i 40 °C odnotowano około 15-krotny przyrost prędkości dla tej samej próbki. Z kolei dla frakcji d50% również nastąpił przyrost prędkości sedymentacji od 20 do 30 razy [$\mu\text{m/s}$] w zależności od temperatury przechowywania (największy przyrost nastąpił w 4 °C). Dla próbki α -pinen-SLN, po miesiącu analizy zauważono, że wysokie prędkości procesów niestabilności utrzymywały się w temp. 40°C, zwłaszcza dla frakcji d90%, której wartość wzrosła o ponad 100 $\mu\text{m/s}$ w stosunku do wartości obliczonej po tygodniu.

Z kolei po tygodniu zaobserwowano, że w próbce **cytral-SLN** zaszły największe zmiany, o czym świadczyła duża niestabilność tej próbki potwierdzona już wcześniej zarejestrowanymi profilami transmisyjnymi (tab. 54-B) oraz wartościami indeksu niestabilności (rys. 62-C). Największe zmiany dla cytralu enkapsulowanego w SLN były widoczne we wszystkich frakcjach po tygodniu przechowywania próbki w temp. 25 i 40 °C. Prędkość sedymentacji dla d10% zmieniła się z wartości 2 $\mu\text{m/s}$ do około 174 $\mu\text{m/s}$ (w 25 °C), podczas gdy przy d50% (także w 25 °C) wzrosła do około 520 $\mu\text{m/s}$. Największy wzrost prędkości, wynoszący 1203 $\mu\text{m/s}$ (25 °C) oraz 896,570 $\mu\text{m/s}$ (40 °C), odnotowano dla frakcji d90%. Tak znaczące przyrosty prędkości można tłumaczyć postępującym procesom śmietanowania i sedymentacji z dodatkową agregacją/flokulacją, zaobserwowaną w temp. 25 °C (zob. tab. 54-B). Ponadto po miesiącu analiz, największy przyrost rozkładu prędkości sedymentacji w porównaniu do wartości zmierzonych po 24 h od dnia syntezy odnotowano ponownie dla frakcji d90%, w której wartości prędkości wahały się w granicach od 8,5 $\mu\text{m/s}$ (w 25 °C) do 22,5 $\mu\text{m/s}$ (4 °C). W dodatku dla próbki przechowywanej w 4 °C rozpoczął się wyraźny proces agregacji/flokulacji cząstek, który zachodził w pozostałych temperaturach już po tygodniu.

Dla próbki **geraniol-SLN** wyniki otrzymane po 24 godzinach dla wszystkich frakcji we wszystkich badanych temperaturach (4, 25 i 40 °C) były zgodne rozkładem prędkości sedymentacji zmierzonym bezpośrednio po syntezie, wynoszącym odpowiednio 1,797/1,798 $\mu\text{m/s}$ dla wszystkich frakcji. Pierwsze widoczne zmiany zostały zauważone dla d90% po tygodniu przechowywania próbki w temp. 4, 25 i 40 °C. Prędkość sedymentacji wzrosła 20-30 razy w temperaturze 4 i 40 °C, podczas gdy dla 25 °C zwiększyła się do prawie 100 $\mu\text{m/s}$. Zarejestrowane procesy śmietanowania i sedymentacji z dodatkową flokulacją cząstek dla geraniolu enkapsulowanego w SLN i przechowywanego w temp. 4 i 40 °C (tab. 54-C) potwierdziły także największy przyrost prędkości migracji cząstek po miesiącu badań (odpowiednio około 101 $\mu\text{m/s}$ i 36 $\mu\text{m/s}$). Po raz kolejny dowiedziono, że niska temperatura przechowywania próbki geraniol-SLN nie wpływa korzystnie na jej stabilność,

co potwierdziły również wysokie wartości prędkości sedymentacji widoczne dla wszystkich frakcji w 4 °C (41 μm/s; 47 μm/s oraz 101 μm/s).

Ostatnią analizowaną próbką, zawierającą składnik aktywny był **limonen-SLN**. W próbce tej, ponownie jak w przypadku cytralu enkapsulowanego w SLN, najbardziej widoczne zmiany zachodziły po tygodniu przechowywania próbki we wszystkich badanych temperaturach (4, 25 i 40 °C). Zaobserwowano, że prędkość sedymentacji dla d50% zmieniła się z wartości 2,9 μm/s do 520 μm/s (w 4 °C) oraz z 2,8 μm/s do około 480 μm/s (w 25 °C). Niemniej jednak, największy rozkład prędkości odnotowano dla frakcji d90% i wynosił on 1626 μm/s (25 °C). Natomiast w temp. 4 i 40 °C odnotowano wartości około 37 μm/s oraz 65,37 μm/s, które utrzymywały się także na podobnym poziomie po miesiącu analiz, co świadczyło o utrzymujących procesach niestabilności tj. śmietanowanie i sedymentacja z flokulacją cząstek (tab. 54-D).

W dodatku zauważono, że próba odniesienia (**puste-SLN**) odznaczała się podobnym rozkładem prędkości migracji cząstek dla wszystkich frakcji i we wszystkich badanych temperaturach w okresie tygodnia, liczonym od dnia produkcji. Powodem był utrzymujący się proces śmietanowania (tab. 54-E), przy czym po tygodniu przechowywania w temp. 40 °C nastąpiła sedymentacja cząstek, co przełożyło się na stopniowo wzrastającą wartość prędkości dla frakcji d90% (z 8,5 μm/s do 16,7 μm/s). Badania przeprowadzone po miesiącu dla próbki puste-SLN wykazały, że najwyższy przyrost prędkości związany z postępującymi procesami niestabilności był ponownie widoczny dla d90% i wynosił około 13 μm/s (4 °C), 62 μm/s (25 °C) oraz 55 μm/s (40 °C).

Podsumowując wszystkie otrzymane wyniki stwierdzono, że próbki cytral/limonen-SLN wykazały ogółem najwyższe przyrosty prędkości dla wszystkich frakcji (zwłaszcza w temp. 25 °C), co przejawiało się najszybciej postępującym procesem śmietanowania i późniejszej sedymentacji spośród wszystkich analizowanych dyspersji nanocząstek. W dodatku, dla frakcji 90% w próbce cytral-SLN badanej po tygodniu przechowywania w temp. 25 °C, prędkość sedymentacji osiągnęła wartość aż 500 razy wyższą w porównaniu do wartości początkowej (po syntezie). Tak znaczący przyrost prędkości sedymentacji przekładał się przede wszystkim na większy rozmiar cząstek dla wszystkich próbek (tab. 53). Tym samym wywnioskowano, że czas przechowywania w temperaturze pokojowej sprzyjał agregacji cząstek, co z kolei wpływało na stabilność fizyczną nanodyspersji, potwierdzonej za pomocą analizy profili transmisyjnych oraz obliczeń indeksów niestabilności.

Ponadto można zaobserwować, że istnieje węższy rozkład wielkości prędkości sedymentacji dla świeżo przygotowanych próbek w porównaniu z ich wynikami po tygodniu analizy, co mogło oznaczać, że są to próbki jednomodalne (tj. z jedną wartością modalną; maksymalną) z małą dyspersją pod względem wielkości cząstek. Ta wąska dystrybucja miała pozytywny wpływ na stabilność fizyczną, co wykazano w analizie indeksu niestabilności. Spośród wszystkich badanych SLN inkorporowanych monoterpenami, próbka geraniol-SLN charakteryzowała się zarówno najniższą prędkością sedymentacji, jak i najwęższą dyspersją. Jednak pomimo obserwowanego wzrostu prędkości sedymentacji po tygodniu analizy, to w próbce α-pinen-SLN były najpóźniej widoczne wszelkie procesy niestabilności, co potwierdzały najniższe wyniki rozkładu prędkości cząstek we wszystkich frakcjach otrzymane po miesiącu od dnia syntezy. W dodatku, wyniki te są zgodne z wynikami indeksu niestabilności, a profile transmisyjne dla próbki α-pinen-SLN dodatkowo potwierdziły jej najwyższą stabilność w analizie separacji odśrodkowej.

Zintegrowana analiza wyników uzyskanych za pomocą urządzenia LUMiSizer[®] jednoznacznie wykazała, że wszystkie świeżo wytworzone SLN inkorporowane monoterpenami były stabilne. Otrzymane profile transmisyjne, a także wartości indeksu niestabilności oraz przedstawione niskie prędkości sedymentacji/śmietanowania, świadczyły o małym i jednomodalnym (wąsko rozproszonym) rozmiarze cząstek. Po dokonaniu jednakowych analiz (STEP, indeks niestabilności, prędkość migracji cząstek) po upływie tygodnia od dnia syntezy, we wszystkich próbkach (w tym puste-SLN) zaobserwowano znaczący wzrost niestabilności fizycznej, co potwierdzały otrzymane wyniki. Zachodzące zmiany można tłumaczyć wzrostem Z-Ave obserwowanym dla wszystkich SLN (tabela 53), a także na podstawie analizy prędkości sedymentacji (tabela 55), ściśle skorelowanej ze średnią wielkością cząstek. Analiza prędkości sedymentacji dla analizowanych próbek wskazała na bardzo szeroki rozkład, który świadczył o postępującym procesie agregacji po upływie minimum tygodnia od dnia syntezy. Istnienie takiej wielomodalnej wielkości cząstek wpływało negatywnie na fizyczną stabilność preparatu.

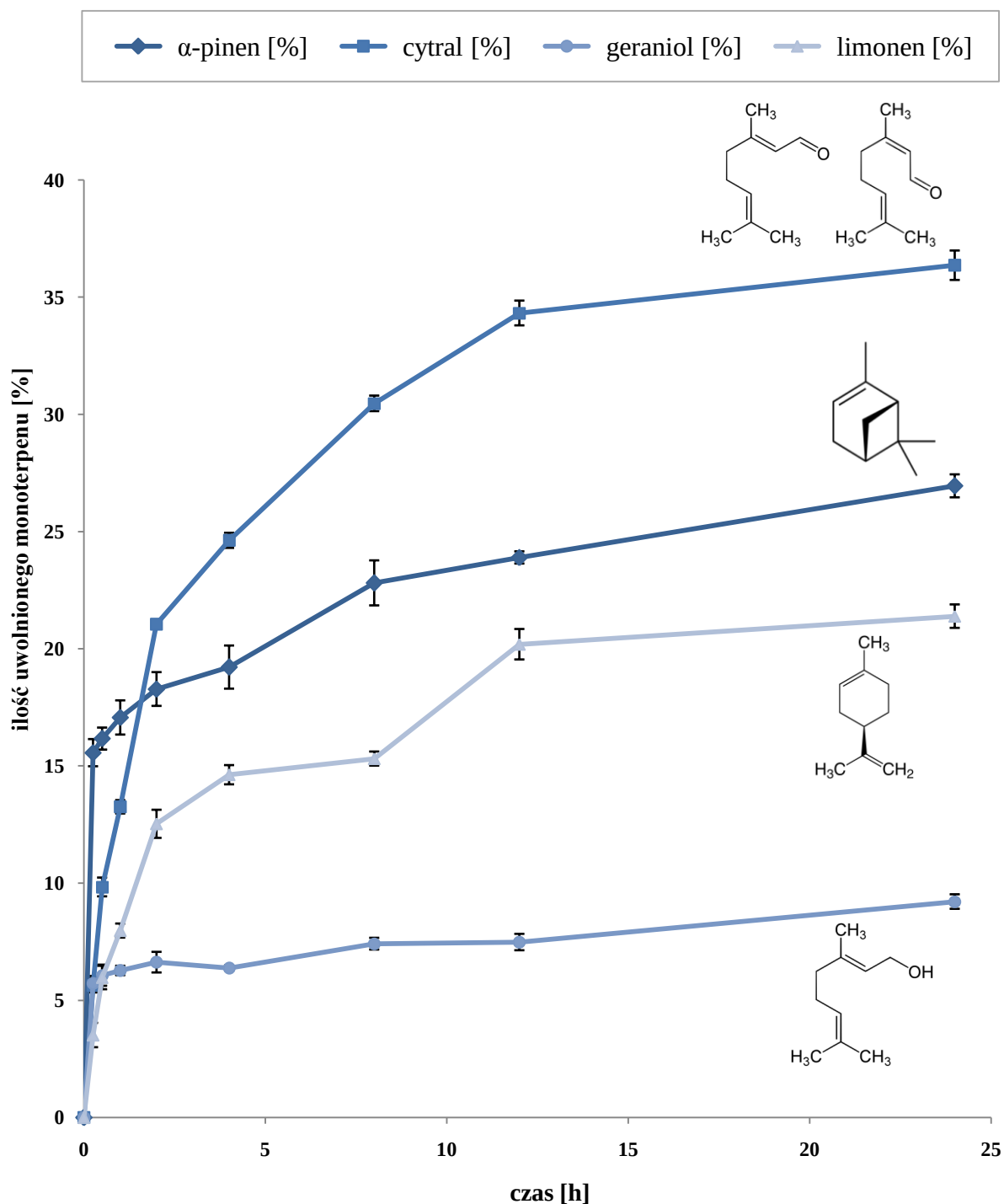
5.5. Badanie uwalniania monoterpenów z nanocząstek lipidowych z wykorzystaniem komór dyfuzyjnych Franza

Badania uwalniania monoterpenów z SLN przeprowadzono z wykorzystaniem szklanych komór dyfuzyjnych Franza. W określonych odstępach czasu, z każdej komory pobierano 200 µl próbki monoterpen-SLN, a pobraną objętość zastępowano roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanem(V) (ang. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS). Kolejnym etapem badań było sporządzenie krzywych kalibracyjnych za pomocą przygotowanych wcześniej roztworów wzorcowych badanych substancji aktywnych rozpuszczonych w PBS (pH = 7,40). Krzywe kalibracyjne określano przy charakterystycznej dla każdego monoterpenu długości fali za pomocą spektroskopii UV-Vis z wykorzystaniem Multi-Mode Microplate Reader Synergy[™] HT (tabela 56). Oprócz tego, dla każdej serii pomiarów stężeń substancji aktywnej obliczono odchylenia standardowe.

Tabela 56. Równania regresji liniowej, opisujące krzywe wzorcowe dla badanych monoterpenów.

Wzorzec monoterpenu	Długość fali [nm]	Równanie regresji liniowej	Współczynnik korelacji
α -pinen	230	$y = 0,0031x + 0,01307$	$R^2 = 0,997$
cytral	280	$y = 0,0056x + 0,0249$	$R^2 = 0,994$
geraniol	290	$y = 0,0056x + 0,0249$	$R^2 = 0,996$
limonen	290	$y = 0,0096x + 0,0166$	$R^2 = 0,999$

Profile uwalniania monoterpenów enkapsulowanych w SLN przedstawiono na rysunku 63. Analiza procesu uwalniania monoterpenów rozpoczęła się w ciągu pierwszych 15 minut, kiedy nastąpiło uwolnienie pierwszych ilości tych lotnych substancji. Cały proces uwalniania monitorowano przez 24 godziny. Dokładne ilości uwolnionych substancji zestawiono w tabeli 57.



Rysunek 63. Porównanie profili uwalniania monoterpenu enkapsulowanych w SLN.

Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano, że w ciągu pierwszych 15 minut największe ilości monoterpenu uwalniały się z próbki α-pinenu enkapsulowanego w SLN (15,57%), natomiast najmniejsze ilości substancji czynnej były uwalniane z próbki limonen-SLN, dla której uzyskany profil uwalniania osiągnął wartość 3,52%. Z uwagi na wczesny profil uwalniania odnotowany dla α-pinenu można oczekiwać szybszego efektu terapeutycznego. Szybkość uwalniania, w tym uwalnianie natychmiastowe (*burst release*) przypisano charakterystycznym właściwościom chemicznym badanych monoterpenu [314, 325].

SLN inkorporowane pozostałymi monoterpenami uwolniły początkowo podobne ilości substancji aktywnej, tj. 5,65% cytralu i 5,72% geraniolu. W kolejnych 15 minutach, największy przyrost uwalniania monoterpenu o około 4% był widoczny dla próbki cytral-SLN, podczas gdy przyrost prędkości uwalniania pozostałych monoterpenów wahał się w granicach od 0,35% (geraniol) do 2,01% (limonen).

Po pierwszej godzinie badań zauważono, że oprócz α -pinenu enkapsulowanego w SLN również z próbki cytral-SLN zostało uwolnione ponad 13% substancji aktywnej, co potwierdzało wysoką lotność obu monoterpenów [160, 174]. W przypadku limonenu, szybszy profil uwalniania nastąpił od 2 godziny badań, w czasie której zostało uwolnionych 12,53% tego monoterpenu. W tym samym czasie, największy przyrost uwolnionej substancji, tj. 7,79% był widoczny dla cytralu enkapsulowanego w SLN. Ponadto, z tej samej próbki cytral-SLN uwalniało się około 30% substancji aktywnej w ciągu kolejnych 6 godzin, co oznaczało, że pozostałe 70% monoterpenu nie miało żadnego działania terapeutycznego [242].

Warto zaznaczyć, że w całym badaniu trwającym łącznie 24 godziny, to właśnie z próbki cytral-SLN został uwolniony najwyższy procent tej lotnej substancji aktywnej (36,36%). Porównując otrzymane wyniki i profile uwalniania odnotowano, że w drugiej kolejności największa ilość monoterpenu uwalniała się z próbki α -pinenu-SLN, osiągając w rezultacie wartość 26,95%. Następnie, zostało uwolnionych 21,39% limonenu, podczas gdy uwalnianie geraniolu enkapsulowanego w SLN przebiegało najwolniej w porównaniu do pozostałych monoterpenów, a procent uwolnionej substancji aktywnej wzrastał nieznacznie z każdą godziną, osiągając po 24 h zaledwie 9,21%.

Tabela 57. Porównanie ilości uwolnionych monoterpenów w ciągu 24 godzin badań.

Czas [h]	α -pinen		cytral		geraniol		limonen	
	Uwolniona ilość [%]	SD	Uwolniona ilość [%]	SD	Uwolniona ilość [%]	SD	Uwolniona ilość [%]	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,25	15,57	0,58	5,65	0,31	5,72	5,72	3,52	0,52
0,5	16,17	0,47	9,84	0,40	6,07	6,07	5,97	0,50
1	17,07	0,73	13,26	0,29	6,27	6,27	7,98	0,30
2	18,28	0,72	21,05	0,18	6,63	6,63	12,53	0,60
4	19,22	0,92	24,62	0,32	6,38	6,38	14,63	0,41
8	22,81	0,96	30,47	0,33	7,42	7,42	15,31	0,30
12	23,89	0,26	34,32	0,53	7,49	7,49	20,19	0,65
24	26,95	0,49	36,36	0,63	9,21	9,21	21,39	0,50

SD – odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)

Podsumowując otrzymane rezultaty stwierdzono, że dla wszystkich badanych SLN inkorporowanych monoterpenami widoczne było uwalnianie dwufazowe, tzn. z efektem natychmiastowego uwalniania (*burst release*) w ciągu pierwszych 15 minut, po których następowało stopniowe tzw. przedłużone uwalnianie (*sustained release*) [326] wszystkich substancji czynnych. W zależności od właściwości chemicznych poszczególnych monoterpenów [314] zachodziło ono z mniejszym (geraniol-SLN) lub większym nasileniem (cytral/ α -pinen/limonen-SLN). Początkowe szybkie uwalnianie mogło wynikać z faktu, że niektóre z monoterpenów zostały częściowo inkorporowane do zewnętrznej powłoki

nanocząstek (*drug-enriched shell*; zob. rozdział 2.4.) [49, 146]. Dotychczas prowadzone badania naukowe dowiodły, że uwalnianie natychmiastowe może zwiększyć przenikanie substancji czynnej, podczas gdy przedłużone uwalnianie zapewnia aktywność substancji przez dłuższy czas [326].

Innym powodem, wyjaśniającym różne typy i ilości uwalnianych sybstancji aktywnej może być zarówno analiza struktury każdego z monoterpenów, jak i wartość stopnia lipofilowości (tabela 58). Lipofilowość jest jednym z najważniejszych parametrów fizykochemicznych wpływających biodostępność substancji czynnych [326]. Silnie lipofilowe cząsteczki posiadają wysoką wartość tzw. współczynnika podziału P, który określa stosunek stężeń substancji w dwóch niemieszających się rozpuszczalnikach w stanie równowagi (np. woda/n-oktanol), a jego wartość podawana jest w formie logarytmicznej [327].

Tabela 58. Wartość współczynnika podziału P dla poszczególnych monoterpenów.

Monoterpen	log P [j.u.]
α -pinen	4,66
cytral	2,76
geraniol	3,28
limonen	4,45

Substancje aktywne o log P powyżej 4 j.u. odznaczają się na ogół niską biodostępnością z powodu ich wysokiego powinowactwa do struktury nośnika [326, 328]. W przeprowadzonych badaniach w ramach niniejszej dysertacji wykazano, że monoterpeny o niższej lipofilności, takie jak cytral (log P = 2,76 j.u.) [329] czy geraniol (log P = 3,28 j.u.) [330] pozostawały początkowo „związane” przez dłuższy czas z nanocząstkami lipidowymi, podczas gdy α -pinen, posiadający najwyższy stopień lipofilowości (log P = 4,66 j.u.) [327] został łatwiej uwolniony z macierzy SLN.

5.6. Obliczenie efektywności enkapsulacji SLN inkorporowanych monoterpenami

W niniejszej pracy doktorskiej obliczono efektywność enkapsulacji (EE) dla wszystkich monoterpenów inkorporowanych do stałych nanocząstek lipidowych. W tym celu, ustalono czas retencji dla badanych monoterpenów, a następnie sporządzono krzywe kalibracyjne za pomocą roztworów wzorcowych badanych substancji aktywnych rozpuszczonych w EtOH. Świeżo przygotowane roztwory analizowano z wykorzystaniem techniki GC [289].

W tabeli 59 przedstawiono czasy retencji dla poszczególnych monoterpenów enkapsulowanych w SLN, jak również otrzymane równania regresji liniowej oraz wartości współczynnika korelacji.

Tabela 59. Równania regresji liniowej, opisujące krzywe wzorcowe dla badanych monoterpenów.

Wzorzec monoterpenu	Czas retencji [min]	Równanie regresji liniowej	Współczynnik korelacji
α -pinen	1,68	$y = 74682x - 784,4$	$R^2 = 0,998$
cytral	8,83 (geranial)	$y = 15896x - 4829$	$R^2 = 0,989$
	9,65 (neral)		
geraniol	4,9	$y = 15454x - 33342$	$R^2 = 0,987$
limonen	2,34	$y = 43846x + 1956,7$	$R^2 = 0,999$

Kolejnym etapem było obliczenie efektywności enkapsulacji na podstawie równania 4 (zob. rozdział 4.6.7.). Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 60.

Tabela 60. Efektywność enkapsulacji (EE) poszczególnych monoterpenów inkorporowanych do SLN.

Monoterpen	EE [%]
α -pinen	4,48
cytral	4,34
geraniol	43,28
limonen	5,58

Efektywność enkapsulacji okazała się bardzo różna w zależności od rodzaju monoterpenów. Najniższy % EE wynoszący 4,34% został obliczony dla cytralu, ale podobne wartości odnotowano również dla α -pinenu i limonenu (odpowiednio 4,48% i 5,58%). Natomiast najwyższą wartość % EE wynoszącą 43,28% obliczono dla geraniolu. Warto tutaj wspomnieć, że najmniejsza ilość monoterpenu została uwolniona z próbki geraniol-SLN (rys. 63). Mogło to świadczyć o enkapsulacji geraniolu w rdzeniu SLN (*drug-enriched core*; zob. rozdział 2.4.), w przeciwieństwie do pozostałych monoterpenów, które zostały w większości inkorporowane do matrycy lipidowej nanocząstek [146].

Porównując wartości EE uzyskane dla wszystkich SLN inkorporowanych monoterpenami można zauważyć, że szybkość uwalniania była tym mniejsza, im wyższą efektywność enkapsulacji posiadał każdy z badanych monoterpenów enkapsulowanych w SLN. Zależność ta może być istotna podczas wyboru substancji aktywnej do formułacji, której właściwości będą zależały od celu terapeutycznego (np. przezskórnego) oraz typu uwalniania: natychmiastowego bądź przedłużonego [326, 330, 331].

5.7. Analiza SLN inkorporowanych monoterpenami z wykorzystaniem dyfrakcji promieni rentgenowskich (XRD)

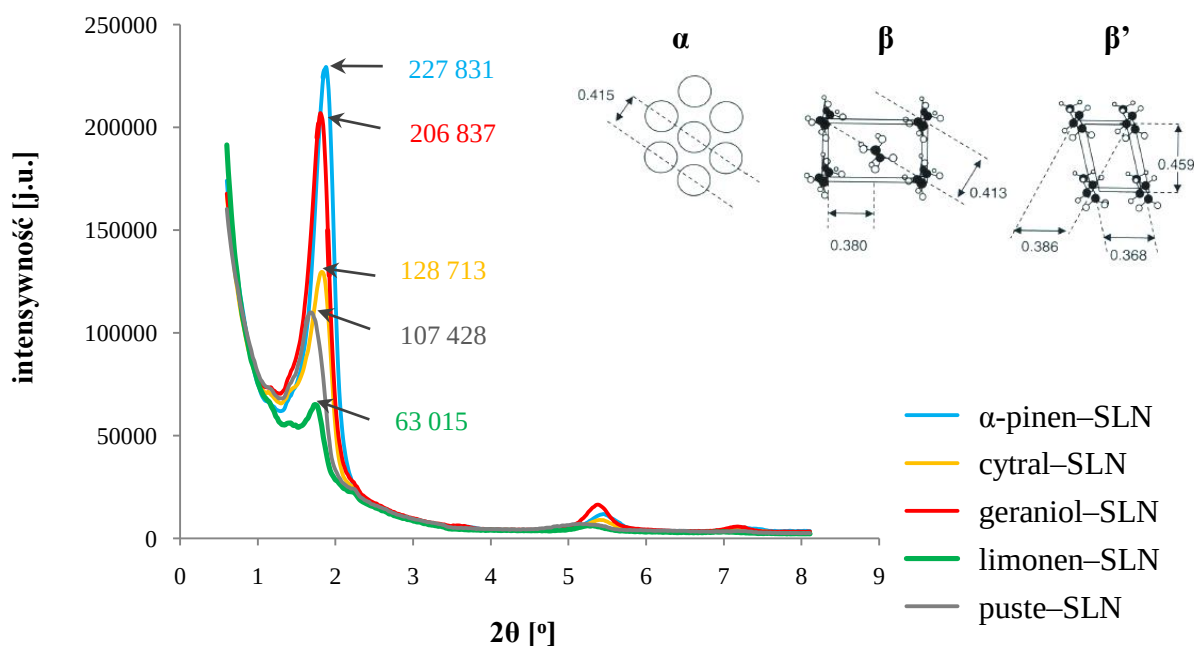
W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej dysertacji zastosowano dyfrakcję promieni rentgenowskich w zakresie nisko- oraz wysokokątowym po to, aby móc lepiej poznać strukturę krystaliczną otrzymanych SLN inkorporowanych monoterpenami, jak również w celu określenia istnienia zjawiska polimorfizmu w przypadku poszczególnych matryc lipidowych dla wszystkich analizowanych próbek SLN inkorporowanych

poszczególnym monoterpenem oraz dla próbki referencyjnej (pozbawionej enkapsulowanego składnika aktywnego).

Na rysunku 64 przedstawiono porównanie intensywności refleksów podczas analizy SAXD (w zakresie niskokątowym), z kolei rysunek 65 przedstawia porównanie intensywności refleksów podczas analizy WAXD (w zakresie wysokokątowym) dla wszystkich badanych monoterpenów enkapsulowanych w SLN oraz dla próbki referencyjnej.

Dodatkowo, zestawienie intensywności refleksów podczas analizy w zakresie nisko- oraz wysokokątowym dla poszczególnych monoterpenów enkapsulowanych w SLN i dla próbki odniesienia przedstawiono w załączniku 22.

5.7.1. Analiza dyfraktogramów w zakresie niskokątowym



Rysunek 64. Porównanie dyfraktogramów w zakresie niskokątowym dla poszczególnych SLN inkorporowanych monoterpenami oraz dla próbki odniesienia.

Na podstawie danych literaturowych ustalono, że lipidy mogą się występować w postaci trzech form polimorficznych [248, 302]. Forma α określana jest mianem niestabilnej (amorficznej), podczas gdy β jest uznawana za formę najbardziej stabilną. Z kolei postać β' , znana jako forma metastabilna, posiada niewielkie nieuporządkowanie oraz w dalszym ciągu utrzymuje częściowy stan amorficzny [302].

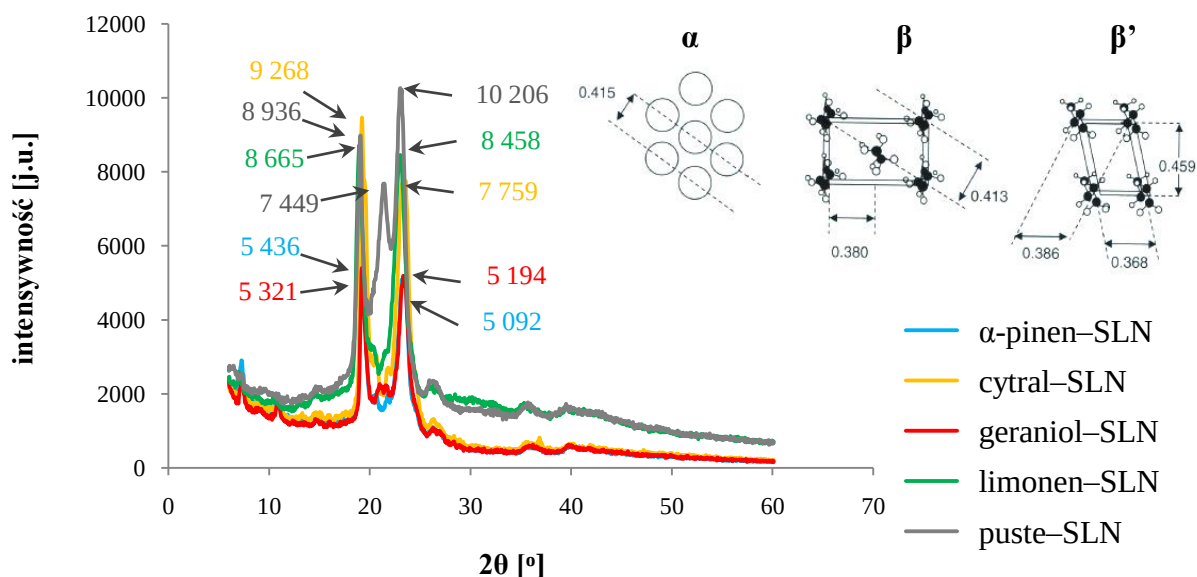
W niniejszej pracy, wszystkie badane próbki SLN syntezowane były z wykorzystaniem tego samego lipidu stałego (monostearynianu glicerolu), a zatem podczas analizy wyników zwrócono szczególną uwagę na monoterpen, którego obecność mogła wpłynąć na zmianę formy polimorficznej monostearynianu glicerolu, zmieniając przy tym właściwości całej nanocząstki.

Na podstawie otrzymanych dyfraktogramów w zakresie niskokątowym zaobserwowano jeden szczególnie intensywny refleks, widoczny dla wszystkich SLN w granicach dla kąta $2\theta = 1,88^\circ$. Za wyjątkiem próbki limonen-SLN, wszystkie pozostałe próbki enkapsulowanych

monoterpenów odznaczały się wyższą intensywnością w stosunku do wzorca macierzy lipidowej, pochodzącej od próbki referencyjnej. Tym samym wywnioskowano, że próbki geraniolu, α -pinenu czy cytralu enkapsulowanych w SLN odznaczały się najmniej uporządkowanym rozmieszczeniem kryształów i występowały w formie β' , która sprzyjała zwiększonej pojemności ładunkowej (LC) [332]. W dodatku, przeprowadzona analiza efektywności enkapsulacji wykazała najwyższą wartość % EE dla geraniolu (tab. 60), jednak pozostałe wyniki nie wykazały istotnej korelacji z analizą dyfraktogramów w zakresie niskokątowym. Jednocześnie wykluczono obecność formy amorficznej dla wszystkich badanych SLN, bowiem ta niestabilna forma α przyczynia się do zwiększenia LC [332, 333]. Ponadto stwierdzono, że z uwagi na obecność najsilniejszych refleksów widocznych dla próbki geraniol-SLN oraz α -pinenu-SLN może zachodzić przemiana polimorficzna z formy $\beta' \rightarrow \beta$, świadcząca o wysokim uporządkowaniu, ale także prowadząca do przyspieszonego uwalniania [302].

Podsumowując, na podstawie analizy w zakresie niskokątowym zauważono, że najintensywniejsze refleksy dla wszystkich badanych próbek SLN były widoczne w granicach kąta $2\theta = 1,88^\circ$. Najbardziej intensywny refleks dyfrakcyjny odnotowano dla α -pinenu enkapsulowanego w SLN (227 831 j.u.) oraz niewiele niższy dla próbki inkorporowanej geraniolem (206 837 j.u.). Pozostałe dyfraktogramy były nieco mniej intensywne, co mogło wiązać się z zastosowaniem podczas pomiarów wiązki ostrza noża (ang. *beam knife-edge*), który zmniejszał rozpraszanie tła pojawiające się przy niskich kątach 2θ . W przypadku próbek SLN inkorporowanych geraniolem i α -pinenem mogła zachodzić przemiana polimorficzna do formy metastabilnej β' , natomiast pozostałe próbki SLN przyjmowały stabilną formę β .

5.7.2. Analiza dyfraktogramów w zakresie wysokokątowym



Rysunek 65. Porównanie dyfraktogramów w zakresie wysokokątowym dla poszczególnych SLN inkorporowanych monoterpenami oraz dla próbki odniesienia.

Na podstawie otrzymanych dyfraktogramów w zakresie wysokokątowym zaobserwowano dwa refleksy widoczne dla wszystkich monoterpenów enkapsulowanych w SLN, dla których najwyższa intensywność dyfrakcji była widoczna dla kąta 2θ wynoszącego $19,68^\circ$ oraz $23,17^\circ$. Dla próbki SLN pozbawionej enkapsulowanego składnika aktywnego zauważono występowanie aż trzech intensywnych refleksów widocznych w granicach kątów: $19,68^\circ$; $21,43^\circ$; $23,17^\circ$.

W zakresie wysokokątowym zauważono zależność odwrotną do tej, którą otrzymano w zakresie niskokątowym, a mianowicie dla wszystkich SLN inkorporowanych monoterpenami intensywności otrzymanych refleksów były niższe w porównaniu do wzorca macierzy lipidowej, pochodzącej od próbki odniesienia. Ponadto, dla próbki (puste-SLN) zaobserwowano obecność dodatkowego refleksu ($2\theta = 21,43^\circ$), który nie był widoczny dla żadnej z pozostałych SLN. W rezultacie, ponownie wywnioskowano, że zarówno próbka odniesienia, jak i SLN inkorporowane monoterpenami posiadają nieznacznie uporządkowanie struktury i występują w formie β' [332].

Po dokładnej analizie stwierdzono, że najwyższą intensywnością dyfrakcji odznaczały się kolejno: cytral-SLN, puste-SLN oraz limonen-SLN dla $2\theta = 19,68^\circ$ oraz te same próbki w kolejności: puste-SLN, limonen-SLN i cytral-SLN dla $2\theta = 23,17^\circ$. Warto zaznaczyć, że podczas analizy w zakresie niskokątowym te same próbki cechowała znacznie niższa intensywność dla kąta $2\theta = 1,88^\circ$ w porównaniu do α -pinenu czy geraniolu enkapsulowanych w SLN, które podczas analizy w zakresie wysokokątowym posiadały najniższe wartości intensywności.

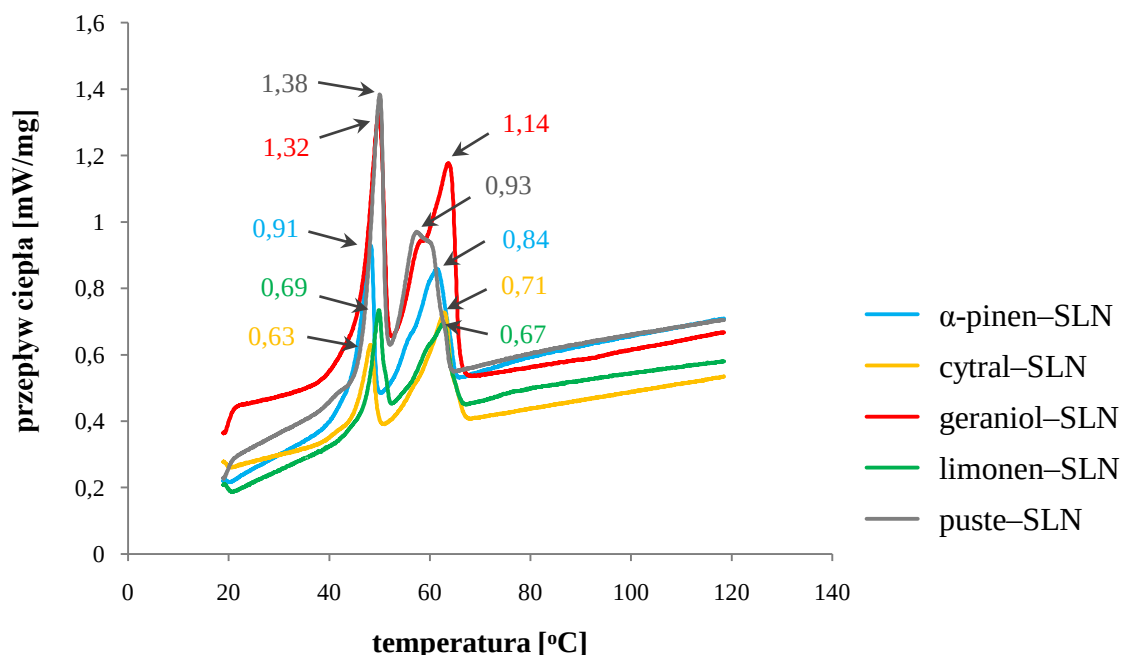
Reasumując, przeprowadzona analiza w zakresie wysokokątowym wykazała, że refleksy dyfrakcyjne dla próbek monoterpenów enkapsulowanych w SLN były najbardziej intensywne dla kątów $2\theta = 19,68^\circ$ i $23,17^\circ$, co może wskazywać na podobną zawartość substratów krystalicznych [255]. Dla nanocząstek lipidowych pozbawionych enkapsulowanej substancji aktywnej zaobserwowano dodatkową wartość dla kąta $2\theta = 21,43^\circ$. Analizy struktury krystalicznej pomogły oszacować możliwość pojawienia się zjawisk polimorficznych oraz miały kluczowe znaczenie dla oceny stopnia uporządkowania osiągniętego przez matrycę lipidową w otrzymanych SLN [255].

5.8. Analiza stanu krystaliczności SLN inkorporowanych wybranym monoterpenem

Kolejnym krokiem w badaniach w ramach niniejszej dysertacji była analiza monoterpenów enkapsulowanych w SLN z zastosowaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Za pomocą DSC możliwe było określenie zmian termodynamicznych zachodzących w SLN, w tym m.in. zmian morfologicznych lipidów mających zróżnicowane temperatury topnienia i entalpie [334]. W celu określenia stanu krystaliczności, mogącego w dużym stopniu wpływać na stopień rozpuszczalności enkapsulowanych monoterpenów [252], wszystkie próbki SLN poddano procesom ogrzewania ($5^\circ\text{C}/\text{min}$), a następnie chłodzenia ($5^\circ\text{C}/\text{min}$). Na rysunku 66 przedstawiono porównanie termogramów wszystkich próbek SLN podczas ogrzewania DSC, podczas gdy rysunek 67 przedstawia wyniki podczas procesu chłodzenia tych samych próbek.

Dodatkowo, zestawienie termogramów dla poszczególnych monoterpenu enkapsulowanych w SLN oraz dla próbki odniesienia podczas ogrzewania i chłodzenia przedstawiono w załączniku 23.

5.8.1. Analiza termogramów DSC w procesie ogrzewania



Rysunek 66. Porównanie termogramów DSC podczas ogrzewania od 20 do 120 °C poszczególnych SLN inkorporowanych monoterpunami oraz próbki odniesienia.

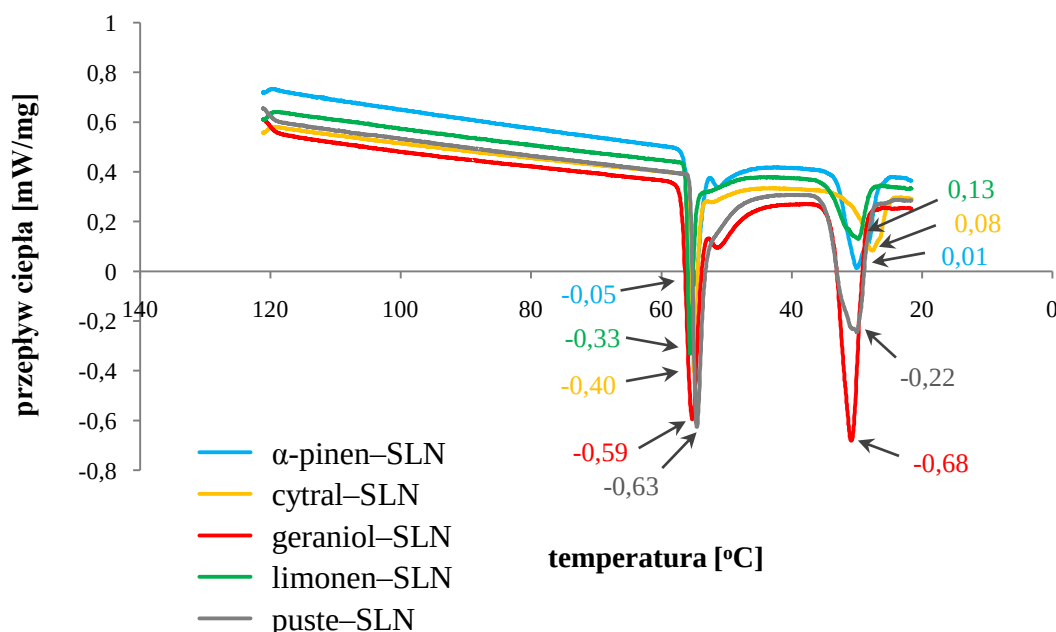
Na podstawie otrzymanych termogramów DSC podczas ogrzewania wszystkich próbek SLN (od 20 do 120 °C) zauważono, że pierwszy intensywny pik egzotermiczny, związany z krystalizacją (krzepnięciem) matrycy lipidowej [302], widoczny był w temperaturze około 48 °C - zarówno dla wszystkich monoterpenu enkapsulowanych w SLN, jak i dla próby odniesienia (temp. 49,5 °C). Drugi pik egzotermiczny, o mniejszej intensywności w przypadku wszystkich badanych próbek SLN, odnotowano w temperaturze od 57 °C (dla próby odniesienia) z przesunięciem do 61 °C (α-pinen-SLN) czy nawet 63 °C (geraniol-SLN). Po przeanalizowaniu otrzymanych wyników zauważono, że obecność monoterpenu w matrycy lipidowej nanocząstek wymagała wyższej temperatury krzepnięcia dla monostearynianu glicerolu niż w przypadku próbki pozbawionej enkapsulowanego składnika aktywnego [302]. Niewielkie przesunięcie termogramów dla próbek SLN inkorporowanych monoterpunami tłumaczono także istnieniem molekularnie rozproszonej substancji aktywnej w matrycy stearynianu glicerolu [252].

W początkowej fazie procesu krystalizacji, tj. w temperaturze 48 °C, najbardziej intensywny pik egzotermiczny zaobserwowano dla próbki odniesienia, dla której intensywność procesu wynosiła 1,38 mW. Z kolei spośród SLN inkorporowanych monoterpunami, najbardziej intensywny pik odnotowano dla próbki geraniol-SLN (1,32 mW). Warto dodać, że geraniol posiadał najwyższą temperaturę topnienia/krzepnięcia (tj. -15 °C; zob. tab. 13) w porównaniu do pozostałych enkapsulowanych monoterpenu. Ponadto zauważono, że im niższa temperatura topnienia/krzepnięcia cechowała poszczególne

monoterpen, tym widoczny był mniej intensywny pik egzotermiczny, a tym samym proces krystalizacji przebiegał z niższą intensywnością. Tym samym dla próbek α -pinen-SLN, limonen-SLN i cytral-SLN, piki egzotermiczne w temperaturze 48 °C wskazywały następujące wartości intensywności: 0,91 mW (48 °C), 0,69 mW (51 °C) i 0,63 mW (49 °C).

W drugiej widocznej fazie procesu krystalizacji najbardziej intensywny pik, wynoszący 1,14 mW (63 °C) odnotowano dla próbki geraniol-SLN. Dalej, pik o intensywności 0,93 mW (57 °C) odnotowano dla próbki odniesienia, a w następnej kolejności zaobserwowano piki egzotermiczne dla próbki α -pinen-SLN (0,84 mW; 61 °C), cytral-SLN (0,71 mW; 62 °C) oraz limonen-SLN (0,67 mW; 63 °C). W rezultacie, na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że procesy krystalizacji monostearynianu glicerolu, stanowiącego matrycę lipidową otrzymanych nanocząstek zachodziły w zakresie temperatur od 55 °C (puste-SLN) do 61-63 °C (monoterpen-SLN).

5.8.2. Analiza termogramów DSC w procesie chłodzenia



Rysunek 67. Porównanie termogramów DSC podczas chłodzenia od 120 do 20 °C poszczególnych SLN inkorporowanych monoterpenami oraz próbki odniesienia.

Na podstawie otrzymanych termogramów DSC podczas chłodzenia wszystkich próbek SLN (od 20 do 120 °C) zaobserwowano, że dla wszystkich SLN inkorporowanych monoterpenami oraz dla próby odniesienia pierwszy widoczny pik endotermiczny, przypisywany początkowej fazie rozpadu matrycy i utlenianiu enkapsulowanej substancji [302, 335], widoczny był w temperaturze około 29 – 31 °C. Z kolei najbardziej intensywny pik endotermiczny, odpowiadający procesowi topnienia stałego lipidu [302] odnotowano w temperaturze około 55 °C – zarówno dla enkapsulowanych monoterpenów jak i dla próby odniesienia (rys. 74). Po przeanalizowaniu wszystkich wyników stwierdzono, że inkorporacja matrycy lipidowej monoterpenami wpłynęła na przebieg zachodzących procesów termicznych [302], a w dodatku enkapsulacja tych lotnych substancji skutkowała obniżeniem temperatury topnienia monostearynianu glicerolu w zestawieniu z próbką referencyjną.

W początkowej fazie procesu topnienia, tj. w temperaturze 31 °C, najbardziej intensywny pik endotermiczny odnotowano dla próbki geraniol-SLN (-0,68 mW). Warto tutaj wspomnieć, że geraniol posiadał najwyższą wartość EE wynoszącą 43,28% (zob. rozdz. 5.6.), co mogło wpłynąć na utlenianie większych ilości enkapsulowanej substancji i w rezultacie bardziej widocznym pikiem endotermicznym, związanym z tym procesem. Ponadto piki endotermiczne, które odnotowano dla pozostałych monoterpenu – enkapsulowanych z podobną efektywnością (tab. 60), potwierdzały te zależności. Dla próbki α -pinen-SLN (EE = 4,48%) najwyższy endotermiczny pik widoczny w granicach temp. 30 °C osiągał wartość 0,01 mW, podczas gdy dla próbki cytral-SLN stanowił wartość 0,08 mW (EE = 4,34%), a dla próbki limonen-SLN odnotowano 0,13 mW (EE = 5,58%).

W kolejnej widocznej fazie procesu topnienia, matryca lipidowa ulegała końcowemu rozkładowi w temperaturze około 55 °C. Najbardziej intensywny pik, wynoszący -0,63 mW (55 °C) odnotowano dla próbki SLN pozbawionej enkapsulowanego składnika aktywnego. Następnie, pik o intensywności -0,59 mW (55 °C) odnotowano dla próbki geraniol-SLN. Z kolei dla próbki α -pinen-SLN, limonen-SLN i cytral-SLN, piki endotermiczne wskazywały wartości odpowiednio: -0,05 mW (55 °C), -0,33 mW (55 °C) i -0,40 mW (55 °C). Tym samym, na podstawie otrzymanych termogramów wywnioskowano, że procesy topnienia monostearianu glicerolu, a w rezultacie degradacja matrycy lipidowej dla SLN inkorporowanych monoterpenu zachodziły w tej samej temperaturze (55 °C) jak w przypadku próbki odniesienia, a w zależności od rodzaju enkapsulowanego monoterpenu, proces ten zachodził jedynie z różną intensywnością.

Na podstawie analizy DSC podczas ogrzewania (od 20 do 120 °C) i chłodzenia (od 120 do 20 °C) porównano temperatury i zachodzące w nich przemiany termiczne. Tym samym wywnioskowano, że we wszystkich analizowanych próbkach SLN procesy topnienia i krystalizacji zachodziły naprzemiennie, a jako pierwszy rozpoczął się proces topnienia ($\Delta H > 0$; reakcja endotermiczna), a po nim następował proces krystalizacji ($\Delta H < 0$; reakcja egzotermiczna). Ponadto, analiza DSC nanocząstek lipidowych dotyczyła w szczególności badania właściwości termicznych lipidów (wchodzących w skład badanych SLN) tzn. analizie potencjalnie występujących w lipidach zjawisk termicznych (np. krystalizacja, topnienie, utlenianie termiczne [336]). Na tej podstawie można było zidentyfikować często obecny w przypadku lipidów polimorfizm (wielopostaciowość) [337].

Po kompleksowej analizie krystaliczności stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych monoterpenu stwierdzono, że proces degradacji może pojawiać się w pewnej kolejności w przypadku krystalicznych obszarów cząstki, po czym następuje wolniejsza degradacja w obszarach amorficznych. Według badań naukowych Izumikawa i wsp. [251] potwierdzonych także przez Omwoyo W.N. i wsp. [252], krystaliczność może wpływać na szybkość degradacji, a tym samym kinetykę uwalniania substancji czynnej. Co więcej, naukowcy udowodnili, że substancja aktywna jest zazwyczaj mniej gwałtownie uwalniana z matrycy o strukturze amorficznej a nie krystalicznej [251, 253], co również potwierdzono w ramach badań niniejszej pracy doktorskiej. Warto dodać, że występowanie substancji farmakologicznych w postaci różnych form polimorficznych ma znaczący wpływ na ich właściwości fizykochemiczne oraz na późniejsze działanie lecznicze [336, 338]. Oprócz tego, zmiany w strukturze krystalicznej substancji leczniczej mogą bezpośrednio wpływać zarówno na jej rozpuszczalność, jak i na zachowanie podczas topnienia oraz właściwości chemiczne lub stabilność termiczną [336]. Pomimo niestabilności postaci

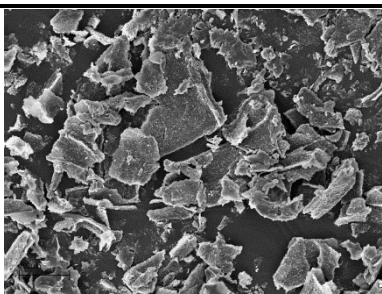
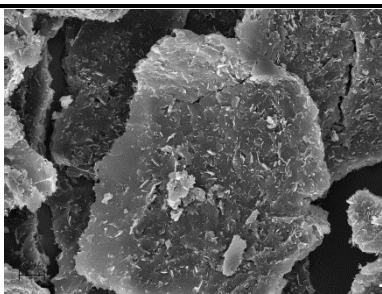
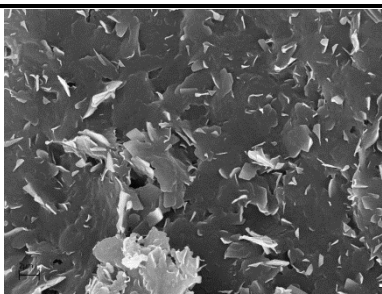
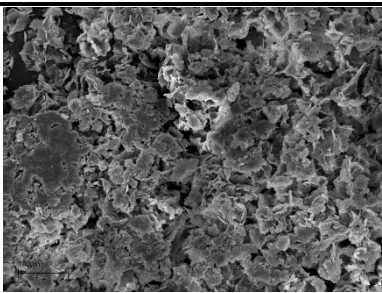
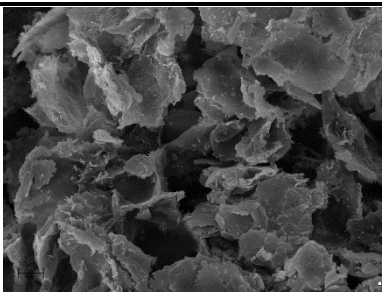
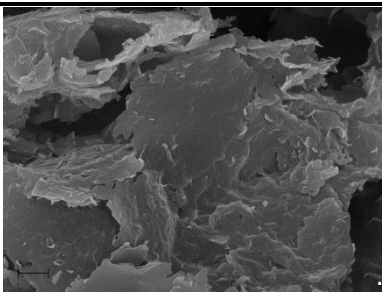
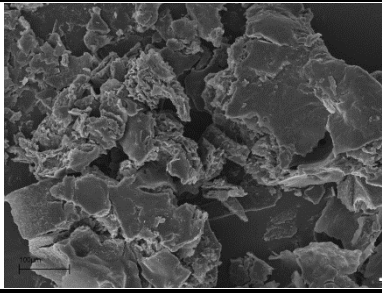
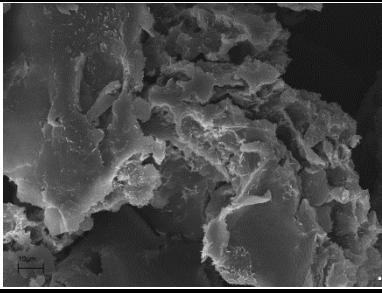
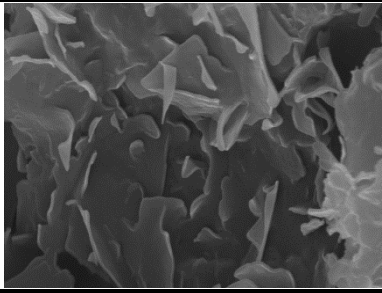
amorficznej i skłonnością do przechodzenia w formę krystaliczną, to właśnie ta postać jest pożądana dla wielu substancji czynnych. Następujący proces krystalizacji substancji może prowadzić do powstawania różnych form polimorficznych, wykazujących wiele różnic pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi, które mogą jednocześnie występować w badanym układzie [336].

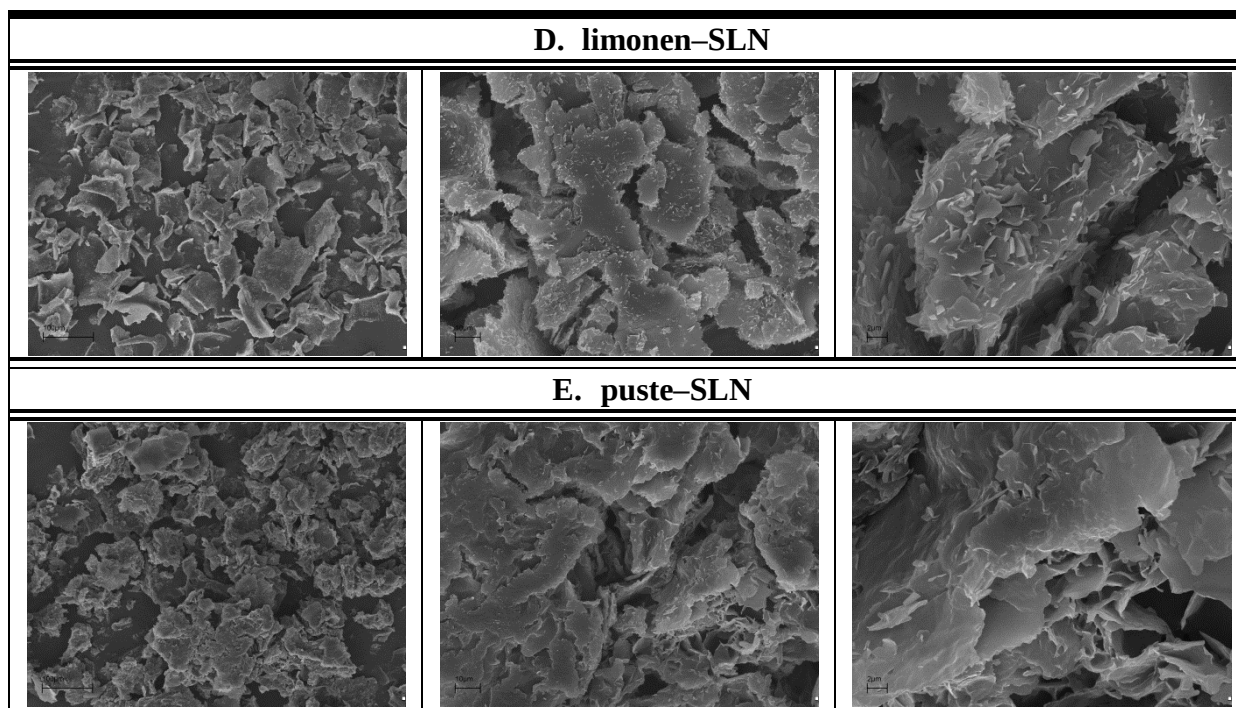
Przeprowadzone w ramach niniejszej dysertacji badania za pomocą techniki DSC dostarczyły charakterystycznych parametrów temperaturowych dla poszczególnych SLN, co może wpłynąć na poprawę jakości i właściwości fizykochemicznych produktów kosmetycznych/farmaceutycznych podczas dalszych procesów technologicznych z wykorzystaniem nanocząstek lipidowych inkorporowanych monoterpenami.

5.9. Morfologia otrzymanych SLN

Obraz nanocząstek lipidowych został otrzymany za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego *Carl Zeiss SMT Evo Series* w powiększeniu 100, 10 i 2 μm (tabela 61). Dzięki obrazom SEM widoczna była struktura powierzchni oraz porowatość SLN.

Tabela 61. Obrazy SEM z powiększeniem 100, 10 i 2 μm dla SLN inkorporowanych monoterpenami.

100 μm	10 μm	2 μm
A. α-pinen-SLN		
		
B. cytral-SLN		
		
C. geraniol-SLN		
		



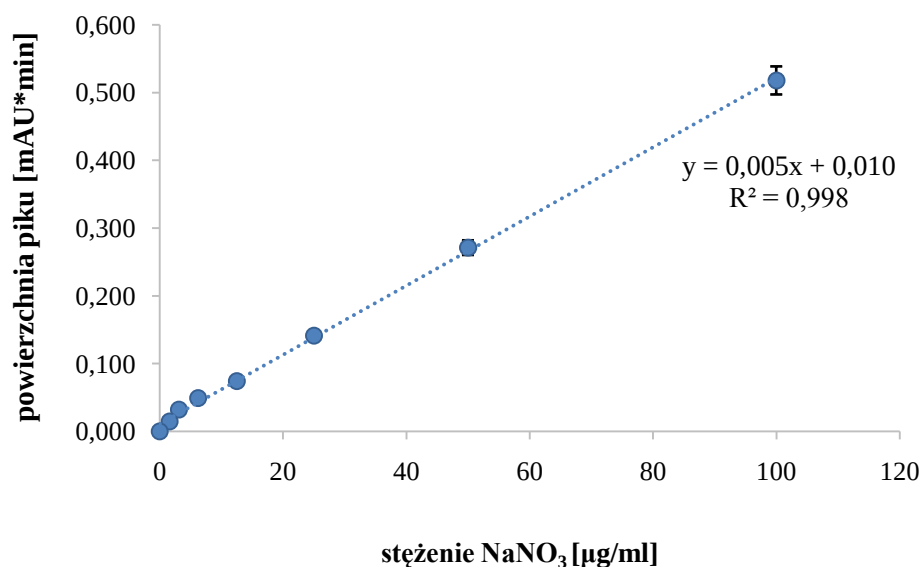
W tabeli 61 przedstawiono obrazy liofilizatów nanocząstek lipidowych inkorporowanych monoterpenami: α -pinenem (tab. 61-A), cytralem (tab. 61-B), geraniolem (tab. 61-C), limonenem (tab. 61-D) oraz próbą odniesienia (tab. 61-E) otrzymane z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego. Powiększenie obrazu umożliwiło obserwację cząstek w skali od 2 do 100 μm .

Na zdjęciach w skali 100, 10 i 2 μm we wszystkich przypadkach widoczna jest aglomeracja oraz nieregularny kształt i powierzchnia cząstek. Wszystkie z SLN posiadają nieregularności morfologiczne i widoczną szorstkość struktury, co jest zgodne z danymi opublikowanymi dla sulpirydu (pochodna benzamidowa stosowana jako lek przeciwpaczkowy) [339] czy ramiprylu (lek z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny stosowany w terapii nadciśnienia tętniczego) [340] enkapsulowanych w SLN, w których składzie obecny był m.in. Imwitor 900 K (stały lipid) czy Poloxamer 188 (jako surfaktant). Te jednoznaczne niedoskonałości mogą być także konsekwencją przedłużonej ekspozycji próbek na wysoką próżnię i intensywną wiązkę elektronów [341]. Przypuszcza się, że nanocząstki mogły zostać pokryte warstwą środka powierzchniowo czynnego. Nie zaobserwowano istotnych różnic w morfologii między próbą odniesienia a SLN inkorporowanymi monoterpenami. Obrazy pokazują, że metoda homogenizacji wysokociśnieniowej wytwarza polidispersyjną próbkę SLN o szerokim rozkładzie wielkości [342]. Rozmiary wszystkich nanocząstek lipidowych posiadały średnicę od około 100 do 200 nm. Ponadto, niektóre cząstki tworzyły duże „skupiska” (aglomeraty). Jest to zjawisko charakterystyczne dla SLN, które wykazują wysoką tendencję do żelowania i agregacji z powodu „kleistej” natury lipidu, zwłaszcza po długotrwałym przechowywaniu. Efekt ten obserwowano już wielokrotnie w innych badaniach syntezy SLN inkorporowanych substancjami czynnymi o różnym pochodzeniu [342].

5.10. Badania *in vitro* wybranych monotrpenów enkapsulowanych w SLN

5.10.1. Aktywność przeciwzapalna cytralu i geraniolu

W przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badaniach *in vitro* porównywano aktywność przeciwzapalną cytralu (Cyt-) i geraniolu (Ger-), enkapsulowanych w nanocząstki lipidowe. W celu umożliwienia kwantyfikacji wyników, wyrażonych jako procent produkcji tlenku azotu (NO) przez komórki kontrolne (RAW 264.7), w badaniach wykonano krzywą kalibracyjną azotanu sodu (NaNO_3 ; Sigma-Aldrich, USA), którą przedstawia rysunek 68. Wyniki dotyczące inhibicji NaNO_3 (wyrażone w % kontroli) dla poszczególnych próbek badanych w obecności lipopolisacharydu (LPS) i przy jego braku zestawiono w tabeli 62.



Rysunek 68. Krzywa kalibracyjna azotanu sodu (NaNO_3).

Tabela 62. Efekt inhibicji NaNO₃ (wyrażony w % kontroli) dla poszczególnych próbek badanych w obecności lipopolisacharydu (LPS) i przy jego braku w 4 różnych stężeniach: 5, 10, 15 i 20 µg/ml.

Nazwa próbki	Puste-SLN	Cyt-SLN-5	Cyt-SLN-10	Cyt-SLN-15	Cyt-SLN-20	Ger-SLN-5	Ger-SLN-10	Ger-SLN-15	Ger-SLN-20
brak stymulacji LPS	23,96	21,70	20,57	20,19	21,32	23,02	19,62	22,45	19,06
	20,19	22,08	19,81	20,57	23,21	24,72	21,13	22,26	21,13
	21,70	25,66	24,53	23,02	24,34	23,40	20,57	21,13	22,08
	20,57	22,83	22,26	23,77	25,85	17,55	23,40	20,57	19,62
średnia ± SD	21,60 ± 1,70	23,07 ± 1,79	21,79 ± 2,09	21,89 ± 1,78	23,68 ± 1,91	22,17 ± 3,17	21,18 ± 1,60	21,60 ± 0,90	20,47 ± 1,38
stymulacja LPS	52,26	28,49	25,283	26,04	25,85	35,47	25,66	22,26	23,21
	50,38	28,30	25,28	25,85	23,21	33,02	24,72	23,40	23,58
	50,38	26,23	23,58	24,15	20,19	35,09	24,53	22,64	24,34
	48,11	27,36	24,53	26,23	22,83	34,72	25,47	22,83	28,30
średnia ± SD	50,28 ± 1,70	27,59 ± 1,04	24,67 ± 0,81	25,57 ± 0,96	23,02 ± 2,32	34,58 ± 1,08	25,09 ± 0,56	22,78 ± 0,47	24,86 ± 2,34

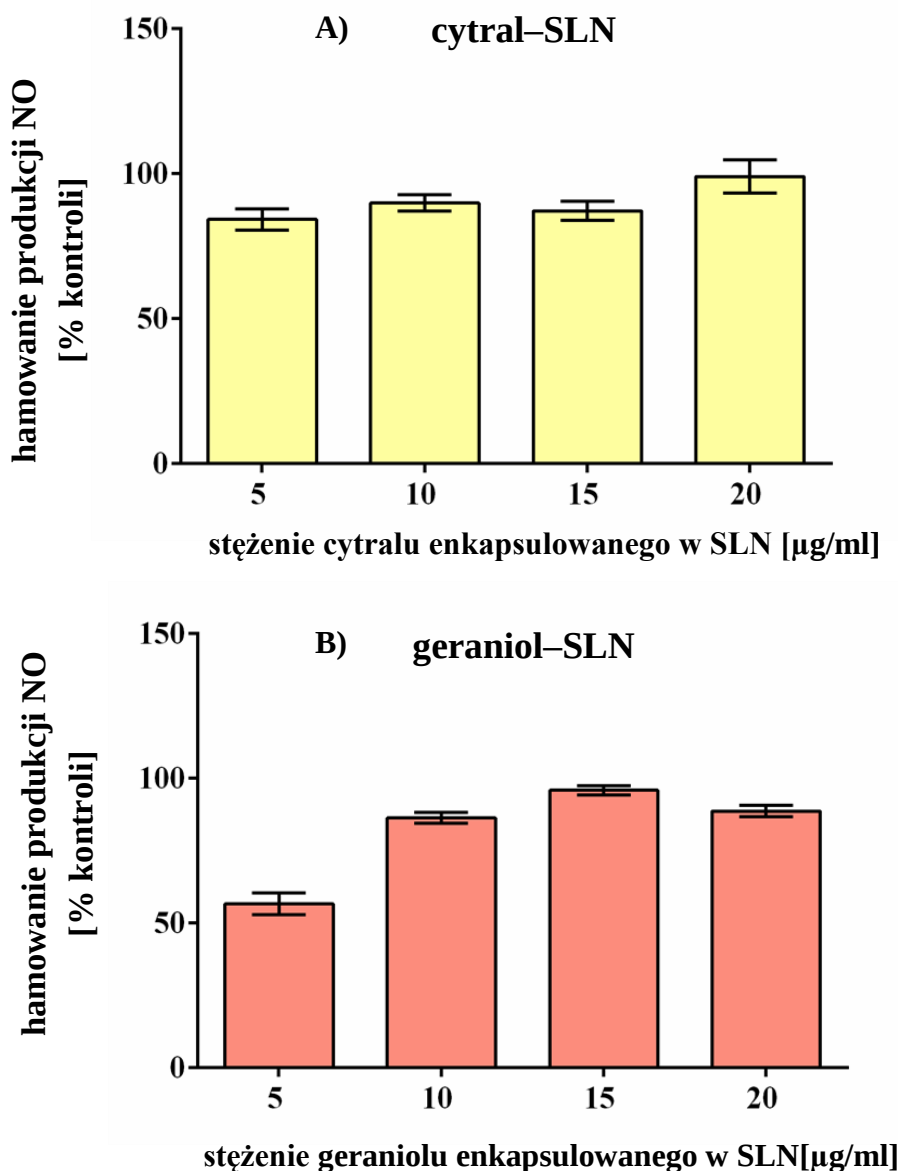
Wyniki przedstawione w tabeli 62 wskazują na wzrost efektywności inhibicji NaNO₃ w obecności LPS zarówno dla próby odniesienia (puste-SLN), jak i dla SLN inkorporowanych cytalem i geraniolem we wszystkich badanych stężeniach.

Kolejnym etapem badań było przygotowanie komórek RAW 264.7 i poddanie ich działaniu SLN inkorporowanych monoterpenami: cytalem i geraniolem oraz próbki SLN pozbawionej enkapsulowanego składnika aktywnego w obecności lipopolisacharydu (rys. 69). W ten sposób określano zdolność badanych substancji do indukowania/inhibicji wytwarzania NO, a otrzymane rezultaty przedstawiono w formie wykresów. Otrzymane wyniki wyrażono jako średnia arytmetyczna ± SD (n = 4). Wszystkie wartości zostały znormalizowane względem 100% kontroli produkcji NO (0% inhibicji).

Warto tutaj wyjaśnić, że do badań *in vitro* wybrano jedynie próbki SLN inkorporowane cytalem (oraz początkowo także geraniolem) spośród wszystkich badanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej monoterpenów, ponieważ tylko one utrzymywały się najdłużej w postaci dyspersji nanocząstek (tj. w stanie ciekłym). Na skutek „zredukowanej” liczby próbek inkorporowanych monoterpenami, badania rozszerzono o różne linie komórkowe. Natomiast próbki α-pinen/limonen-SLN przyjęły postać półstałą i pomimo prób rozproszenia w medium przed badaniami, nie zostały one zachowane do badań na linii komórkowej. Warto pamiętać, że rozcieńczenie próbki może zostać wykonane w celu zmniejszenia stężenia cząstek/składnika aktywnego jedynie do wartości, która nie spowoduje uszkodzenia („śmierci”) komórek (reakcja zależna od stężenia).

Ponadto, badania cytotoksyczności są analizą porównawczą i były przeprowadzane równolegle z próbkami referencyjnymi – tj. SLN pozbawionymi substancji czynnej. Z uwagi na fakt, że zarówno referencyjne dyspersje nanocząstek, jak i dyspersje inkorporowane składnikiem aktywnym są rozcieńczane, a następnie testowane w takim samym stosunku, dlatego nie ma możliwości wykonania tych czynności dla dyspersji w stanie półstałym. W niniejszych badaniach, nawet przeprowadzona próba zdyspergowania półstałej dyspersji

za pomocą myjki ultradźwiękowej nie przyniosła oczekiwanego rezultatu. Jednakże nawet w przypadku uzyskania tym sposobem ponownie dyspersji w stanie ciekłym, otrzymane następnie wyniki mogłyby okazać się niewiarygodne, ponieważ na skutek ultradźwięków mogłyby ulec zmianie konfiguracja nanocząstek lub też mogłyby wytworzyć się dodatkowe agregaty cząstek. Tak przygotowana próbka do badań na liniach komórkowych, mogłaby w rezultacie uszkodzić komórki, nawet pomimo braku toksyczności.



Rysunek 69. Porównanie aktywności przeciwzapalnej SLN inkorporowanych cytralem (A) i geraniem (B) w obecności LPS w 4 różnych stężeniach: 5, 10, 15 i 20 µg/ml.

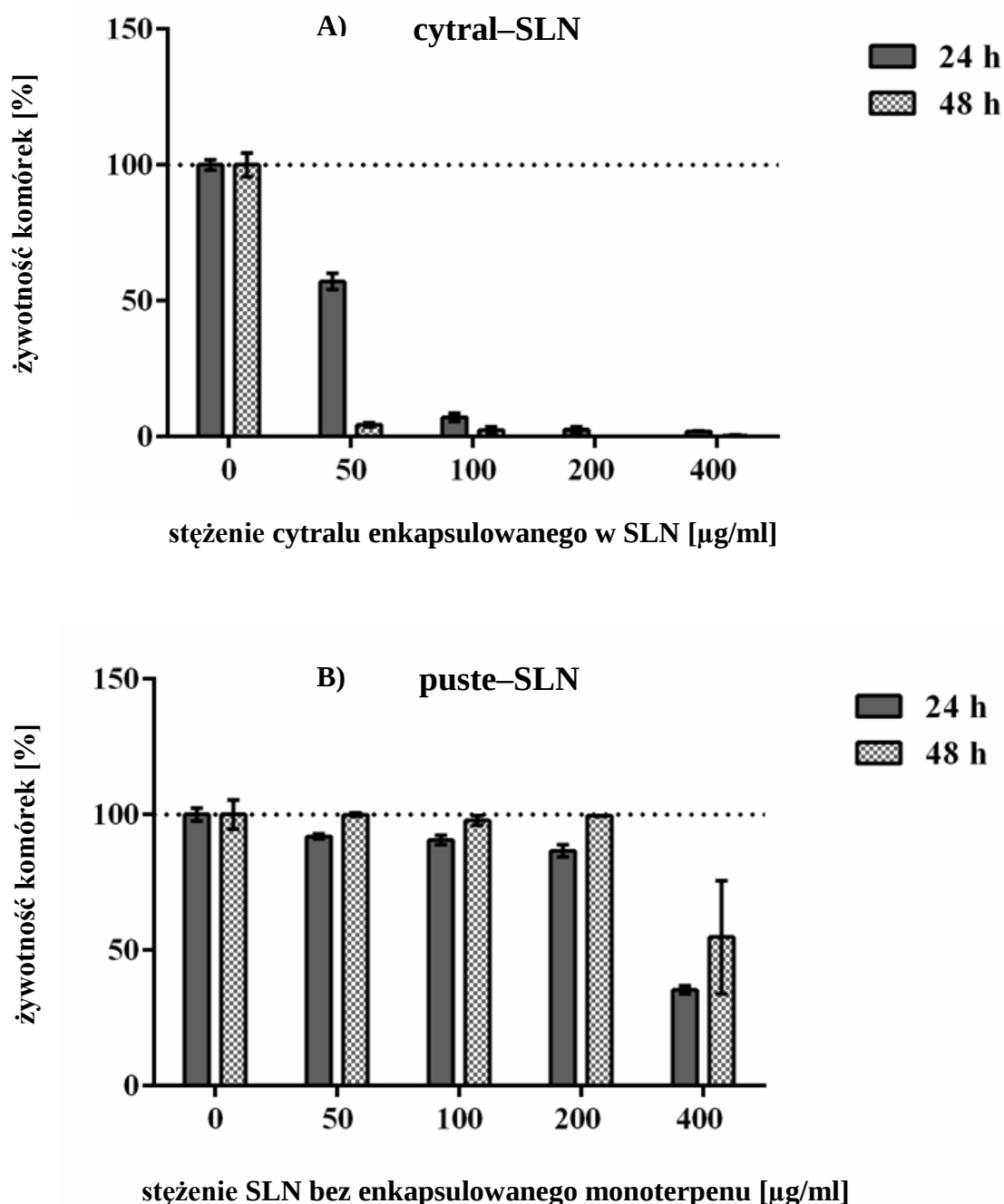
Przeprowadzone badania dowiodły, że już przy najniższym badanym stężeniu (5 µg/ml), cytral hamował wytwarzanie NO aż w 84%, podczas gdy geraniol w 57% (w tym samym stężeniu). Ponadto, przy stężeniu 10 µg/ml skuteczność inhibicji NO w przypadku cytralu dodatkowo wzrosła do 90% i utrzymywała się na wysokim poziomie, wynoszącym 87% również przy 15 µg/ml. Dla geraniolu także odnotowano wzrost efektywności inhibicji NO, wraz ze wzrostem stężeń, która przy 10 µg/ml wynosiła 86%, a przy 15 µg/ml jej wartość

wzrosła do 96% (przewyższając tym samym skuteczność cytralu, odnotowaną przy tym samym stężeniu). Jednak przy najwyższych badanych stężeniach (20 µg/ml) to aktywność hamowania dla cytralu wynosiła aż 99%, wskazując tym samym na silny potencjał przeciwnowotworowy tego monoterpenu. Z uwagi na utrzymującą się na bardzo wysokim poziomie we wszystkich badanych stężeniach, zdolność cytralu enkapsulowanego w SLN do hamowania NO, w następnym etapie dokonano oceny cytotoksyczności dla tego monoterpenu z wykorzystaniem dwóch modeli komórkowych skóry: HaCaT (nienowotworowy) oraz A431 (nowotworowy).

Warto podkreślić, że dotychczas naukowcy próbowali określić aktywność przeciwzapalną jedynie „czystych” monoterpenu (w tym cytralu) [259, 261]. Zarówno cytral, jak i geraniol są głównymi składnikami olejku z trawy cytrynowej (stanowią łącznie ok. 80% wszystkich składników) [343], odznaczającego się najsilniejszym działaniem przeciwzapalnym w chorobach skóry (m.in. atopowe zapalenie skóry, trądzik pospolity) spośród 20 badanych olejków eterycznych [260]. Badania przeprowadzone w 2010 roku przez Su Y.-W. i in. miały na celu określenie aktywności przeciwzapalnej pojedynczych składników charakterystycznych dla oleju geraniowego (cytronelol i geraniol), mogących znaleźć zastosowanie m.in. w leczeniu stanów zapalnych skóry. Sprawdzano wówczas skuteczność hamowania NO przez cytronelol i geraniol w obecności lipopolisacharydu (LPS), a otrzymane wyniki sugerowały, że substancje te wykazują działanie przeciwzapalne i mogą zostać wykorzystane do celów terapeutycznych [259].

5.10.2. Badania cytotoksyczności SLN enkapsulowanych cytralem z wykorzystaniem nienowotworowej linii komórkowej HaCaT

Na rysunku 70 przedstawiono otrzymane wyniki, ukazujące żywotność komórek HaCaT określona metodą redukcji Alamar Blue[®] w ciągu 24 i 48 godzin po ekspozycji linii komórek nienowotworowych skóry na różne stężenia cytralu enkapsulowanego w SLN (A) oraz próby odniesienia (B). Zaobserwowano, że obecność cytralu znacząco wpłynęła na zmniejszenie żywotności komórek badanej linii nienowotworowej. Wraz ze wzrostem stężenia była widoczna wyraźna redukcja % żywotności, która przy najniższym badanym stężeniu 50 µg/ml została zmniejszona o prawie połowę już po 24 h, podczas gdy po 48 h osiągnęła skuteczność w granicach 95%. W dodatku przy stężeniu 100 µg/ml, żywotność komórek po 24 h spadła do ok. 10%, a po 48 h była bliska 0%. Przy najwyższych stężeniach, takich jak 200 i 400 µg/ml, żywotność komórek poddanych działaniu SLN inkorporowanych cytralem mieściła się w granicach 0% po 24 i 48 h, co wskazywało na silne działanie cytotoksyczne cytralu (rys. 70-A). Warto zaznaczyć, że stałe nanocząstki lipidowe niezawierające monoterpenu nie wykazały działania cytotoksycznego na te same linie komórkowe. Jedynie przy najwyższym badanym stężeniu wynoszącym 400 µg/ml, żywotność komórek po 24 i 48 h spadła o około połowę; przy dużym rozkładzie błędów (rys. 70-B).

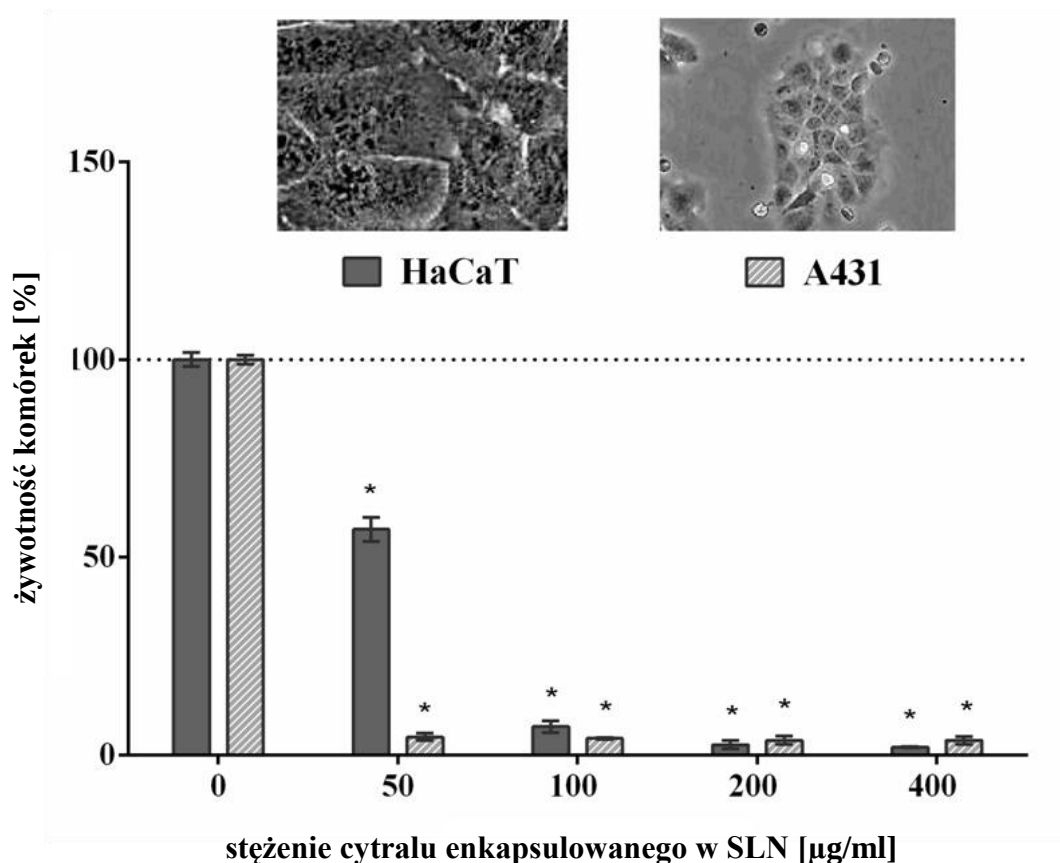


Rysunek 70. Żywotność komórek HaCaT określona metodą redukcji Alamar Blue[®] w ciągu 24 i 48 godzin po ekspozycji linii na różne stężenia cytralu enkapsulowanego w SLN (A) oraz próby odniesienia (B).

5.10.3. Porównanie działania cytralu enkapsulowanego w SLN na linie komórek skóry: nienowotworowe HaCaT oraz nowotworowe A431

Na rysunku 71 przedstawiono otrzymane rezultaty dotyczące badań cytotoksyczności cytralu enkapsulowanego w SLN na linie komórkowe HaCaT i A431. Zaobserwowano, że we wszystkich badanych stężeniach po 24 godzinach ekspozycji na cytral, żywotność

komórek HaCaT była znacząco zmniejszona (wartość $p < 0,05$). Ekspozycja na najniższe badane stężenie (50 $\mu\text{g/ml}$) obniżyła żywotność komórek HaCaT do 57%, podczas gdy w najwyższym badanym stężeniu (400 $\mu\text{g/ml}$) żywotność komórek została znacząco zmniejszona, osiągając jedynie 2%. Wpływ cytralu okazał się jeszcze silniejszy na żywotność komórek A431, powodując zmniejszenie ich żywotności aż o 95% przy najniższym badanym stężeniu (50 $\mu\text{g/ml}$). Świadczyło to o silnym działaniu cytotoksycznym monoterpenu, który zmniejszył także żywotność komórek nowotworowych do wartości około 4% przy najwyższym badanym stężeniu.



Rysunek 71. Żywotność komórek określona metodą redukcji Alamar Blue® po ekspozycji linii komórek skóry HaCaT i A431 na różne stężenia cytralu enkapsulowanego w SLN.

Na podstawie otrzymanych wyników dowiedziono, że w porównaniu z nienowotworową linią komórkową (HaCaT), nawet przy najniższym badanym stężeniu (50 $\mu\text{g/ml}$) cytral enkapsulowany w SLN wywoływał znaczące działanie cytotoksyczne po 24 godzinach ekspozycji na linię komórek nowotworowych (A431). Tak istotny efekt cytotoksyczny cytralu w linii komórkowej nowotworu A431 wskazywał na silne działanie przeciwnowotworowe tego monoterpenu, co zostało potwierdzone również przez innych naukowców [268, 343, 344].

Warto dodać, że badania przeprowadzone przez grupę amerykańskich naukowców (Zeng i in., 2016) dotyczyły badań *in vivo* na myszach z guzami heteroprzeszczepu 4T1 (raka sutka) i wykazały, że geranial jest silniejszym izomerem cytralu, przy czym żadna z testowanych formułacji nie wykazywała oznak szkodliwej ostrej toksyczności dla zwierząt w oparciu o masę ciała [345].

5.10.4. Porównania wielokrotne za pomocą poprawki Bonferroniego (testy *post-hoc*)

Ostatnim etapem przeprowadzonych badań było przeprowadzenie dwuczynnikowej (dwukierunkowej) analizy ANOVA (ang. *Two-way ANOVA*), która obejmowała porównania wielokrotne z wykorzystaniem tzw. poprawki Bonferroniego, stanowiącej powszechne a zarazem wiarygodne, dodatkowe testy dla analizy wariancji. W tej metodzie statystycznej, wartość $\alpha = 0,05$ uległa redukcji na skutek podzielenia jej przez liczbę wykonywanych testów wielokrotnych k . Następnie analizowano wyniki, które spełniały założoną wcześniej istotność statystyczną ($p < 0,05$), jednak ostatecznie przyjmowały wartości z prawdopodobieństwem mniejszym niż $p < \alpha/k$. Otrzymane rezultaty, spełniające założoną istotność statystyczną po poprawce Bonferroniego, przedstawiono w tabeli 63.

Tabela 63. Analiza cytralu enkapsulowanego w SLN za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ($\alpha = 0,05$).

Cytral-SLN					
Źródło wariancji	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
Interakcja	4086	4	1022	272,5	$p < 0,0001$
Współczynnik wiersza (ang. Row Factor)	57302	4	14325	3821	$p < 0,0001$
Współczynnik kolumny (ang. Column Factor)	1520	1	1520	405,4	$p < 0,0001$
Błąd	112,5	30	3,75		

Na podstawie otrzymanych wyników, przeprowadzonych w oprogramowaniu GraphPad Prism[®] wersja 6.00 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornia, USA) otrzymano wartość współczynnika p mniejszą od założonej istotności statystycznej ($p < 0,05$). W tabeli 63 przedstawiono wartości wynoszące $p < 0,0001$ dla interakcji między zmiennymi, co oznaczało, że po wykonaniu testów wielokrotnych otrzymano wszystkie wyniki istotne statystycznie.

WYNIKI BADAŃ I ICH DYSKUSJA

CZEŚĆ II

NANOSTRUKTURALNE NOŚNIKI LIPIDOWE (NLC)

INKORPOROWANE WYBRANYMI

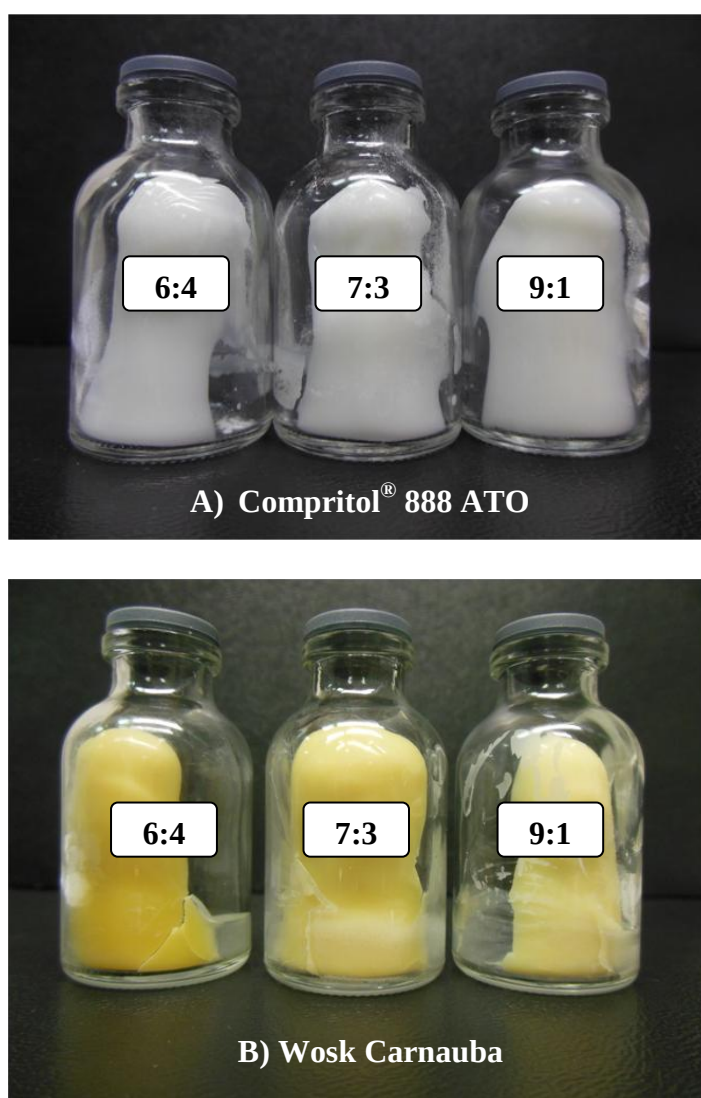
SKŁADNIKAMI AKTYWNYMI

6. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA (cz. 2 – NLC)

6.1. Dobór odpowiedniego lipidu dla Retinolu 50 C

Po przeprowadzeniu selekcji lipidów z wykorzystaniem lipidów stałych (zob. rozdz. 4.1.2., tab. 14) mieszanych w różnych stosunkach z Retinolem 50 C, dokonano wyboru najbardziej kompatybilnych lipidów do syntezy NLC. Po dokonaniu obserwacji rozpuszczalności Retinolu 50 C w określonych odstępach czasu (15 min, 30 min, 1 h, 24 h, 72 h) zaobserwowano, że we wszystkich badanych stosunkach najlepsze końcowe rezultaty otrzymano dla behenianiu glicerolu (Compritol® 888 ATO) oraz dla wosku Carnauba (Carnauba Wax).

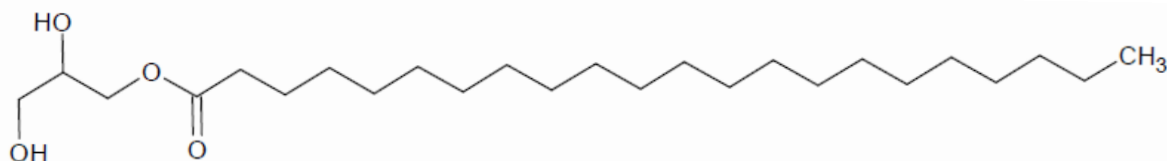
Na rysunku 72 pokazano dwa najbardziej kompatybilne zestalone lipidy (półsyntetyczny oraz organiczny) w połączeniu z Retinolem 50 C we wszystkich badanych stosunkach (9:1 / 7:3 / 6:4) po upływie 72 h.



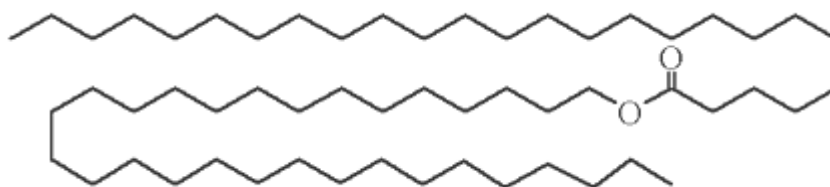
Rysunek 72. Compritol® 888 ATO (A) oraz Wosk Carnauba (B) w połączeniu z Retinolem 50 C we wszystkich badanych stosunkach.

Przedstawione na rysunku 72 zestalone lipidy – Compritol® 888 ATO oraz Wosk Carnauba utworzyły mieszaniny jednorodne z Retinolem 50 C we wszystkich badanych stosunkach po 72 h, co świadczyło o dobrym powinowactwie lipidów z badaną substancją aktywną. Efekt ten był widoczny od momentu stopienia obu lipidów i utrzymywał się w ciągu kolejnych minut i godzin.

Retinol 50 C (INCI: Retinol (and) Polysorbate 20) jest przykładem związku składającego się w 50% z polarnego retinolu, będącego alkoholem zaliczanym do grupy karotenoidów oraz w 50% z emulgatora, złożonego z estrów tłuszczowych sorbitanu polioksyetylenowanych 20 molami tlenu etylenu. Taka budowa Retinolu 50 C zapewnia dobrą rozpuszczalność zarówno w związkach o polarnym, jak i niepolarnym charakterze struktury chemicznej. Wysokie powinowactwo do behenianu glicerolu można tłumaczyć obecnością długiego łańcucha alkilowego oraz amfifilowym charakterem struktury chemicznej (rys. 73), zapewniającym dobrą stabilność dla wszystkich polarnych i niepolarnych związków. Z kolei wysoka kompatybilność wosku Carnauba wynikała z obecności długiego łańcucha alkilowego oraz niepolarnego charakteru struktury chemicznej (rys. 74). Ponadto, wysoka temperatura topnienia (82–86 °C) pozyskiwanego z liści palmy *Copernicia prunifera* wosku zapewniała, że NLC będzie pozostawać w stanie stałym przy podawaniu przez skórę. Warto dodać, że średnia ważona temperatura powierzchni skóry wynosi 32–34 °C, natomiast w stanie równowagi cieplnej organizmu, temperatura wewnętrzna (w stanie spoczynku) utrzymuje się na stałym poziomie $37 \pm 0,3$ °C [346].



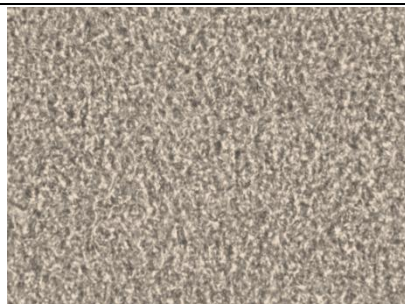
Rysunek 73. Wzór strukturalny behenianu glicerolu [rysunek własny w *Chemsketch*].



Rysunek 74. Wzór strukturalny wosku Carnauba.

Najlepszą zgodność połączonych składników tj. w stosunku 9:1 potwierdzono również za pomocą mikroskopu stereoskopowego (Leitz Orthoplan, Niemcy) w powiększeniu 40-krotnym (tab. 64), co uwzględniono w późniejszej preparatyce Ret–NLC.

Tabela 64. Obraz mikroskopowy najbardziej kompatybilnych lipidów z Retinolem 50 C, zmieszanych w stosunku 9:1 (przy 40-krotnym powiększeniu).

Nazwa lipidu	Compritol® 888 ATO	Wosk Carnauba
Stosunek lipid–Retinol 50 C		
9:1		

6.2. Porównanie Z-Ave, PDI oraz ZP otrzymanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C

6.2.1. NLC inkorporowane Retinolem 50 C, zawierające półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid

W tabeli 65 przedstawiono wyniki dla Z-Ave i PDI, które otrzymano po 24 godzinach oraz po miesiącu od dnia syntezy nanocząstek (NLC) inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierających półsyntetyczny (Miglyol 812) lub naturalny (MSO) ciekły lipid. Analogiczne pomiary wykonywane były także po 3, 7 i 15 dniach, jednak pominięto ich analizę i interpretację w dalszym w toku dyskusji z powodu braku istotnych różnic pomiędzy uzyskanymi wynikami średniej wielkości, współczynnika polidispersyjności oraz potencjału zeta w porównaniu do prezentowanych wyników NLC (po 24 h i miesiącu). Wszystkie próbki nanostrukturalnych nośników lipidowych przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C (bez dostępu światła).

Tabela 65. Porównanie Z-Ave i PDI dla NLC inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierających półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid.

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Z-Ave [nm] ± SD	PDI [j.u.] ± SD
Ret–NLC/Mig	po 24 h	4	164 ± 0,01	0,20 ± 0,05
		25	162 ± 0,02	0,18 ± 0,01
		40	166 ± 0,01	0,21 ± 0,01
	po miesiącu	4	161 ± 0,01	0,16 ± 0,01
		25	169 ± 0,02	0,17 ± 0,03
		40	163 ± 0,01	0,14 ± 0,02
Ret–NLC/MSO	po 24 h	4	166 ± 0,03	0,21 ± 0,03
		25	163 ± 0,02	0,17 ± 0,02
		40	165 ± 0,01	0,16 ± 0,01

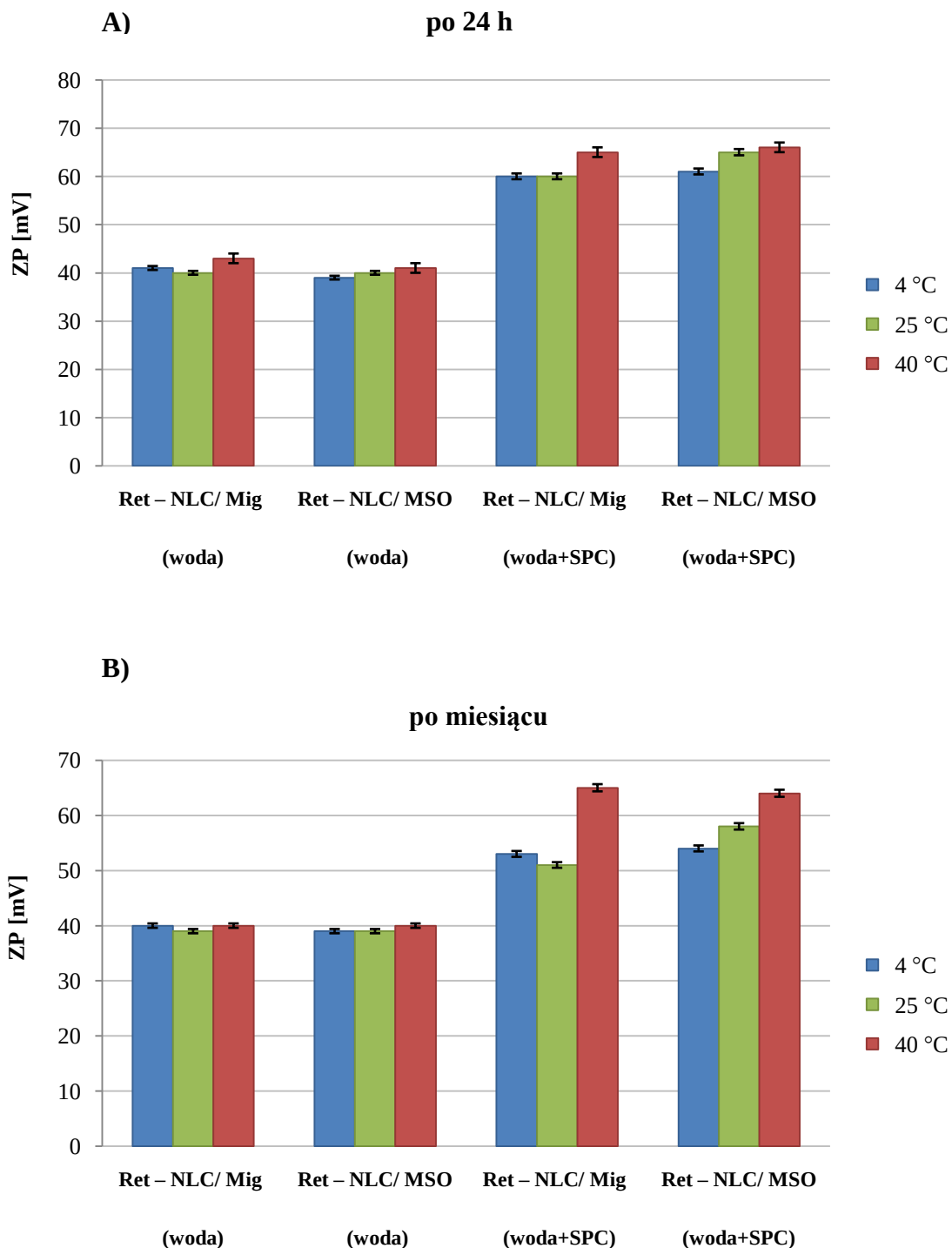
	po miesiącu	4	$169 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,02$
		25	$162 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
		40	$163 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$

Na podstawie wyników zebranych w tabeli 65 zaobserwowano, że średnia wielkość cząstek wszystkich NLC inkorporowanych Retinolem 50 C po 24 h od dnia syntezy i przechowywania w temperaturze 4, 25 i 40 °C nie przekraczała 170 nm. Dla próbek Ret–NLC/Mig, Z-Ave mieściło się w podobnym zakresie, wynoszącym od $162 \pm 0,02$ nm (25 °C) przy PDI równym $0,18 \pm 0,01$ j.u. do $166 \pm 0,01$ nm (40 °C) przy PDI wynoszącym $0,21 \pm 0,01$ j.u. Duże podobieństwo względem NLC zawierających półsyntetyczny olej Miglyol 812 było widoczne dla próbki Ret–NLC/MSO, w której wielkość cząstek wahała się w zakresie od $163 \pm 0,02$ nm (25 °C) przy PDI wynoszącym $0,17 \pm 0,02$ j.u. do $165 \pm 0,03$ nm (4 °C) przy PDI równym $0,16 \pm 0,01$ j.u. Tak nieznaczne różnice w rozmiarze obu rodzajów NLC mogą świadczyć o równie wysokiej funkcjonalności naturalnego oleju roślinnego w porównaniu do jego półsyntetycznego odpowiednika.

Warto dodać, że po miesiącu przechowywania wszystkich próbek NLC w różnych warunkach temperaturowych (4, 25 i 40 °C), w większości przypadków nie zaobserwowano zjawiska agregacji cząstek. Wyjątek stanowiły jedynie dwie próbki: Ret–NLC/Mig w temp. 25 °C, w której przyrost cząstek wynosił 7 nm oraz Ret–NLC/MSO w temp. 4 °C, w której nastąpił przyrost o zaledwie 3 nm. Ponadto, wartości współczynnika polidispersyjności dla wszystkich NLC mieściły się w zakresie normy (0-0,30 j.u.) w ciągu całego okresu badań.

Tym samym dowiedziono, że naturalny olej z nasion Meadowfoam może skutecznie pełnić rolę ciekłego lipidu w syntezie nanostrukturalnych nośników lipidowych, nie wpływając na znaczący przyrost średniej wielkości cząstek w porównaniu do lipidów półsyntetycznych. Ponadto, wysoka stabilność oleju wynikająca z jego unikalnego składu (zob. rozdział 2.2.3.1., tab. 6) może korzystnie wpływać na stabilność próbek, zwłaszcza przechowywanych w wyższych temperaturach, co potwierdzono w niniejszym badaniu.

Na rysunku 75 przedstawiono wartości ZP (w wodzie Milli-Q[®] Plus o pH = 5,5 i przewodności 50 μ S/cm oraz w wodnym roztworze surfaktantu), które otrzymano po 24 godzinach (A) oraz po miesiącu (B) od dnia syntezy nanocząstek.



Rysunek 75. Porównanie wartości ZP po 24 h (A) oraz po miesiącu (B) dla NLC inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierających półsyntetyczny/naturalny ciekły lipid.

Zarówno po 24 h (rys. 75-A), jak i po miesiącu (rys. 75-B) przechowywania próbek w temperaturze 4, 25 i 40 °C zaobserwowano wysoką stabilność dla wszystkich otrzymanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C. We wszystkich próbkach wartość bezwzględna ZP znacząco przekroczyła $|\pm 30 \text{ mV}|$, co wskazywało na dobrą przewidywaną stabilność fizyczną próbek. Warto zaznaczyć, że wyższe wartości potencjału zeta we wszystkich badanych temperaturach odnotowano dla ZP mierzonego w wodnym roztworze surfaktantu

(ang. *original dispersion medium*), aniżeli w wodzie (pH = 5,5; przewodność 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$) – różnica wynosiła bowiem około $|\pm 20 \text{ mV}|$ w przypadku obu rodzajów Ret–NLC, zawierających półsyntetyczny/naturalny ciekły lipid. Odpowiednie rozcieńczenie może wpłynąć na właściwości badanej próbki oraz zmieniać wartości ZP [347]. Zakłada się, że obecność surfaktantu podczas syntezy SLN/NLC może wpłynąć na właściwości otrzymanych nanocząstek, dlatego też pomiar w wodzie z dodatkiem środka powierzchniowo czynnego (SPC) stanowi najdokładniejszą analizę potencjału elektrycznego na płaszczyźnie poślizgu [347, 348].

Na podstawie otrzymanych wyników zauważono, że dla próbki Ret–NLC/Mig najwyższa stabilność zmierzona w wodzie, jak i w wodnym roztworze SPC była widoczna w najwyższej temperaturze (40 °C) w ciągu całego okresu badań. Równie wysoka stabilność tej samej próbki była widoczna w temperaturze pokojowej oraz 4 °C, jednak po miesięcznej analizie w tych temperaturach odnotowano nieznaczny spadek wartości ZP (woda+SPC) w porównaniu do ZP zmierzonego w temp. 40 °C.

Podobnych obserwacji dokonano w przypadku próbki Ret–NLC/MSO. Największa wartość bezwzględna ZP została zmierzona w wodzie oraz w wodnym roztworze SPC również w temperaturze 40 °C, podczas gdy w temp. 4 i 25 °C wartości ZP były nieznacznie mniejsze.

Określenie wartości ZP, obok wielkości cząstek i współczynnika polidispersyjności, jest kluczowym parametrem w późniejszym dostarczaniu substancji aktywnej do miejsc docelowych. Naukowcy dowiedli, że potencjał zeta może wpłynąć na farmakokinetkę inkorporowanej substancji czynnej [347]. Ponadto, może przyczynić się do zmian właściwości fizykochemicznych nanonośników w ludzkim organizmie lub też może wpłynąć na fagocytózę nanocząstek w krwioobiegu [349].

6.2.2. Półsyntetyczne i organiczne NLC inkorporowane Retinolem 50 C

W tabeli 66 przedstawiono średnie wielkości cząstek i wartości współczynnika polidispersyjności dla Retinolu 50 C enkapsulowanego w półsyntetyczne (Ret–NLC/Synt) oraz organiczne (Ret–NLC/Org) nanostrukturalne nośniki lipidowe, które także zmierzono po 24 godzinach i po miesiącu od dnia syntezy. Te same pomiary wykonywane były również po 3, 7 i 15 dniach, jednak z powodu braku znaczących różnic pomiędzy uzyskanymi wynikami dla półsyntetycznych i organicznych NLC, pominięto ich analizę i interpretację w dalszym w toku dyskusji. Wszystkie próbki NLC przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C (bez dostępu światła).

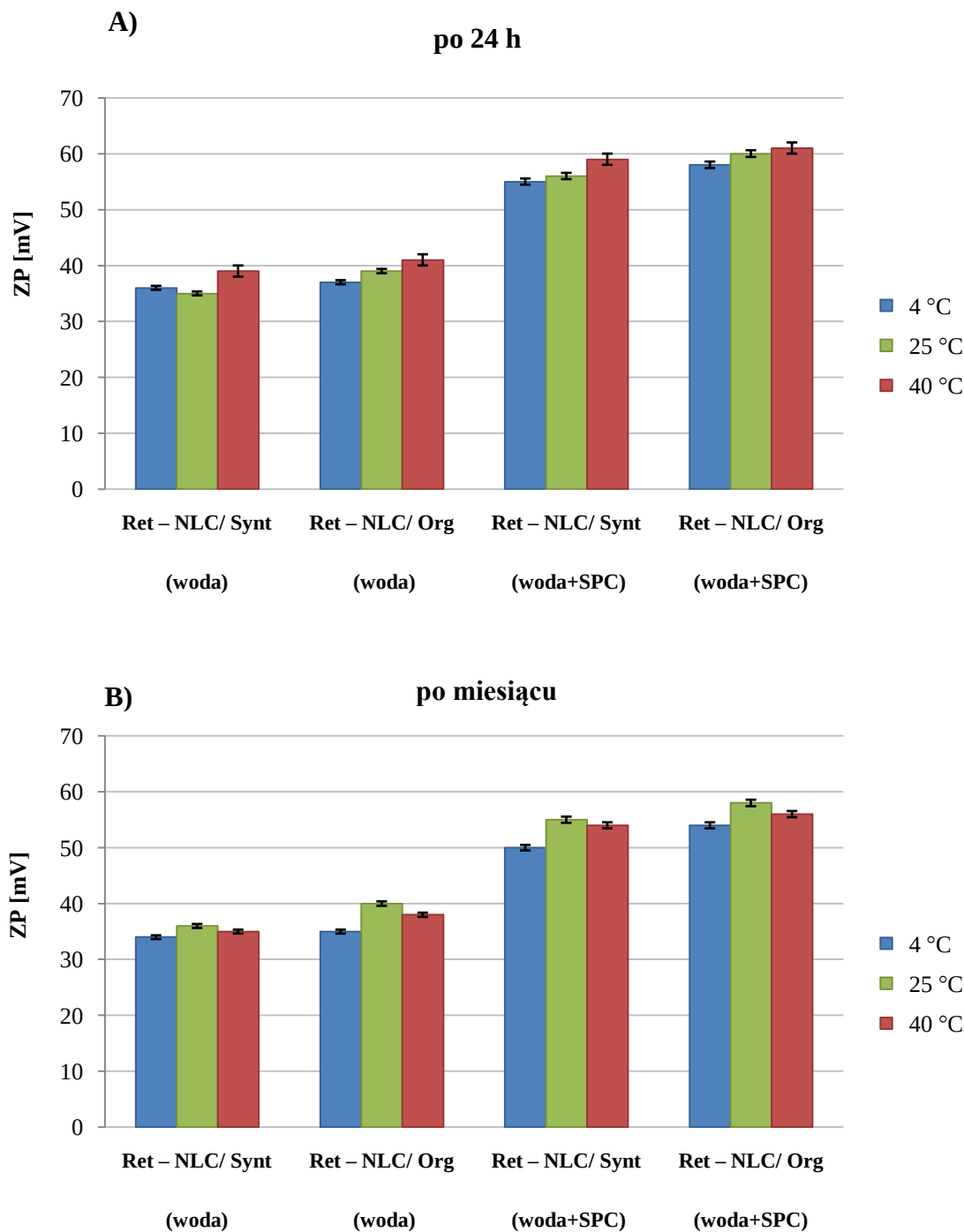
Tabela 66. Porównanie Z-Ave i PDI dla Retinolu 50 C enkapsulowanego w półsyntetyczne oraz organiczne NLC.

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Z-Ave [nm] ± SD	PDI [j.u.] ± SD
Ret-NLC/Synt	po 24 h	4	170 ± 0,01	0,20 ± 0,02
		25	172 ± 0,01	0,16 ± 0,00
		40	174 ± 0,03	0,20 ± 0,01
	po miesiącu	4	169 ± 0,01	0,16 ± 0,02
		25	170 ± 0,02	0,17 ± 0,01
		40	171 ± 0,01	0,14 ± 0,02
Ret-NLC/Org	po 24 h	4	176 ± 0,02	0,20 ± 0,04
		25	175 ± 0,02	0,17 ± 0,01
		40	173 ± 0,03	0,16 ± 0,02
	po miesiącu	4	173 ± 0,02	0,18 ± 0,01
		25	175 ± 0,01	0,17 ± 0,01
		40	170 ± 0,01	0,15 ± 0,02

Na podstawie wyników zebranych w tabeli 66 zaobserwowano, że średnia wielkość cząstek dla półsyntetycznych, jak i organicznych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C po 24 h od dnia syntezy i przechowywania w temperaturze 4, 25 i 40 °C nie przekraczała 180 nm. Tym samym, można wnioskować, że odpowiednio dobrane składniki naturalne mogą stanowić równie stabilne i skuteczne podłoże do syntezy organicznych NLC, co ich półsyntetyczne zamienniki.

W przypadku półsyntetycznych NLC zauważono, że po 24 h Z-Ave mieściło się w podobnym zakresie od 170 ± 0,01 nm (4 °C) przy PDI równym 0,20 ± 0,02 j.u. do 174 ± 0,03 nm (40 °C) przy PDI wynoszącym 0,20 ± 0,01 j.u. Niewiele większe rozmiary odnotowano dla organicznych NLC, dla których średnia wielkość cząstek po 24 h wahała się w zakresie od 173 ± 0,03 (40 °C) przy PDI wynoszącym 0,16 ± 0,02 j.u. do 176 ± 0,02 nm (4 °C) przy PDI równym 0,20 ± 0,04 j.u. Natomiast, po miesiącu przechowywania wszystkich próbek NLC w różnych warunkach temperaturowych (4, 25 i 40 °C), po raz kolejny nie zaobserwowano zjawiska agregacji cząstek. We wszystkich przypadkach Z-Ave oraz PDI badanych nanocząstek utrzymywały się na stabilnym poziomie, co świadczyło o stabilności otrzymanych nanodyspersji i precyzyjnie dobranych parametrach do syntezy metodą HPH [220].

Na rysunku 76 przedstawiono wartości ZP (w wodzie Milli-Q[®] Plus o pH = 5,5 i przewodności 50 µS/cm oraz w wodnym roztworze surfaktantu), które otrzymano po 24 godzinach (A) oraz po miesiącu (B) od dnia syntezy nanocząstek.



Rysunek 76. Porównanie wartości ZP po 24 h (A) oraz po miesiącu (B) dla Retinolu 50 C enkapsulowanego w półsyntetyczne oraz organiczne NLC.

Zarówno po 24 h (rys. 76-A), jak i po miesiącu (rys. 76-B) przechowywania próbek w temperaturze 4, 25 i 40 °C zaobserwowano stabilność dla wszystkich otrzymanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C. We wszystkich próbkach wartość bezwzględna ZP ponownie przekroczyła $|\pm 30 \text{ mV}|$, co świadczyło o dobrej stabilności fizycznej. Ponownie lepsze rezultaty odnotowano dla ZP zmierzonego w wodnym roztworze surfaktantu (ang. *original dispersion medium*) niż w wodzie (pH = 5,5; przewodność 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$) – różnica wynosiła około $|\pm 10\text{-}15 \text{ mV}|$, w przypadku obu rodzajów NLC (półsyntetycznych

i organicznych). Przeprowadzone badania ponownie wykazały, że rozcieńczenie nanocząstek lipidowych w różnych ośrodkach dyspersyjnych mogło znacząco wpłynąć na stabilność badanej próbki [347], a dodatkowa obecność surfaktantu spowodowała znaczący wzrost uzyskanych wartości ZP [347, 349].

Na podstawie otrzymanych wyników zauważono, że dla próbki Ret–NLC zbudowanej z półsyntetycznych składników najwyższa stabilność zmierzona w wodzie, jak i w wodnym roztworze SPC była widoczna w najwyższej temperaturze (40 °C) po 24 h od dnia syntezy. Jednak po miesiącu przechowywania próbek w różnych temperaturach, najlepsze rezultaty dotyczące wartości ZP odnotowano dla NLC przechowywanych w temp. 25 °C. Najniższa, ale równie dobra stabilność dla tej samej próbki była widoczna w temp. 4 °C. Po miesięcznej analizie, we wszystkich analizowanych temperaturach odnotowano nieznaczny spadek wartości ZP (woda+SPC) w porównaniu do wartości uzyskanych dzień po syntezie NLC.

Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku wartości ZP otrzymanych dla próbki Ret–NLC zbudowanej ze składników organicznych. Najwyższą wartość bezwzględną ZP odnotowano w wodzie oraz w wodnym roztworze SPC dla próbki przechowywanej w temperaturze 25 i 40 °C, podczas gdy w temp. 4 °C wartości ZP były nieznacznie mniejsze.

Na podstawie przeprowadzonych badań udowodniono, że możliwa jest równie skuteczna synteza NLC oraz inkorporacja Retinolu 50 C przy wyborze wyłącznie organicznych składników. Dzięki starannie dobranym składnikom pochodzenia roślinnego, udało się dokonać syntezy równie stabilnych NLC w porównaniu do nanonośników, powszechnie otrzymywanych ze składników syntetycznych. Obecność w składzie nanocząstek lipidowych naturalnych składników zapewnia ich lepszą kompatybilność nie tylko dla skóry [350], ale całego organizmu, a także zmniejsza ryzyko powstawania ewentualnych działań niepożądanych [139, 351].

Podsumowując, przeprowadzone badania potwierdziły wysoką stabilność oleju z nasion Meadowfoam i zapewniły o jego funkcjonalności w syntezie NLC mogących znaleźć zastosowanie w szerokim zakresie preparatów kosmetycznych oraz farmaceutycznych [110]. Ponadto, Retinol 50 C został skutecznie enkapsulowany w NLC składających się zarówno ze składników półsyntetycznych, jak i organicznych. Ret–NLC na bazie składników naturalnych odznaczał się równie wysoką stabilnością, co półsyntetyczne nanocząstki lipidowe. W pełni naturalny skład NLC w pełni wpisuje się w powszechnie panujący trend „zielonej chemii” (ang. *green chemistry*) [352] i w dodatku wykazuje wyższą wartość dodaną [353].

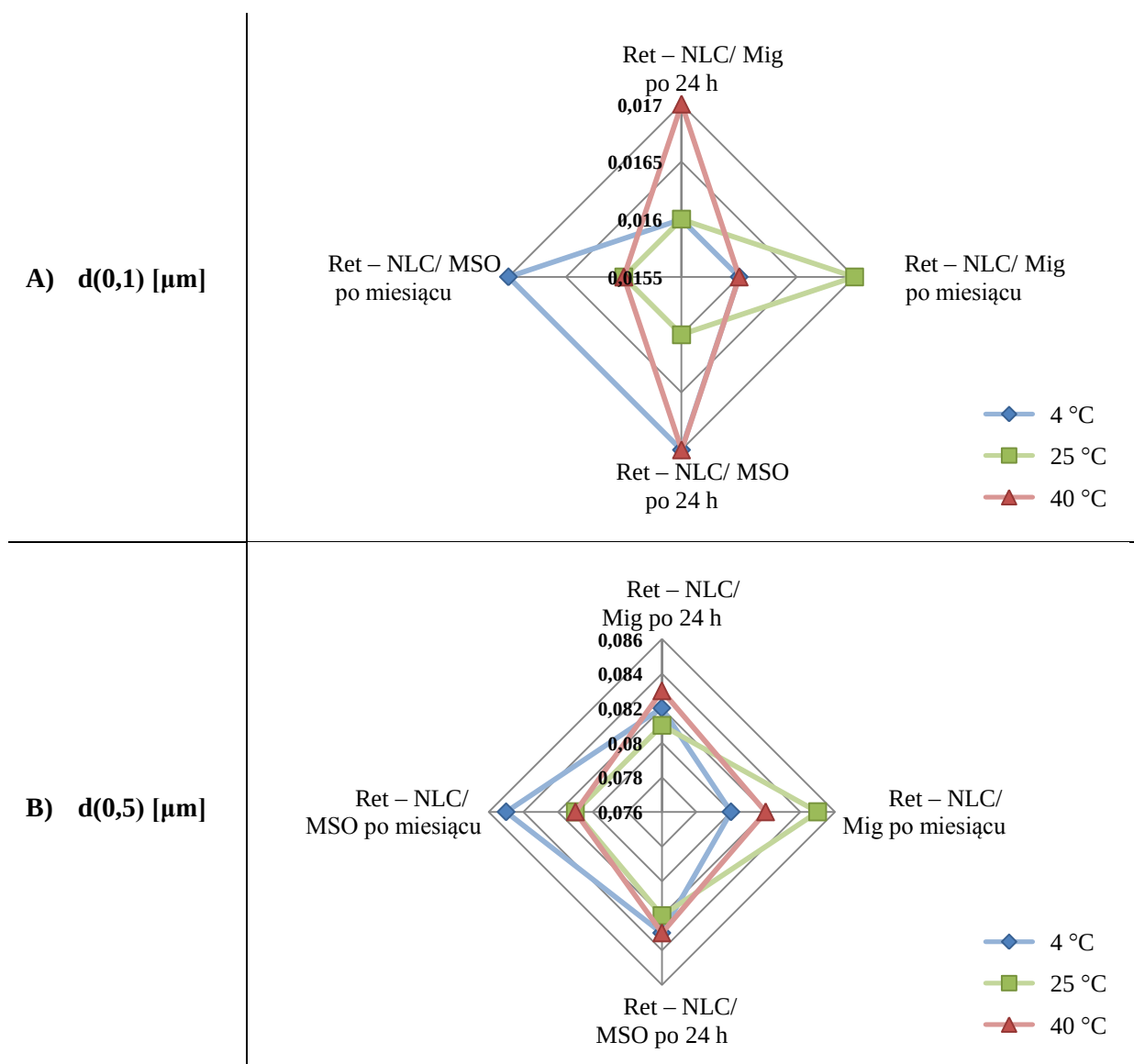
6.3. Porównanie rozkładu wielkości cząstek otrzymanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C techniką dyfrakcji laserowej

6.3.1. NLC inkorporowane Retinolem 50 C, zawierające półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid

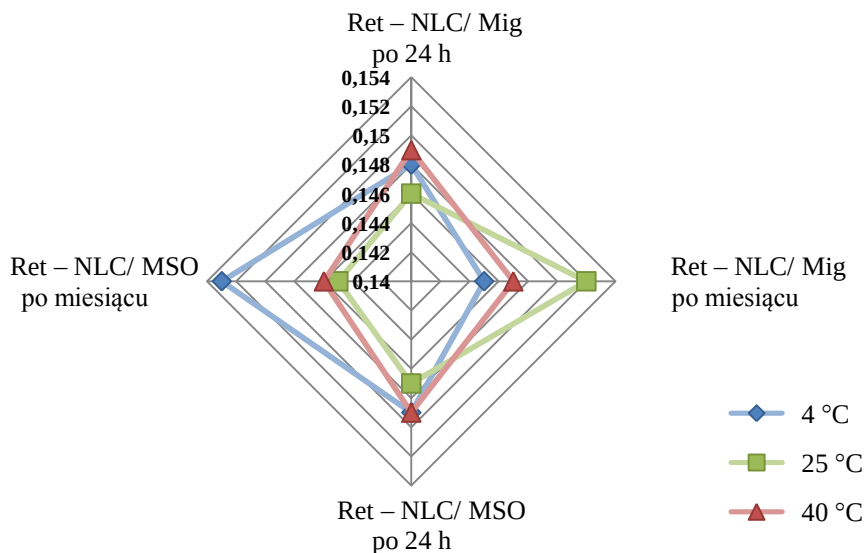
Na rysunku 77 przedstawiono zmiany rozkładu wielkości cząstek, które otrzymano po 24 godzinach oraz po miesiącu od dnia syntezy nanocząstek inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierających półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid. Analogiczne pomiary wykonywane były także po 3, 7 i 15 dniach. Z powodu braku istotnych różnic pomiędzy

uzyskanymi wynikami rozkładu wielkości cząstek otrzymanych NLC, pominięto ich analizę i interpretację w dalszym w toku dyskusji. Wszystkie próbki nanostrukturalnych nośników lipidowych przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

Porównanie rozkładu wielkości cząstek dla NLC inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierających półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid zestawiono w formie wykresów, na których odpowiednimi kolorami oznaczono wszystkie temperatury przechowywania próbek (4, 25 i 40 °C). Omówienie wyników dotyczyło zwłaszcza analizy zmian parametru $d(0,9)$, który uwzględniał wielkość średnicy cząstek, stanowiących aż 90% udziału objętościowego.



C) $d(0,9)$ [μm]



Rysunek 77. Porównanie rozkładu wielkości cząstek dla NLC inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierających półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid.

Zaobserwowano, że wartości parametru $d(0,9)$ dla NLC inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierających w składzie półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid były porównywalne po 24 h od dnia syntezy i mieściły się w zakresie od 0,146 do 0,149 μm (Ret-NLC/Mig) oraz 0,147 do 0,149 μm (Ret-NLC/MSO) we wszystkich badanych temperaturach (4, 25 i 40 °C) (rys. 77-C).

Po przechowywaniu wszystkich NLC przez 30 dni zauważono, że nieznaczne zmniejszenie średnicy cząstek nastąpiło w temp. 4 i 40 °C dla Ret-NLC/Mig i w rezultacie wartość $d(0,9)$ była równa odpowiednio 0,145 i 0,147 μm . W temperaturze pokojowej średnica cząstek osiągnęła wartość minimalnie wyższą od wartości początkowej (różnica wyniosła 0,06 μm), co w dodatku korelowało ze wzrostem wartości Z-Ave (zob. tab. 65). Z kolei dla Ret-NLC/MSO zmniejszenie średnicy cząstek było widoczne po miesiącu przechowywania próbek w temp. 25 i 40 °C (odpowiednio do 0,145 i 0,146 μm), natomiast w najniższej temperaturze nastąpił przyrost średnicy o zaledwie 0,04 μm , co również było zgodne z uzyskanym wcześniej pomiarem średniej wielkości cząstek.

Warto zaznaczyć, że po miesiącu przechowywania w różnych warunkach temperaturowych (4, 25 i 40 °C), 90% udziału objętościowego cząstek dla próbki Ret-NLC/Mig posiadało średnicę $\leq 0,152$ μm , natomiast w przypadku próbki Ret-NLC/MSO parametr $d(0,9)$ wynosił $\leq 0,153$ μm . Wyniki te potwierdziły niewielkie różnice w rozkładzie wielkości cząstek pomiędzy dwoma różnymi składami NLC, podobnie jak w przypadku wcześniej zmierzonych parametrów (Z-Ave, PDI, ZP). Ponadto stwierdzono, że wszystkie wartości $d(0,9)$ utrzymywały się na porównywalnym poziomie zwłaszcza w temperaturze 40 °C, co świadczyło o braku procesów niestabilności w badanych nanodyspersjach. Z kolei przechowywanie próbek w niższych temperaturach 4 i 25 °C wpłynęło na wartości parametru $d(0,9)$ badanych NLC w podobnym stopniu. Tym samym, w przypadku próbki Ret-NLC/Mig w temp. 4 °C wartość analizowanego parametru zmniejszyła się w porównaniu do wartości początkowej, a w temp. 25 °C nastąpił nieznaczny przyrost. Natomiast dla próbki Ret-NLC/MSO zauważono sytuację odwrotną – w temp. 4 °C wartość analizowanego parametru

zwiększyła się w porównaniu do wartości początkowej, podczas gdy w temp. 25 °C nastąpiło zmniejszenie rozkładu wielkości cząstek.

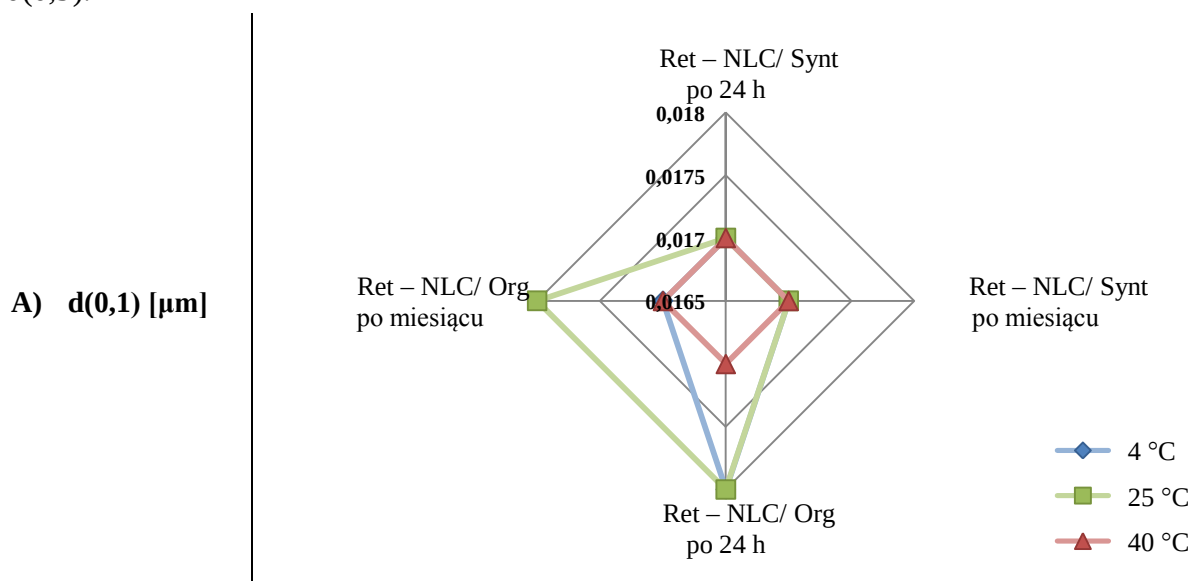
Podsumowując, korzystny wpływ na wartość parametru $d(0,9)$ badanych NLC zawierających Miglyol lub też MSO był widoczny w przypadku poddaniu próbek działaniu podwyższonej temperatury (40 °C), a wartość $d(0,9)$ dla przechowywanych w takich warunkach temperaturowych próbek NLC wskazywała na podobne zmiany wartości w ciągu całego okresu badań. Ponadto nie zaobserwowano istotnych zmian wartości zarówno w przypadku $d(0,5)$, jak i $d(0,1)$, również zmierzonych dla wszystkich NLC przechowywanych w 4, 25 i 40 °C (rys. 77-A i B).

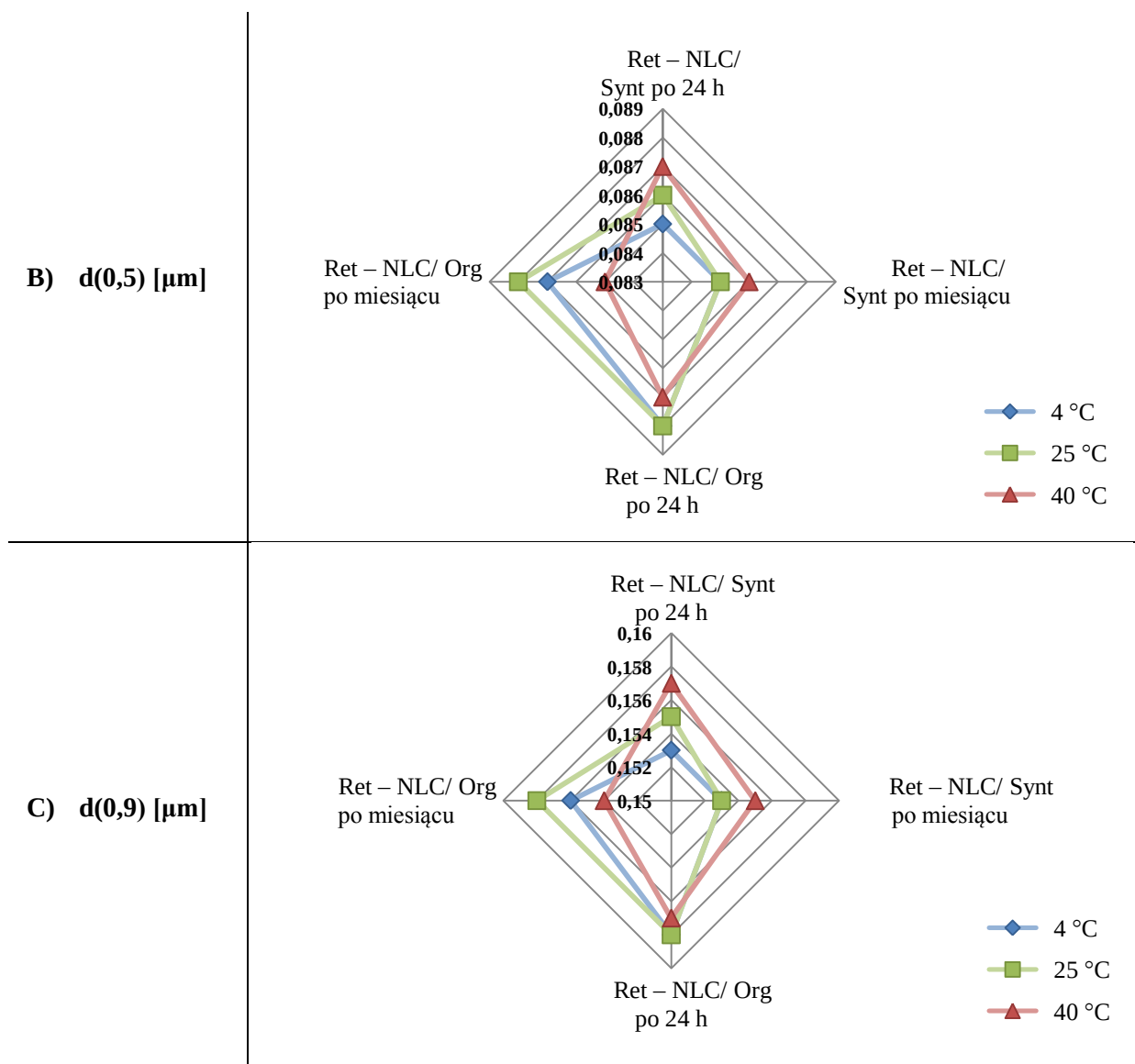
Na podstawie dokonanej analizy wyników rozkładu wielkości cząstek dla badanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C oraz zawierających w składzie półsyntetyczny i naturalny ciekły lipid wywnioskowano, że oba rodzaje NLC odznaczają się wysoką stabilnością, ponieważ żadna z próbek nie wykazywała tendencji do aglomeracji cząstek w ciągu 30 dni analizy. Zauważono także wysoką odporność termiczną badanych NLC, potwierdzoną uzyskanymi wartościami parametru $d(0,9)$ po miesiącu przechowywania w temperaturze 40 °C.

6.3.2. Półsyntetyczne i organiczne NLC inkorporowane Retinolem 50 C

Na rysunku 78 przedstawiono analizę rozkładu wielkości cząstek, które otrzymano po 24 godzinach oraz po miesiącu od dnia enkapsulacji Retinolu 50 C w półsyntetyczne oraz organiczne NLC. Analogiczne pomiary wykonywane były również po 3, 7 i 15 dniach, jednak ponownie z powodu braku istotnych różnic pomiędzy uzyskanymi wynikami rozkładu wielkości cząstek otrzymanych NLC, pominięto ich analizę i interpretację w dalszym w toku dyskusji. Wszystkie próbki nanostrukturalnych nośników lipidowych przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

Porównanie rozkładu wielkości cząstek dla NLC inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierających w swej budowie wyłącznie półsyntetyczne lub organiczne składniki także zestawiono w formie graficznej, która uwzględniała wszystkie temperatury przechowywania próbek (4, 25 i 40 °C). Omówienie wyników dotyczyło głównie analizy zmian parametru $d(0,9)$.





Rysunek 78. Porównanie rozkładu wielkości cząstek dla Retinolu 50 C enkapsulowanego w półsyntetyczne lub organiczne NLC.

Zaobserwowano, że wartości parametru $d(0,9)$ dla NLC inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierających w swej budowie wyłącznie półsyntetyczne lub organiczne składniki utrzymywały się na podobnym poziomie po 24 h od dnia syntezy i mieściły się w zakresie od 0,153 do 0,157 μm (półsyntetyczne) oraz 0,157 do 0,158 μm (organiczne) we wszystkich badanych temperaturach (4, 25 i 40 °C) (rys. 78-C).

Po przechowywaniu wszystkich NLC przez 30 dni zauważono, że w przypadku półsyntetycznych NLC pozostawionych w temp. 25 i 40 °C nastąpiło niewielkie zmniejszenie średnicy cząstek (w obu przypadkach różnica wynosiła zaledwie 0,002 μm), natomiast w temp. 4 °C nie odnotowano żadnych zmian – średnica cząstek wciąż wynosiła 0,153 μm . W dodatku, wyniki otrzymane podczas analizy Z-Ave (zob. tab. 67) wykazały najmniejsze różnice właśnie dla próbki pozostawionej w temp. 4 °C, w której po 30 dniach nastąpiło zmniejszenie wielkości cząstek o zaledwie 1 nm.

Z kolei dla organicznych NLC zmniejszenie średnicy cząstek było widoczne po miesiącu przechowywania próbek w temp. 4 i 40 °C (odpowiednio do 0,156 i 0,154 μm), podczas gdy w temperaturze pokojowej średnica cząstek utrzymywała się na stałym poziomie

i wynosiła 0,158 μm , co korelowało w wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem spektroskopii korelacji fotonów.

Ponadto odnotowano, że po miesiącu przechowywania zarówno półsyntetycznych, jak i organicznych NLC w różnych temperaturach (4, 25 i 40 °C), 90% udziału objętościowego cząstek posiadało średnicę $\leq 0,158 \mu\text{m}$. Otrzymane rezultaty wykazały jedynie niewielkie różnice w rozkładzie wielkości cząstek pomiędzy NLC, zbudowanych ze składników różnego pochodzenia (półsyntetycznego/roślinnego). Co więcej, uzyskane wyniki były zgodne z rezultatami otrzymanymi dla Z-Ave, PDI, ZP. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach dotyczących enkapsulacji Retinolu 50 C do NLC różniących się jedynie pochodzeniem ciekłego lipidu (półsyntetycznym lub organicznym) zaobserwowano, że wszystkie wartości $d(0,9)$ utrzymywały się w niektórych warunkach na niezmiennym poziomie w ciągu miesiąca badań. Dla półsyntetycznych NLC najkorzystniejsza okazała się temperatura 4 °C, natomiast w przypadku organicznych NLC – temperatura pokojowa (25 °C). Biorąc pod uwagę również zbliżone do siebie wyniki Z-Ave uzyskane po 30 dniach badań (tab. 66) stwierdzono, że badane nanodyspersje charakteryzują się dobrą stabilnością. Przechowywanie próbek w najwyższej badanej temperaturze 40 °C nieznacznie zmniejszyło wartości parametru $d(0,9)$ w obu rodzajach badanych NLC – minimalnie większe różnice zauważono dla organicznych NLC.

Podsumowując, korzystny wpływ na wartość parametru $d(0,9)$ badanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C i zbudowanych wyłącznie z półsyntetycznych lub organicznych składników był widoczny w przypadku pozostawienia próbek półsyntetycznych w obniżonej temperaturze (4 °C), natomiast próbek organicznych w temperaturze pokojowej (25 °C). W dodatku ponownie nie zaobserwowano większych zmian wartości w przypadku parametrów $d(0,5)$ oraz $d(0,1)$, także zmierzonych dla wszystkich NLC przechowywanych w 4, 25 i 40 °C (zob. rys. 78-A i B).

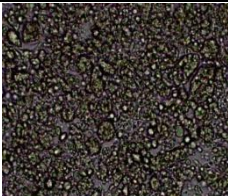
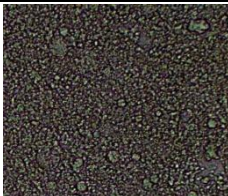
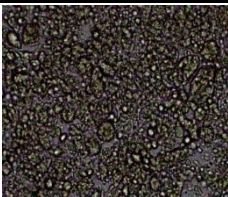
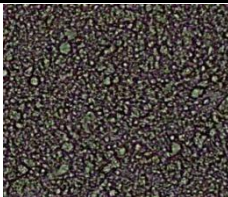
Na podstawie dokonanej analizy wyników rozkładu wielkości cząstek dla badanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C oraz całkowicie zbudowanych z półsyntetycznych lub też z organicznych składników wywnioskowano, że oba rodzaje NLC odznaczają się wysoką stabilnością, a w żadnej z próbek przez okres 30 dni nie zauważono znaczących zmian, wskazujących na rozpoczęcie procesów niestabilności. Warto zaznaczyć, że otrzymane NLC posiadały dużą odporność termiczną (w temperaturze 40 °C), potwierdzoną uzyskanymi wartościami parametru $d(0,9)$, z przewagą NLC zawierających w pełni półsyntetyczne składniki.

6.4. Zdjęcia matrycy lipidowej NLC inkorporowanych Retinolem 50 C wykonane za pomocą mikroskopu stereoskopowego

6.4.1. NLC inkorporowane Retinolem 50 C, zawierające półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid

W tabeli 67 przedstawiono obrazy matrycy lipidowej uzyskane za pomocą mikroskopu stereoskopowego (Leitz Orthoplan, Niemcy) po miesiącu badań nanocząstek inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierających półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid. Wszystkie próbki NLC przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

Tabela 67. Porównanie obrazu mikroskopowego matrycy lipidowej NLC inkorporowanych Retinolem 50 C, zawierających półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid przy 40-krotnym powiększeniu.

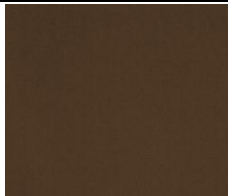
Nazwa próbki	Temp.	4 °C	25 °C	40 °C
	Termin pomiaru			
Ret–NLC/Mig	po miesiącu			
Ret–NLC/MSO				

Organiczny preparat NLC zawierający naturalny olej roślinny (MSO) został pomyślnie opracowany z podobną stabilnością fizyczną i chemiczną jak jego półsyntetyczny zamiennik. Przeprowadzone badania potwierdziły również wysoką stabilność oleju z nasion Meadowfoam i zapewniają jego funkcjonalność w szerokim zakresie preparatów kosmetycznych i farmaceutycznych.

6.4.2. Półsyntetyczne i organiczne NLC inkorporowane Retinolem 50 C

W tabeli 68 przedstawiono obrazy matrycy lipidowej uzyskane za pomocą mikroskopu stereoskopowego (Leitz Orthoplan, Niemcy) po miesiącu badań Retinolu 50 C enkapsulowanego w półsyntetyczne oraz organiczne NLC. Wszystkie próbki NLC przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

Tabela 68. Porównanie obrazu mikroskopowego matrycy lipidowej NLC półsyntetycznych i organicznych inkorporowanych Retinolem 50 C przy 40-krotnym powiększeniu.

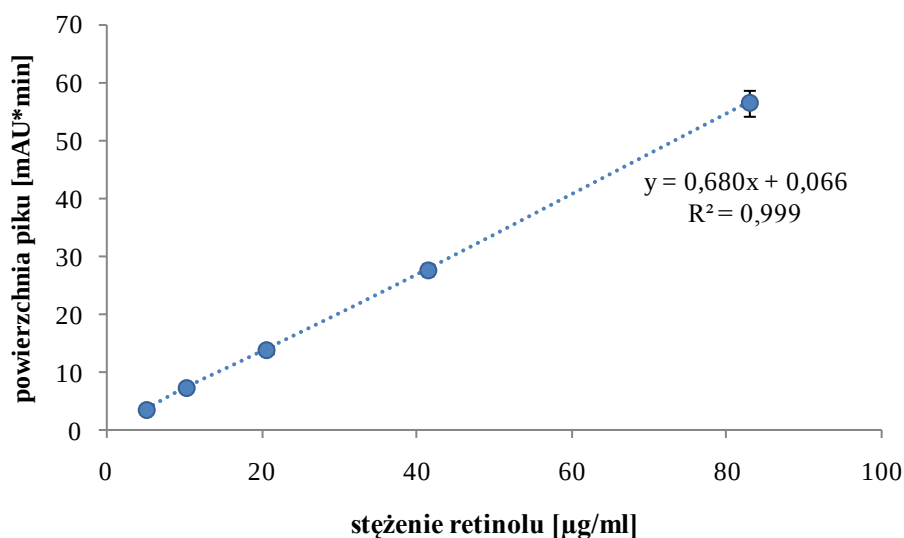
Nazwa próbki	Temp.	4 °C	25 °C	40 °C
	Termin pomiaru			
Ret–NLC/Synt	po miesiącu			
Ret–NLC/Org				

Organiczny preparat NLC zbudowany ze składników pochodzenia roślinnego został pomyślnie opracowany z podobną stabilnością fizyczną i chemiczną jak jego półsyntetyczny odpowiednik. Przeprowadzone badania potwierdziły dobrą stabilność we wszystkich badanych temperaturach (4, 25 i 40 °C) dla organicznego NLC inkorporowanego Retinolem 50 C, stanowiąc tym samym doskonały potencjał do rozwoju organicznych nanonośników substancji aktywnych, charakteryzujących się wysoką biodegradowalnością [160].

6.5. Ocena stabilności chemicznej Retinolu 50 C enkapsulowanego w NLC

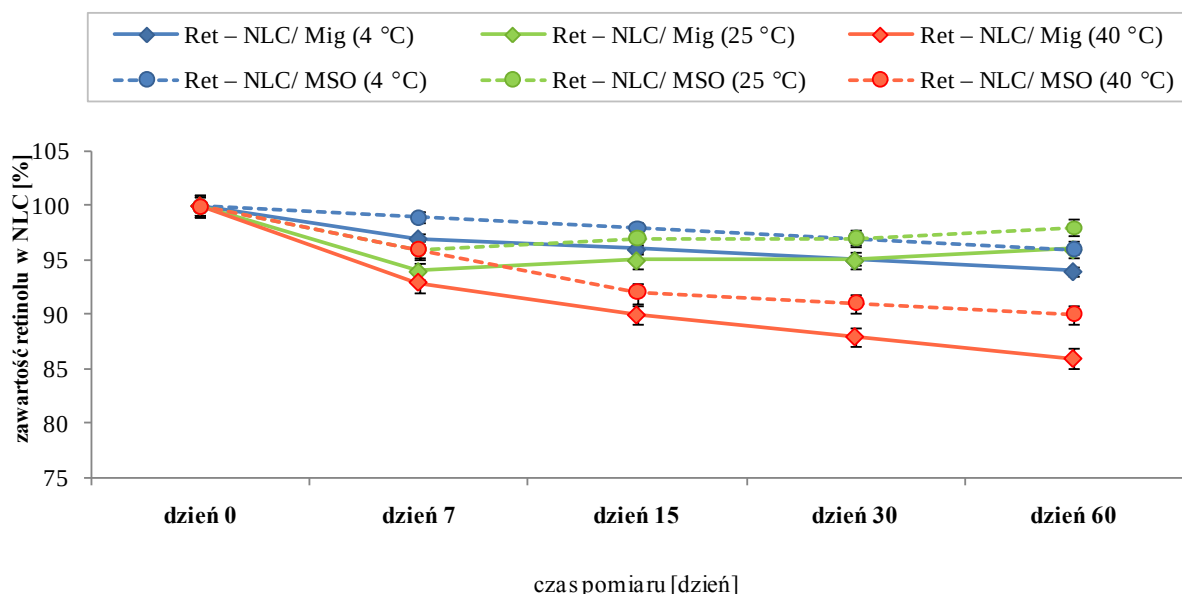
6.5.1. NLC inkorporowane Retinolem 50 C, zawierające półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid

Chemiczną stabilność Retinolu 50 C enkapsulowanego w NLC, zawierających półsyntetyczny (Ret–NLC/Mig) oraz naturalny ciekły lipid (Ret–NLC/MSO) oceniano za pomocą analizy HPLC. W celu umożliwienia kwantyfikacji wyników, wyrażonych jako procent Retinolu 50 C skutecznie inkorporowanego do matrycy lipidowej (ang. *entrapped*) nanocząstek, wykonano krzywą kalibracyjną, którą przedstawiono na rysunku 79.



Rysunek 79. Krzywa kalibracyjna Retinolu 50 C.

Następnie badano stężenie Retinolu 50 C w każdej z analizowanych próbek, które mierzono bezpośrednio po otrzymaniu NLC, jak również po 7, 15, 30 oraz 60 dniach od momentu syntezy nanocząstek. Procent składnika aktywnego (% Ret), pozostałego w próbkach NLC inkorporowanych Retinolem 50 C w trakcie całego okresu badań pokazano na rysunku 80.



Rysunek 80. Stabilność chemiczna Retinolu 50 C enkapsulowanego w NLC (zawierających półsyntetyczny/organiczny ciekły lipid) w ciągu dwóch miesięcy przechowywania próbek w trzech różnych temperaturach.

Na podstawie wyników analizy HPLC zauważono, że w obu rodzajach NLC (Ret–NLC/Mig oraz Ret–NLC/MSO) Retinol 50 C był najmniej stabilny w próbkach przechowywanych w temp. 40 °C, natomiast największą stabilnością odznaczały się próbki w temp. 25 °C. Równie dobra stabilność była widoczna dla próbek przechowywanych w temp. 4 °C.

Jednak procent wagowy Retinolu 50 C „pozostawionego” w NLC po dwóch miesiącach badań w temp. 40 °C i wynoszący odpowiednio 86% wag. (Ret–NLC/Mig) i 90% wag. (Ret–NLC/MSO) początkowego stężenia wskazywał na dobrą stabilność oraz działanie ochronne matrycy lipidowej NLC [354]. Z kolei, dla próbek w temperaturze w temp. 4 °C zawartość Retinolu 50 C w 60 dniu badań wynosiła 94% wag. (Ret–NLC/Mig) i 96% wag. (Ret–NLC/MSO), podczas gdy w przypadku NLC przechowywanych w temp. 25 °C zostało „utraconych” jedynie 4% wag. Retinolu 50 C z NLC/Mig oraz 2% wag. Retinolu 50 C z NLC/MSO.

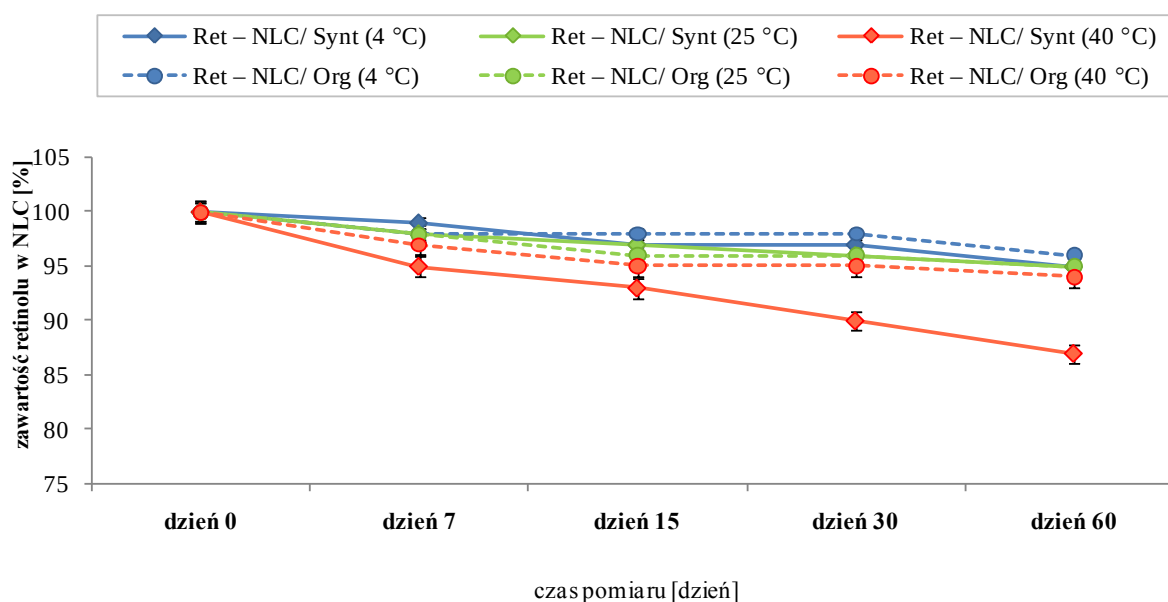
W dodatku zaobserwowano, że matryca lipidowa zbudowana m.in. z naturalnego lipidu MSO odznaczała się większą odpornością na działanie wszystkich badanych temperatur, co mogło wynikać z wysokiej stabilności termicznej oleju Meadowfoam [13, 89].

6.5.2. Półsyntetyczne i organiczne NLC inkorporowane Retinolem 50 C

Stabilność chemiczną Retinolu 50 C enkapsulowanego w NLC zbudowanych wyłącznie z półsyntetycznych (Ret–NLC/Synt) lub też z wyłącznie organicznych (Ret–NLC/Org) składników oceniano z wykorzystaniem techniki HPLC. W celu umożliwienia kwantyfikacji wyników ponownie użyto krzywą kalibracyjną, przedstawioną na rysunku 79.

Stężenie Retinolu 50 C w każdej z próbek odnotowano bezpośrednio po otrzymaniu NLC, jak również po 7, 15, 30 oraz 60 dniach od momentu syntezy nanocząstek. Procent

pozostalej ilości Retinolu 50 C (% Ret) w próbkach NLC w trakcie całego okresu badań przedstawiono na rysunku 81.



Rysunek 81. Stabilność chemiczna Retinolu 50 C enkapsulowanego w NLC (zbudowane z wyłącznie półsyntetycznych lub organicznych składników), w ciągu dwóch miesięcy przechowywania próbek w trzech różnych temperaturach.

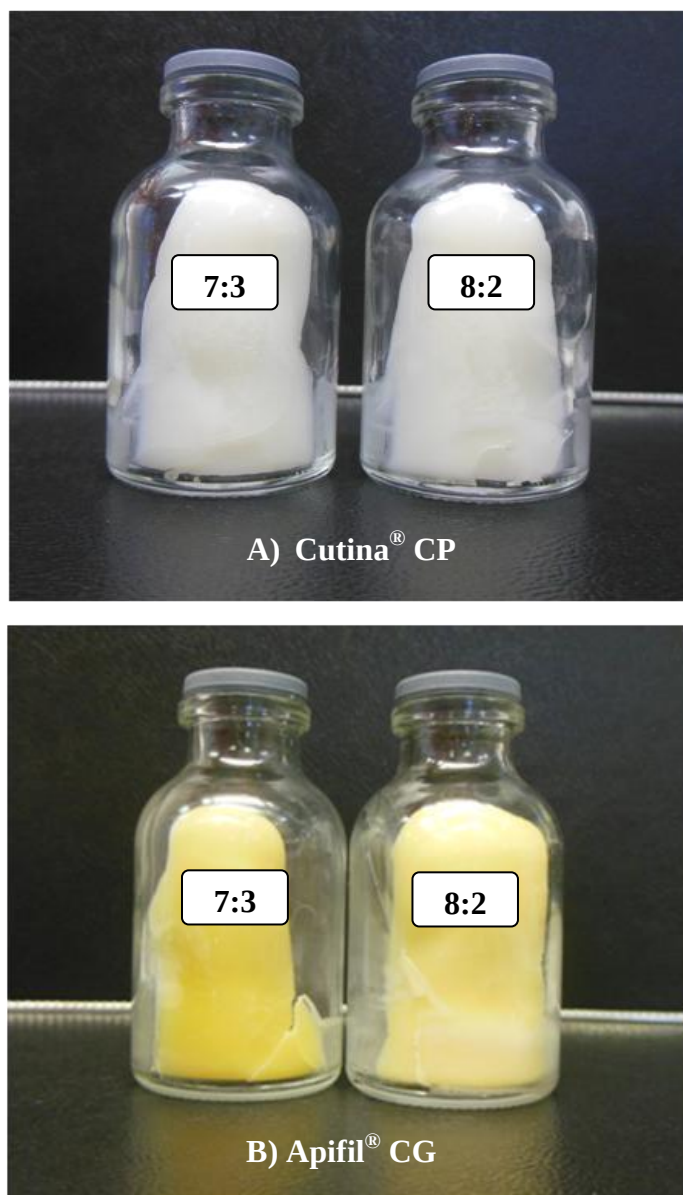
Na podstawie otrzymanych wyników za pomocą HPLC zaobserwowano, że w obu przypadkach NLC (Ret-NLC/Synt oraz Ret-NLC/Org) Retinol 50 C był ponownie najmniej stabilny w próbkach przechowywanych w najwyższej z badanych temperatur (40 °C), podczas gdy największą stabilnością odznaczały się próbki przechowywane w najniższej temperaturze (4 °C). Dobrą stabilnością odznaczały się również próbki NLC przechowywane w temperaturze pokojowej (25 °C).

Po dwóch miesiącach badań odnotowano, że w przypadku półsyntetycznych NLC przechowywanych w temp. 40 °C zostało „utraconych” 13% wag. początkowej zawartości Retinolu 50 C, natomiast w przypadku organicznych NLC „utracono” w rezultacie tylko 6% wag. substancji czynnej. Tym samym dowiedziono, że w pełni organiczna matryca lipidowa NLC może stanowić jeszcze bardziej skuteczną ochronę dla enkapsulowanej substancji aktywnej – tj. Retinolu 50 C, w porównaniu do swojego półsyntetycznego odpowiednika. Dowód na to mogą stanowić także wyniki otrzymane dla próbek przechowywanych w temp. 25 °C, w których zawartość Retinolu 50 C po dwóch miesiącach badań wynosiła w obu przypadkach (Ret-NLC/Synt; Ret-NLC/Org) 95% wag. stężenia początkowego. Tymczasem, w temperaturze w temp. 4 °C zawartość Retinolu 50 C w 60 dniu badań wynosiła 95% wag. (Ret-NLC/Synt) i 96% wag. (Ret-NLC/Org).

6.6. Dobór odpowiedniego lipidu dla koenzymu Q₁₀

Po przeprowadzeniu selekcji lipidów z wykorzystaniem różnych lipidów stałych (zob. tab. 14) mieszanych w różnych stosunkach z koenzymem Q₁₀, dokonano wyboru najbardziej kompatybilnych lipidów do syntezy NLC. Po dokonaniu obserwacji rozpuszczalności CoQ₁₀ w określonych odstępach czasu (15 min, 30 min, 1 h, 24 h, 72 h) zaobserwowano, że we wszystkich badanych stosunkach (8:2 oraz 7:3) najlepsze końcowe rezultaty otrzymano dla palmitynianu cetylu (Cutina[®] CP; Cethyl Palmitate) oraz dla wosku pszczelego (Apifil[®] CG) w połączeniu z CoQ₁₀ w stosunku 8:2.

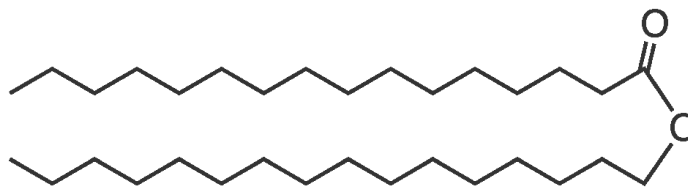
Na rysunku 82 pokazano dwa najbardziej kompatybilne zestalone lipidy (półsyntetyczny oraz organiczny) w połączeniu z CoQ₁₀ w dwóch badanych stosunkach (8:2 / 7:3) po upływie 72 h.



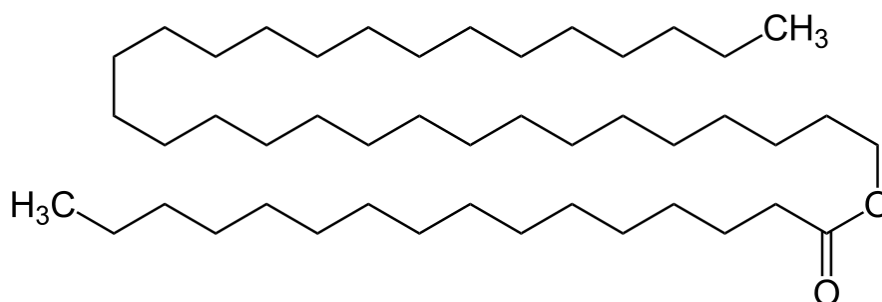
Rysunek 82. Cutina[®] CP (A) oraz Apifil[®] CG (B) w połączeniu z CoQ₁₀ w obu badanych stosunkach.

Zarówno zestalony palmitynian cetylu (Cutina[®] CP), jak i wosk pszczeli (Apifil[®] CG) utworzyły mieszaniny jednorodne z CoQ₁₀ w obu badanych stosunkach, co świadczyło o ich dobrym powinowactwie z badaną substancją aktywną. Efekt ten był widoczny od momentu stopienia obu lipidów do ich całkowitego zestalenia po 72 h. Na podstawie obserwacji wzrokowej stwierdzono, że „lepsze dopasowanie” obu substancji nastąpiło w stosunku 8:2 (bielsza barwa bądź mniej intensywne żółte zabarwienie lipidów).

Koenzym Q₁₀ jest wrażliwy na światło i wysoką temperaturę (temperatura topnienia = 48 – 52 °C), dlatego też wysoki stopień dopasowania tego związku do zarówno długołańcuchowego palmitynianu cetylu, jak i do wosku pszczelego można tłumaczyć również stosunkowo niskimi temperaturami topnienia (porówn. tab. 14). Wzory strukturalne obu długołańcuchowych lipidów przedstawiono na rysunkach 83 i 84.



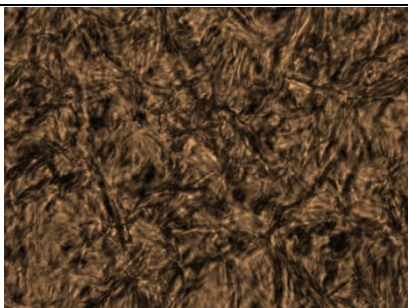
Rysunek 83. Wzór strukturalny palmitynianu cetylu.



Rysunek 84. Wzór strukturalny estru mirycylowego kwasu palmitynowego - składnika wosku pszczelego.

Najlepszą zgodność połączonych składników w stosunku 8:2 potwierdzono również za pomocą mikroskopu stereoskopowego (Leitz Orthoplan, Niemcy) w powiększeniu 40-krotnym (tab. 69), co uwzględniono w późniejszej preparatyce CoQ₁₀-NLC.

Tabela 69. Obraz mikroskopowy najbardziej kompatybilnych lipidów z koenzymem Q₁₀, zmieszanych w stosunku 8:2 (przy 40-krotnym powiększeniu).

Nazwa lipidu	Cutina [®] CP	Apifil [®] CG
Stosunek lipid-CoQ ₁₀		
8:2		

6.7. Porównanie Z-Ave, PDI oraz ZP otrzymanych NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀

W tabeli 70 przedstawiono wyniki dla Z-Ave i PDI dla koenzymu Q₁₀ enkapsulowanego do półsyntetycznych (CoQ₁₀-NLC/Synt) oraz organicznych (CoQ₁₀-NLC/Org) nanostrukturalnych nośników lipidowych, które otrzymano po 24 godzinach oraz po miesiącu od dnia syntezy. Identyczne pomiary wykonywano także po 3, 7 i 15 dniach, jednak pominięto ich analizę i interpretację w dalszym toku dyskusji z powodu braku istotnych różnic pomiędzy uzyskanymi wynikami średniej wielkości, współczynnika polidispersyjności oraz potencjału zeta w porównaniu do prezentowanych wyników NLC. Wszystkie próbki NLC ponownie przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

Tabela 70. Porównanie Z-Ave i PDI dla koenzymu Q₁₀ enkapsulowanego w półsyntetyczne oraz organiczne NLC.

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Z-Ave [nm] ± SD	PDI [j.u.] ± SD
CoQ ₁₀ -NLC/Synt	po 24 h	4	204 ± 0,01	0,10 ± 0,02
		25	213 ± 0,04	0,13 ± 0,01
		40	224 ± 0,05	0,20 ± 0,05
	po miesiącu	4	208 ± 0,02	0,15 ± 0,03
		25	225 ± 0,12	0,17 ± 0,13
		40	238 ± 0,19	0,28 ± 0,18
CoQ ₁₀ -NLC/Org	po 24 h	4	220 ± 0,00	0,16 ± 0,05
		25	222 ± 0,01	0,19 ± 0,03
		40	240 ± 0,11	0,24 ± 0,12
	po miesiącu	4	222 ± 0,05	0,19 ± 0,12
		25	230 ± 0,01	0,20 ± 0,02
		40	250 ± 0,02	0,25 ± 0,10

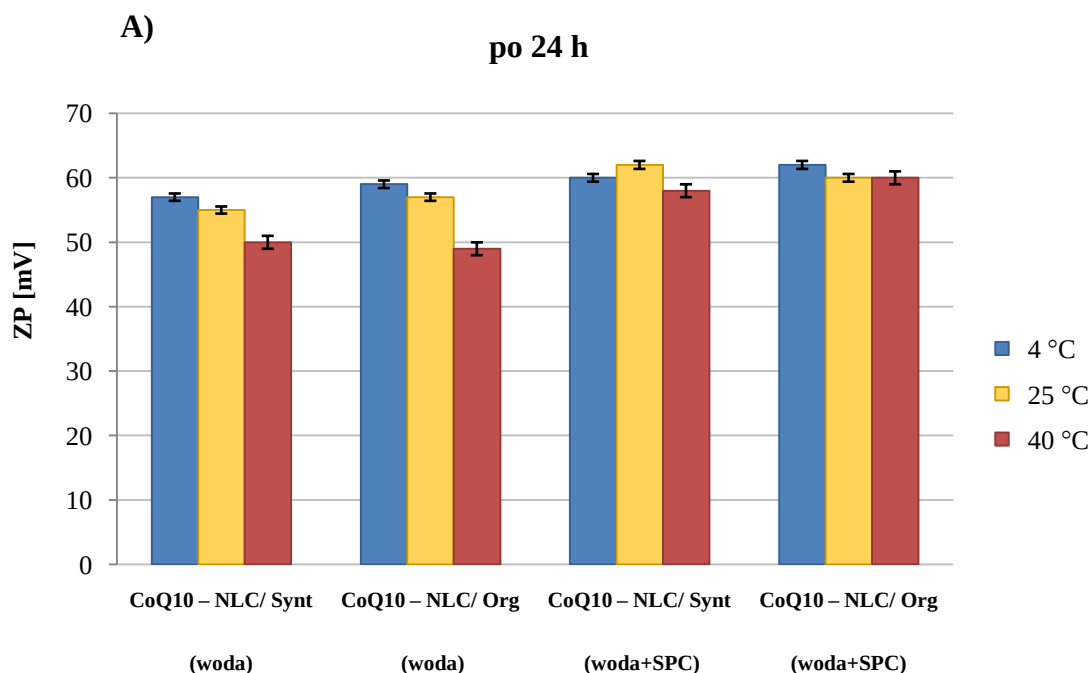
Na podstawie wyników zebranych w tabeli 70 zaobserwowano, że średnia wielkość cząstek dla półsyntetycznych NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀ po 24 h od dnia syntezy i przechowywania w temperaturze 4, 25 i 40 °C mieściła się w granicach od 204 ± 0,01 nm przy PDI wynoszącym 0,10 ± 0,02 j.u. (4 °C) do 224 ± 0,05 nm, przy PDI równym 0,20 ± 0,05 j.u. (40 °C). Z kolei po 30 dniach przechowywania próbek w tych samych warunkach temperaturowych odnotowano nieznacznie większe wartości w każdej analizowanej temperaturze. W rezultacie średnia wielkość cząstek dla półsyntetycznych NLC mieściła się w zakresie od 208 ± 0,02 nm przy PDI równym 0,15 ± 0,03 j.u. (4 °C) do 238 ± 0,19 nm przy PDI wynoszącym 0,28 ± 0,18 j.u. (40 °C). Zarówno po 24 h, jak i po miesiącu analiz dla półsyntetycznych NLC przechowywanych w temp. 25 °C, otrzymane wyniki wykazywały wartości pośrednie, a przyrost wielkości po 30 dniach wynosił około 11 nm.

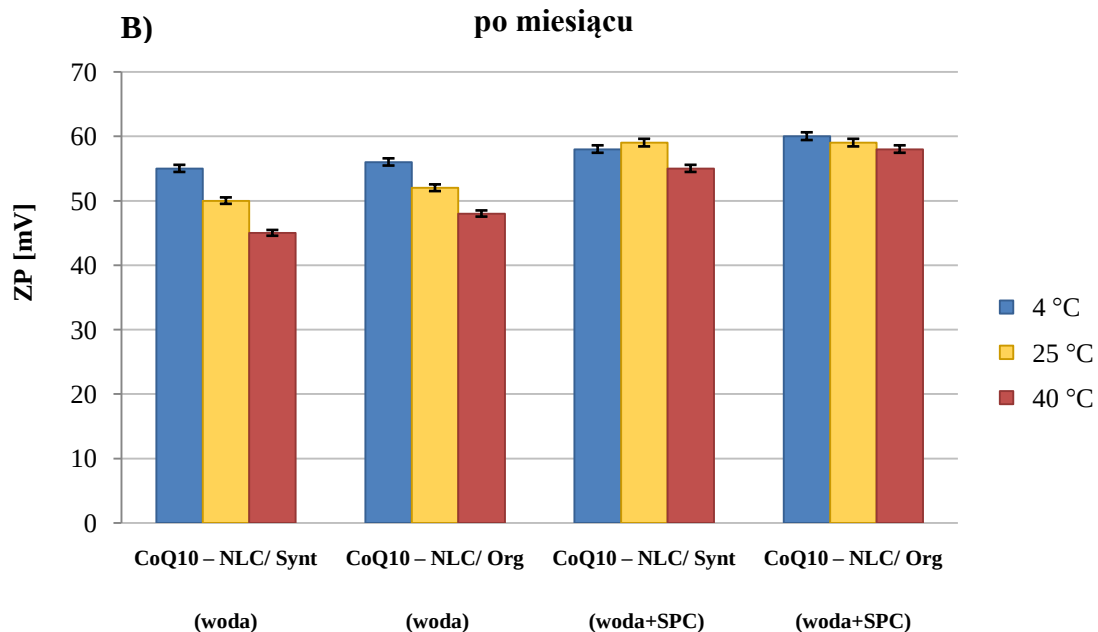
W przypadku CoQ₁₀ enkapsulowanego w organiczne NLC średnia wielkość cząstek po 24 h i przechowywania w temperaturze 4, 25 i 40 °C mieściła się w granicach od 220 ± 0,00 nm przy PDI wynoszącym 0,16 ± 0,05 j.u. (4 °C) do 240 ± 0,11 nm, przy PDI równym 0,24 ± 0,12 j.u. (40 °C). Po miesiącu przechowywania próbek w tych samych warunkach

temperaturowych ponownie odnotowano wzrost wartości Z-Ave dla każdej z analizowanych próbek CoQ₁₀-NLC/Org. Najmniejsze różnice w przyroście wielkości cząstek były widoczne dla organicznych CoQ₁₀-NLC w temp. 4 °C, których średnia wielkość cząstek mieściła się w zakresie od $222 \pm 0,05$ nm przy PDI równym $0,19 \pm 0,12$ j.u. Dla próbek przechowywanych w temp. 25 °C zaobserwowano większe rozmiary o 8 nm, natomiast w 40 °C rozmiar cząstek zwiększył się o 10 nm.

Wszystkie otrzymane wyniki wskazywały na stopniowo pojawiającą się agregację cząstek, najbardziej widoczną w przypadku próbek pozostawionych w temp. 40 °C. Z uwagi na dużą wrażliwość na działanie wysokich temperatur, a także dużą masę molową koenzymu Q₁₀ (863,34 g/mol), skuteczna enkapsulacja tego związku wciąż stanowi obiekt zainteresowań wielu naukowców. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej dotyczące półsyntetycznych CoQ₁₀-NLC były podobne do wyników opublikowanych przez grupę badawczą prof. Müllera (2007) [355]. Wśród otrzymanych wyników niniejszej dysertacji warto zwrócić uwagę na fakt, że przyrost wielkości cząstek we wszystkich temperaturach (4, 25 i 40 °C) był nieznacznie mniejszy w organicznych NLC, a tym samym zjawisko aglomeracji zachodziło wolniej.

Z kolei na rysunku 85 przedstawiono wartości ZP (w wodzie Milli-Q[®] Plus o pH = 5,5 i przewodności 50 µS/cm oraz w wodnym roztworze surfaktantu), które otrzymano po 24 godzinach (A) oraz po miesiącu (B) od dnia syntezy nanocząstek.





Rysunek 85. Porównanie wartości ZP po 24 h (A) oraz po miesiącu (B) dla koenzymu Q₁₀ enkapsulowanego w półsyntetyczne oraz organiczne NLC.

Zarówno po 24 h (rys. 85-A), jak i po miesiącu (rys. 85-B) przechowywania próbek w temperaturze 4, 25 i 40 °C zaobserwowano, że wartość bezwzględna ZP znacząco przekroczyła ± 30 mV, co świadczyło o bardzo dobrej stabilności fizycznej dla wszystkich otrzymanych NLC inkorporowanych CoQ₁₀. Wysokie wartości ZP były porównywalne dla wszystkich próbek zmierzonych zarówno w wodnym roztworze surfaktantu (ang. *original dispersion medium*), jak i w wodzie (pH = 5,5; przewodność 50 μ S/cm). Niemniej jednak w zależności od rodzaju ośrodka dyspersyjnego, zauważono niewielkie różnice wartości ZP dla próbek przechowywanych jedynie w temp. 40 °C. Okazało się, że obecność SPC wpłynęła na stabilność analizowanych NLC. Natomiast w przypadku próbek przechowywanych w temp. 4 i 25 °C różnice mieściły się w zakresie ± 3 –10 mV dla półsyntetycznych i organicznych CoQ₁₀–NLC, a przeprowadzone badania dowiodły, że dodatkowa obecność surfaktantu nie wpłynęła znacząco na stabilność badanych próbek.

Na podstawie otrzymanych wyników zauważono, że dla próbki CoQ₁₀–NLC zbudowanej z półsyntetycznych składników najwyższa stabilność zmierzona w wodzie była widoczna w najniższej temperaturze (4 °C) po 24 h oraz po miesiącu pomiarów, podczas gdy w wodnym roztworze SPC najwyższe wartości ZP od początku do końca badań uzyskała próbka przechowywana w temp. 25 °C. Z kolei w przypadku próbki CoQ₁₀–NLC zbudowanej ze składników organicznych najwyższą stabilność, zarówno w wodzie jak i w wodzie z dodatkiem surfaktantu, odnotowano w najniższej temperaturze (4 °C): po 24 h oraz po miesiącu. Niewielkie różnice (około ± 1 –2 mV) były widoczne dla tej próbki przechowywanej w temp. 25 oraz 40 °C (w obu ośrodkach dyspersyjnych).

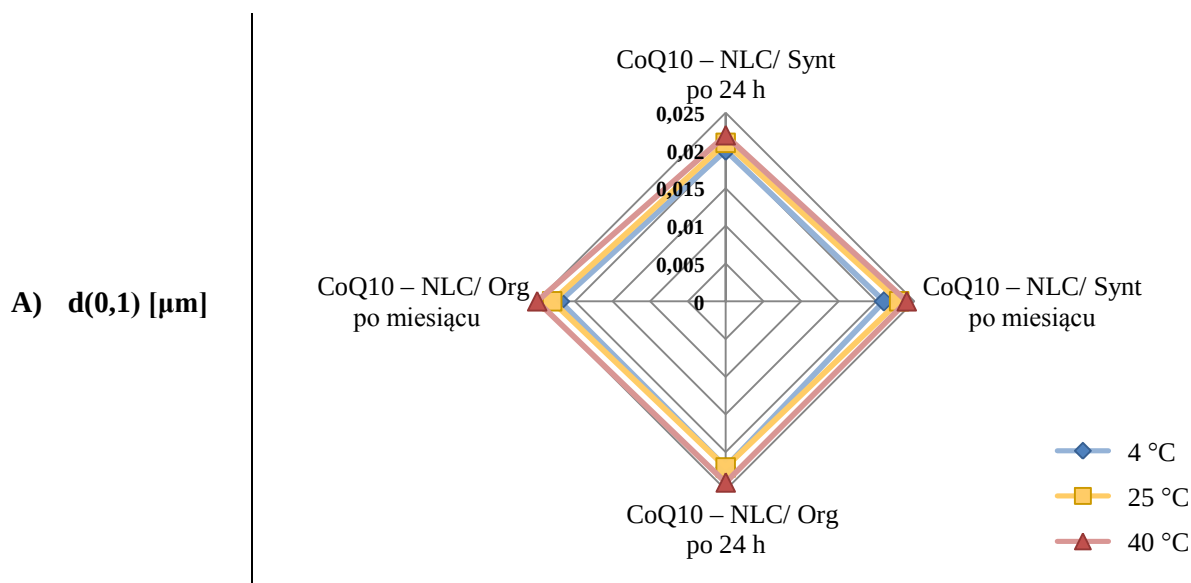
Przeprowadzone badania dowiodły, że enkapsulacja koenzymu Q₁₀ w nanostrukturalne nośniki lipidowe, zbudowane wyłącznie ze składników pochodzenia naturalnego jest tak samo możliwa z zachowaniem równie dobrej stabilności jak w przypadku syntezy NLC z powszechnie stosowanych składników półsyntetycznych. Podobnie jak w przypadku

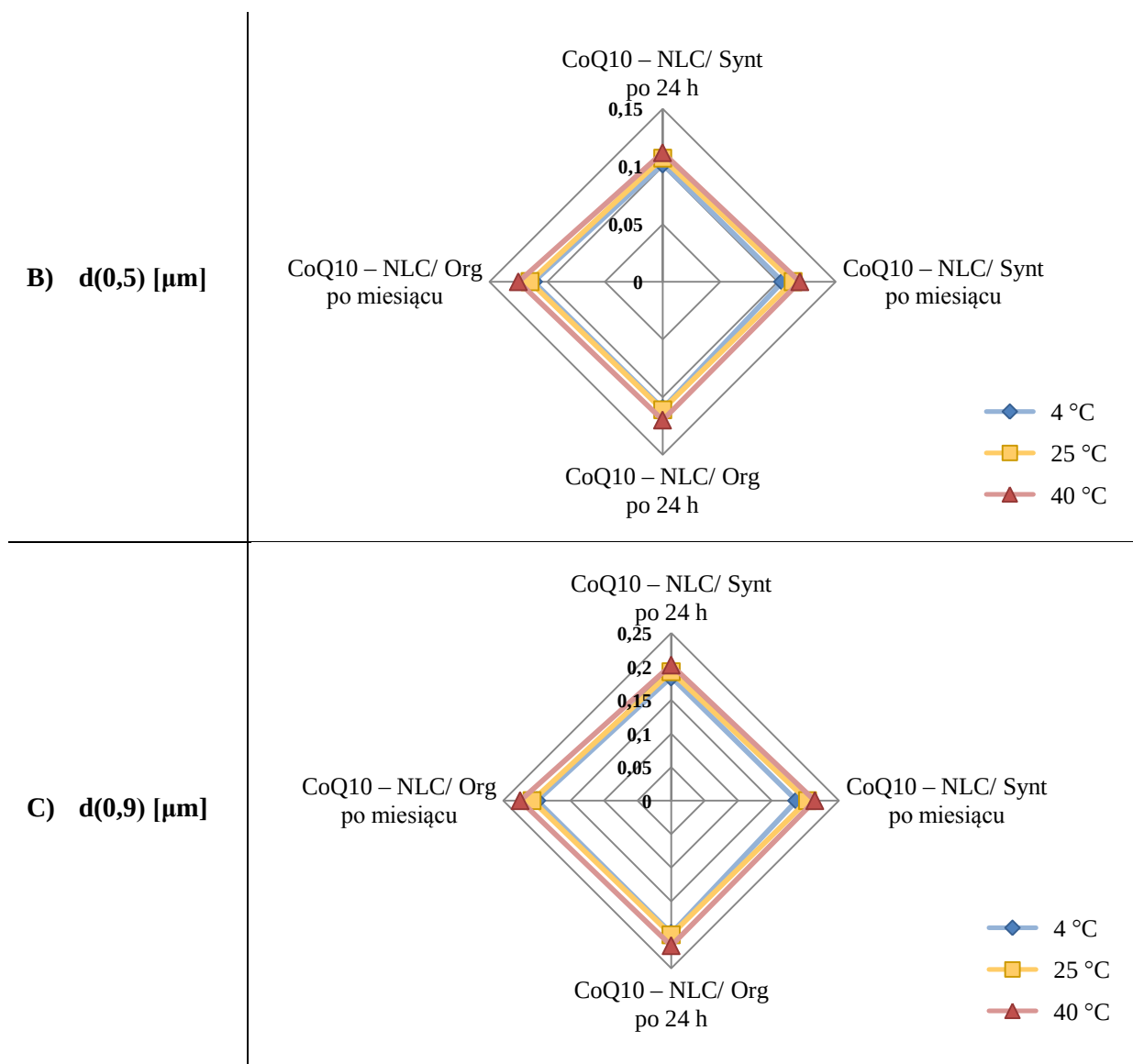
Retinolu 50 C enkapsulowanego w organiczne składniki, enkapsulacja CoQ₁₀ oraz innych substancji czynnych w nanocząstki lipidowe, zawierające składniki organiczne, zapewnia nie tylko lepszą kompatybilność dla skóry [350], ale i zmniejsza występowanie ewentualnych działań niepożądanych [139, 351].

6.8. Porównanie rozkładu wielkości cząstek otrzymanych NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀ techniką dyfrakcji laserowej

Na rysunku 86 przedstawiono analizę rozkładu wielkości cząstek, które otrzymano po 24 godzinach oraz po miesiącu od dnia enkapsulacji koenzymu Q₁₀ w półsyntetyczne oraz organiczne NLC. Analogiczne pomiary wykonywane były również po 3, 7 i 15 dniach, jednak ponownie z powodu braku istotnych różnic pomiędzy uzyskanymi wynikami dla półsyntetycznych i organicznych NLC, pominięto ich analizę i interpretację w dalszym w toku dyskusji. Wszystkie próbki nanostrukturalnych nośników lipidowych przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

Porównanie rozkładu wielkości cząstek dla NLC inkorporowanych CoQ₁₀, zawierających w swej budowie wyłącznie półsyntetyczne lub organiczne składniki także zestawiono w formie graficznej, która uwzględniała wszystkie temperatury przechowywania próbek (4, 25 i 40 °C). Omówienie wyników dotyczyło głównie analizy zmian parametru d(0,9).





Rysunek 86. Porównanie rozkładu wielkości cząstek dla NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀, zawierających półsyntetyczny lub naturalny ciekły lipid.

Zaobserwowano, że wartości parametru d(0,9) dla NLC inkorporowanych CoQ₁₀, zawierających w swej budowie wyłącznie półsyntetyczne lub organiczne składniki utrzymywały się na podobnym poziomie po 24 h od dnia syntezy i mieściły się w zakresie od 0,184 do 0,214 μm (półsyntetyczne) oraz 0,198 do 0,225 μm (organiczne) we wszystkich badanych temperaturach (4, 25 i 40 °C) (rys. 86-C).

Po przechowywaniu wszystkich NLC przez okres miesiąca zauważono, że w przypadku półsyntetycznych CoQ₁₀-NLC we wszystkich badanych temperaturach nastąpił minimalny wzrost średnicy cząstek (różnica wynosiła średnio od 0,003 do 0,012 μm). Najmniejsze zmiany wartości d(0,9) były widoczne dla próbek pozostawionych w temp. 4 °C, natomiast największe w temp. 40 °C. Otrzymane wyniki były zgodne z tymi, które uzyskano podczas pomiarów Z-Ave (zob. tab. 70).

W przypadku organicznych CoQ₁₀-NLC również zauważono zwiększenie średnicy cząstek, które po miesiącu było najbardziej widoczne dla próbek w temp. 40 °C (przyrost wynosił 0,009 μm). Z kolei w temperaturze 4 oraz 25 °C średnica cząstek przyjmowała

wartości podobne do uzyskanych po 24 h (przyrost wynosił odpowiednio 0,002 oraz 0,007 μm). Otrzymane wyniki także korelowały z pomiarami Z-Ave.

Ponadto zauważono, że po miesiącu przechowywania półsyntetycznych CoQ₁₀-NLC, w różnych temperaturach (4, 25 i 40 °C), 90% udziału objętościowego cząstek posiadało średnicę $\leq 0,214 \mu\text{m}$, z kolei w przypadku organicznych CoQ₁₀-NLC $\leq 0,225 \mu\text{m}$ otrzymane rezultaty wykazały stosunkowo nieduże różnice w rozkładzie wielkości cząstek pomiędzy NLC zbudowanymi ze składników różnego pochodzenia (półsyntetycznego bądź też organicznego). Warto zaznaczyć, że uzyskane wyniki były zgodne z wartościami otrzymanymi podczas pomiarów Z-Ave, PDI, ZP. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach, dotyczących enkapsulacji Retinolu 50 C w NLC zaobserwowano, że wszystkie wartości d(0,9) utrzymywały się w niektórych warunkach na niezmiennym poziomie w ciągu miesiąca badań. Zarówno dla półsyntetycznych, jak i organicznych NLC inkorporowanych CoQ₁₀ najkorzystniejsza okazała się temperatura 4 °C. Ponadto w przypadku obu rodzajów NLC największe zmiany były widoczne w temperaturze 40 °C. Po przeanalizowaniu podobnych zależności w wynikach Z-Ave uzyskanych po 30 dniach badań (tab. 71) przyjęto, że próbki NLC inkorporowane CoQ₁₀ charakteryzują się stosunkowo dobrą stabilnością, jednak przechowywanie próbek w najwyższej temperaturze powoduje przyspieszenie powstawania procesów niestabilności (tj. agregacja/aglomeracja cząstek) dla obu typów syntezowanych CoQ₁₀-NLC.

Podsumowując, korzystny wpływ na wartość parametru d(0,9) badanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C i zbudowanych wyłącznie z półsyntetycznych lub organicznych składników był widoczny w przypadku pozostawienia próbek w obniżonej lub też pokojowej temperaturze. W przypadku parametrów d(0,5) oraz d(0,1), zmierzonych dla wszystkich NLC przechowywanych w 4, 25 i 40 °C (rys. 86-A i B), odnotowano analogiczne zmiany jak w przypadku d(90). Na podstawie dokonanej analizy wyników rozkładu wielkości cząstek dla badanych NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀ oraz zbudowanych w pełni z półsyntetycznych lub też z organicznych składników wywnioskowano, że oba rodzaje NLC odznaczają się stosunkowo dobrą stabilnością przez minimum kilka tygodni od dnia syntezy.

6.9. Zdjęcia matrycy lipidowej NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀ wykonane za pomocą mikroskopu stereoskopowego

W tabeli 71 przedstawiono obrazy matrycy lipidowej uzyskane za pomocą mikroskopu stereoskopowego (Leitz Orthoplan, Niemcy) po miesiącu badań CoQ₁₀ enkapsulowanego w półsyntetyczne lub organiczne NLC. Wszystkie próbki NLC przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

Tabela 71. Porównanie obrazu mikroskopowego matrycy lipidowej NLC półsyntetycznych lub organicznych inkorporowanych koenzymem Q₁₀ przy 40-krotnym powiększeniu.

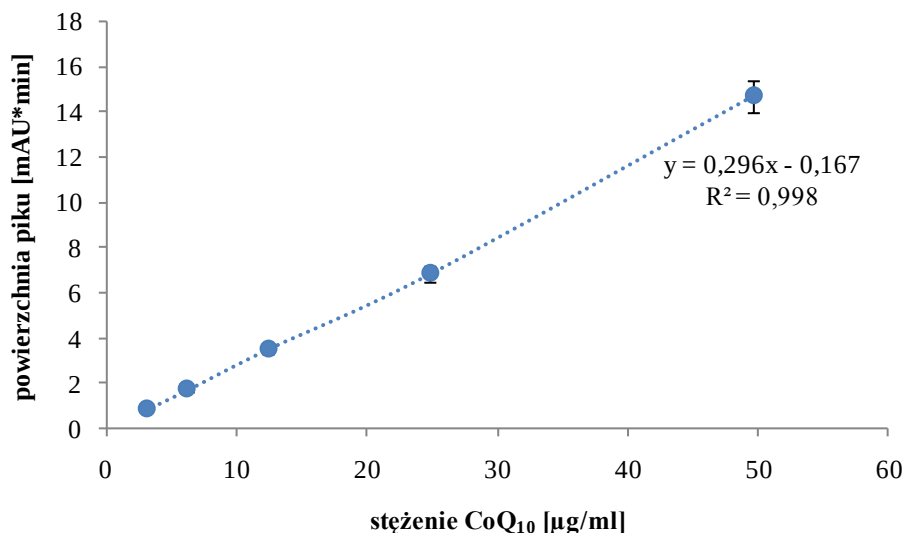
Nazwa próbki	Temp.	4 °C	25 °C	40 °C
	Termin pomiaru			
CoQ ₁₀ -NLC/Synt	po miesiącu			
CoQ ₁₀ -NLC/Org				

Organiczny preparat CoQ₁₀-NLC zbudowany ze składników pochodzenia roślinnego został pomyślnie opracowany z podobną stabilnością fizyczną i chemiczną jak jego półsyntetyczny odpowiednik. Przeprowadzone badania wykazały stabilność we wszystkich badanych temperaturach (4, 25 i 40 °C) dla organicznego NLC inkorporowanego CoQ₁₀, wpisując się w założenia powszechnie panującego w przemyśle nurtu „zielonej chemii”.

6.10. Ocena stabilności chemicznej koenzymu Q₁₀ enkapsulowanego w NLC

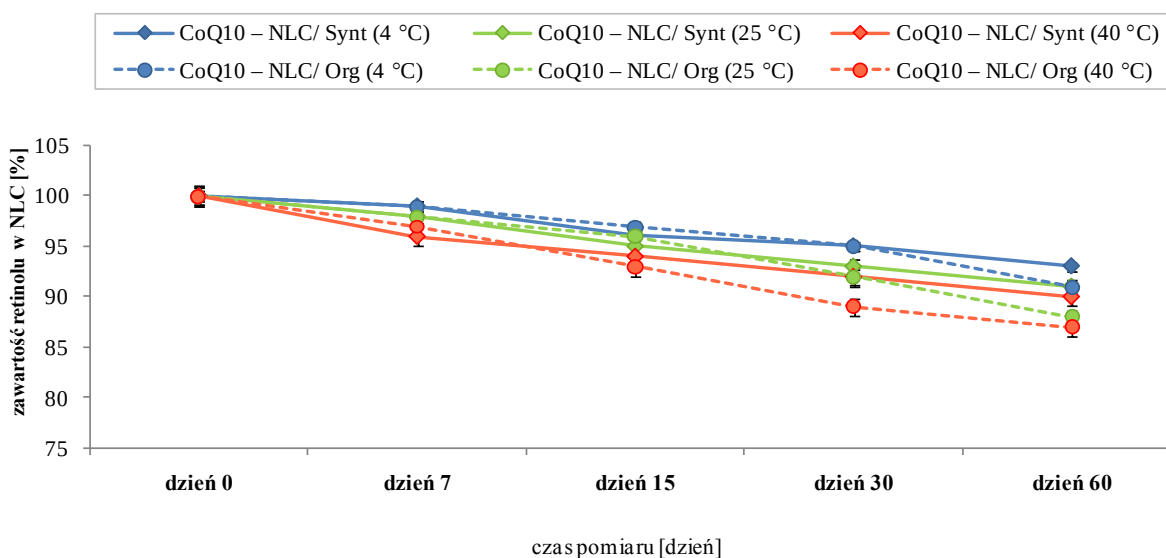
6.10.1. Półsyntetyczne i organiczne NLC inkorporowane koenzymem Q₁₀

Stabilność chemiczną koenzymu Q₁₀ enkapsulowanego w NLC, zbudowanych z wyłącznie półsyntetycznych (CoQ₁₀-NLC/Synt), jak i z wyłącznie organicznych (CoQ₁₀-NLC/Org) składników oceniano za pomocą techniki HPLC. W badaniach wykonano krzywą kalibracyjną, przedstawioną na rysunku 87, w celu umożliwienia kwantyfikacji wyników oraz obliczenia efektywności enkapsulacji do matrycy lipidowej (ang. *entrapment efficiency*) koenzymu Q₁₀ w NLC, wyrażonej w procentach wagowych.



Rysunek 87. Krzywa kalibracyjna koenzymu Q₁₀.

Stężenie koenzymu Q₁₀ mierzono w każdej z badanych próbek, które analizowano bezpośrednio po otrzymaniu NLC, jak również po 7, 15, 30 oraz 60 dniach od momentu syntezy nanocząstek. Procent inkorporowanego koenzymu Q₁₀ (% CoQ₁₀), pozostałego w próbkach NLC w trakcie całego okresu badań przedstawiono na rysunku 88.



Rysunek 88. Stabilność chemiczna koenzymu Q₁₀ enkapsulowanego w NLC (zbudowane z wyłącznie półsyntetycznych lub organicznych składników) w ciągu dwóch miesięcy przechowywania próbek w trzech różnych temperaturach.

Na podstawie wyników otrzymanych przy użyciu HPLC zauważono, że koenzym Q₁₀ był nieznacznie mniej stabilny we wszystkich próbkach organicznych NLC w porównaniu do NLC syntetycznych. Biorąc pod uwagę warunki przechowywania próbek zaobserwowano, że największe ilości składnika aktywnego „utracono” w obu przypadkach NLC (CoQ₁₀–

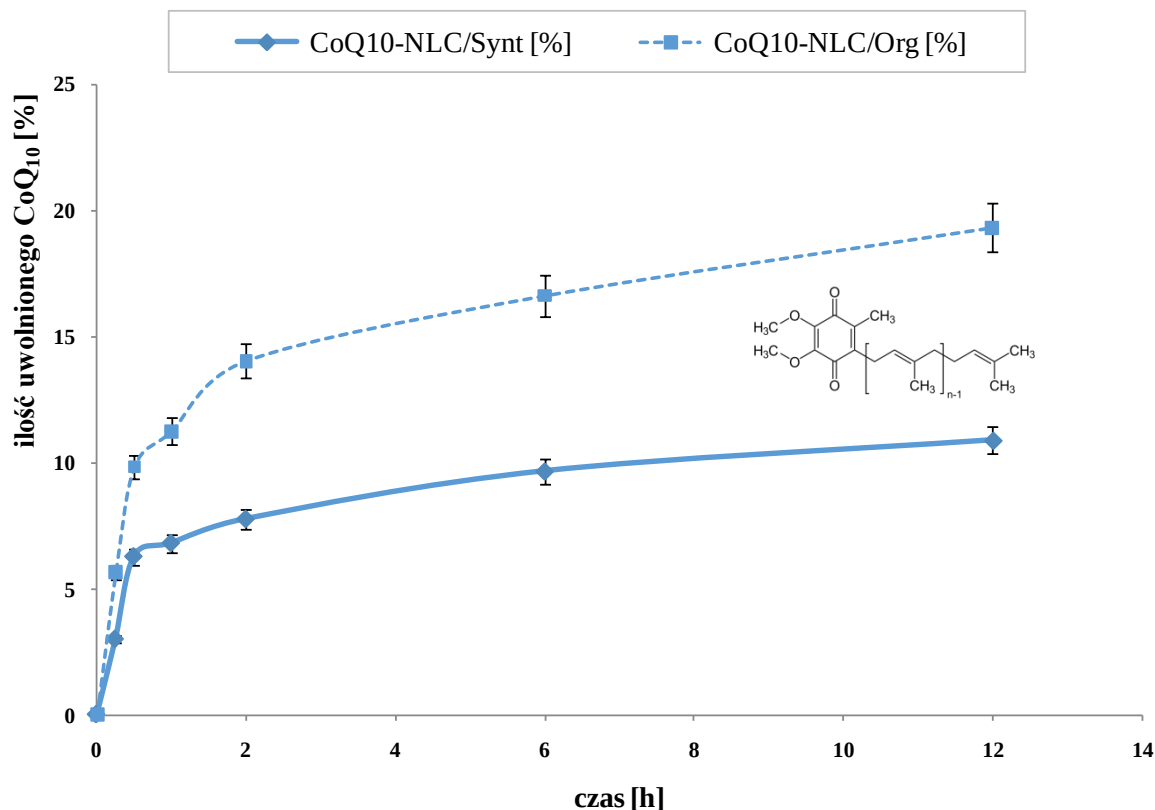
NLC/Synt; CoQ₁₀–NLC/Org) w temp. 40 °C, natomiast największa ilość CoQ₁₀ została „zachowana” dla próbek w temp. 4 °C. Porównywalnie dobrą stabilnością odznaczały się próbki NLC przechowywane w temp. 25 °C.

Po 60-u dniach badań odnotowano, że w przypadku NLC przechowywanych w temp. 40 °C procent wagowy CoQ₁₀ „uwięzionego” w półsyntetycznej matrycy (CoQ₁₀–NLC/Synt) wynosił 90% wag., podczas gdy w matrycy organicznej (CoQ₁₀–NLC/Org) pozostało 87% wag. początkowego stężenia substancji czynnej. Z kolei dla próbek w temperaturze w temp. 4 °C zawartość CoQ₁₀ po dwóch miesiącach badań wynosiła 93% wag. (CoQ₁₀–NLC/Synt) oraz 91% wag. (CoQ₁₀–NLC/Org), podczas gdy w przypadku półsyntetycznych NLC przechowywanych w temperaturze pokojowej pozostało 91% wag. CoQ₁₀, a dla organicznych NLC końcowa zawartość CoQ₁₀ wynosiła 88% wag.

Podsumowując, otrzymane wyniki świadczyły o dobrej stabilności i działaniu ochronnym zarówno półsyntetycznej, jak i organicznej matrycy lipidowej NLC, które ograniczały utlenianie koenzymu Q₁₀, poprawiając przy tym jego chemiczną stabilność. Dzięki skutecznej inkorporacji do matrycy lipidowej, koenzym Q₁₀ miał utrudniony kontakt bezpośredni z wodą oraz z zawartym w niej tlenem [354]. W badaniach G. Hommossa (2017) [354] nad skuteczną enkapsulacją w NLC tetrahydrokannabinolu (THC), który równie łatwo ulega utlenianiu co koenzym Q₁₀ dowiedziono, że w celu zwiększenia stabilności produktów wrażliwych na utlenianie warto dodać przeciwutleniacze oraz stosować ochronne gazowanie azotem. Procedury te powinny dodatkowo przedłużyć okres przydatności produktów komercyjnych, które odznaczały się najlepszą stabilnością w obniżonej temperaturze [354], co również potwierdzono w badaniach niniejszej pracy doktorskiej.

6.11. Badanie uwalniania koenzymu Q₁₀ z nanocząstek lipidowych z wykorzystaniem aparatu łopatkowego z dyskiem nośnym

Profile uwalniania CoQ₁₀ enkapsulowanego w NLC półsyntetyczne (CoQ₁₀–NLC/Synt) oraz organiczne (CoQ₁₀–NLC/Org) przedstawiono na rysunku 89. Analiza procesu uwalniania monoterpenów rozpoczęła się w ciągu pierwszych 15 minut, kiedy nastąpiło uwolnienie pierwszych ilości badanej substancji czynnej. Cały proces uwalniania monitorowano przez 12 godzin.



Rysunek 89. Porównanie profili uwalniania koenzymu Q₁₀ enkapsulowanego w półsyntetyczne lub organiczne NLC.

Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano, że w ciągu pierwszych 15 minut większe ilości koenzymu Q₁₀ uwalniały się z próbki organicznej CoQ₁₀-NLC/Org (5,65%), natomiast w mniejszych ilościach nastąpiło uwolnienie z próbki półsyntetycznej CoQ₁₀-NLC/Synt (2,99%). W kolejnych minutach, w obu przypadkach odnotowano największy przyrost uwalniania CoQ₁₀, który wynosił około 3% dla próbki NLC/Synt oraz około 4% dla próbki NLC/Org.

Po pierwszej godzinie badań zauważono, że w próbce półsyntetycznej następowało stopniowe, lecz niewielkie uwolnienie substancji czynnej – przyrost o zaledwie 0,53% wag. Z kolei w próbce organicznej, po tym samym czasie uwolnione zostało o 1,42% wag. CoQ₁₀ więcej niż w poprzednich 30 minutach. W kolejnych godzinach obserwowano ponownie szybsze uwalnianie CoQ₁₀ z próbki syntezowanej z wyłącznie naturalnych składników. W końcowym etapie badań, w próbce CoQ₁₀-NLC/Synt odnotowano około 10% wag. uwolnionego koenzymu Q₁₀, podczas gdy w próbce CoQ₁₀-NLC/Org uwolniło się prawie 20% wag. substancji czynnej. Tym samym, pozostałe 80% koenzymu Q₁₀ nie miało żadnego działania terapeutycznego [242].

Podsumowując otrzymane rezultaty wywnioskowano, że dla obu rodzajów NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀, podobnie jak w przypadku badanych monoterpenów enkapsulowanych w SLN (zob. rozdz. 5.5.) widoczne było uwalnianie dwufazowe, polegające na początkowym uwalnianiu natychmiastowym (*burst release*), po których następowało stopniowe przedłużone uwalnianie (*sustained release*) [326], zapewniające aktywność substancji czynnej przez dłuższy czas [326]. Początkowe szybkie uwalnianie substancji

czynnej można tłumaczyć częściową enkapsulacją koenzymu Q₁₀ do zewnętrznej powłoki nanocząstek (zob. rozdz. 2.4.) [49, 146], natomiast stosunkowo słabe przedłużone uwalnianie tego składnika mogło wynikać z wysokiej stabilności matrycy lipidowej, co potwierdzono w badaniach opisanych w rozdziale 6.10.1.

6.12. Dobór odpowiedniego lipidu dla α -tokoferolu

Po przeprowadzeniu selekcji lipidów dla α -tokoferolu mieszanego w stosunku 1:100 z różnymi lipidami stałymi, dokonano wyboru najbardziej kompatybilnego lipidu do syntezy NLC. W tym celu, przeprowadzono obserwację rozpuszczalności α -tokoferolu w określonych odstępach czasu (15 min, 30 min, 1 h, 24 h). Stosunek wybranych testowanych lipidów w połączeniu z α -tokoferolem w stosunku 1:100, obserwowanych w określonych odstępach czasu przedstawiono w tabeli 72.

Tabela 72. Dobór lipidu dla α -tokoferolu.

Nazwa lipidu + α -tokoferol (stosunek 1:100)	Rozpuszczalność α -tokoferolu				
	po stopieniu	15 min	30 min	1 h	24 h
Compritol® 888 ATO					
Imwitor® 900 K					
Softisan® 601					

Na podstawie wyników przedstawionych w tabeli 72 zauważono, że po osiągnięciu temperatury topnienia charakterystycznej dla każdego z lipidów, α -tokoferol był najlepiej rozpuszczalny w stearynianie glicerolu (Softisan® 601). Wraz z upływem czasu, efekt ten był coraz bardziej widoczny pod postacią mieszaniny jednorodnej, skład której stanowił zestalony lipid z badanym składnikiem aktywnym. Jednak warto dodać, że zarówno behenian glicerolu (Compritol® 888 ATO), jak również monostearynian glicerolu (Imwitor® 900 K) charakteryzowała dobra kompatybilność z α -tokoferolem. Zgodnie z zasadą, według której matryca lipidowa nanocząstek powinna zostać utrzymana w stanie stałym podczas transportu do miejsca docelowego [356], do dalszych badań wybrano Compritol® 888 ATO, który odznaczał się jedną z najwyższych temperatur topnienia spośród testowanych lipidów (zob. tab. 14). Tym samym, otrzymane nanostrukturalne nośniki lipidowe będą mogły znaleźć potencjalne transdermalne zastosowanie.

6.13. Porównanie Z-Ave, PDI oraz ZP otrzymanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem

W tabeli 73 przedstawiono wyniki dla Z-Ave, PDI oraz ZP, które otrzymano bezpośrednio po syntezie (dzień 0), jak również po 24 godzinach (dzień 1) oraz po 3, 7, 15 i 30 dniu od momentu syntezy nanocząstek inkorporowanych α -tokoferolem z wykorzystaniem techniki mikroemulgowania (ME) oraz homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH). Wszystkie próbki nanostrukturalnych nośników lipidowych przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C (bez dostępu światła).

Tabela 73. Porównanie Z-Ave, PDI i ZP dla wszystkich NLC inkorporowanych α -T za pomocą techniki mikroemulgowania oraz homogenizacji wysokociśnieniowej.

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Z-Ave [nm] $\pm$ SD	PDI [j.u.] $\pm$ SD	ZP [mV] $\pm$ SD
α -T-NLC(ME)	dzień 0	25	234 $\pm$ 0,20	0,27 $\pm$ 0,12	$ \pm 27 \pm 0,01$
	dzień 1	4	300 $\pm$ 0,21	0,20 $\pm$ 0,19	$ \pm 30 \pm 0,10$
		25	240 $\pm$ 0,25	0,19 $\pm$ 0,05	$ \pm 31 \pm 0,05$
		40	345 $\pm$ 0,15	0,23 $\pm$ 0,14	$ \pm 29 \pm 0,02$
	dzień 3	4	555 $\pm$ 0,31	0,32 $\pm$ 0,20	$ \pm 32 \pm 0,02$
		25	274 $\pm$ 0,29	0,27 $\pm$ 0,02	$ \pm 26 \pm 0,01$
		40	410 $\pm$ 1,59	0,28 $\pm$ 0,21	$ \pm 31 \pm 0,04$
	dzień 7	4	1220 $\pm$ 15,02	0,68 $\pm$ 0,05	$ \pm 28 \pm 0,10$
		25	296 $\pm$ 1,01	0,28 $\pm$ 0,11	$ \pm 31 \pm 0,12$
		40	634 $\pm$ 5,20	0,35 $\pm$ 0,21	$ \pm 26 \pm 0,06$
	dzień 15	4	560 $\pm$ 148,60	0,62 $\pm$ 0,25	$ \pm 30 \pm 0,15$
		25	360 $\pm$ 1,54	0,30 $\pm$ 0,15	$ \pm 38 \pm 0,11$
		40	382 $\pm$ 12,25	0,37 $\pm$ 0,02	$ \pm 25 \pm 0,22$
	dzień 30	4	1515 $\pm$ 133,21	0,80 $\pm$ 1,02	$ \pm 29 \pm 0,11$
		25	309 $\pm$ 0,53	0,26 $\pm$ 0,10	$ \pm 36 \pm 0,12$
		40	562 $\pm$ 5,11	0,38 $\pm$ 0,12	$ \pm 25 \pm 0,18$
α -T-NLC(HPH)	dzień 0	25	113 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	$ \pm 34 \pm 0,02$
	dzień 1	4	113 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,02	$ \pm 31 \pm 0,05$
		25	113 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,06	$ \pm 34 \pm 0,02$
		40	119 $\pm$ 0,11	0,21 $\pm$ 0,11	$ \pm 33 \pm 0,05$
	dzień 3	4	113 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,15	$ \pm 27 \pm 0,03$
		25	114 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,14	$ \pm 25 \pm 0,12$
		40	135 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,02	$ \pm 37 \pm 0,04$
	dzień 7	4	118 $\pm$ 0,10	0,20 $\pm$ 0,02	$ \pm 30 \pm 0,01$
		25	120 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,02	$ \pm 32 \pm 0,12$
		40	151 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,05	$ \pm 35 \pm 0,05$
	dzień 15	4	121 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,10	$ \pm 18 \pm 0,11$
		25	121 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,15	$ \pm 22 \pm 0,15$
		40	177 $\pm$ 0,10	0,03 $\pm$ 1,51	$ \pm 26 \pm 0,09$
	dzień 30	4	122 $\pm$ 0,05	0,19 $\pm$ 0,21	$ \pm 22 \pm 0,05$
		25	123 $\pm$ 0,06	0,23 $\pm$ 0,35	$ \pm 28 \pm 0,20$
		40	178 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 1,02	$ \pm 22 \pm 0,14$

Na podstawie wyników zebranych w tabeli 73 zauważono znaczące różnice pomiędzy wynikami (Z-Ave, PDI, ZP) dla NLC inkorporowanych α -tokoferolem syntezowanych za pomocą dwóch odmiennych metod. Bezpośrednio po produkcji (dzień 0), średnia wielkość cząstek otrzymanych metodą mikroemulgowania była o ponad 100 nm wyższa od NLC otrzymanych za pomocą HPH. Z kolei współczynnik polidispersyjności mieścił się w podobnym prawidłowym zakresie ($0,24 - 0,27$ j.u.) $< 0,30$ j.u., podczas gdy wartość bezwzględna potencjału zeta była wyższa dla nanocząstek syntezowanych przy użyciu homogenizacji wysokociśnieniowej, co świadczyło o dobrej stabilności. Ponadto, wraz z upływem czasu odnotowano widoczny wzrost wartości Z-Ave oraz PDI dla α -T-NLC(ME) w porównaniu z α -T-NLC(HPH), dla których parametry te utrzymywały się na podobnym poziomie przez cały okres badań.

Po 24 godzinach (dzień 1) od dnia syntezy i przechowywania wszystkich próbek w temperaturze 4, 25 i 40 °C zaobserwowano, że Z-Ave dla α -T-NLC(ME) mieściła się w zakresie od $240 \pm 0,25$ nm (25 °C) przy PDI równym $0,19 \pm 0,05$ j.u. do $345 \pm 0,15$ nm (40 °C) przy PDI wynoszącym $0,23 \pm 0,14$ j.u. Wartości ZP utrzymywały się w granicach $|\pm 30$ mV|, przy czym nieznacznie wyższa stabilność była widoczna po przechowywaniu próbki w temperaturze pokojowej. W przypadku próbki α -T-NLC(HPH) odnotowano, że wartości Z-Ave mieściły się w granicach od ok. $113 \pm 0,05$ nm (4 i 25 °C) przy PDI wynoszącym około $0,16 \pm 0,02$ j.u. do $119 \pm 0,11$ nm (40 °C) przy PDI równym $0,21 \pm 0,11$ j.u. Wartości ZP przekraczały $|\pm 30$ mV| dla wszystkich próbek, przy czym ponownie najwyższą stabilność wykazywała próbka przechowywana w temperaturze 25 °C.

Z kolei, dla próbki α -T-NLC(ME), w 3 dniu pomiarów od dnia syntezy NLC zaobserwowano znaczący wzrost Z-Ave w temp. 4 i 40 °C. Dodatkowo, wzrost wartości PDI wskazywał na rozpoczynający się proces agregacji cząstek dla próbek otrzymanych metodą ME, przechowywanych w skrajnych warunkach temperaturowych (4 i 40 °C). Co więcej, po tygodniu (dzień 7) odnotowano największy przyrost wartości Z-Ave, które w temperaturze 4 °C przekraczały wartości nanometryczne ($1220 \pm 15,02$ nm przy PDI = $0,68 \pm 0,05$ j.u.). Dla próbki przechowywanej w temp. 40 °C odnotowano wzrost wielkości o 224 nm, natomiast w temp. 25 °C o 22 nm. Tak duże różnice pomiędzy wartościami Z-Ave wskazywały na znaczący wpływ temperatury otoczenia na tempo powstawania procesu agregacji cząstek [356]. Po miesiącu pomiarów (dzień 30) największe zmiany utrzymywały się dla próbki przechowywanej w temp. 4 °C (Z-Ave = $1515 \pm 133,21$ nm przy PDI = $0,80 \pm 1,02$ j.u.) oraz w temp. 40 °C (Z-Ave = $562 \pm 5,11$ nm przy PDI = $0,38 \pm 0,12$ j.u.). Natomiast najmniejsze różnice dla mierzonych parametrów w stosunku do wartości początkowych (dzień 1) były widoczne dla próbki α -T-NLC(ME) w temp. 25 °C.

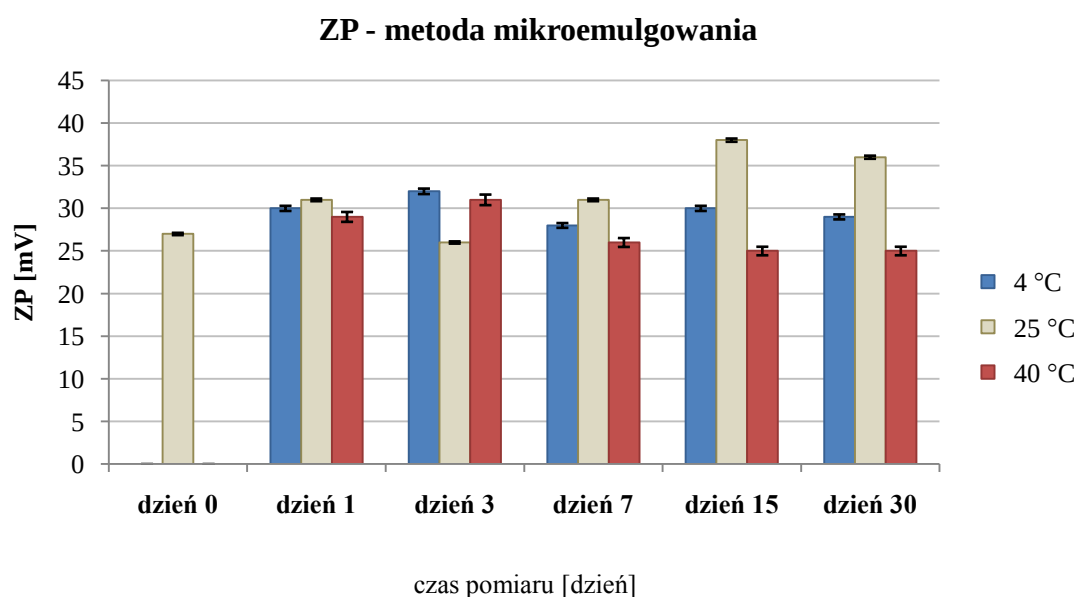
Z kolei w przypadku α -T-NLC(HPH), w 3 dniu pomiarów od dnia syntezy NLC nie zaobserwowano znaczącego wzrostu wartości Z-Ave w stosunku do wartości uzyskanych po 1 dniu od momentu syntezy nanocząstek. Największy przyrost Z-Ave, wynoszący około 16 nm odnotowano dla próbki przechowywanej w temp. 40 °C, podczas gdy dla próbek w temp. 4 i 25 °C wartości Z-Ave i PDI utrzymywały się na stałym poziomie.

Po tygodniu pomiarów zauważono nieznaczny przyrost Z-Ave we wszystkich badanych zakresach temperatur, który mieścił się w przedziale od 5 nm (4 °C) do 16 nm (40 °C) i utrzymywał na podobnym poziomie w kolejnych tygodniach. W rezultacie, po miesiącu pomiarów (dzień 30) średnia wielkość cząstek mieściła się w zakresie od $122 \pm 0,05$ nm przy PDI wynoszącym $0,19 \pm 0,21$ j.u. do $178 \pm 0,02$ nm przy PDI równym $0,14 \pm 1,02$ j.u.

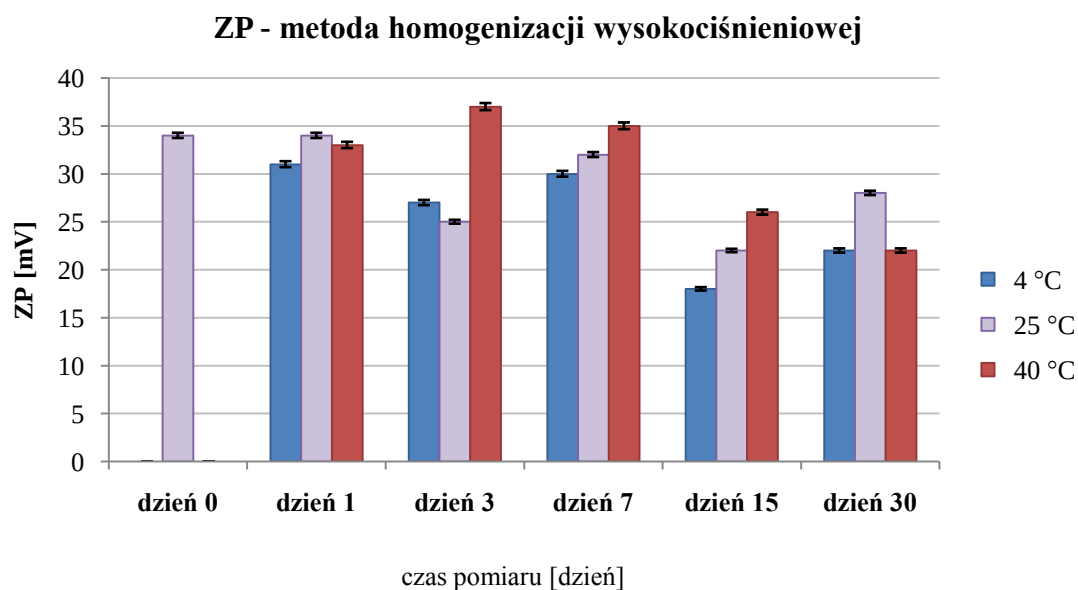
Najmniejsze różnice dla mierzonych parametrów w stosunku do wartości początkowych były widoczne dla próbki α -T-NLC(HPH) zarówno w temperaturze 4, jak i 25 °C, podczas gdy w temp. 40 °C odnotowano największe wartości Z-Ave wynoszące $178 \pm 0,02$ nm. Wartości współczynnika polidispersyjności dla wszystkich α -T-NLC(HPH) mieściły się w zakresie normy (0 – 0,30 j.u.) w ciągu całego okresu badań. Z kolei wartości potencjału zeta znacząco malały od drugiego tygodnia badań, wynosząc w zależności od temperatury przechowywania $|\pm 18\text{--}26$ mV| oraz w rezultacie osiągając po miesiącu wartości w granicach $|\pm 22\text{--}28$ mV|. Warto zaznaczyć, że końcowa stabilność NLC inkorporowanych α -tokoferolem metodą HPH była nieznacznie niższa od NLC syntezowanych metodą mikroemulgowania.

Na rysunku 90 zostały przedstawione wartości ZP zmierzonego dla badanych próbek w wodnym roztworze surfaktantu, które otrzymano w ciągu całego okresu badań dla α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC(ME) (rys. 90-A) oraz w NLC(HPH) (rys. 90-B).

A)



B)



Rysunek 90. Porównanie wartości ZP zmierzonego w wodnym roztworze surfaktantu dla α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC za pomocą dwóch różnych metod.

Zaobserwowano, że bezpośrednio po syntezie NLC inkorporowanych α -tokoferolem (dzień 0) wartość potencjału zeta dla próbki otrzymanej metodą ME (rys. 90-A) wynosiła $|\pm 27 \text{ mV}|$, natomiast przy użyciu HPH (rys. 90-B) początkowa wartość bezwzględna ZP była równa $|\pm 34 \text{ mV}|$.

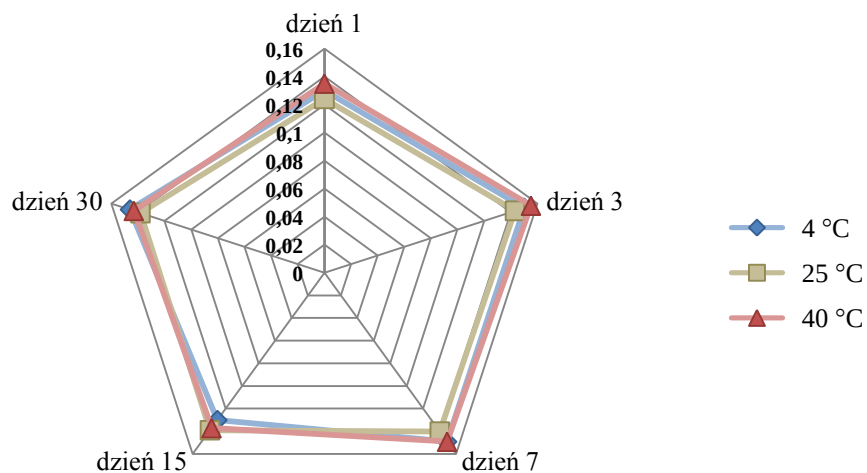
Po 24 godzinach przechowywania próbek w różnych temperaturach (4, 25 i 40 °C), najwyższą stabilność zarówno dla próbki α -T-NLC(ME), jak i dla α -T-NLC(HPH) była widoczna w temp. 25 °C i wynosiła odpowiednio $|\pm 31 \text{ i } 34 \text{ mV}|$. W 3 dniu zauważono, że wartości ZP dla NLC otrzymanych za pomocą obu metod były najniższe w temp. 25 °C i wynosiły: $|\pm 26 \text{ mV}|$ za pomocą ME oraz $|\pm 25 \text{ mV}|$ z wykorzystaniem HPH. Ponadto w przypadku α -T-NLC(ME), próbki po 3 dniach wykazywały najwyższą stabilność w temp. 4 °C, w przeciwieństwie do α -T-NLC(HPH), dla których najwyższa stabilność była widoczna w temp. 40 °C i utrzymywała się ona w kolejnych dniach. Tym samym, w 7 dniu pomiarów nie odnotowano większych zmian dla zmierzonego parametru. Jednak po upływie 15 dni, stabilność wszystkich próbek uległa widocznym zmianom. W efekcie dla α -T-NLC(ME) odnotowano najwyższą stabilność równą $|\pm 38 \text{ mV}|$ w temp. 25 °C, natomiast najniższą $|\pm 25 \text{ mV}|$ w temp. 40 °C. Wartości ZP utrzymywały się na podobnym poziomie we wszystkich badanych temperaturach w czasie kolejnych tygodni badań. Z kolei dla próbki α -T-NLC(HPH) pierwsze znaczące zmiany również były widoczne po drugim tygodniu badań od momentu syntezy nanocząstek (dzień 15). Wówczas najwyższe wartości ZP były równe $|\pm 26 \text{ mV}|$ w temp. 40 °C oraz o $|\pm 4 \text{ mV}|$ mniej w temp. 25 °C, natomiast stosunkowo niską stabilność $|\pm 18 \text{ mV}|$ odnotowano w temp. 4 °C. Po miesiącu badań (dzień 30) zaobserwowano, że najwyższa stabilność dla α -T-NLC(HPH) była ponownie widoczna dla nanocząstek przechowywanych w temperaturze pokojowej, a wartość ZP była równa $|\pm 28 \text{ mV}|$.

Podsumowując, otrzymane wartości potencjału zeta wskazywały na dobrą stabilność wszystkich otrzymanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem. Jednak wraz z upływem czasu stabilność α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC otrzymanych za pomocą homogenizacji wysokociśnieniowej malała szybciej w porównaniu do nanocząstek syntezowanych metodą mikroemulgowania.

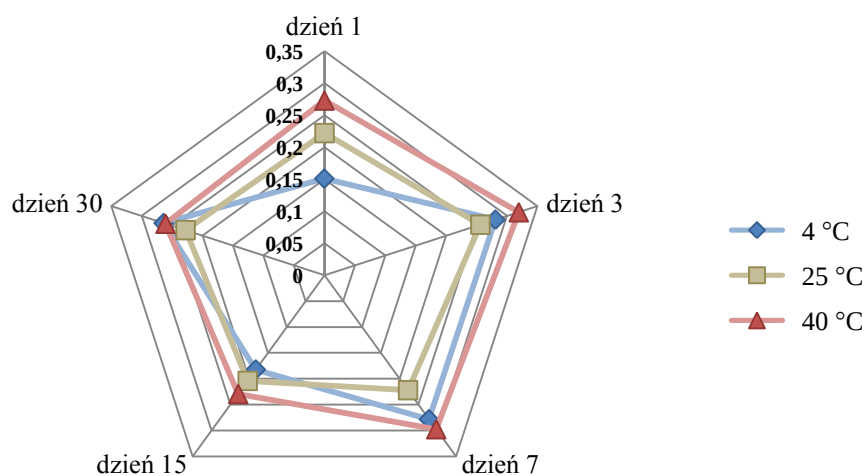
6.14. Porównanie rozkładu wielkości cząstek za pomocą techniką dyfrakcji laserowej dla NLC inkorporowanych α -tokoferolem otrzymanych z wykorzystaniem dwóch różnych metod syntezy

Na rysunku 91 przedstawiono w formie graficznej analizę rozkładu wielkości cząstek dla α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC z zastosowaniem metody mikroemulgowania, natomiast na rysunku 92 została przedstawiona analiza rozkładu wielkości cząstek dla α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC z zastosowaniem metody homogenizacji wysokociśnieniowej. Wszystkie pomiary wykonywano po 1, 3, 7, 15 i 30 dniu od momentu syntezy nanocząstek. Próbki nanostrukturalnych nośników lipidowych przechowywano w temperaturze 4, 25 i 40 °C (bez dostępu światła). Omówienie wyników dotyczyło głównie analizy zmian parametru $d(0,9)$.

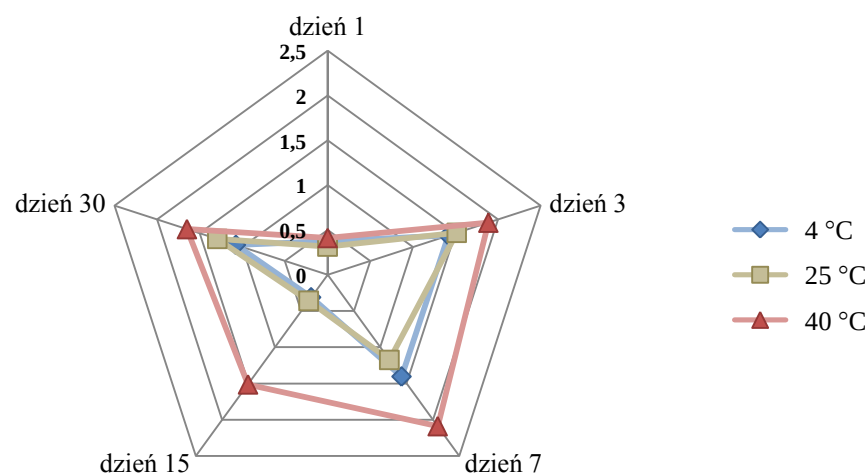
A) $d(0,1)$ [μm]



B) $d(0,5)$ [μm]



C) $d(0,9)$ [μm]

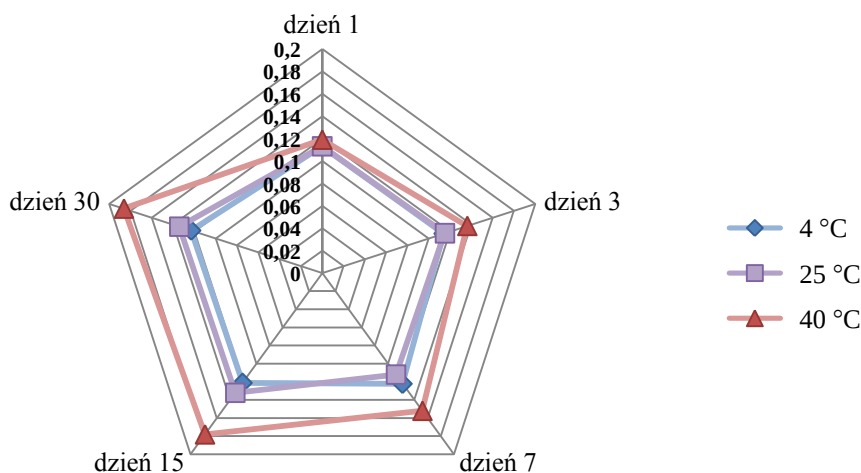


Rysunek 91. Porównanie rozkładu wielkości cząstek dla NLC inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem metody mikroemulgowania.

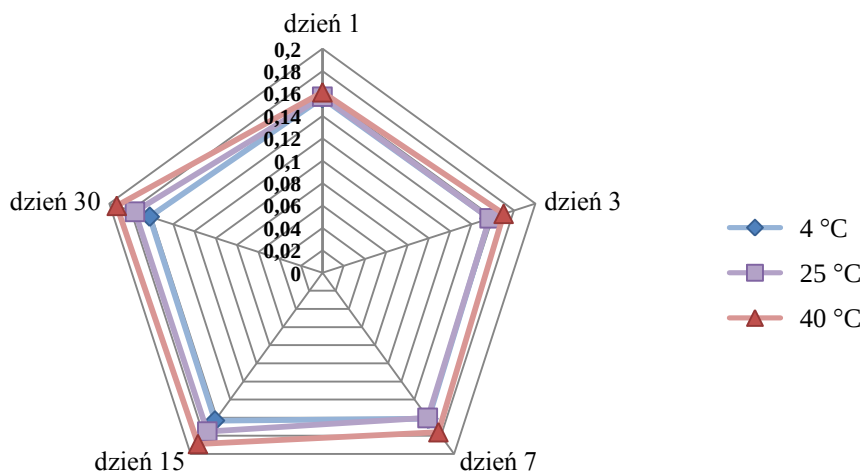
Zaobserwowano, że wartości parametru $d(0,9)$ dla NLC inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem metody mikroemulgowania (rys. 91-C) utrzymywały się na podobnym poziomie we wszystkich badanych temperaturach (4, 25 i 40 °C). W 1 dniu pomiarów, liczonym od dnia syntezy, wartości $d(0,9)$ mieściły się bowiem w zakresie od 0,316 μm (25 °C), 0,372 μm (4 °C) oraz 0,411 μm (40 °C) i utrzymywały na podobnym poziomie także w 3 dniu. Wyraźne różnice pomiędzy wartościami parametru $d(0,9)$ były widoczne od 7 dnia pomiarów. Największy rozkład wielkości cząstek odnotowano w temp. 40 °C (2,088 μm), natomiast najmniejszy w temp. 25 °C (1,173 μm). Po upływie kolejnego tygodnia odnotowano znaczące różnice wartości $d(0,9)$ pomiędzy NLC(ME) przechowywanymi w temp. 40 °C (1,512 μm), a pozostawionymi w pozostałych badanych temperaturach: 4 °C (0,312 μm) oraz 25 °C (0,359 μm). Po miesiącu badań ponownie zaobserwowano zbliżone wartości $d(0,9)$, których wartości wahały się w granicach od 1,075 μm (4 °C) do 1,651 μm (40 °C). Warto zaznaczyć, że jedynie wyniki otrzymane dla próbki zmierzonej w temperaturze 25 °C korelowały z tymi, które uzyskano podczas pomiarów Z-Ave (zob. tab. 73).

Otrzymane wyniki dowiodły, że korzystny wpływ na wartość parametru $d(0,9)$ badanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem metody mikroemulgowania był widoczny na skutek przechowywania próbek w temperaturze pokojowej lub w temp. 4 °C. W przypadku parametrów $d(0,5)$ oraz $d(0,1)$, zmierzonych dla α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC przechowywane w temp. 4, 25 i 40 °C (rys. 91-A i B), odnotowano analogiczne zmiany jak w przypadku $d(0,9)$. Na podstawie przeprowadzonej analizy rozkładu wielkości cząstek dla badanych NLC(ME) zauważono, że po tygodniu od dnia syntezy rozpoczyna się stopniowy proces agregacji cząstek, którego intensywność ulega nasileniu w zależności od temperatury otoczenia.

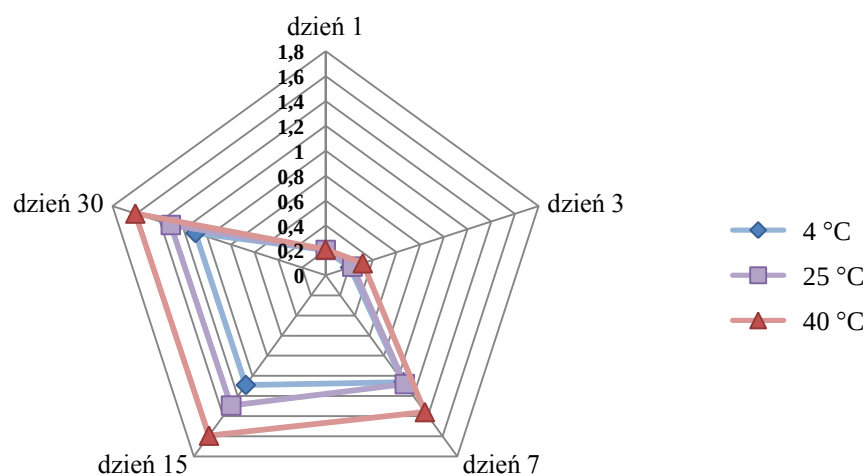
A) $d(0,1)$ [μm]



B) $d(0,5)$ [μm]



C) $d(0,9)$ [μm]



Rysunek 92. Porównanie rozkładu wielkości cząstek dla NLC inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem metody homogenizacji wysokociśnieniowej.

Wartości parametru $d(0,9)$ przedstawione na rys. 92-C dla NLC inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem metody homogenizacji wysokociśnieniowej utrzymywały się na podobnym poziomie we wszystkich badanych temperaturach (4, 25 i 40 °C) przez cały okres badań, a pierwsze różnice odnotowano po drugim tygodniu liczonym od dnia syntezy NLC. Ponadto, w 1 i 3 dniu pomiarów, wartości $d(0,9)$ mieściły się w podobnym zakresie i wynosiły odpowiednio od 0,202 μm (4 °C; dzień 1) do 0,208 μm (40 °C, dzień 1) oraz od 0,207 μm (4 °C, dzień 3) do 0,315 μm (40 °C, dzień 3). Z kolei po tygodniu analiz zaobserwowano zwiększony rozkład wielkości we wszystkich warunkach temperaturowych, który wahał się od 1,062 μm (4 °C) do 1,359 μm (40 °C). Wyniki te były zgodne z uzyskanymi wartościami Z-Ave, dla których w 7 dniu pomiarów odnotowano stopniowy przyrost wielkości cząstek (zob. tab. 20). W 15 dniu pomiarów zauważono utrzymujące się zwiększone od tygodnia wartości $d(0,9)$, które utrzymywały się na podobnym poziomie przez kolejne dni i tygodnie. W rezultacie, po miesiącu badań najniższe wartości $d(0,9)$ odnotowano dla próbek α -T-NLC(HPH) przechowywanych w temp. 4 °C (1,098 μm), najwyższe $d(0,9)$

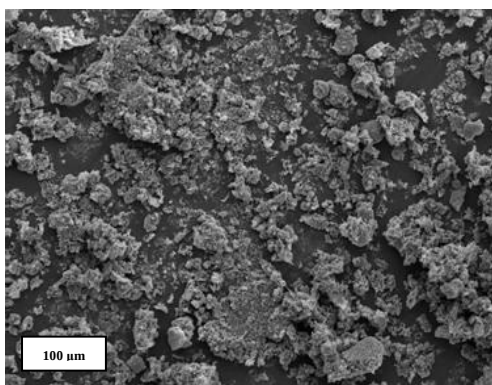
odnotowano natomiast dla próbek pozostawionych w 40 °C (1,607 μm). Wartości pośrednie wykazały NLC przechowywane w temp. 25 °C (1,307 μm). Warto podkreślić, że pomimo wzrostu wielkości cząstek po 7 dniu badań, wszystkie wyniki otrzymane dla próbek α -T-NLC(HPH) były do siebie zbliżone we wszystkich badanych temperaturach i dodatkowo korelowały z pomiarami Z-Ave (zob. tab. 73).

Otrzymane wyniki dowiodły, że korzystny wpływ na wartość parametru $d(0,9)$ badanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem metody homogenizacji był widoczny na skutek przechowywania próbek w temperaturze pokojowej zarówno dla parametru $d(0,9)$, jak również dla $d(0,5)$ oraz $d(0,1)$ (rys. 92-A i B). Ponadto dowiedziono, że wartości rozkładu wielkości cząstek otrzymywanych metodą homogenizacji wysokociśnieniowej utrzymywały się na bardziej stabilnym poziomie niż w przypadku nanocząstek o tym samym składzie, ale otrzymywanych metodą mikroemulgowania.

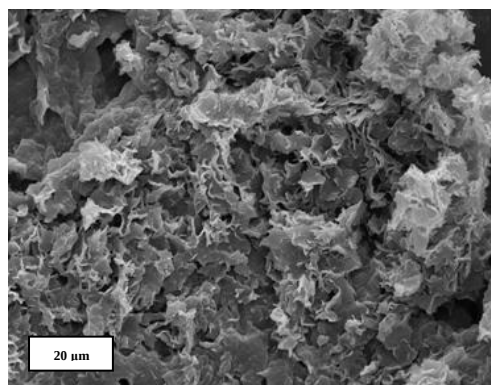
6.15. Morfologia otrzymanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem

Obrazy nanostrukturalnych nośników lipidowych inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem metody mikroemulgowania lub homogenizacji wysokociśnieniowej otrzymano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego *Carl Zeiss SMT Evo Series* (rys. 93). Analizę przy różnym powiększeniu przeprowadzono dla próbek, poddanych wcześniejszemu procesowi liofilizacji (suszeniu sublimacyjnemu). Za pomocą SEM obserwowano strukturę powierzchni oraz porowatość NLC.

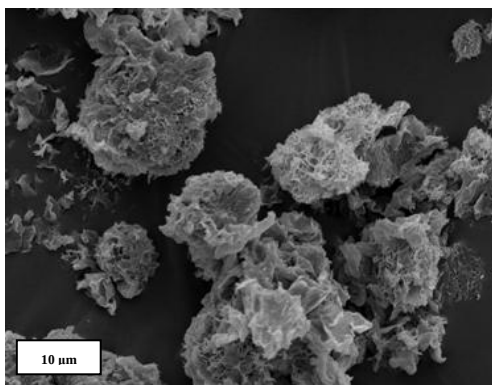
A)



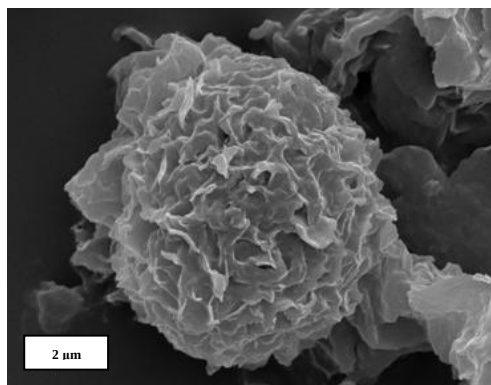
B)



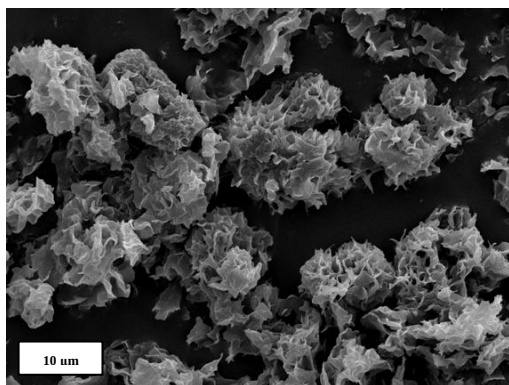
C)



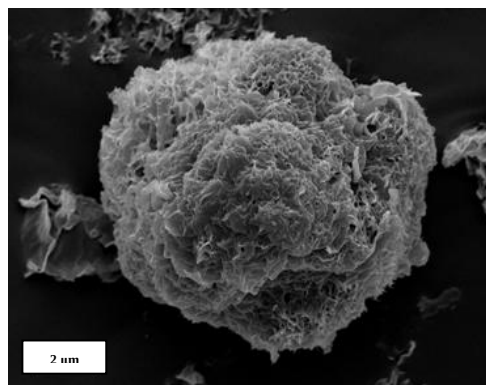
D)



E)



F)



Rysunek 93. Zdjęcia SEM dla NLC inkorporowanych α -tokoferolem.

Na rysunku 93-A został przedstawiony obraz liofilizatu α -T-NLC(ME) przy powiększeniu 100 μm , które wykonano po miesiącu od dnia syntezy nanocząstek. Zdjęcie umożliwiło obserwację NLC o wielkości 10–400 μm , przechowywanych w temperaturze 25 $^{\circ}\text{C}$. Na podstawie otrzymanego obrazu NLC zauważono aglomerację cząstek oraz ich nieregularny kształt i powierzchnię lipidową.

Z kolei na rysunku 93-B przedstawiono zdjęcie pojedynczej cząstki α -T-NLC(ME) o wielkości ok. 100 μm (skala 20 μm). Ponownie zaobserwowano nieregularny kształt cząstki i chropowatość powierzchni. Przy większym powiększeniu tej samej próbki (rys. 93-C) zaobserwowano nanocząstki o wielkości 10–100 μm . Na podstawie otrzymanego obrazu, ponownie zauważono aglomerację otrzymanych nanocząstek oraz nieregularność ich kształtu oraz powierzchni. Ponadto, na rysunku 93-D przedstawiono obraz pojedynczej cząstki liofilizatu o wielkości około 20 μm (skala 2 μm). Pomimo kulistego kształtu, widoczna była nieregularna powierzchnia cząstki.

Obraz próbki α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC(HPH), przechowywanej przez 30 dni w temperaturze 25 $^{\circ}\text{C}$, przedstawiono na rysunku 93-E. Przy zastosowaniu skali 10 μm , była możliwa obserwacja nanocząstek o wielkości w granicach 10–100 μm . Na podstawie otrzymanego obrazu zauważono agregaty nanocząstek, jak również częściowo kulisty kształt oraz nieznaczną chropowatość powierzchni. Dodatkowo na rysunku 93-F przedstawiono obraz pojedynczej cząstki liofilizatu, otrzymanego metodą homogenizacji wysokociśnieniowej (skala 2 μm). Zauważono, że otrzymane NLC ponownie charakteryzowała nieregularna powierzchnia cząstki.

6.16. Badania aplikacyjne i ocena skuteczności działania MSO

Badania aplikacyjne przeprowadzono w celu oceny działania na skórę człowieka oleju z nasion Meadowfoam, który w syntezie NLC pełnił funkcję naturalnej matrycy lipidowej. Z uwagi na obecność w swym składzie różnorodnych kwasów tłuszczowych o licznych korzystnych właściwościach na zdrowie i poprawę wyglądu człowieka, oleje roślinne znajdują się od kilku lat w obszarze badań naukowców. Stanowiąc jeden z elementów budowy nanostrukturalnych nośników, wybrany do badań olej z nasion Meadowfoam mógł nie tylko przyczynić się do zwiększenia biodegradowalności nanonośnika, ale także zwiększyć kompatybilność całej nanocząstki lipidowej dostarczanej przez skórę do organizmu człowieka [160].

6.16.1. Analiza właściwości fizykochemicznych badanych preparatów kosmetycznych

Przed przystąpieniem do testów *in vivo*, dokonano oceny właściwości fizykochemicznych otrzymanych preparatów kosmetycznych. W tabeli 74 przedstawiono otrzymane wyniki dla analizowanych wielkości fizykochemicznych, wśród których znalazły się: wartość pH, lepkość, rozkład wielkości cząstek czy stabilność kremu I i II, która została oceniona na podstawie pomiarów potencjału zeta.

Tabela 74. Otrzymane wyniki badanych preparatów kosmetycznych dla poszczególnych wielkości fizykochemicznych [24].

Badana wielkość		A) Wartość pH					
Nazwa preparatu		KREM I			KREM II		
Temperatura przechowywania		4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
dzień 0		–	7,0	–	–	6,9	–
dzień 7		6,7	7,0	6-7,0	6,9	7,0	6-7,0
dzień 15		7,0	6,8	6-7,0	6,8	6,9	6-7,0
dzień 30		6,8	6,9	6,0	6,8	6,9	6,0
dzień 60		6,8	7,0	6,0	6,9	7,0	6,0
Badana wielkość		B) Lepkość [mPa·s]					
Temperatura przechowywania		4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
Prędkość wrzeciona [obr/min]		1,5	2	–	1,5	2	–
dzień 0		–	123 883	–	–	195 877	–
dzień 7		204 670	120 997	–	299 043	193 420	–
dzień 15		206 860	120 780	–	300 843	190 823	–
dzień 30		208 373	118 223	–	304 143	191 913	–
dzień 60		200 333	116 197	–	296 767	149 777	–
Badana wielkość		C) Rozkład wielkości cząstek					
Temperatura przechowywania		4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
dzień 0	d(0,1) [µm]	–	0,410	–	–	0,378	–

	d(0,5) [μm]	–	1,692	–	–	1,438	–
	d(0,9) [μm]	–	7,948	–	–	7,339	–
dzień 30	d(0,1) [μm]	0,405	0,375	0,317	0,324	0,385	0,292
	d(0,5) [μm]	1,667	1,673	1,604	1,377	1,463	1,482
	d(0,9) [μm]	4,566	5,114	3,655	8,218	6,617	4,337
dzień 60	d(0,1) [μm]	0,421	0,316	0,403	0,401	0,353	0,400
	d(0,5) [μm]	1,668	1,592	1,738	1,451	1,539	1,566
	d(0,9) [μm]	5,216	5,181	4,329	6,946	4,570	4,521
Badana wielkość		D) Potencjał Zeta [mV]					
Temperatura przechowywania		4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
dzień 0		–	± 64	–	–	± 69	–
dzień 7		± 51	± 28	± 40	± 41	± 38	± 65
dzień 15		± 51	± 30	± 43	± 44	± 37	± 65
dzień 30		± 49	± 28	± 42	± 41	± 36	± 67
dzień 60		± 40	± 32	± 41	± 60	± 34	± 46

W przypadku **wartości pH** (tab. 74-A) mierzonych w ciągu 60 dni od dnia produkcji preparatów i przechowywanych w różnych temperaturach (4, 25 i 40 °C) odnotowano, że zarówno dla kremu I i II pozostawionych w temp. 25 °C wartości pH mieściły się w granicach 6,8 – 7,0. Oszacowano, że dla obu preparatów wartości pH wahały się na poziomie poniżej 1% od wyjściowej wartości pomiarowej (dzień 0). Z kolei pod wpływem przechowywania kremu I w temp. 4 °C zaobserwowano niewielką zmianę wartości pH, m.in. w 7 dniu odnotowano spadek pH z 7,0 do 6,7, podczas gdy po 60 dniach wartość pH ponownie wzrosła (6,8). Tym samym obliczono, że zmiany wartości pH mieściły się na poziomie 3% od wyjściowej wartości pomiarowej. Dla kremu II (zaw. MSO) odnotowano porównywalne wartości pH, wynoszące od 6,8 do 7,0. W temp. 40 °C wartości pH dla obu badanych kremów zmieniły nieznacznie odczyn z pH = 7,0 do około 6,0. Podsumowując, analiza wartości pH otrzymanych preparatów wskazywała na prawidłowy dla tego typu produktów kosmetycznych odczyn lekko kwaśny lub obojętny (pH = 6,0 – 7,0). Warto dodać, że w przypadku kremu II, zawierającego MSO zauważono mniejsze wahania wartości pH, co mogło świadczyć o pozytywnym wpływie oleju naturalnego na odczyn pH otrzymanego preparatu [24].

Lepkość kremów I i II (tab. 74-B) była analizowana także w ciągu 60 dni od dnia produkcji preparatów, które pozostawiono w temp. 4 i 25 °C. Natomiast dla preparatów przechowywanych w temp. 40 °C pomiar lepkości został pominięty z powodu zbyt małej średnicy fiolek, uniemożliwiającej zanurzenie wrzeciona pomiarowego w badanym kremie. Badania lepkości wykazały, że krem II (zawierający MSO) odznaczał się w końcowym etapie badań (dzień 60) dużo wyższą lepkością, wynoszącą 296 767 mPa·s (4 °C) oraz 149 777 mPa·s (25 °C) w porównaniu do kremu I (pozbawionego składnika aktywnego),

dla którego wartości lepkości wynosiły odpowiednio 200 333 mPa·s (4 °C) oraz 296 767 mPa·s (25 °C). Różnice te mogły wynikać m.in. z obecności MSO w składzie kremu II, którego właściwości wpłynęły na reologię preparatu, powodując wzrost jego lepkości [24]. Ponadto, nie zaobserwowano znaczących zmian lepkości badanych formułacji w czasie. Istotne znacznie miała natomiast temperatura przechowywania preparatów, bowiem w temp. 4 °C dla kremu I i II odnotowano większe wartości lepkości w porównaniu do tych samych preparatów przechowywanych w temp. 25 °C, a różnica pomiędzy lepkością testowanych kremów wynosiła prawie 100 000 mPa·s. Analiza otrzymanych wartości lepkości zapewniła potwierdzenie właściwości adhezyjnych oleju Meadowfoam, dzięki którym następuje nie tylko wzrost lepkości, ale również zdecydowana poprawa trwałości preparatów kosmetycznych, zawierających MSO w swoim składzie [88].

W tab. 74-C przedstawiono zmiany **rozkładu wielkości cząstek**, zmierzone dla kremu I i II w dniu produkcji preparatów (dzień 0), a także po 30 oraz 60 dniach przechowywania temperaturze 4, 25 oraz 40 °C. Pomiarów dokonywano również w 7 i 15 dniu, jednak z uwagi na brak istotnych różnic pomiędzy otrzymanymi wynikami rozkładu wielkości cząstek (dla kremu I i II) pominięto ich interpretację w dalszym toku dyskusji. Z kolei analiza wyników badanych preparatów kosmetycznych (tab. 74-C) dotyczyła głównie parametru $d(0,9)$, oznaczającego wielkość średnicy cząstek, stanowiących 90% udziału objętościowego. Tym samym zaobserwowano, że wartości parametru $d(0,9)$ dla obu kremów były podobne w dniu produkcji, a ich wartości wynosiły 7,948 μm (krem I) oraz 7,339 μm (krem II). Oba kremy przechowywane przez 60 dni w temp. 25 °C odznaczały się w rezultacie zmniejszonym rozkładem średnicy cząstek w porównaniu do wartości początkowej parametru $d(0,9)$. W przypadku kremu II, 90% udziału objętościowego cząstek tego preparatu posiadało średnicę mniejszą niż 4,570 μm , podczas gdy w przypadku kremu I < 5,181 μm . Zatem wartości parametru $d(0,9)$ w końcowym dniu pomiarów utrzymywały się na podobnym poziomie dla obu preparatów. Wartości $d(0,9)$ dla kremów przechowywanych w temp. 4 °C również były do siebie zbliżone, jednak po dwóch miesiącach pomiarów osiągnęły wartości nieznacznie wyższe dla kremu II (6,946 μm), niż dla jego odpowiednika bez MSO (5,216 μm). Ogółem, różnica pomiędzy wartościami otrzymanymi dla obu kremów w 60 dniu pomiarów wynosiła około 2 μm . Warto podkreślić, że w przypadku preparatów poddanych działaniu podwyższonej temperatury (40 °C), wartość parametru $d(0,9)$ była najniższa spośród wszystkich wartości badanych w temp. 4 i 25 °C po dwóch miesiącach analiz dla obu preparatów (krem I: 4,329 μm , krem II: 4,521 μm). W dodatku, dla pozostałych parametrów $d(0,1)$ oraz $d(0,5)$ nie odnotowano znaczących zmian dla kremu I oraz II, przechowywanych w trzech różnych temperaturach. Podsumowując, rozkład wielkości cząstek testowanych preparatów kosmetycznych wskazywał na bardzo dobrą stabilność zarówno kremu I, jak i kremu II. Na podstawie otrzymanych wyników, nie zaobserwowano procesów aglomeracji cząstek, natomiast szczególną uwagę zwrócono na odporność termiczną badanych preparatów I i II, która utrzymywała się w ciągu minimum dwóch miesięcy przechowywania kremów w temp. 40 °C [24].

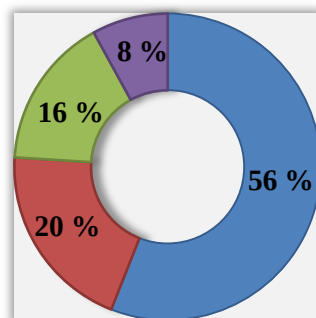
Otrzymane wyniki dotyczące pomiarów **potencjału zeta** (tabeli 74-D) dowiodły o bardzo dobrej stabilności obu preparatów, bowiem wartości bezwzględne ZP przekraczały umowną granicę $|\pm 30 \text{ mV}|$, świadczącą o stabilności analizowanej próbki. W przypadku kremu II (zaw. MSO) wartości ZP były nie tylko wyższe w porównaniu do kremu I, ale dodatkowo potwierdzały wysoką odporność formułacji II na działanie wysokiej temperatury. Odnotowano bowiem, że wartość potencjału zeta kremu I była o $|\pm 20 \text{ mV}|$ wyższa względem

kremu II, który także przechowywano temp. 40 °C. Tym samym, za pomocą pomiarów ZP dowiedziono, że preparaty zawierające olej Meadowfoam odznaczają się wysoką odpornością pod wpływem działania wysokich temperatur, wpływając jednocześnie na wzrost stabilności produktów zawierających go w swoim składzie [24, 88].

6.16.2. Testy *in vivo*

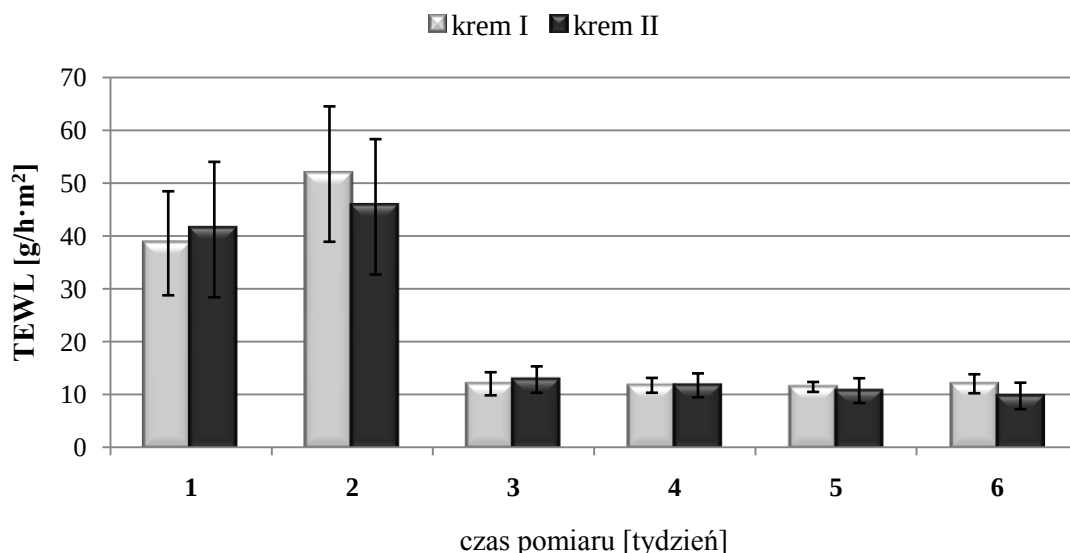
Na podstawie przeprowadzonych badań aplikacyjnych, wszystkich 25 uczestników podzielono na 4 grupy (rys. 94), w których zaobserwowano:

- pozytywne zmiany wartości parametrów
- negatywne zmiany wartości paramterów
- brak zmian wartości parametrów
- reakcje podrażnieniowe



Rysunek 94. Procentowy wpływ działania kremów I i II na skórę 25 uczestników badań.

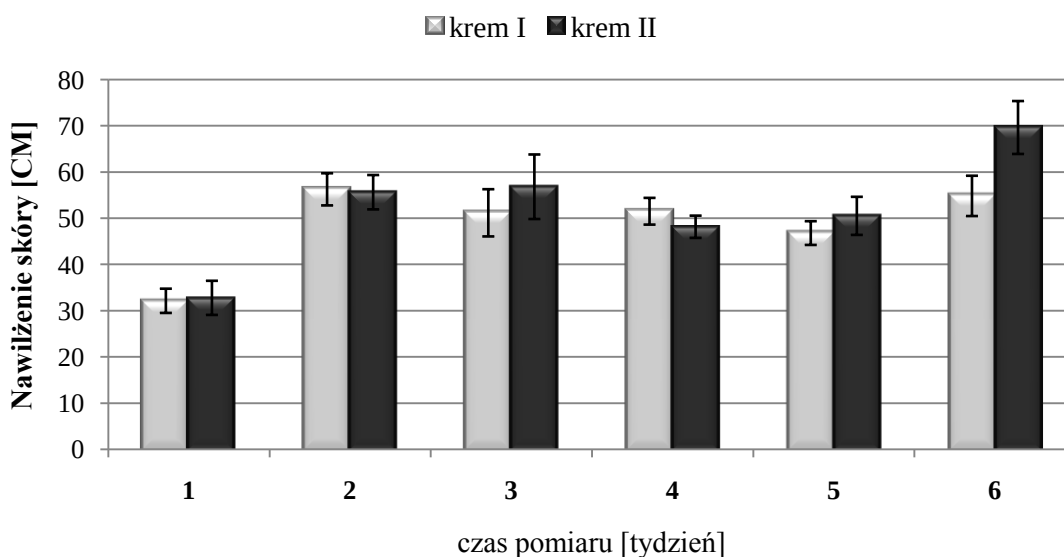
Zgodnie z powyższym podziałem, na podstawie wykresów (rys. 95 i 96) dla wybranych uczestników przedstawiono i zinterpretowano pozytywny wpływ kremów I i II na zmiany wartości TEWL oraz stopnia nawilżenia odnotowane w ciągu 6 tygodni badań [24].



Rysunek 95. Przykładowe pozytywne zmiany wartości TEWL.

Na rysunku 95 przedstawiono pozytywne zmiany parametru TEWL spowodowane aplikacją przygotowanych kremów w trakcie 6 tygodni testów aplikacyjnych. Pierwszy tydzień obejmował pomiary przed aplikacją badanych kremów. Krem I stanowił próbę kontrolną (pozbawioną MSO), natomiast krem II zawierał w swym składzie olej roślinny (MSO), pełniący funkcję składnika aktywnego.

Na podstawie sporządzonego wykresu (rys. 95) zauważono, że w pierwszych dwóch tygodniach badań wartość TEWL była krytycznie wysoka, tj. $> 30 \text{ g/h}\cdot\text{m}^2$ (zob. tab. 26, rozdz. 4.4.4.1), zarówno w przypadku lewego, jak i prawego przedramienia uczestnika badań. Jednak od drugiego tygodnia aplikacji kremów (tydzień 3) odnotowano znaczące obniżenie wartości TEWL – do około $11\text{--}12 \text{ g/h}\cdot\text{m}^2$. W rezultacie, stan skóry probanta oceniono pozytywnie, bowiem spełniała ona wyniki skóry zdrowej (zob. tab. 26). Ponadto zaobserwowano, że efekt niskiego poziomu TEWL utrzymywał się w kolejnych tygodniach badań, jak również po zakończeniu testów (tydzień 6). Co więcej, zmniejszenie wartości TEWL było bardziej widoczne po aplikacji kremu II, dzięki któremu wartość TEWL osiągnęła w końcowym efekcie wartości poniżej $10 \text{ g/h}\cdot\text{m}^2$, odpowiednie dla skóry bardzo zdrowej (rozdz. 4.4.4.1).



Rysunek 96. Przykładowe pozytywne zmiany wartości stopnia nawilżenia skóry.

Na rysunku 96 przedstawiono pozytywne zmiany stopnia nawilżenia skóry powstałe po aplikacji testowanych kremów przez okres 6 tygodni. Tak samo jak w przypadku pomiarów TEWL, pierwszy tydzień dotyczył pomiarów wykonanych przed aplikacją badanych preparatów – kremu I (próba kontrolna, bez MSO) oraz kremu II (zaw. MSO).

Na podstawie sporządzonego wykresu (rys. 96) zaobserwowano, że stopień nawilżenia skóry uczestnika badań wynosił niewiele powyżej 30 CM, co oznaczało skórę suchą (zob. tab. 27, rozdz. 4.4.4.2). Natomiast w kolejnych tygodniach badań, u ponad połowy uczestników testów odnotowano znaczący wzrost poziomu nawilżenia skóry pod wpływem działania obu preparatów. Istotny był fakt, że większy przyrost nawilżenia zauważono w przypadku kremu II, pod wpływem którego skóra sucha stała się dostatecznie nawilżona już po pierwszym tygodniu badań, przekraczając wartości 50,54 CM (zob. tab. 27). Ponadto, efekt ten był widoczny zarówno w kolejnych tygodniach badań, jak i po zaprzestaniu stosowania preparatów (tydzień 6).

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Wśród powszechnie stosowanych związków z rodziny terpenoidów, niezwykle cenionych za swoje właściwości fizykochemiczne, wymienia się między innymi α -pinen, cytral, geraniol oraz limonen. Z uwagi na szeroką aktywność biologiczną, monoterpény są od bardzo dawna stosowane w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym, podobnie jak retinol, koenzym Q₁₀ czy α -tokoferol – substancje o silnym działaniu przeciwutleniającym. Jednak z uwagi na wysoką lotność monoterpény, jak również uleganie rozkładowi pod wpływem wysokiej temperatury Retinolu 50 C i koenzymu Q₁₀ czy też światła (α -tokoferol), enkapsulacja tych substancji aktywnych w nanocząstki lipidowe okazała się alternatywną metodą poprawienia ich stabilności oraz poprawy skuteczności działania w trakcie podawania przezskórnego.

Celem przedstawianej pracy doktorskiej było porównanie właściwości fizykochemicznych zarówno monoterpény inkorporowanych do stałych nanocząstek lipidowych (SLN), jak również Retinolu 50 C, koenzymu Q₁₀ i α -tokoferolu enkapsulowanych w nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC). Nanocząstki lipidowe zbudowane są z biodegradowalnych i biokompatybilnych lipidów, będących ciałami stałymi w temperaturze pokojowej i w temperaturze ciała. NLC różnią się od SLN pod względem nanostrukturalnej matrycy lipidowej, będącej mieszaniną lipidów stałych i ciekłych (która w przypadku SLN złożona jest tylko z lipidów stałych). W rezultacie, w przypadku NLC powstaje mniej uporządkowana matryca lipidowa, która może zawierać większe ilości substancji czynnej, zapobiega jej uwalnianiu podczas przechowywania, a także umożliwia bardziej elastyczną modulację uwalniania inkorporowanego składnika.

W ramach badań niniejszej pracy doktorskiej oceniano m.in. w jaki sposób interakcje między zawartymi w nanocząstkach substancjami aktywnymi a matrycą lipidową wpływają na ich profil uwalniania oraz bioaktywność. Dodatkowo, wszystkie nanocząstki lipidowe zostały zoptymalizowane w badaniu czynnikowym (ang. *factorial design*) w zakresie wielkości i zawartości substancji czynnej. Wpływ zmian polimorficznych w matrycy lipidowej SLN/NLC na strukturę przeciwiał po umieszczeniu w nanocząstkach i w trakcie przechowywania monitorowano za pomocą nieinwazyjnych biofizycznych metod. Weryfikacja koncepcji w niniejszej dysertacji nastąpiła także w badaniu *in vitro* poprzez ocenę działania przeciwzapalnego i cytotoksycznego na przykładzie wybranego monoterpenu enkapsulowanego w nanocząstki lipidowe oraz wewnątrzkomórkowe podanie do linii komórkowych skóry (HaCaT i A431). Dotychczas naukowcom udało się z powodzeniem opracować zastosowanie SLN/NLC do enkapsulacji linalolu, jak również palmitynianu retinolu, koenzymu Q₁₀ czy α -tokoferolu. Jednak zupełną nowością przedstawionych badań była m.in. optymalizacja metod syntezy nanocząstek lipidowych, zawierających w swej budowie lub też całkowicie zbudowanych ze składników organicznych.

Po przeprowadzonych badaniach w ramach pracy doktorskiej i na podstawie uzyskanych wyników otrzymano następujące wnioski:

I. STAŁE NANOCZĄSTKI LIPIDOWE INKORPOROWANE MONOTERPENAMI

Dobór lipidów dla monotерpenów

- ✓ Po dokonaniu selekcji stałych lipidów (*lipid screening*), najbardziej kompatybilnym lipidem dla wszystkich badanych monotерpenów okazał się Imwitor[®] 900 K – monostearynian glicerolu, którego długi łańcuch alkilowy oraz amfifilowy charakter struktury chemicznej zapewniały dobrą stabilność dla wszystkich polarnych i niepolarnych związków.

Analiza statystyczna

- ✓ W oparciu o analizę statystyczną, dla wszystkich badanych monotерpenów ustalono projekt czynnikowy 2², w którym zmiennymi niezależnymi był surfaktant – Poloxamer 188 oraz stały lipid – Imwitor[®] 900 K (wybrany podczas *lipid screening*), podczas gdy na zmienne zależne wybrano: wielkość cząstek (Z-Ave), indeks polidispersyjności (PDI) i potencjał zeta (ZP).
- ✓ Na podstawie optymalizacji metod syntezy do produkcji SLN, wybrano jednakowy skład dla wszystkich badanych monotерpenów, który obejmował 1% wag. składnika aktywnego (wybrany monotерpen), jak również 2; 4 lub 8% wag. stałego lipidu (Imwitor[®] 900 K) oraz 1,25; 2,5 lub 5% wag. surfaktantu (Poloxamer 188).
- ✓ Na podstawie analizy wariancji ANOVA wyznaczono wartość graniczną $\alpha = 0,15$; $\alpha = 0,1$ albo $\alpha = 0,05$ (tzn. istotność statystyczną równą odpowiednio 85%; 90%; 95%).
- ✓ Za pomocą diagramów Pareto potwierdzono istotność statystyczną na wybranym poziomie 85 – 95% dla próbek monotерpenów enkapsulowanych w SLN oraz dla próby odniesienia w przypadku oddziaływania czynników i interakcji między nimi na wszystkie zmienne zależne (Z-Ave, PDI, ZP).
- ✓ Na podstawie trójwymiarowych wykresów powierzchniowych dopasowanej odpowiedzi (obrazów 3D), ściśle związanych z diagramami Pareto, przedstawiono efekty oddziaływań zmiennych niezależnych (Poloxamer 188 i Imwitor[®] 900 K) na zmienne zależne – wielkość cząstek (Z-Ave), wartości współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjał zeta (ZP).
- ✓ Z uwagi na niejonowy charakter surfaktantu, który utworzył stabilizowaną sferycznie zaadsorbowaną warstwę polimeru na powierzchni nanocząstek, wartości potencjału zeta wynosiły $|\pm 0 \text{ mV}|$ dla wszystkich otrzymanych SLN inkorporowanych monotерpenami.

Porównanie Z-Ave, PDI i ZP wszystkich otrzymanych SLN inkorporowanych monotерpenami

- ✓ Otrzymane wartości Z-Ave dla poszczególnych próbek SLN dowiodły, że rodzaj inkorporowanego monotерpenu mógł wpłynąć na rozmiar otrzymywanych nanocząstek.
- ✓ Po 24 godzinach przechowywania wszystkich próbek w temperaturze 4, 25 i 40 °C następował stopniowy wzrost średniej wielkości cząstek, charakterystyczny dla zjawiska aglomeracji/agregacji cząstek, które nasilało się w kolejnych dniach/tygodniach badań.

- ✓ Najbardziej optymalną temperaturą przechowywania wszystkich próbek monoterpenów enkapsulowanych w SLN było 25 °C, bowiem zarówno średnia wielkość nanocząstek wahała się w granicach od 127 nm (α -pinen) do 431 nm (cytral), przy PDI wynoszącym mieszczącym się we wszystkich przypadkach w prawidłowym zakresie tj. $< 0,30$ j.u.

Porównanie stabilności otrzymanych SLN inkorporowanych monoterpenami z wykorzystaniem analizatora dyspersji LUMiSizer®

- ✓ We wszystkich analizowanych próbkach, najpóźniej po tygodniu od dnia produkcji SLN, profile transmisyjne wskazywały na wyższą niestabilność w porównaniu analizą w dniu syntezy nanocząstek.
- ✓ Na podstawie uzyskanych wyników wywnioskowano, że wysoka lotność wszystkich testowanych monoterpenów znacząco wpływała na stabilność syntezowanych nanodyspersji.
- ✓ Wraz z upływem czasu widoczny był proces flokulacji (nieodwracalny), spowodowany m.in. rosnącymi wielkościami cząstek (zwłaszcza dla próbki limonen-SLN) oraz nasilony przez surfaktant (Poloxamer 188), który w zależności od stężenia posiadał właściwości destabilizujące i stabilizujące.
- ✓ Procesy niestabilności w próbkach SLN korelowały z otrzymanymi wartościami potencjału zeta, tzn. dyspersja SLN była stabilna, gdy odpychanie elektrostatyczne przeważało nad siłami van der Waalsa, natomiast brak odpychania elektrostatycznego (z powodu niskich wartości ZP) sprzyjał aglomeracji cząstek.
- ✓ Zmiany w energii kinetycznej, zmniejszające odpychanie elektrostatyczne i działające na ZP, były zależne od temperatury przechowywania próbek.
- ✓ Wyniki analizy stabilności dowiodły, że monoterpeny enkapsulowane w SLN miały ograniczoną stabilność podczas przechowywania w różnym zakresie temperatur, przy czym temperatura 25 °C okazała się najbardziej optymalną do przechowywania nanocząstek lipidowych.
- ✓ Stabilność dyspersji koloidalnych, takich jak np. SLN, związana była zarówno z migracją cząstek i występującymi w rezultacie procesami niestabilności (np. śmietanowanie, sedymentacja, flokulacja), jak i ze zmianami w rozkładzie wielkości cząstek, które następowały na skutek ich wzajemnego oddziaływania.

Porównanie indeksów niestabilności wszystkich analizowanych monoterpenów enkapsulowanych w SLN

- ✓ Dla wszystkich SLN inkorporowanych monoterpenami najwyższą stabilność po miesiącu analizy zaobserwowano w temperaturze 25 °C, w której indeks niestabilności wynosił $< 0,4$, a otrzymane wyniki dowiodły, że monoterpeny enkapsulowane w SLN mogły być stabilne do zaledwie kilku dni od momentu ich otrzymania.

Analiza prędkości sedymentacji cząstek w otrzymanych próbkach SLN inkorporowanych monoterpunami

- ✓ Na podstawie otrzymanych wyników rozkładu prędkości sedymentacji dla poszczególnych próbek SLN inkorporowanych monoterpunami zaobserwowano, że korelowały one zarówno z kształtem zarejestrowanych profili transmisyjnych, jak również z wartościami indeksów niestabilności.
- ✓ Próbkki cytral/limonen–SLN wykazały ogółem najwyższe przyrosty prędkości dla wszystkich frakcji (zwłaszcza w temp. 25 °C), co przejawiało się najszybciej postępującym procesem śmietanowania i późniejszej sedymentacji spośród wszystkich analizowanych dyspersji nanocząstek.
- ✓ Znaczący przyrost prędkości sedymentacji przekładał się zwłaszcza na większy rozmiar cząstek dla wszystkich próbek (wyniki rozkładu prędkości sedymentacji korelowały z wartościami Z-Ave i PDI).
- ✓ Czas przechowywania próbek w temperaturze pokojowej sprzyjał agregacji cząstek, co z kolei wpływało na stabilność fizyczną nanodyspersji, potwierdzoną za pomocą analizy profili transmisyjnych oraz obliczeń indeksów niestabilności.
- ✓ Węższy rozkład wielkości prędkości sedymentacji obserwowano dla świeżo przygotowanych próbek SLN (próbki jednomodalne) w porównaniu z ich wynikami po tygodniu analizy, co przekładało się na większą stabilność fizyczną.
- ✓ Próbkka geraniol–SLN charakteryzowała się zarówno najniższą prędkością sedymentacji, jak i najwęższą dyspersją spośród wszystkich badanych SLN inkorporowanych wybranymi monoterpunami.
- ✓ Analiza prędkości sedymentacji dla wszystkich badanych próbek wskazała na bardzo szeroki rozkład, świadczący o postępującym procesie agregacji po upływie minimum tygodnia od dnia syntezy. Istnienie takiej wielomodalnej wielkości cząstek wpływało negatywnie na fizyczną stabilność preparatu.

Zintegrowana analiza wyników uzyskanych za pomocą urządzenia LUMiSizer®

- ✓ Uzyskane rezultaty wykazały, że wszystkie świeżo wytworzone SLN inkorporowane monoterpunami były stabilne.
- ✓ Otrzymane profile transmisyjne, wartości indeksu niestabilności oraz niskie prędkości sedymentacji/śmietanowania świadczyły o małym i jednomodalnym rozmiarze cząstek.
- ✓ We wszystkich próbkach (w tym puste–SLN) zaobserwowano znaczący wzrost niestabilności fizycznej już po upływie tygodnia od dnia produkcji, a otrzymane wyniki były zgodne z pomiarami Z-Ave oraz analizą prędkości sedymentacji.

Badanie uwalniania monoterpenu z nanocząstek lipidowych z wykorzystaniem komór dyfuzyjnych Franza

- ✓ Dla wszystkich badanych SLN inkorporowanych monoterpunami widoczne było uwalnianie dwufazowe, tj. z efektem natychmiastowego uwalniania (*burst release*)

substancji czynnej w ciągu pierwszych 15 minut, po których następowało stopniowe tzw. przedłużone uwalnianie (*sustained release*).

- ✓ Szybkie uwalnianie mogło wynikać z faktu, że niektóre z monoterpenów zostały częściowo inkorporowane do zewnętrznej powłoki nanocząstek (*drug-enriched shell*).
- ✓ W zależności od właściwości chemicznych poszczególnych monoterpenów uwolniony został mniejszy (geraniol–SLN) lub większy procent substancji czynnej (cytral/ α -pinen/limonen–SLN).
- ✓ Otrzymane wyniki dowiodły, że zarówno typ uwalniania, jak i ilość uwalnianej substancji aktywnej może zależeć od wartości stopnia lipofilowości, czyli współczynnika podziału P (log P). Tym samym, monoterpeny o niższej lipofilności (cytral, geraniol) pozostawały początkowo „związane” przez dłuższy czas z SLN, podczas gdy α -pinen, posiadający najwyższy stopień lipofilowości został łatwiej uwolniony przez matrycę lipidową.

Obliczenie efektywności enkapsulacji SLN inkorporowanych monoterpenami

- ✓ Najniższy % EE został obliczony dla cytralu (4,34%), ale podobne wartości odnotowano również dla α -pinenu i limonenu, podczas gdy najwyższą wartość % EE obliczono dla geraniolu (43,28%).
- ✓ Najmniejsza ilość uwolniona dla geraniolu mogła świadczyć o jego enkapsulacji w rdzeniu SLN (*drug-enriched core*), w przeciwieństwie do pozostałych monoterpenów, które zostały inkorporowane do matrycy lipidowej nanocząstek.
- ✓ Szybkość uwalniania była tym mniejsza, im wyższą efektywność enkapsulacji posiadał każdy z badanych monoterpenów enkapsulowanych w SLN. Zależność ta może być istotna podczas wyboru substancji aktywnej do formułacji, której właściwości będą zależały od celu terapeutycznego (np. przezskórnego) oraz typu uwalniania: natychmiastowego bądź przedłużonego.

Analiza SLN inkorporowanych monoterpenami z wykorzystaniem dyfrakcji promieni rentgenowskich (XRD)

- ✓ Na podstawie analizy w zakresie niskokątowym zauważono, że najbardziej intensywne refleksy dla wszystkich badanych próbek SLN były widoczne w granicach kąta $2\theta = 1,88^\circ$.
- ✓ W przypadku próbek SLN inkorporowanych geraniolem i α -pinenem mogła zachodzić przemiana polimorficzna do formy metastabilnej β' , natomiast pozostałe próbki SLN przyjmowały stabilną formę β .
- ✓ Analiza w zakresie wysokokątowym i obecność najbardziej intensywnych refleksów dyfrakcyjnych w tych samych zakresach kątów w przypadku wszystkich próbek SLN wskazywała na podobną zawartość substratów krystalicznych dla wszystkich badanych monoterpenów oraz dla próbki referencyjnej.
- ✓ Przeprowadzone analizy struktury krystalicznej pomogły oszacować możliwość pojawienia się zjawisk polimorficznych oraz miały kluczowe znaczenie dla oceny stopnia uporządkowania osiągniętego przez matrycę lipidową.

Analiza stanu krystaliczności SLN inkorporowanych wybranym monoterpenem

- ✓ Na podstawie analizy DSC podczas ogrzewania (od 20 do 120 °C) i chłodzenia (od 120 do 20 °C) wykazano, że we wszystkich analizowanych próbkach SLN procesy topnienia i krystalizacji zachodziły naprzemiennie, a jako pierwszy rozpoczął się proces topnienia ($\Delta H > 0$; reakcja endotermiczna), po czym następował proces krystalizacji ($\Delta H < 0$; egzotermiczna).
- ✓ Po kompleksowej analizie krystaliczności SLN inkorporowanych monoterpenami wywnioskowano, że proces degradacji mógł pojawiać się w pierwszej kolejności w przypadku krystalicznych obszarów cząstki, po czym następowała wolniejsza degradacja w obszarach amorficznych.

Morfologia otrzymanych SLN

- ✓ Na podstawie uzyskanych obrazów stwierdzono obecność zjawiska aglomeracji, jak również nieregularność kształtu oraz widoczną szorstkość struktury nanocząstek.
- ✓ Na podstawie zdjęć ze skalą 100, 10 i 2 μm nie wykryto istotnych różnic w morfologii między próbą odniesienia a SLN inkorporowanymi monoterpenami.

Badania *in vitro* – aktywność przeciwzapalna i cytotoksyczna wybranych monoterpenów enkapsulowanych w SLN

- ✓ Przeprowadzone badania dowiodły, że już przy najniższym badanym stężeniu cytral–SLN hamował wytwarzanie NO aż w 84%, podczas gdy geraniol–SLN w 57% (w tym samym stężeniu).
- ✓ Ponadto, w najwyższych badanych stężeniach aktywność hamowania dla cytralu wynosiła aż 99%, wskazując tym samym na silny potencjał przeciwnowotworowy tego monoterpeny.
- ✓ Obecność cytralu inkorporowanego do SLN znacząco wpłynęła na zmniejszenie żywotności komórek badanej linii nienowotworowej, a wraz ze wzrostem stężenia widoczna była wyraźna redukcja żywotności komórek poddanych działaniu cytral–SLN po 24 i 48 godzinach, co świadczyło o silnym działaniu cytotoksycznym monoterpeny.
- ✓ Stałe nanocząstki lipidowe niezawierające monoterpeny nie wykazały działania cytotoksycznego na te same linie komórkowe.
- ✓ Orzymane wyniki dowiodły, że cytral enkapsulowany w SLN wywoływał znaczące działanie cytotoksyczne po 24 godzinach ekspozycji na linię komórek nowotworowych (A431) w porównaniu z nienowotworową linią komórkową (HaCaT), co wskazywało na silne działanie przeciwnowotworowe tego monoterpeny.

II. NANOSTRUKTURALNE NOŚNIKI LIPIDOWE INKORPOROWANE WYBRANYMI SKŁADNIKAMI AKTYWNYMI

Dobór odpowiedniego lipidu dla Retinolu 50 C

- ✓ Po dokonaniu selekcji stałych lipidów (półsyntetycznych i organicznych), najbardziej kompatybilnym w połączeniu z Retinolem 50 C okazał się Compritol® 888 ATO – behenian glicerolu, o długim łańcuchu alkilowymi amfifilowej strukturze chemicznej, które warunkowały dobrą stabilność dla związków polarnych i niepolarnych.
- ✓ Wśród lipidów stałych pochodzenia organicznego, wysoką „biozgodność” z Retinolem 50 C, wynikającą z obecności długiego łańcucha alkilowego oraz niepolarnego charakteru struktury chemicznej lipidu zapewniał – воск Carnauba.

Porównanie Z-Ave, PDI oraz ZP otrzymanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C

Ret–NLC i półsyntetyczny/organiczny ciekły lipid

- ✓ Naturalny olej z nasion Meadowfoam mógł skutecznie pełnić rolę ciekłego lipidu w syntezie NLC, nie wpływając na znaczący przyrost średniej wielkości cząstek oraz PDI w porównaniu do lipidów półsyntetycznych.
- ✓ Wysoka stabilność oleju, wynikająca z jego unikalnego składu, mogła korzystnie wpływać na stabilność próbek, zwłaszcza poddanych działaniu wysokich temperatur, co przekładało się na wysokie wartości potencjału zeta.
- ✓ Odpowiednie rozcieńczenie mogło wpłynąć na właściwości badanej próbki oraz zmieniać wartości ZP – pomiar w wodzie z dodatkiem SPC stanowił najdokładniejszą analizę potencjału elektrycznego na płaszczyźnie poślizgu.

Ret–NLC półsyntetyczne/organiczne

- ✓ Odpowiednio dobrane składniki naturalne mogły stanowić równie stabilne i skuteczne podłoże do produkcji organicznych NLC, co ich półsyntetyczne zamienniki.
- ✓ We wszystkich przypadkach Z-Ave oraz PDI badanych nanocząstek utrzymywały się na stabilnym poziomie, a brak widocznej agregacji cząstek po miesiącu przechowywania próbek w różnych warunkach temperaturowych (4, 25 i 40 °C) świadczył o stabilności otrzymanych NLC i precyzyjnie dobranych parametrach do produkcji metodą HPH.
- ✓ We wszystkich próbkach wartość bezwzględna ZP znacząco przekroczyła $|\pm 30 \text{ mV}|$, co świadczyło o dobrej stabilności fizycznej, a rozcieńczenie nanocząstek lipidowych w różnych ośrodkach dyspersyjnych mogło znacząco wpłynąć na stabilność badanej próbki (dodatkowa obecność surfaktantu spowodowała znaczący wzrost uzyskanych wartości ZP).
- ✓ Otrzymane wyniki dowiodły, że istnieje możliwość skutecznej syntezy stabilnych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C przy użyciu składników wyłącznie pochodzenia organicznego, zapewniających nie tylko lepszą kompatybilność dla skóry i całego organizmu, ale również zmniejszających ryzyko powstawania ewentualnych działań niepożądanych.

- ✓ W pełni naturalny i biodegradowalny skład NLC w pełni wpisuje się w powszechnie panujący trend „zielonej chemii” i w dodatku wykazuje wyższą wartość dodaną.

Porównanie rozkładu wielkości cząstek otrzymanych NLC inkorporowanych Retinolem 50 C z wykorzystaniem techniki dyfrakcji laserowej

Ret-NLC i półsyntetyczny/organiczny ciekły lipid

- ✓ Na podstawie uzyskanych wartości parametru d(0,9) stwierdzono, że oba rodzaje NLC (zawierające półsyntetyczny lub organiczny ciekły lipid) odznaczały się wysoką stabilnością i odpornością termiczną w temperaturze 40 °C, o czym świadczył m.in. brak zjawiska aglomeracji cząstek w ciągu 30 dni badań.

Ret-NLC półsyntetyczne/organiczne

- ✓ Oba rodzaje NLC odznaczały się wysoką stabilnością, a w żadnej z próbek przez okres 30 dni nie zauważono zmian, wskazujących na rozpoczęcie procesów niestabilności.
- ✓ W przypadku próbki Ret-NLC/Synt najkorzystniejszy wpływ na stabilność próbek zapewniała obniżona temperatura (4 °C), podczas gdy dla próbki Ret-NLC/Org najlepsze rezultaty uzyskano po przechowywaniu próbek w temperaturze pokojowej (25 °C).

Ocena stabilności chemicznej Retinolu 50 C enkapsulowanego w NLC

Ret-NLC i półsyntetyczny/organiczny ciekły lipid

- ✓ W obu rodzajach NLC, Retinol 50 C był najmniej stabilny w próbkach przechowywanych w temp. 40 °C, natomiast największą stabilnością odznaczały się próbki w temp. 25 °C.
- ✓ Z uwagi na wysoką stabilność termicznej oleju Meadowfoam, matryca lipidowa zbudowana z tego naturalnego oleju odznaczała się większą odpornością na działanie wszystkich badanych temperatur w porównaniu do matrycy zawierającej półsyntetyczny lipid.
- ✓ Procent wagowy Retinolu 50 C skutecznie inkorporowanego do matrycy lipidowej (*entrapment efficiency*) wynosił 86% wag. dla Ret-NLC/Mig oraz 90% wag. dla Ret-NLC/MSO, potwierdzając tym samym dobrą stabilność i działanie ochronne matrycy lipidowej po dwóch miesiącach badań w temp. 40 °C.

Ret-NLC półsyntetyczne/organiczne

- ✓ W przypadku obu rodzajów próbek przechowywanych w temp. 4 i 25 °C, zawartość Retinolu 50 C inkorporowanego do matrycy lipidowej (*entrapment efficiency*) po dwóch miesiącach badań wynosiła około 95% wag. stężenia początkowego, podczas gdy w temp. 40 °C: 87% wag. dla Ret-NLC/Synt oraz 94% wag. dla Ret-NLC/Org.
- ✓ W pełni „organiczna” matryca lipidowa NLC może stanowić równie skuteczną ochronę dla enkapsulowanej substancji aktywnej (Retinolu 50 C), w zestawieniu ze swoim półsyntetycznym odpowiednikiem.

Dobór odpowiedniego lipidu dla koenzymu Q₁₀

- ✓ Po przeprowadzeniu selekcji stałych lipidów (półsyntetycznych i organicznych), zarówno zestalony palmitynianu cetylu (Cutina[®] CP), jak i воск pszczeli (Apifil[®] CG) utworzyły mieszaniny jednorodne z koenzymem Q₁₀ w badanych stosunkach, co świadczyło o ich dobrym powinowactwie z badaną substancją aktywną.

Porównanie Z-Ave, PDI oraz ZP otrzymanych NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀

CoQ₁₀-NLC półsyntetyczne/organiczne

- ✓ Wszystkie otrzymane wyniki wskazywały na stopniowo pojawiającą się agregację cząstek, najbardziej widoczną w przypadku próbek CoQ₁₀-NLC pozostawionych w temp. 40 °C.
- ✓ Przyrost wielkości cząstek we wszystkich temperaturach (4, 25 i 40 °C) był nieznacznie mniejszy w organicznych NLC, co także przekładało się na wolniejsze rozpoczęcie zjawiska aglomeracji.
- ✓ Enkapsulacja koenzymu Q₁₀ w NLC zbudowane ze składników wyłącznie pochodzenia naturalnego okazała się możliwa z zachowaniem równie wysokiej stabilności jak w przypadku syntezy NLC z powszechnie stosowanych składników półsyntetycznych.

Porównanie rozkładu wielkości cząstek otrzymanych NLC inkorporowanych CoQ₁₀ techniką dyfrakcji laserowej

CoQ₁₀-NLC półsyntetyczne/organiczne

- ✓ Korzystny wpływ na wartość parametru d(0,9) badanych NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀ zbudowanych wyłącznie z półsyntetycznych/organicznych składników był widoczny w przypadku pozostawienia próbek w obniżonej oraz pokojowej temperaturze.
- ✓ Oba rodzaje NLC odznaczały się stosunkowo dobrą stabilnością przez minimum kilka tygodni od dnia produkcji.

Ocena stabilności chemicznej koenzymu Q₁₀ enkapsulowanego w NLC

CoQ₁₀-NLC półsyntetyczne/organiczne

- ✓ Na podstawie wyników otrzymanych przy użyciu HPLC zauważono, że koenzym Q₁₀ był nieznacznie mniej stabilny we wszystkich próbkach organicznych NLC w porównaniu do NLC syntetycznych.
- ✓ Najmniejsze ilości składnika aktywnego inkorporowano do matrycy lipidowej w obu przypadkach NLC (CoQ₁₀-NLC/Synt; CoQ₁₀-NLC/Org) w temp. 40 °C, natomiast największa ilość CoQ₁₀ została skutecznie inkorporowana (*entrapment efficiency*) dla próbek w temp. 4 °C. Porównywalnie dobrą stabilnością odznaczały się próbki NLC przechowywane w temp. 25 °C.
- ✓ Otrzymane wyniki wykazały dobrą stabilność i skuteczne działanie ochronne zarówno półsyntetycznej, jak i organicznej matrycy lipidowej NLC, które ograniczały utlenianie koenzymu Q₁₀, poprawiając przy tym jego chemiczną stabilność.

Badanie uwalniania koenzymu Q₁₀ z nanocząstek lipidowych z wykorzystaniem aparatu łopatkowego z dyskiem nośnym

- ✓ Dla obu rodzajów NLC inkorporowanych koenzymem Q₁₀ – analogicznie jak w przypadku badanych monoterpenów enkapsulowanych w SLN, zaobserwowano uwalnianie dwufazowe. Polegało ono na początkowym uwalnianiu natychmiastowym (*burst release*), po którym następowało stopniowe przedłużone uwalnianie (*sustained release*), mające zapewnić aktywność substancji czynnej przez dłuższy czas.

Dobór odpowiedniego lipidu dla α -tokoferolu

- ✓ Po osiągnięciu temperatury topnienia charakterystycznej dla każdego z lipidów, dobra kompatybilność z α -tokoferolem charakteryzowała stearynian glicerolu (Softisan[®] 601), monostearynian glicerolu (Imwitor[®] 900 K) oraz behenian glicerolu (Compritol[®] 888 ATO), który następnie został wybrany do dalszych badań z uwagi na najwyższą temperaturę topnienia spośród wszystkich testowanych lipidów. Tym samym, matryca lipidowa nanocząstek mogła pozostać w stanie stałym podczas transportu w głąb skóry.

Porównanie Z-Ave, PDI oraz ZP otrzymanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem

- ✓ Na podstawie uzyskanych wyników zauważono znaczące różnice pomiędzy wynikami (Z-Ave, PDI, ZP) dla NLC inkorporowanych α -tokoferolem syntezowanych za pomocą dwóch odmiennych metod – mikroemulgowania (ME) oraz homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH).
- ✓ Otrzymane wartości potencjału zeta wskazywały na dobrą stabilność wszystkich syntezowanych NLC, przy czym wraz z upływem czasu stabilność α -tokoferolu enkapsulowanego w NLC otrzymanych techniką HPH malała szybciej w porównaniu do nanocząstek syntezowanych techniką ME.

Porównanie rozkładu wielkości cząstek otrzymanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem techniką dyfrakcji laserowej

- ✓ Otrzymane wyniki dowiodły, że korzystny wpływ na wartość parametru d(0,9) badanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem metody mikroemulgowania był widoczny na skutek przechowywania próbek w temperaturze pokojowej lub w temp. 4 °C.
- ✓ Na podstawie przeprowadzonej analizy rozkładu wielkości cząstek dla NLC otrzymanych techniką ME zauważono, że po tygodniu od dnia syntezy rozpoczyna się stopniowy proces agregacji cząstek, którego intensywność ulega nasileniu w zależności od temperatury otoczenia.
- ✓ Otrzymane wyniki dowiodły, że korzystny wpływ na wartość parametru d(0,9) badanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem metody HPH był widoczny na skutek przechowywania próbek w temperaturze pokojowej.
- ✓ Wartości rozkładu wielkości cząstek otrzymanych metodą HPH utrzymywały się na bardziej stabilnym poziomie niż w przypadku nanocząstek o tym samym składzie, ale otrzymywanych metodą ME.

Morfologia otrzymanych NLC inkorporowanych α -tokoferolem

- ✓ Zastosowanie techniki z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego umożliwiło obserwację NLC przy różnym powiększeniu (skala: 100, 20, 10 i 2 μm), dzięki czemu możliwa była m.in. ocena kształtu i powierzchni lipidowej otrzymanych nanośników czy istnienie zjawiska agregacji/aglomeracji cząstek.

Analiza właściwości fizykochemicznych preparatów kosmetycznych do badań aplikacyjnych

- ✓ Analiza wartości pH otrzymanych preparatów wskazywała na odczyn lekko kwaśny lub obojętny ($\text{pH} = 6,00 - 7,00$) – prawidłowy dla tego typu produktów kosmetycznych. Ponadto, w przypadku kremu II, zawierającego MSO, zauważono mniejsze wahania wartości pH, co mogło świadczyć o pozytywnym wpływie oleju naturalnego na odczyn pH otrzymanego preparatu.
- ✓ Analiza otrzymanych wartości lepkości zapewniła potwierdzenie właściwości adhezyjnych oleju Meadowfoam, dzięki którym nastąpił nie tylko wzrost lepkości, ale również zdecydowana poprawa trwałości preparatów kosmetycznych, zawierających MSO w swoim składzie.
- ✓ Rozkład wielkości cząstek testowanych preparatów kosmetycznych wskazywał zarówno na bardzo dobrą stabilność kremu I oraz kremu II, jak również na wysoką odporność termiczną badanych preparatów, która utrzymywała się w ciągu przynajmniej dwóch miesięcy przechowywania kremów w temp. 40 °C.
- ✓ Na podstawie pomiarów ZP wywnioskowano, że preparaty zawierające olej Meadowfoam odznaczały się wysoką odpornością pod wpływem działania wysokich temperatur, wpływając jednocześnie na wzrost stabilności produktów zawierających go w swoim składzie. Dowiedziono zatem, że MSO mógłby sprawdzić się w roli matrycy lipidowej syntezowanych NLC.

Ocena skuteczności działania MSO w testach *in vivo*

- ✓ Pod wpływem działania testowanych preparatów I i II, poziom TEWL został zredukowany do wartości poniżej 10 $\text{g/h}\cdot\text{m}^2$, charakterystycznej dla skóry bardzo zdrowej, a ponadto efekt ten utrzymywał się w kolejnych tygodniach badań, jak również po zakończeniu testów.
- ✓ Pod wpływem aplikacji kremów I i II nastąpił znaczący wzrost poziomu nawilżenia skóry, dzięki czemu stała się ona dostatecznie nawilżona już po pierwszym tygodniu badań (przekraczając wartości 50,54 CM), a efekt ten był widoczny zarówno w kolejnych tygodniach badań, jak i po zaprzestaniu stosowania preparatów.
- ✓ Zarówno zmniejszenie wartości TEWL, jak i wzrost nawilżenia były bardziej widoczne po aplikacji kremu II (zawierającego MSO) niż kremu I, co potwierdzało korzystne działanie na skórę składnika aktywnego.
- ✓ Olej z nasion Meadowfoam jako potencjalny główny element matrycy lipidowej NLC, mógłby pełnić dodatkowe funkcje nawilżająco-pielęgnujące naskórek podczas podawania

nanocząstek inkorporowanych substancją czynną przez skórę. Obecność naturalnego MSO w strukturze nanocząstek zwiększyłaby biodegradowalność i kompatybilność nanonośników, zmniejszając ryzyko wystąpienia działań niepożądanych po podaniu transdermalnym.

8. STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Nanocząstki lipidowe są stosunkowo nowymi substancjami wykorzystywanymi w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym. Przedstawiona rozprawa doktorska zawiera opis budowy stałych nanocząstek lipidowych (ang. *Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) i nanostrukturalnych nośników lipidowych (ang. *Nanostructured Lipid Carriers*, NLC) oraz przykłady najpopularniejszych metod do ich syntezy. Szczególną uwagę poświęcono metodzie homogenizacji wysokociśnieniowej, którą uznaje się obecnie za najszybszą i najskuteczniejszą technikę wykorzystywaną do otrzymywania nanocząstek lipidowych. Na podstawie przeglądu literatury zostały opisane między innymi charakterystyczne właściwości SLN/NLC, takie jak m.in. ich potencjalna toksyczność czy zdolność do przenikania przez skórę. W części teoretycznej rozwinięty został także temat typów uwalniania substancji czynnych oraz rodzajów inkorporowania nanocząstek lipidowych. W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, uwzględniono szczególny wpływ inkorporowania monoterpenami (α -pinen, cytral, geraniol, limonen), Retinolem 50 C, koenzymem Q₁₀ oraz α -tokoferolem na profil uwalniania substancji czynnych z SLN/NLC, jak również efektywność enkapsulacji, stabilność otrzymanych nanocząstek bądź enkapsulowanych składników aktywnych oraz ich uwalnianie z SLN/NLC. Ponadto, w części teoretycznej niniejszej dysertacji wskazano na możliwe zastosowania tych innowacyjnych nośników w przemyśle kosmetyczno-farmaceutycznym. W opisie badań zwrócono szczególną uwagę na znaczenie matrycy lipidowej, stanowiącej ochronę dla enkapsulowanej substancji aktywnej oraz wyjaśniono znaczenie naturalnych olejów roślinnych w syntezie NLC. Na przykładzie oleju z nasion Meadowfoam, odznaczającego się unikalnym składem kwasów tłuszczowych, przeprowadzono badania reologii preparatów kosmetycznych i oceniono ich działanie pielęgnacyjne na skórę. Tym sposobem wykazano właściwości zimnotłoczonych olejów roślinnych, dzięki którym naturalna matryca lipidowa mogłaby nie tylko przyczynić się do zwiększenia kompatybilności syntezowanych nanostruktur, ale również wykazywałaby dodatkowe działanie pielęgnacyjno-lecznicze.

Głównym celem badań naukowych prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pt. „Synteza i charakterystyka stałych nanocząstek oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych przeznaczonych do celów kosmetycznych i farmaceutycznych” było opracowanie powtarzalnej metodyki otrzymywania SLN/NLC, inkorporowanych wybranymi składnikami aktywnymi, mającymi szczególne znaczenie w przemyśle kosmetyczno-farmaceutycznym oraz otrzymanie w pełni biodegradowalnych nanostrukturalnych nośników lipidowych, zbudowanych z wyłącznie naturalnych składników.

Aby zracjonalizować kolejność przeprowadzonych badań, cel pracy podzielono na dwie części, z których pierwsza obejmowała opracowanie powtarzalnej syntezy do enkapsulacji monoterpenów (α -pinen, cytral, geraniol, limonen) w SLN. Druga część pracy dotyczyła natomiast otrzymania powtarzalnej metodyki enkapsulacji Retinolu 50 C (retinol stabilizowany Polisorbatem 20), koenzymu Q₁₀ i α -tokoferolu w NLC, a następnie próby enkapsulacji ww. substancji aktywnych w NLC, syntezowanych z wykorzystaniem składników pochodzenia organicznego, ze szczególnym uwzględnieniem kompozycji tłuszczowej olejów roślinnych, pełniących rolę matrycy lipidowej.

Po przeprowadzeniu procedur eksperymentalnych, w pierwszej części niniejszej rozprawy doktorskiej dobrano optymalne warunki do syntezy stałych nanocząstek lipidowych, wykorzystując zaawansowaną analizę statystyczną, tj. plany czynnikowych

eksperymentów, analizę wariancji (ANOVA), diagram Pareto oraz wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi (3D i 2D). Następnie, właściwości zoptymalizowanego składu SLN identyfikowano za pomocą następujących technik i metod badawczych:

- Spektroskopii korelacji fotonów (Zetasizer Nano ZS, Malvern) – określono wielkości cząstek (Z-Ave) i współczynniki polidispersyjności (PDI).
- Elektroforetycznego rozpraszania światła (Zetasizer Nano ZS, Malvern) – zmierzono stabilność SLN poprzez określenie wartości potencjału zeta (ZP).
- Analizatora dyspersji (LUMiSizer[®], L.U.M. GmbH) – wykonano przyspieszoną analizę stabilności, wyznaczono indeksy niestabilności oraz dokonano analizy prędkości sedymentacji cząstek dla wszystkich otrzymanych próbek SLN.
- Komór dyfuzyjnych Franza oraz spektroskopii UV-Vis (Synergy[™] HT Multi-Mode Microplate Reader) – obliczono czas uwalniania enkapsulowanych monoterpenu.
- Chromatografii gazowej (Varian CP 3800 GC) – oznaczono efektywność enkapsulacji.
- Dyfrakcji promieni rentgenowskich (XRD, Bruker D8 Advance) oraz za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC, XP-10, Thass) – scharakteryzowano wszystkie matryce lipidowe otrzymanych SLN, opisano zachodzące w nich przemiany polimorficzne i przedstawiono przejścia fazowe lipidów, zachodzące pod wpływem ogrzewania i chłodzenia próbek.
- Skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM, Carl Zeiss SMT Evo Series) – wykonano zdjęcia otrzymanych nanostruktur.
- Badań *in vitro* wybranych monoterpenu enkapsulowanych w SLN – analizowano aktywność przeciwzapalną cytralu i geraniolu, a następnie przeprowadzono badania cytotoksyczności SLN inkorporowanych cytralem z wykorzystaniem różnorodnych linii komórkowej HaCaT (nienowotworowej) oraz A431 (nowotworowej).

Na skutek przeprowadzonych badań i przeanalizowaniu otrzymanych wyników dowiedziono, że:

1. Wybrane do badań monoterpenu mogą być z powodzeniem inkorporowane do SLN.
2. Nowo opracowane warunki syntezy zapewniły wysoką stabilność fizyczną i chemiczną otrzymanych nanocząstek lipidowych oraz zawartych w nich substancji aktywnych.
3. Metoda homogenizacji wysokociśnieniowej (na gorąco) okazała się nie tylko najszybszą, ale i najbardziej efektywną metodą syntezy nanocząstek lipidowych.

W drugiej części przedłożonej rozprawy doktorskiej ponownie przeprowadzono wieloaspektowe procedury eksperymentalne, za pomocą których dobrano optymalne warunki do syntezy nanostrukturalnych nośników lipidowych, a następnie właściwości zoptymalizowanego składu NLC identyfikowano za pomocą najważniejszych metod fizykochemicznych stosowanych do charakterystyki otrzymanych nanocząstek lipidowych (m.in. Z-Ave, PDI, ZP, SEM). Nanostrukturalne nośniki lipidowe inkorporowano składnikami aktywnymi, mającymi szczególne znaczenie w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym, zwłaszcza ze względu na silne właściwości przeciwutleniające (tj. Retinol 50 C, koenzym Q₁₀, α -tokoferol).

W powyżej opisaney części pracy, głównym celem była synteza NLC inkorporowanych ww. substancjami aktywnymi z wykorzystaniem naturalnego odpowiednika dla półsyntetycznego lipidu. W rezultacie, matrycę lipidową NLC stanowił organiczny olej z nasion kwiatów Meadowfoam (MSO) lub też olej z nasion owoców Marula. Badania te miały na celu zarówno zwiększenie kompatybilności NLC, jak i równoczesną poprawę stabilności enkapsulowanych składników aktywnych, które na ogół bardzo szybko ulegają

degradacji pod wpływem przechowywania. Dodatkowo przeprowadzone testy *in vivo* potwierdziły skuteczność działania zimnotłoczonego oleju (MSO) na wybrane parametry skóry, takie jak stopień nawilżenia czy elastyczności skóry. Ponadto, nanocząstki lipidowe otrzymywano metodą mikroemulgowania z wykorzystaniem metody sonifikacji, jednak najskuteczniejszą metodą syntezy SLN inkorporowanych monoterpunami okazała się homogenizacja wysokociśnieniowa przeprowadzona „na gorąco”. W procesie tym, stopiona mieszanina lipidów wraz ze składnikiem aktywnym została dodana bezpośrednio do gorącego roztworu surfaktantu.

Biorąc pod uwagę coraz częściej rozpowszechniany trend „zielonej chemii” w przemyśle kosmetyczno-farmaceutycznym, w ramach prezentowanej dysertacji opracowano powtarzalną metodę enkapsulacji Retinolu 50 C oraz koenzymu Q₁₀ w NLC, zbudowanych ze składników wyłącznie pochodzenia roślinnego. Główną ideą tych badań było stworzenie nanostrukturalnych nośników lipidowych, mogących znaleźć zastosowanie w naturalnych i biodegradowalnych kosmetykach, szczególnie preferowanych przez współczesnych konsumentów. Z uwagi na tendencję do ulegania procesowi „jęłczenia” w wyniku degradacji oksydacyjnej przez organiczne lipidy i oleje, mające wysokie stężenie nienasyconych kwasów tłuszczowych, stworzenie w pełni organicznych preparatów kosmetycznych stanowi zawsze duże wyzwanie dla przemysłu. W pracy doktorskiej przeprowadzono również syntezę NLC inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem dwóch najpowszechniej stosowanych metod – mikroemulgowania oraz homogenizacji wysokociśnieniowej. Badania te miały przede wszystkim wykazać różnice we właściwościach fizykochemicznych otrzymanych nanocząstek. Oprócz tego, postanowiono porównać efektywności procesu syntezy nanocząstek lipidowych przy użyciu dwóch odmiennych technik.

Po przeprowadzeniu wszystkich powyższych badań, wywnioskowano, że:

1. Naturalne oleje roślinne mogą skutecznie pełnić rolę matrycy lipidowej powstałej podczas syntezy NLC, nie wpływając przy tym na znaczący przyrost średniej wielkości cząstek oraz polidispersyjności w porównaniu do lipidów półsyntetycznych.
2. Wysoka stabilność olejów organicznych, wynikająca z osobliwej kompozycji kwasów tłuszczowych, może korzystnie wpływać na stabilność próbek, zwłaszcza poddanych działaniu wysokich temperatur, co przekładało się na wysokie wartości potencjału zeta.
3. Odpowiednio dobrane i zoptymalizowane składniki organiczne mogą stanowić równie stabilne i skuteczne podłoże do produkcji organicznych NLC, co ich półsyntetyczne zamienniki.
4. Na podstawie uzyskanych wyników zauważono znaczące różnice pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi dla substancji aktywnej (α -tokoferol) enkapsulowanej w NLC, syntezowanych za pomocą dwóch odmiennych metod – mikroemulgowania (ME) i homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH).

Wszystkie otrzymane wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej mogą tłumaczyć coraz większe zainteresowanie SLN/NLC zarówno wielu ośrodków naukowo-badawczych, jak i nieustannie rozwijającego się przemysłu kosmetyczno-farmaceutycznego na świecie. Z uwagi na mało kosztowną, a przy tym łatwą i szybką technologię produkcji, obecność nietoksycznych i biodegradowalnych nanocząstek lipidowych w różnego typu produktach kosmetycznych lub farmaceutycznych może stać się w najbliższych latach nieoceniona.

9. ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

Lipid nanoparticles are relatively new substances used in cosmetic and pharmaceutical industry. The doctoral dissertation presents structures of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) and examples of the most popular methods for their syntheses. Particular attention has been paid to the method of high-pressure homogenization, currently assumed as the fastest and most efficient one for obtaining lipid nanoparticles. On the basis of literature, the characteristic properties of SLN/NLC, including their potential toxicity and ability to permeate through skin, are described. The theoretical part also provides information on the types of release of active ingredients and types of incorporation of lipid nanoparticles, in particular on encapsulation of monoterpenes. The impact of incorporation of monoterpenes (α -pinene, citral, geraniol, limonene), Retinol 50 C, coenzyme Q₁₀ and α -tocopherol on the profile of release of active ingredients from SLN/NLC as well as the effectiveness of encapsulation, stability of nanoparticles or encapsulated active ingredients and their release from SLN/NLC were discussed in detail. The possible applications of the innovative lipid carriers in cosmetic and pharmaceutical industries were indicated. Particular attention was paid to the significance of the lipid matrix that protects the encapsulated active ingredient and the role of the natural vegetable oils in the synthesis of NLC. On the example of the oil from the Meadowfoam seeds, characterized by the specific composition of fatty acids, the rheology of cosmetic preparations and their effect on the skin were studied. The study revealed the properties of cold pressed vegetable oils thanks to which the lipid matrix would improve the compatibility of the synthesized NLC with the skin and would promote additional healing and caring activity.

The main aim of the research work reported in the doctoral dissertation entitled “Synthesis and characterization of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers dedicated to cosmetic and pharmaceutical applications”, was to devise a reproducible method for the synthesis SLN/NLC, incorporated with selected active ingredients of particular importance in cosmetic and pharmaceutical industry and syntheses of fully biodegradable NLC made only of natural components.

The dissertation was divided into two parts. The first concerned the work aimed at devising a reproducible method for encapsulation of monoterpenes (α -pinene, citral, geraniol, limonene) in SLN. The second part was devoted to working out of a reproducible method for encapsulation of Retinol 50 C (retinol stabilized with Polysorbate 20), coenzyme Q₁₀ and α -tocopherol in NLC, followed by attempts at encapsulation of the above active compounds in the NLC obtained from the components of natural origin, with particular attention to the lipid components of vegetable oils used as a lipid matrix.

In the first part of the dissertation the conditions for the synthesis of solid lipid nanoparticles were optimized using the advanced statistical analysis, including experimental factorial design, analysis of variance (ANOVA), Pareto chart and response surface plot (two- and three-dimensional). The properties of the optimized composition of SLN were characterized by the following methods and techniques.

- Photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nano ZS, Malvern) to determined average particle size distribution (Z-Ave) and polydispersity index (PDI).
- Electrophoretic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern) to measure SLN stability by zeta potential determination (ZP).

- Dispersion analysis (LUMiSizer[®], L.U.M. GmbH), to perform fast analysis of stability (by centrifugal separation analysis), determine the instability index and analyze the sedimentation velocity of nanoparticles for all SLN samples studied.
- Franz diffusion cell system for the measurement of drug release from a given dosage form and UV-Vis spectroscopy (Synergy[™] HT Multi-Mode Microplate Reader) to calculate the time of liberation of encapsulated monoterpenes.
- Gas chromatography (Varian CP 3800 GC) to estimate the encapsulation efficiency.
- X-ray diffraction (XRD, Bruker D8 Advance) and differential scanning calorimetry (DSC, XP-10, Thass) to characterize all lipid matrices of the obtained SLN, their polymorphic transformations and phase transitions in lipids induced by thermal processing.
- Scanning electron microscopy (SEM, Carl Zeiss SMT Evo Series) to get images of the nanostructures obtained.
- *In vitro* studies of selected monoterpenes encapsulated in SLN to evaluate the anti-inflammatory activity of citral and geraniol, to evaluate the cytotoxicity of citral-loaded SLN towards a series of HaCaT (noncancerous) cell line and A431 (cancerous) cell line.

The results provided the evidence permitting the following claims.

1. The monoterpenes selected for the study can be successfully incorporated to SLN.
2. The newly established and optimized conditions of syntheses ensured high physical and chemical stability of the SLN and their active ingredients.
3. High-pressure homogenization (hot) proved not only the fastest but also the most effective method for the synthesis of lipid nanoparticles.

The second part of the research work included optimization of the synthesis conditions of NLC and their characterization by a number of physicochemical methods (e.g. Z-Ave, PDI, ZP, SEM). Nanostructured lipid carriers were incorporated with active ingredients of great significance in cosmetic and pharmaceutical industries, in particular because of their antioxidating properties, such as Retinol 50 C, coenzyme Q₁₀, α -tocopherol.

The main aim of the research work in this part of the study was synthesis of NLC incorporated with the above mentioned active ingredients with the use of natural correspondent of the semisynthetic lipid. The lipid matrix of NLC was the organic oil from the seeds of Meadowfoam (MSO) or oil from Marula seeds. The objective was to improve the compatibility of NLC and increase the stability of the encapsulated active ingredients that usually are quickly degraded on storage. The additional *in vivo* tests confirmed the effectiveness of cold pressed Meadowfoam seed oil on improvement of selected skin parameters like the degree of moisturization and elasticity. Moreover, the lipid nanoparticles were obtained by microemulsion using sonification, although the most efficient method for the synthesis of SLN incorporated with monoterpenes was the hot high-pressure homogenization. In this process the melted mixture of lipids with the active ingredient was added directly to the hot surfactant solution.

To adapt the procedures proposed to the “green chemistry” principles, a reproducible method for Retinol 50 C/coenzyme Q₁₀-loaded NLC made entirely of plant origin. The main idea was to devise nanostructured lipid carriers that could be used in natural and fully biodegradable cosmetic products desired on the market. Because of the common tendency of the organic lipids and oils (containing unsaturated fatty acid in high concentration) to go rancid as a result of oxidation processes, the design of fully organic cosmetic preparations is always a great challenge for the industry.

The NLC loaded α -tocopherol was also synthesized by two methods: microemulsion and high-pressure homogenization to compare the physicochemical properties of the obtained nanoparticles and the effectiveness of the two processes.

In general the results obtained in the study permitted drawing the following conclusions.

1. Natural vegetable oils can be effective lipid matrix during the synthesis of NLC, their use does not significantly increase the average particle size nor polydispersity with respect to those achieved with the use of semisynthetic lipids.
2. High stability of vegetable oils, related to their specific fatty acid composition, may improve the stability of the samples, especially when subjected to high temperatures, which was manifested as high zeta potential values.
3. Selected and optimized organic components can be equally stable and effective matrix for production of NLC as their semisynthetic correspondents.
4. Significant differences in the physicochemical properties were noted between the preparation based on α -tocopherol encapsulated in NLC synthesized by microemulsion method (ME) and high-pressure homogenization (HPH).

The results obtained within the doctoral dissertation fully justify the increasing interest in SLN and NLC of researchers as well as cosmetic and pharmaceutical industries. Low-cost, easy and fast technology of production of nontoxic and biodegradable lipid nanoparticles make them very attractive in a wide range of applications.

10. DOROBK NAUKOWY

10.1. Lista publikacji

PUBLIKACJE Z LISTY A CZASOPISM PUNKTOWANYCH PRZEZ MNiSW

1. Aleksandra Zielińska, Carlos Martins-Gomes, Nuno R. Ferreira, Amélia M. Silva, Izabela Nowak, Eliana B. Souto. Anti-inflammatory and Anti-cancer Activity of Citral: Optimization of Citral-loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) using Experimental Factorial Design and LUMiSizer®. **International Journal of Pharmaceutics** (2018) (wysłane: 14.10.2018).
2. Aleksandra Zielińska, Nuno R. Ferreira, Izabela Nowak, Eliana B. Souto. Development and Optimization of Alpha-pinene-loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) using Experimental Factorial Design and Dispersion Analysis. **International Journal of Pharmaceutics** (2018) (wysłane: 14.10.2018).
3. Aleksandra Zielińska., Nuno R. Ferreira, Agnieszka Feliczak-Guzik, Eliana B. Souto, Izabela Nowak. Release kinetics and stability assessment of Monoterpenes-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN). **Pharmaceutical Development and Technology** (2018) (wysłane: 14.10.2018).
4. Irina Pereira, Aleksandra Zielińska, Nuno R. Ferreira, Amélia M. Silva, Eliana B. Souto. Optimization of linalool-loaded solid lipid nanoparticles using experimental factorial design and long-term stability studies with a new centrifugal sedimentation method. **International Journal of Pharmaceutics**, 2018, 549, 261–270 (IF=3,649; MNiSW= 40).
5. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Abundance of active ingredients in sea-buckthorn oil. **Lipids in Health and Disease**, 2017, 16(95), 1-11(IF = 2,073, MNiSW = 25).
6. Anna Olejnik, Joanna Gościana, Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Stability determination of formulations containing hyaluronic acid. **International Journal of Cosmetic Science**, 2015, 37, 401-407 (IF= 1,45, MNiSW = 20).

PUBLIKACJE Z LISTY B CZASOPISM PUNKTOWANYCH PRZEZ MNiSW

1. Natalia Kalinowska, Izabela Nowak, Aleksandra Zielińska. Właściwości oleju z pestek malin wykorzystywane w kosmetyce. Properties of raspberry seed oil used in cosmetics. **Kosmetologia Estetyczna**, 2017, 6(1), 29-31 (3) (MNiSW = 4).
2. Aleksandra Zielińska, Agnieszka Feliczak-Guzik, Izabela Nowak. Oleje z owoców jagodowych jako cenne źródła kwasu elagowego. **Polish Journal of Cosmetology**, 2016, 19(4), 294-299 (6) (MNiSW = 7).
3. Aleksandra Zielińska, Marta Dąbrowska, Izabela Nowak. Meadowfoam seed oil – the "pearl" of vegetable oils. **Polish Journal of Cosmetology**, 2015, 18 (2), 113-116 (MNiSW = 7).
4. Marta Dąbrowska, Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Lipid oxidation products as a potential health and analytical problem. **Chemik**, 2015, 69 (2), 85-87 (MNiSW= 8).
5. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Fatty acids in vegetable oils and their importance in cosmetic industry. **Chemik**, 2014, 68 (2), 103-110 (MNiSW= 8).
6. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Tocopherols and tocotrienols as witamin E. **Chemik**, 2014, 68 (7), 585-591 (MNiSW = 8).

ROZDZIAŁY W MONOGRAFIACH

1. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) as novel carriers for cosmetic ingredients, [in:] Application of NanoBioMaterials (Muti-Volume SET I-XI), Volume X: NanoBioMaterials in Galenic Formulations and Cosmetics. Oxford, UK: Elsevier (William Andrew), **2016**, 231-252; DOI: 10.1016/B978-0-323-42868-2.00010-3.
2. Irina Pereira, Aleksandra Zielińska, Francisco J. Veiga, Ana C. Santos, Izabela Nowak, Amélia M. Silva, Eliana B. Souto. Monoterpenes Based Pharmaceuticals: A Review of Applications in Human Health and Drug Delivery Systems, [in:] Part II: Plant-based pharmaceuticals in human health: review. Apple Academic Press, USA, CRC Taylor & Francis, **2018**; ISBN: 978-1-77188-670-3.
3. Aleksandra Zielińska, Irina Pereira, Sara Antunes, Francisco J. Veiga, Ana C. Santos, Izabela Nowak, Amélia M. Silva, Eliana B. Souto. Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems against melanoma, [in:] Design of nanostructures for theranostics applications. Oxford, UK: ELSEVIER (William Andrew), **2018**; DOI: 10.1016/B978-0-12-813669-0.00010-5.

PRACE PRZEGLĄDOWE I INNE

1. Marta Dąbrowska, Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Olej Monoi – eliksir wysp Południowego Pacyfiku. **Świat Przemysłu Kosmetycznego**, **2015**, 1 (18), 48-51.
2. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak, Maria Żebrowska. Substancje aktywne pochodzenia roślinnego, stosowane w produktach kosmetycznych. Kwercetyna, hesperydyna, trokserutyna i inne surowce flawonoidowe. **Świat Przemysłu Kosmetycznego**, **2015**, 1 (18), 54-57.
3. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak, Maria Żebrowska. Substancje aktywne pochodzenia roślinnego, stosowane w produktach kosmetycznych. Ramnoza i inne cukry proste. **Świat Przemysłu Kosmetycznego**, **2015**, 2 (22), 48-51.
4. Aleksandra Zielińska. Oleje roślinne jako surowce kosmetyczne cz. I. Oleje owocowe: spożywać czy nakładać na twarz? **Świat Przemysłu Kosmetycznego**, **2014**, 1 (17), 50-52.
5. Aleksandra Zielińska. Oleje roślinne jako surowce kosmetyczne cz. II. Oleje orzechowe: prawdziwa przekąska dla skóry! **Świat Przemysłu Kosmetycznego**, **2014**, 2 (17), 16-17.
6. Aleksandra Zielińska. Oleje roślinne jako surowce kosmetyczne cz. III. Oleje palmowe: egzotyczny luksus. **Świat Przemysłu Kosmetycznego**, **2014**, 3 (17), 34-36.
7. Aleksandra Zielińska, Agnieszka Feliczak-Guzik, Maria Żebrowska. Substancje aktywne pochodzenia roślinnego, stosowane w produktach kosmetycznych. α -bisabolol i inne surowce terpenowe. **Świat Przemysłu Kosmetycznego**, **2014**, 3 (17), 20-23.

10.2. Konferencje naukowe

KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE – WYSTĄPIENIA USTNE

1. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Synthesis of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for pharmaceutical and cosmetic purposes, **6th European Young Engineers Conference**, 24-26.04.2017, Warszawa.
2. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Production of nanostructured lipid carriers based on natural plant ingredients, **2nd Polish-Kazakh Meeting: relationship between chemistry and biology**, Department of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, 28.06.2016, Poznań.
3. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Investigations on skin conditions of hyaluronic acid based emulsion with and without oils. **Home and Personal Care Ingredients Central and Eastern Europe**, 01-02.10.2014, SOFW –Verlag für chemische Industrie, H. Ziolkowsky GmbH (Warsaw, Poland), Warszawa.

KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE – POSTERY

1. Irina Pereira, Aleksandra Zielińska, Amélia M. Silva, Ana C. Santos, Izabela Nowak, Eliana B. Souto. Optimization of linalool-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) by experimental factorial design, **XII Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery**, 14-16.01.2018, Coimbra, Portugal.
2. Aleksandra Zielińska, Carina Bütterich, Martin Hartmann, Izabela Nowak. Encapsulation of Carbamazepine-loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) by solvent evaporation method and high pressure homogenization. **Proceeding for the Controlled Release Society Conference**, 16-19.07.2017, Boston, Massachusetts, USA.
3. Aleksandra Zielińska, Irina Pereira, Francisco J. Veiga, Amélia M. Silva, Ana C. Santos, Izabela Nowak, Eliana B. Souto. Development and Optimization of α -pinene-loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) using Experimental Factorial Design. **Proceeding for the Controlled Release Society Conference**, 16-19.07.2017, Boston, Massachusetts, USA.
4. Irina Pereira, Aleksandra Zielińska, Ricardo N. Ferreira, Francisco J. Veiga, Amélia M. Silva, Ana C. Santos, Izabela Nowak, Eliana B. Souto. Accelerated Stability Evaluation of Linalool-Solid Lipid Nanoparticles (SLN) using a Centrifugal Sedimentation Method (LUMiSizer). **Proceeding for the Controlled Release Society Conference**, 16-19.07.2017, Boston, Massachusetts, USA.
5. Aleksandra Zielińska, Irina Pereira, Ana C. Santos, Maria L. Garcia, Izabela Nowak, Eliana B. Souto. The economic impact of cellular pharmacokinetics in retinal pigment epithelium. **14th IComSC 2017**, 19-22.06.2017, Dolsk, Polska.
6. Aleksandra Zielińska, Irina Pereira, Agnieszka Feliczak-Guzik, Francisco J. Veiga, Amélia M. Silva, Ana C. Santos, Izabela Nowak, Eliana B. Souto. D-limonene-loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) as innovative delivery system for pharmacy and cosmetic industries. **6th European Young Engineers Conference**, 24-26.04.2017, Warszawa.
7. Irina Pereira, Aleksandra Zielińska, Francisco J. Veiga, Amélia M. Silva, Ana C. Santos, Izabela Nowak, Eliana B. Souto. Encapsulation of linalool in solid lipid nanoparticles. **6th European Young Engineers Conference**, 24-26.04.2017, Warszawa.

8. Aleksandra Zielińska, Krzysztof Wójcicki, Maria Żebrowska, Izabela Nowak. Spectroscopy analysis of natural oils for hair-care. **IVth International Conference on Research and Education on Challenges for Contemporary Biology, Biotechnology, Bioinformatics and Environmental Protection**, 06-08.04.2017, Faculty of Biology AMU, Poznań.
9. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Lipid nanoparticles loaded D-panthenol for pharmaceutical and cosmetic applications. **NanoTech Poland, International Conference & Exhibition**, 22-25.06.2016, Poznań.
10. Aleksandra Zielińska, Maria Żebrowska, Izabela Nowak. Monoi oil – Tahitian elixir of the beauty and life. **Environment & Technology in Business**, 11-14.05.2016, Poznań.
11. Aleksandra Zielińska, Rainer H. Müller, Izabela Nowak. Sacha inchi oil for the production of vitamin E loaded nanostructured lipid carriers in cosmetic formulations. **5th European Young Engineers Conference**, 20-22.04.2016, Warszawa.
12. Aleksandra Zielińska, Krzysztof Wójcicki, Izabela Nowak. Marula oil as a successor of argan oil. **5th European Young Engineers Conference**, 20-22.04.2016, Warszawa.
13. Marta Dąbrowska, Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. The influence of Limnanthes alba seed oil on functional parameters and its effectiveness in cosmetic formulations. **5th European Young Engineers Conference**, 20-22.04.2016, Warszawa.
14. Marta Dąbrowska, Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Stability testing of cosmetic formulations containing vegetable oil. **5th European Young Engineers Conference**, 20-22.04.2016, Warszawa.
15. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Coenzyme Q₁₀ loaded solid lipid nanoparticles (SLN) with natural lipid matrix for cosmetic application. **5th Berliner Chemie Symposium**, 12-13.04.2016, Berlin, Niemcy.
16. Krzysztof Wójcicki, Aleksandra Zielińska, Anna Gliszczyńska-Świgło, Izabela Nowak. Determination of tocopherols in small seed vegetable oils. **5th Berliner Chemie Symposium**, 12-13.04.2016, Berlin, Niemcy.
17. Aleksandra Zielińska, Krzysztof Wójcicki, Maria Żebrowska, Izabela Nowak. Spectrometric determination of quality parameters in unique natural oils. **18th JCF-Frühjahrssymposium**, 16-19.03.2016, Kiel, Niemcy.
18. Aleksandra Zielińska, Carina Bütterich, Martin Hartmann, Izabela Nowak. Encapsulation of carbamazepine in solid lipid nanoparticles for immediate drug release. **18th JCF-Frühjahrssymposium**, 16-19.03.2016, Kiel, Niemcy.
19. Aleksandra Zielińska, Sung Min Pyo, Rainer H. Müller, Izabela Nowak. Meadowfoam seed oil loaded nanostructured lipid carriers (NLC) with optimized particle matrix for drug delivery. **17th JCF-Frühjahrssymposium**, 25-28.03.2015, Münster, Niemcy.
20. Sung Min Pyo, Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak, Rainer H. Müller. Natural plant excipients for the production of vitamin A₁ loaded nanostructured lipid carriers (NLC). **8th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Science**, 29-30.05.2015, Kiel, Niemcy.
21. Aleksandra Zielińska, Marta Dąbrowska, Izabela Nowak. Meadowfoam seed oil as exceptional stable active ingredient of care formulations. **8th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Science**, 29-30.05.2015, Kiel, Niemcy.

22. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak, Maria Żebrowska, Katarzyna Gruzewska. Argan oil – the healing power of the Moroccan gold. **8th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Science**, 29-30.05.2015, Kiel, Niemcy.
23. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Vegetable oils as inhibitors of transepidermal water loss. **Oxygenalia – Conference WATER the molecule of live**. 07-08.11.2014, Faculty of Biology UAM, Poznań.
24. Aleksandra Zielińska, Marta Dąbrowska, Izabela Nowak. Vegetable oils, essential oils and floral waters as active ingredients. **Oxygenalia – Conference WATER the molecule of live**. 07-08.11.2014, Faculty of Biology UAM, Poznań.
25. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Chemical processes allowed by COSMOS Organic Certification for processing of vegetable oils. **Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry**, 23-24.10.2014, Institute of Organic Chemistry PAS, Warszawa.
26. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak, Maria Żebrowska. Properties of fatty acids contained in Borage Seed Oil (*Borago Officinalis* L.). **Home and Personal Care Ingredients Central and Eastern Europe**, 01-02.10.2014, SOFW – Verlag für chemische Industrie, H. Ziolkowsky GmbH (Warsaw, Poland), Warszawa.
27. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Nanoshell silica as potential drug delivery system. **BaltSilica 2014**, 01-03.06.2014, Faculty of Chemistry UAM, Poznań.
28. Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Nanoshell preparation and capping for use in biomedical applications. **4th Summer Symposium on Nanomaterials and their Application to Biology and Medicine**, 15-18.06.2014, NanoBioMedical Centre, Poznań.

KONFERENCJE KRAJOWE – POSTERY

1. Aleksandra Zielińska, Agnieszka Feliczak-Guzik, Izabela Nowak. Zastosowanie homogenizacji wysokociśnieniowej do syntezy stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych limonenem. **XLIX Ogólnopolskie Kolokwium Katalityczne**, 15-17.03.2017, Kraków.
2. Aleksandra Zielińska, Agnieszka Feliczak-Guzik, Izabela Nowak. Synteza nanostrukturalnych nośników lipidowych inkorporowanych limonenem. **PTChem**, 19-23.09.2016, Poznań.
3. Aleksandra Zielińska, Agnieszka Feliczak-Guzik, Izabela Nowak. Zastosowanie chromatografii gazowej do oznaczenia limonenu w formulacjach kosmetycznych. **PTChem**, 19-23.09.2016, Poznań.
4. Marta Dąbrowska, Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Zastosowanie metod fizykochemicznych do oceny trwałości formulacji kosmetycznych. **IV Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii**, 12-13.05.2016, Łódź (Współautorstwo wystąpienia ustnego).
5. Marta Dąbrowska, Aleksandra Zielińska, Izabela Nowak. Potencjał zeta a stabilność emulsji kosmetycznych. **II Toruńskie Sympozjum Doktorantów Nauk Przyrodniczych**, 15-17.04.2016, Toruń (Współautorstwo wystąpienia ustnego).
6. Aleksandra Zielińska, Sung Min Pyo, Rainer H. Müller, Izabela Nowak. Meadowfoam seed oil for the production of vitamin A₁ loaded NLC. **Krajowa Konferencja Nanotechnologii**, 24-27.06.2015, Poznań.

10.3. Staże i stypendia naukowe

- Staż w ramach projektu „UAM: Unikatowy Absolwent = Możliwości”, Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin (Niemcy), prof. Rainer H. Müller, 01.11.2014 - 31.01.2015.
- Praktyki doktoranckie w ramach programu Erasmus+, Erlangen Catalysis Resource Center, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Niemcy), prof. Martin Hartmann, 01.10.2015 - 29.02.2016.
- Praktyki doktoranckie w ramach programu Erasmus+, Wydział Farmacji na Uniwersytecie w Coimbrze (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugalia), prof. Eliana B. Souto, 01.09.2016 - 22.12.2016 oraz 01.06.2017 - 08.09.2017.
- Szkolenie z przedsiębiorczości jako nagroda w projekcie TransFormation.doc, (projekt Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. „Wsparcie systemu zarządzania badaniami naukowymi i ich wynikami” – *Entrepreneurship and Soft Skills Training Program for PhDs and Young Scientists* w University of Alberta School of Business w Edmonton (Kanada), 11.10.2015 - 24.10.2015.
- Stypendium Projektu SKILLS Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej na szkolenia naukowe:
 - z zakresu pisanie tekstów naukowych, Warszawa, 20 - 21.07.2015.
 - z zakresu zarządzania zespołem naukowym, Wrocław, 18 - 19.06.2015.
 - z zakresu upowszechniania nauki, Warszawa, 25 - 26.05.2015.
 - z zakresu prezentacji wyników badań naukowych, Kraków, 06 - 07.05.2015.
 - z zakresu zarządzania projektami badawczymi, Wrocław, 23 - 24.02.2015.
 - z zakresu komercjalizacji wyników prac badawczych, Poznań, 22 - 24.10.2014.
 - z zakresu przedsiębiorczości, Warszawa, 15 - 18.10.2014.

10.4. Nagrody

- **II nagroda** za najlepszą prezentację ustną pt. *Synthesis of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for pharmaceutical and cosmetic purposes* na konferencji międzynarodowej 6th European Young Engineers Conference (EYEC), Warszawa, 24.04.2017 – 26.04.2017.
- **I nagroda** za najlepszy poster naukowy pt. *Marula oil as a successor of argan oil* na konferencji międzynarodowej 5th European Young Engineers Conference (EYEC), Warszawa, 20.04.2016 – 22.04.2016.
- **I nagroda** za najlepszy poster naukowy pt. *Encapsulation of carbamazepine in solid lipid nanoparticles (SLN) for immediate drug release* na konferencji międzynarodowej 18th JCF-Frühjahrssymposium 2016, Kiel (Niemcy), 16.03.2016 – 19.03.2016.
- **I nagroda** za najlepszy poster naukowy pt. *Meadowfoam seed oil loaded nanostructured lipid carriers (NLC) with optimized particle matrix for drug delivery* na konferencji międzynarodowej 17th JCF-Frühjahrssymposium 2015, Münster (Niemcy), 25.03.2016 – 28.03.2015.

11. SPIS ZAŁĄCZNIKÓW

- **Załącznik 1.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla α -pinen-SLN: poziom istotności statystycznej: 95% ($\alpha = 0,05$).
- **Załącznik 2.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla α -pinen-SLN: poziom istotności statystycznej: 90% ($\alpha = 0,1$).
- **Załącznik 3.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla α -pinen-SLN: poziom istotności statystycznej: 85% ($\alpha = 0,15$).
- **Załącznik 4.** Warstwiczny wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla α -pinen-SLN, ukazujący wpływ % wag. stałego lipidu (Imwitor[®] 900 K) i % wag. surfaktantu (Poloxamer 188) na średnią wielkość cząstek (A), współczynnik polidispersyjności (B) oraz potencjał zeta (C).
- **Załącznik 5.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla cytral-SLN: poziom istotności statystycznej: 95% ($\alpha = 0,05$).
- **Załącznik 6.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla cytral-SLN: poziom istotności statystycznej: 90% ($\alpha = 0,1$).
- **Załącznik 7.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla cytral-SLN: poziom istotności statystycznej: 85% ($\alpha = 0,15$).
- **Załącznik 8.** Warstwiczny wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla cytral-SLN, ukazujący wpływ % wag. stałego lipidu (Imwitor[®] 900 K) i % wag. surfaktantu (Poloxamer 188) na średnią wielkość cząstek (A), współczynnik polidispersyjności (B) oraz potencjał zeta (C).
- **Załącznik 9.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla geraniol-SLN: poziom istotności statystycznej: 95% ($\alpha = 0,05$).
- **Załącznik 10.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla geraniol-SLN: poziom istotności statystycznej: 90% ($\alpha = 0,1$).
- **Załącznik 11.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla geraniol-SLN: poziom istotności statystycznej: 85% ($\alpha = 0,15$).
- **Załącznik 12.** Warstwiczny wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla geraniol-SLN, ukazujący wpływ % wag. stałego lipidu (Imwitor[®] 900 K) i % wag. surfaktantu (Poloxamer 188) na średnią wielkość cząstek (A), współczynnik polidispersyjności (B) oraz potencjał zeta (C).

- **Załącznik 13.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla limonen–SLN: poziom istotności statystycznej: 95% ($\alpha = 0,05$).
- **Załącznik 14.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla limonen–SLN: poziom istotności statystycznej: 90% ($\alpha = 0,1$).
- **Załącznik 15.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla limonen–SLN: poziom istotności statystycznej: 85% ($\alpha = 0,15$).
- **Załącznik 16.** Warstwiczny wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla limonen–SLN, ukazujący wpływ % wag. stałego lipidu (Imwitor[®] 900 K) i % wag. surfaktantu (Poloxamer 188) na średnią wielkość cząstek (A), współczynnik polidispersyjności (B) oraz potencjał zeta (C).
- **Załącznik 17.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla puste–SLN: poziom istotności statystycznej: 95% ($\alpha = 0,05$).
- **Załącznik 18.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla puste–SLN: poziom istotności statystycznej: 90% ($\alpha = 0,1$).
- **Załącznik 19.** Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla puste–SLN: poziom istotności statystycznej: 85% ($\alpha = 0,15$).
- **Załącznik 20.** Warstwiczny wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla puste–SLN, ukazujący wpływ % wag. stałego lipidu (Imwitor[®] 900 K) i % wag. surfaktantu (Poloxamer 188) na średnią wielkość cząstek (A), współczynnik polidispersyjności (B) oraz potencjał zeta (C).
- **Załącznik 21.** Otrzymane wartości indeksów niestabilności wszystkich SLN inkorporowanych monoterpenami oraz próbki odniesienia (puste–SLN) z dokładnością do trzech cyfr znaczących po przecinku.
- **Załącznik 22.** Analiza dyfraktogramów w zakresie nisko- i wysokokątowym dla poszczególnych próbek SLN.
- **Załącznik 23.** Analiza termogramów DSC podczas ogrzewania (od 20 do 120°C) i chłodzenia (120 do 20°C) poszczególnych próbek SLN.

α -pinen-SLN

Załącznik 1. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla α -pinen-SLN: **poziom istotności statystycznej: 95% ($\alpha = 0,05$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	1984717	1	1984717	6,173713	0,088900
(2) Poloxamer 188	2062096	1	2062096	6,414409	0,085225
(1) na (2)	1909648	1	1909648	5,940199	0,092727
Błąd	964436	3	321479		
Suma	6920897	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,063504	1	0,063504	2,779458	0,194071
(2) Poloxamer 188	0,066049	1	0,066049	2,890848	0,187643
(1) na (2)	0,034225	1	0,034225	1,497968	0,308339
Błąd	0,068543	3	0,022848		
Suma	0,232321	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,000784	1	0,000784	0,078011	0,798159
(2) Poloxamer 188	0,005329	1	0,005329	0,530259	0,519189
(1) na (2)	0,001369	1	0,001369	0,136221	0,736577
Błąd	0,030149	3	0,010050		
Suma	0,037631	6			

α -pinen-SLN

Załącznik 2. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla α -pinen-SLN: **poziom istotności statystycznej: 90% ($\alpha = 0,1$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	1984717	1	1984717	6,173713	0,088900
(2) Poloxamer 188	2062096	1	2062096	6,414409	0,085225
(1) na (2)	1909648	1	1909648	5,940199	0,092727
Błąd	964436	3	321479		
Suma	6920897	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,063504	1	0,063504	2,779458	0,194071
(2) Poloxamer 188	0,066049	1	0,066049	2,890848	0,187643
(1) na (2)	0,034225	1	0,034225	1,497968	0,308339
Błąd	0,068543	3	0,022848		
Suma	0,232321	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,000784	1	0,000784	0,078011	0,798159
(2) Poloxamer 188	0,005329	1	0,005329	0,530259	0,519189
(1) na (2)	0,001369	1	0,001369	0,136221	0,736577
Błąd	0,030149	3	0,010050		
Suma	0,037631	6			

α -pinen-SLN

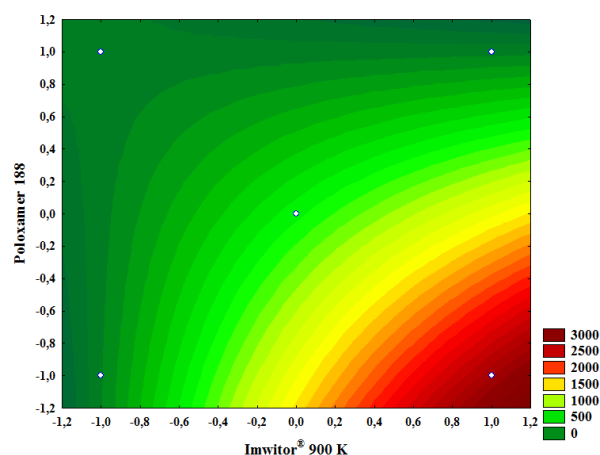
Załącznik 3. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla α -pinen-SLN: **poziom istotności statystycznej: 85% ($\alpha = 0,15$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	1984717	1	1984717	6,173713	0,088900
(2) Poloxamer 188	2062096	1	2062096	6,414409	0,085225
(1) na (2)	1909648	1	1909648	5,940199	0,092727
Błąd	964436	3	321479		
Suma	6920897	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,063504	1	0,063504	2,779458	0,194071
(2) Poloxamer 188	0,066049	1	0,066049	2,890848	0,187643
(1) na (2)	0,034225	1	0,034225	1,497968	0,308339
Błąd	0,068543	3	0,022848		
Suma	0,232321	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,000784	1	0,000784	0,078011	0,798159
(2) Poloxamer 188	0,005329	1	0,005329	0,530259	0,519189
(1) na (2)	0,001369	1	0,001369	0,136221	0,736577
Błąd	0,030149	3	0,010050		
Suma	0,037631	6			

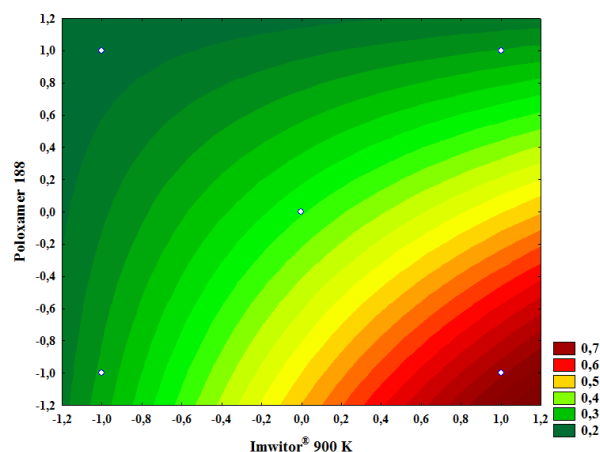
α -pinen-SLN

Załącznik 4. Warstwicowy wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla α -pinen-SLN, ukazujący wpływ % wag. stałego lipidu (Imwitor® 900 K) i % wag. surfaktantu (Poloxamer 188) na średnią wielkość cząstek (A), współczynnik polidispersyjności (B) oraz potencjał zeta (C).

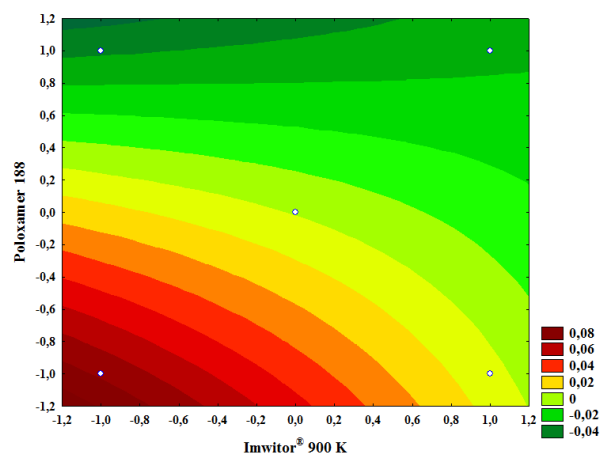
A) Warstwicowy wykres powierzchniowy; Obraz 2D: Z-Ave [nm]



B) Warstwicowy wykres powierzchniowy; Obraz 2D: PDI [j.u.]



C) Warstwicowy wykres powierzchniowy; Obraz 2D: ZP [mV]



cytral-SLN

Załącznik 5. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla cytral-SLN: **poziom istotności statystycznej: 95% ($\alpha = 0,05$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	29412,25	1	29412,25	4,729584	0,117928
(2) Poloxamer 188	11067,04	1	11067,04	1,779616	0,274425
(1) na (2)	26699,56	1	26699,56	4,293375	0,129987
Błąd	18656,34	3	6218,78		
Suma	85835,19	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,003969	1	0,003969	0,232242	0,662839
(2) Poloxamer 188	0,009216	1	0,009216	0,539264	0,515929
(1) na (2)	0,040804	1	0,040804	2,387602	0,220013
Błąd	0,051270	3	0,017090		
Suma	0,105259	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,002256	1	0,002256	0,453649	0,548855
(2) Poloxamer 188	0,001806	1	0,001806	0,363170	0,589258
(1) na (2)	0,007310	1	0,007310	1,469823	0,312141
Błąd	0,014921	3	0,004974		
Suma	0,026293	6			

cytral–SLN

Załącznik 6. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla cytral–SLN: **poziom istotności statystycznej: 90% ($\alpha = 0,1$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	29412,25	1	29412,25	4,729584	0,117928
(2) Poloxamer 188	11067,04	1	11067,04	1,779616	0,274425
(1) na (2)	26699,56	1	26699,56	4,293375	0,129987
Błąd	18656,34	3	6218,78		
Suma	85835,19	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,003969	1	0,003969	0,232242	0,662839
(2) Poloxamer 188	0,009216	1	0,009216	0,539264	0,515929
(1) na (2)	0,040804	1	0,040804	2,387602	0,220013
Błąd	0,051270	3	0,017090		
Suma	0,105259	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,002256	1	0,002256	0,453649	0,548855
(2) Poloxamer 188	0,001806	1	0,001806	0,363170	0,589258
(1) na (2)	0,007310	1	0,007310	1,469823	0,312141
Błąd	0,014921	3	0,004974		
Suma	0,026293	6			

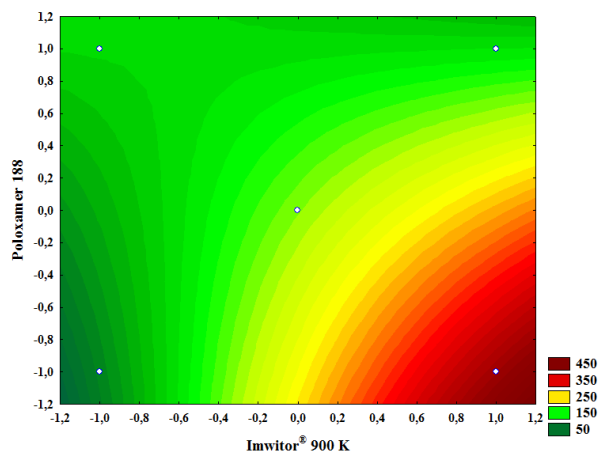
cytral-SLN

Załącznik 7. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla cytral-SLN: **poziom istotności statystycznej: 85% ($\alpha = 0,15$)**

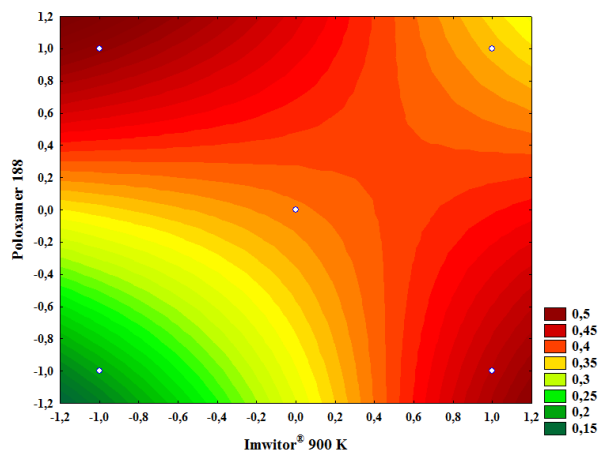
Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	29412,25	1	29412,25	4,729584	0,117928
(2) Poloxamer 188	11067,04	1	11067,04	1,779616	0,274425
(1) na (2)	26699,56	1	26699,56	4,293375	0,129987
Błąd	18656,34	3	6218,78		
Suma	85835,19	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,003969	1	0,003969	0,232242	0,662839
(2) Poloxamer 188	0,009216	1	0,009216	0,539264	0,515929
(1) na (2)	0,040804	1	0,040804	2,387602	0,220013
Błąd	0,051270	3	0,017090		
Suma	0,105259	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,002256	1	0,002256	0,453649	0,548855
(2) Poloxamer 188	0,001806	1	0,001806	0,363170	0,589258
(1) na (2)	0,007310	1	0,007310	1,469823	0,312141
Błąd	0,014921	3	0,004974		
Suma	0,026293	6			

Załącznik 8. Warstwicowy wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla cytral-SLN, ukazujący wpływ % wag. stałego lipidu (Imwitor® 900 K) i % wag. surfaktantu (Poloxamer 188) na średnią wielkość cząstek (A), współczynnik polidispersyjności (B) oraz potencjał zeta (C).

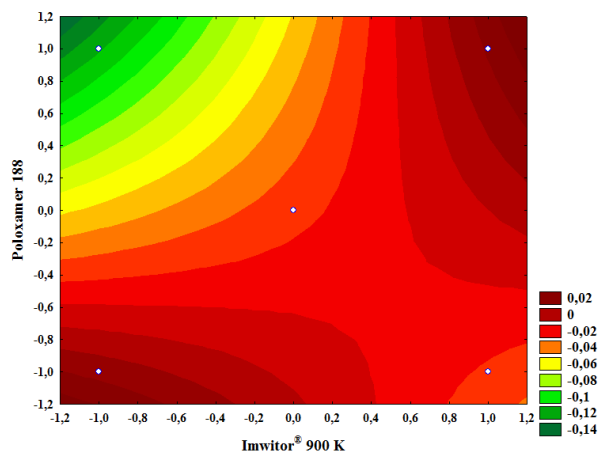
A) Warstwicowy wykres powierzchniowy; Obraz 2D: Z-Ave [nm]



B) Warstwicowy wykres powierzchniowy; Obraz 2D: PDI [j.u.]



C) Warstwicowy wykres powierzchniowy; Obraz 2D: ZP [mV]



geraniol–SLN

Załącznik 9. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla geraniol–SLN: **poziom istotności statystycznej: 95% ($\alpha = 0,05$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	15487,8	1	15487,80	0,776744	0,443035
(2) Poloxamer 188	19530,1	1	19530,06	0,979471	0,395291
(1) na (2)	24226,9	1	24226,92	1,215028	0,350832
Błąd	59818,2	3	19939,40		
Suma	119063,0	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,004489	1	0,004489	0,559390	0,508798
(2) Poloxamer 188	0,030976	1	0,030976	3,860029	0,144190
(1) na (2)	0,017956	1	0,017956	2,237561	0,231583
Błąd	0,024074	3	0,008025		
Suma	0,077495	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,027390	1	0,027390	3,506460	0,157854
(2) Poloxamer 188	0,003782	1	0,003782	0,484198	0,536589
(1) na (2)	0,002550	1	0,002550	0,326479	0,607741
Błąd	0,023434	3	0,007811		
Suma	0,057157	6			

geraniol-SLN

Załącznik 10. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla geraniol-SLN: **poziom istotności statystycznej: 90% ($\alpha = 0,1$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	15487,8	1	15487,80	0,776744	0,443035
(2) Poloxamer 188	19530,1	1	19530,06	0,979471	0,395291
(1) na (2)	24226,9	1	24226,92	1,215028	0,350832
Błąd	59818,2	3	19939,40		
Suma	119063,0	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,004489	1	0,004489	0,559390	0,508798
(2) Poloxamer 188	0,030976	1	0,030976	3,860029	0,144190
(1) na (2)	0,017956	1	0,017956	2,237561	0,231583
Błąd	0,024074	3	0,008025		
Suma	0,077495	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,027390	1	0,027390	3,506460	0,157854
(2) Poloxamer 188	0,003782	1	0,003782	0,484198	0,536589
(1) na (2)	0,002550	1	0,002550	0,326479	0,607741
Błąd	0,023434	3	0,007811		
Suma	0,057157	6			

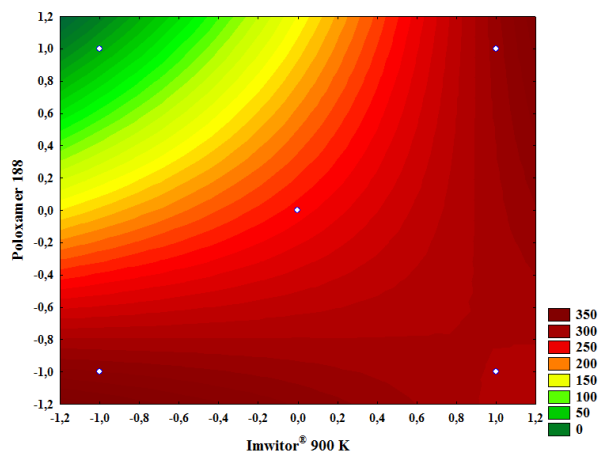
geraniol–SLN

Załącznik 11. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla geraniol–SLN: **poziom istotności statystycznej: 85% ($\alpha = 0,15$)**

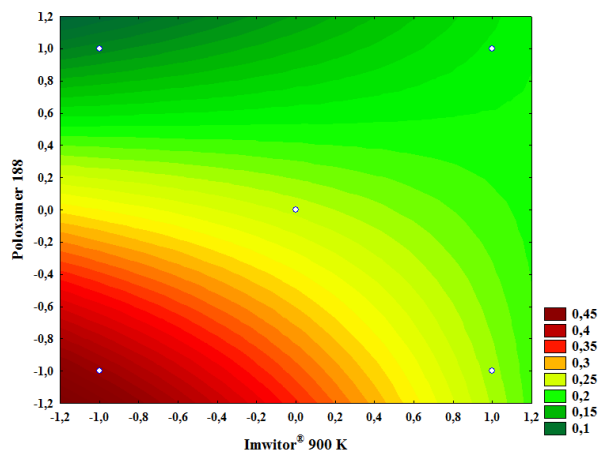
Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	15487,8	1	15487,80	0,776744	0,443035
(2) Poloxamer 188	19530,1	1	19530,06	0,979471	0,395291
(1) na (2)	24226,9	1	24226,92	1,215028	0,350832
Błąd	59818,2	3	19939,40		
Suma	119063,0	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,004489	1	0,004489	0,559390	0,508798
(2) Poloxamer 188	0,030976	1	0,030976	3,860029	0,144190
(1) na (2)	0,017956	1	0,017956	2,237561	0,231583
Błąd	0,024074	3	0,008025		
Suma	0,077495	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,027390	1	0,027390	3,506460	0,157854
(2) Poloxamer 188	0,003782	1	0,003782	0,484198	0,536589
(1) na (2)	0,002550	1	0,002550	0,326479	0,607741
Błąd	0,023434	3	0,007811		
Suma	0,057157	6			

Załącznik 12. Warstwicowy wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla geraniol-SLN, ukazujący wpływ % wag. stałego lipidu (Imwitor® 900 K) i % wag. surfaktantu (Poloxamer 188) na średnią wielkość cząstek (A), współczynnik polidispersyjności (B) oraz potencjał zeta (C).

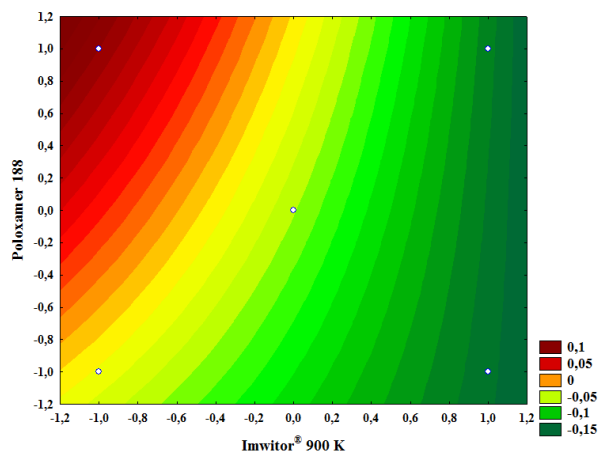
A) Warstwicowy wykres powierzchniowy; Obraz 2D: Z-Ave [nm]



B) Warstwicowy wykres powierzchniowy; Obraz 2D: PDI [j.u.]



C) Warstwicowy wykres powierzchniowy; Obraz 2D: ZP [mV]



limonen–SLN

Załącznik 13. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla limonen–SLN: **poziom istotności statystycznej: 95% ($\alpha = 0,05$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	307027	1	307026,8	5,093607	0,109238
(2) Poloxamer 188	316969	1	316969,0	5,258549	0,105650
(1) na (2)	289229	1	289228,8	4,798337	0,116199
Błąd	180831	3	60276,9		
Suma	1094055	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,073984	1	0,073984	2,159807	0,238002
(2) Poloxamer 188	0,043681	1	0,043681	1,275175	0,340936
(1) na (2)	0,038416	1	0,038416	1,121474	0,367319
Błąd	0,102765	3	0,034255		
Suma	0,258846	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,008836	1	0,008836	0,324865	0,608587
(2) Poloxamer 188	0,003721	1	0,003721	0,136807	0,736045
(1) na (2)	0,005929	1	0,005929	0,217986	0,672395
Błąd	0,081597	3	0,027199		
Suma	0,100083	6			

limonen–SLN

Załącznik 14. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla limonen–SLN: **poziom istotności statystycznej: 90% ($\alpha = 0,1$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	307027	1	307026,8	5,093607	0,109238
(2) Poloxamer 188	316969	1	316969,0	5,258549	0,105650
(1) na (2)	289229	1	289228,8	4,798337	0,116199
Błąd	180831	3	60276,9		
Suma	1094055	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,073984	1	0,073984	2,159807	0,238002
(2) Poloxamer 188	0,043681	1	0,043681	1,275175	0,340936
(1) na (2)	0,038416	1	0,038416	1,121474	0,367319
Błąd	0,102765	3	0,034255		
Suma	0,258846	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,008836	1	0,008836	0,324865	0,608587
(2) Poloxamer 188	0,003721	1	0,003721	0,136807	0,736045
(1) na (2)	0,005929	1	0,005929	0,217986	0,672395
Błąd	0,081597	3	0,027199		
Suma	0,100083	6			

limonen–SLN

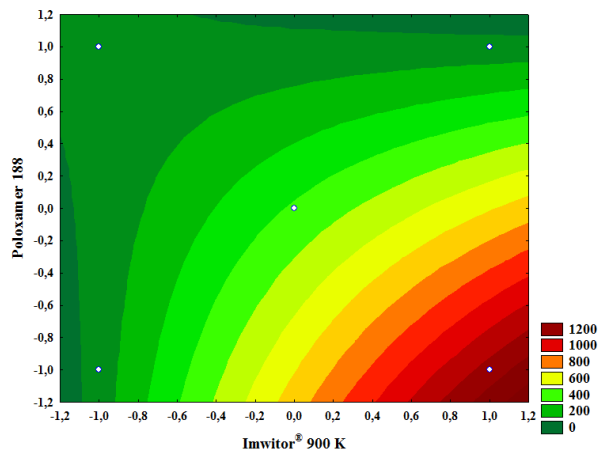
Załącznik 15. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla limonen–SLN: **poziom istotności statystycznej: 85% ($\alpha = 0,15$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	307027	1	307026,8	5,093607	0,109238
(2) Poloxamer 188	316969	1	316969,0	5,258549	0,105650
(1) na (2)	289229	1	289228,8	4,798337	0,116199
Błąd	180831	3	60276,9		
Suma	1094055	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,073984	1	0,073984	2,159807	0,238002
(2) Poloxamer 188	0,043681	1	0,043681	1,275175	0,340936
(1) na (2)	0,038416	1	0,038416	1,121474	0,367319
Błąd	0,102765	3	0,034255		
Suma	0,258846	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,008836	1	0,008836	0,324865	0,608587
(2) Poloxamer 188	0,003721	1	0,003721	0,136807	0,736045
(1) na (2)	0,005929	1	0,005929	0,217986	0,672395
Błąd	0,081597	3	0,027199		
Suma	0,100083	6			

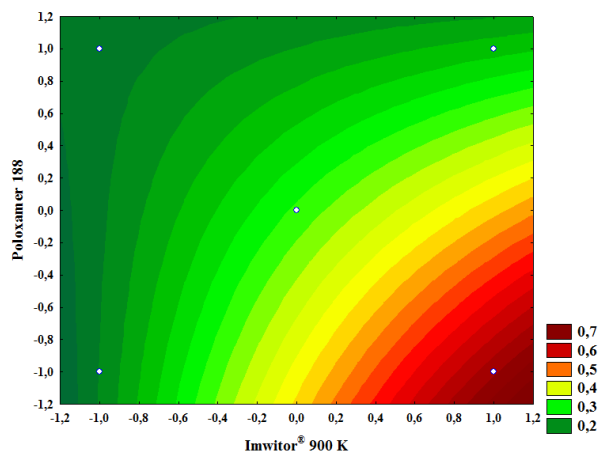
limonen-SLN

Załącznik 16. Warstwiczny wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla limonen-SLN, ukazujący wpływ % wag. stałego lipidu (Imwitor® 900 K) i % wag. surfaktantu (Poloxamer 188) na średnią wielkość cząstek (A), współczynnik polidispersyjności (B) oraz potencjał zeta (C).

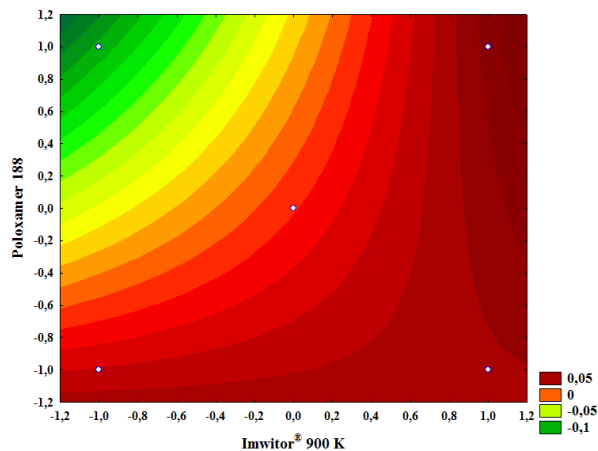
A) Warstwiczny wykres powierzchniowy; Obraz 2D: Z-Ave [nm]



B) Warstwiczny wykres powierzchniowy; Obraz 2D: PDI [j.u.]



C) Warstwiczny wykres powierzchniowy; Obraz 2D: ZP [mV]



puste-SLN

Załącznik 17. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla puste-SLN: **poziom istotności statystycznej: 95% ($\alpha = 0,05$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	1962,49	1	1962,49	0,62716	0,486241
(2) Poloxamer 188	35948,16	1	35948,16	11,48808	0,042794
(1) na (2)	22831,21	1	22831,21	7,29625	0,073714
Błąd	9387,51	3	3129,17		
Suma	70129,37	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,003782	1	0,003782	1,89461	0,262426
(2) Poloxamer 188	0,044310	1	0,044310	22,19595	0,018103
(1) na (2)	0,026732	1	0,026732	13,39075	0,035261
Błąd	0,005989	3	0,001996		
Suma	0,080814	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,064516	1	0,064516	25,64909	0,014861
(2) Poloxamer 188	0,052441	1	0,052441	20,84853	0,019703
(1) na (2)	0,007225	1	0,007225	2,87238	0,188683
Błąd	0,007546	3	0,002515		
Suma	0,131728	6			

puste-SLN

Załącznik 18. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla puste-SLN: **poziom istotności statystycznej: 90% ($\alpha = 0,1$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	1962,49	1	1962,49	0,62716	0,486241
(2) Poloxamer 188	35948,16	1	35948,16	11,48808	0,042794
(1) na (2)	22831,21	1	22831,21	7,29625	0,073714
Błąd	9387,51	3	3129,17		
Suma	70129,37	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,003782	1	0,003782	1,89461	0,262426
(2) Poloxamer 188	0,044310	1	0,044310	22,19595	0,018103
(1) na (2)	0,026732	1	0,026732	13,39075	0,035261
Błąd	0,005989	3	0,001996		
Suma	0,080814	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,064516	1	0,064516	25,64909	0,014861
(2) Poloxamer 188	0,052441	1	0,052441	20,84853	0,019703
(1) na (2)	0,007225	1	0,007225	2,87238	0,188683
Błąd	0,007546	3	0,002515		
Suma	0,131728	6			

puste-SLN

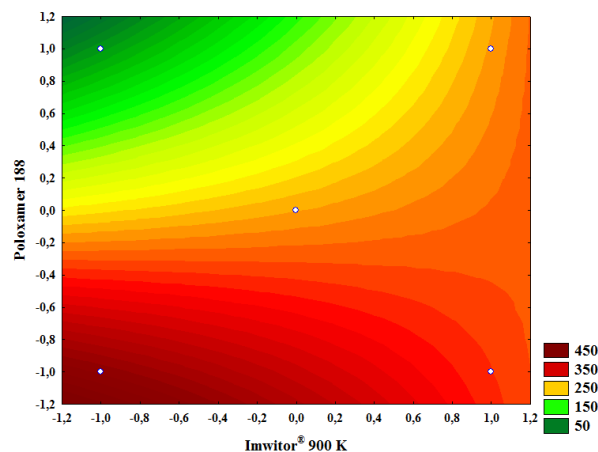
Załącznik 19. Analiza średniej wielkości cząstek (Z-Ave), współczynnika polidispersyjności (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) za pomocą testu statystycznego ANOVA dla puste-SLN: **poziom istotności statystycznej: 85% ($\alpha = 0,15$)**

Średnia wielkość cząstek					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	1962,49	1	1962,49	0,62716	0,486241
(2) Poloxamer 188	35948,16	1	35948,16	11,48808	0,042794
(1) na (2)	22831,21	1	22831,21	7,29625	0,073714
Błąd	9387,51	3	3129,17		
Suma	70129,37	6			
Współczynnik polidispersyjności					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,003782	1	0,003782	1,89461	0,262426
(2) Poloxamer 188	0,044310	1	0,044310	22,19595	0,018103
(1) na (2)	0,026732	1	0,026732	13,39075	0,035261
Błąd	0,005989	3	0,001996		
Suma	0,080814	6			
Potencjał zeta					
Oceniane czynniki i ich interakcje	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Współczynnik F	Współczynnik p
(1) Imwitor® 900 K	0,064516	1	0,064516	25,64909	0,014861
(2) Poloxamer 188	0,052441	1	0,052441	20,84853	0,019703
(1) na (2)	0,007225	1	0,007225	2,87238	0,188683
Błąd	0,007546	3	0,002515		
Suma	0,131728	6			

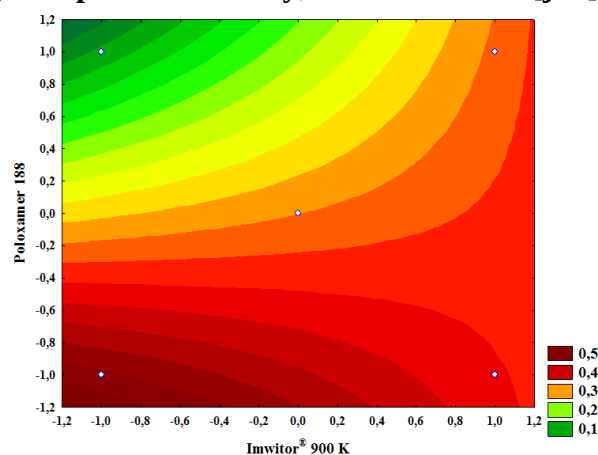
puste-SLN

Załącznik 20. Warstwiczny wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi dla puste-SLN, ukazujący wpływ % wag. stałego lipidu (Imwitor® 900 K) i % wag. surfaktantu (Poloxamer 188) na średnią wielkość cząstek (A), współczynnik polidispersyjności (B) oraz potencjał zeta (C).

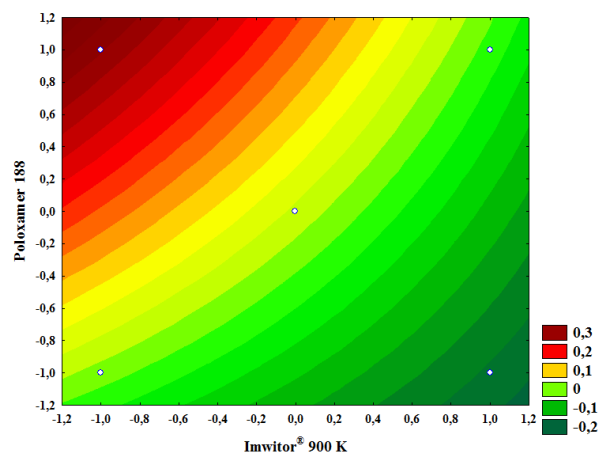
D) Warstwiczny wykres powierzchniowy; Obraz 2D: Z-Ave [nm]



E) Warstwiczny wykres powierzchniowy; Obraz 2D: PDI [j.u.]



F) Warstwiczny wykres powierzchniowy; Obraz 2D: ZP [mV]



Indeks niestabilności

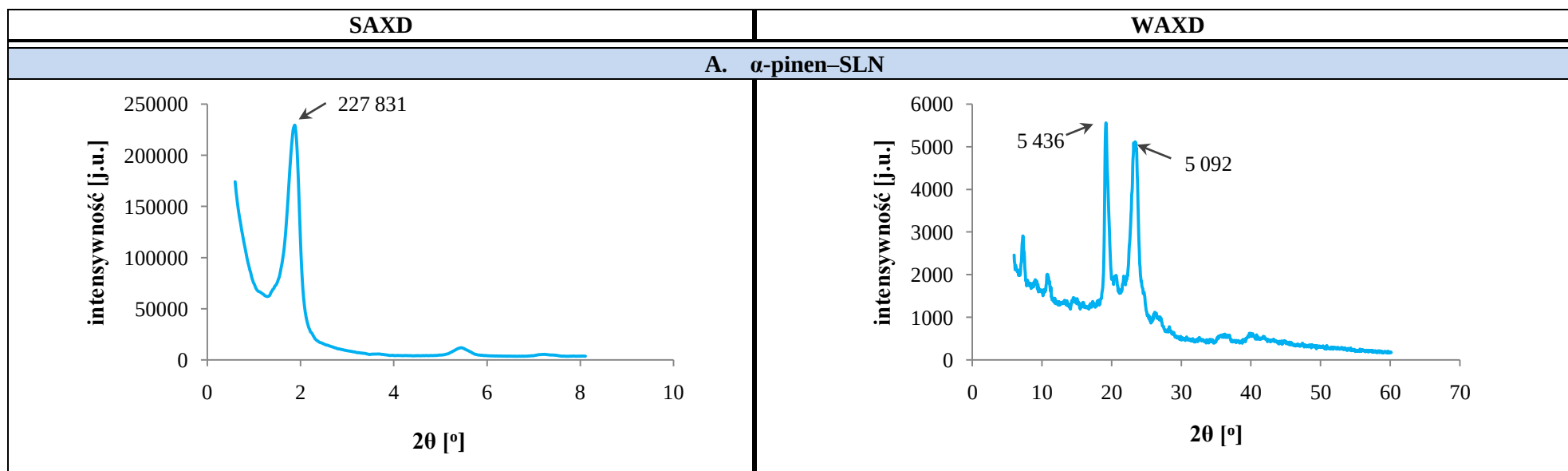
Załącznik 21. Otrzymane wartości indeksów niestabilności wszystkich SLN inkorporowanych monoterpenami oraz próbki odniesienia (puste-SLN) po syntezie, po 24 godzinach oraz po tygodniu i miesiącu przechowywania w temperaturze 4, 25 i 40 °C.

Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Indeks niestabilności
α -pinen-SLN	po syntezie	25	0,008
	po 24 h	4	0,007
		25	0,009
		40	0,065
	po tygodniu	4	0,151
		25	0,210
		40	0,294
	po miesiącu	4	0,039
		25	0,069
		40	0,163
cytral-SLN	po syntezie	25	0,016
	po 24 h	4	0,051
		25	0,032
		40	0,149
	po tygodniu	4	0,201
		25	0,748
		40	0,891
	po miesiącu	4	0,495
		25	0,042
		40	0,177
geraniol-SLN	po syntezie	25	0,000
	po 24 h	4	0,160
		25	0,031
		40	0,014
	po tygodniu	4	0,301
		25	0,129
		40	0,420
	po miesiącu	4	0,659
		25	0,351
		40	0,890
limonen-SLN	po syntezie	25	0,020
	po 24 h	4	0,152
		25	0,100
		40	0,179

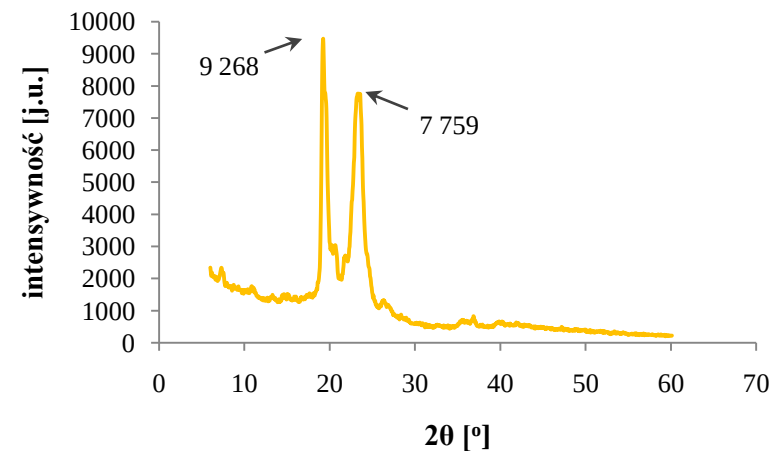
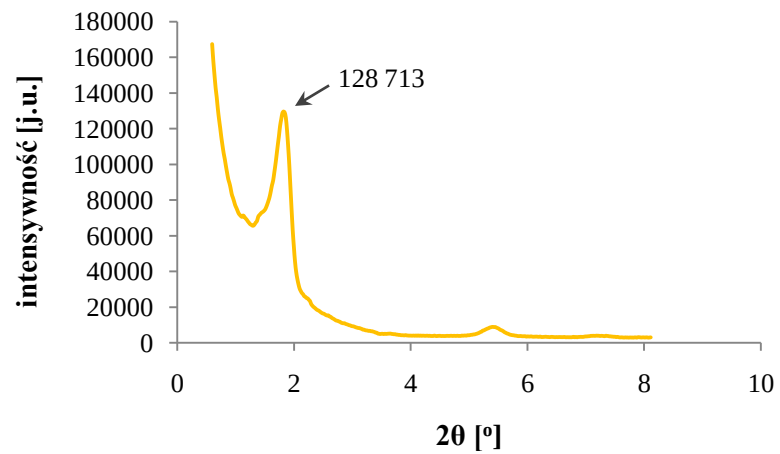
Nazwa próbki	Termin pomiaru	Temperatura przechowywania [°C]	Indeks niestabilności
	po tygodniu	4	0,240
		25	0,270
		40	0,301
	po miesiącu	4	0,131
		25	0,257
		40	0,348
puste-SLN	po syntezie	25	0,387
	po 24 h	4	0,305
		25	0,370
		40	0,389
	po tygodniu	4	0,250
		25	0,355
		40	0,412
	po miesiącu	4	0,151
		25	0,367
		40	0,584

Dyfrakcja promieni rentgenowskich (XRD)

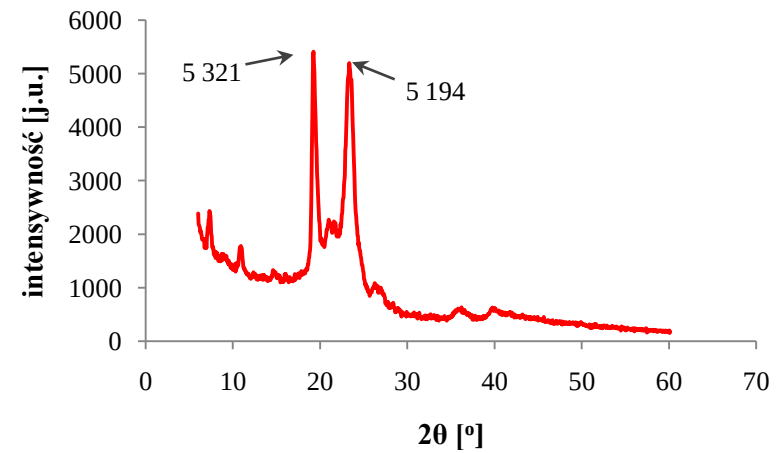
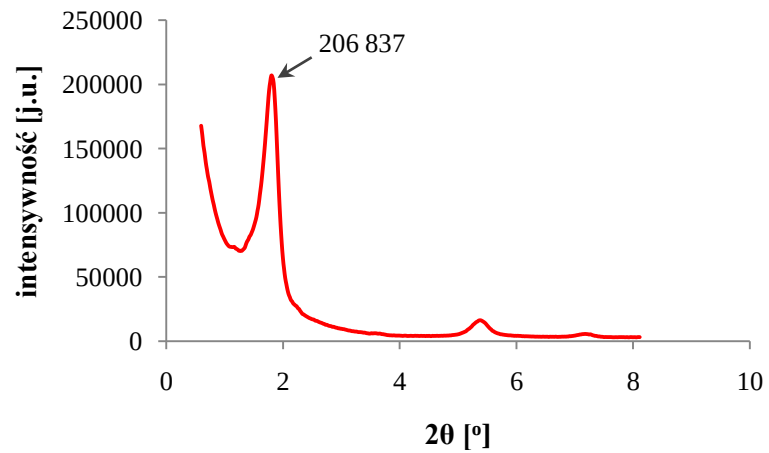
Załącznik 22. Analiza dyfraktogramów w zakresie nisko- i wysokokątowym dla poszczególnych próbek SLN.



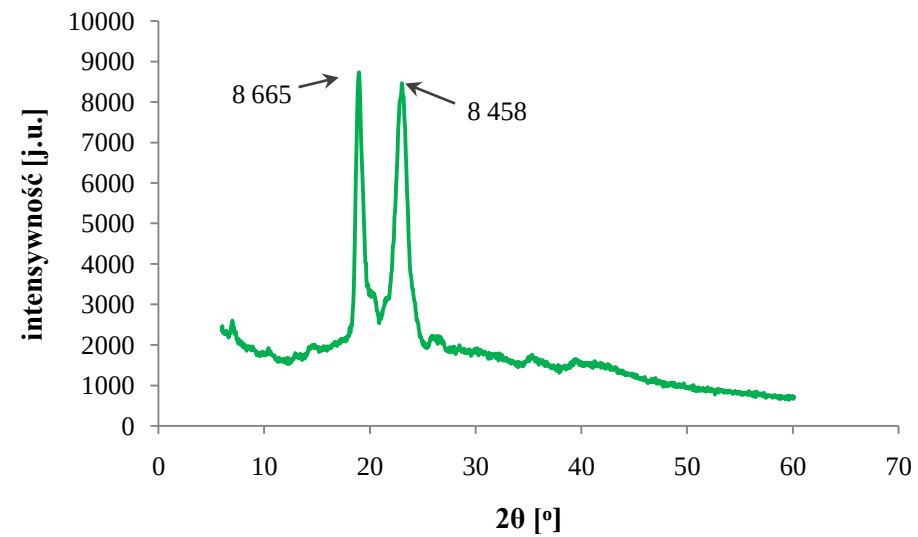
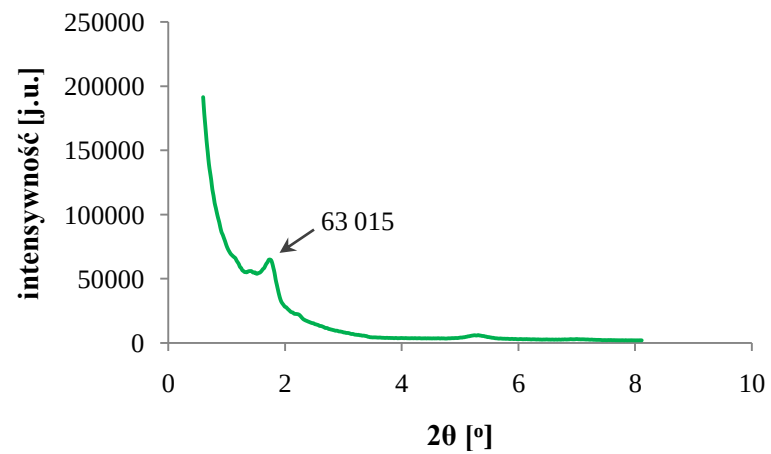
B. cytral-SLN



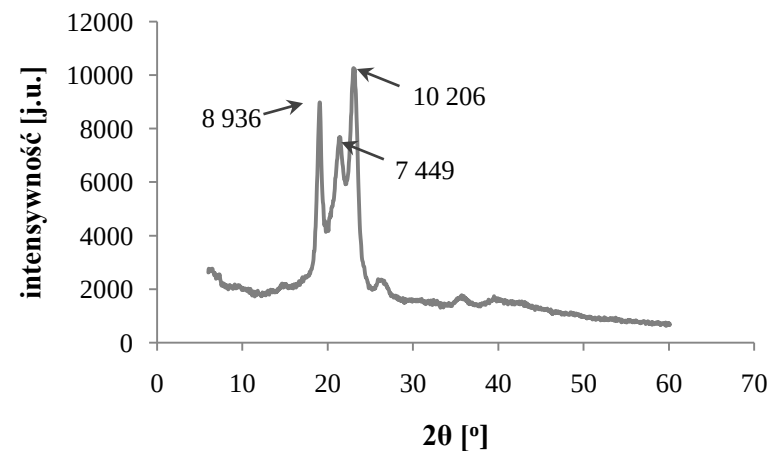
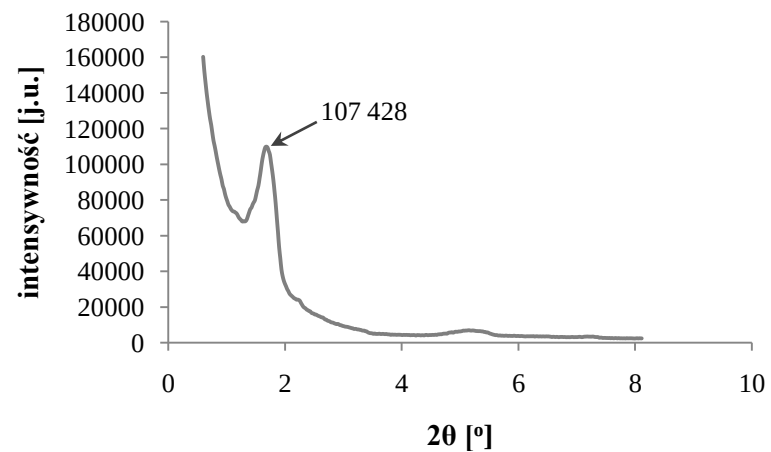
C. geraniol-SLN



D. limonen-SLN

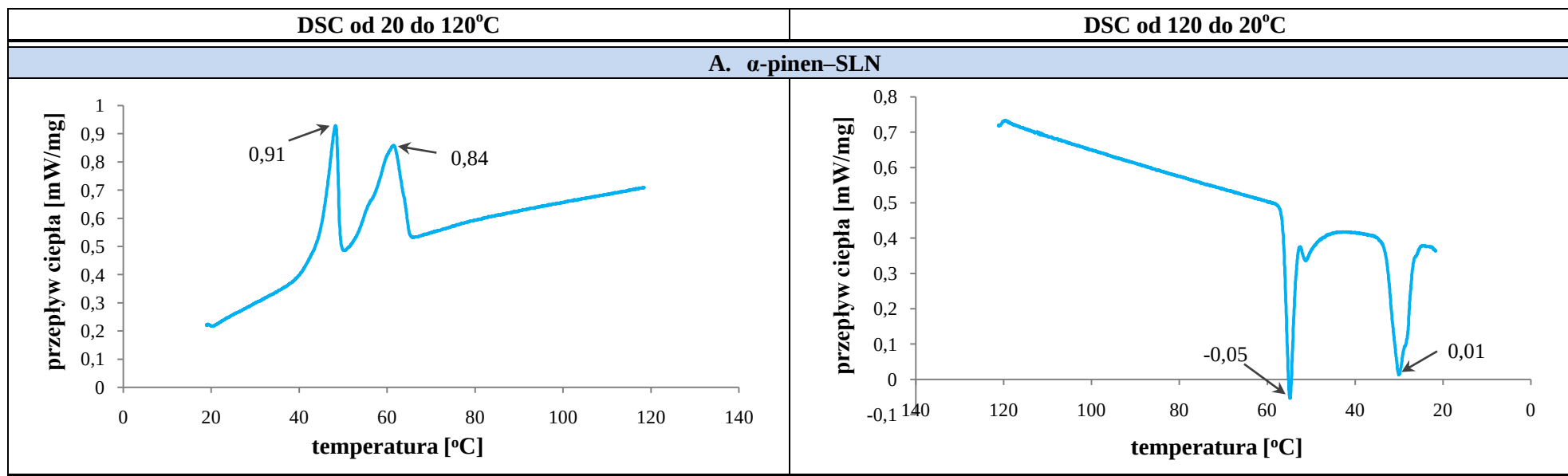


E. puste-SLN

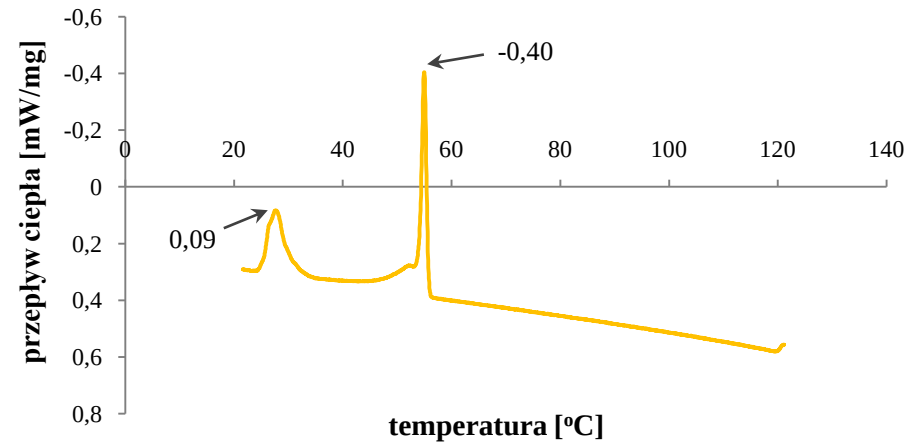
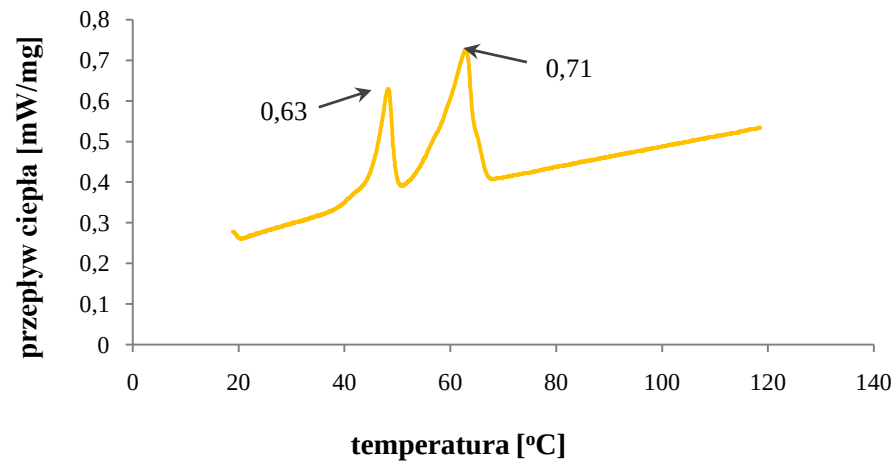


Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

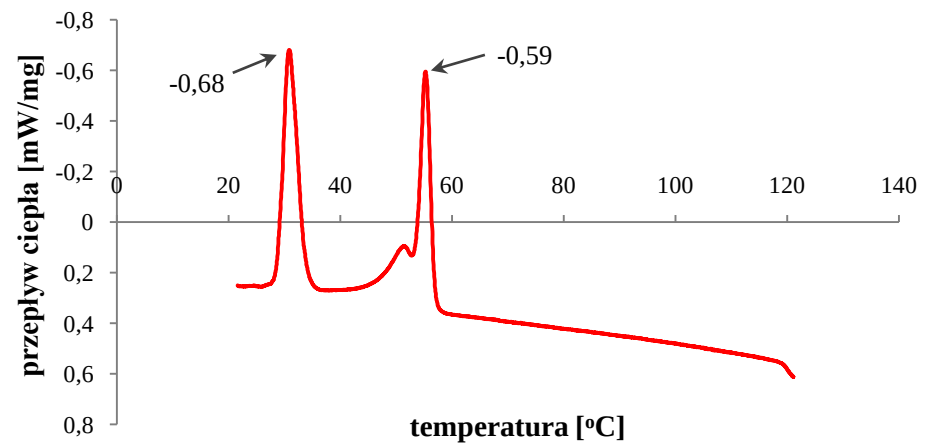
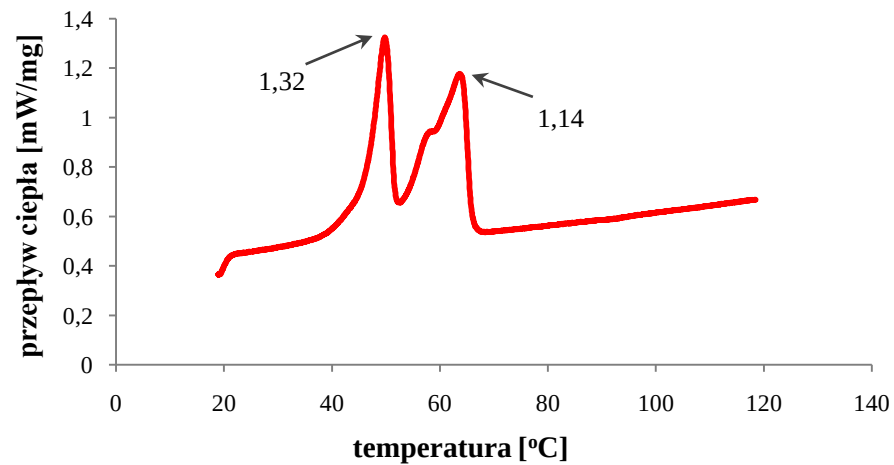
Załącznik 23. Analiza termogramów DSC podczas ogrzewania (od 20 do 120°C) i chłodzenia (120 do 20°C) poszczególnych próbek SLN.



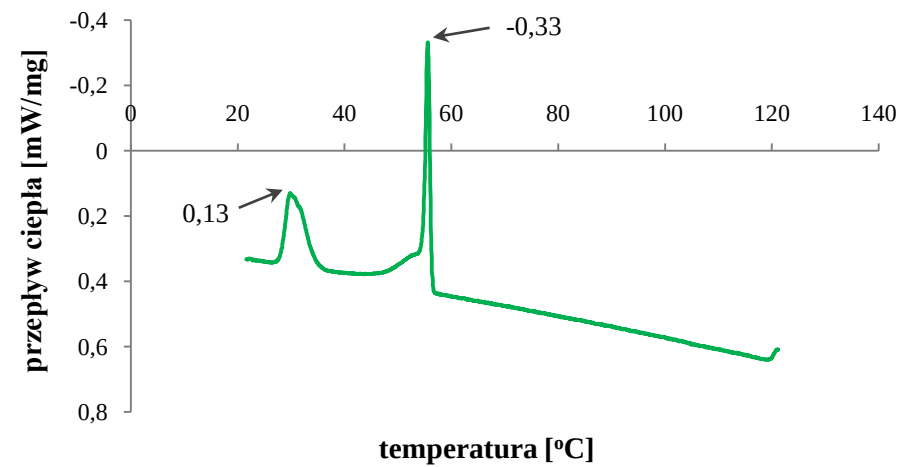
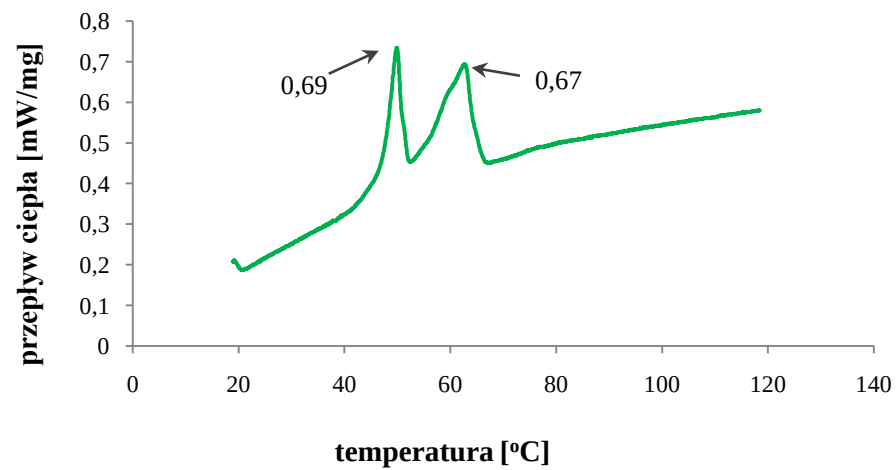
B. cytral-SLN



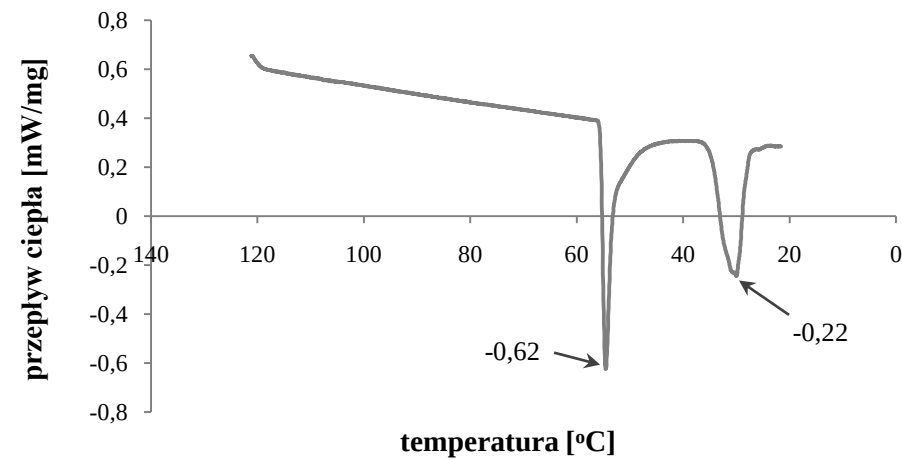
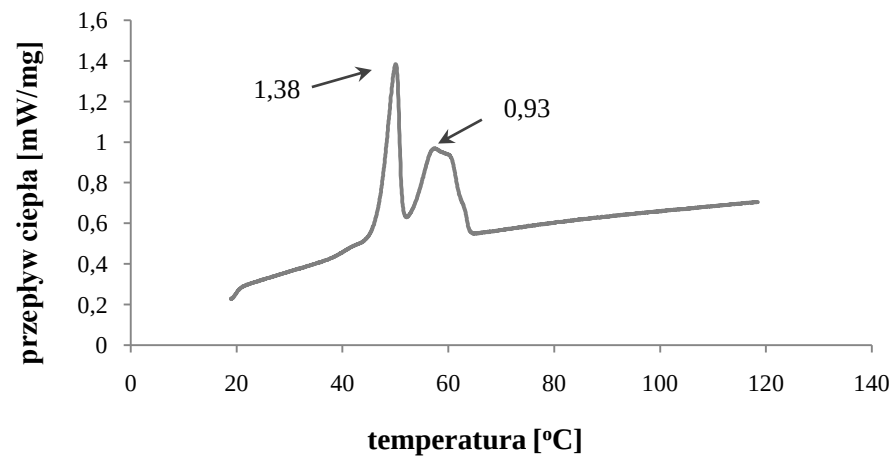
C. geraniol-SLN



D. limonen-SLN



E. puste-SLN



12. LITERATURA

- [1] P. Morganti, E. Ruocco, R. Wolf, V. Ruocco, Percutaneous absorption and delivery systems, *Clin. Dermatol.*, 19 (2001) 489-501.
- [2] M. Malinowska, E. Sikora, J. Ogonowski, Transport przez naskórkowy aktywnych składników kosmetycznych, *Wiad. Chem.* (2013).
- [3] M. Martini, Anatomia i fizjologia skóry, in: *Kosmetologia i farmakologia skóry*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa (2007) 37-59.
- [4] A. Zielińska, I. Nowak, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel carriers for cosmetic ingredients, in: A.M. Grumezescu (Ed.) *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*, William Andrew Publishing (2016) 231-255.
- [5] <http://www.dermnetnz.org/> (2018).
- [6] Z.D. Draelos, J.S. Dover, M. Alam, A. Ignaciuk, M. Tomaszewski, *Kosmeceutyki*, Elsevier Urban & Partner (2011).
- [7] H. Bojarowicz, B. Woźniak, Wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz ich wpływ na skórę, *Probl. Hig. Epidemiol.*, 89 (2008) 471-475.
- [8] J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, The lipid organisation in human *stratum corneum* and model systems, *Open Dermatol. J.*, 4 (2010).
- [9] E. Lamer-Zarawska, A. Gwardys, C. Chwała, *Rośliny w kosmetyce i kosmetologii przeciwstarzeniowej*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa (2014).
- [10] S. Jabłońska, T. Chorzelski, *Choroby skóry*, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa (2002).
- [11] M. Jaworska, E. Sikora, J. Ogonowski, Czynniki wpływające na penetrację składników aktywnych przez skórę, *Wiad. Chem.* (2011) 301-320.
- [12] S. Majewski, J. Arct, K. Pytkowska, Kosmetyczne zastosowanie witamin A i E - pielęgnacja i suplementacja, *Wyższa Szkoła Zawodowa Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia*, Warszawa (2003).
- [13] A. Zielińska, I. Nowak, Kwasy tłuszczowe w olejach roślinnych i ich znaczenie w kosmetyce, *Chemicz.*, 68 (2014) 103-110.
- [14] D. Śniegórska, C. Kowalewski, K. Wertheim-Tysarowska, Struktura molekularna bariery naskórkowej i jej zaburzenia w wybranych chorobach z grupy rybiej łuski, *Post. Bioch.*, 62 (2016) 36-45.
- [15] E. Proksch, J.M. Brandner, J.M. Jensen, The skin: an indispensable barrier, *Exp. Dermatol.*, 17 (2008) 1063-1072.
- [16] H. Kowalska, A. Sysa-Jędrzejowska, A. Woźniacka, Role of diet in the aetiopathogenesis of acne, *Przegl. Dermatol.*, 105 (2018).
- [17] M. Noszczyk, *Kosmetologia pielęgnacyjna i lekarska*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL (2016).
- [18] D. Jenerowicz, *Leczenie ogólne atopowego zapalenia skóry*, Termedia, Poznań (2012).
- [19] S. Jurkowska, *Surowce kosmetyczne*, WSF Wrocław (2001).
- [20] A. Kołodziejczyk, *Naturalne związki organiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa (2006).
- [21] I. Żak, I. Szoltysek-Bołdys, Kwasy tłuszczowe i ikozanoidy, [w:] I. Żak (Ed.) *Chemia medyczna*, ŚAM Katowice (2001) 177-192.
- [22] Z. Sarbak, B. Jachymska-Sarbak, A. Sarbak, *Chemia w kosmetyce i kosmetologii*, MedPharm Polska (2013).
- [23] R. Uauy, A.D. Dangour, Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids, *Nutr. Rev.*, 64 (2006).
- [24] M. Dąbrowska, Zastosowanie metod fizykochemicznych oraz aplikacyjnych do oceny jakości formułacji kosmetycznych zawierających oleje roślinne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, Pracownia Chemii Stosowanej, Poznań (2015).
- [25] N. Dayan, Pathways for skin penetration, in: *Cosmetics & Toiletries* (2005) 67-76.

- [26] A.-H. Ghanem, H. Mahmoud, U.D. Rohr, S. Borsadia, P. Liu, J.L. Fox, W.R. Good, The effects of ethanol on the transport of β -estradiol and other permeants in hairless mouse skin. II. A new quantitative approach, *J. Controlled Release*, 6 (1987) 75-83.
- [27] M. Sala, R. Diab, A. Elaissari, H. Fessi, Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications, *Int. J. Pharm.* (2017).
- [28] L. Kang, C. Yap, P. Lim, Y. Chen, P. Ho, Y. Chan, G. Wong, S. Chan, Formulation development of transdermal dosage forms: Quantitative structure-activity relationship model for predicting activities of terpenes that enhance drug penetration through human skin, *J. Controlled Release*, 120 (2007) 211-219.
- [29] S. Grégoire, C. Ribaud, F. Benech, J. Meunier, A. Garrigues-Mazert, R.H. Guy, Prediction of chemical absorption into and through the skin from cosmetic and dermatological formulations, *Br. J. Dermatol.*, 160 (2009) 80-91.
- [30] L. Chen, G. Lian, L. Han, Modeling transdermal permeation. Part I. Predicting skin permeability of both hydrophobic and hydrophilic solutes, *AIChE J.*, 56 (2010) 1136-1146.
- [31] T. Hahn, U. Schaefer, C. Lehr, Measuring skin absorption *in vitro*, *SÖFW-Journal*, 136 (2010).
- [32] T.J. Franz, Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data, *J. Invest. Dermatol.*, 64 (1975) 190-195.
- [33] J. Arct, A. Eysymont, Innowacyjność w kosmetologii, Wydawnictwa Wyższej Szkoły Zawodowej Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia, Warszawa (2013).
- [34] S. Vats, C. Saxena, T. Easwari, V. Shukla, Emulsion Based Gel Technique: Novel Approach for Enhancing Topical Drug Delivery of Hydrophobic Drugs, *Int. J. Pharm. Res. Scholars*, 3 (2014) 650-653.
- [35] B. Sinkó, T.M. Garrigues, G.T. Balogh, Z.K. Nagy, O. Tsinman, A. Avdeef, K. Takács-Novák, Skin – PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45 (2012) 698-707.
- [36] G. Ottaviani, S. Martel, P.-A. Carrupt, Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability, *J. Med. Chem.*, 49 (2006) 3948-3954.
- [37] B. Sinkó, J. Kökösi, A. Avdeef, K. Takács-Novák, A PAMPA Study of the Permeability-Enhancing Effect of New Ceramide Analogues, *Chem. Biodivers.*, 6 (2009) 1867-1874.
- [38] S.K. Chittimalla, Absorption: Passive and active transport (permeability) - 2, [in:] *Medicinal Chemistry for Newbies at Research* (2018).
- [39] R.L. Bronaugh, R.F. Stewart, E.R. Congdon, Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62 (1982) 481-488.
- [40] R.L. Bronaugh, *In vitro* percutaneous absorption models, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 919 (2000) 188-191.
- [41] R.L. Bronaugh, R.F. Stewart, Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell, *J. Pharm. Sci.*, 74 (1985) 64-67.
- [42] S.W. Collier, N. Sheikh, A. Sakr, J. Lichtin, R. Stewart, R. Bronaugh, Maintenance of skin viability during *in vitro* percutaneous absorption/metabolism studies, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 99 (1989) 522-533.
- [43] C. Carbone, E. Arena, V. Pepe, O. Prezzavento, I. Cacciatore, H. Turkez, A. Marrazzo, A. Di Stefano, G. Puglisi, Nanoencapsulation strategies for the delivery of novel bifunctional antioxidant/ σ 1 selective ligands, *Colloids Surf. B*, 155 (2017) 238-247.
- [44] J. F Fangueiro, F. Veiga, A. M Silva, E. B Souto, Ocular Drug Delivery-New Strategies for targeting anterior and posterior segments of the eye, *Curr. Pharm. Des.*, 22 (2016) 1135-1146.
- [45] J. Pardeike, A. Hommoss, R.H. Müller, Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *Int. J. Pharm.*, 366 (2009) 170-184.

- [46] E. Souto, R. Müller, Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN[®], NLC[®]), *Int. J. Cosmet. Sci.*, 30 (2008) 157-165.
- [47] E.B. Souto, R.H. Müller, Lipid nanoparticles: effect on bioavailability and pharmacokinetic changes, [in:] *Drug delivery*, Springer (2010) 115-141.
- [48] R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54 (2002) 131-155.
- [49] S. Wissing, O. Kayser, R. Müller, Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56 (2004) 1257-1272.
- [50] A. Saupe, S.A. Wissing, A. Lenk, C. Schmidt, R.H. Müller, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) – structural investigations on two different carrier systems, *Biomed. Mater. Eng.*, 15 (2005) 393-402.
- [51] V. Teeranachaideekul, R.H. Müller, V.B. Junyaprasert, Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC) – effects of formulation parameters on physicochemical stability, *Int. J. Pharm.*, 340 (2007) 198-206.
- [52] M. Teixeira, C. Carbone, E. Souto, Beyond liposomes: Recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery, *Prog. Lipid Res.*, 68 (2017) 1-11.
- [53] A. Kovacevic, S. Savic, G. Vuleta, R. Müller, C. Keck, Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability and particle matrix structure, *Int. J. Pharm.*, 406 (2011) 163-172.
- [54] K.L. Guimarães, M.I. Ré, Lipid nanoparticles as carriers for cosmetic ingredients: The first (SLN) and the second generation (NLC), *Nanocosmetics and nanomedicines* (2011) 101-122.
- [55] S.A. Wissing, R.H. Müller, The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – *in vivo* study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 56 (2003) 67-72.
- [56] E. Souto, A. Almeida, R. Müller, Lipid nanoparticles (SLN[®], NLC[®]) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 3 (2007) 317-331.
- [57] E. Souto, S. Wissing, C. Barbosa, R. Müller, Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery, *Int. J. Pharm.*, 278 (2004) 71-77.
- [58] M. Üner, Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems, *Pharmazie - Int. J. Pharm. Sci.*, 61 (2006) 375-386.
- [59] C. Puglia, F. Bonina, Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals, *Expert Opin. Drug. Deliv.*, 9 (2012) 429-441.
- [60] S. Wissing, R. Müller, Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: *in vitro* release and *in vivo* skin penetration, *J. Controlled Release*, 81 (2002) 225-233.
- [61] S.A. Wissing, R.H. Müller, Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN), *Int. J. Pharm.*, 254 (2003) 65-68.
- [62] S. Wissing, R. Müller, Solid lipid nanoparticles (SLN) - a novel carrier for UV blockers, *Pharmazie*, 56 (2001) 783-786.
- [63] D. Teijeiro-Osorio, C. Remuñán-López, M.J. Alonso, New generation of hybrid poly/oligosaccharide nanoparticles as carriers for the nasal delivery of macromolecules, *Biomacromolecules*, 10 (2008) 243-249.
- [64] W. Zhang, W. Niu, Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded octyl methoxycinnamate [J], *CIESC J.*, 10 (2011) 043.
- [65] E.B. Souto, S. Doktorovova, Chapter 6 - Solid Lipid Nanoparticle Formulations: Pharmacokinetic and Biopharmaceutical Aspects in Drug Delivery, *Methods Enzymol.*, 464 (2009) 105-129.
- [66] E. Lason, J. Ogonowski, Solid Lipid Nanoparticles-characteristics, application and obtaining, *Chemik*, 65 (2011) 960-967.

- [67] C. Schwarz, W. Mehnert, J. Lucks, R. Müller, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization, *J. Controlled Release*, 30 (1994) 83-96.
- [68] H. Wosicka, J. Lulek, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers in novel cosmetics., *Pol. J. Cosmetol.*, 12 (2009) 23-37.
- [69] M.R. Gasco, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, Patent (1993).
- [70] S. Mukherjee, S. Ray, R. Thakur, Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system, *Indian J. Pharm. Sci.*, 71 (2009) 349.
- [71] E.B. Souto, S. Doktorovova, E. Gonzalez-Mira, M.A. Egea, M.L. Garcia, Feasibility of lipid nanoparticles for ocular delivery of anti-inflammatory drugs, *Curr. Eye Res.*, 35 (2010) 537-552.
- [72] A. Leonardi, C. Bucolo, G.L. Romano, C.B.M. Platania, F. Drago, G. Puglisi, R. Pignatello, Influence of different surfactants on the technological properties and *in vivo* ocular tolerability of lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 470 (2014) 133-140.
- [73] E.B. Souto, J.F. Figueiro, R.H. Müller, Solid lipid nanoparticles (SLNTM), [in:] I. Uchegbu, A. Schätzlein, W. Cheng, A. Lalatsa (Eds.) *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*, Springer, New York, NY (2013) 91-116.
- [74] S. Doktorová, A.B. Kovačević, M.L. Garcia, E.B. Souto, Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from *in vitro* and *in vivo* evaluation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 108 (2016) 235-252.
- [75] F. Cerreto, P. Paolicelli, S. Cesa, H.M.A. Amara, F.D. D'Auria, G. Simonetti, M.A. Casadei, Solid lipid nanoparticles as effective reservoir systems for long-term preservation of multidose formulations, *AAPS PharmSciTech*, 14 (2013) 847-853.
- [76] R. Müller, R. Petersen, A. Hommoss, J. Pardeike, Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59 (2007) 522-530.
- [77] C.M. Keck, A. Kovačević, R.H. Müller, S. Savić, G. Vuleta, J. Milić, Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): The value of different alkyl polyglucoside surfactants, *Int. J. Pharm.*, 474 (2014) 33-41.
- [78] R.M. Shah, F. Malherbe, D. Eldridge, E.A. Palombo, I.H. Harding, Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique, *J. Colloid Interface Sci.*, 428 (2014) 286-294.
- [79] F. Brugè, E. Damiani, F. Marcheggiani, A. Offerta, C. Puglia, L. Tiano, A comparative study on the possible cytotoxic effects of different nanostructured lipid carrier (NLC) compositions in human dermal fibroblasts, *Int. J. Pharm.*, 495 (2015) 879-885.
- [80] V. Teeranachaideekul, E.B. Souto, V.B. Junyaprasert, R.H. Müller, Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q₁₀ – Development, physicochemical characterization and *in vitro* release studies, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 67 (2007) 141-148.
- [81] G. Schroeder, *Nanotechnologia, kosmetyki, chemia supramolekularna, Cursiva* (2010).
- [82] W. Mehnert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47 (2001) 165-196.
- [83] X. Yang, L. Zhao, L. Almasy, V.M. Garamus, A. Zou, R. Willumeit, S. Fan, Preparation and characterization of 4-dedimethylamino sancycline (CMT-3) loaded nanostructured lipid carrier (CMT-3/NLC) formulations, *Int. J. Pharm.*, 450 (2013) 225-234.
- [84] M. Joshi, V. Patravale, Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib, *Int. J. Pharm.*, 346 (2008) 124-132.
- [85] O. Uchechi, J.D. Ogbonna, A.A. Attama, Nanoparticles for dermal and transdermal drug delivery, [in:] *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, InTech (2014).
- [86] E. Oelke, E. Oplinger, C. Hanson, K. Kelling, Meadowfoam, *Alternative Field Crops Manual*, (1990).
- [87] M.A.S.M. Nasir, Taxonomic perspective of plant species yielding vegetable oils used in cosmetics and skin care products, *Afr. J. Biotechnol.*, 4 (2005) 36.

- [88] A. Zielińska, M. Dąbrowska, I. Nowak, Olej z nasion meadowfoam–„perła” wśród olejów roślinnych, *Pol. J. Cosmetol.* (2015) 18(2) 113-116.
- [89] J. Alander, A. Andersson, C. Lindstrom, Cosmetic emollients with high stability against photo-oxidation, *Lipid Technol.*, 18 (2006) 226.
- [90] S. Intanon, A. Hulting, D. Myrold, C. Mallory-Smith, Impacts of meadowfoam seed meal amendment on weeds and soil microbial activity, [in:] *The 4th Tropical Weed Science Conference* (2013) 61.
- [91] S. Zereshki, Distillation-Advances from modeling to applications, InTech, Croatia, (2012).
- [92] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dwarf_wooly_meadowform.jpg, (2018).
- [93] <https://meadowfoam.com/>, (2018).
- [94] I. Vermaak, G.P.P. Kamatou, B. Komane-Mofokeng, A. Viljoen, K. Beckett, African seed oils of commercial importance - cosmetic applications, *S. Afr. J. Bot.*, 77 (2011) 920-933.
- [95] J. Eloff, Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst. subsp. caffra (Sond.) Kokwaro) (Anacardiaceae) bark and leaves, *J. Ethnopharmacol.*, 76 (2001) 305-308.
- [96] A.A. Mariod, S.I. Abdelwahab, *Sclerocarya birrea* (Marula), an African tree of nutritional and medicinal uses: a review, *Food Rev. Int.*, 28 (2012) 375-388.
- [97] J. Hall, E. O'brien, F. Sinclair, *Sclerocarya birrea*: A Monograph School of Agriculture and Forest Science Publication No. 19, University of Wales, Bangor, UK (2002) 157.
- [98] <https://pl.wikipedia.org/wiki/Marula>, (2018).
- [99] A. Zielińska, Master's thesis: Hyaluronic acid as a facial filler for men – rheology study and skin efficiency estimation in *in vivo* tests, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (2013).
- [100] R. Dębowska, Badania *in vitro* i *ex vivo* we współczesnej kosmetologii, *Chemik*, 64 (2010) 74-79.
- [101] I. Sokołowska, Dlaczego warto łączyć testy *in vitro* i *in vivo* w badaniach produktów kosmetycznych?, *Świat Przem. Kosmet.*, 20 (2014) 59-61.
- [102] J. Igielska, J. Gościańska, B. Witkowska, I. Nowak, Badania *in vivo* substancji stosowanych w przemyśle kosmetycznym, *Świat Przem. Kosmet.*, 21 (2015) 56-61.
- [103] D. Chomiczewska, M. Kieć-Świerczyńska, B. Kręcis, Kontaktowe zapalenie skóry z podrażnienia część II. Metody badania działania drażniącego substancji chemicznych, *Med. Pr.*, 60 (2009) 209.
- [104] J. Koziej, Badania i dokumentacja produktów kosmetycznych zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 dotyczącym produktów kosmetycznych, *Świat Przem. Kosmet.*, 10 (2012) 22-25.
- [105] A. Beloqui, M.Á. Solinís, A. Rodríguez-Gascón, A.J. Almeida, V. Prétat, Nanostructured lipid carriers: promising drug delivery systems for future clinics, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12 (2016) 143-161.
- [106] M. Geszke-Moritz, M. Moritz, Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies, *Mater. Sci. Eng. C.*, 68 (2016) 982-994.
- [107] A. Garcês, M. Amaral, J.S. Lobo, A. Silva, Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review, *Eur. J. Pharm. Sci.*, (2017).
- [108] R. H. Müller, R. Shegokar, C. M Keck, 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications, *Curr. Drug Discov. Technol.*, 8 (2011) 207-227.
- [109] E. Desmet, M. Van Gele, J. Lambert, Topically applied lipid-and surfactant-based nanoparticles in the treatment of skin disorders, *Expert Opin. Drug. Deliv.*, 14 (2017) 109-122.

- [110] R.H. Müller, S. Staufenbiel, C.M. Keck, Lipid Nanoparticles (SLN, NLC) for innovative consumer care & household products, *Household and Personal Care Today*, 9 (2014) 18-25.
- [111] P. Severino, T. Andreani, A. Jäger, M.V. Chaud, M.H.A. Santana, A.M. Silva, E.B. Souto, Solid lipid nanoparticles for hydrophilic biotech drugs: optimization and cell viability studies (Caco-2 & HEPG-2 cell lines), *European journal of medicinal chemistry*, 81 (2014) 28-34.
- [112] H. Kim, J.T. Kim, S. Barua, S.-Y. Yoo, S.-C. Hong, K.B. Lee, J. Lee, Seeking better topical delivery technologies of moisturizing agents for enhanced skin moisturization, *Expert Opin. Drug. Deliv.*, 15 (2018) 17-31.
- [113] V. Jennings, M. Schäfer-Korting, S. Gohla, Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties, *J. Controlled Release*, 66 (2000) 115-126.
- [114] V. Sanna, G. Caria, A. Mariani, Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the *ex vivo* skin permeability of Econazole nitrate, *Powder Technol.*, 201 (2010) 32-36.
- [115] C.-L. Fang, S. A Al-Suwayeh, J.-Y. Fang, Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting, *Recent Pat. Nanotechnol.*, 7 (2013) 41-55.
- [116] R.H. Müller, C.M. Keck, Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles, *J. Biotechnol.*, 113 (2004) 151-170.
- [117] F. Knorr, J. Lademann, A. Patzelt, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, A. Vogt, Follicular transport route – research progress and future perspectives, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 71 (2009) 173-180.
- [118] K. Cal, J. Stefanowska, Metody zwiększania przenikania substancji leczniczych przez skórę, *Farm. Pol.*, 66 (2010) 514-520.
- [119] H. Wosicka, K. Cal, Targeting to the hair follicles: current status and potential, *J. Dermatol. Sci.*, 57 (2010) 83-89.
- [120] R.H. Müller, D. Rühl, S. Runge, K. Schulze-Forster, W. Mehnert, Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant, *Pharm. Res.*, 14 (1997) 458-462.
- [121] V. Jennings, A.F. Thünemann, S.H. Gohla, Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids, *Int. J. Pharm.*, 199 (2000) 167-177.
- [122] H. Wosicka-Frąckowiak, Mikro-i nanocząstki lipidowe jako nośniki roksytromycyny do mieszków włosowych, Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny (2014).
- [123] R.H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50 (2000) 161-177.
- [124] J. Buzek, B. Ask, Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, *Off. J. Eur. Union*, 342 (2009).
- [125] U. Bernauer, L. Bodin, L. Celleno, Q.C. Mohammad, P.-J. Coenraads, M. Dusinska, J. Ezendam, E. Gaffet, L.G. Corrado, B.G. Brunstad, Checklists for Applicants submitting dossiers on Cosmetic Ingredients to be evaluated by the SCCS (2017).
- [126] A. Gergely, L. Coroyannakis, Nanotechnology in the EU cosmetics regulation, *Household and Personal Care Today*, 3 (2009) 28-30.
- [127] M. Widmer, C. Meili, 12 Approaching the nanoregulation problem in chemicals legislation in the EU and US, *International Handbook on Regulating Nanotechnologies*, (2010) 238.
- [128] K. Mistry, D. Sarker, SLNs can serve as the New Brachytherapy Seed: Determining Influence of Surfactants on Particle Size of Solid Lipid Microparticles and Development of Hydrophobised Copper Nanoparticles for Potential Insertion, *J. Chem. Eng. Process Technol.*, 7 (2016) 302.

- [129] S.K. Sahoo, R. Misra, S. Parveen, Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging, [in:] *Nanomedicine in Cancer*, Pan Stanford Publishing (2017) 73-124.
- [130] M. Singhal, M. Lapteva, Y.N. Kalia, Formulation challenges for 21st century topical and transdermal delivery systems, Taylor & Francis (2017).
- [131] P. Ghasemiyeh, S. Mohammadi-Samani, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages, *Res. Pharm. Sci.*, 13 (2018) 288.
- [132] J. Pietkiewicz, Mikrosfery lipidowe jako nowa postać leku pozajelitowego: Opracowanie metody sporządzania i próba inkorporacji substancji leczniczych (2005).
- [133] A. Alemanno, EU risk regulation and science: The role of experts in decision-making and judicial review, *European Risk Governance* (2008) 37.
- [134] S. NfG, The SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation, SCCS/1564/15, 2016.
- [135] T. Linsinger, G. Roebben, D. Gilliland, L. Calzolari, F. Rossi, N. Gibson, C. Klein, Requirements on measurements the European Commission definition of the term "nanomaterial" (2012).
- [136] E.E. Commission, Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial, *Off. J. Eur. Union*, 275 (2011) 38.
- [137] L. Rigano, N. Lionetti, Nanobiomaterials in galenic formulations and cosmetics, [in:] A.M. Grumezescu (Ed.) *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*, Elsevier (2016) 121-148.
- [138] <http://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceRegulation/GuidanceDocuments/ucm300886.htm>. Accessed, 9 (2014).
- [139] G.J. Nohynek, E. Antignac, T. Re, H. Toutain, Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 243 (2010) 239-259.
- [140] D.M. Bowman, N.D. May, A.D. Maynard, Nanomaterials in Cosmetics: Regulatory Aspects, *Analysis of Cosmetic Products* (2017) 289.
- [141] M.G. Wacker, Nanotherapeutics-Product Development Along the "Nanomaterial" Discussion, *J. Pharm. Sci.*, 103 (2014) 777-784.
- [142] H. Rauscher, K. Rasmussen, B. Sokull-Klüttgen, Regulatory aspects of nanomaterials in the EU, *Chem. Ing. Tech.* 89 (2017) 224-231.
- [143] L. Bergkamp, G. Michaux, N. Herbatschek, Nanotechnology regulation in Europe: from REACH and nano-registries to cosmetics, biocides, and medical devices, *Nanotech. L. & Bus.*, 11 (2014) 93.
- [144] E.U. Scientific Committee on Consumer Safety, Memorandum on "Relevance and Quality of Data in Safety Dossiers on Nanomaterials", 12 December 2013, SCCS/1524/13, revision of 27 March 2014 (2013).
- [145] B. Siekmann, K. Westesen, Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 42 (1996) 104-109.
- [146] N. Naseri, H. Valizadeh, P. Zakeri-Milani, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application, *Adv. Pharm. Bull.*, 5 (2015) 305.
- [147] D. Haznar, G. Garbacz, Wybrane aspekty technologii leków o modyfikowanym uwalnianiu, *Farm. Pol.*, 65 (2009) 749-757.
- [148] M. Schäfer-Korting, W. Mehnert, H.-C. Korting, Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59 (2007) 427-443.
- [149] A. Feliczak-Guzik, K. Jagodzińska, I. Nowak, Technologia wytwarzania perfum i olejków eterycznych, Wyd. Cursiva, Kostrzyn (2012) 49-103.
- [150] K.B. Torssell, Natural product chemistry: a mechanistic, *J. Nat. Prod.* 2 (1998).
- [151] E. Breitmaier, Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones, John Wiley & Sons (2006).

- [152] S. Jurkowska, *Chemia surowców kosmetycznych*. Wydanie II, Ośrodek Informatyczno-Badawczy „Ekoprzem” Sp. z o.o., Dąbrowa Górnicza (2007).
- [153] U. Wrzeciono, L. Zaprutko, *Chemia związków naturalnych*, Chemistry of natural compounds (2001).
- [154] I. Matławska, *Farmakognozja*, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań (2005).
- [155] A. Astani, P. Schnitzler, Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against *Herpes simplex virus in vitro*, Iran. J. Microbiol., 6 (2014) 149-155.
- [156] A. Feliczak-Guzik, I. Nowak, Mesoporous materials in the synthesis of fragrances, Comprehensive Guide For Mesoporous Materials. Application and Commercialization, Nova Science Publisher (2015) 117.
- [157] Y. Bhalla, V.K. Gupta, V. Jaitak, Anticancer activity of essential oils: a review, J. Sci. Food Agric., 93 (2013) 3643-3653.
- [158] C. Yang, H. Chen, H. Chen, B. Zhong, X. Luo, J. Chun, Antioxidant and anticancer activities of essential oil from Gannan navel orange peel, Molecules, 22 (2017) 1391.
- [159] R. Paduch, M. Kandefer-Szerszeń, M. Trytek, J. Fiedurek, Terpenes: substances useful in human healthcare, Arch. Immunol. Ther. Exp., 55 (2007) 315.
- [160] A.R. Bilia, C. Guccione, B. Isacchi, C. Righeschi, F. Firenzuoli, M.C. Bergonzi, Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach, J. Evid. Based Complementary Altern. Med. (2014).
- [161] M. Sherry, C. Charcosset, H. Fessi, H. Greige-Gerges, Essential oils encapsulated in liposomes: a review, J. Liposome Res., 23 (2013) 268-275.
- [162] K. Khosravi-Darani, M.E. Khoosfi, H. Hosseini, Encapsulation of Zataria multiflora Boiss. Essential oil in liposome: antibacterial activity against E. coli O157: H7 in broth media and minced beef, J. Food Safety, 36 (2016) 515-523.
- [163] C. Liolios, O. Gortzi, S. Lalas, J. Tsaknis, I. Chinou, Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of Origanum dictamnus L. and *in vitro* antimicrobial activity, Food Chem., 112 (2009) 77-83.
- [164] S. Das, W.K. Ng, R.B. Tan, Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?, Eur. J. Pharm. Sci., 47 (2012) 139-151.
- [165] K.W. George, J. Alonso-Gutierrez, J.D. Keasling, T.S. Lee, Isoprenoid drugs, biofuels, and chemicals – artemisinin, farnesene, and beyond, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 148 (2015) 355-389.
- [166] E. Kang, H.D. Lee, Y.J. Jung, S.Y. Shin, D. Koh, Y.H. Lee, α -Pinene inhibits tumor invasion through downregulation of nuclear factor (NF)- κ B-regulated matrix metalloproteinase-9 gene expression in MDA-MB-231 human breast cancer cells, Appl. Biol. Chem., 59 (2016) 1-6.
- [167] B. Sundaravel, C.M. Babu, R. Vinodh, W.S. Cha, H.T. Jang, Synthesis of campholenic aldehyde from α -pinene using bi-functional PrAlPO-5 molecular sieves, J. Taiwan Inst. Chem. Eng., 63 (2016) 157-165.
- [168] A.C.R. Silva, P.M. Lopes, M.M.B. Azevedo, D.C.M. Costa, C.S. Alviano, D.S. Alviano, Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers, Molecules, 17 (2012) 6305-6316.
- [169] W. Wang, N. Li, M. Luo, Y. Zu, T. Efferth, Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components, Molecules, 17 (2012) 2704-2713.
- [170] M.J. O'Neill, The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals., in: M.J. O'Neill (Ed.) The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals., Cambridge, UK : Royal Society of Chemistry, England (2006).
- [171] B. Mercier, J. Prost, M. Prost, The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review, Int. J. Occup. Med. Environ. Health., 22 (2009) 331-342.

- [172] L. Hagvall, J. Bråred Christensson, Cross-reactivity between citral and geraniol – can it be attributed to oxidized geraniol?, *Contact Dermatitis*, 71 (2014) 280-288.
- [173] S.L. Pereira, A.M. Marques, R.T. Sudo, M.A.C. Kaplan, G. Zapata-Sudo, Vasodilator activity of the essential oil from aerial parts of *Pectis brevipedunculata* and its main constituent citral in rat aorta, *Molecules*, 18 (2013) 3072-3085.
- [174] J. Marcus, M.L. Klossek, D. Touraud, W. Kunz, Nano-droplet formation in fragrance tinctures, *Flavour Fragr. J.*, 28 (2013) 294-299.
- [175] D.C.J. Weng, J.B. Latip, S.A.B. Hasbullah, H. Sastrohamidjojo, Separation of geraniol from citronellol by selective oxidation of geraniol to geranial, *Sains Malays.*, 44 (2015) 1183-1188.
- [176] L. Hagvall, C. Bäcktorp, S. Svensson, G. Nyman, A. Börje, A.-T. Karlberg, Fragrance compound geraniol forms contact allergens on air exposure. Identification and quantification of oxidation products and effect on skin sensitization, *Chem. Res. Toxicol.*, 20 (2007) 807-814.
- [177] W. Mączka, K. Wińska, M. Grabarczyk, M. Anioł, Biological properties of geraniol, *Post. Fitoter.* (2015).
- [178] E. Jongedijk, K. Cankar, M. Buchhaupt, J. Schrader, H. Bouwmeester, J. Beekwilder, Biotechnological production of limonene in microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100 (2016) 2927-2938.
- [179] S. Fukumoto, A. Morishita, K. Furutachi, T. Terashima, T. Nakayama, H. Yokogoshi, Effect of flavour components in lemon essential oil on physical or psychological stress, *Stress and Health*, 24 (2008) 3-12.
- [180] A. Pappas, Epidermal surface lipids, *Dermatoendocrinol.*, 1 (2009) 72-76.
- [181] B.J. Bruno, G.D. Miller, C.S. Lim, Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery, *Ther. Deliv.* 4 (2013) 1443-1467.
- [182] T. Subongkot, S. Duangjit, T. Rojanarata, P. Opanasopit, T. Ngawhirunpat, Ultradeformable liposomes with terpenes for delivery of hydrophilic compound, *J. Liposome Res.*, 22 (2012) 254-262.
- [183] M. Hoppel, M. Caneri, O. Glatter, C. Valenta, Self-assembled nanostructured aqueous dispersions as dermal delivery systems, *Int. J. Pharm.*, 495 (2015) 459-462.
- [184] W.-C. Lu, B.-H. Chiang, D.-W. Huang, P.-H. Li, Skin permeation of D-limonene-based nanoemulsions as a transdermal carrier prepared by ultrasonic emulsification, *Ultrason. Sonochem.*, 21 (2014) 826-832.
- [185] I. Khan, A. Bahuguna, P. Kumar, V.K. Bajpai, S.C. Kang, *In vitro* and *in vivo* antitumor potential of carvacrol nanoemulsion against human lung adenocarcinoma A549 cells via mitochondrial mediated apoptosis, *Sci. Rep.*, 8 (2018) 144.
- [186] Q.-h. Yin, F.-x. Yan, X.-Y. Zu, Y.-h. Wu, X.-p. Wu, M.-c. Liao, S.-w. Deng, L.-l. Yin, Y.-z. Zhuang, Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2, *Cytotechnology*, 64 (2012) 43-51.
- [187] M.V. Sobral, A.L. Xavier, T.C. Lima, D.P. de Sousa, Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils, *Sci. World J.* (2014).
- [188] A. Jaafari, M. Tilaoui, H.A. Mouse, L.A. M'bark, R. Aboufatima, A. Chait, M. Lepoivre, A. Zyad, Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 22 (2012) 534-540.
- [189] D. Twilley, N. Lall, The Role of Natural Products From Plants in the Development of Anticancer Agents, [in:] *Natural Products and Drug Discovery*, Elsevier (2018) 139-178.
- [190] H.D. Han, Y.-J. Cho, S.K. Cho, Y. Byeon, H.N. Jeon, H.-S. Kim, B.-G. Kim, D.-S. Bae, G. Lopez-Berestein, A.K. Sood, Linalool-incorporated nanoparticles as a novel anticancer agent for epithelial ovarian carcinoma, *Mol. Cancer. Ther.* 15 (2016) 618-627.
- [191] F. Shi, Y. Zhao, C.K. Firempong, X. Xu, Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of linalool-loaded nanostructured lipid carriers, *Pharm. Biol.*, 54 (2016) 2320-2328.

- [192] M. Ashour, M. Wink, J. Gershenzon, Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes, Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Second Edition (2010) 258-303.
- [193] A. Zaborska, J. Król, A. Brodziak, Witamina A - funkcje i znaczenie dla człowieka, Przemysł Spożywczy, 69 (2015) 36-38.
- [194] H. Bojarowicz, A. Płowiec, Wpływ witaminy A na kondycję skóry, Probl. Hig. Epidemiol, 91 (2010) 352-356.
- [195] M. Gonnet, L. Lethuaut, F. Boury, New trends in encapsulation of liposoluble vitamins, J. Controlled Release, 146 (2010) 276-290.
- [196] V. Jennings, A. Gysler, M. Schäfer-Korting, S.H. Gohla, Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin, Eur. J. Pharm. Biopharm., 49 (2000) 211-218.
- [197] V. Jennings, M. Schäfer-Korting, S. Gohla, Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties, J. Controlled Release, 66 (2000) 115-126.
- [198] J.-P. Jee, S.-J. Lim, J.-S. Park, C.-K. Kim, Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles, Eur. J. Pharm. Biopharm., 63 (2006) 134-139.
- [199] M. Carafa, C. Marianecchi, M. Salvatorelli, L. Di Marzio, F. Cerreto, G. Lucania, E. Santucci, Formulations of retinyl palmitate included in solid lipid nanoparticles: characterization and influence on light-induced vitamin degradation, J. Drug Deliv. Sci. Technol., 18 (2008) 119-124.
- [200] R. Müller, R. Ruick, C. Keck, SmartLipids® - the next generation of lipid nanoparticles by optimized design of particle matrix, DPhG-Jahrestagung, Frankfurt (2014).
- [201] V.M. Ghate, S.A. Lewis, P. Prabhu, A. Dubey, N. Patel, Nanostructured lipid carriers for the topical delivery of tretinoin, Eur. J. Pharm. Biopharm., 108 (2016) 253-261.
- [202] E. Siemieniuk, E. Skrzydlewska, Koenzym Q₁₀ – biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmach zwierząt i człowieka, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej AM w Białymstoku, Postępy Hig Med. Dosw. (online), 59 (2005) 150-159.
- [203] J.C. Schwarz, N. Baisaeng, M. Hoppel, M. Löw, C.M. Keck, C. Valenta, Ultra-small NLC for improved dermal delivery of coenzyme Q₁₀, Int. J. Pharm., 447 (2013) 213-217.
- [204] U. Gałka, J. Ogonowski, Koenzym Q₁₀ – powstawanie, właściwości i zastosowanie w preparatach kosmetycznych, LAB Laboratoria, Aparatura, Badania, 15 (2010) 14-21.
- [205] J. Pardeike, R.H. Müller, Penetration enhancement and occlusion properties of coenzyme Q₁₀-loaded NLC, The American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS), San Antonio, Texas, USA (2006).
- [206] N. Rahmani, S.A. Hashemi, S. Ehteshami, Vitamin E and its clinical challenges in cosmetic and reconstructive medicine with focus on scars; a review, J. Pak. Med. Assoc., 8 (2013) 9.
- [207] A. Zielińska, I. Nowak, Tokoferole i tokotrienole jako witamina E, Chemik, 68 (2014).
- [208] L. Montenegro, L. Rapisarda, C. Ministeri, G. Puglisi, Effects of lipids and emulsifiers on the physicochemical and sensory properties of cosmetic emulsions containing vitamin E, Cosmetics, 2 (2015) 35-47.
- [209] N. Khayata, W. Abdelwahed, M. Chehna, C. Charcosset, H. Fessi, Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor, Int. J. Pharm., 439 (2012) 254-259.
- [210] A. Laouini, H. Fessi, C. Charcosset, Membrane emulsification: A promising alternative for vitamin E encapsulation within nano-emulsion, J. Membr. Sci., 423 (2012) 85-96.
- [211] N. Khayata, W. Abdelwahed, M. Chehna, C. Charcosset, H. Fessi, Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor, Int. J. Pharm., 423 (2012) 419-427.
- [212] E.B. Souto, P. Severino, M.H.A. Santana, S.C. Pinho, Solid lipid nanoparticles: classical methods of lab production, Quim. Nova, 34 (2011) 1762-1769.

- [213] R. Müller, K. Mäder, A. Lippacher, V. Jennings, Solid-liquid (semi-solid) liquid particles and method of producing highly concentrated lipid particle dispersions, German Patent Application, 199 (2000).
- [214] A. Radomska-Soukharev, Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59 (2007) 411-418.
- [215] J. Moschwitz, R. Müller, Drug Nanocrystals-The Universal Formulation Approach for Poorly Soluble Drugs, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences: Nanoparticulate Drug Delivery Systems*, 166 (2007) 71.
- [216] A. Lippacher, R. Müller, K. Mäder, Investigation on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers, *Int. J. Pharm.*, 196 (2000) 227-230.
- [217] R.H. Müller, R. Dobrucki, A. Radomska, Solid lipid nanoparticles as a new formulation with retinol, *Acta Pol. Pharm.*, 56 (1999) 117-120.
- [218] B. Sjöström, B. Bergenståhl, Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate, *Int. J. Pharm.*, 88 (1992) 53-62.
- [219] H. Wosicka, Nanocząstki lipidowe w kosmetologii, Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu (2010).
- [220] P. Severino, M.H.A. Santana, E.B. Souto, Optimizing SLN and NLC by 2² full factorial design: effect of homogenization technique, *Mater. Sci. Eng. C.: C*, 32 (2012) 1375-1379.
- [221] B. Winer, D. Brown, K. Michels, *Statistical Principles in Experimental Medicine*, New York: McGraw-Hill (1991).
- [222] H. Shrestha, R. Bala, S. Arora, Lipid-based drug delivery systems, *J. Pharm. (Hindawi)*, (2014).
- [223] J.F. Figueiro, T. Andreani, M.A. Egea, M.L. Garcia, S.B. Souto, E.B. Souto, Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process, *Colloids Surf., B*, 100 (2012) 84-89.
- [224] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 56 (2011) 141-158.
- [225] Y. Jin, Factor screening in a 12 Run Plackett-Burman design assuming four active factors, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Department of Mathematical Sciences (2016).
- [226] R. Tauler, B. Walczak, S.D. Brown, *Comprehensive chemometrics: chemical and biochemical data analysis*, Elsevier (2009).
- [227] W.H. Swallow, J.F. Monahan, Monte Carlo comparison of ANOVA, MIVQUE, REML, and ML estimators of variance components, *Technometrics*, 26 (1984) 47-57.
- [228] J. Juran, Pareto, Lorenz, Cournot, Bernoulli, Juran and others, op. cit, 25 (1960).
- [229] K.A. Brownlee, *Statistical theory and methodology in science and engineering* (1960).
- [230] X. Yin, Q. You, Z. Jiang, Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology, *Carbohydr. Polym.*, 86 (2011) 1358-1364.
- [231] H.O. Hartley, Smallest composite designs for quadratic response surfaces, *Biometrics*, 15 (1959) 611-624.
- [232] A. Khuri, J. Cornell, *Response Surfaces: Designs and Analysis*, New York: Marcel Dekker, Inc (1987).
- [233] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, F. Delie, Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 69 (2008) 1-9.
- [234] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *J. Controlled Release*, 235 (2016) 337-351.
- [235] K. Jores, W. Mehnert, M. Drechsler, H. Bunjes, C. Johann, K. Mäder, Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles

- by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, *J. Controlled Release*, 95 (2004) 217-227.
- [236] A.P. Instruments, Instrukcja obsługi analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000. MAN 0247 Wydanie 3.0. (2005).
- [237] S. Doktorovova, E.B. Souto, Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery: a comprehensive review, *Expert Opin. Drug. Deliv.*, 6 (2009) 165-176.
- [238] M.I. Ltd., Rodzina urządzeń Zetasizer Nano. Instrukcja użytkownika (MAN0317), (2004).
- [239] <http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zeta%20potential%20-%20An%20introduction%20in%2030%20minutes.pdf>, accessed on: 16/04/2018, (2018).
- [240] C. Freitas, R.H. Müller, Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions, *Int. J. Pharm.*, 168 (1998) 221-229.
- [241] G.D. Kalaycioglu, N. Aydogan, Preparation and investigation of solid lipid nanoparticles for drug delivery, *Colloids Surf. A*, 510 (2016) 77-86.
- [242] A. Fernandes, N. Ferreira, J. Fangueiro, A. Santos, F. Veiga, C. Cabral, A. Silva, E. Souto, Ibuprofen nanocrystals developed by 2² factorial design experiment: A new approach for poorly water-soluble drugs, *Saudi Pharm. J.*, 25 (2017) 1117-1124.
- [243] D. Xu, Y. Qi, X. Wang, X. Li, S. Wang, Y. Cao, C. Wang, B. Sun, E. Decker, A. Panya, The influence of flaxseed gum on the microrheological properties and physicochemical stability of whey protein stabilized β -carotene emulsions, *Food Funct.*, 8 (2017) 415-423.
- [244] L.G. Firma, Materiały szkoleniowe *The Next STEP[®] In Dispersion Analysis* (2018).
- [245] C. Caddeo, M. Manconi, A.M. Fadda, F. Lai, S. Lampis, O. Diez-Sales, C. Sinico, Nanocarriers for antioxidant resveratrol: formulation approach, vesicle self-assembly and stability evaluation, *Colloids Surf. B*, 111 (2013) 327-332.
- [246] A. Tehrani-Bagha, Cationic gemini surfactant with cleavable spacer: Emulsion stability, *Colloids Surf. A*, 508 (2016) 79-84.
- [247] T. Detloff, T. Sobisch, D. Lerche, Instability index, *Dispersion Letters Technical*, 4 (2013) 1-4.
- [248] H. Bunjes, T. Unruh, Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59 (2007) 379-402.
- [249] L. Rey, Glimpses into the realm of freeze-drying: classical issues and new ventures, [in:] *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, Third Edition, CRC Press (2016) 13-40.
- [250] M. Maugey, W. Neri, C. Zakri, A. Derré, A. Pénicaud, L. Noé, M. Chorro, P. Launois, M. Monthieux, P. Poulin, Substantial improvement of nanotube processability by freeze-drying, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 7 (2007) 2633-2639.
- [251] S. Izumikawa, S. Yoshioka, Y. Aso, Y. Takeda, Preparation of poly (l-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate, *J. Controlled Release*, 15 (1991) 133-140.
- [252] W.N. Omwoyo, B. Ogutu, F. Oloo, H. Swai, L. Kalombo, P. Melariri, G.M. Mahanga, J.W. Gathirwa, Preparation, characterization, and optimization of primaquine-loaded solid lipid nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine*, 9 (2014) 3865.
- [253] R.I. Mahato, A.S. Narang, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery: Revised and Expanded*, CRC Press (2017).
- [254] C. Allais, G. Keller, P. Lesieur, M. Ollivon, F. Artzner, X-ray diffraction/Calorimetry coupling, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 74 (2003) 723-728.
- [255] R. Beck, S. Guterres, A. Pohlmann, *Nanocosmetics and nanomedicines: new approaches for skin care*, Springer (2011).
- [256] G. Klančnik, J. Medved, P. Mrvar, Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation, *RMZ – M&G*, 57 (2010) 127-142.

- [257] M. Estanqueiro, J. Conceição, M. Amaral, J. Sousa Lobo, Characterization, sensorial evaluation and moisturizing efficacy of nanolipidgel formulations, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 36 (2014) 159-166.
- [258] G. Słowik, *Podstawy mikroskopii elektronowej i jej wybrane zastosowania w charakterystyce katalizatorów nośnikowych*, Uniwersytet Rzeszowski (2012).
- [259] Y.-W. Su, S.-H. Chao, M.-H. Lee, T.-Y. Ou, Y.-C. Tsai, Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E2 production in macrophages, *Planta Med.*, 76 (2010) 1666-1671.
- [260] M. Mitoshi, I. Kuriyama, H. Nakayama, H. Miyazato, K. Sugimoto, Y. Kobayashi, T. Jippo, K. Kuramochi, H. Yoshida, Y. Mizushima, Suppression of allergic and inflammatory responses by essential oils derived from herbal plants and citrus fruits, *Int. J. Mol. Med.*, 33 (2014) 1643-1651.
- [261] H.J. Lee, H.S. Jeong, D.J. Kim, Y.H. Noh, D.Y. Yuk, J.T. Hong, Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF- κ B activation in RAW264. 7 cells, *Arch. Pharmacol. Res.*, 31 (2008) 342-349.
- [262] D.J. Manayani, D. Thomas, K.A. Dryden, V. Reddy, M.E. Siladi, J.M. Marlett, G.J.A. Rainey, M.E. Pique, H.M. Scobie, M. Yeager, A viral nanoparticle with dual function as an anthrax antitoxin and vaccine, *Plos. Pathog.*, 3 (2007) e142.
- [263] P. Duffy, A. Bennett, M. Roberts, O. Flint, Prediction of phototoxic potential using human A431 cells and mouse 3T3 cells, *Mol. Toxicol.*, 1 (1987) 579-587.
- [264] L.J. Pike, A. Eakes, Epidermal growth factor stimulates the production of phosphatidylinositol monophosphate and the breakdown of polyphosphoinositides in A431 cells, *J. Biol. Chem.*, 262 (1987) 1644-1651.
- [265] T. Kawamoto, J. Mendelsohn, A. Le, G. Sato, C. Lazar, G. Gill, Relation of epidermal growth factor receptor concentration to growth of human epidermoid carcinoma A431 cells, *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 7761-7766.
- [266] D. Breitkreutz, V.M. Schoop, N. Mirancea, M. Baur, H.-J. Stark, N.E. Fusenig, Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants, *Eur. J. Cell Biol.*, 75 (1998) 273-286.
- [267] P. Boukamp, R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, N.E. Fusenig, Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J. Cell Biol.*, 106 (1988) 761-771.
- [268] L.J. Sanches, P.C. Marinello, C. Panis, T.R. Fagundes, J.A. Morgado-Díaz, J.C.M. de-Freitas-Junior, R. Cecchini, A.L. Cecchini, R.C. Luiz, Cytotoxicity of citral against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction, *Tumour Biol.*, 39 (2017).
- [269] M. Davoren, E. Herzog, A. Casey, B. Cottineau, G. Chambers, H.J. Byrne, F.M. Lyng, In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells, *Toxicology in vitro*, 21 (2007) 438-448.
- [270] S.N. Rampersad, Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays, *Sensors*, 12 (2012) 12347-12360.
- [271] F. Bonnier, M. Keating, T.P. Wrobel, K. Majzner, M. Baranska, A. Garcia-Munoz, A. Blanco, H.J. Byrne, Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models, *Toxicol. in Vitro*, 29 (2015) 124-131.
- [272] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *FEBS J.*, 267 (2000) 5421-5426.
- [273] E. Mitrea, C. Ott, A. Meghea, New approaches on the synthesis of effective nanostructured lipid carriers, *Rev. Chim.*, 65 (2014) 50-55.
- [274] J. Jose, G. Netto, Role of solid lipid nanoparticles as photoprotective agents in cosmetics, *J. Cosmet. Dermatol.*, (2018).

- [275] S. Nikolić, S. Gohla, R.H. Müller, Lipid nanoparticles: nanocarriers for more effective and safer photoprotective products, *Expert Rev. Dermatol.*, 6 (2011) 501-507.
- [276] D. Nesseem, Formulation of sunscreens with enhancement sun protection factor response based on solid lipid nanoparticles, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 33 (2011) 70-79.
- [277] R.H. Müller, W. Mehnert, E.B. Souto, Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers for Dermal Delivery, *ChemInform.*, 37 (2006).
- [278] A. zur Mühlen, C. Schwarz, W. Mehnert, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – drug release and release mechanism, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45 (1998) 149-155.
- [279] A. Hommos, Preservative system development for argan oil-loaded nanostructured lipid carriers, *Pharmazie - Int. J. Pharm. Sci.*, 66 (2011) 187-191.
- [280] Sigma-Aldrich, (+)- α -Pinen. Karta charakterystyki zgodnie z Rozporządzeniem WE 1907/2006. Wersja 6.0 Aktualizacja 03.05.2017, sigma-aldrich.com, (2017).
- [281] Sigma-Aldrich, Citral. Karta charakterystyki zgodnie z Rozporządzeniem WE 1907/2006. Wersja 7.0 Aktualizacja 03.05.2017, sigma-aldrich.com, (2017).
- [282] Sigma-Aldrich, Geraniol. Karta charakterystyki zgodnie z Rozporządzeniem WE 1907/2006. Wersja 5.4 Przejrano dnia 30.05.2014, sigma-aldrich.com, (2014).
- [283] Sigma-Aldrich, (R)-(+)-Limonen. Karta charakterystyki zgodnie z Rozporządzeniem WE 453/2010. Wersja 5.5 Aktualizacja 07.12.2015, sigma-aldrich.com, (2015).
- [284] L.O.S. Stand, Leitz Orthoplan Widefield Trinocular Research Microscope (2014).
- [285] W. Kluska, Synteza nanostrukturalnych nośników lipidowych inkorporowanych α - tokoferolem i olejem amla przeznaczonych do pielęgnacji włosów, Praca magisterska (2017).
- [286] <https://www.laboratory-equipment.com/dispersers/t-25-digital-ultra-turrax-disperser-ika.php> (2018).
- [287] T. Way, Performance Testing of Novel Dosage Forms, RQA Ireland Regional Forum - Athlone, May 2016. Quality Considerations - Pharma and Biopharma (2016).
- [288] P. Charoenputtakun, B. Pamornpathomkul, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, Terpene composited lipid nanoparticles for enhanced dermal delivery of all-trans-retinoic acids, *Biol. Pharm. Bull.*, 37 (2014) 1139-1148.
- [289] E. Piacentini, Encapsulation Efficiency, [in:] *Encyclopedia of Membranes*, Springer, (2016) 706-707.
- [290] <http://www.xrd.amu.edu.pl/>, Pracownia Dyfrakcji Rentgenowskiej (XRD). Środowiskowe Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii (2018).
- [291] www.sluach.amu.edu.pl, Pracownia Badań Powierzchni Ciał Stałych. Środowiskowe Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii (2018).
- [292] S. Al-Nasiry, N. Geusens, M. Hanssens, C. Luyten, R. Pijnenborg, The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells, *Hum. Reprod.*, 22 (2007) 1304-1309.
- [293] T. Andreani, C.P. Kiill, A.L.R. de Souza, J.F. Fangueiro, L. Fernandes, S. Doktorovová, D.L. Santos, M.L. Garcia, M.P.D. Gremião, E.B. Souto, Surface engineering of silica nanoparticles for oral insulin delivery: characterization and cell toxicity studies, *Colloids Surf., B*, 123 (2014) 916-923.
- [294] M. Shah, Y. Agrawal, Ciprofloxacin hydrochloride-loaded glyceryl monostearate nanoparticle: factorial design of Lutrol F68 and Phospholipon 90G, *J. Microencapsul.*, 29 (2012) 331-343.
- [295] M. Shah, K. Pathak, Development and statistical optimization of solid lipid nanoparticles of simvastatin by using 2^3 full-factorial design, *AAPS Pharm SciTech.*, 11 (2010) 489-496.
- [296] M. Harms, C. Müller-Goymann, Solid lipid nanoparticles for drug delivery, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 21 (2011) 89-99.

- [297] S. Doktorovova, R. Shegokar, E.B. Souto, Role of Excipients in formulation development and biocompatibility of lipid nanoparticles (SLNs/NLCs), [in:] *Nanostructures for Novel Therapy*, Elsevier (2017) 811-843.
- [298] T. Wang, Q. Hu, M. Zhou, J. Xue, Y. Luo, Preparation of ultra-fine powders from polysaccharide-coated solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by innovative nano spray drying technology, *Int. J. Pharm.*, 511 (2016) 219-222.
- [299] E. Gonzalez-Mira, M. Egea, E. Souto, A. Calpena, M. García, Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery, *Nanotechnology*, 22 (2010).
- [300] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine, *Trends Biotechnol.*, 18 (2000) 412-420.
- [301] K. Krishnam Raju, B. Sudhakar, K.V.R. Murthy, Factorial design studies and biopharmaceutical evaluation of simvastatin loaded solid lipid nanoparticles for improving the oral bioavailability, *Int. Sch. Res. Notices (Hindawi)* (2014).
- [302] B. Rodenak-Kladniew, G.A. Islan, M.G. de Bravo, N. Durán, G.R. Castro, Design, characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy, *Colloids Surf. B*, 154 (2017) 123-132.
- [303] L. Wu, J. Zhang, W. Watanabe, Physical and chemical stability of drug nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63 (2011) 456-469.
- [304] R. Costa, C. Bisignano, A. Filocamo, E. Grasso, F. Occhiuto, F. Spadaro, Antimicrobial activity and chemical composition of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle essential oil from Italian organic crops, *J. Essent. Oil Res.*, 26 (2014) 400-408.
- [305] D. Djordjevic, L. Cercaci, J. Alamed, D.J. McClements, E.A. Decker, Stability of citral in protein-and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions, *Food Chem*, 106 (2008) 698-705.
- [306] V.B. Oriani, I.D. Alvim, B.N. Paulino, F.R. Procópio, G.M. Pastore, M.D. Hubinger, The influence of the storage temperature on the stability of lipid microparticles containing ginger oleoresin, *Food Res. Int.* (2018).
- [307] A. Brunelli, A. Zabeo, E. Semenzin, D. Hristozov, A. Marcomini, Extrapolated long-term stability of titanium dioxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes in artificial freshwater, *J. Nanopart. Res.*, 18 (2016) 113.
- [308] G. Petzold, C. Goltzsche, M. Mende, S. Schwarz, W. Jaeger, Monitoring the stability of nanosized silica dispersions in presence of polycations by a novel centrifugal sedimentation method, *J. Appl. Polym. Sci.*, 114 (2009) 696-704.
- [309] C. Vitorino, Lipid nanoparticles permeation enhancement for transdermal drug delivery, University of Coimbra, Portugal, 2013.
- [310] F. Suter, D. Schmid, F. Wandrey, F. Zülfi, Heptapeptide-loaded solid lipid nanoparticles for cosmetic anti-aging applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 108 (2016) 304-309.
- [311] A.C. Santos, J. Cunha, F. Veiga, A. Cordeiro-da-Silva, A.J. Ribeiro, Ultrasonication of insulin-loaded microgel particles produced by internal gelation: Impact on particle's size and insulin bioactivity, *Carbohydr. Polym.*, 98 (2013) 1397-1408.
- [312] D. Meshulam, U. Lesmes, Responsiveness of emulsions stabilized by lactoferrin nanoparticles to simulated intestinal conditions, *Food Funct.*, 5 (2014) 65-73.
- [313] I. Dammak, P.J. do Amaral Sobral, Formulation optimization of lecithin-enhanced pickering emulsions stabilized by chitosan nanoparticles for hesperidin encapsulation, *J. Food Eng.* (2017).
- [314] I. Pereira, A. Zielińska, F.J. Veiga, A.C. Santos, I. Nowak, A.M. Silva, E.B. Souto, Monoterpenes Based Pharmaceuticals: A Review of Applications in Human Health and Drug Delivery Systems, Plant- and Marine-Based Phytochemicals for Human Health - Attributes, Potential, and Use, Chapter: 4, Publisher: CRC Press, Editors: Megh R. Goyal, Durgesh Nandini Chauhan (2018).
- [315] A. Silva, E. González-Mira, M. García, M. Egea, J. Fonseca, R. Silva, D. Santos, E. Souto, D. Ferreira, Preparation, characterization and biocompatibility studies on

- risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound, *Colloids Surf. B*, 86 (2011) 158-165.
- [316] C.-C. Wei, Z.-Q. Ge, Influence of electrolyte and poloxamer 188 on the aggregation kinetics of solid lipid nanoparticles (SLNs), *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38 (2012) 1084-1089.
- [317] P.I. Siafaka, N. Üstündağ Okur, E. Karavas, D.N. Bikiaris, Surface modified multifunctional and stimuli responsive nanoparticles for drug targeting: current status and uses, *Int. J. Mol. Sci.*, 17 (2016) 1440.
- [318] D. Lerche, Dispersion stability and particle characterization by sedimentation kinetics in a centrifugal field, *J. Disper. Sci. Technol.*, 23 (2002) 699-709.
- [319] D.A. Daquilano, G. Sgualdino, *Fundamental Aspects of Equilibrium and Crystallization Kinetics* (2001).
- [320] J. Hoscheid, P.M. Outuki, S.A. Kleinubing, M.F. Silva, M.L. Bruschi, M.L.C. Cardoso, Development and characterization of *Pterodon pubescens* oil nanoemulsions as a possible delivery system for the treatment of rheumatoid arthritis, *Colloids Surf. A*, 484 (2015) 19-27.
- [321] F. Liu, D. Wang, C. Sun, Y. Gao, Influence of polysaccharides on the physicochemical properties of lactoferrin-polyphenol conjugates coated β -carotene emulsions, *Food Hydrocolloids*, 52 (2016) 661-669.
- [322] R. Zieliński, Application of experimental design method in flocculants production process, *Towaroznawcze Problemy Jakości* (2007) 73-81.
- [323] T. Sobisch, D. Lerche, Separation behaviour of particles in biopolymer solutions in dependence on centrifugal acceleration: Investigation of slow structuring processes in formulations, *Colloids Surf. A*, 536 (2018) 74-81.
- [324] C. Ullmann, F. Babick, R. Koeber, M. Stintz, Performance of analytical centrifugation for the particle size analysis of real-world materials, *Powder Technol.*, 319 (2017) 261-270.
- [325] X. Huang, C.S. Brazel, On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *J. Controlled Release*, 73 (2001) 121-136.
- [326] E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, M. Tabaszewska, Ł. Skoczylas, Release study of selected terpenes from nanostructured lipid carriers, *Colloids Surf., A*, 510 (2016) 87-92.
- [327] L.O. Copolovici, Ü. Niinemets, Temperature dependencies of Henry's law constants and octanol/water partition coefficients for key plant volatile monoterpenoids, *Chemosphere*, 61 (2005) 1390-1400.
- [328] T. Grabowski, S.W. Gumułka, B. Borucka, W. Raszewski, Analysis relationships between pharmacokinetic parameters *in silico/in vivo* of selected antiviral drugs based on structural analysis, *Adv. Clin. Exp. Med.*, 17 (2008) 285-292.
- [329] A. Szymańska, B. Frydrych, 3, 7-Dimetylookta-2, 6-dienal (cytral), *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* (2011) 21-41.
- [330] J. Chen, Q.-D. Jiang, Y.-P. Chai, H. Zhang, P. Peng, X.-X. Yang, Natural terpenes as penetration enhancers for transdermal drug delivery, *Molecules*, 21 (2016) 1709.
- [331] S. Gupta, P.S. Variyar, Nanoencapsulation of essential oils for sustained release: application as therapeutics and antimicrobials, [in:] *Encapsulations*, Elsevier (2016) 641-672.
- [332] D. Hou, C. Xie, K. Huang, C. Zhu, The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs), *Biomaterials*, 24 (2003) 1781-1785.
- [333] K. Westesen, H. Bunjes, M. Koch, Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, *J. Controlled Release*, 48 (1997) 223-236.
- [334] H. Tian, Z. Lu, D. Li, J. Hu, Preparation and characterization of citral-loaded solid lipid nanoparticles, *Food Chem.*, 248 (2018) 78-85.
- [335] P. Menezes, M. Serafini, L. Quintans-Júnior, G. Silva, J. Oliveira, F. Carvalho, J. Souza, J. Matos, P. Alves, I. Matos, Inclusion complex of (–)-linalool and β -cyclodextrin, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 115 (2014) 2429-2437.

- [336] M. Kardas, E. Grochowska-Niedworok, Różnicowa kalorymetria skaningowa jako metoda termooanalityczna stosowana w farmacji i analizie żywności, *Bromat. Chem. Toksykol.*, 42 (2009) 224-230.
- [337] C. Tan, Y.C. Man, Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: comparison of thermal properties and chemical composition, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77 (2000) 143-155.
- [338] M. Wesołowski, Analiza termiczna w badaniu polimorfizmu leków, *Laboratorium*, 10 (2007) 24-28.
- [339] W.M. Ibrahim, A.H. AlOmriani, A.E.B. Yassin, Novel sulpiride-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced intestinal permeability, *Int. J. Nanomedicine*, 9 (2014) 129.
- [340] P. Ekambaram, A.A.H. Sathali, Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of ramipril, *J. Young Pharm.*, 3 (2011) 216-220.
- [341] P. Blasi, S. Giovagnoli, A. Schoubben, C. Puglia, F. Bonina, C. Rossi, M. Ricci, Lipid nanoparticles for brain targeting I. Formulation optimization, *Int. J. Pharm.*, 419 (2011) 287-295.
- [342] J. Mazuryk, T. Deptuła, A. Polchi, J. Gapiński, S. Giovagnoli, A. Magini, C. Emiliani, J. Kohlbrecher, A. Patkowski, Rapamycin-loaded solid lipid nanoparticles: Morphology and impact of the drug loading on the phase transition between lipid polymorphs, *Colloids Surf. A*, 502 (2016) 54-65.
- [343] E.C. Adukwu, M. Bowles, V. Edwards-Jones, H. Bone, Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100 (2016) 9619-9627.
- [344] D. Dangkong, W. Limpanasithikul, Effect of citral on the cytotoxicity of doxorubicin in human B-lymphoma cells, *Pharm. Biol.*, 53 (2015) 262-268.
- [345] S. Zeng, A. Kapur, M.S. Patankar, M.P. Xiong, Formulation, characterization, and antitumor properties of trans-and cis-citral in the 4T1 breast cancer xenograft mouse model, *Pharm. Res.*, 32 (2015) 2548-2558.
- [346] I. Sudoł-Szopińska, A. Chojnacka, Określanie warunków komfortu termicznego w pomieszczeniach za pomocą wskaźników PMV i PPD, *Bezp. Pr. Nauk. Prakt.*(2007) 19-23.
- [347] S. Honary, F. Zahir, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1), *Trop. J. Pharm. Res.*, 12 (2013) 255-264.
- [348] S. Honary, F. Zahir, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2), *Trop. J. Pharm. Res.*, 12 (2013) 265-273.
- [349] C. Freitas, R.H. Müller, Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions, *Int. J. Pharm.*, 168 (1998) 221-229.
- [350] N. Lourith, M. Kanlayavattanukul, Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 31 (2009) 255-261.
- [351] E. Antignac, G.J. Nohynek, T. Re, J. Clouzeau, H. Toutain, Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics, *Food Chem. Toxicol.*, 49 (2011) 324-341.
- [352] W. Zhang, B.W. Cue, *Green techniques for organic synthesis and medicinal chemistry*, John Wiley & Sons (2018).
- [353] E. Soddu, G. Rassu, M. Cossu, P. Giunchedi, G. Cerri, E. Gavini, The effect of formulative parameters on the size and physical stability of SLN based on “green” components, *Pharm. Dev. Technol.*, 21 (2016) 98-107.
- [354] G. Hommoss, S.M. Pyo, R.H. Müller, Mucoadhesive tetrahydrocannabinol-loaded NLC – Formulation optimization and long-term physicochemical stability, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 117 (2017) 408-417.
- [355] V. Teeranachaideekul, E.B. Souto, V.B. Junyaprasert, R.H. Müller, Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q₁₀ – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 67 (2007) 141-148.
- [356] E. Souto, W. Mehnert, R. Müller, Polymorphic behaviour of Compritol[®] 888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC, *J. Microencapsul.*, 23 (2006) 417-433.