

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEJA PETROVIĆ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM

KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEJA PETROVIĆ

STABILNOST RESVERATROLA V MIKROEMULZIJAH

STABILITY OF RESVERATROL IN MICROEMULSIONS

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravila na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. in somentorstvom asist. Katarine Bolko Seljak, mag. farm..

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. in somentorici asist. Katarini Bolko Seljak, mag. farm. za vso pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Zahvalila bi se rada tudi strokovnima sodelavkama, Tatjani Hrovatič in Mojci Keržan za pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela.

Zahvaljujem se tudi staršem in vsem ostalim, ki so mi v času študija bili v podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. in somentorstvom asist. Katarine Bolko Seljak, mag. farm..

Teja Petrović

Ljubljana, 2016

KAZALO VSEBINE

SEZNAM SLIK	III
SEZNAM PREGLEDNIC.....	III
SEZNAM ENAČB.....	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1 UVOD	1
1.1 KOŽA	1
1.1.1 Vrhnjica	1
1.1.2 Usnjica.....	2
1.1.3 Podkožje	2
1.2 STARANJE KOŽE.....	2
1.2.1 Intrinzično staranje.....	2
1.2.2 Ekstrinzično staranje	3
1.2.3 Radikali in oksidativni stres	3
1.2.4 Fotostarjanje	4
1.3 ANTIOKSIDANTI.....	6
1.3.1 Resveratrol	6
1.3.1.1 Mikroemulzije.....	7
1.3.2 Merjenje antioksidativne učinkovitosti formulacij z vgrajenim RSV.....	8
1.3.2.1 Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo DPPH	8
2 NAMEN DELA	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Sestavine mikroemulzij z vgrajenim resveratrolo.....	11
3.1.2 Reagenti in topila	12
3.1.3 Laboratorijski material	12
3.1.4 Laboratorijska oprema	12
3.2 METODE.....	13
3.2.1 Izdelava mikroemulzij.....	13
3.2.1.1 Izdelava mešanice emulgatorjev	13
3.2.1.2 Izdelava ME tipa o/v, v/o in ME gel	14
3.2.1.3 Izdelava ME v/o z belim voskom	14

3.2.1.4	Izdelava ME o/v s poliakrilno kislino	14
3.2.2	<i>Določanje gostote ME</i>	14
3.2.3	<i>Staranje izdelanih ME</i>	15
3.2.3.1	Obsevanje z UVA lučko	15
3.2.3.2	Staranje pri povišani T (40 °C).....	16
3.2.3.3	Staranje pri sobni T.....	16
3.2.4	<i>Določanje antioksidativne učinkovitosti vzorcev z metodo DPPH</i>	16
3.2.4.1	Priprava osnovne in delovne raztopine DPPH	16
3.2.4.2	Priprava vzorcev	16
3.2.4.3	Določanje absorbance vzorcev	17
3.2.5	<i>Določanje vsebnosti trans-RSV s HPLC metodo</i>	19
3.2.5.1	Priprava umeritvene krivulje	19
3.2.5.2	Priprava vzorcev za HPLC analizo	20
3.2.5.3	Izračun koncentracije trans-RSV v vzorcih	21
3.2.6	<i>Primer izračuna $EC_{50} \pm SD$ in koncentracije trans-RSV</i>	21
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	24
4.1	OBSEVANJE Z UVA LUČKO	24
4.2	STARANJE PRI POVIŠANI TEMPERATURI	29
4.3	STARANJE PRI SOBNI TEMPERATURI.....	32
5	SKLEP	35
6	VIRI IN LITERATURA	37
7	PRILOGE	40
7.1	PRILOGA 1: REZULTATI OBSEVANJA Z UVA LUČKO	40
7.2	PRILOGA 2: REZULTATI STARANJA PRI POVIŠANI TEMPERATURI	42
7.3	PRILOGA 3: REZULTATI STARANJA PRI SOBNI TEMPERATURI.....	43

SEZNAM SLIK

SLIKA 1: PRIMER OKSIDACIJE NENASIČENE MAŠČOBNE KISLINE V LIPIDU SPROŽENE S HIDROKSILNIM RADIKALOM.....	4
SLIKA 2: IZOMERIZACIJA <i>TRANS</i> -RSV V <i>CIS</i> -RSV POD VPLIVOM UV SEVANJA.....	7
SLIKA 3: REDUKCIJA DPPH OB PRISOTNOSTI ANTIOKSIDANTA TER SPREMEMBA V BARVI VZORCA.	9
SLIKA 4: UVA LUČKE Z VZORCI V PETRIJEVKAH.	15
SLIKA 5: UMERITVENA KRIVULJA <i>TRANS</i> -RSV.	20
SLIKA 6: PRIMER GRAFA ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE EC ₅₀ V VZORCU.	22
SLIKA 7: PRIMERJAVA VREDNOSTI EC ₅₀ RAZLIČNIH FORMULACIJ PO DOLOČENEM ČASU OBSEVANJA Z UVA SVETLOBO.....	25
SLIKA 8: PRIMERJAVA VSEBNOSTI <i>TRANS</i> -RSV V RAZLIČNIH FORMULACIJAH PO DOLOČENEM ČASU OBSEVANJA Z UVA SVETLOBO.....	25
SLIKA 9: PRIMERJAVA V BARVI 28 DNI OBSEVANIH (ZGORNJIH) IN NEOBSEVANIH (SPODNJIH) VZORCEV (Z LEVE PROTI DESNI: ME v/o, ME o/v, ME GEL, ME o/v S POLIAKRILNO KISLINO, ME v/o Z BELIM VOSKOM).	26
SLIKA 10: PRIMERJAVA VREDNOSTI EC ₅₀ RAZLIČNIH FORMULACIJ PO DOLOČENEM ČASU STARANJA PRI POVIŠANI TEMPERATURI.....	30
SLIKA 11: PRIMERJAVA VSEBNOSTI <i>TRANS</i> -RSV RAZLIČNIH FORMULACIJ PO DOLOČENEM ČASU STARANJA PRI POVIŠANI TEMPERATURI.	30
SLIKA 12: PRIMERJAVA VREDNOSTI EC ₅₀ RAZLIČNIH FORMULACIJ PO DOLOČENEM ČASU STARANJA PRI SOBNI TEMPERATURI.	33
SLIKA 13: PRIMERJAVA VSEBNOSTI <i>TRANS</i> -RSV RAZLIČNIH FORMULACIJ PO DOLOČENEM ČASU STARANJA PRI SOBNI TEMPERATURI. .	33

SEZNAM PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: SESTAVINE IZDELANIH MIKROEMULZIJ IN NJIHOVE LASTNOSTI.	11
PREGLEDNICA II: SESTAVA IZDELANIH ME (v (M/M)%).	13
PREGLEDNICA III: LASTNOSTI UVA LUČKE: LED DIODA GMKY.	15
PREGLEDNICA IV: PRIPRAVA VZORCEV SEDMIH RAZLIČNIH KONCENTRACIJ Z METANOLOM.	17
PREGLEDNICA V: SHEMA NANOSA VZORCEV NA MIKROTITRSKO PLOŠČO.....	17
PREGLEDNICA VI: OSNOVNI POGOJI HPLC METODE.	19
PREGLEDNICA VII: PRIMER IZRAČUNA KVOCIENTA IZGUBE VODE V VZORCU.....	21
PREGLEDNICA VIII: PRIMER IZMERJENIH ABSORBANC SLEPIH VZORCEV IN VZORCEV Z DPPH TER IZRAČUNA A IN % NEREDUCIRANEGA DPPH PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH V VZORCU (Z UPOŠTEVANJEM KVOCIENTA IZGUBE VODE).	22
PREGLEDNICA IX: PRIMER IZRAČUNA KONCENTRACIJE EC ₅₀ OB UPOŠTEVANJU SD.....	22
PREGLEDNICA X: IZRAČUN KONCENTRACIJE <i>TRANS</i> -RSV V VZORCU S POMOČJO UMERITVENE PREMICE NA PODLAGI IZMERJENIH POVRŠIN POD KRIVULJO.....	23
PREGLEDNICA XI: VISKOZNOST IZDELANIH MIKROEMULZIJ.....	28
PREGLEDNICA XII: REZULTATI OBSEVANJA ZA ME o/v S POLIAKRILNO KISLINO.....	40
PREGLEDNICA XIII: REZULTATI OBSEVANJA ZA ME v/o Z BELIM VOSKOM.	40
PREGLEDNICA XIV: REZULTATI OBSEVANJA ZA ME o/v.....	40
PREGLEDNICA XV: REZULTATI OBSEVANJA ZA ME v/o.....	41

PREGLEDNICA XVI: REZULTATI OBSEVANJA ZA ME GEL	41
PREGLEDNICA XVII: REZULTATI STARANJA PRI POVIŠANI T ZA ME O/V S POLIAKRILNO KISLINO.....	42
PREGLEDNICA XVIII: REZULTATI STARANJA PRI POVIŠANI T ZA ME GEL.....	42
PREGLEDNICA XIX: REZULTATI STARANJA PRI POVIŠANI T ZA ME V/O.	42
PREGLEDNICA XX: REZULTATI STARANJA PRI POVIŠANI T ZA ME O/V.	42
PREGLEDNICA XXI: REZULTATI STARANJA PRI POVIŠANI T ZA ME V/O Z BELIM VOSKOM.....	42
PREGLEDNICA XXII: REZULTATI STARANJA PRI SOBNI T ZA ME O/V S POLIAKRILNO KISLINO.	43
PREGLEDNICA XXIII: REZULTATI STARANJA PRI SOBNI T ZA ME GEL.	43
PREGLEDNICA XXIV: REZULTATI STARANJA PRI SOBNI T ZA ME V/O.	43
PREGLEDNICA XXV: REZULTATI STARANJA PRI SOBNI T ZA ME O/V.	43
PREGLEDNICA XXVI: REZULTATI STARANJA PRI SOBNI T ZA ME V/O Z BELIM VOSKOM.....	43

SEZNAM ENAČB

ENAČBA 1: IZRAČUN GOSTOTE ME.....	14
ENAČBA 2: IZRAČUN KONCENTRACIJE OSNOVNE RAZTOPINE VZORCA.	16
ENAČBA 3: IZRAČUN ABSORBANCE VZORCA.	18
ENAČBA 4: IZRAČUN DELEŽA NEREDUCIRANEGA DPPH.	18
ENAČBA 5: IZRAČUN STANDARDNE NAPAKE.....	18
ENAČBA 6: ENAČBA UMERITVENE PREMICE RSV.	23

POVZETEK

Lepotni ideali stremijo k ohranjanju sijoče, nenagubane kože tudi v zrelih letih. Na samo fiziološko staranje sami nimamo velikega vpliva, s pazljivim in odgovornim obnašanjem pa lahko zmanjšamo vpliv na videz neškodljivih zunanjih dejavnikov, ki lahko dolgoročno pripeljejo tudi do razvoja kožnega raka. Najlažji način zaščite kože je zagotovo uporaba kozmetičnih izdelkov z vgrajenimi antioksidanti – kozmetično aktivnimi sestavinami, ki že pri nizkih koncentracijah s stabilizacijo reaktivnih zvrsti preprečujejo oksidativne poškodbe kože. Na kozmetičnem trgu je zato vedno več izdelkov, ki zaradi vsebnosti teh "čudežnih" sestavin oglašujejo in obljublajo neverjetne učinke na koži po določenem času uporabe. Potrošniki takšnim trditvam velikokrat slepo verjamemo, ne zavedamo pa se dejstva, da vsi izdelki z enakim vgrajenim antioksidantom, niso nujno tudi enako učinkoviti.

V okviru diplomske naloge smo pripravili pet mikroemulzij z različno sestavo (mikroemulzije tipa voda v olju (v/o), olje v vodi (o/v), v/o z belim voskom, o/v s poliakrilno kislino in mikroemulzijski gel) v katere smo vgradili enako količino antioksidanta *trans*-resveratrola. Izdelane mikroemulzije smo izpostavili staranju pod stresnimi pogoji (28 dni obsevanja z UVA svetlobo; oz. 28 dni pri 40 °C). Tekom staranja smo spremljali vsebnost *trans*-resveratrola v formulacijah mikroemulzij s HPLC metodo, antioksidativno kapaciteto formulacij pa z metodo redukcije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH). Rezultate smo primerjali z rezultati vzorcev, ki smo jih shranjevali 90 dni pri sobni temperaturi.

Ugotovili smo, da na koncentracijo vgrajenega *trans*-resveratrola in njegovo antioksidativno učinkovitost najbolj vpliva UVA sevanje in viskoznost same formulacije. Pri povišani temperaturi in pri daljšem shranjevanju formulacij pri sobni temperaturi izdelki kljub izomerizaciji določenega deleža *trans*-resveratrola ohranjajo visoko antioksidativno kapaciteto.

Ključne besede: resveratrol, mikroemulzija, DPPH, HPLC, antioksidant

ABSTRACT

Beauty ideals aim at preserving the shiny, non wrinkled skin in adult years. At physiological skin aging, we do not have a big impact, but by careful and responsible behaviour the impact of seemingly harmless external factors can be reduced, which in the long run also lead to the development of skin cancer. The easiest way to protect your skin is definitely the common use of cosmetics incorporating antioxidants - cosmetic active ingredients which already at low concentrations stabilize reactive species to prevent oxidative damage to the skin. There is an enormous number of products on the cosmetic market, which due to the presence of these "miracle" ingredients promote amazing effects on your skin after a certain period of use in time. Consumers often blindly believe, but at the same time are unaware of the fact, that all products built with the same antioxidants are not necessarily equally effective.

In the context of the thesis, we prepared five microemulsions with a different composition (microemulsions type water in oil (w/o), oil in water (o/w), w/o with white wax, w/o with polyacrylic acid and microemulsion gel) in which we put the same amount of antioxidant *trans*-resveratrol. Prepared microemulsions were exposed to aging under stress conditions (28 days of irradiation with UVA-light; 28 days at 40 °C). During the process of aging, we monitored the content of *trans*-resveratrol in the formulation of microemulsions with HPLC, and antioxidant capacity of the formulations with the reduction method of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The results were compared with the results of the samples, stored for 90 days at room temperature.

We have found, that the concentration of the built *trans*-resveratrol and its antioxidant effectiveness is most affected by UV radiation and the viscosity of the formulation. At elevated temperatures and prolonged storage of the formulation at room temperature, the content of *trans*-resveratrol was slightly reduced but at the same time maintained a high antioxidant capacity in the formulation.

Key words: resveratrol, microemulsion, DPPH, HPLC, antioxidant

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>Deoxyribonucleinic Acid</i>)
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (<i>1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>)
EC ₅₀	polovična maksimalna efektivna koncentracija (<i>Effective concentration</i>)
EHMC	etilheksil metoksikrilen (<i>Ethylhexyl methoxycrylene</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
INCI	mednarodna nomenklatura za kozmetične sestavine (<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>)
IPM	izopropil miristat (<i>Isopropyl Myristate</i>)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
RNS	reaktivne dušikove zvrsti (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RSS	reaktivne žveplove zvrsti (<i>Reactive Sulfide Species</i>)
RSV	resveratrol
SD	standardni odklon (<i>Standard Deviation</i>)
TEWL	transepidermalna izguba vode (<i>Transepidermal Water Loss</i>)
UV	ultravijolično sevanje
UVA	ultravijolično sevanje tipa A
UVB	ultravijolično sevanje tipa B
UVC	ultravijolično sevanje tipa C
UV-VIS	ultravijolično-vidno (<i>Ultraviolet-Visible</i>)

1 UVOD

Koža je naš največji, vsestranski in zelo pomemben organ. Velikokrat se pravzaprav ne zavedamo izjemnega pomena te, na videz enostavne ovojnice, ki neprekinjeno obdaja naše telo. Pomena tega, kar nam stanje kože pove brez besed. Lepa, sijoča, gladka koža ni le rezultat primerne nege povrhnjice kože, temveč izraža pravilno delovanje vseh biokemičnih in fizikalnih dejavnikov, tako v telesu kot v samem okolju (1). Seveda si vsi želimo ohraniti mlado, ne nagubano kožo skozi celotno življenje, vendar je staranje neizogiben proces. Tako kot vse ostale telesne funkcije in zmožnosti tudi koža z leti izgublja svoj sijaj, prožnost in nekdam ozke, mimične gube postajajo vedno globlje (2).

Na svetu ne obstaja čudežna sestavina, s katero bi staranje lahko ustavili. S pazljivim in odgovornim obnašanjem pa ga lahko upočasnimo (3). Na kozmetičnem trgu je v zadnjih letih močno naraslo število kozmetičnih izdelkov z vgrajenimi antioksidanti – po opisih sodeč s čudežnimi sestavinami, ki z redno uporabo upočasnjujejo procese staranja in hkrati omejujejo vpliv na videz neškodljivih dejavnikov (npr. vpliv UV sevanja), ki lahko dolgoročno na koži pustijo nepopravljive spremembe (3, 4). Njihova dejanska učinkovitost pa je vsota več različnih dejavnikov, katerih se potrošniki velikokrat ne zavedamo (4).

1.1 KOŽA

Koža je naš največji organ, ki opravlja tako funkcijo čutila kot tudi zaščite celotnega sistema (5). Zagotovo je najpomembnejša prav zaščitna funkcija. Telo ščiti pred zunanjimi dejavniki, hkrati pa omogoča neprestano komunikacijo notranjosti z zunanjim svetom. Z vzdrževanjem stalne telesne temperature ter koncentracije elektrolitov in tekočinskega ravnovesja skrbi za konstantno notranje okolje, hkrati pa s stalnim luščenjem površine kože ter izločanjem skozi žleze lojnice in znojnice skrbi za izločanje škodljivih snovi iz telesa (3, 5).

Vzrok za številne življenjsko pomembne funkcije kože prav gotovo izhaja iz njene specifične strukture (3).

1.1.1 Vrhnjica

Vrhnjica ali *epidermis* je najvišja in najtanjša plast kože, ki je v neposrednem stiku z zunanjim svetom. Večplastna struktura tega nenehno obnavljajočega, luščečega epitelija sega vse od zarodnega (*stratum basale*) do roženega sloja (*stratum corneum*). Večinski celični predstavniki so nedvomno keratinociti, poleg njih pa tudi melanociti (dendritične celice, ki

proizvajajo melanin), Langerhansove celice (celice imunskega sistema) in številne druge celice (3).

Najnižji sloj, *stratum basale*, je sestavljen iz živih keratinocitov, ki s stalno mitotsko delitvijo zagotavljajo veliko število celic in s tem učinkovito zaščitno pregrado pred zunanjimi dejavniki. Novo nastale celice se pomikajo proti zunanjemu sloju vrhnjice (*stratum corneum*). Prej živi keratinociti se proti vrhu z diferenciacijo popolnoma spremenijo. Postanejo sploščeni, brezjedrni korneociti, ki v končnih slojih zaroženijo in se odluščijo s površine (3, 6).

Tesno zložene ploščate celice z vmesnimi sloji lipidov (maščobne kisline, ceramidi, estri, beljakovine – predvsem keratin) in zelo nizko vsebnostjo vode predstavljajo dobro lipofilno bariero, ki telo ščiti pred izsušitvijo (transepidermalno izgubo vode - TEWL), hkrati pa tudi pred vdorom mikrobov in ostalih snovi iz okolja (7,8).

1.1.2 Usnjica

Usnjica ali *dermis* je vmesna plast kože, iz katere izvirajo številne pomembne funkcije kože. V neposrednem stiku z zarodno plastjo vrhnjice je papilarna plast. Številne, zelo nagubane dermalne papile s tankimi limfnimi in krvnimi žilami skrbijo za dobro prekrvavljenost kože in preskrbo vrhnjice s hranljivimi snovmi. Spodnja retikularna plast s spletom kolagenskih in elastinskih vlaken omogoča čvrstost, elastičnost in prožnost kože (9).

1.1.3 Podkožje

Podkožje ali *subcutis* je najnižja plast kože, za katero je značilna visoka vsebnost maščobnih celic ali adipocitov. Velikokrat bi si želeli, da bi bila plast maščobe karseda tanka, vendar pa se moramo zavedati njenega izjemnega pomena pri vzdrževanju stalne telesne temperature in zaščiti pred morebitnimi mehanskimi poškodbami notranjih organov (3, 10).

1.2 STARANJE KOŽE

Staranje kože je proces, pri katerem tako intrinzični kot ekstrinzični dejavniki progresivno vodijo k upadu strukturne integritete kože, kot tudi k zmanjšanju fiziološke funkcije kože (2).

1.2.1 Intrinzično staranje

Intrinzično staranje drugače imenujemo tudi fiziološko staranje, ki je za vsakega posameznika neizogibno. Je rasno, strukturno in hormonsko pogojeno (2). Najpomembnejše strukturne in funkcionalne spremembe starane kože potekajo v vrhnjici in usnjici (3).

Podaljšan cikel obnavljanja in luščenja kože, zmanjšana količina naravnega vlažilnega faktorja, poslabšana prekrvavitev epidermisa zaradi izravnave papilarne plasti dermisa in upad celic imunskega sistema so dejavniki, ki z leti ključno vplivajo na izgled in funkcionalnost povrhnjice. Koža je tako na otip hrapava in suha, blede, zaradi slabše obrambe imunskega sistema pa tudi vedno bolj nagnjena k infektivnim obolenjem (2, 3).

Najbolj opazna sprememba pa je vsekakor sprememba prožnosti in elastičnosti kože. Zmanjšana sinteza in povečana razgradnja fibrilarnih proteinov elastina in kolagena vodi v nastanek gub (11).

1.2.2 Ekstrinzično staranje

Ekstrinzično staranje je posledica izpostavljenosti zunanjim škodljivim dejavnikom in življenjskega sloga posameznika. Čeprav se včasih ne zavedamo, lahko kajenje, stres, onesnaženost okolice, nezdrava prehrana, povišana koncentracija ozona v ozračju in vpliv UV sevanja znatno prispevajo k prezgodnjemu staranju ter dolgoročno tudi k razvoju kožnega raka in melanoma (2, 3).

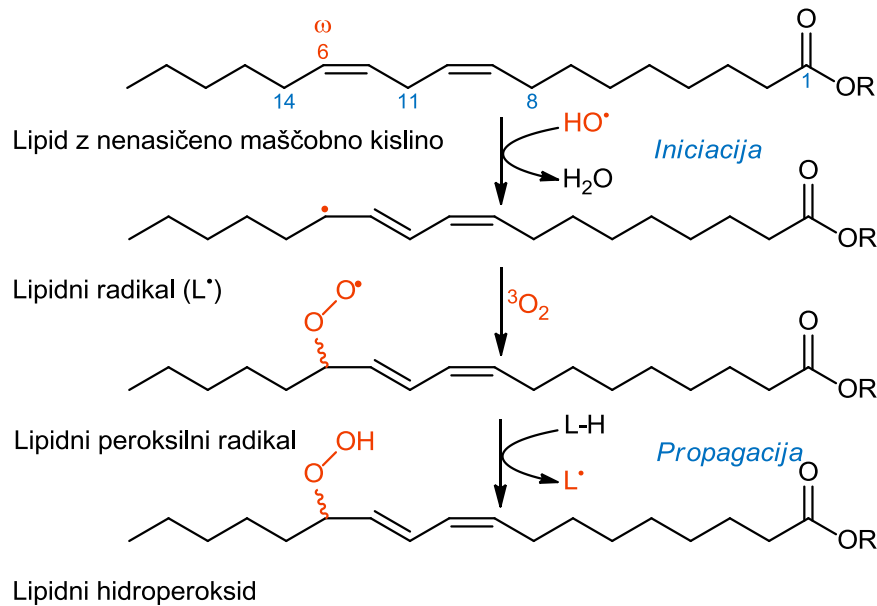
1.2.3 Radikali in oksidativni stres

Radikali so atomi, ioni ali nevtralne spojine z najmanj enim nesparjenim elektronom (paramagnetne snovi). Zaradi težnje po zapolnitvi zunanje orbitale so radikali zelo reaktivni in običajno zelo hitro reagirajo s snovmi okrog sebe za doseg stabilnega stanja (3).

Prisotnost radikalov v telesu ni problematična, dokler je njihova količina uspešno nadzorovana s strani endogenih antioksidantov (12). Pravzaprav predstavlja pomemben del pri tvorbi učinkovitega obrambnega zidu imunskega sistema pred vdorom patogenov in aerobnega metabolizma v mitohondrijih (3). V človeškem organizmu imamo različne reaktivne radikale. Najpogostejši so predstavniki ROS (reaktivne kisikove spojine ali zvrsti), katerih nastanek je pogojen s prisotnostjo atmosferskega kisika. Pojavljajo pa se tudi RNS (reaktivne dušikove spojine ali zvrsti), RSS (reaktivne žveplove zvrsti) in halogenske reaktivne zvrsti (3).

Problem nastane, ko je to ravnovesje porušeno. Oksidativni stres predstavlja namreč motnjo v razmerju med prooksidanti in antioksidanti, pri katerem je ravnovesje nagnjeno v korist prvih. Vzrok za njihov presežek je lahko v povečani tvorbi reaktivnih zvrsti ali v zmanjšani antioksidativni kapaciteti organizma (13). Nenadzorovano nastajanje radikalov je sčasoma

vedno bolj moteče in onemogoča celično signalizacijo, kar postopno povzroči porušitev celičnih struktur ter nepravilno delovanje biokemičnih procesov (3).



Slika 1: Primer oksidacije nenasičene maščobne kisline v lipidu sprožene s hidroksilnim radikalom

Ob prisotnosti kisika (glavni celični oksidant) je vse, kar potrebujemo za oksidacijo sestavin celic, dovolj reaktiven radikal, ki z odvzemom H-atoma sproži oksidacijo (Slika 1). Reakcije radikalov s celičnimi komponentami v našem telesu (lipidi, proteini, DNA) so zelo hitre, nenadzorovane, povzročene poškodbe pa se z leti kopičijo (14).

Z leti se endogena antioksidativna kapaciteta v koži zmanjšuje. Posledice stalno nastajajočih ROS postajajo vidne na celičnih membranah, proteinih in DNA (jedrna in mitohondrijska). Celica lahko okvarjene proteine in lipide precej enostavno nadomesti z novimi, nepoškodovanimi. Poškodbe, predvsem mitohondrijske DNA, pa niso tako lahko popravljive (15). Slednje je najbolj problematično pri vrhnjici, kjer poteka stalna mitotska delitev celic. Poškodbe mitohondrijske DNA se zaradi odsotnosti popravljalnih mehanizmov kopičijo, vsaka mutacija pa se prenese na naslednjo generacijo keratinocitov. Neželene mutacije, nenormalna rast in razvoj keratinocitov pripeljejo do vidnih sprememb na površini kože ali celo do razvoja kožnega raka (3, 15).

1.2.4 Fotostaranje

Daleč najpomembnejši zunanji dejavnik, ki pomembno vpliva na prezgodnje staranje, je zagotovo UV sevanje (16).

Osnovni mehanizem škodljivih učinkov UV sevanja na koži je interakcija s posamezno celično komponento, ki lahko absorbira določen spekter sončne svetlobe. Sprejeta energija se v molekuli snovi porabi za vzbujanje elektronov in s tem njeno aktivacijo. V primeru, da je bila energija absorbirane svetlobe večja od 100 kcal/mol (energija kovalentne vezi), pride do homolitske cepitve kovalentne vezi in do možnosti neposrednega nastanka radikalov (3).

Snovi ali deli molekul, ki svetlobo določene valovne dolžine lahko absorbirajo, z drugo besedo poimenujemo tudi kromofori, in predstavljajo zaščitni mehanizem kože pred škodljivimi vplivi UV žarkov (3). Eden najpomembnejših je zagotovo melanin, polimerni pigment v zarodnem delu vrhnjice. Po izpostavljenosti soncu se poveča njegova sinteza v melanocitih, kar se na površini kože kaže kot porjavitev. Melanin ne ščiti samo zarodnega sloja, temveč tudi folno kislino pred fotolizo, ki je pomemben dejavnik popravljalnih mehanizmov DNA (3, 17). Poznamo tudi številne druge kromofore (npr. urokansko kislino), žal pa je med njimi tudi DNA, katere poškodbe lahko vodijo do mutacij in raznih obolenj (3).

Zaščitni mehanizmi lahko varujejo kožo pred škodljivimi vplivi le v določeni meri, zato daljša izpostavljenost soncu ne pomeni le intenzivnejše porjavelosti, temveč tudi začetek fotostaranja kože. Posledice fotostaranja so torej odvisne od stopnje izpostavljenosti sončnim žarkom in od količine samega melanina v koži (16).

Večino poškodb v koži povzroči prav UV svetloba, predvsem UVA in UVB (UVC žarki so v večini prestreženi že v ozonski plasti). Neposredni povzročitelj poškodb fotostaranja je UVB svetloba, ki se absorbira v roženem sloju in povzroča opekline (16). Z valovno dolžino med 280-315 nm ima UVB svetloba dovolj energije, da kljub odsotnosti kisika neposredno povzroči poškodbe molekule DNA (3). Evolucija je za mutacije poskrbela s popravljalnimi mehanizmi, vendar pa je njihova kapaciteta omejena, zato so lahko posledice, po določeni obremenitvi trajne in včasih tudi usodne (18). UVA svetloba, z valovno dolžino med 315-400 nm, je po energiji sicer šibkejša, vseeno pa prodira globlje v kožo in ima zato hujše posledice kot UVB svetloba (3, 16). Ker vnos energije ni zadosten za cepitev kovalentne vezi, povzroča poškodbe genskega materiala posredno ob prisotnosti kisika preko tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti in s trošenjem nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) (2, 3).

Prvi pokazatelji fotostarane kože so izguba prožnosti in elastičnosti, hrapava in suha koža, pojav globljih in izrazitejših gub, motenj v pigmentaciji (hiper- ali hipopigmentacije), v skrajnem primeru pa tudi kožni rak in razvoj melanoma (3, 16). Glavni vzrok za nastanek vidnih sprememb fotostarane kože je v razpadu kolagena, elastina in ostalih komponent

ekstracelularnega matriksa zaradi aktivacije in povečane produkcije kolagenaz, matriksnih metaloproteaz in ostalih proteolitičnih encimov (2, 11, 16).

1.3 ANTIOKSIDANTI

Antioksidant je vsaka snov, ki lahko pri nizki koncentraciji s stabilizacijo reaktivnih zvrsti prepreči oksidativne poškodbe tarčnih molekul (13). Kemijsko so antioksidanti reducenti, ki reaktivnemu radikalni sami ponudijo vodikov atom ali elektron in omogočijo prehod v stabilno stanje, v katerem radikal ni več sposoben nadaljevati reakcij oksidacij. Na ta način pred oksidativnim stresom zaščitijo ostale pomembne celične biomolekule (4, 13).

Telo je z evolucijo razvilo sistem endogenih ali telesu lastnih antioksidantov (npr. superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaz, itd.) in jih vse skupaj povežalo v mrežo medsebojno odvisnih snovi (16). Glavni vir energije za obnavljanje antioksidantov predstavlja NADPH, ki nastaja pri aerobnem metabolizmu v mitohondrijih. Reduktazam priskrbi H-atom in jih s tem ponovno postavi na obrambno linijo v boju proti reaktivnim radikalom (3).

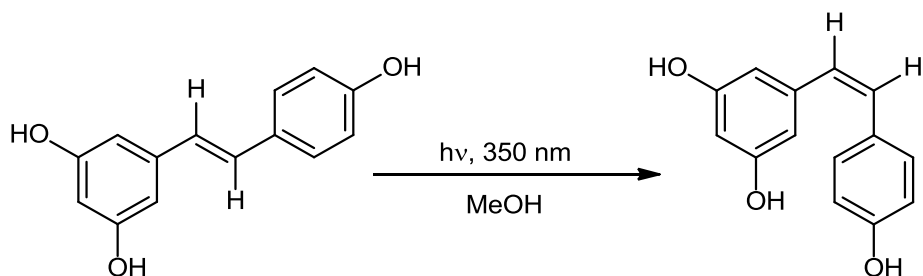
Z leti se oksidativne poškodbe celičnih komponent kopičijo, mutacije mitohondrijske DNA pa povzročijo zmanjšano kapaciteto obnavljanja antioksidativne mreže in s tem sprožitev oksidativnega stresa (3). Ravno zato postaja z leti vedno bolj pomemben tudi vnos eksogenih antioksidantov, ki jih telo samo ne more sintetizirati. Pridobimo jih s hrano, prehranskimi dopolnili, za zaščito kože pa je vse bolj aktualna uporaba kozmetičnih izdelkov z vgrajenimi antioksidanti (npr. tokoferoli – vitamin E, askorbinska kislina – vitamin C, polifenoli – resveratrol, itd.) (16).

1.3.1 Resveratrol

Resveratrol (RSV) ali *trans*-3,4',5-trihidroksistilben je polifenol, ki je naravno prisoten v več kot 72 rastlinskih vrstah (npr. grozdju, borovnicah, raznih oreščkih, japonskem dresniku) kot oblika obrambnega sistema pred škodljivimi zunanjimi dejavniki (19, 20, 21). Na voljo je v obliki belega prahu, ki ga pridobivajo z metodo ekstrakcije iz rastlin (22). Uvrščamo ga v družino stilbenov, katerih osnovno strukturo tvorita 2 aromatska obroča med seboj povezana z metilenskim mostičkom (20).

RSV v naravi najdemo v dveh izomernih oblikah, *cis*- in *trans*-. *Trans*-RSV je pogostejši, prav tako pa dokazano bolj stabilen (foto- in termostabilen) in biološko aktiven. Je fluorescenčna spojina, kar pomeni, da fotonsko vzbujena molekula RSV ob prehodu iz singletnega vzbujenega v osnovno stanje izseva foton (20).

Zaradi termo nestabilnosti in izjemne nagnjenosti *cis*-RSV k oksidaciji, ta ni komercialno dostopen. *Trans*-RSV pod vplivom UV svetlobe izomerizira v *cis*, čeprav je bolj stabilen izomer (Slika 2, 20).



Slika 2: Izomerizacija *trans*-RSV v *cis*-RSV pod vplivom UV sevanja.

Dermalna aplikacija RSV ima številne pozitivne učinke. Kožo ščiti pred škodljivimi učinki UV sevanja in prezgodnjim staranjem (21). Številne raziskave so pokazale pozitivne učinke v boju proti predrakavim stanjem (npr. aktinične keratoze) in pri zdravljenju melanoma (v kombinaciji s standardno protirakavo terapijo) (22). Izkazuje pa tudi protimikrobno in protivnetno delovanje (21).

Zaradi mnogih pozitivnih učinkov so poskušali RSV vgrajevati že v številne različne kozmetične izdelke. Vendar pa je ob izboru ustrezne formulacije treba upoštevati zelo slabo vodotopnost in nestabilnost pod vplivom UV sevanja. Poleg običajnih sistemov (emulzije, kreme, losjoni) so poskušali tudi učinkovitost vgrajevanja v napredne nosilne sisteme, kot so na primer mikroemulzije (ME) (21).

Glavni vzrok za vedno pogostejšo uporabo ME pred običajnimi emulzijami, tako v farmaciji kot tudi na področju kozmetike, je v njihovi nizki viskoznosti, enostavni pripravi in predvsem izboljšani stabilnosti in topnosti vgrajene učinkovine. Velikost kapljic, v katerih je učinkovina raztopljena, je v primerjavi z navadnimi emulzijami skoraj 3-krat manjša (50–100 nm), s čimer je močno povečana njihova specifična površina (23).

1.3.1.1 Mikroemulzije

Mikroemulzije (ME) so termodinamsko stabilne, transparentne in optično izotropne disperzije sestavljene iz oljne in vodne faze ter visoke koncentracije površinsko aktivnih snovi (PAS) (23).

PAS so amfifilne molekule sestavljene iz hidrofilne glave in lipofilnega repa. Njihova glavna vloga je adsorpcija na medfazi, kjer z znižanjem površinske napetosti omogočijo samoorganizacijo sistema v različne strukture (npr. miceli) in njegovo spontano stabilizacijo

(23, 24). Visoka koncentracija PAS (običajno kombinacija emulgatorja in koemulgatorja) omogoča spontan nastanek sistema brez vnosa dodatne mehanske energije, izboljšano solubilizacijo in dermalno absorpcijo vgrajene učinkovine (25).

Struktura nastale ME je odvisna predvsem od deleža vodne in oljne faze. Ločimo dva osnovna tipa ME: hidrofilne (o/v) z zunanjo vodno fazo in lipofilne (v/o) z zunanjo oljno fazo (25). Drugačno razmerje enakih sestavin ME pa lahko vodi v nastanek kristaliničnih heksagonalnih, kubičnih in lamelarnih struktur. Čeprav so takšni sistemi viskoznejši in optično anizotropni, jih zaradi termodinamske stabilnosti, spontanega nastanka in transparentnosti vseeno uvrščamo v kategorijo ME. Za take sisteme lahko v literaturi zasledimo poimenovanje mikroemulzijski geli (26).

Višja viskoznost sistema je ena glavnih prednosti ME gelov, kot izdelkov za topikalno aplikacijo. Izboljšanje reoloških lastnosti ME v/o in v/o lahko dosežemo z dodatkom ustreznih zgoščeval, ki ne vplivajo na njihovo stabilnost, transparentnost in spontan nastanek (26).

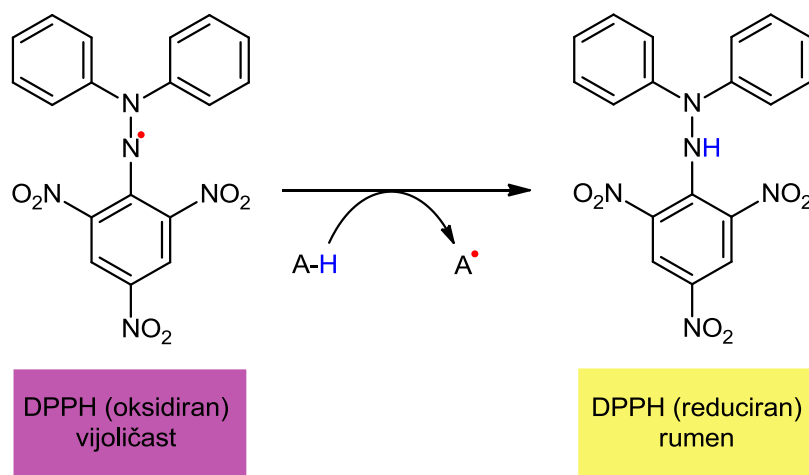
1.3.2 Merjenje antioksidativne učinkovitosti formulacij z vgrajenim RSV

Antioksidativno učinkovitost formulacij z vgrajenim RSV lahko vrednotimo z zmožnostjo redukcije stabilnih organskih radikalov (npr. DPPH, ABTS⁺, DMPD⁺). Najpogosteje uporabljena metoda je metoda redukcije DPPH (27).

1.3.2.1 Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo DPPH

DPPH ali 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil je stabilen radikal v obliki temno vijoličnega kristalnega prahu. Delokalizacija neparnega valenčnega elektrona po celotni molekuli preprečuje dimerizacijo (28).

Metoda določanja antioksidativne učinkovitosti temelji na reakciji DPPH z antioksidanti (donorji elektronov ali H-atoma). Rastopina DPPH z metanolom je zaradi delokaliziranega valenčnega elektrona intenzivno vijolične barve z maksimumom absorpcije pri 517 nm (29). Ko rastopino zmešamo z vzorcem z vgrajenim antioksidantom, se določen delež DPPH pretvori v reducirano obliko, barva vzorca pa preide v rumeno (Slika 3). Določanje antioksidativne učinkovitosti temelji prav na spremembi barve vzorca (28).



Slika 3: Redukcija DPPH ob prisotnosti antioksidanta ter sprememba v barvi vzorca.

Zmanjšanje koncentracije DPPH vrednotimo z merjenjem spremembe v absorbanci vzorca z UV-VIS spektrofotometrom. Maksimum absorpcije raztopine DPPH je zaradi valenčnega elektrona pri 517 nm. Absorbanca vzorca se zaradi prisotnosti antioksidanta zmanjša. Razbarvanje vzorca je stehiometrično in je premosorazmerno s številom sprejetih elektronov (29). S pripravo različnih koncentracij vzorca lahko določimo EC_{50} – to je koncentracija antioksidanta, ki povzroči redukcijo 50 % DPPH radikala v določenem časovnem intervalu. Nižja kot je vrednost EC_{50} , večja je antioksidativna učinkovitost (28, 30).

Zagotavljanje enakih pogojev pri vseh analizah je zelo pomembno za primerljivost rezultatov, zaradi občutljivosti DPPH na kisik in svetlobo (31).

2 NAMEN DELA

Na kozmetičnem trgu je vedno več izdelkov, ki zaradi vsebnosti antioksidantov obljublajo neverjetne učinke na koži po določenem času uporabe. Velikokrat takšnim trditvam slepo verjamemo, ne zavedamo pa se dejstva, da niso vsi izdelki z enakim vgrajenim antioksidantom tudi enako učinkoviti. Na antioksidativno kapaciteto kozmetičnega izdelka ne vpliva samo delež vgrajenega antioksidanta, temveč tudi tip formulacije in številni, na videz neškodljivi, zunanji dejavniki kot sta UV sevanje in povišana temperatura.

V okviru diplomske naloge bomo pripravili pet mikroemulzij z različno sestavo (v/o, o/v, v/o z belim voskom, o/v s poliakrilno kislino in mikroemulzijski gel) v katere bomo vgradili enako količino antioksidanta *trans*-resveratrola. Mikroemulzije bomo izpostavili staranju pod stresnimi pogoji (28 dni obsevanja z UVA svetlobo; oz. 28 dni pri 40 °C). Tekom staranja bomo spremljali vsebnost *trans*-resveratrola v formulacijah mikroemulzij s HPLC metodo, antioksidativno kapaciteto formulacije pa z metodo redukcije difenilpikrilhidrazila (DPPH). Rezultate bomo primerjali z rezultati vzorcev, ki jih bomo shranjevali 90 dni pri sobni temperaturi.

Z rezultati eksperimentalnega dela zastavljenega v diplomski nalogi, pričakujemo, da bomo osvetlili kako na antioksidativno kapaciteto mikroemulzij s *trans*-resveratrolom vpliva sestava formulacije (vrsta zunanje faze, viskoznost izdelka) in staranje pod stresnimi pogoji. Izsledke bomo povezali s sposobnostjo mikroemulzij, da ohranijo resveratrol v obliki *trans*- izomera.

Zaradi termolabilnosti in nagnjenosti *trans*-resveratrola k izomerizaciji v manj stabilen a še vedno učinkovit izomer *cis*-resveratrol pod vplivom UV sevanja, pričakujemo upad koncentracije *trans*-resveratrola in s tem upad antioksidativne učinkovitosti formulacij, tako pri staranju pod vplivom povišane temperature, kot pri obsevanju z UVA svetlobo. Zanima nas tudi vpliv formulacije same na stabilnost vgrajenega *trans*-resveratrola. Zaradi slabše vodotopnosti *trans*-RSV pričakujemo višje koncentracije in s tem boljšo antioksidativno učinkovitost pri mikroemulzijah z zunanjo oljno fazo. Poleg razlik v vrsti zunanje faze se mikroemulzije med seboj razlikujejo v viskoznosti. Boljše rezultate pričakujemo pri viskoznejših mikroemulzijah zaradi tesnejše premreženosti sistema in s tem boljše zaščite *trans*-resveratrola.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Sestavine mikroemulzij z vgrajenim resveratrolom

- Resveratrol (*ChromaDex Inc., ZDA*)
- Prečiščena voda (*Pripravljena z aparaturo MiliQ, Millipore, ZDA*)
- Isopropyl myristate (*Sigma-Aldrich, Nemčija*)
- Tween® 40 (*Merck Schuchardt, Nemčija*)
- Imwitor® 308 (*Sasol, Nemčija*)
- Cera alba (*Caelo, Nemčija*)
- Carbopol (*BF Goodrich, Belgija*)

Preglednica I: Sestavine izdelanih mikroemulzij in njihove lastnosti.

Sestavina	Funkcija v ME	Osnovne lastnosti
Prečiščena voda	Vodna faza	Prečiščeno vodo pridobivamo na Fakulteti za farmacijo s postopkom reverzne osmoze.
Izopropil miristat (IPM)	Oljna faza	Maščobna kislina (ester izopropilnega alkohola in miristinske kisline) (32)
Tween® 40	Hidrofilen emulgator	Ester sorbitana s palmitinsko kislino in eter s polioksietilenom (Polioksietilen-20-sorbitanmonopalmitat) (33) Neionska površinsko aktivna snov s HLB vrednostjo 15,6 (34) INCI ime: <i>Polysorbate 20</i> (35)
Imvitor® 308	Lipofilen koemulgator	Ester glicerola in kaprilne kisline (36) Neionska površinsko aktivna snov s HLB vrednostjo 6,0 (37) INCI ime: <i>Glyceryl caprylate</i> (37)
Beli vosek	Zgoščevalo	Prečiščen in beljen čebelji vosek (38) INCI ime: <i>Cera alba</i>
Carbopol® 974P NF	Zgoščevalo	Polimer akrilne kisline (39)

3.1.2 Reagenti in topila

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ali DPPH (*Sigma-Aldrich, ZDA*)
- Metanol (*Carlo Erba Reagents, Italija*)
- Metanol za tekočinsko kromatografijo (*Merck KGaA, Nemčija*)
- Bidestilirana voda (*Millipore, ZDA*)
- Brezvodna očetna kislina (*Merck KGaA, Nemčija*)

3.1.3 Laboratorijski material

- Merilni valj
- Parafilm M (*Bemis NA, ZDA*)
- Merilne bučke 25 mL, 100 mL
- Avtomatske pipete Transferpette 5 mL in 1000 μ L (*Brand GMBH, Nemčija*)
- Nastavki za pipete
- Mikrotitrne ploščice (*TPP, Švica*)
- Mikrocentrifugirke 2 mL
- Čaše
- Penicilinke 5 mL
- Kolona za HPLC YMC Pack ODS-AM (*Nemčija*)
- Viale za HPLC (*Agilent Technologies, Nemčija*)
- Petrijevke
- Ultracentrifugirke 1,5 mL
- Filtri (0,45 μ m, *Sartorius Stedium Biotech, Nemčija*)
- Brizge (5 mL, *BD Discart II, Becton Dickinson, ZDA*)
- Injekcijska igla
- Patena
- Steklene vsebniki s plastičnim pokrovom na navoj (20 mL)

3.1.4 Laboratorijska oprema

- Mikrotitrski čitalec (*Synergy H4 Hybrid Reader, BioTek® Instruments s programsko opremo Gen5 (BioTek)*)
- Analitska tehtnica AE-240S (*Mettler Toledo, Švica*)
- Vodna kopel (*Büchi, Švica*)
- Ultrazvočna kadička SONIS 3 (*Iskra PIO, Slovenija*)

- Laboratorijska centrifuga MiniCentrifuge GMC-060 (*neoLab, Koreja*)
- Ultracentrifuga Thermo Scientific® (*Sorwall, WX ULTRA Series Centrifuge, ZDA*)
- Sušilnik (*Kambič SP-45, Slovenija*)
- UVA lučka (*lastnosti so opisane na strani 15*)
- HPLC Agilent Technologies (*Agilent 1100 Series, Nemčija*)

3.2 METODE

3.2.1 Izdelava mikroemulzij

V okviru diplomske naloge smo se odločili za pripravo petih različnih ME. Sestavljene so iz vodne faze (prečiščena voda), oljne faze (Izopropil miristat), emulgatorja (Tween 40) in koemulgatorja (Imwitor 308). V vsako izmed ME smo vgradili tudi 0,1% RSV.

ME tipa o/v, v/o in gel se razlikujejo samo v kvantitativni sestavi. Beli vosek in poliakrilno kislino pa smo uporabili kot zgoščevali za ME tipa o/v in v/o. Preglednica II prikazuje sestavo izdelanih ME.

Preglednica II: Sestava izdelanih ME (v (m/m)%).

Sestavina	ME v/o	ME o/v	ME gel	ME v/o z belim voskom	ME o/v s poliakrilno kislino
Prečiščena voda	10	45	60	9	43,9
IPM	60	25	10	54	24,4
Tween 40	15	15	15	13,5	14,6
Imwitor 308	15	15	15	13,5	14,6
Beli vosek	-	-	-	10	-
Poliakrilna kislina	-	-	-	-	2,5

3.2.1.1 Izdelava mešanice emulgatorjev

Zaradi enakega razmerja med emulgatorjem in koemulgatorjem v vseh formulacijah smo njuno mešanico pripravili vnaprej. Homogeno zmes smo dosegli s segrevanjem in mešanjem na vodni kopeli pri temperaturi 70 °C. Tudi po ohladitvi na sobno temperaturo je mešanica ostala tekoča in homogena.

3.2.1.2 Izdelava ME tipa o/v, v/o in ME gel

ME tipa o/v, v/o in gel se med seboj razlikujejo samo v kvantitativni sestavi, zato smo jih pripravili po enakem postopku. Najprej smo v čašo natančno zatehtali *trans*-RSV. Počasi smo mu dodajali mešanico emulgatorjev in mešali s stekleno palčko, dokler ni bil v celoti raztopljen. Nato smo dodali IPM in vodo. Celotno zmes smo počasi premešali do spontanega nastanka bistre ME.

3.2.1.3 Izdelava ME v/o z belim voskom

Beli vosek je pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju, zato smo ga morali pred izdelavo ME raztaliti. V čašo smo zatehtali vosek in ga raztalili na vodni kopeli segreti na 70 °C. V drugi čaši smo pripravili zmes preostalih sestavin po prej opisanem postopku in jo segreti na približno enako temperaturo. Njeno vsebino smo nato počasi prenesli v čašo z voskom in mešali do ohladitve.

3.2.1.4 Izdelava ME o/v s poliakrilno kislino

Postopek priprave ME o/v s poliakrilno kislino smo v celoti izvajali v pateni. V pateno smo zatehtali RSV in ga raztopili v emulgatorski mešanici. Postopno smo dodajali poliakrilno kislino, ki smo jo sproti raztrli s pestilom, dokler v formulaciji ni bilo več vidnih grudic. Nato smo dodali IPM, na koncu pa še vodo, ki omogoči polimerizacijo poliakrilne kisline in posledično zgoštev sistema.

3.2.2 Določanje gostote ME

Gostoto tako izdelanih ME smo določili z merilnim valjem.

V predhodno stehtan prazen merilni valj smo odmerili približno 2 mL vzorca. Prekritega s parafilmom smo segreti na vodni kopeli na približno 70 °C. S tem smo se znebili morebitnih zračnih mehurčkov, hkrati pa preprečili zastajanje izdelka na stenah merilnega valja. Po ohladitvi na sobno temperaturo smo odčitali točen volumen in merilni valj ponovno stehtali. Razlika v masah med praznim in polnim merilnim valjem predstavlja maso odčitane volumna kozmetičnega izdelka. S pomočjo formule smo nato izračunali gostoto mikroemulzij.

Enačba 1: Izračun gostote ME.

$$\rho = \frac{m}{V}$$

m = masa ME v merilnem valju

V = volumen ME v merilnem valju

Meritve so pokazale, da je gostota vseh petih ME približno enaka in sicer 0,9 g/mL. Pravilnost rezultata smo potrdili še z enostavnim poskusom z vodo: vse ME so plavale, kar potrjuje, da je gostota izdelka manjša od 1 g/mL.

3.2.3 Staranje izdelanih ME

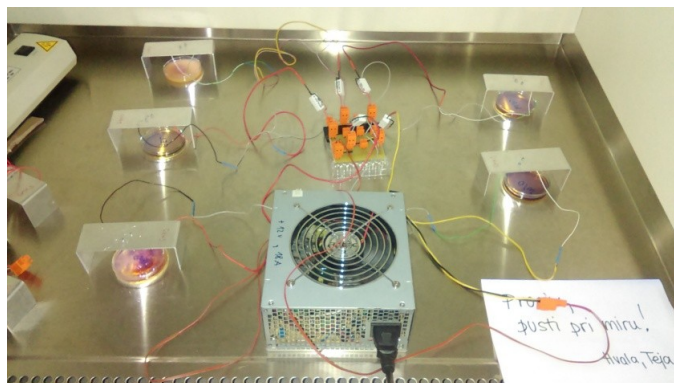
3.2.3.1 Obsevanje z UVA lučko

Za izvedbo obsevanja smo uporabili UVA lučko (LED dioda GMKY, vpeta v aluminijast okvir višine 40 mm) z navedenimi lastnostmi (Preglednica III).

Preglednica III: Lastnosti UVA lučke: LED dioda GMKY.

U (napetost na diodi)	3,1 V
I (tok čez diodo)	340 mA
P_{el} (električna moč na diodi)	1 mW
λ max (maksimalna valovna dolžina)	373 nm
% P_{opt} 375 nm (delež izsevane moči svetlobe pod določeno valovno dolžino)	45
% P_{opt} 370 nm	16
% P_{opt} 350 nm	0

Vzorci ME smo nanegli v petrijevke in jih izpostavili UVA svetlobi, kot je prikazano na sliki 4. Petrijevke so bile ves čas odprte, vzorci pa tako v stalnem stiku s kisikom in neposredno izpostavljeni vplivu UVA sevanja LED diode (oddaljene 40 mm). Testiranje vpliva obsevanja vzorcev smo izvajali 28 dni.



Slika 4: UVA lučke z vzorci v petrijevkah.

3.2.3.2 Staranje pri povišani T (40 °C)

Staranje pri povišani temperaturi smo izvajali 28 dni v sušilniku segretem na 40 °C.

3.2.3.3 Staranje pri sobni T

Za to testiranje smo izdelke hranili 90 dni v temi pri sobni temperaturi.

3.2.4 Določanje antioksidativne učinkovitosti vzorcev z metodo DPPH

3.2.4.1 Priprava osnovne in delovne raztopine DPPH

V 25 mL bučko smo natančno zatehtali 6,90 mg DPPH. Bučko smo nato do polovice napolnili z metanolom. Ker so bili v raztopini še vedno prisotni kristali DPPH, smo jih raztopili z uporabo ultrazvoka. Bučko smo nato dopolnili z metanolom do oznake ter dobro premešali. Koncentracija tako pripravljene raztopine je 700 µM.

Zaradi občutljivosti raztopine DPPH na svetlobo in kisik, smo vsak dan pripravili svežo.

Za analize smo uporabljali delovno raztopino DPPH s koncentracijo 280 µM. Pripravili smo jo z ustrežno redčitvijo osnovne raztopine DPPH z metanolom v razmerju 2 : 3.

3.2.4.2 Priprava vzorcev

Za analizo vsake mikroemulzije smo pripravili po sedem vzorcev različnih koncentracij.

Priprava vzorcev ME gel, o/v, v/o in o/v s poliakrilno kislino

Najprej smo v čaši pripravili osnovno raztopino vsake ME. Natančno smo zatehtali približno 200 mg vzorca, s pomočjo gostote izračunali volumen (v tem primeru $V = 222,2 \mu\text{L}$) ter dopolnili z metanolom do skupnega volumna 5 mL ($V_{\text{metanola}} = 4777,8 \text{ mL}$). Koncentracija tako pripravljene osnovne raztopine je 40 mg/mL.

Enačba 2: Izračun koncentracije osnovne raztopine vzorca.

$$c = \frac{m}{V}$$

m = masa zatehtane ME

V = skupni volumen vzorca

Z ustreznim redčenjem smo pripravili po 1 mL sedem različnih koncentracij vzorca (Preglednica IV).

Preglednica IV: Priprava vzorcev sedmih različnih koncentracij z metanolom.

Koncentracija vzorca (mg/mL)	V _{osnovna raztopina vzorca} (μL)	V _{metanol} (μL)
8	200	800
10	250	750
16	400	600
18	450	550
20	500	500
25	625	375
30	750	250

Ustrezne volumne vzorcev smo nato prenesli na mikrotitrsko ploščo (Preglednica V). Glede na to, da so vzorci na plošči redčeni z raztopino DPPH v metanolu v razmerju 1 : 1, so končne koncentracije enkrat nižje.

Preglednica V: Shema nanosa vzorcev na mikrotitrsko ploščo.

Metanol	Metanol + delovna raztopina DPPH (1 : 1)		
Vzorci + Metanol (slepi vzorec)	1. Paralelka Vzorec + DPPH	2. Paralelka Vzorec + DPPH	3. Paralelka Vzorec + DPPH
1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1

Sledila je 90 minutna inkubacija v temi pri sobni temperaturi, nato pa smo rezultate odčitali z mikrotitrskim čitalcem.

Priprava vzorcev ME v/o z belim voskom

Ker vosek v metanolu ni topen, vzorcev nismo pripravljali na enak način kot ostale ME.

V 2 mL centrifugirke smo natančno zatehtali mase vzorca za posamezne koncentracije, s pomočjo gostote izračunali volumen ter dopolnili z metanolom do skupnega volumna 1 mL. Dodali smo 1 mL delovne raztopine DPPH in 90 min inkubirali v temi pri sobni temperaturi. S centrifugiranjem smo poskrbeli, da se je neraztopljen vosek posedel na dno, odpipetiran supernatant vzorca pa nanесли na mikrotitrsko ploščo po zgoraj navedenem postopku.

3.2.4.3 Določanje absorbance vzorcev

Po inkubaciji smo izvedli meritve z mikrotitrskim čitalcem pri valovni dolžini 517 nm.

Absorbanco slepega vzorca moramo odšteti pri vsaki meritvi (glej Enačbo 3).

Enačba 3: Izračun absorbance vzorca.

$$A = A1 - A2$$

A1 = povprečje absorbanc 3 paralelk

A2 = absorbanca slepega vzorca

Absorbanca delovne raztopine DPPH redčena z metanolom v razmerju 1 : 1 predstavlja 100% DPPH, absorbance vzorcev posameznih koncentracij pa delež preostalega nereduciranega DPPH v vzorcu, ki ga lahko izračunamo po spodaj navedeni enačbi (Enačba 4).

Enačba 4: Izračun deleža nereduciranega DPPH.

$$y = \frac{A2 * 100}{A1}$$

y = delež nereduciranega DPPH

A1 = absorbanca delovne raztopine DPPH

A2 = absorbanca vzorca

Na podlagi izračunanih podatkov smo lahko narisali graf deleža nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca. S pomočjo linearne regresije smo določili enačbo premice in vrednost kvadrata Pearsonovega koeficienta.

Enačbo premice uporabimo pri izračunu EC₅₀, torej koncentracije antioksidanta, ki povzroči redukcijo 50 % DPPH radikala v določenem časovnem intervalu. S pomočjo statistične funkcije STEYX (program Excel) smo izračunali standardno napako (glej Enačbo 5), na podlagi katere smo lahko določili tudi standardni odklon (SD).

Enačba 5: Izračun standardne napake.

$$SE = \sqrt{\frac{1}{(n-2)} \left(\sum (y - \bar{y})^2 - \frac{(\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y}))^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \right)}$$

n = velikost vzorca

y = obseg podatkovnih točk na y osi

\bar{y} = povprečje podatkovnih točk na y osi

x = obseg podatkovnih točk na x osi

\bar{x} = povprečje podatkovnih točk na x osi

Končni rezultat smo predstavili kot $EC_{50} \pm SD$. Rezultate testiranj smo primerjali med seboj.

3.2.5 Določanje vsebnosti *trans*-RSV s HPLC metodo

Kemijsko stabilnost in s tem vsebnost *trans*-RSV smo določali s HPLC metodo. Kot smo že prej omenili, je RSV lahko prisoten v dveh izomernih oblikah, od katerih je *trans*-RSV bolj stabilen in biološko aktiven. Pod vplivom UV sevanja pa lahko *trans*-RSV izomerizira in preide v manj učinkovito obliko. S to metodo določamo koncentracijo *trans*-RSV v samem izdelku (20, 40).

Maksimum absorpcije *trans*-RSV je pri valovni dolžini približno 306 nm. Površina pod dobljeno krivuljo pa je premo-sorazmerna s koncentracijo preostalega *trans*-RSV v vzorcu. Koncentracijo *trans*-RSV izračunamo na podlagi enačbe premice standardne raztopine RSV (40).

Osnovni pogoji metode so predstavljeni v Preglednici VI.

Preglednica VI: Osnovni pogoji HPLC metode.

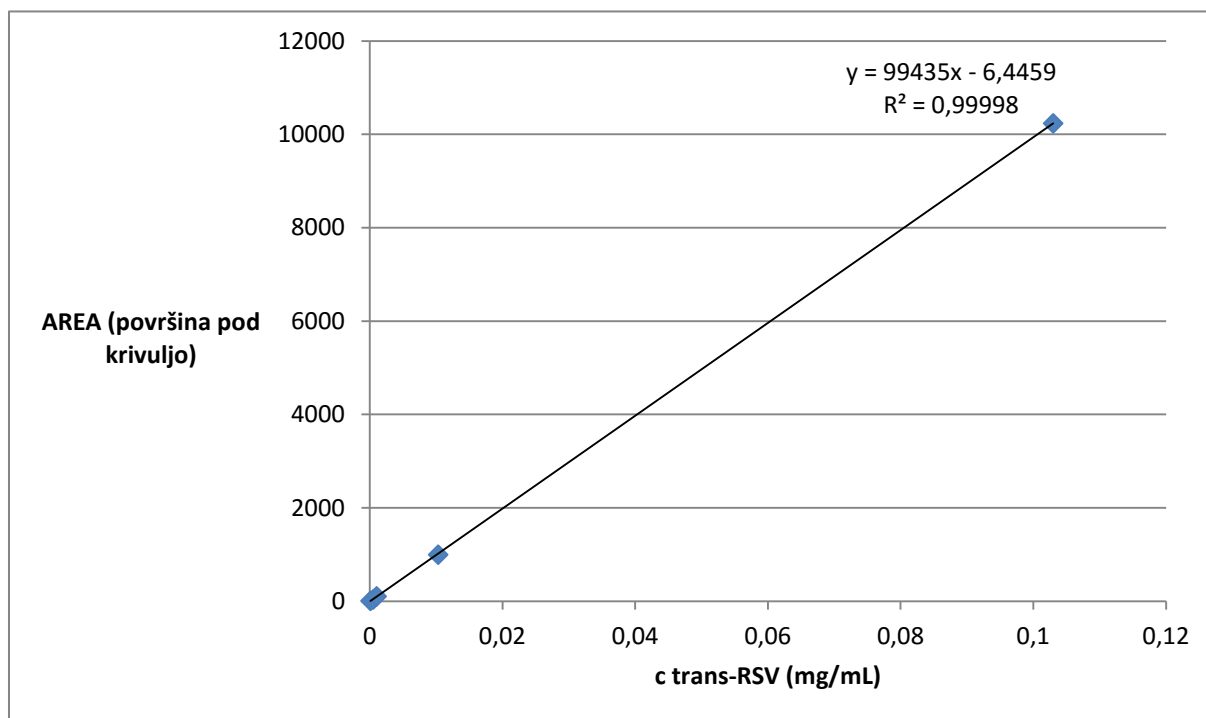
Kolona	Reverznofazna kolona C18 YMC Pack ODS-AM
Dolžina kolone	250 μ m
Notranji premer	4,6 μ m
Velikost delcev	5 μ m
Temperatura kolone	25 $^{\circ}$ C
Mobilna faza	5% očetna kislina (metanol:bidestilirana voda=1:1)
Pretok mobilne faze	1 mL/min
Volumen injiciranja vzorca	20 μ L
Valovna dolžina UV detekcije	303 nm
Retencijski čas <i>trans</i> -resveratrola	7,5 min

3.2.5.1 Priprava umeritvene krivulje

Za pripravo umeritvene krivulje smo najprej natančno zatehtali približno 10 mg RSV in ga prenesli v 100 mL bučko. Do polovice smo jo napolnili z metanolom in za kratek čas postavili na ultrazvok, da se je RSV popolnoma raztopil. Nato smo z metanolom bučko dopolnili do oznake in dobro premešali z obračanjem bučke.

Na podlagi osnovne raztopine RSV smo nato pripravili nadaljnje redčitve v koncentracijskem območju med 0,0001 in 0,01 mg/mL in s HPLC analizo izmerili površine pod krivuljo. S

pomočjo linearne regresije smo nato določili enačbo premice ter vrednost kvadrata Pearsonovega koeficienta (Glej sliko 5).



Slika 5: Umeritvena krivulja *trans*-RSV.

3.2.5.2 Priprava vzorcev za HPLC analizo

Vzorci za HPLC analizo smo pripravljali z ustrezno redčitvijo vzorca z metanolom. Faktor redčenja smo kasneje upoštevali pri izračunu koncentracije *trans*-RSV v vzorcu.

Dobljena raztopina mora biti bistra ali rahlo opalescentna, brez prisotnih neraztopljenih trdnih delcev. Vzorce o/v, v/o in gel smo pripravili z redčenjem v razmerju 1 : 5, ME v/o z belim voskom in o/v s poliakrilno kislino pa v razmerju 1 : 10.

Zaradi netopnosti voska v metanolu smo morali vzorce ME v/o z belim voskom pred vsako analizo najprej ultracentrifugirati (15 min, 10.000 obratov/min, 20 °C), da so se trdni delci posedli na dno. Supernatant smo nato previdno odvzeli z injekcijsko iglo. Za zmanjšanje tveganja zamašitve kolone smo vzorce še filtrirali. Postopek filtracije smo izvedli tudi pri vzorcih ME o/v s poliakrilno kislino, ker je bila raztopina motna.

Zaradi dodatnih postopkov smo morali upoštevati možnost zaostanka RSV v usedlini po ultracentrifugiranju ali na samem filtru.

3.2.5.3 Izračun koncentracije *trans*-RSV v vzorcih

S HPLC analizo smo pridobili podatke o površini pod krivuljo, koncentracijo prisotnega *trans*-RSV v vzorcu pa smo izračunali s pomočjo umeritvene premice. Na koncu smo upoštevali tudi faktor redčenja vzorcev pred samo analizo.

3.2.6 Primer izračuna $EC_{50} \pm SD$ in koncentracije *trans*-RSV

Prikazali bomo primer izračuna vrednosti $EC_{50} \pm SD$ in koncentracije *trans*-RSV v vzorcih ob upoštevanju kvocienta izgube vode.

Primer izračuna kvocienta izgube vode

V primeru, da so vsebniki v času testiranja zaprti, morebitnih izgub vzorcev ni treba upoštevati. Vzorci v času obsevanja pa niso bili pokriti, zato smo morali pred vsako analizo petrijevke stehtati. Predpostavili smo, da je vzrok za zmanjšanje mase vzorca v izhlapevanju vode. Delež zaostanka vzorca smo upoštevali kot kvocient povečanja koncentracije vzorca.

Preglednica VII prikazuje primer izračuna kvocienta izgube vode v vzorcu ME o/v s poliakrilno kislino po določenem času obsevanja.

Preglednica VII: Primer izračuna kvocienta izgube vode v vzorcu.

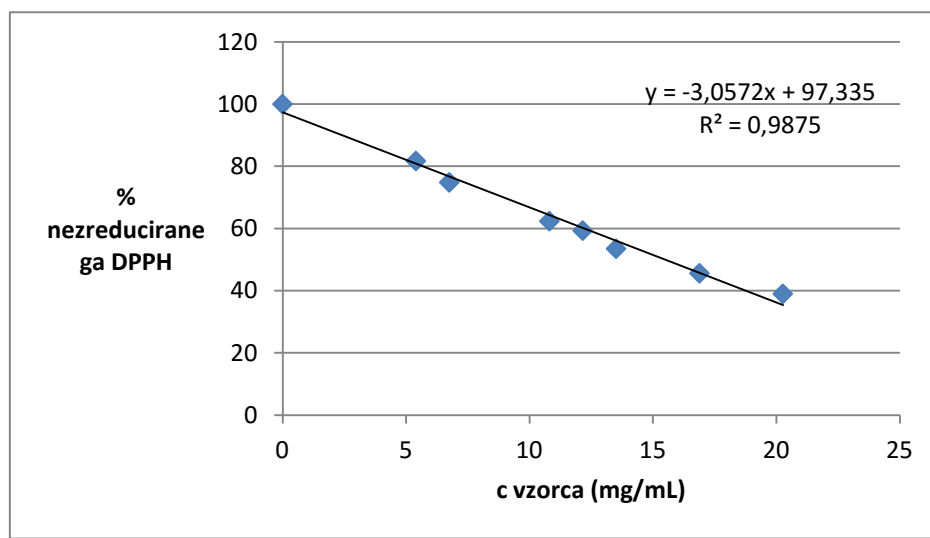
m (petrijevke)	20,5289 g
m (petrijevka + vzorec)	32,1570 g
m 1 (vzorec)	11,6281 g
m (vzorec + petrijevka) po določenem času obsevanja	29,1807 g
m (izguba vzorca po obsevanju)	2,9763 g
m 2 (vzorec po obsevanju)	8,6517 g
Kvocient izgube vode (m2/m1)	0,74

Primer izračuna $EC_{50} \pm SD$

Preglednica VIII prikazuje primer izmerjenih absorbanc, izračuna absorbanc vzorcev in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah vzorca ME o/v s poliakrilno kislino. Upoštevali smo koncentracije povečane za kvocient izgube vode. Preglednica IX pa prikazuje primer izračuna koncentracije EC_{50} ob upoštevanju SD. Slika 6 prikazuje graf za določanje koncentracije EC_{50} .

Preglednica VIII: Primer izmerjenih absorbanc slepih vzorcev in vzorcev z DPPH ter izračuna A in % nereduciranega DPPH pri različnih koncentracijah v vzorcu (z upoštevanjem kvocienta izgube vode).

c vzorca (mg/mL)	c -povečana za kvocient izgube vode (mg/mL)	A1 (slepi vzorec)	A2 vzorec z DPPH (povprečje 3 vzorcev)	A (A2-A1)	% nereduciranega DPPH
0	0	0,041	0,966	0,925	100
4	5,405	0,054	0,81	0,756	81,70
5	6,757	0,061	0,753	0,692	74,82
8	10,81	0,078	0,655	0,577	62,36
9	12,16	0,083	0,632	0,549	59,33
10	13,51	0,087	0,547	0,495	53,52
12,5	16,89	0,098	0,52	0,422	45,61
15	20,17	0,111	0,472	0,361	39,01



Slika 6: Primer grafa za določanje koncentracije EC_{50} v vzorcu.

Preglednica IX: Primer izračuna koncentracije EC_{50} ob upoštevanju SD.

EC_{50} (mg/mL)	STEYX	$EC_{50} - SD$ (mg/mL)	SD	$EC_{50} \pm SD$ (mg/mL)
15,48312	2,426934	14,68928	0,793842	15,48 ± 0,79

Primer izračuna koncentracije *trans*-RSV

Preglednica X prikazuje primer izračuna koncentracije *trans*-RSV, na primeru ME o/v s poliakrilno kislino, s pomočjo enačbe umeritvene premice (glej Enačbo 6). Pri končnem rezultatu smo upoštevali tudi redčitev pred analizo in izgubo vode vzorca: dobljeno koncentracijo smo pomnožili s faktorjem redčenja (koncentracija v izdelku je večja) in

kvocientom izgube vode (zaradi izgube vode je koncentracija vzorca večja kot v prvotnem izdelku).

Enačba 6: Enačba umeritvene premice RSV.

$$y (\text{AREA}) = 99435 x(c \text{ trans-RSV}) - 6,4459$$

Preglednica X: Izračun koncentracije *trans*-RSV v vzorcu s pomočjo umeritvene premice na podlagi izmerjenih površin pod krivuljo.

AREA (izmerjena površina pod krivuljo)	Redčitev vzorca	c <i>trans</i>-RSV z upoštevano redčitvijo (mg/mL)	Kvocient povečane koncentracije vzorca	c <i>trans</i>-RSV z upoštevanim kvocientom izgube vode (mg/mL)
2703,3	10×	0,272514	0,74	0,20166

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Obsevanje z UVA lučko

Dermalna aplikacija kozmetičnih izdelkov z vgrajenim *trans*-RSV ima številne pozitivne učinke. *Trans*-RSV kožo ščiti pred škodljivimi učinki UV sevanja in prezgodnjim staranjem. S tem testiranjem smo želeli preveriti ali formulacije po aplikaciji na kožo in izpostavljenosti sončnim žarkom še vedno ohranjajo konstantno antioksidativno učinkovitost. Za ponazoritev vsakdanjih pogojev na koži so bile petrijevke z vzorci ves čas testiranja odprte in v stalnem stiku z atmosferskim kisikom.

Izvedba testiranja

Obsevanje z UVA lučko smo izvajali 28 dni. V tem časovnem obdobju smo vzorce ME 10 krat analizirali: v času 0 (pred samo izvedbo testiranja) in nato po 1, 2, 3, 7, 10, 13, 16, 20 in 28 dneh. Rezultate dobljene z metodama DPPH in HPLC smo nato med seboj primerjali.

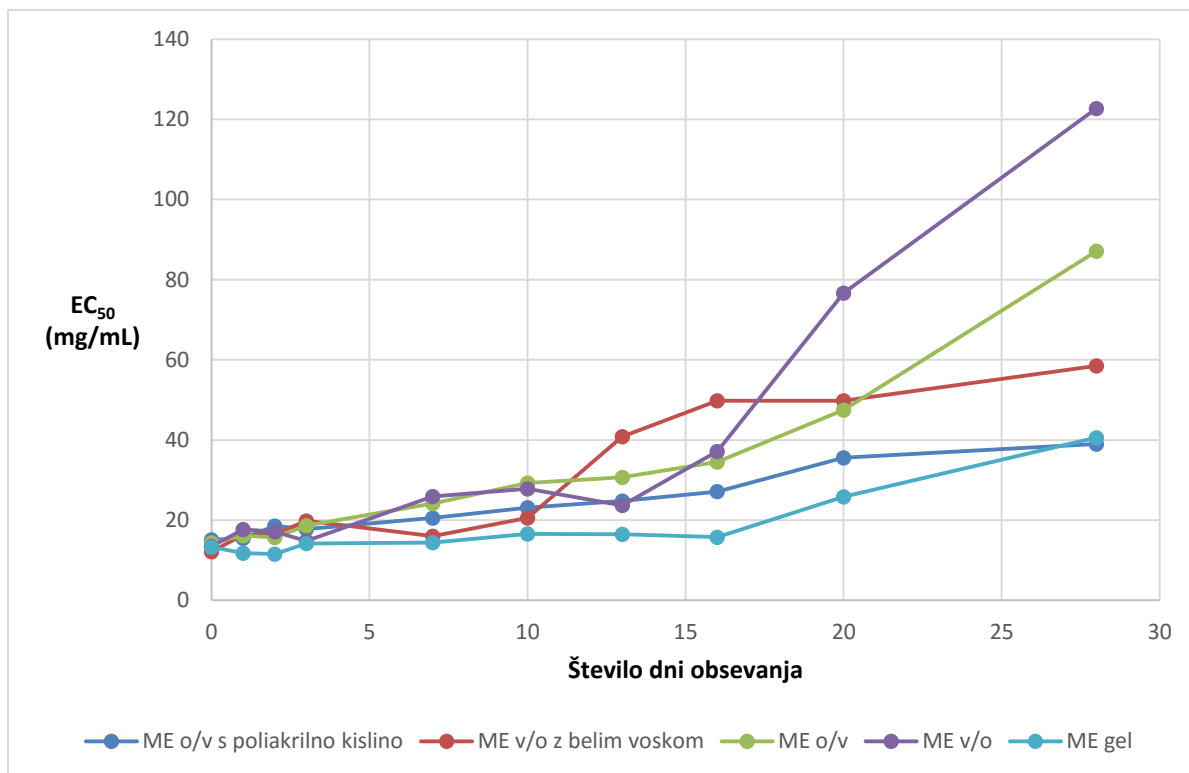
Vzorci v času obsevanja niso bili pokriti, zato smo morali pred vsako analizo petrijevke stehtati. Predpostavili smo, da je vzrok za zmanjšanje mase vzorca v izhlapevanju vode. Delež zaostanka vzorca pa smo upoštevali kot kvocient povečanja koncentracije vzorca.

Na enak način smo z metodo DPPH analizirali tudi slepe vzorce. Meritve so pokazale, da vzorci, brez vgrajenega *trans*-RSV, ne izkazujejo antioksidativne učinkovitosti (rezultate teh meritev ne navajamo).

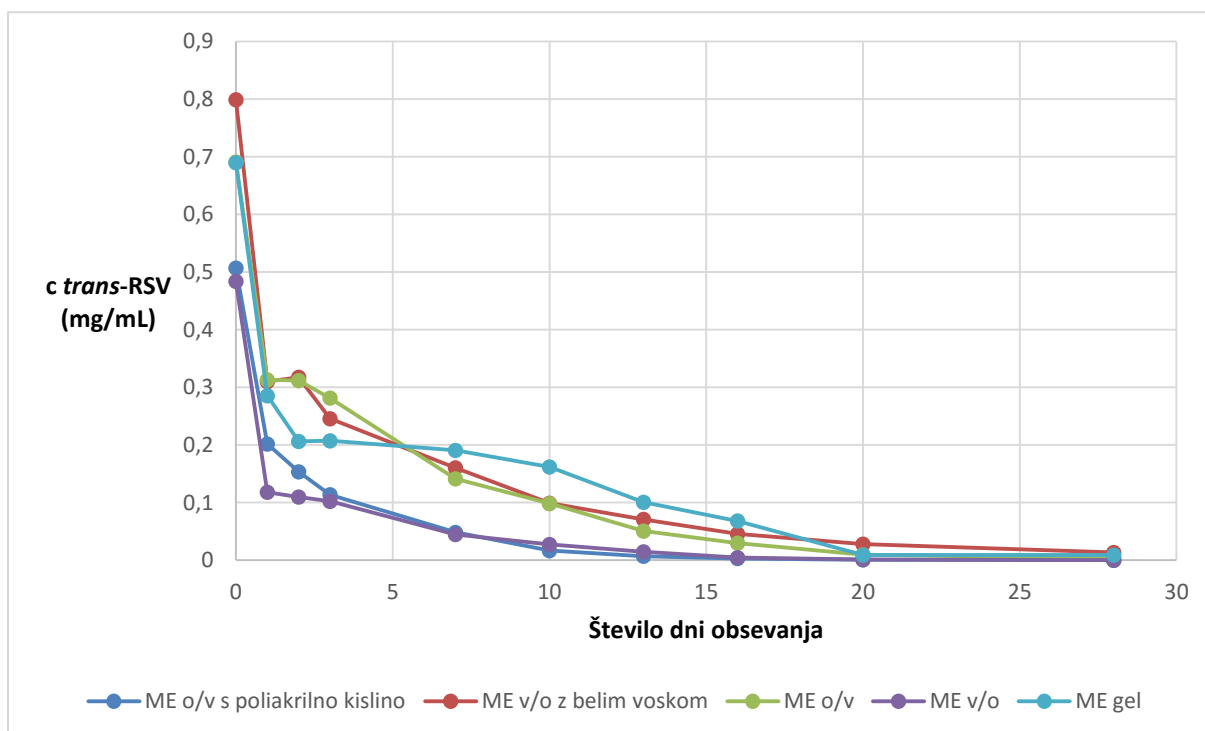
Rezultati

V prilogi 1 so v Preglednicah XII, XIII, XIV, XV in XVI predstavljeni rezultati obsevanja, ki smo jih zaradi boljše preglednosti združili in predstavili v obliki grafov na slikah 7 in 8.

Slika 7 prikazuje primerjavo vrednosti EC_{50} , slika 8 pa koncentracije *trans*-RSV v različnih formulacijah po določenem času obsevanja z UVA svetlobo.



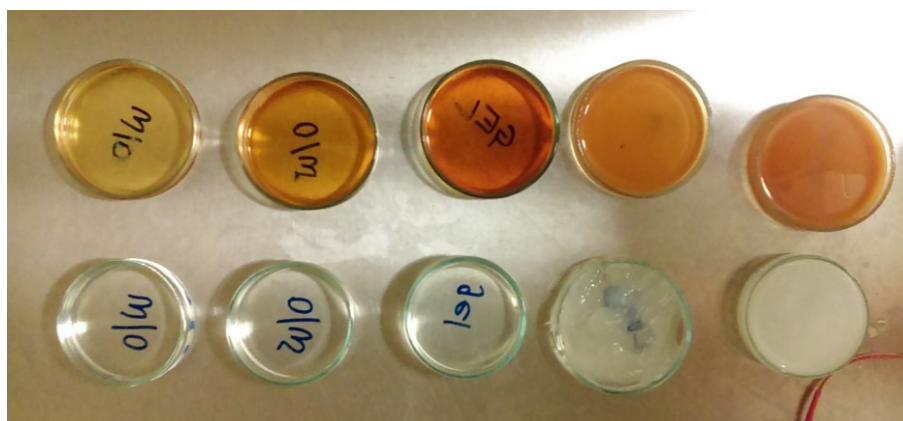
Slika 7: Primerjava vrednosti EC_{50} različnih formulacij po določenem času obsevanja z UVA svetlobo.



Slika 8: Primerjava vsebnosti *trans*-RSV v različnih formulacijah po določenem času obsevanja z UVA svetlobo.

UVA svetloba z valovno dolžino 373 nm nima zadostne energije za direktno cepitev kovalentnih vezi. Poškodbe povzročajo posredno ob prisotnosti kisika s tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (3, 16). Da je oksidacija vzorcev res potekla, lahko ugotovimo tudi s spremembo barve vzorcev, ki postajajo vse temnejši.

V našem primeru se je barva vseh formulacij že po prvem dnevu obsevanja bistveno spremenila. Predvidevamo, da je lahko vzrok v nastanku obarvanih radikalov (41) ali obarvanih produktov *trans*-RSV, ki nastanejo po izpostavitvi UV-sevanju (*cis*-RSV, ostali fotoprodukti). Slika 9 prikazuje primerjavo v barvi obsevanih in neobsevanih formulacij.



Slika 9: Primerjava v barvi 28 dni obsevanih (zgornjih) in neobsevanih (spodnjih) vzorcev (z leve proti desni: ME v/o, ME o/v, ME gel, ME o/v s poliakrilno kislino, ME v/o z belim voskom).

RSV je lahko prisoten v dveh izomernih oblikah, od katerih je *trans*-RSV bolj stabilen in biološko aktiven. Pod vplivom UV sevanja pa lahko *trans*-RSV izomerizira in preide v manj učinkovito obliko, *cis*-RSV (20). Pri študiji C. Bonda et.al. (20) so preverjali vpliv UV sevanja na emulzijo tipa o/v z vgrajenim 0,1 % *trans*-RSV. Primerjali so rezultate neobsevanih in vzorcev eno uro izpostavljenih UV sevanju z valovno dolžino 290-400 nm. Pri HPLC kromatogramu obsevanih vzorcev so zaznali izomerizacijo kar 55 % *trans*-RSV izmerjenega pri neobsevanih vzorcih. Po obsevanju so poleg novonastalega *cis*-RSV (33%) detektirali tudi nekatere nedefinirane fotoprodukte (22 %). Zmanjšana koncentracija *trans*-RSV je posledično pomenila slabšo antioksidativno kapaciteto vzorca in s tem povišanje vrednosti EC₅₀.

Pri obsevanju z UVA svetlobo smo zato pričakovali največji porast koncentracije EC₅₀ in najbolj drastično zmanjšanje koncentracije *trans*-RSV v primerjavi z neobsevanimi vzorci.

Rezultati testiranja pred začetkom obsevanja

Teoretično, bi morala biti koncentracija *trans*-RSV v vseh formulacijah pri prvem testiranju približno 1 mg/mL. Vse izmerjene koncentracije pa so bile nižje od te vrednosti. Najvišjo koncentracijo smo izmerili pri ME v/o z belim voskom (0,80 mg/mL), sledile so ji ME o/v (0,70 mg/mL), ME gel (0,69 mg/mL), ME o/v s poliakrilno kislino (0,51 mg/mL) in ME v/o (0,48 mg/mL). Pri ME v/o z belim voskom in ME o/v s poliakrilno kislino moramo upoštevati možen zaostanek RSV, zaradi uvedbe dodatnih postopkov filtracije in ultracentrifugiranja. Določen delež *trans*-RSV je tako lahko ostal ujet na samem filtru, pri ME v/o z belim voskom pa poleg tega tudi v usedlini neraztopljenega belega voska na dnu ultracentrifugirke.

Vzrok za nižje koncentracije *trans*-RSV je najverjetneje v časovnem razmiku med izdelavo vzorcev in izvedbo meritve. Glede na to, da so vrednosti $EC_{50} \pm SD$ vseh petih ME pri prvem testiranju primerljive (v koncentracijskem območju 10-15 mg/mL), predvidevamo, da je določen delež *trans*-RSV v tem času izomeriziral v *cis*-RSV, ki še vedno izkazuje določeno antioksidativno aktivnost.

Rezultati po enem dnevu obsevanja

Koncentracija *trans*-RSV je pri vseh vzorcih upadla za več kot 50% že po prvem dnevu obsevanja: pri ME o/v za 55 %, pri ME o/v s poliakrilno kislino, ME v/o z belim voskom in ME gelu za 60 %, pri ME v/o pa kar za 75 %. Antioksidativna učinkovitost vseh petih ME pa je ostala približno enaka. Vzrok je najverjetneje v določeni antioksidativni aktivnosti nastalega *cis*-RSV in ostalih fotoproduktov.

S tem testiranjem smo potrdili izjemno občutljivost *trans*-RSV že ob krajši izpostavitvi UV sevanju, več kot 50 % vgrajenega *trans*-RSV bi izomeriziralo že v prvih 24 urah. Izdelek apliciran na kožo bi bil posledično manj učinkovit. Za ohranjanje strukturne integritete *trans*-RSV in s tem biološke učinkovitosti tudi po izpostavitvi soncu bi morali v formulacije dodatno vgraditi UV filtre ali tehnične antioksidante.

Problematiko fotolabilnosti *trans*-RSV so v študiji C. Bonda et.al. (20) poskušali rešiti z vgraditvijo fotostabilizatorja etilheksil metoksikrilena (EHMC). Primerjali so rezultate obsevanih formulacij brez in z vgrajenim 4 % EHMC. Ob prisotnosti EHMC so dokazali, da je izomerizacija *trans*-RSV po eni uri obsevanja močno inhibirana. V primerjavi s formulacijami brez EHMC se v tem primeru ohrani kar 90 % vgrajenega *trans*-RSV, izomerizacija v *cis*-RSV in ostale fotoprodukte poteče le v manjši meri.

Vpliv formulacije

Za zagotavljanje stabilnosti vgrajenega *trans*-RSV je zelo pomemben izbor ustrezne formulacije, ki bo kljub izpostavljenosti soncu in posledično UVB in UVA žarkom omogočala ohranitev konstantne antioksidativne učinkovitosti izdelka (21).

Zaradi slabe vodotopnosti *trans*-RSV (21) smo pričakovali boljše rezultate ME z zunanjo oljno fazo. Opazili pa smo, da je bolj kot lipofilnost sistema imela pomembno vlogo sama viskoznost.

V Preglednici XI so predstavljeni podatki o viskoznosti vseh petih ME testiranih pri T 20 °C (26).

Preglednica XI: Viskoznost izdelanih mikroemulzij.

	ME v/o	ME o/v	ME gel	ME o/v s poliakrilno kislino	ME v/o z belim voskom
Viskoznost (mPas)	32,2 ± 0,1	31,5 ± 0,1	80,2 ± 0,6	79,3 ± 1,5	131,8 ± 3,1

Kot lahko vidimo, ima najvišjo viskoznost ME v/o z belim voskom, sledijo ji ME gel, ME o/v s poliakrilno kislino, ME v/o in ME o/v (26).

Po 28 dneh se je za najbolj antioksidativno učinkovito izkazala ME o/v s poliakrilno kislino (38,98 ± 1,64 mg/mL). Sledile so ji ME gel (40,57 ± 0,63 mg/mL), ME v/o z belim voskom (58,5 ± 6,25 mg/mL), ME o/v (87,12 ± 1,18 mg/mL) in ME v/o (122,71 ± 0,98 mg/mL).

Viskoznejše ME so se izkazale za bistveno bolj učinkovite glede zaščite vgrajenega *trans*-RSV. Najbolj konstantne vrednosti antioksidativne učinkovitosti lahko opazimo pri ME gelu in ME o/v s poliakrilno kislino. Vrednosti EC₅₀ ± SD se ves čas testiranja gibljejo v koncentracijskem območju 10-40 mg/mL. Vzrok je najverjetneje v premreženi strukturi sistema. Lamelarna struktura ME gela (26) in polimerizacija poliakrilne kisline tvorita učinkovito zaščito vgrajenega *trans*-RSV. Antioksidativna učinkovitost ME v/o z belim voskom je sicer v primerjavi z drugima dvema nekoliko slabša, po 28 dneh obsevanja vrednost EC₅₀ ± SD naraste na približno 60 mg/mL. Vseeno pa moramo pri tem upoštevati možnost zaostanka *trans*-RSV v usedlini neraztopljenega voska na dnu centrifugirke, zaradi česar lahko vzorci izkazujejo slabšo antioksidativno učinkovitost.

4.2 Staranje pri povišani temperaturi

Stabilnost vgrajenega antioksidanta ni problematična samo po aplikaciji na kožo, temveč tudi pri samem shranjevanju v originalni ovojnini izdelka. S tem testiranjem smo želeli preveriti vpliv povišane T (40 °C) na formulacije z vgrajenim *trans*-RSV v zaprtih steklenih vsebnikih, ki smo jih pred vplivom UV svetlobe zaščitili z aluminijasto folijo.

Vpliv povišane temperature so preverjali tudi pri študiji C. Bonda et.al. (20). Tanko plast emuzije o/v z vgrajenim 0,1 % *trans*-RSV so nanegli na dno 100 mL steklene bučke in jo v celoti ovili z aluminijasto folijo za zaščito vzorca pred vplivom svetlobe. Postavili so jo v 400 mL bučko v vodno kopel segreto na 37 °C. HPLC analizo so izvedli po 0, 2, 4, in 6 urni inkubaciji. Po 6 urah se je delež *trans*-RSV zmanjšal za 1,21 %.

Glede na izkazano termolabilnost *trans*-RSV, smo pričakovali zmanjšanje koncentracije *trans*-RSV in s tem antioksidativne učinkovitosti vzorcev z daljšanjem obdobja staranja pri povišani temperaturi.

Izvedba testiranja

Staranje pri povišani temperaturi (40 °C) smo izvajali 28 dni. V tem časovnem obdobju smo vzorce ME štirikrat analizirali: v času 0 (pred samo izvedbo testiranja) in nato po 8, 14 in 28 dneh. Rezultate dobljene z metodo DPPH in HPLC smo nato med seboj primerjali.

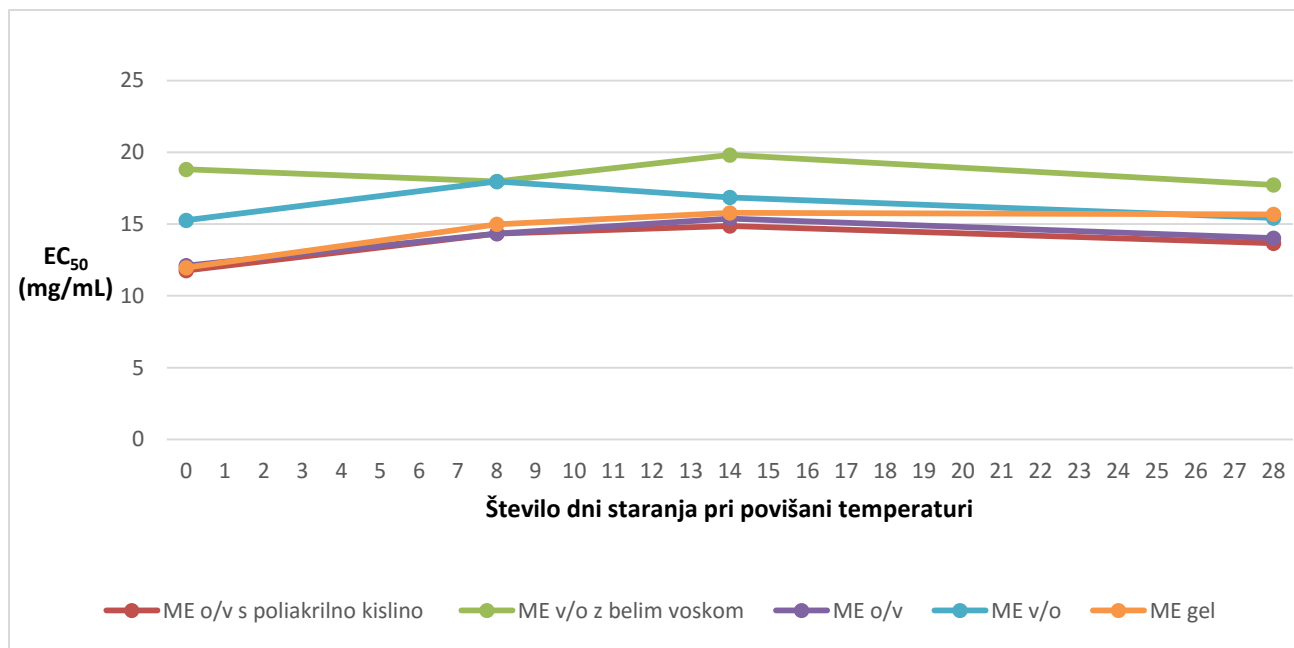
Zaradi shranjevanja vzorcev v zaprtih steklenih vsebnikih, kvocienta izgube vode ni bilo potrebno upoštevati.

Na enak način smo z metodo DPPH analizirali tudi slepe vzorce. Meritve so pokazale, da formulacije same brez vgrajenega RSV ne izkazujejo antioksidativne učinkovitosti (rezultate teh meritev ne navajamo).

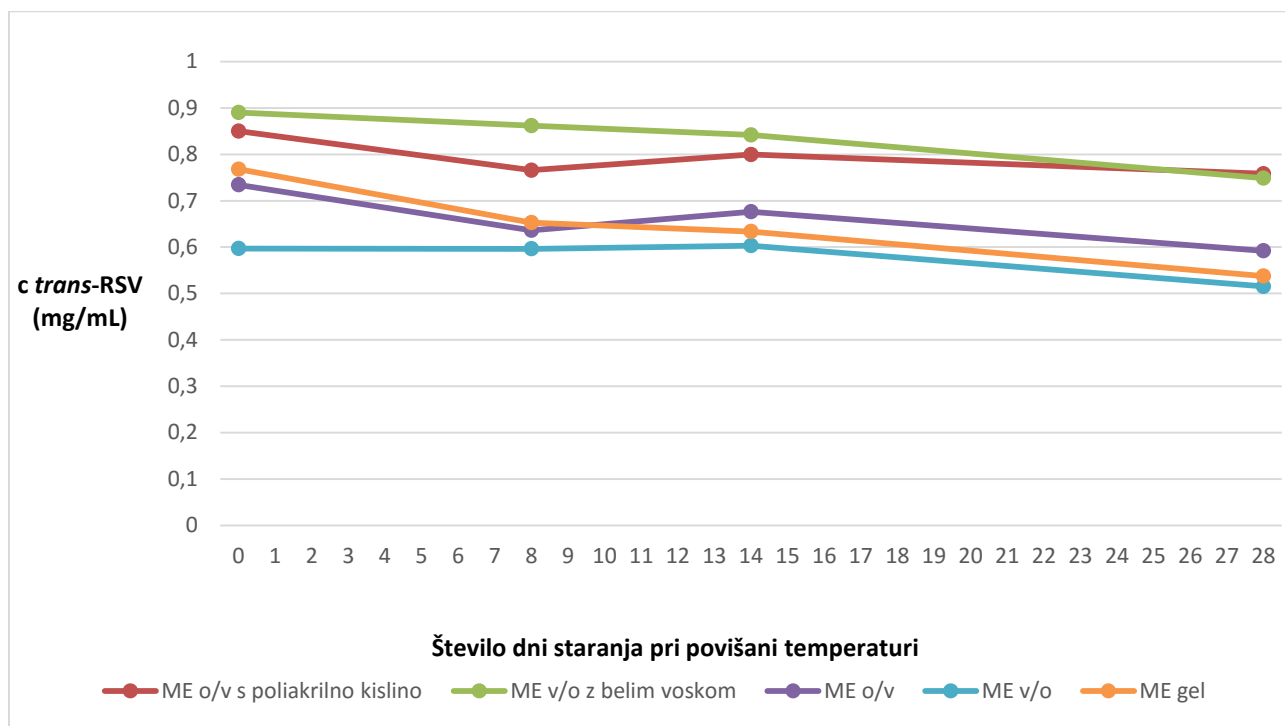
Rezultati

V prilogi 2 so v Preglednicah XVII, XVIII, XIX, XX, XXI predstavljeni rezultati staranja vzorcev pri povišani temperaturi, ki smo jih zaradi boljše preglednosti združili in predstavili v obliki grafov na slikah 10 in 11.

Slika 10 prikazuje primerjavo vrednosti EC₅₀, slika 11 pa koncentracije *trans*-RSV v različnih formulacijah po določenem času staranja pri povišani temperaturi.



Slika 10: Primerjava vrednosti EC_{50} različnih formulacij po določenem času staranja pri povišani temperaturi.



Slika 11: Primerjava vsebnosti *trans*-RSV različnih formulacij po določenem času staranja pri povišani temperaturi.

Rezultati testiranja pred začetkom staranja (v času 0)

Tudi v tem primeru, bi teoretično morala biti koncentracija *trans*-RSV v vseh formulacijah pri prvem testiranju približno 1 mg/mL. Najvišjo koncentracijo *trans*-RSV je imela ME v/o z

belim voskom (0,89 mg/mL), nekoliko nižje vrednosti smo izmerili pri ME o/v s poliakrilno kislino (0,85 mg/mL), ME gel (0,76 mg/mL), ME o/v (0,73 mg/mL) in ME v/o (0,60 mg/mL). Pri ME v/o z belim voskom in ME o/v s poliakrilno kislino moramo upoštevati možen zaostanek RSV zaradi filtracije in ultracentrifugiranja. Določen delež *trans*-RSV je tako lahko ostal ujet na samem filtru, pri ME v/o z belim voskom pa poleg tega tudi v usedlini neraztopljenega belega voska na dnu ultracentrifugirke.

Vzrok za nižje koncentracije *trans*-RSV že pred izvedbo testiranja je najverjetneje v časovnem zamiku med izdelavo formulacij in izvedbo HPLC analize. Glede na to, da so vrednosti $EC_{50} \pm SD$ vseh petih ME pri prvem testiranju primerljive (v koncentracijskem območju 10-15 mg/mL), predvidevamo, da je določen delež *trans*-RSV v tem času izomeriziral v *cis*-RSV, ki še vedno izkazuje določeno antioksidativno aktivnost.

Ponovno pa lahko opazimo, da so se za bolj učinkovite pri zaščiti vgrajenega *trans*-RSV izkazale viskoznejše ME.

Rezultati staranja pri povišani temperaturi po 28 dneh

Po 28 dneh se koncentracija *trans*-RSV pri ME o/v s poliakrilno kislino zniža za 11 %, pri ME v/o za 14 %, pri ME v/o z belim voskom za 16 % pri ME o/v za 19 %, pri ME gelu pa kar za 30 %. Ponovno lahko predpostavimo, da imajo nastali produkti (predvidevamo, da je med njimi tudi izomer *cis*-RSV) določeno antioksidativno učinkovitost. Čeprav so razlike v koncentraciji *trans*-RSV po 28 dneh v različnih ME precejšnje, vrednosti $EC_{50} \pm SD$ vseh 28 dni staranja ostajajo konstantne, v koncentracijskem območju 10-20 mg/mL. Povprečne vrednosti meritev EC_{50} v vseh štirih časovnih točkah znašajo pri ME o/v s poliakrilno kislino 13,7 mg/mL, pri ME o/v 14,0 mg/mL, pri ME gelu 14,6 mg/mL in pri ME v/o 16,3 mg/mL. Najvišje povprečje vrednosti EC_{50} po 28 dneh smo sicer izmerili pri ME v/o z belim voskom (18,6 mg/mL), vendar pa moramo upoštevati možnost zaostanka *trans*-RSV v belem vosku, ki predstavlja usedlino na dnu centrifugirke.

S tem testiranjem smo ugotovili, da formulacije kljub izkazani termolabilnosti vgrajenega *trans*-RSV tudi po 28 dneh ohranjajo konstantno antioksidativno učinkovitost, če jih hranimo v zaprtih steklenih vsebnikih, zaščitene pred svetlobo.

4.3 Staranje pri sobni temperaturi

Vsak izdelek ima rok uporabe po odprtju najmanj nekaj mesecev, zato mora izdelek ohranjati konstantno antioksidativno učinkovitost tudi v daljšem časovnem obdobju. S tem testiranjem smo želeli preveriti, v kolikšni meri se v 90 dneh shranjevanja v temi pri sobni temperaturi zmanjša koncentracija vgrajenega *trans*-RSV in s tem antioksidativna učinkovitost formulacije.

Izvedba testiranja

Staranje pri sobni temperaturi smo izvajali 90 dni, vzorce smo v času testiranja hranili v omari prekrte z aluminijasto folijo. V tem časovnem obdobju smo vzorce ME štirikrat analizirali: v času 0 (pred samo izvedbo testiranja) in nato po 30, 60 in 90 dneh. Rezultate dobljene z metodo DPPH in HPLC smo nato med seboj primerjali.

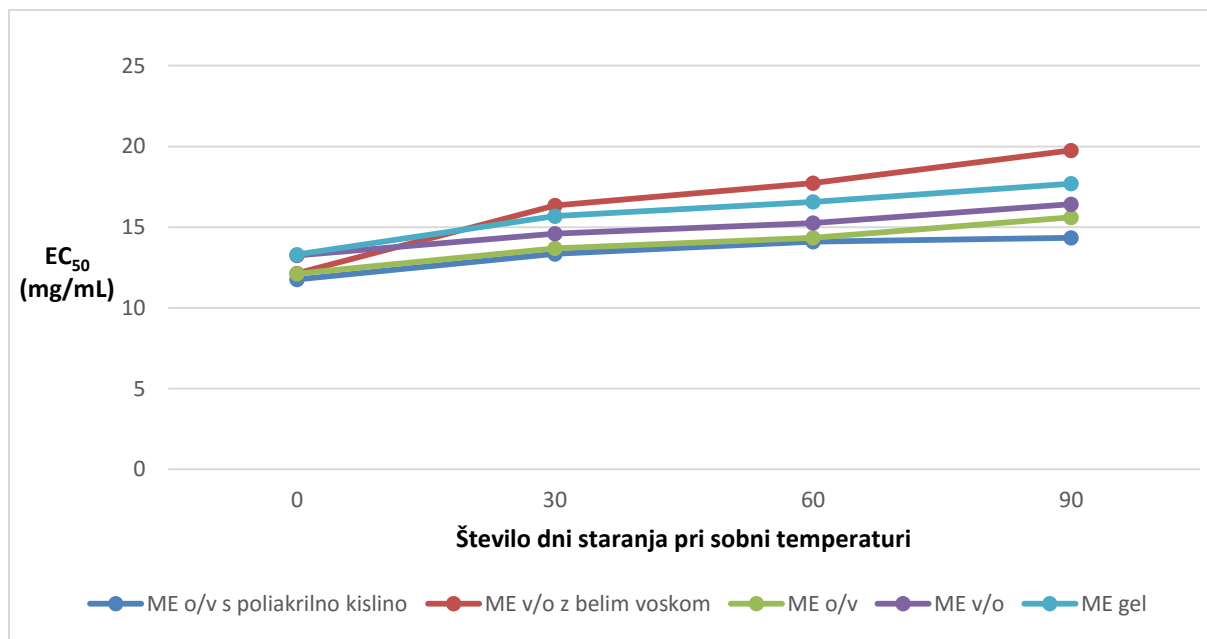
Vzorce smo hranili zaprte v steklenih vsebnikih, zato ni prišlo do zmanjšanja mase zaradi izhlapevanja vode.

Na enak način smo z metodo DPPH analizirali tudi slepe vzorce. Rezultati so pokazali, da formulacije same brez vgrajenega RSV ne izkazujejo antioksidativne učinkovitosti (rezultate teh meritev ne navajamo).

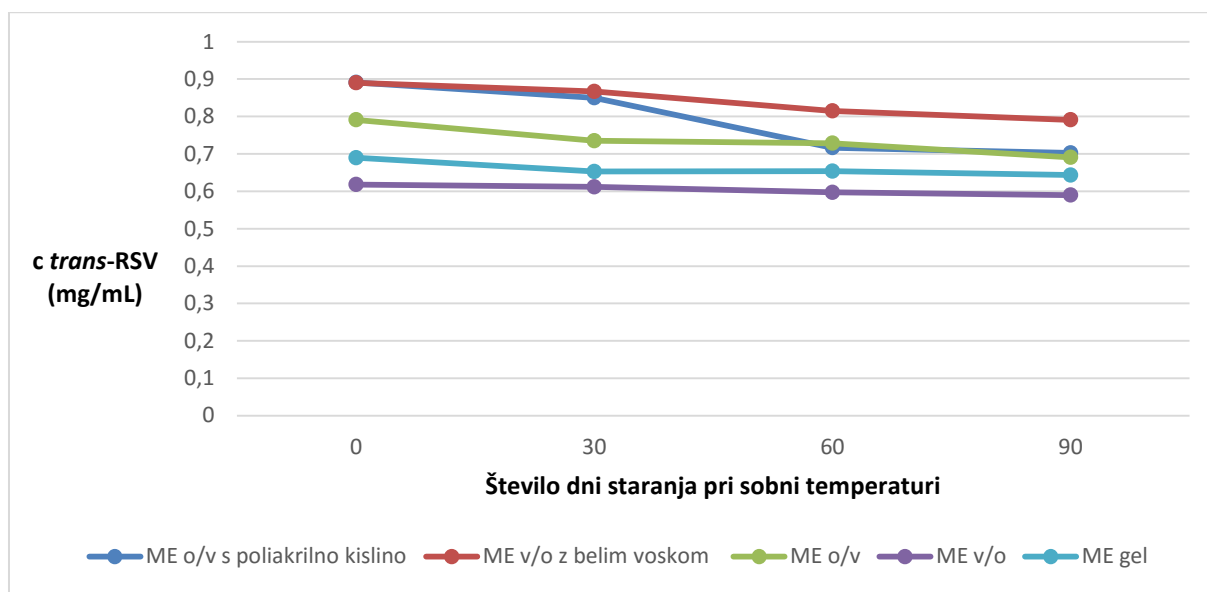
Rezultati

V prilogi 3 so v Preglednicah XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI predstavljeni rezultati staranja vzorcev pri sobni temperaturi, ki smo jih zaradi boljše preglednosti združili in predstavili v obliki grafov na slikah 12 in 13.

Slika 12 prikazuje primerjavo dobljenih vrednosti EC_{50} , slika 13 pa koncentracije *trans*-RSV v različnih formulacijah po določenem času staranja pri sobni temperaturi.



Slika 12: Primerjava vrednosti EC_{50} različnih formulacij po določenem času staranja pri sobni temperaturi.



Slika 13: Primerjava vsebnosti *trans*-RSV različnih formulacij po določenem času staranja pri sobni temperaturi.

Rezultati testiranja pred začetkom staranja (v času 0)

Tudi v tem primeru, bi teoretično morala biti koncentracija *trans*-RSV v vseh formulacijah pri prvem testiranju približno 1 mg/mL. Najvišjo koncentracijo *trans*-RSV je imela ME o/v s poliakrilno kislino (0,99 mg/mL), sledile so ji ME v/o z belim voskom (0,89 mg/mL), ME o/v (0,69 mg/mL), ME gel (0,69 mg/mL) in ME v/o (0,62 mg/mL). Pri ME v/o z belim voskom in ME o/v s poliakrilno kislino moramo upoštevati možen zaostanek RSV zaradi filtracije in

ultracentrifugiranja. Določen delež *trans*-RSV je tako lahko ostal ujet na samem filtru, pri ME v/o z belim voskom pa poleg tega tudi v usedlini neraztopljenega belega voska na dnu ultracentrifugirke.

Ponovno lahko predpostavimo, da je vzrok za nižje koncentracije *trans*-RSV že pred izvedbo testiranja v časovnem zamiku med izdelavo formulacij in izvedbo HPLC analize. Glede na to, da so vrednosti $EC_{50} \pm SD$ vseh petih ME pri prvem testiranju primerljive (v koncentracijskem območju 10-15 mg/mL) predvidevamo, da je določen delež *trans*-RSV v tem času izomeriziral v *cis*-RSV, ki še vedno izkazuje določeno antioksidativno aktivnost. Viskoznost sistema je tudi v tem primeru imela večji vpliv na zaščito *trans*-RSV pred izomerizacijo, v primerjavi z lipofilnostjo zunanje faze ME.

Rezultati staranja pri sobni temperaturi po 90 dneh

Po 90 dneh se koncentracija *trans*-RSV pri ME v/o zniža za 5 %, pri ME gelu za 7 %, pri ME v/o z belim voskom za 11 %, pri ME o/v za 13 %, pri ME o/v s poliakrilno kislino pa kar za 29 %. Glede na to, da so vrednosti $EC_{50} \pm SD$ vseh petih ME tudi po 90 dneh staranja ostale približno enake (v koncentracijskem območju 10-15 mg/mL), lahko sklepamo na določeno antioksidativno aktivnost *cis*-RSV. Povprečne vrednosti meritev EC_{50} vseh štirih časovnih točk znašajo pri ME o/v s poliakrilno kislino 13,4 mg/mL, pri ME o/v 13,9 mg/mL, pri ME v/o 14,9 mg/mL, pri ME gelu 15,8 mg/mL. Najvišje povprečje vrednosti EC_{50} smo sicer ponovno izmerili pri ME v/o z belim voskom (16,49 mg/mL), vendar pa moramo upoštevati možnost zaostanka RSV neraztopljenem v belem vosku, ki predstavlja usedlino na dnu centrifugirke.

S tem testiranjem smo ugotovili, da formulacije tudi v daljšem časovnem obdobju shranjevanja pri sobni temperaturi v temnih zaprtih vsebnikih ohranjajo konstantno antioksidativno učinkovitost. Kljub določenemu deležu izomerizacije *trans*-RSV v manj stabilne produkte so vrednosti EC_{50} vseh formulacij ostale približno enake.

5 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo uspeli pripraviti 5 različnih tipov mikroemulzij in vanje vgraditi aktivno sestavino *trans*-RSV. Preverjali smo, kako UV sevanje, povišana temperatura in sama formulacija vplivajo na stabilnost *trans*-RSV in s tem na antioksidativno učinkovitost formulacije. Koncentracijo prisotnega *trans*-RSV smo določali s HPLC metodo, antioksidativno učinkovitost formulacij pa s pomočjo redukcije DPPH radikala. Pri tem smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Zaradi slabe vodotopnosti *trans*-RSV smo pričakovali boljše rezultate (nižje vrednosti $EC_{50} \pm SD$, višje koncentracije *trans*-RSV) ME z zunanjo oljno fazo. Opazili pa smo, da je bolj kot lipofilnost sistema imela pomembno vlogo viskoznost ME. Učinkovitejšo zaščito pred izomerizacijo *trans*-RSV so omogočale formulacije ME v/o z belim voskom, ME v/o s poliakrilno kislino in ME gel v primerjavi z običajnimi manj viskozni ME v/o in o/v.
- Pri shranjevanju pri sobni temperaturi so, tudi po daljšem (90 dnevnem) staranju, formulacije ohranile najvišji delež vgrajenega *trans*-RSV. Če bi izdelek torej hranili v temnem zaprtem steklenem vsebniku, bi tudi v daljšem časovnem obdobju ostal enako učinkovit.
- Zaradi termolabilnosti *trans*-RSV smo z daljšanjem staranja pri povišani temperaturi (40 °C) pričakovali dvig vrednosti $EC_{50} \pm SD$. Ugotovili smo, da formulacije kljub izomerizaciji določenega deleža *trans*-resveratrola ohranjajo konstantno antioksidativno učinkovitost.
- Na stabilnost *trans*-RSV najbolj vpliva UV sevanje. Že po enem dnevu obsevanja z UVA svetlobo je koncentracija *trans*-RSV bistveno upadla, po 10 dneh pa je upadla tudi antioksidativna učinkovitost formulacij. Če izdelek torej nanesemo na kožo, bo že po krajši izpostavljenosti soncu večina vgrajenega *trans*-RSV izomerizirala v manj učinkovito obliko *cis*-RSV. Vgrajeni antioksidant tako s časom ne bo več sposoben opravljati svoje funkcije tako v izdelku kot na koži. Če bi želeli ohraniti antioksidativno učinkovitost tudi po daljši izpostavljenosti soncu, bi morali v formulacije dodatno vgraditi UV filtre ali antioksidante, ki bi vgrajeni *trans*-RSV zaščitili pred izomerizacijo.

- Koncentracija *trans*-RSV je že po enem dnevu obsevanja z UVA svetlobo močno upadla. Prvi dan bi bilo tako smiselno vzorčenje za HPLC analizo vsako uro, s čimer bi ugotovili kinetiko pretvorbe *trans*-RSV v *cis*-RSV.
- Ohranjanje konstantnih vrednosti antioksidativne učinkovitost, kljub upadu koncentracije *trans*-RSV, nakazuje na določeno antioksidativno aktivnost izomera *cis*-RSV. Rezultate testiranj vpliva obsevanja, staranja pri povišani in sobni temperaturi bi lahko izboljšali s hkratnim določanjem koncentracije prisotnega *cis*-RSV s HPLC metodo.
- Zaradi netopnosti ME v/o z belim voskom in slabše topnosti ME o/v s poliakrilno kislino v metanolu smo morali pred vsako izvedbo analiz z DPPH in HPLC metodo vpeljati dodatne postopke centrifugiranja in filtriranja vzorcev. Določen delež *trans*-RSV je tako lahko ostal ujet na filtru ali neraztopljen v usedlini belega voska po centrifugiranju. Zaostanku *trans*-RSV in s tem eksperimentalni napaki bi se lahko izognili z uporabo primernejšega topila, v katerem bi bili tudi ME v/o z belim voskom in ME o/v s poliakrilno kislino popolnoma topni.

6 VIRI IN LITERATURA

1. Poljšak B: Skin aging, free radicals and antioxidants, Nova science, New York, 2012: 1-6.
2. Farage M.A, Miller K.W, Elsner P: Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review, International journal of cosmetic science 2008; 30:87-95.
3. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2005; 242-274.
4. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2005; 138-198.
5. Kristl J: Koža-zgradba in dogajanja v njej, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo
(http://studentski.net/gradivo/ulj_ffa_kz1_kil_sno_koza_03_zgradba_in_dogajanja_v_njej?r=1) ; dostop: 10.8.2016.
6. <http://emedicine.medscape.com/article/1294744-overview#a2>; dostop: 1.8.2016.
7. <http://www.merckmanuals.com/home/skin-disorders/biology-of-the-skin/structure-and-function-of-the-skin>; dostop: 5.8.2016.
8. Gioia F, Celleno L: The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin. Skin research and technology 2002; 8: 178-186.
9. Freinkel R.K, Woodley D. T, The biology of the skin, Parthenon Publishing, London, 2001: 19-39.
10. <https://www.aad.org/public/kids/skin/the-layers-of-your-skin>, dostop: 9.8.2016.
11. Quan T, Fisher G. J: Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging, Gerontology. 2015; 61(5): 427-434.
12. Chaudiere J, Ferrari-Iliou: Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms, Food and Chemical Toxicology. 1999; 37: 949-962.
13. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres. Farmaceutski vestnik 2015; 66: 127-132.
14. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2005; 77-100.
15. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2005; 119-137.
16. Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R: Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention, University of Ljubljana, Faculty of Health Studies and

- Faculty of Medicine (<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/930164/>) ; dostop: 10.8.2016.
17. Funan H: Melanocytes and Melanin Pigmentation, *J. Soc. Cosmetic Chemists*. 1968; 19: 565-580.
 18. Ichihashi M, Ando H, Yoshida M, Niki Y, Matsui M: Photoaging of the skin, *JAAM* (<http://www.anti-aging.gr.jp/english/pdf/2009/6-8.pdf>) ; dostop: 10.8.2016.
 19. Resveratrol monograph. *Altern Med Review* 2010; 15 (2): 152-158.
 20. Bonda C, Zhang J, Pavlovic A: The Photostability and Photostabilization of trans-Resveratrol, *Cosmetics & Toiletries magazine*, 2011; 126: 652-660.
 21. Janeš D, Kočevar Glavač N: Sodobna kozmetika, 1, Širimo dobro besedo, Velenje, 2015: 246-252.
 22. Ndiaye M, Philippe C, Mukhtar H, Ahmad N: The Grape Antioxidant Resveratrol for Skin Disorders: Promise, Prospects, and Challenges, *National Institutes of Health*, 2011; 508(2): 164-170.
 23. Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J: Samo(mikro)emulgirajoči sistemi – alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin, *Farmacevtski vestnik*, 2008; 59: 263-268.
 24. Jurkin T, Gotić M: Uvod u mikroemulzije, *Kem. Ind*, 2013; 62 (11-12): 389-399.
 25. Jurkovič P, Gašperlin M: Mikroemulzije za dermalno dostavo učinkovin, *Farmacevtski vestnik*, 2004; 55: 565-571.
 26. Rozman B, Gosenca M, Falson F, Gašperlin M: The influence of microemulsion structure on their skin irritation and phototoxicity potential, *International Journal of Pharmaceutics*, 2016; 499: 228-235.
 27. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C: Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2010; 14 (4): 840-860.
 28. Molyneux P: The use of stabile free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol* 2004; 26 (2): 211-219.
 29. Kedare S. B, Singh R.P: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol* 2011; 48 (4): 412-422.
 30. Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M: DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained from Some Medicinal Plants. *Biol. Pharm. Bull.* 2001; 24 (10): 1202-1205.

31. Sharma O. P, Bhat T.K: DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry 2009; 113: 1202-1205.
32. https://www.ewg.org/skindeep/ingredient/703206/ISOPROPYL_MYRISTATE/, dostop: 5.8.2016.
33. http://studentski.net/gradivo/ulj_ffa_fa1_ft1_sno_tekoce_in_poltrde_farmacevtske_oblike_01?r=1, dostop: 20.8.2016.
34. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p1504?lang=en®ion=SI&gclid=CjwKEAjwrcC9BRC2v5rjyvSbhWASJACKkjDz0r-hh0LX8ntsCcMP7ICq-ihECd4In_RjS25hedn3xRoCphjw_wcB, dostop: 7.8.2016.
35. <https://www.ulprospector.com/en/na/PersonalCare/Detail/134/84320/Tween-40>; dostop: 13.8.2016.
36. <http://www.petercremerna.com/products/1070702234>; dostop: 19.8.2016.
37. Ash M, Ash I: Handbook of Green Chemicals, 2, Synapse Information Resources, Endincott, 2004: 275.
38. <http://www.herbana.si/voski-trdila-mascobe-in-derivati/297-cebelji-vosek-beli.html>; dostop: 12.8.2016.
39. <https://www.lubrizol.com/LifeScience/Products/Carbopol.html>; dostop: 15.8.2016.
40. Cvetkovic Z. S, Nikolic V. D, Savic I. M, Savic-Gajic I. M, Nikolic L. B: Development and validation of an RP-HPLC method for quantification of *trans*-resveratrol in the plant extracts, Faculty of technology, University of Niš (<http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0367-598X/2015/0367-598X1500004C.pdf>); dostop: 10.8.2016.
41. Pečar S: Radikali v našem okolju, Strokovni članek, Kemija v šoli in družbi, 2006: 18/3: 13-19.

7 PRILOGE

7.1 PRILOGA 1: Rezultati obsevanja z UVA lučko

Preglednica XII: Rezultati obsevanja za ME o/v s poliakrilno kislino.

Število dni	K (kvocient izgube vode)	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	1	15,1 ± 0,50	0,506838*
1	0,74	15,48 ± 0,79	0,201660*
2	0,61	18,53 ± 1,30	0,153418*
3	0,56	17,78 ± 2,60	0,113777*
7	0,53	20,53 ± 2,00	0,04839*
10	0,51	23,12 ± 2,19	0,01669*
13	0,51	24,77 ± 1,97	0,00712*
16	0,51	27,14 ± 1,30	0,003162*
20	0,51	35,56 ± 1,24	0,000813*
28	0,51	38,98 ± 1,64	-

Vzorci označeni z * smo pred HPLC analizo filtrirali.

Preglednica XIII: Rezultati obsevanja za ME v/o z belim voskom.

Število dni	K (kvocient izgube vode)	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	1	12,13 ± 1,28	0,798848**
1	0,97	16,35 ± 1,81	0,309827**
2	0,959	16,46 ± 1,84	0,317463**
3	0,95	19,80 ± 0,95	0,245503**
7	0,93	15,99 ± 1,66	0,160424**
10	0,924	20,56 ± 0,84	0,099025**
13	0,924	40,84 ± 3,29	0,071018**
16	0,924	49,80 ± 2,23	0,045631**
20	0,924	-	0,027975**
28	0,924	58,5 ± 6,25	0,013552**

Vzorci označeni z ** smo pred HPLC analizo ultracentrifugirali in filtrirali.

Preglednica XIV: Rezultati obsevanja za ME o/v.

Število dni	K (kvocient izgube vode)	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	1	14,32 ± 0,55	0,690856

1	0,605	16,14 ± 2,09	0,312925
2	0,558	15,67 ± 2,61	0,311688
3	0,53	18,62 ± 1,60	0,281478
7	0,51	24,15 ± 2,76	0,141381
10	0,4886	29,27 ± 1,11	0,098298
13	0,4886	30,67 ± 1,81	0,050623
16	0,4886	34,51 ± 0,81	0,02976
20	0,4886	47,46 ± 1,22	0,009511
28	0,4886	87,12 ± 1,18	0,002823

Preglednica XV: Rezultati obsevanja za ME v/o.

Število dni	K (kvocient izgube vode)	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	1	13,45 ± 1,66	0,483781
1	0,957	17,68 ± 0,93	0,118099
2	0,94	17,10 ± 0,82	0,109747
3	0,93	14,82 ± 2,00	0,102196
7	0,91	25,90 ± 0,77	0,044754
10	0,90	27,81 ± 1,11	0,027481
13	0,90	23,69 ± 0,78	0,0146925
16	0,90	37,14 ± 0,63	0,004645
20	0,90	76,66 ± 0,40	0,0013509
28	0,90	122,71 ± 0,98	0

Preglednica XVI: Rezultati obsevanja za ME gel.

Število dni	K (kvocient izgube vode)	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	1	13,25 ± 0,43	0,689639
1	0,66	11,77 ± 2,17	0,28539
2	0,64	11,53 ± 2,13	0,20620
3	0,64	14,18 ± 2,59	0,20722
7	0,63	14,39 ± 1,75	0,19058
10	0,619	16,57 ± 1,81	0,16189
13	0,619	16,46 ± 1,66	0,10065
16	0,619	15,74 ± 1,51	0,06825
20	0,619	25,82 ± 0,81	0,00903
28	0,619	40,57 ± 0,63	0,00894

7.2 PRILOGA 2: Rezultati staranja pri povišani temperaturi

Preglednica XVII: Rezultati staranja pri povišani T za ME o/v s poliakrilno kislino.

Število dni	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	11,76 ± 0,70	0,850057*
8	14,34 ± 0,43	0,765681*
14	14,87 ± 0,56	0,799492*
28	13,66 ± 0,35	0,758078*

Vzorci označeni z * smo pred HPLC analizo filtrirali.

Preglednica XVIII: Rezultati staranja pri povišani T za ME gel.

Število dni	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	11,96 ± 0,60	0,767921
8	14,99 ± 0,58	0,652791
14	15,78 ± 0,82	0,633743
28	15,68 ± 0,73	0,537554

Preglednica XIX: Rezultati staranja pri povišani T za ME v/o.

Število dni	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	15,26 ± 0,77	0,597061
8	17,96 ± 0,53	0,596492
14	16,86 ± 0,81	0,603205
28	15,42 ± 0,94	0,515087

Preglednica XX: Rezultati staranja pri povišani T za ME o/v.

Število dni	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	12,11 ± 0,56	0,734447
8	14,34 ± 0,74	0,636283
14	15,39 ± 0,59	0,676334
28	14,02 ± 0,56	0,592123

Preglednica XXI: Rezultati staranja pri povišani T za ME v/o z belim voskom.

Število dni	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	18,805 ± 5,68	0,890275**
8	17,97 ± 3,18	0,861834**
14	19,81 ± 3,51	0,841851**
28	17,73 ± 4,47	0,748725**

Vzorci označeni z ** smo pred HPLC analizo ultracentrifugirali in filtrirali.

7.3 PRILOGA 3: Rezultati staranja pri sobni temperaturi

Preglednica XXII: Rezultati staranja pri sobni T za ME o/v s poliakrilno kislino.

Število dni	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	11,76 ± 0,70	0,991124*
30	13,34 ± 0,61	0,850057*
60	14,1 ± 0,56	0,716744*
90	14,34 ± 0,43	0,702569*

Vzorci označene z * smo pred HPLC analizo filtrirali.

Preglednica XXIII: Rezultati staranja pri sobni T za ME gel.

Število dni	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	13,3 ± 0,63	0,689639
30	15,68 ± 0,73	0,652791
60	16,57 ± 1,81	0,653801
90	17,7 ± 0,60	0,643256

Preglednica XXIV: Rezultati staranja pri sobni T za ME v/o.

Število dni	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	13,25 ± 0,43	0,618235
30	14,6 ± 0,82	0,611713
60	15,26 ± 0,77	0,597061
90	16,42 ± 0,60	0,589946

Preglednica XXV: Rezultati staranja pri sobni T za ME o/v.

Število dni	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	12,11 ± 0,56	0,791258
30	13,69 ± 1,11	0,735096
60	14,34 ± 0,74	0,728699
90	15,6 ± 0,57	0,690856

Preglednica XXVI: Rezultati staranja pri sobni T za ME v/o z belim voskom.

Število dni	EC ₅₀ ± SD (mg/mL)	c <i>trans</i> -RSV (mg/mL)
0	12,13 ± 1,28	0,890275**
30	16,35 ± 1,81	0,866882**
60	17,73 ± 4,47	0,814989**
90	19,75 ± 1,47	0,791258**

Vzorci označene z ** smo pred HPLC analizo ultracentrifugirali in filtrirali.