

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA PIŠEK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA PIŠEK

**VREDNOTENJE STABILNOSTI IN ANTIOKSIDATIVNE  
UČINKOVITOSTI RAZLIČNIH KOLOIDNIH SISTEMOV KOT  
NOSILCEV ZA ETERIČNO OLJE POPROVE METE**

**EVALUATION OF STABILITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF  
DIFFERENT COLLOIDAL SYSTEMS AS CARRIERS FOR MENTHA  
PIPERITA ESSENTIAL OIL**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom doc. dr. Alenke Zvonar Pobirk, mag. farm.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Alenki Zvonar Pobirk, mag. farm. za pomoč, usmerjanje in strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Obenem se zahvaljujem tudi tehničnima sodelavkama na Katedri za farmacevtsko tehnologijo za pomoč pri opravljanju eksperimentalnega dela ter mag. Blažu Grilcu, za pomoč pri optimizaciji meritev na UV-VIS spektrofotometru. Zahvaljujem se tudi svoji družini, prijateljem in Marku za vso podporo v času študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Alenke Zvonar Pobirk, mag. farm.

Špela Pišek

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl

Član diplomske komisije: doc. dr. Tihomir Tomašič

# VSEBINA

POVZETEK.....	III
SEZNAM OKRAJŠAV .....	V
1 UVOD .....	1
1.1 ETERIČNA OLJA (EO) .....	1
1.2 POPROVA META.....	4
1.2.1 ETERIČNO OLJE POPROVE METE.....	4
1.3 VGRAJEVANJE ETERIČNIH OLJ V KOLOIDNE NOSILCE.....	7
1.3.1 NANOSTRUKTURIRANI LIPIDNI NOSILCI (NLC) .....	8
1.3.2 LIPOSOMI.....	9
1.3.3 MICELARNE RAZTOPINE IN NANOEMULZIJE.....	11
1.4 <i>IN VITRO</i> METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI... 12	
1.4.1 DIFENILPIKRILHIDRAZILNA (DPPH) METODA .....	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE.....	18
3.1 MATERIALI.....	18
3.1.1 SESTAVINE .....	18
3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR .....	21
3.2 METODE .....	22
3.2.1 IZDELAVA NLC.....	22
3.2.2 IZDELAVA LIPOSOMOV .....	23
3.2.3 IZDELAVA MICELARNE RAZTOPINE / NANOEMULZIJE.....	23
3.2.4 VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI KOLOIDNIH SISTEMOV .....	24
3.2.5 ANALIZA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI EO POPROVE METE Z DPPH METODO.....	25
3.2.6 UČINKOVITOST VGRAJEVANJA NLC.....	29
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	30
4.1 IZDELAVA KOLOIDNIH SISTEMOV .....	30
4.1.1 IZDELAVA NLC.....	30
4.1.2 IZDELAVA LIPOSOMOV .....	33
4.1.3 IZDELAVA MICELARNE RAZTOPINE / NANOEMULZIJE.....	33
4.2 VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI KOLOIDNIH SISTEMOV .....	34

4.2.1	STABILNOST PRAZNIH KOLOIDNIH SISTEMOV .....	34
4.2.2	VPLIV VGRADNJE EO NA STABILNOST KOLOIDNIH SISTEMOV .....	36
4.3	DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z DPPH METODO .....	39
4.3.1	STABILNOST DPPH RADIKALA .....	39
4.3.2	ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST ETERIČNEGA OLJA POPROVE METE	40
4.3.3	AOU EO POPROVE METE V KOLOIDNIH SISTEMIH .....	41
5	SKLEPI .....	46
6	LITERATURA.....	48

## POVZETEK

Eterična olja (EO) zaradi številnih pozitivnih lastnosti uporabljamo v kozmetiki in farmaciji že vrsto let. Njihova pomembna lastnost je hlapnost, ki je ključnega pomena v aromaterapiji, v procesu vgradnje v kozmetične izdelke pa nas ta lastnost prisili v preišljeno izbiro sestavin in postopka izdelave, saj lahko vodi v večje izgube EO pri združevanju posameznih komponent pri povišani temperaturi. V izogib večjim izgubam EO v procesu izdelave je pomembno, da izberemo sestavine, ki imajo nizko tališče. Prav tako je smiselno izbrati nosilec za vgradnjo, ki omogoča podaljšano sproščanje učinkovine, da s tem zagotovimo dolgoročno učinkovitost izdelka.

EO, ki smo ga uporabili v diplomski nalogi, je EO poprove mete. Pripravki iz EO poprove mete delujejo protimikrobno, protialergeno, protitumorsko, imunomodulatorno, antiseptično in na podlagi najnovejših raziskav tudi antioksidativno.

Izdelali smo tri koloidne dostavne sisteme: micelarno raztopino/nanoemulzijo (MR/NE), liposome in nanostrukturirane lipidne nosilce (NLC) in proučevali, kateri izmed njih bi bil najbolj primeren za vgradnjo EO poprove mete koncentracij od 0,5 – 2%. Spremljali smo fizikalno stabilnost sistemov med enomesečnim shranjevanjem disperzij pri sobni temperaturi, in sicer smo vrednotili velikost dispergiranih kapljic/delcev in porazdelitev velikosti (merilo za slednjega je ti. polidisperzni indeks- PI) in zeta potencial (ZP). Nadalje nas je zanimalo, v kolikšni meri sistemi z EO izkazujejo antioksidativno delovanje, kar smo vrednotili z DPPH metodo. V obdobju 1 meseca smo vsak dan odpirali vsebnike, v katerih smo shranjevali disperzije koloidnih sistemov in tako posnemali realno vsakdanjo uporabo kozmetičnih izdelkov. Med odpiranjem vsebnikov lahko namreč EO izhlapi in posledično se zmanjša AOU koloidnega sistema. V povezavi s tem nas je tudi zanimalo, ali NLC omogočajo podaljšano sproščanje EO v primerjavi z MR/NE in liposomi.

Pred izdelavo koloidnih nosilnih sistemov smo optimizirali recepturo za NLC-je tako, da smo kot lipid uporabili bodisi glicerol monostearat (GMS) bodisi trdo mast (ki ima nižje tališče od GMS), kot stabilizator pa fosfolipid Phospholipon 80 ali Phospholipon 80 H. Optimizirali smo tudi temperaturo izdelave, ki smo jo želeli čim bolj znižati, da ne bi prišlo do izgub EO pri vgradnji v koloidni dostavni sistem.

Rezultati raziskovalnega dela so pokazali, da je najbolj primeren lipid za izdelavo NLC-jev trda mast v kombinaciji s stabilizatorjem Phospholiponom 80 pri temperaturi 45 °C. S

stališča fizikalne stabilnosti so najbolj primerni koloidni nosilci za vgradnjo EO poprove mete liposomi, pri katerih so nastali najmanjši delci, katerih velikost se ni spreminjala v obdobju 4 tednov. Prav tako so bile vrednosti ZP najbolj optimalne pri liposomih, torej najbližje vrednosti  $|-30|$ , kar nakazuje na dobro elektrostatsko stabilizacijo.

Z vidika antioksidativne učinkovitosti (AOU) EO v koloidnih dostavnih sistemih kažejo najboljšo AOU liposomi z 2% vgrajenim EO in MR/NE z vgrajenim 1 in 2 % EO, medtem ko NLC-je ne moremo primerjati z navedenima koloidnima sistemoma zaradi spremembe pogojev meritev in slabše detekcije vzorca zaradi obarjanja delcev. Pričakovali smo sicer, da bodo najprimernejši nosilni sistem za vgradnjo EO NLC-ji, pri katerih tekoče lipidno jedro (v katerega želimo vgraditi EO) obdaja trdna lipidna ovojnica in sloj stabilizatorja. Posledično naj bi se iz NLC-jev EO sproščalo počasneje kot iz MR/NE in liposomov. Slednje bi se odražalo v večji jakosti vonja disperzije NLC po 1-mesečnem roku uporabe in tudi v dolgotrajnejši AOU tega sistema v primerjavi z MR/NE in liposomi. Vendarle moramo upoštevati, da smo pri NLC-jih imeli težave z detekcijo zaradi netopnosti lipida v topilu (metanolu), zato je bilo potrebno disperzijo pred meritvijo na UV/VIS spektrofotometru dodatno redčiti in zamenjati vrsto topila (etanol), kar je lahko zmanjšalo zanesljivost rezultatov. Če zaključimo, EO poprove mete vsekakor izkazuje antioksidativne lastnosti in bi ga bilo smiselno vgrajevati v KI za te namene. Priporočljivo bi bilo raziskati tudi druge možne nosilne sisteme za vgradnjo EO, da bi zagotovili boljše fizikalno stabilnost in podaljšano sproščanje EO.

Ključne besede: koloidni dostavni sistemi, eterično olje, poprova meta, DPPH

## SEZNAM OKRAJŠAV

AO	antioksidant
AOU	antioksidativna učinkovitost
DPPH	difenilpikrilhidrazil
DPPH•	difenilpikrilhidrazilni radikal
EC <sub>50</sub>	koncentracija antioksidanta, ki povzroči zmanjšanje začetne koncentracije DPPH za 50 %
EC <sub>20</sub>	koncentracija antioksidanta ki povzroči zmanjšanje začetne koncentracije DPPH za 20 %
EO	eterično olje
GMS	glicerol monostearat
KAS	kozmetično aktivna sestavina
KI	kozmetični izdelek
MR	micelarna raztopina
NE	nanoemulzija
ND	nanodelci
NLC	nanostrukturirani lipidni nosilci
OS	osnovna raztopina
PAS	površinsko aktivna snov
Ph 80	Phospholipon 80
Ph 80H	Phospholipon 80H
PI	polidisperzni indeks
SCCNFP	Znanstveni odbor za kozmetične in neživilske izdelke namenjene potrošnikom (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food products intended for Consumers)
SCCS	Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov (Scientific Committee on Consumer Safety)
ZP	zeta potencial



# 1 UVOD

## 1.1 ETERICNA OLJA (EO)

EO so aromatične, hlapne, visoko koncentrirane zmesi spojin, ki jih pridobivamo (ekstrahiramo) iz delov rastlin, kot so cvetovi, korenine, lubje, listi, semena, lupine, sadeži, les ali celotna rastlina (1). Že stoletja se uporabljajo v medicini, parfumeriji, kozmetiki in prehrambni industriji. Poznamo skoraj 3000 različnih EO, vendar jih je samo približno 300 komercialno pomembnih v industriji (2). Najpogosteje jih pridobivamo s postopkom destilacije z vodno paro ali z iztiskanjem. Hlapne spojine so v večini primerov v rastlinah prisotne v zelo nizkih koncentracijah, večinoma manj kot 1 % (2) (3).

### Sestava

Sestava EO je zelo kompleksna, vsebujejo lahko do nekaj sto različnih spojin. Po glavnih sestavinah jih delimo v dve skupini: *terpenska/terpenoidna* in *fenilpropanoidna*. Glavne sestavine terpenskih EO so najpogosteje monoterpeni (npr. limonen v EO limonovca) in seskviterpeni (npr.  $\alpha$ -humulen v EO cveta navadnega hmelja) (3). Monoterpeni imajo v svoji sestavi 10 ogljikovih atomov (2 izoprenski enoti) in predstavljajo kar 80 % celotne sestave EO (4). Terpeni in terpenoidi sestavljajo zelo veliko in raznovrstno skupino rastlinskih sekundarnih metabolitov, po strukturi so lahko aciklični, monociklični in biciklični, terpenoidi so lahko alkoholi, aldehidi, kisline, estri, ketoni, fenoli, epoksidi in ustrezni žveplovski analogi nekaterih omenjenih spojin. Manjšo skupino EO sestavljajo fenilpropanoidi, katerih pomembna predstavnika sta cimetni aldehyd, ki je glavna sestavina EO lubja pravega cimeta in evgenol, ki sestavlja glavnino EO iz cvetov dišečega klinčevca (1) (3).

Sestava EO navadno sezonsko zmerno variira, saj je odvisna od razmer rasti (sestave prsti, količine padavin, temperature) ter tudi od časa žetve rastline (3).

### Kakovost

Cilj postopka pridobivanja EO je, da dobimo EO najboljše kakovosti, saj je posledično tudi učinkovitost takšnih EO večja. Na kakovost EO lahko vplivajo različni dejavniki: razmere gojenja rastline (sestave prsti, količine padavin, temperature), uporaba zaščitnih sredstev, čas žetve, način destilacije in shranjevanje EO. Zaščitna sredstva (pesticidi in herbicidi), ki

se pogosto uporabljajo pri gojenju rastlin lahko prehajajo v EO, zato je priporočljivo ovreči uporabo le-teh. Pravilen čas žetve rastline zagotavlja optimalno sestavo EO in največji izplen le-tega. Pomembna je tudi pravilna izbira dela rastline, saj se sestava EO iz različnih delov rastline med seboj navadno zelo razlikuje, prav tako pa tudi njegova vsebnost. Destilacija predstavlja enega izmed najpomembnejših korakov pridobivanja EO, saj temperatura in trajanje destilacije ključno vplivata na kakovost. Zelo pomembno je tudi pravilno shranjevanje EO, ki so večinoma občutljiva na kisik in svetlobo, zato jih shranjujemo na hladnem ter v temnih, do vrha napolnjenih vsebnikih. Večje količine EO je priporočljivo dolgoročno shranjevati v inertni atmosferi – vsebnik lahko prepriamo z inertnim plinom, npr. z dušikom ali argonom, da odstranimo kisik (3).

### **Fizikalne lastnosti EO**

EO so pri sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju, izjemoma pa se iz njih lahko izločijo kristali spojin z višjim tališčem (kafra, mentol). Njihova glavna značilnost je, da so hlapna ter močnega vonja in okusa. Običajno imajo nižjo gostoto kot voda, razen določenih izjem (npr. EO dišečega klinčevca in cimeta). Dobro so topna v etanolu in lipofilnih topilih, v vodi pa so slabo topna (vendar dovolj, da dajejo blago aromo hidrolatom) (4) (5).

### **Varnost**

EO so naravnega izvora, pridobivamo jih iz rastlin, vendar to še ne pomeni, da so varna. Njihova toksičnost je odvisna od odmerka oziroma deleža odmerka, ki se vnese v naš organizem. EO, ki niso razredčena, lahko zaradi določenih strupenih in alergeni sestavin močno dražijo kožo in sluznice, zato jih moramo vedno uporabljati primerno razredčena. Toksični učinki, ki jih lahko povzročajo, so poleg draženja tudi fototoksičnost (pretirana občutljivost kože na sončno svetlobo), pulmotoksičnost (dražeče delujejo na dihala), nevrotoksičnost (dražeče delujejo na živčni sistem). Nekatera EO lahko vplivajo tudi na strjevanje krvi, raven glukoze v plazmi, delovanje imunskega sistema, izražajo teratogeno delovanje, zato je pred njihovo uporabo v rizičnih skupinah, kot so na primer otroci, nosečnice, doječe matere in težki bolniki, nujen posvet s strokovnjakom (zdravnik, farmacevt, aromaterapevt) (3).

Že leta 1999 je SCCNFP (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products) objavil 26 alergeni dišav, ki morajo biti navedene na embalaži KI, če je njihova

koncentracija višja od dovoljene. Ta seznam je kasneje SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) ponovno izpostavil na podlagi številnih raziskav. Dišave, za katere so dokazali, da lahko sprožijo preobčutljivostne reakcije, so navedene v Uredbi (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih. Njihova prisotnost mora biti posebej označena na seznamu sestavin KI, če koncentracija posamezne dišave presega 0,001 % v izdelkih, ki ostanejo na koži ali 0,01 % v izdelkih, ki se s kože sperejo. To velja ne glede na to, ali so sinteznega izvora ali pa so prisotne v EO (6) (7).

### Uporaba v KI

EO pogosto vgrajujemo v KI zaradi protimikrobnega (mikrobiološka zaščita KI), antioksidativnega (predvsem v izdelkih proti staranju), protivnetnega ter pomirjujočega delovanja. Zaradi njihovega prijetnega vonja so tudi pogoste sestavine parfumov. V izdelkih za lase prispevajo k sijaju in regeneraciji las, lahko delujejo tudi proti prhljaju (npr. EO čajne mirte), v kremah pa vlažijo in izboljšajo elastičnost kože. Nekatera EO lahko vplivajo tudi na izboljšanje stanja aknaste kože (EO bazilike, koprive, čajne mirte) in ustnega zadaha (EO poprove mete, čajne mirte). V aromaterapiji se pogosto uporabljajo za pripravo kopeli in masažnih olj, saj blagodejno delujejo na počutje. EO poprove mete in evkaliptusa delujeta hladilno in puščata na koži občutek svežine (3) (8) (9). Nekaj najpogostejših učinkov EO je predstavljenih v preglednici I.

Preglednica I: Pregled najpogostejših učinkov posameznih EO (povzeto po (3) (9) (10) (11))

UČINEK	IME RASTLINE, IZ KATERE PRIDOBIVAMO EO
protimikrobno delovanje	poprova meta, limonska trava, nageljnovе žbice, čajna mirta, timijan, geranija, majaron, palisander, žajbelj, pačuli, vanilija, ylang-ylang, melisa, bazilika, sivka, črna kumina
antioksidativno delovanje	nageljnovе žbice, cimet, mušklatni orešček, bazilika, origano, timijan, rožmarin, poprova meta, črna kumina
pomirjujoče delovanje	limonska trava, poprova meta, kamilica
proti aknam	bazilika, čajna mirta, kopriva
proti prhljaju	čajna mirta, bergamotka, sivka, rožmarin,

	timijan
izboljšša ustni zadah	poprova meta, čajna mirta
protivnetno delovanje	koriander, črna kumina, čajna mirta, kamilica
hladilni učinek	poprova meta, evkaliptus
sijaj in regeneracija las	rožmarin, kamilica

## 1.2 POPROVA META

Poprova meta (*Mentha x piperita*), medicinsko zelo pomembna rastlina, spada v družino ustnatic (*lat. Lamiaceae*) in je po vsej verjetnosti križanec med klasasto meto (*M. spicata*) in vodno meto (*M. aquatic*). V antičnih časih so jo gojili že Egipčani, danes pa je najbolj razširjena v Evropi, Severni Ameriki in Severni Afriki. Spada med trajnice, visoka pa je med 50 in 90 cm. Kot lahko vidimo na sliki 1 je steblo vijoličasto, včasih tudi sivkaste barve. Ima temno- ali svetlozelene liste. Cvetovi so vijoličaste ali roza barve.



Slika 1: Poprova meta (71)

Rastlina raste na sončni legi in kisljih tleh, vendar uspeva tudi na glinastih tleh (12). EO poprove mete pridobivajo iz svežih listov rastline s postopkom destilacije z vodno paro (13).

### 1.2.1 ETERIČNO OLJE POPROVE METE

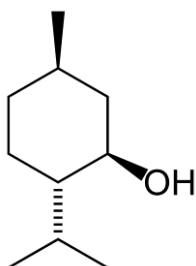
EO poprove mete se že vrsto let uporablja v kozmetiki, parfumeriji, farmaciji in za medicinske namene, saj deluje protimikrobno, protialergeno, protivnetno, protibolečinsko, protivirusno, protitumorsko, antiseptično, imunomodulatorno ter antioksidativno (13). Njegova glavna sestavina je mentol. To je hlapna spojina, zato daje učinek hlajenja. Uporablja se v zobnih pastah, izdelkih za izboljšanje ustnega zadaha, balzamih za ustnice, sirupih proti kašlju, parfumih, žvečilnih gumijih, bonbonih, čajih in v tobačni industriji (12).

Če EO poprove mete v zelo majhnih količinah nanesemo na čelo in sence, pomaga tudi pri glavobolu (11). Prav tako naj bi pomagalo pri lajšanju prebavnih težav in bolečinah v času menstrualnega cikla (13) (14). V letih 2013 in 2014 so znanstveniki objavili rezultate raziskav, ki kažejo, da se je pri bolnikih, ki so peroralno jemali kapsule z EO poprove mete, zmanjšala pojavnost sindroma razdražljivega črevesa. Dnevni odmerki EO, ki so jih

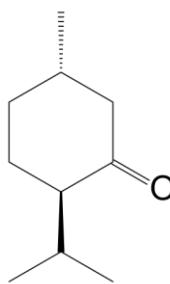
uporabili, so bili med 0,6-1,2 mL, kar so testiranci zaužili v treh enkratnih odmerkih v obdobju 28 dni. Ugotovili so, da je omenjeno EO v primerjavi s placebo značilno zmanjšalo bolečino v trebuhu, občutek napetosti, normaliziralo je izločanje blata in zmanjšalo napenjanje ter izločanje vetrov (15) (16).

### Sestava

Glavni sestavini EO poprove mete sta mentol (30-55 %) in menton (14-32 %), njuni kemijski strukturi sta prikazani na slikah 2 in 3.



Slika 2: Kemijska struktura mentola (72)



Slika 3: Kemijska struktura mentona (73)

Ostali monoterpeni, ki so prisotni, so: limonen (1-5%), cineol (3.5-14 %), mentofuran (1-9 %), izomenton (1.5-10 %), mentil acetat (2.8-10 %), pulegon (do 4%) in carvon (do 1%). (13) Mentol je eden najpogosteje uporabljenih korigensov okusa. Kemijsko je ciklični monoterpenoid in tvori velike igličaste kristale, ki so zelo težko topni v vodi (0,04 g v 100 mL). Poznamo več izomerov mentola. Naravni (-) mentol tradicionalno pridobivamo s kristalizacijo iz močno ohlajenega EO njivske mete. Sintezno pridobljeni mentol je lahko (-) mentol ali ( $\pm$ ) mentol. (+) Mentol uporabljamo redkeje, saj je njegov vonj manj prijeten (17).

### Protibakterijske lastnosti

EO poprove mete (natančneje mentol) izkazuje protimikrobno delovanje proti določenim po Gramu pozitivnim (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) in po Gramu negativnim (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) bakterijam. Singh in sodelavci so preverjali njegovo protibakterijsko učinkovitost z gojenjem kultur na agarju in potrdili protimikrobno delovanje za navedene seve bakterij. Minimalna zaviralna koncentracija 20, tj. koncentracija, pri kateri je zrastle največ 20 % bakterij, je variirala med 0,4 % in 0,7 % (v/v). Določili so tudi minimalno bakteriostatično koncentracijo, tj. najnižja koncentracija

EO, pri kateri ne zraste noben mikroorganizem. Ta je znašala med 0,6-0,8 % (v/v). Bakterije so pri 37°C inkubirali 18 ur (12).

V splošnem visoka lipofilnost sestavin EO omogoča tesne interakcije z lipidnimi celičnimi membranami. Vključevanje terpenov v membrane mikrobnih celic vpliva na fluidnost zunanje membrane, kot tudi na mitohondrijsko membrano, kar vodi v smrt patogena. Presnovki EO se lahko vežejo tudi na specifične proteine na celični membrani mikroba in le-te zavirajo (18). V večini študij so proučevali dermalno uporabo EO oz. so vrednotili njihovo delovanje po inhaliranju, medtem ko so informacije o peroralnem vnosu redke zaradi potencialne toksičnosti EO (19).

V kozmetiki so protibakterijske lastnosti pomembne za zaščito KI pred mikroorganizmi. Kozmetični izdelki, kot so npr. kreme, pene, losjoni in geli za tuširanje, vsebujejo v svoji strukturi tudi precejšen delež vode, ki daje ugodne pogoje za rast mikroorganizmov. EO lahko zaradi svojega protibakterijskega delovanja delno nadomesti konzervanse, ki jih lahko zato dodamo v KI v manjši koncentraciji. Kljub temu moramo upoštevati, da je uporaba EO priporočljiva oz. varna le v nižjih koncentracijah, saj v nasprotnem primeru lahko delujejo dražeče v stiku s kožo. To še zlasti velja za njihove oksidacijske produkte, ki lahko nastajajo v stiku EO s svetlobo ali toploto in izkazujejo visoko alergenoost (18).

### **Antioksidativne lastnosti**

V zadnjih letih je bilo objavljenih več člankov, ki navajajo antioksidativne lastnosti EO poprove mete. Riachi in sodelavci so raziskovali, katere sestavine v EO izkazujejo antioksidativne lastnosti. Domnevajo, da so to terpeni (natančneje monoterpeni) – mentol in menton, fenolne kisline (rožmarinska in kafeinska kislina), flavoni (luteolin) ali flavanoni. Zaradi kompleksne kemijske strukture sestavin v EO ne vemo natančno, katera spojina izkazuje antioksidativne lastnosti, saj pogosto spojine delujejo sinergistično.

V splošnem je pri proučevanju antioksidativnih lastnosti potrebno omeniti tudi nekaj pomembnih dejstev: (i) AOU je odvisna od koncentracije EO, (ii) AOU se lahko spremeni, ko EO dodamo mešanici drugih sestavin, (iii) tudi različne tehnike ekstrakcije EO vplivajo na sestavo in posledično AOU eteričnega olja (14).

Z vgrajevanjem spojin z AOU v KI želimo zaščititi kožo pred oksidacijskimi procesi, seveda pa želimo zaščititi tudi oksidativno občutljive spojine v samem izdelku. Za doseg želenih učinkov moramo uporabiti zelo učinkovite AO, žal pa so le-ti zelo reaktivni in posledično nestabilni, kar pri vgrajevanju v KI predstavlja velik problem. Pri izbiri AO je

potrebno vedeti, katere so spojine, ki jih želimo zaščititi, kakšne vrste je izdelek (V/O ali O/V emulzija, gel, vodna raztopina), kakšna je stabilnost AO v izbrani obliki ter kako se koža odzove na izbrani AO (20).

### **1.3 VGRAJEVANJE ETERIČNIH OLJ V KOLOIDNE NOSILCE**

Glavna razloga za vgrajevanje EO v koloidne nosilce sta slaba stabilnost EO (občutljivost na kisik, svetlobo, temperaturo in hlapnost) in nizka topnost v vodi (4).

Naš cilj je, da EO med procesom izdelave izhlapi v najmanjšem možnem obsegu ter da po sami izdelavi v KI ostane čim dlje. Učinkovitost vgradnje EO seveda ni popolna, kar še zlasti velja, kadar postopek izdelave KI oz. vgradnje EO v nosilce vključuje uporabo povišane temperature (npr. faza združevanja posameznih sestavin izdelka), ki se ji lahko le redko popolnoma izognemo. Z namenom, da bi zagotovili ustrezno stabilnost in omogočili podaljšano sproščanje EO iz KI in s tem učinkovitost skozi daljši čas, preizkušamo nove koloidne sisteme ter sestavine za izdelavo le-teh, izdelava katerih pa pogosto prav tako vključuje uporabo (zmerno) povišane temperature.

Vgrajevanje EO v koloidne nosilce, kot so recimo nanodelci, liposomi, mikroemulzije, nanoemulzije, micelarne raztopine in tekoči kristali, ima veliko prednosti, še posebej z vidika izboljšanja stabilnosti in zagotavljanja prirejenega sproščanja EO, pa tudi s ciljem učinkovitejše dostave na mesto delovanja. Vgradnja EO v koloidne nosilce lahko zaščiti EO pred razgradnjo (pod vplivom svetlobe) in izhlapevanjem (pod vplivom povišane temperature), kar zagotavlja povečano stabilnost, večjo obstojnost vonja in bolj izražene specifične učinke posameznih EO (11). V kolikor z vgradnjo v koloidne sisteme dosežemo podaljšano sproščanje EO, se to odraža tudi v podaljšanem času delovanja le-tega (npr. dolgotrajnejši vonj izdelka, kljub vsakodnevni uporabi in odpiranju vsebnika).

Koloidne nosilce lahko pripravimo iz velikega nabora materialov in s pomočjo različnih postopkov izdelave. Pri pripravi koloidnih dostavnih sistemov z EO moramo biti posebno pozorni pri izbiri nosilca (npr. trdni lipidni nanodelci, NLC, liposomi, polimerni nanodelci) in metodi izdelave, saj so EO kompleksne mešanice s posebnimi lastnostmi. Po eni strani nepravilna izbira materialov lahko povzroči agregacijo ali aglomeracijo delcev, ki lahko vodi v fizikalno nestabilnost le-teh med shranjevanjem in uporabo, po drugi strani pa moramo biti pozorni, da ne uporabljamo metode, ki bi povzročila izgubo EO zaradi izhlapevanja (10).

Ko oblikujemo koloidne nosilce, je naš cilj, da izdelamo delce čim manjših velikosti, s homogeno porazdelitvijo velikosti, ki jo spremljamo z merjenjem PI. Zaželena je tudi visoka učinkovitost vgradnje EO in ustrezna fizikalna stabilnost disperzije, o kateri posredno sklepamo z merjenjem vrednosti zeta potenciala-ZP (visoka absolutna vrednost slednjega nakazuje manjšo verjetnost agregiranja delcev) (10).

### **1.3.1 NANOSTRUKTURIRANI LIPIDNI NOSILCI (NLC)**

Nanostrukturirane lipidne nosilce (angl.: nanostructured lipid carriers - NLC) uvrščamo med koloidne dostavne sisteme, kjer delce tvorijo delno kristalni lipidni delci nanometrskih velikosti, dispergirani v vodni raztopini stabilizatorja (21). Ovojnica NLC je zgrajena iz fiziološko sprejemljivih in biorazgradljivih lipidov, ki so pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju. Jedro NLC vsebuje določen odstotek lipidov v tekočem agregatnem stanju, zaradi česar imajo bolj neurejeno notranjo strukturo - slednja omogoča večjo kapaciteto vgrajevanja spojin, ki so predvsem lipofilne kozmetično aktivne sestavine (KAS). NLC izkazujejo tudi ustrezno fizikalno stabilnost. Med shranjevanjem v obliki disperzij večinoma ohranijo ustrezno velikost delcev, pa tudi druge lastnosti - naboj na površini in vsebnost učinkovine, kar je bistvena prednost v primerjavi z liposomi. Izkazujejo tudi dobro fiziološko sprejemljivost, za njihovo pripravo pa ne potrebujemo organskih topil. Na voljo imamo več različnih postopkov izdelave, metodi vročega in hladnega dispergiranja pa omogočata tudi enostaven prenos v večje merilo in industrijsko izdelavo. Poleg tega na izbiro metode izdelave vplivajo tudi lastnosti in koncentracija spojine, ki jo želimo vključiti v NLC. Zavedati pa se moramo, da fizikalno-kemične lastnosti izdelanih NLC (oblika delcev, polimorfne modifikacije in stopnja kristaliničnosti) niso prednostno odvisne od izbrane metode izdelave temveč od kristalografskih lastnosti surovin (10) (21) (22).

V literaturi omenjajo tudi izdelavo NLC po metodi z razredčevanjem vroče mikroemulzije (23), emulgiranje z izhlapevanjem topila, injiciranje topila, inverzijo faz, tehniko večfazne emulzije, ultrasonifikacijo in membransko tehniko (24).

Pri izdelavi NLC-jev v smo uporabili metodo vročega dispergiranja zaradi številnih prednosti pred drugimi metodami, npr. ne potrebujemo organskih topil, kratek čas izdelave ter enostaven prehod za izdelavo v industrijskem merilu. Po drugi strani so slabosti te metode visoke temperature, ki lahko vplivajo na stabilnost EO.



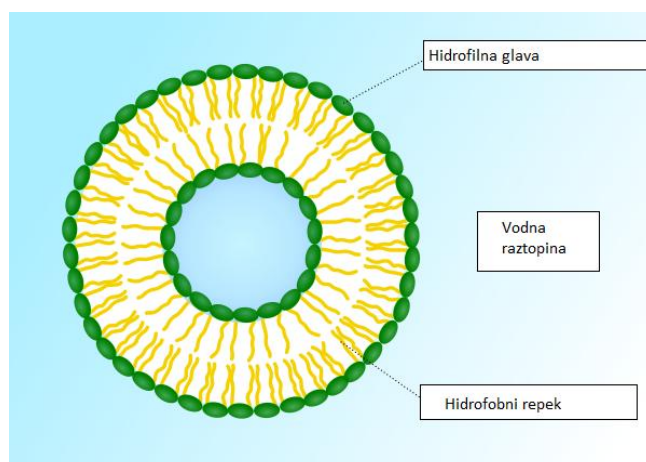
*Metoda z emulgiranjem taline (vroče dispergiranje)*; spojino, ki jo želimo vgraditi, najprej dispergiramo v talino lipida (izberemo lipid, ki je pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju, omenjenemu lipidu pa dodamo še določen delež lipida, ki se pri sobni temperaturi nahaja v tekočem agregatnem stanju). Tako pripravljeno lipidno fazo nato emulgiramo v segreto vodno fazo s stabilizatorjem (t.i. vroče dispergiranje). Ustrezno temperaturo postopka izberemo na podlagi temperature tališča lipida (običajno 5 – 10 °C nad tališčem). Velikost kapljic nastale emulzije je odvisna od vnosa energije med emulgiranjem, ki ga navadno izvedemo pod visokim tlakom, z rotor-stator homogenizatorjem ali uporabo ultrazvočne sonde. Nastale lipidne kapljice nanometrskih velikosti se nato pri sobni temperaturi strdijo in pri tem ujamejo vgrajeno spojino v notranjost lipidnega ogrodja. Dosežena velikost kapljic emulzije in posledično lipidnih nanodelcev (ND) je odvisna od številnih dejavnikov, kot so koncentracija dispergirane faze, viskoznost obeh faz, medfazna napetost, najpomembnejše pa so lastnosti emulgatorja. Le-ta namreč med postopkom emulgiranja z adsorpcijo na novo nastale mejne površine in tvorbo elastičnega emulgatorskega filma prepreči združevanje kapljic in omogoča nastanek stabilne emulzije. Zaradi pogojev izdelave opisana metoda običajno ni primerna za vgrajevanje vodotopnih spojin in močno termolabilnih spojin; za le-te je primernejši postopek hladnega dispergiranja (22) (25).

NLC imajo veliko prednosti za vgrajevanje EO, saj so le-ta večinoma lipofilna in se lahko dobro ujamejo v lipidni matriks ter učinkovito vgrajujejo v koloidni sistem. V nekaterih raziskavah omenjajo visoko stabilnost vgrajenega EO, kjer naj bi ND nudili zaščito pred izhlapevanjem EO tudi več kot 1 leto. Drugi raziskovalci omenjajo izboljšano protimikrobno in antioksidativno delovanje po vgradnji EO kretskega origana v NLC, pri čemer so  $\alpha$ -tokoferol uporabili kot standard za protimikrobno in antioksidativno delovanje (18).

### **1.3.2 LIPOSOMI**

Liposomi (slika 4) so med najbolj proučevanimi koloidnimi dostavnimi sistemi; prvič so jih razvili za namene vgradnje učinkovin leta 1970 (26). So mikroskopski vezikli, sestavljeni iz lipidnih, v koncentrične kroge urejenih dvoslojev, znotraj katerih oz. med katerimi je ujeta vodna faza (27). Prednost liposomov je, da lahko v njih vgradimo tako lipofilne kot tudi hidrofilne učinkovine. Močno lipofilne se vgradijo v lipidni dvosloj, močno hidrofilne so v jedru liposoma (kjer je vodna faza), zmerno polarne in amfifilne spojine pa se

razporedijo med lipidno in vodno fazo (28). Struktura liposomov omogoča biokompatibilnost in biorazgradljivost. Če so zgrajeni iz naravnih fosfolipidov, so biološko inertni, šibko imunogeni in imajo nizko toksičnost (29).



Slika 4: Prikaz strukture enoslojnega liposoma (30)

Liposome lahko ločimo glede na njihovo slojnost, velikost in metodo priprave. Glede na slojnost ločimo manjše enoslojne liposome (20-100 nm), večje enoslojne (100-800 nm) in večslojne liposome (100-4000 nm). Enoslojni so večinoma primerni za vgradnjo vodotopnih učinkovin, medtem ko so večslojni primerni tudi za vgradnjo lipofilnih učinkovin (22).

Najstarejši in najpogosteje uporabljen način priprave liposomov je *filmska metoda* zaradi enostavnega postopka priprave. Obstaja še mnogo načinov priprave, kot so: dispergiranje fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem, metoda izdelave liposomov iz proliposomov. Med novejšie metode spadajo metoda mikrofluidizacije, metoda s segrevanjem in Mozafari-jeva metoda. (22) V diplomskem delu smo uporabili metodo *injiciranja etanolne raztopine fosfolipidov v vodno fazo*, ki je predvsem primerna za vgrajevanje hlapnih sestavin. To metodo sta prvič opisala Batzri in Korn (31) leta 1973. Postopek je takšen, da najprej raztopimo lipid v primernem organskem topilu, nato pa nastalo raztopino s pomočjo brizge, na katero namestimo injekcijsko iglo, injiciramo v vodno fazo. Pri tem nastanejo liposomi. Metoda je zelo enostavna, vendar moramo biti pozorni pri izbiri lipida, saj so nekateri slabo topni v etanolu, zato je potrebno mešati dalj časa. Jaafar-Maalej in sodelavci (32) so uporabili to metodo za vgrajevanje hidrofobnih in hidrofilnih učinkovin. Ugotovili so, da je večja učinkovitost vgrajevanja pri hidrofobnih učinkovinah (100%) kot pri hidrofilnih učinkovinah (16 %). Zaznali so tudi manjše večslojne vezikle velikosti med 80-170 nm. Prednost te metode je enostaven in hiter

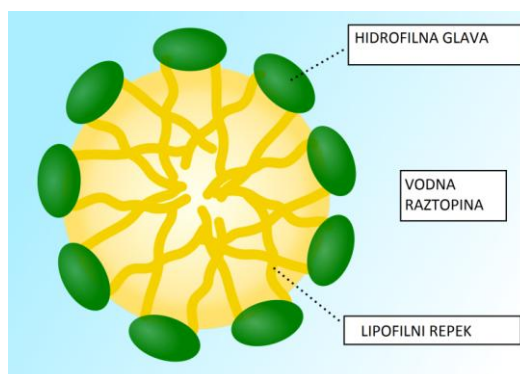
postopek izdelave liposomov. Velikost delcev je odvisna od vsebnosti in lastnosti lipida, vsebnosti KAS in vrste topila (33).

Z vgrajevanjem v liposome lahko izboljšamo topnost in zmanjšamo izhlapevanje EO ter omogočamo nadzorovano sproščanje in posledično tudi večjo učinkovitost v izdelku (4).

Raziskovalci omenjajo tudi večjo protimikrobno, protivirusno, antiherpetično aktivnost pri vgradnji EO v liposome (34).

### 1.3.3 MICELARNE RAZTOPINE IN NANOEMULZIJE

*Micelarne raztopine* (slika 5) temeljijo na osnovi micelov, ki so zgrajeni iz lipofilnih "repkov" in hidrofilne "glave". Za nastanek micelarne raztopine je potreben dodatek površinsko aktivne snovi (PAS) v takšni koncentraciji, da preseže kritično micelarno koncentracijo, kar povzroči tvorbo micelov – lipofilni deli PAS in vodna faza se samodejno povežejo v kroglasto strukturo, da zagotovijo ustrezno stabilnost raztopine. Velikost micelov je ponavadi med 10-100 nm (26).



Slika 5: Zgradba micela (35)

Dolžina nepolarnega repa, narava in velikost polarnega oziroma ionskega dela, pH raztopine, temperatura in prisotnost dodanih topljencev, so najpomembnejši dejavniki, ki določajo stopnjo agregacije- fizikalne destabilizacije sistema preko združevanja delcev. Če se ti parametri spremenijo, se lahko spremeni tudi oblika in velikost delcev (26). Miceli so primerni za vgradnjo lipofilnih spojin, kot so EO, saj zaradi dodatka PAS izboljšajo topnost EO v vodi tako, da ga vključijo v jedro micela in posledično povečajo stabilnost sistema. Primer micelarne raztopine EO so aromatične vode, pri čemer za povečanje topnosti uporabimo solubilizator.

*Nanoemulzije (NE)* spadajo med večfazne koloidne disperzije. Opišemo jih lahko kot emulzije z velikostjo kapljic med 30 in 300 nm. So prozorne ali prosojne disperzije o/v ali v/o, ki so stabilizirane z medfaznim filmom emulgatorja in koemulgatorja. Lipofilne

kapljice notranje faze so ločene od kontinuirane zunanje vodne faze z enojno plastjo površinsko aktivnih snovi, zato so primerne za vgrajevanje lipofilnih spojin. Postopek izdelave NE vključuje vzpostavitev kontinuiranega filma površinsko aktivne snovi na medfazi tekočina-tekočina in uporabo raznovrstnih mešal, rotor-stator sistemov, homogenizatorjev pod visokim tlakom, soniciranja in druge ustrezne postopke, katerih rezultat je nastanek zelo drobnih kapljic. Če so kapljice v emulziji večje od 100 nm so bele, med 70-100 nm so opalescentne, manjše od 70 nm pa so transparentne (36) (37).

S kozmetološkega vidika so primeren koloidni sistem, saj lahko z njimi dosežemo večjo topnost učinkovin, ki so v vodi slabo topne (npr. EO). Majhna velikost kapljic stabilizira sistem proti razslojevanju ali sedimentaciji. Vendarle so termodinamsko nestabilen sistem, ki je podvržen flokulaciji, koalescenci, najbolj pa Ostwaldovi rasti. Z ustrezno izbiro komponent, sestavo in metodo izdelave lahko vendarle dosežemo dobro kinetično stabilnost NE (38).

Prednosti NE so enostavna priprava, majhna velikost kapljic in biokompatibilnost pomožnih snovi. V primerjavi z mikroemulzijami pri izdelavi NE potrebujemo le 5-10 % PAS, medtem ko moramo pri mikroemulzijah dodati večji odstotek le-teh.

V zadnjih letih se kot alternativna metoda za izdelavo emulzij uveljavlja emulgiranje v mikroporoznih sistemih, uveljavlja pa se tudi emulgiranje v sistemu membran z mikrokanali (22).

## **1.4 IN VITRO METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI**

Antioksidanti (AO) so snovi, ki lahko upočasnijo ali preprečijo možnost oksidativne poškodbe tarčne molekule, tako da reagirajo z radikali in zaustavijo verižne radikalske reakcije. Te snovi imajo v svoji strukturi najpogosteje reaktiven vodik, ki se zlahka odcepi in veže na radikal. V tej reakciji nastane nov stabilnejši radikal, ki je manj škodljiv. Aktivnost AO je odvisna od števila »protiradikalskih« skupin. Pomembno je, kako je nastali radikal stabiliziran, na kar vpliva celotna struktura molekule (39).

Poznamo več delitev AO. Lahko jih razdelimo na endogene (npr. encimski sistemi) ter eksogene, katere vnašamo v telo s hrano (npr. vitamini). Glede na kemijsko strukturo jih delimo na encimske ter neencimske (npr. vitamini). Najpomembnejši encimski AO v

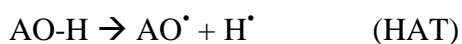
organizmu so katalaza (CAT), superoksid dismutaza (SOD), glutation reduktaza (GR) ter glutation peroksidaza (GPx). Ti so tudi najučinkovitejši, ker se njihova koncentracija prilagodi potrebam po zmanjšanju oksidativnega stresa. Glede na topnost jih delimo na lipofilne (ti se nahajajo v celičnih membranah in lipoproteinih- vitamin E, ubikvinon), hidrofilne (v vodnih sredicah- vitamin C) in amfifilne (lipojska kislina) AO. Od topnosti je tudi odvisno, kje bodo delovali – lipofilni delujejo v celičnih membranah, hidrofilni pa v krvni plazmi in citosolu (40).

Za določanje AOU je opisanih veliko metod. Po načinu določanja jih ločimo na *in vivo* in *in vitro* metode. Najbolje je, da učinkovitost preverimo z več različnimi metodami. *In vitro* metode za določanje AOU lahko imenujemo tudi kemijske metode. Gre namreč za enostaven postopek, pri katerem opazujemo sposobnost AO in njihovih kompleksov, kako reagirajo z reaktivnimi kisikovimi spojinami (ROS).

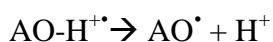
Delovanje AO lahko ločimo na preprečevalno in popravljalno, načine delovanja pa ločimo na:

- katalitično odstranjevanje radikalov in reaktivnih zvrsti (CAT, SOD, peroksidaza, ...);
  - lovilci radikalov, ki reagirajo z radikali in jim donirajo H-atom, jih nevtralizirajo, sami pa pri tem dobijo lastnosti stabilnejših radikalov, ki ne morejo več reagirati dalje (npr. vitamin C);
  - kelatorji vežejo kovinske ione (železa, bakra,...) in s tem zmanjšajo njihovo razpoložljivost ter preprečijo nastanek hidroksilnega radikala in razgradnjo lipidnih peroksidov (tako delujejo nekateri proteini, npr. transferini);
  - če je v strukturi dvojna vez, se nanjo adirajo singletni kisik ali pa drugi radikali (41)
- (42)

Eden od možnih mehanizmov, po katerem AO deaktivirajo radikal, je odtegnitev vodikovega atoma (*hydrogen atom abstraction* ali *hydrogen atom transfer* - HAT):



Drug možen mehanizem je prenos elektrona (*electron transfer* - ET), kjer tvorbi radikalskega kationa sledi deprotonacija:

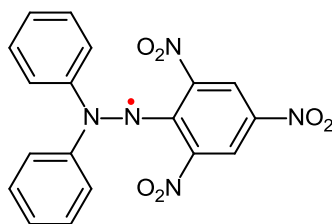


Dobro znani AO, ki reagirajo po HAT mehanizmu so  $\alpha$ -tokoferol, kurkumin, epigalokatehin galat in drugi (43).

#### 1.4.1 DIFENILPIKRILHIDRAZILNA (DPPH) METODA

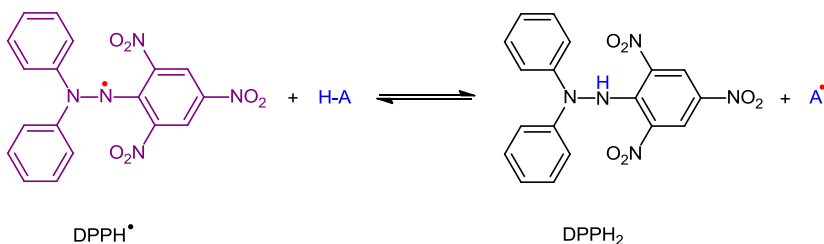
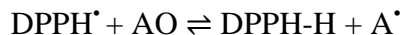
DPPH metoda je ena izmed najbolj hitrih, enostavnih (ne zahteva velikega števila korakov in reagentov) in poceni metod za določanje AOU spojin. Prvič jo je opisal M. Blois pred približno 50 leti. Metoda temelji na meritvi absorbance s spektrofotometrom, s čimer posredno spremljamo spremembo koncentracije DPPH radikala, ko le-ta reagira z AO. (44)

Osnovna molekula je 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil ( $\alpha,\alpha$ -difenil- $\beta$ -pikrilhidrazil; DPPH) – na sliki 6, ki je stabilen radikal zaradi delokalizacije prostega elektrona na molekuli. Zaradi delokalizacije elektrona je raztopina DPPH temno vijolično obarvana. Absorpcijski maksimum ima pri valovni dolžini 515 – 520 nm.



Slika 6: : Kemijska struktura 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (45)

Ko raztopini DPPH-ja dodamo snov, ki lahko odda vodikov atom, tj. AO, se radikal DPPH spremeni v reducirano obliko, kar lahko vidimo s prostim očesom kot izgubo vijolične barve. Slika 7 prikazuje DPPH radikal, ki reagira z molekulo AO (H-A) in se pri tem pretvori v reducirano obliko, molekula AO pa v stabilen radikal ( $A^\bullet$ ), ki lahko v naslednji reakciji ponovno reagira z DPPH radikalom.



Slika 7: Reakcija DPPH z antioksidantom

Raztopina se obarva rumenkasto, ker je pikrilna skupina še vedno prisotna, le-ta pa daje rumeno barvo. Antioksidativno aktivnost lahko proučujemo spektrofotometrično. Večja kot je antioksidativna aktivnost snovi, večja je redukcija DPPH-ja in manj vijolično obarvan je vzorec (46) (47) (48) (49).

Rezultate običajno predstavimo z vrednostjo  $EC_{50}$  ("efficient concentration") - to je koncentracija antioksidanta, ki povzroči zmanjšanje začetne koncentracije DPPH za 50 %. Večja kot je antioksidativna aktivnost, nižja je vrednost  $EC_{50}$  (18). Parameter je prvič uporabil Brand-Williams (1995) in je zelo uporaben, saj lahko rezultate primerjamo ne glede na koncentracijo preiskovanih spojin (49). Vrednost  $EC_{50}$  nam ne poda nikakršne informacije o hitrosti kinetike (50). Veliko avtorjev uporablja tudi parameter  $EC_{20}$ , ki nam poda koncentracijo, ki je potrebna za 20% zmanjšanje začetne koncentracije DPPH.

### **Priporočila za izvedbo metode**

Za izvedbo meritev priporočajo uporabo kivete s premerom 1 cm in z maksimalnim volumnom 4 mL. Za najboljšo analitično natančnost priporočajo mešanico 2 mL DPPH in 2 mL reducenta. Pri izbiri topila svetujejo metanol ali etanol, saj se ne vključujeta v reakcijo. Koncentracija učinkovine v kiveti naj bo izbrana tako, da bomo s spektrofotometrom izmerili vrednost absorbanca pod 1,0 (18) (48).

### **Težave pri izvedbi metode**

Čeprav je DPPH metoda znana po svoji enostavnosti in učinkovitosti, se tudi tukaj pojavljajo težave pri izvedbi. Številne raziskave so pokazale, da povezava med koncentracijo AO in aktivnostjo DPPH radikala ni linearna v vseh koncentracijskih območjih, zato lahko  $EC_{50}$  napačno določimo (51) (52).

Potrebno je tudi omeniti, da se uporabljajo različne izvedbe metode, ki se razlikujejo v izbiri topila, izhodiščni koncentraciji DPPH, volumnu vzorca in načinu prikaza rezultatov. Posledica navedenih razlik je, da rezultati različnih študij niso vedno primerljivi. Precej avtorjev je zato dalo pobudo za standarizacijo metode (44) (53).

## 2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je ovrednotiti stabilnost in AOU različnih koloidnih dostavnih sistemov kot nosilcev za EO poprove mete. Slednje bomo vgradili v NLC, liposome in micelarno raztopino/nanoemulzijo (MR/NE). Obstočnost EO, ki so pogosta sestavina kozmetičnih izdelkov, je namreč odvisna tudi od vrste nosilnega sistema oz. postopka in mesta vgradnje EO v izdelek.

Diplomska naloga je razdeljena na več delov. V prvem delu bomo optimizirali recepturo in pogoje za izdelavo NLC. Za pripravo slednjih se najpogosteje uporablja lipid glicerol monostaerat (GMS), ki zaradi visoke temperature tališča (54-66°C) ni primeren za vgradnjo EO. GMS bomo zato poskusili nadomestiti s trdo mastjo (Adeps solidus), ki ima nižje tališče (med 33,5 °C in 35,5 °C). Preverili bomo tudi ustreznost izbranih receptur za liposome in MR/NE. V vse nosilce bomo vgradili 1 oz. 2% EO, za kontrolo pa bomo izdelali tudi prazne nosilne dostavne sisteme. Na podlagi vseh izdelanih dostavnih sistemov bomo ocenili, kateri koloidni nosilec je najprimernejši za vgradnjo EO z namenom omejitve njegovega izhlapevanja iz izdelka med uporabo. V drugem delu bomo vrednotili stabilnost izdelanih koloidnih sistemov v naslednjih časovnih točkah: ob času 0, po dveh tednih in štirih tednih hranjenja disperzije pri sobni temperaturi. Med staranjem jih bomo vsak dan za 1 minuto odprli in tako posneli pogoje uporabe KI. S tem želimo preveriti, kako vsakdanja uporaba potencialnega KI vpliva na izhlapevanje EO in posledično AOU izdelka. Velikost in porazdelitev velikosti delcev (NLC, liposomi) oz. kapljic (MR/NE) bomo spremljali z napravo Zeta sizer (metoda fotonske korelacijske spektroskopije - PCS). Z metodo laserske Dopplerjeve elektroforeze bomo spremljali tudi zeta potencial (ZP) dostavnih sistemov, ki je merilo za naboj na njihovi površini. Z metodo DPPH bomo spremljali AOU koloidnih nosilcev z dodanim EO. Pričakujemo, da se bo EO sproščalo najdlje časa pri NLC-jih, zaradi njihove sposobnosti podaljšane sproščanja, medtem ko pri liposomih in MR/NE pričakujemo, da bo zaradi hlapnosti EO po določenem času staranja AOU manjša.

Za trdne NLC bomo posredno določili tudi učinkovitost vgradnje EO, in sicer bomo disperzijo ultracentrifugirali in nato na osnovi rezultatov DPPH analize posredno ocenili vsebnost EO v supernatantu napram celotni disperziji NLC.

EO poprove mete smo izbrali kot modelno EO za proučevanje primernosti različnih vrst koloidnih dostavnih sistemov kot nosilcev za vgradnjo EO. Z izbiro nosilca lahko namreč vplivamo na obstojnost in tudi čas sproščanja vgrajenega EO in s tem na lastnosti



končnega kozmetičnega izdelka. Za EO poprove mete smo se odločili, ker je bilo v zadnjih letih objavljenih več člankov na temo njegove antioksidativne in protimikrobne učinkovitosti in je pogosta sestavina KI.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 SESTAVINE

##### Prisotni v vseh koloidnih sistemih

- **Eterično olje poprove mete (*Menthae piperitae Aetheroleum*); Lex d.o.o, Slovenija**

Eterično olje poprove mete je glavna KAS, ki je prisotna v vseh dostavnih sistemih in smo jo predstavili že v uvodu.

- **Prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Slovenija)**

Prečiščena voda je pripravljena na Fakulteti za farmacijo in je prav tako prisotna v vseh dostavnih sistemih. Predstavlja hidrofilno fazo. Pri postopku izdelave NLC je tudi topilo za Lutrol F68.

##### SESTAVINE ZA IZDELAVO NLC

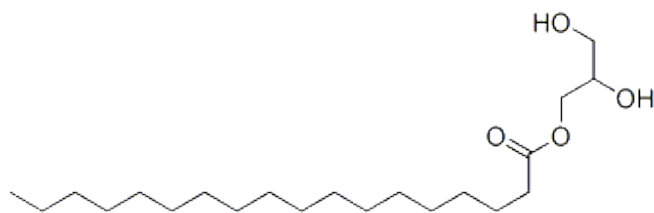
- **Trda mast - *Adeps solidus*/ Hard fat ( Lex, d.o.o., Slovenija)**

Trda mast je bela, krhka, mazljiva snov, brez vonja in okusa. Je netopna v vodi.

Kemijsko je mešanica mono-, di-, in trigliceridov, v katerih je glicerol zaestren z nasičenimi maščobnimi kislinami z 10 do 18 atomi ogljika. Ima emulgatorske lastnosti tipa voda-v-olju. Tališče ima med 33-40 °C. Je netopna v vodi in delno topna v brezvodnem etanolu. Če jo segrejemo na 50°C, dobimo prozorno oz. rahlo rumenkasto tekočino. Pridobivamo jo s procesom katalitskega hidrogeniranja tekočih olj. Shranjevati jo je potrebno v temnih in hladnih prostorih (54) (55).

- **Glicerol monostearat 40-55 - GMS (Lex, Slovenija)**

Glicerol monostearat (na sliki 8) je kemijsko ester glicerola in stearinske kisline. Je higroskopen prah bele barve, sladkega okusa, brez vonja. Temperaturo tališča ima med 54 in 66°C. Je netopen v vodi in topen v 96 % etanolu pri 60 °C (55). Uporabljamo ga v kozmetičnih izdelkih za nego las in kože kot emulgator, zgoščevalo, sredstvo proti sprijemanju in kot konzervans (56).



Slika 8: Skeletna formula glicerol monostearata (57)

- **Miglyol 812 (Sasol, Nemčija)**

Miglyol 812 je klasičen emolient, ki je zaradi kemijske čistosti znan tudi kot nevtralno olje. Je zmes trigliceridov s srednje dolgimi verigami C<sub>8</sub>/C<sub>10</sub>, ki jih pridobivajo iz kokosovega olja. Veliko ga uporabljamo v kozmetiki za nego telesa, obraza, las in v sončnih kremah oz. oljih (58) (59).

- **Phospholipon® 80 (Rhône-Poulenc, Nattermann Phospholipid GMBH, Köln)**

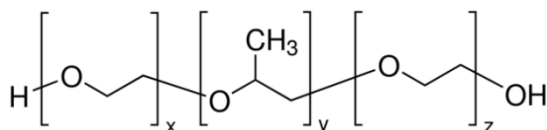
Phospholipon 80 je kemijsko zmes fosfolipidov, ki vsebuje 76±3 % fosfatidilholina in 3±3 % lizofosfatidilholina. Vsebuje približno 65 % linolne kisline. Je rumenorjave barve, v trdni obliki, po videzu spominja na smolo. Uporablja se kot emulgator za pripravo liposomov, emulzij in mikroemulzij v farmaciji in kozmetiki. Priporočljiva koncentracija za dermalen nanos v kozmetiki je 0,5 – 3 %. (60)

- **Phospholipon® 80 H (Rhône-Poulenc, Nattermann Phospholipid GMBH, Köln)**

Phospholipon 80 H je zmes hidrogeniranih fosfolipidov, pridobljenih iz soje. 70 % predstavlja hidrogeniran fosfatidilholin, preostali deli pa trigliceridi in maščobne kisline - vsebuje 85 % stearinske kisline in 15 % palmitinske kisline. Je belorumen prašek. Uporabljamo ga v kozmetiki za pripravo liposomov in emulzij. Ima vlogo emulgatorja in stabilizatorja. (61) (56)

- **Poloksamer 188 (Lutrol® F 68, Basf, Nemčija)**

Lutrol F 68 je bela ali belorumena snov, ki se pojavlja v obliki prahu, sferičnih delcev mikrometrskih velikosti ali kosmičev. Kemijsko je neionogeni blok kopolimer etilenoksida in propilenoksida (Slika 9) (55). Tališče ima pri 52-55 °C. Dobro topen je v etanolu (96 %) in vodi, netopen pa v dietil etru, parafinu in maščobnih kislinah. Spada med hidrofилne, neionogene PAS. Uporabljamo ga kot stabilizator ali emulgator (56).



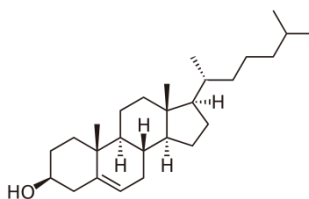
Slika 9: Strukturna formula poloksamera 188 (62)

- **Prečiščena voda**
- **Eterično olje poprove mete**

### **SESTAVINE ZA IZDELAVO LIPOSOMOV**

- **Holesterol (5-Cholesten-3 $\beta$ -ol), Sigma, Nemčija**

Holesterol (slika 10) je kemijsko sterol živalskega izvora. Po izgledu je bel, kristaliničen prašek. Je netopen v vodi, delno topen v acetonu in etanolu (96 %). Je občutljiv na svetlobo. Tališče ima pri 147-150 °C. V KI ga uporabljamo kot emulgator, na kožo pa deluje tudi negovalno in mehčalno (59).



Slika 10: Kemijska formula holesterola (63)

- **Etanol - 96 % (Pharmachem, Slovenija)**

Etanol ali etilni alkohol je brezbarvna, bistra, higroskopna, vnetljiva tekočina. Mešamo ga lahko z vodo in metilen kloridom. Gori z modrim plamenom brez dima. Večinoma etanol uporabljamo kot topilo.

- **Phospholipon 80**
- **Prečiščena voda**
- **Eterično olje poprove mete**

### **SESTAVINE ZA IZDELAVO MICELARNE RAZTOPINE/ NANOEMULZIJE**

- **Tween 20 (Sigma Aldrich, Nemčija)**

Tween 20 ali polisorbat 20 je viskozna tekočina z molekulsko formulo C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>. Njegovo kemijsko ime je polioksietilen-20-sorbitan monolavrat. Spada med neionske PAS, uporabljamo ga kot solubilizator.

- **Prečiščena voda**
- **Eterično olje poprove mete**

## **SNOVI, UPORABLJENE PRI DPPH METODI**

- **DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, ZDA)**

DPPH radikal je prah zelene ali temno vijolične barve z empirično formulo  $C_{18}H_{12}N_5O_6$  in molekulska masa 394,32 g/mol. Shranjevati ga je potrebno pri temperaturi med 2-8 °C. Ob stiku z antioksidantom se raztopina DPPH obarva rumenkasto. (64) Topen je v organskih topilih, v vodi pa je netopen.

- **Metanol, Emparta, Nemčija**

Metanol ( $CH_3OH$ ) smo uporabili kot topilo za DPPH.

- **Etanol (96 %)**

Etanol (96 %) smo uporabili kot topilo, kadar se snov v metanolu ni dobro raztopila (v primeru NLC-jev).

### **3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR**

- Polistirenske kivete za merjenje velikosti delcev (Sarstedt AG & Co., Nemčija)
- Celice za merjenje zeta potenciala DTS 1061 (Malvern, Velika Britanija)
- Polavtomatske pipete (Biohit, Eppendorf, Nemčija)
- Analitska tehtnica (Metler Toledo AG245, Mettler Toledo International Inc., Švica)
- Tehtnica VIBRA AJ – 2200CE model ( Shinko DenshiCo., Ltd., Japonska)
- Vodna kopel (Gorenje, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička Sonis (Iskra Pio, Slovenija)
- Merilne bučke (10 mL, 20 mL, 50 mL in 100 mL)
- Erlenmajerica z obrusom (50 mL)
- Magnetno mešalo Rotamix 560 MMH; Tehtnica, Slovenija
- Zetasizer Nano ZS (Malvern, Velika Britanija)
- Ultracentrifuga Thermo Scientific WX Ultra 100 (Sigma, Nemčija)
- Rotor-stator homogenizator Omni PDH (Omni International, ZDA)
- UV-VIS spektrofotometer Hewlett Packard 8453 (Nemčija) – za meritve pri DPPH metodi

## 3.2 METODE

### 3.2.1 IZDELAVA NLC

NLC na osnovi GMS oz. trde masti smo izdelali po recepturi, ki je prikazana v preglednici II. V posamezni seriji smo pripravili 5 g NLC.

Preglednica II: Receptura za NLC brez EO , z 1% in 2% EO

Sestavine	Delež (%)		
GMS/ Trda mast	2,1		
Miglyol 812	1,4	0,4	
Phospholipon 80/ 80H	1		
Lutrol F 68	1,5		
Eterično olje poprove mete/ brez EO	0	1	2
Prečiščena voda	do 100 %		

Priprava vzorcev je potekala v treh stopnjah. Najprej smo na analitski tehtnici v 15 mL centrifugirke iz umetne mase (ti. falkonke) točno natehtali posamezne lipofilne sestavine, torej GMS ali trdo mast, Miglyol 812 in Phospholipon 80. V drugo falkonko smo natehtali Lutrol F 68 in prečiščeno vodo, ki sta predstavljalata vodno fazo. Lipidno fazo smo na vodni kopeli segreli približno 10 stopinj nad temperaturo tališča. V primeru izdelave NLC na osnovi GMS smo zmes segrevali pri  $T=75^{\circ}\text{C}$  (kar je 10 stopinj nad temperaturo tališča GMS), pri izdelavi NLC na osnovi trde masti pa pri  $45^{\circ}\text{C}$  ( $10^{\circ}\text{C}$  nad temperaturo tališča trde masti). Vodno fazo smo segreli na isto temperaturo in jo nato med mešanjem z rotor-stator homogenizatorjem (Omni PDH) postopno dodali k lipidni fazi. Pri izbrani T ( $75^{\circ}\text{C}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$ ) ali smo disperzijo NLC 8 min homogenizirali pri 20000 obratih/min (med homogeniziranjem smo imeli centrifugirko potopljeno v vodno kopel). Postopek izdelave v centrifugirkah smo ponovili 7-krat za izdelavo praznih NLC ter NLC z 1 oz. 2% eteričnega olja. Posamezne vzorce smo nato združili v skupno čašo, da smo imeli dovolj vzorca za spremljanje stabilnosti vzorcev (ob času 0, čez 2 tedna in čez 4 tedne) in določanje antioksidativne učinkovitosti. Centrifugirke iz umetne mase smo uporabili zato, ker so bile primernih velikosti za homogeniziranje z rotor-stator homogenizatorjem ob združitvi lipofilne in hidrofilne faze. Pri izdelavi NLC z vgrajenim EO se je nekoliko spremenila tudi receptura, kot je razvidno iz preglednice II. Ob dodatku 1% EO smo za isti odstotek zmanjšali delež Miglyola 812, medtem ko se je ob dodatku 2 % EO receptura spremenila

na račun Miglyola 812 (za 1%) in vode (1%). Ko smo dodajali EO, smo slednjega dodali v lipidno fazo tik pred združitvijo z vodno fazo, da bi EO čim krajši čas izpostavljali povišani temperaturi.

### 3.2.2 IZDELAVA LIPOSOMOV

Liposome smo izdelali po metodi injiciranja etanolne raztopine v vodno fazo. Priprava liposomov je potekala v dveh fazah. Najprej smo pripravili etanolno raztopino Phospholipona 80 in holesterola v 10 mL čaši (po recepturi iz preglednice III) in jo postavili na magnetno mešalo, da so se sestavine hitreje raztopile. V 50 mL erlenmajerico z obrusom smo odmerili vodo. Tik preden smo etanolno raztopino fosfolipidov posrkali v 5 mL brizgo in nanjo namestili injekcijsko iglo (dolžina 50 mm, premer: 0,7 mm) smo v etanolno raztopino raztopili EO poprove mete koncentracij 0% /1% /2%. Med mešanjem na magnetnem mešalu (600 obratov/min) smo etanolno raztopino počasi injicirali v čašo s prečiščeno vodo. Po združitvi obeh faz smo disperzijo mešali še nadaljnjih 5 min.

Preglednica III: Receptura za izdelavo liposomov po metodi injiciranja etanolne raztopine fosfolipidov v vodno fazo

	Sestavina	Količina
<b>Etanolna raztopina fosfolipidov</b>	Phospholipon 80	100 mg
	Holesterol	10 mg
	Etanol	4 mL
	Eterično olje poprove mete	0%/ 1 %/ 2%
<b>Vodna faza</b>	Prečiščena voda	46 mL

### 3.2.3 IZDELAVA MICELARNE RAZTOPINE / NANOEMULZIJE

Micelarno raztopino/nanoemulzijo smo pripravili tako, da smo v merilno bučko (100 mL) natehtali 2 g Tween-a 20 in ustrezno količino eteričnega olja (preglednica IV). Nato smo počasi, med mešanjem na magnetnem mešalu dodajali vodo.

Preglednica IV: Receptura za izdelavo micelarne raztopine/nanoemulzije

Sestavina	Delež
<b>Tween 20</b>	2 %
<b>EO poprove mete</b>	1 % ali 2 %
<b>Prečiščena voda</b>	do 100 %

### 3.2.4 VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI KOLOIDNIH SISTEMOV

Fizikalno stabilnost dostavnih sistemov smo vrednotili z napravo Zetasizer Nano SZ (Malvern). Merili smo velikosti in porazdelitev velikosti delcev oz. kapljic z metodo fotonske korelacijske spektroskopije-PCS in zeta potencial (ZP) z metodo laserske dopplerjeve elektroforeze. Fotonska korelacijska spektroskopija je metoda za določanje velikosti nanometrskih struktur na osnovi Brownovega gibanja delcev. Temelji na merjenju intenzitete sipanja svetlobe v določenem časovnem obdobju. Na podlagi tega dobimo podatek o povprečni velikosti delcev ( $d$ ) in porazdelitvi njihove velikosti (polidisperzni indeks-PI). PI merimo zato, da ugotovimo, v kolikšni meri je velikost delcev, ki jih merimo, poenotena. Pri vrednosti 0 je sistem monodisperzen (ozka porazdelitev velikosti delcev), medtem ko vrednost 1 kaže na zelo heterodisperzen sistem z zelo široko porazdelitvijo velikosti delcev.

Laserska dopplerjeva elektroforeza temelji na merjenju hitrosti gibanja nabitih delcev v električnem polju. Težnja je, da se delci med seboj čimbolj odbijajo, saj je tako sistem fizikalno bolj stabilen. Če je ZP delcev absolutno večji od 30, to nakazuje na ustrezno stabilnost vzorca.

V kiveto za merjenje velikosti delcev smo odmerili ~1 mL disperzije, pokrili kiveto s pokrovčkom in izvedli meritev.

Za merjenje zeta potenciala smo v 2 mL brizgo počasi posrkali vzorec in napolnili kapilarno celico za merjenje ZP ter izvedli meritev.

Fizikalno stabilnost koloidnih dostavnih sistemov smo spremljali v časovnih točkah: ob času 0, čez 2 tedna in čez 4 tedne. Vzorce smo med posameznimi časovnimi točkami shranjevali pri sobni temperaturi in jih vsak dan odpirali za 1 minuto, da smo posnemali vsakdanjo uporabo potencialnega KI.

Pogoji meritev (velikost delcev):

- Temperatura: 25 °C
- Viskoznost disperznega medija:  $\eta = 0,887$  mPas (voda)
- Lomni količnik disperznega medija:  $RI = 1,330$  (voda)
- Valovna dolžina laserske svetlobe:  $\lambda = 633$  nm
- Kot merjenja: 173°
- Celica: DTS0012 (kiveta)
- Št. Meritev: 2 cikla meritev (vsak cikel je sestavljen iz 10-20 posameznih meritev)



Pogoji meritev (ZP):

- temperatura: 25 °C
- viskoznost disperznega medija:  $\eta = 0,8872$  mPas (voda)
- lomni količnik disperznega medija:  $RI = 1,330$  (voda)
- dielektrična konstanta disperznega medija:  $\epsilon = 78,5$  (voda)
- model: Smoluchowski
- celica: DTS1060C (kapilarna celica)
- število meritev: 2

### **3.2.5 ANALIZA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI EO POPROVE METE Z DPPH METODO**

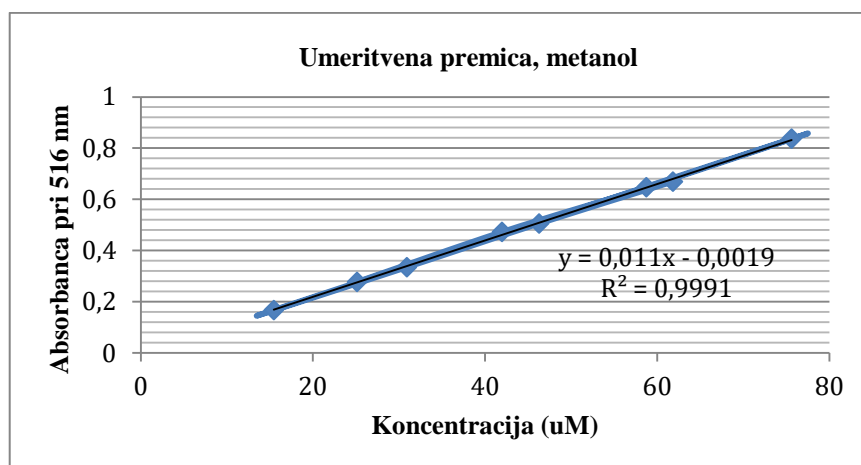
#### **3.2.5.1 PRIPRAVA UMERITVENE PREMICE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE DPPH**

Umeritvena premica nam omogoča določanje neznane koncentracije DPPH radikala ob dodatku AO. Posledično lahko določimo AOU dodanega antioksidanta. Umeritveno premico smo pripravili tako, da smo najprej pripravili raztopine DPPH radikala v metanolu v različnih koncentracijah ter jim nato pomerili absorbanco z UV/VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 516 nm. Raztopine z različnimi koncentracijami DPPH radikala smo pripravili tako, da smo najprej točno natehtali 13 mg DPPH radikala in ga raztopili v 25 mL metanola. 3 mL tako pripravljene raztopine smo nato z metanolom redčili do 50 mL, da smo dobili osnovno raztopino (OS) DPPH s koncentracijo  $\sim 83,92$   $\mu\text{M}$ . Slednjo smo nadalje redčili tako, da smo v 10 mL bučke najprej odmerili različne volumne OS (9 mL, 7 mL, 5 mL in 3 mL), ter jih nato dopolnili do 10 mL z metanolom. Tako smo dobili koncentracije, ki so predstavljene v preglednici V. Tem raztopinam DPPH smo pomerili absorbanco pri valovni dolžini 516 nm. Nato smo pripravili še drugo OS raztopino DPPH, da smo zajeli tudi vmesne točke na premici in upoštevali napake pri tehtanju. Slednjo smo pripravili tako, da smo točno natehtali 10 mg DPPH-ja in ga raztopili v 20 mL metanola. 3 mL tako pripravljene raztopine smo nato z metanolom razredčili do 50 mL, da smo dobili OS s koncentracijo  $\sim 77,27$   $\mu\text{M}$ . Ponovno smo redčili OS tako, da smo v 10 mL bučke odmerili različne volumne OS (8 mL, 6 mL, 4 mL in 2 mL) in jih dopolnili do 10 mL z metanolom. Koncentracije, ki smo jih dobili na podlagi redčitev so predstavljene v

preglednici V (2. OS DPPH). Nato smo jim pomerili absorbanco na UV/VIS spektrofotometru. Umeritvena premica s topilom metanolom je prikazana na sliki 11.

Preglednica V: Vrednosti koncentracij na podlagi redčitev za izdelavo umeritvene premice s topilom metanolom

Redčitev	Koncentracija ( $\mu\text{M}$ )
1. OS DPPH	
9mL/10 mL	75,6
7mL/10 mL	58,72
5 mL/10 mL	41,96
3 mL/10 mL	25,20
2. OS DPPH	
8 mL/10 mL	61,81
6 mL/10 mL	46,27
4 mL/10 mL	30,91
2 mL/10 mL	15,45

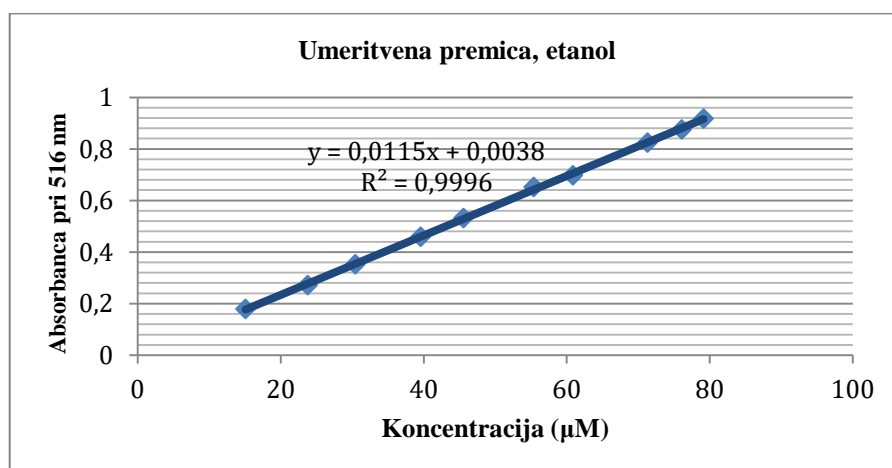


Slika 11: Umeritvena premica za določanje koncentracije DPPH radikala, topilo: metanol,  $\lambda = 516 \text{ nm}$

Na isti način smo izdelali tudi umeritveno premico z drugim topilom - etanolom. Koncentracija pri prvi OS je bila  $\sim 79,12 \mu\text{M}$ , pri drugi pa  $77,6 \mu\text{M}$ . Redčitve in njihove koncentracije so predstavljene v preglednici VI. Umeritvena premica z etanolom je prikazana na sliki 12.

Preglednica VI: Vrednosti koncentracij na podlagi redčitev za izdelavo umeritvene premice s topilom etanolom

Redčitev	Koncentracija ( $\mu\text{M}$ )
1. OS DPPH	
9mL/10 mL	71,28
7mL/10 mL	55,37
5 mL/10 mL	39,56
3 mL/10 mL	23,76
2. OS DPPH	
8 mL/10 mL	62,07
6 mL/10 mL	46,46
4 mL/10 mL	31,03
2 mL/10 mL	15,52



Slika 12: Umeritvena premica za določanje koncentracije DPPH radikala, topilo: etanol,  $\lambda = 516 \text{ nm}$

### 3.2.5.2 PRIPRAVA VZORCEV

#### Priprava reakcijske zmesi

Reakcijsko zmes smo pripravili iz raztopine DPPH radikala in raztopine antioksidanta. Kot topilo smo primarno uporabili metanol, če se snov ni dobro raztopila v metanolu pa smo uporabili etanol. Raztopino DPPH radikala smo pripravili tako, da je bila koncentracija DPPH radikala v reakcijski zmesi  $\sim 63 \mu\text{M}$ . Natančno smo natehtali 10 mg DPPH radikala in ga raztopili v 20 mL metanola/etanola s pomočjo ultrazvočne kadičke. Iz tako pripravljene raztopine smo s pipeto odmerili 1 mL in vzorec prenesli v 20 mL merilno bučko in dopolnili s topilom do oznake. Nato smo s pomočjo polavtomatske pipete v kiveti združili 1500  $\mu\text{L}$  raztopine DPPH radikala in 1500  $\mu\text{L}$  raztopine AO in zmes previdno pomešali s polavtomatsko pipeto.

Vrednotili smo naslednje raztopine AO: raztopine EO poprove mete, micelarna raztopina/nanoemulzija, raztopina liposomov in raztopina NLC. Metanolne raztopine EO poprove mete smo pripravili v koncentracijah 0,5%; 1% in 2% (m/V), ostale raztopine pa v koncentracijah 1% in 2% (m/V). Za vse raztopine smo pripravili tudi prazne koloidne sisteme, ki so nam služili kot kontrola. Kot primarno topilo pri vseh koloidnih sistemih smo uporabili metanol, pri NLC-jih pa smo kot nadomestno topilo uporabili etanol (ker so se delci v metanolu oborili). Raztopino NLC je bilo potrebno pred združitvijo z raztopino DPPH v reakcijski zmesi redčiti z etanolom v razmerju 100/2900  $\mu$ L. Takšno redčenje smo izvedli zato, ker je bila raztopina zelo motna in neprimerna za merjenje na UV/VIS spektrofotometru. Izvedli smo več redčitev (500/2500, 400/2600, 300/2700, 200/2800, 100/2900) in nato izbrali največjo redčitev, ker je bila edina bistra (pri spremljanju absorbance vzorcev čez noč, je tudi pri tej redčitvi prišlo do precipitacije in rahle zamotnitve vzorca).

### 3.2.5.3 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI (AOU) VZORCEV

AOU smo določali z DPPH metodo, ki je opisana v uvodu diplomske naloge. Spremljali smo učinkovitost EO s pomočjo UV/VIS spektrofotometra posredno preko merjenja absorbance v reakcijski zmesi. AOU smo določali raztopinam EO, disperzijama NLC in liposomov ter micelarni raztopini/nanoemulziji. Meritev smo izvajali skupaj največ 120 minut, posamezne meritve pa smo izvajali vsako minuto. Vse meritve smo ponovili po 2 in 4 tednih. Meritve so potekale v zatemnjenem prostoru, najpogosteje čez noč. Pozorni smo bili, da je bila v času meritev UV kiveta vedno zaprta s pokrovčkom, saj smo s tem preprečili izhlapevanje topila, ki bi lahko vplivalo na določitev lažno višje koncentracije DPPH. Spremembo v koncentraciji DPPH• smo določili preko padca absorbance v reakcijski zmesi pri valovni dolžini 516 nm. Če se je koncentracija DPPH• pri reakciji z AO zmanjšala, to pomeni da se je DPPH• pretvoril v reducirano obliko in obarval zmes iz vijolične barve v rumeno – to nakazuje na AOU EO. Cilj je bil, da dosežemo ravnotežno stanje koncentracije.

### 3.2.5.4 PRIKAZ REZULTATOV

Rezultate oz. posredno AOU EO smo prikazali na grafu kot delež DPPH radikala v odvisnosti od časa. Enačba 1 prikazuje izračun deleža DPPH radikala.

$$\% DPPH = \frac{c_T}{c_0} \times 100 \quad \text{Enačba 1}$$

$C_t$ ... koncentracija ob času  $t$

$C_0$ ...koncentracija ob času  $0$

V literaturi se rezultati pogosto prikazujejo z  $EC_{50}$  vrednostjo. Vrednost  $EC_{50}$  (angl. : "efficient concentration") označuje koncentracijo antioksidanta, ki povzroči zmanjšanje začetne absorbance DPPH za 50 %. V zadnjem času se pogosto uporablja tudi  $EC_{20}$  - to je koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za redukcijo 20 % začetne vrednosti DPPH.

### 3.2.6 UČINKOVITOST VGRAJEVANJA NLC

Učinkovitost vgrajevanja nam pove, kolikšen delež EO, ki ga vgrajujemo v NLC, se vgradi v nanodelce. Določali smo ga posredno, in sicer smo disperzijo NLC ultracentrifugirali in nato v supernatantu vrednotili prisotnost nevgrajenega EO, ki smo ga primerjali s koncentracijo EO v izhodiščni disperziji. Učinkovitost vgradnje EO v NLC smo določali relativno, na osnovi primerjave koncentracije supernatanta (z DPPH metodo) in koncentracije izhodne disperzije NLC ter raztopine EO iste koncentracije. Najprej smo natehtali v dve ultracentrifugirki disperzijo tako, da je bila skupna masa posamezne ultracentrifugirke in disperzije 2,5 g. Nato smo ultracentrifugirali 30 min pri 40000 obratih/min in 23,5 °C. Dve centrifugirki smo natehtali zato, da je bil rotor ultracentrifuge v ravnotežju.

Iz razlike med celokupno koncentracijo EO v vzorcu in koncentracijo nevgrajenega EO smo izračunali delež EO, ki se je vgradil v NLC (enačba 2)

*Enačba 2*

$$\% \text{ učinkovitosti vgradnje} = \frac{c(\text{celotna}) - c(\text{nevgrajena})}{c(\text{celotna})} \times 100 \%$$

$c$ ...koncentracija, določena z DPPH metodo

## **4 REZULTATI IN RAZPRAVA**

V okviru diplomskega dela smo želeli ugotoviti, kateri koloidni sistem je najprimernejši za vgradnjo EO z namenom njegove zaščite in doseganja podaljšanega sproščanja. Proučevali smo fizikalno stabilnost koloidnih sistemov brez in z vgrajenim EO, in sicer smo spremljali njihovo velikost, PI in ZP. Z DPPH metodo smo vrednotili tudi AOU koloidnih sistemov z vgrajenim EO med 1 mesečnim shranjevanjem vzorcev pri sobni temperaturi, na osnovi česar smo želeli sklepati o hitrosti sproščanja vgrajenega EO iz sistemov – v kolikor bi bilo sproščanje upočasnjeno, bi takšen nosilni sistem 1 mesec po izdelavi izkazoval višjo AOU kot sistem, iz katerega bi EO hitro hlapelo. Primerjali smo naslednje koloidne sisteme: NLC (EO je ujeto znotraj trdne lipidne ovojnice), liposome (EO je v dvoplasti ujeto med nepolarnimi repi maščobnih kislin) in micelarno raztopino oz. nanoemulzijo (EO je ujeto v notranjosti micela oz. znotraj tekoče lipidne kapljice, ki je stabilizirana s plastjo površinsko aktivne snovi).

### **4.1 IZDELAVA KOLOIDNIH SISTEMOV**

Naš namen je bil izdelati koloidne sisteme iz sestavin, ki so primerne za vgradnjo EO in hkrati zagotavljajo ustrezno fizikalno stabilnost sistema. Cilj je, da poteka vgradnja EO v koloidni sistem pri čim nižjih temperaturah zaradi hlapljive narave EO, zato morajo imeti izbrane sestavine tudi primerno tališče oz. je potrebno ustrezno izbrati/prilagoditi metode izdelave koloidnih sistemov.

#### **4.1.1 IZDELAVA NLC**

Za izdelavo slednjih smo izbrali metodo vročega dispergiranja, imenovano tudi metoda z emulgiranjem taline, ki ne vključuje uporabe organskih topil ter omogoča kratek čas izdelave in enostaven prehod na izdelavo v večjem merilu. Zaradi hlapnosti EO, bi bila verjetno primernejša metoda hladnega dispergiranja, ki pa v začetni fazi prav tako vključuje segrevanje vzorca na povišano temperaturo. Pri izdelavi NLC smo se zato osredotočili predvsem na optimizacijo sestave sistema (izbira sestavin z nižjo temperaturo tališča), čemur smo nato prilagodili tudi metodo izdelave NLC. Običajno se za izdelavo NLC uporablja lipid glicerol monostearat (GMS), ki ima tališče med 54-66°C. Pri vgradnji EO težimo k izdelavi pri čim nižji temperaturi, da omejimo izgube EO zaradi hlapenja. Zato smo se odločili, da bomo izdelali še NLC, pri katerih bomo GMS zamenjali z lipidom z nižjim tališčem - trdo mastjo, ki se tali med 33-40 °C. Tako NLC na osnovi GMS kot NLC na osnovi trde masti smo najprej izdelali pri višji temperaturi (75°C), nato pa po

enakem postopku še pri nižji temperaturi (45°C). Poleg lipidov smo variirali tudi tip emulgatorja, ki pomembno vpliva na velikost kapljic in stabilnost nastale emulzije in posledično končno velikost NLC. Oba tipa NLC smo izdelali bodisi z uporabo Phospholipon-a 80 bodisi Phospholipon-a 80H, ki sta kemijsko fosfolipida. V preglednici VII so predstavljene njune glavne razlike.

Vsem izdelanim disperzijam smo izmerili velikost delcev, zeta potencial ter jih organoleptično ovrednotili. V fazi optimizacije sestave smo vse sisteme izdelali brez vgrajenega EO.

Preglednica VII: Glavne razlike med Phospholiponom 80 in 80 H

<b>PHOSPHOLIPON 80 (Ph 80)</b>	<b>PHOSPHOLIPON 80 H (Ph 80H)</b>
zmes fosfolipidov, ki vsebuje 76±3% fosfatidilholina in 3±3% lizofosfatidilholina	zmes hidrogeniranih fosfolipidov
trdna snov voskaste konsistence	prašek
rjavorumene barve	belorumene barve

Iz rezultatov (preglednica VIII) je razvidno, da je pri obeh temperaturah segrevanja za izdelavo NLC bolj primeren lipid trda mast, ki daje v kombinaciji z emulgatorjem Ph 80 najmanjše delce z ozko porazdelitvijo velikosti. Prav tako je zadovoljiva tudi absolutna vrednost ZP (-21 mV pri T=75°C), ki nakazuje na ustrezno fizikalno stabilnost disperzije. Večjo vrednost ZP smo sicer izmerili le pri izhodiščni kombinaciji GMS + Ph 80, ki pri 75°C prav tako omogoča izdelavo majhnih NLC z ozko porazdelitvijo velikosti, ne omogoča pa izdelave NLC pri 45°C, ki je primernejša za vgradnjo EO.

Če primerjamo disperzije izdelane pri različnih temperaturah (tj. 75°C in 45°C), lahko vidimo, da znižanje temperature pri formulaciji z GMS znatno spremeni lastnosti disperzije. Velikost delcev se zelo poveča, prav tako vrednost PI z 0,301 (pri 75°C) naraste na 1 (pri 45°C), kar kaže na nastanek disperzije z zelo neenakomerno velikimi delci. To je sicer v skladu s pričakovanji, saj se glede na temperaturo tališča GMS (55) pri 45°C ni stalil. Iz preglednice VII je sicer razvidno, da je izdelava NLC pri 45°C pri vseh disperzijah vplivala na nekoliko večjo velikost delcev. Poleg nepopolnega taljenja bi razlog za to lahko bilo tudi nepopolno raztapljanje posameznih sestavin (ker smo jih združevali pri nižji temperaturi) in nekoliko višja viskoznost disperzije. Pri nižji temperaturi smo

izmerili tudi nižjo absolutno vrednost ZP, kar nakazuje na nekoliko drugačno razporeditev posameznih sestavin na površini delcev in slabšo fizikalno stabilnost disperzij.

GMS je po literaturnih podatkih najpogostejša sestavina za izdelavo NLC-jev, zato je zanimiv podatek, da v našem primeru trda mast v kombinaciji s Ph 80 izkazuje boljše rezultate (tj. manjša velikost delcev in absolutno večji ZP).

Pri nižji temperaturi trda mast zagotovo izkazuje boljše lastnosti zaradi nižje temperature tališča v primerjavi z GMS, pri višji temperaturi pa so razlike med obema lipidoma relativno majhne. Zavedati pa se je potrebno, da je končna stabilnost formulacije odvisna tudi od načina oz. hitrosti rekristalizacije trdnega lipida znotraj NLC ogrodja, česar v tej raziskavi nismo proučevali oz. upoštevali pri izbiri lipida (65).

Boljša učinkovitost fosfolipida Ph 80 v primerjavi s Ph 80H je prav tako verjetno povezana z nižjo temperaturo faznega prehoda prvega, saj Ph 80 vsebuje kar 65% večkrat nenasičene linolenske kisline, medtem ko je Ph 80H hidrogeniran in vsebuje nasičene maščobne kisline (približno 85 % stearinske in 15 % palmitinske kisline). Oba sta sicer negativno nabita in dajeta disperziji NLC negativni naboj, kar potrjuje negativna vrednost ZP.

Preglednica VIII: Pregled kombinacije sestavin in rezultati meritev na Zeta sizerju pri optimizaciji NLC

TEMPERATURA	KOMBINACIJA SESTAVIN				IZGLED	VELIKOST DELCEV (nm)	PI	ZP (mV)	PREVODNOST (mS/cm)
	GMS	TRDA MAST	PH 80	PH 80H					
75°C	X		X		bel moten vzorec	222,4± 0,7071	0,301 ± 0,002	-23,6	0,121
	X			X	zelo gost, penast vzorec	nismo izmerili zaradi prevelike konsistence vzorca			
		X	X		bel moten vzorec	208,4± 3,606	0,276 ± 0,001	-21,6	0,103
		X		X	bel moten videz	307,2 ± 5,3	0,271 ± 0,011	-21,6	0,07
45°C	X		X		bel, gost moten vzorec	1317±222	1 ± 0	nismo izmerili zaradi prevelike konsistence vzorca	
		X	X		bel moten vzorec	279,4± 2,192	0,261 ± 0,009	-17	-1,331
		X		X	bel, penast vzorec	353±7,849	0,403±0,016	nismo izmerili zaradi prevelike konsistence vzorca	

Glede na fizikalne lastnosti in pogoje izdelave se je tako kot optimalna izkazala disperzija, ki vsebuje lipid trdo mast in emulgator Ph 80; pri obeh temperaturah izdelave je bila vizualno bolj bistra (v primerjavi z ostalimi sistemi), nastali NLC pa so imeli najmanjšo velikost delcev, ustrezen PI ter primerno absolutno vrednost ZP (blizu |30|). Ker želimo, da je temperatura izdelave NLC med vgradnjo EO čim nižja, smo za izdelavo NLC z EO



izbrali temperaturo 45°C, ki še omogoča nastanek zadovoljivo stabilnih disperzij. V optimizirane NLC-je smo vgradili EO v koncentraciji 1 % in 2 %.

#### 4.1.2 IZDELAVA LIPOSOMOV

Liposome smo izdelali z injekcijsko metodo, ki omogoča izdelavo pri sobni temperaturi in je zato zelo primerna za izdelavo liposomov z vgrajenim EO. Kot je razvidno iz preglednice IX so nastali liposomi velikosti ~45 nm. Omenjena velikost liposomov se ujema z značilno velikostjo liposomov izdelanih z injekcijsko metodo, ki znaša 20-50 nm (66). PI je pri liposomih nekoliko večji ( $0,323 \pm 0,261$ ) kot pri ostalih dveh koloidnih sistemih, kar kaže na bolj heterodisperzen vzorec. ZP zajema vrednosti  $-50,6 \pm 1,6$ , kar ustreza teoretični podlagi o ustrezni fizikalni stabilnosti.

Preglednica IX: Vrednosti meritev liposomov in MR/NE ob času 0, meritve so potekale z napravo Zeta sizer

	Velikost delcev (nm)	PI	ZP (mV)
PRAZNI LIPOSOMI	$38,2 \pm 2,3$	$0,215 \pm 0,082$	$-50,6 \pm 1,6$
PRAZNA MR/NE	$239,5 \pm 1,14$	$0,151 \pm 0,452$	$-9,3 \pm 0,218$

#### 4.1.3 IZDELAVA MICELARNE RAZTOPINE / NANOEMULZIJE

Micelarno raztopino smo pripravili po klasičnem postopku z dodatkom EO k solubilizatorju Tween-u 20 in postopnim razredčevanjem z vodno fazo. Pri tem so nastali »miceli« velikosti ~ 240 nm, kar se bistveno razlikuje od pričakovanih vrednosti (pod 50 nm). Sklepamo, da je v omenjenem primeru nastala nanoemulzija, saj je po literaturnih podatkih le-te mogoče izdelati tudi z nizkoenergijskimi postopki emulgiranja (67). Glede na velikost nastalih kapljic sklepamo, da EO predstavlja notranjo fazo NE, ki je v obliki nanometrskih kapljic dispergirana v zunanji vodni fazi, medfaza pa je stabilizirana s kontinuiranim filmom površinsko aktivne snovi – Tween-a 20.

Vrednost ZP ob času 0 kaže na slabšo elektrostatsko stabilnost kot pri ostalih dveh koloidnih sistemih, kar lahko sčasoma vodi v združevanje delcev zaradi premalo naboja med posameznimi delci. PI ima sicer precej nizko vrednost, kar kaže na monodisperznost vzorca.

## **4.2 VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI KOLOIDNIH SISTEMOV**

Koloidnim sistemom (brez in z vgrajenim EO) smo v izbranih časovnih točkah (ob času 0, po dveh tednih in po štirih tednih) vrednotili fizikalno stabilnost. Vzorce smo med tem časom shranjevali pri sobni temperaturi, vsebnike pa smo vsak dan odprli za 1 minuto, s čimer smo posnemali tipično uporabo kozmetičnega izdelka. Spremljali smo spreminjanje velikosti delcev oz. kapljic ter PI in ZP disperzij koloidnih sistemov. Optimalen nosilni sistem naj bi vseboval delce čim manjših velikosti, ki izkazujejo ozko porazdelitev velikosti delcev in so čim večji naboj na površini. Zaželeno je, da se lastnosti koloidnih sistemov s časom čim manj spreminjajo.

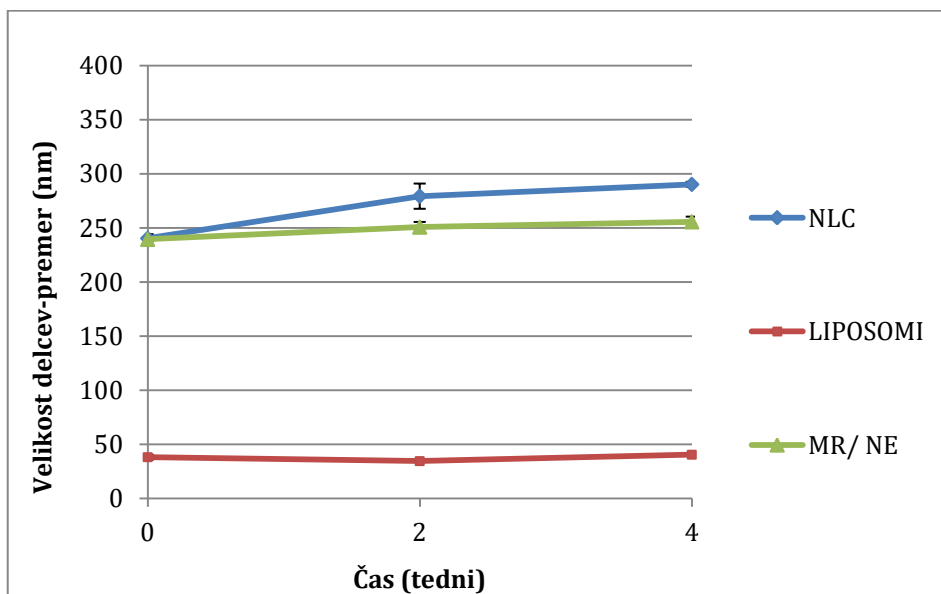
### **4.2.1 STABILNOST PRAZNIH KOLOIDNIH SISTEMOV**

Najprej smo preverjali stabilnost praznih koloidnih sistemov (brez dodanega EO poprove mete). Pridobljene podatke smo v nadaljevanju raziskovalnega dela uporabili za primerjavo s koloidnimi sistemi z vgrajenim EO, na osnovi česar smo ocenili vpliv vgradnje EO na velikost delcev in PI ter ZP, ki odražajo fizikalno stabilnost sistema. Vse koloidne sisteme smo izdelali po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2 (Metode).

#### **Velikost koloidnih nosilcev in polidisperzni indeks**

Velikost delcev (izražena kot hidrodinamski premer delcev) za posamezne koloidne sisteme je prikazana na sliki 13. Iz slike je razvidno, da izmed izdelanih koloidnih nosilcev najmanjšo velikost delcev izkazujejo liposomi (pod 50 nm), nastala disperzija pa je fizikalno stabilna in velikost liposomov ne narašča v odvisnosti od časa. Precej večje delce smo izmerili v disperziji NLC in vzorcu MR/NE (med 200-300 nm). Predvsem pri NLC smo zaznali naraščanje velikosti delcev v odvisnosti od časa shranjevanja vzorcev, kar bi sčasoma lahko vodilo v destabilizacijo sistema zaradi združevanja posameznih delcev. Za disperzije NLC je sicer značilno, da so fizikalno dokaj stabilne. Vzrok za večanje delcev s časom, bi lahko bila bodisi neoptimalna izbira sestavin (površina delcev je šibko nabita) bodisi postopek homogenizacije, ki smo ga uporabili za zmanjšanje in poenotenje kapljic emulzije med izdelavo NLC-jev (rotor-stator homogenizator). Ker so EO hlapna, bi bilo v prihodnosti smiselno izdelati NLC-je še z metodo hladnega dispergiranja. Tudi pri

MR/NE smo opazili rahlo naraščanje velikosti micelov/kapljic v odvisnosti od časa shranjevanja vzorcev. Kot smo že omenili v poglavju 4.1.3 je bil naš primarni cilj izdelati micelarno raztopino, glede na velikost kapljic pa lahko upravičeno sklepamo, da je nastala nanoemulzija. Za izdelavo stabilnejše nanoemulzije bi lahko nekoliko modificirali recepturo in poleg emulgatorja uporabili še ko-emulgator oz. izbrali drug postopek izdelave.



Slika 13: Velikost delcev koloidnih sistemov brez vgrajenega EO, spremljanje skozi čas (4 tedni). rezultati so podani kot SD, n=2

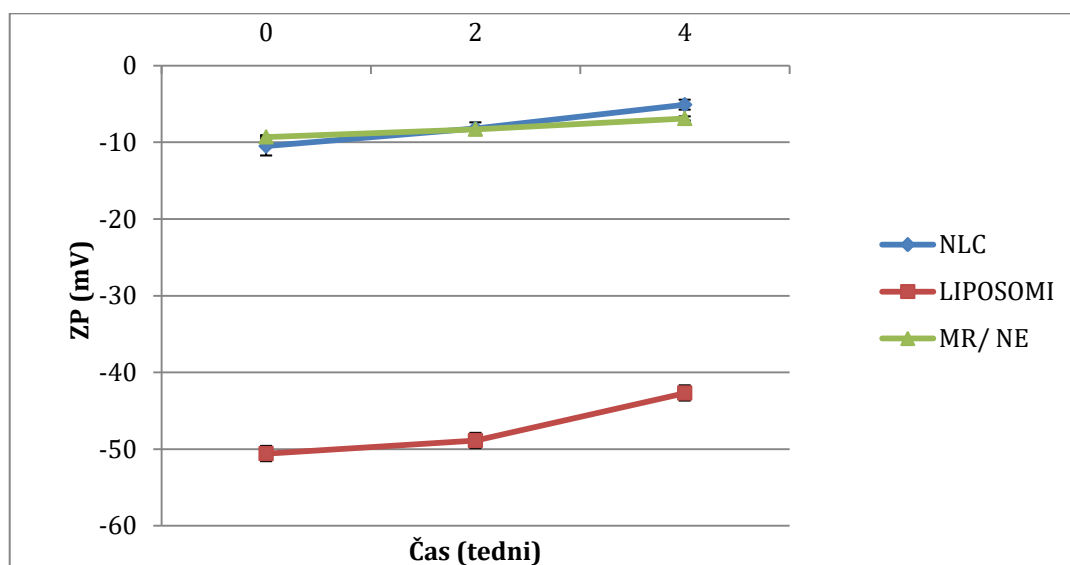
Vrednosti PI, ki smo jih določili na disperzijah praznih koloidnih sistemih, so prikazane v preglednici X. PI je v splošnem razmeroma nizek in je v primeru NLC in MR/NE pod 0,250, kar kaže na ozko porazdelitev velikosti delcev. O nekoliko večji heterodiperznosti sistema je sicer mogoče sklepati v primeru liposomov. Vrednost PI je v primeru disperzij NLC in liposomov praktično neodvisna od časa shranjevanja vzorcev. To kaže, da je porazdelitev velikosti delcev v obeh primerih še naprej relativno ozka in neodvisna od časa. Glede na naraščanje velikosti NLC s časom, smo sicer pričakovali, da se bo povečal tudi PI, vendar rezultati kažejo, da večji delci ne rastejo bistveno na račun manjših in je velikost NLC tudi po 1 mesecu staranja vzorcev homogena. Nasprotno v sistemu MR/NE PI narašča v odvisnosti od časa, čeprav je njegova vrednost tudi po 4 tednih pod 0,250. Ker rahlo narašča tudi velikost kapljic, slednje lahko nakazuje začetek Ostwaldove rasti kapljic.

Preglednica VIII: Vrednosti PI koloidnih sistemov brez vgrajenega EO v odvisnosti od časa hranjenja vzorcev.

	PI		
	ob času 0	čez 2 tedna	čez 4 tedne
NLC	0,215±0,082	0,231±0,072	0,222±0,663
LIPOSOMI	0,323±0,261	0,331±0,254	0,320±0,316
MR/NE	0,151±0,452	0,202±7,071	0,235±7,407

### Zeta potencial

Vrednost zeta potenciala (slika 14) se med posameznimi koloidnimi sistemi precej razlikuje. Pri liposomih je absolutna vrednost ZP visoka tako ob izdelavi kot po 1 mesecu, kar nakazuje na dobro fizikalno stabilnost sistema. Pri NLC in MR/NE je absolutna vrednost ZP precej manjša (okoli -10 mV) in se s časom še zniža (na okoli -5 mV), zato so odbojne sile med delci vse manjše. Ker smo za omenjene sisteme zaznali tudi naraščanje velikosti delcev oz. kapljic, lahko sklepamo, da so se posamezni delci začeli združevati, čeprav PI v primeru NLC tega (še) ne odraža.



Slika 14: Zeta potencial koloidnih sistemov brez vgrajenega EO, spremljanje skozi čas. Rezultati so podani kot povprečje ±SD (n=2)

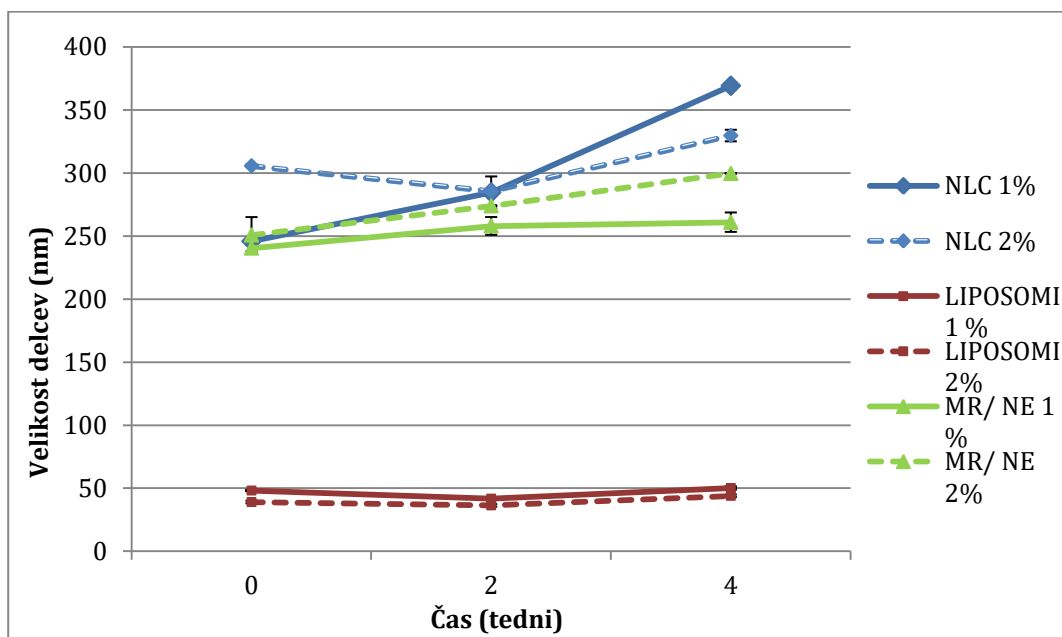
#### 4.2.2 VPLIV VGRADNJE EO NA STABILNOST KOLOIDNIH SISTEMOV

V koloidne sisteme: NLC, liposome, MR/NE smo vgrajevali EO v koncentracijah 1% ali 2%. Meritve smo izvajali v časovnih točkah: ob času 0, čez 2 tedna in čez 4 tedne shranjevanja vzorcev pri sobni temperaturi.

## Velikost delcev

Spremljali smo spreminjanje velikosti delcev skozi čas (skupaj največ 4 tedne). Rezultati so prikazani na sliki 15. Iz grafa je razvidno, da so tako kot v primeru praznih nosilcev tudi po vgradnji EO v 1 oz 2 % liposomi najmanjši izmed pripravljenih nosilcev, njihova velikost pa se s časom ne spreminja bistveno. Delci MR/NE in NLC so tudi po vgradnji EO precej večji od liposomov – ob izdelavi merijo med 250 in 300 nm, njihova velikost pa se s časom tudi v tem primeru večja. Glede na rezultate lahko sklepamo, da bo dolgoročno stabilna samo disperzija liposomov. V primerjavi s praznimi koloidnimi sistemi so delci z vgrajenim EO nekoliko večji, kar omenjajo tudi drugi raziskovalci (32).

Iz slike 15 je nadalje razvidno, da koncentracija vgrajenega EO v primeru liposomov ne vpliva na velikost delcev, medtem ko smo v primeru MR/NE opazili rahlo, v primeru NLC pa občutno povečanje delcev z 1% EO v primerjavi z liposomi. V primeru MR/NE je velikost kapljic z 2% EO s časom hitreje naraščala; možno je, da smo v tem primeru presegli kapaciteto vgradnje EO, zato je prišlo do destabilizacije sistema. V primeru disperzij NLC je v nasprotju s pričakovanji hitrejša naraščanje velikosti izkazoval vzorec z 1% EO.



Slika 15: Spremljanje velikosti delcev v koloidnih sistemih z vgrajenim EO v odvisnosti od časa, rezultati so prikazani kot povprečje  $\pm$ SD (n=2); NLC-nanostrukturirani lipidni nosilci, MR/NE-micelarna raztopina/nanoemulzija

PI proučevanih koloidnih sistemov je prikazan v preglednici XI. Pri večini proučevanih koloidnih sistemov z EO se vrednosti PI s časom precej spreminjajo, pri čemer je zanimivo, da se vrednosti PI manj spreminjajo pri vzorcih z 2% EO. V primerjavi s

praznimi nosilci se je ob času 0 PI najbolj povečal v primeru liposomov - z vrednosti okoli 0,300 na vrednost okoli 0,500 (Preglednica X in XI), čeprav se velikost liposomov z EO ne razlikuje bistveno od praznih liposomov in se s časom ne spreminja. V primeru disperzij NLC vgradnja EO v času izdelave ni bistveno vplivala na vrednost PI, s staranjem vzorcev pa se je PI povečal predvsem v primeru NLC z 1% EO, pri katerem smo zaznali tudi hitrejša naraščanja velikosti delcev. Vgradnja 1% EO v MR/NE je bistveno povečala PI sistema v primerjavi s praznim sistemom, medtem ko vgradnja 2% EO ni vplivala na homogenost disperzije. Skladno s hitrejšim naraščanjem velikosti kapljic z 2% EO je s staranjem naraščala tudi vrednost PI, medtem ko se je MR/NE z 1% EO z obeh vidikov izkazala kot najstabilnejši izmed proučevanih sistemov.

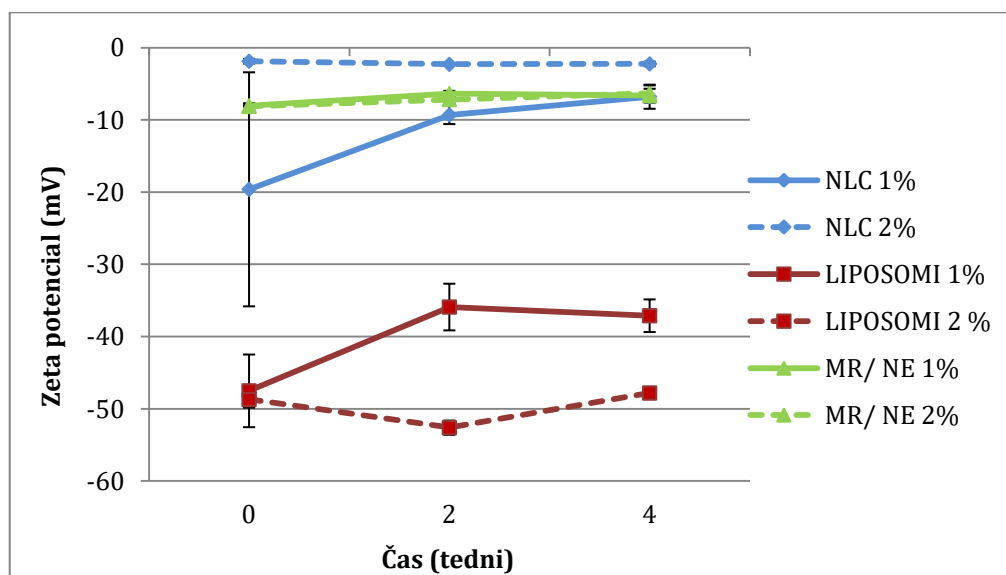
Preglednica IXI: Vrednosti polidisperznega indeksa (PI) za koloidne nosilne sisteme z vgrajenim EO v odvisnosti od časa; liposomi – LIP, nanostrukturirani lipidni nosilci – NLC, micelarna raztopina/nanoemulzija- MR/NE.

Tip sistema	t = 0	t =2 tedna	t = 4 tedni
NLC 1%	0,234 ± 0,004	0,359 ± 0,067	0,412 ± 0,011
NLC 2%	0,245 ± 0,006	0,204 ± 0,008	0,290 ± 0,003
LIP 1%	0,470 ± 0,070	0,356 ± 0,006	0,322 ± 0,046
LIP 2%	0,497 ± 0,006	0,502 ± 0,005	0,477 ± 0,006
MR/NE 1%	0,366 ± 0,059	0,242 ± 0,001	0,103 ± 0,031
MR/NE 2%	0,181 ± 0,035	0,207 ± 0,041	0,268 ± 0,012

### Zeta potencial (ZP)

ZP smo prav tako spremljali 4 tedne za posamezne koloidne sisteme (slika 16). V skladu z rezultati merjenja velikosti delcev največjo stabilnost izkazujeta formulaciji liposomov (z 1 in 2% EO), ki ostajata ves čas staranja elektrostatsko stabilni. Preostali sistemi imajo manjše absolutne vrednosti ZP, kar kaže na manj nabite delce v sistemu in slabšo fizikalno stabilnost. To se je sčasoma odražalo tudi v videzu vzorcev – disperzije NLC in MR/NE so postajale bolj motne, neprosojne.

Vgradnja EO je v splošnem povečala variabilnost rezultatov, kar je še zlasti očitno pri vzorcu NLC z 1% EO, pri katerem smo ob času 0 določili zelo velik odklon posameznih meritev, kar je lahko posledica specifičnega dogajanja v vzorcu ali napake pri meritvi. Če primerjamo posamezne koloidne sisteme z različno koncentracijo vgrajenega EO lahko vidimo, da vgradnja EO ne izkazuje enotnega vpliva na ZP delcev; medtem ko ima v primeru liposomov večjo absolutno vrednost ZP sistem z 2% EO, je pri NLC ravno obratno, saj ima sistem z 2% vgrajenega EO manjšo absolutno vrednosti ZP.



Slika 16: Spremljanje zeta potenciala za koloidne sisteme z vgrajenim EO v odvisnosti od časa. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$ SD (n=2); NLC-nanostrukturirani lipidni nosilci, MR/NE- micelarna raztopina/nanoemulzija

### 4.3 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z DPPH METODO

AOU smo najprej določili za različno koncentrirane raztopine EO: 0,5%, 1%, 2% (m/V). Nato smo meritve izvedli še za vse koloidne sisteme, v katere smo vgradili 1% ali 2% (m/V) EO. Meritve smo izvedli tako, da smo v kivetu združili raztopino DPPH radikala in raztopino EO oz. vzorca koloidnih sistemov z EO ter pomerili na UV/VIS spektrofotometru pri valovni dolžini 516 nm. Meritev smo izvedli vsako minuto, skupen čas merjenja pa je bil 120 minut. Na podlagi rezultatov smo primerjali razlike v antioksidativni učinkovitosti teh sistemov.

#### 4.3.1 STABILNOST DPPH RADIKALA

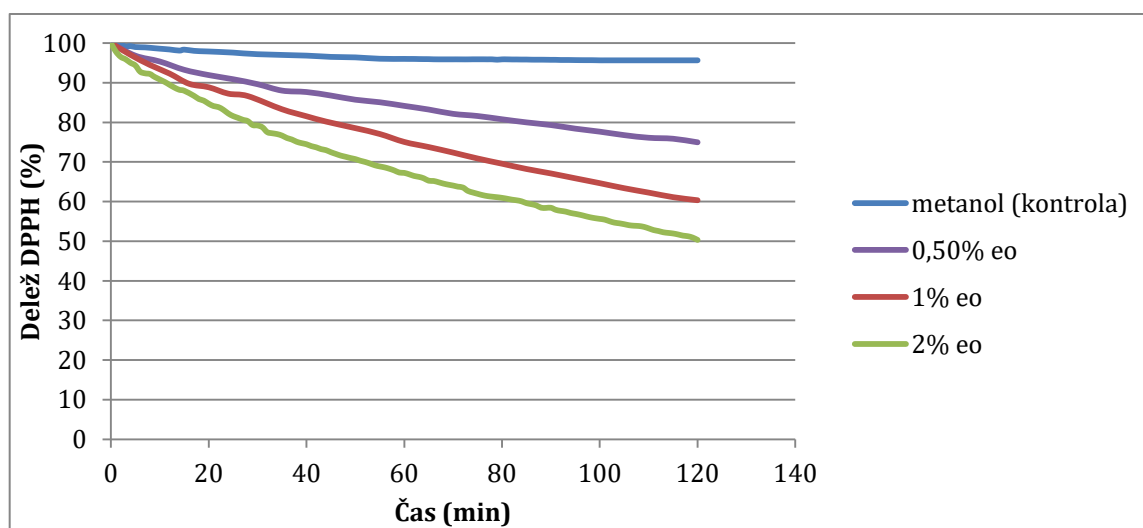
Pred prvim dodatkom spojine z antioksidativnim delovanjem smo želeli potrditi, da UV svetloba ne vpliva na razpad DPPH radikala. Zato smo reakcijsko zmes naredili tako, da smo 1500  $\mu$ L DPPH dodali 1500  $\mu$ L metanola (namesto raztopine AO). Cilj je, da je vrednost absorbance oz. koncentracije raztopine DPPH čim bolj konstantna in lahko s tem izključimo morebitno nestabilnost radikala, ki bi lahko vplivala na rezultate meritev. Slika 17 (glej modro krivuljo - metanol) prikazuje odvisnost deleža DPPH radikala v reakcijski zmesi od časa. Iz krivulje je razvidno, da izpostavljenost vzorca UV svetlobi nima

pomembnega vpliva na rezultate meritev, saj se delež DPPH v reakcijski zmesi po 120 minutah le minimalno zniža (za cca. 5%).

#### 4.3.2 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST ETERIČNEGA OLJA POPROVE METE

Za določanje AOU čistega EO poprove mete smo pripravili metanolne (v primeru NLC tudi etanolne) raztopine EO, koncentracij 0,5%; 1% in 2 % (m/V). Združili smo jih s sveže pripravljenimi raztopinami DPPH in spremljali absorbanco tako pripravljene reakcijske zmesi v izbranih časovnih točkah, skupaj 120 minut. Na podlagi pridobljenih podatkov smo izračunali delež DPPH radikala v odvisnosti od časa in rezultate predstavili na grafu.

Iz slike 17 je razvidno, da koncentracija EO vpliva na zmanjševanje deleža DPPH v reakcijski zmesi. Večja kot je koncentracija EO, hitreje poteka reakcija, več DPPH• se reducira kot posledica reakcije z EO poprove mete. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Polatoglu in sodelavci (68), ki so proučevali EO *Achillea vermicularis*, *A. teretifolia* in *A. biebersteinii* (Asteraceae). To je v skladu z našimi pričakovanji, saj rezultati potrjujejo AOU EO poprove mete.



Slika 17: Spremljanje deleža DPPH v odvisnosti od časa pri različnih koncentracijah eteričnega olja poprove mete. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$ SD (n=3)

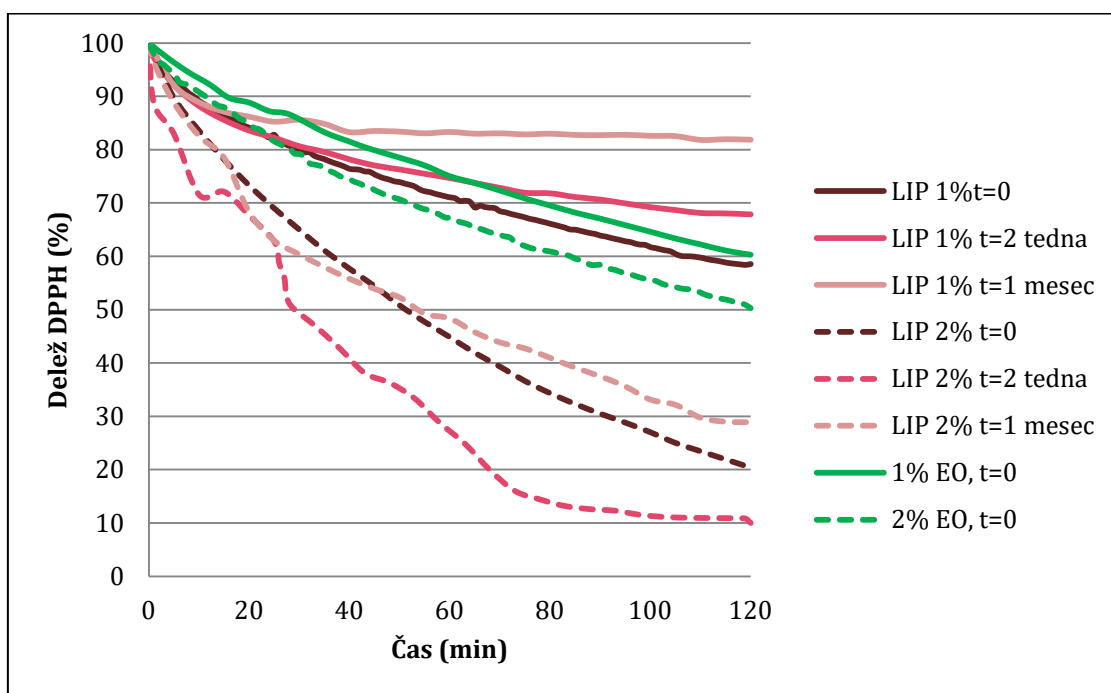


### 4.3.3 AOU EO POPROVE METE V KOLOIDNIH SISTEMIH

#### Liposomi

Na sliki 18 so prikazani liposomi s koncentracijami EO 1 in 2%, katerih AOU smo spremljali v obdobju 4 tednov. Na primeru liposomov z 1% EO je lepo vidna časovna odvisnost obsega redukcije DPPH radikala – obseg redukcije je tako najvišji ob času 0, nato pa pada. To je verjetno posledica izhlapevanja EO iz disperzije, zaradi posnemanja realnih pogojev shranjevanja vzorcev z vsakodnevnim odpiranjem vsebnikov. Pri vzorcu, ki smo ga starali 4 tedne, se krivulja ustali že po približno 40 minutah, kar kaže, da je v tem času reagiralo vso prisotno EO. Liposomi z 2% vgrajenega EO izkazujejo večjo AOU v primerjavi z liposomi z 1% EO, podobno je tudi pri metanolnih raztopinah EO (večja koncentracija EO, hitrejša pretvorba DPPH v reducirano obliko).

V primerjavi z enostavno metanolno raztopino EO (1% in 2%) z vgradnjo v liposome dosežemo primerljivo (liposomi z 1 % EO) oz. večjo (liposomi z 2% EO) AOU.



Slika 18: Spremljanje deleža DPPH v odvisnosti od časa pri liposomih z vgrajenim 1% in 2% EO. Zeleni krivulji prikazujeta čisto EO (nevgrajeno v koloidni sistem), topilo: metanol

#### Micelarna raztopina/ nanoemulzija

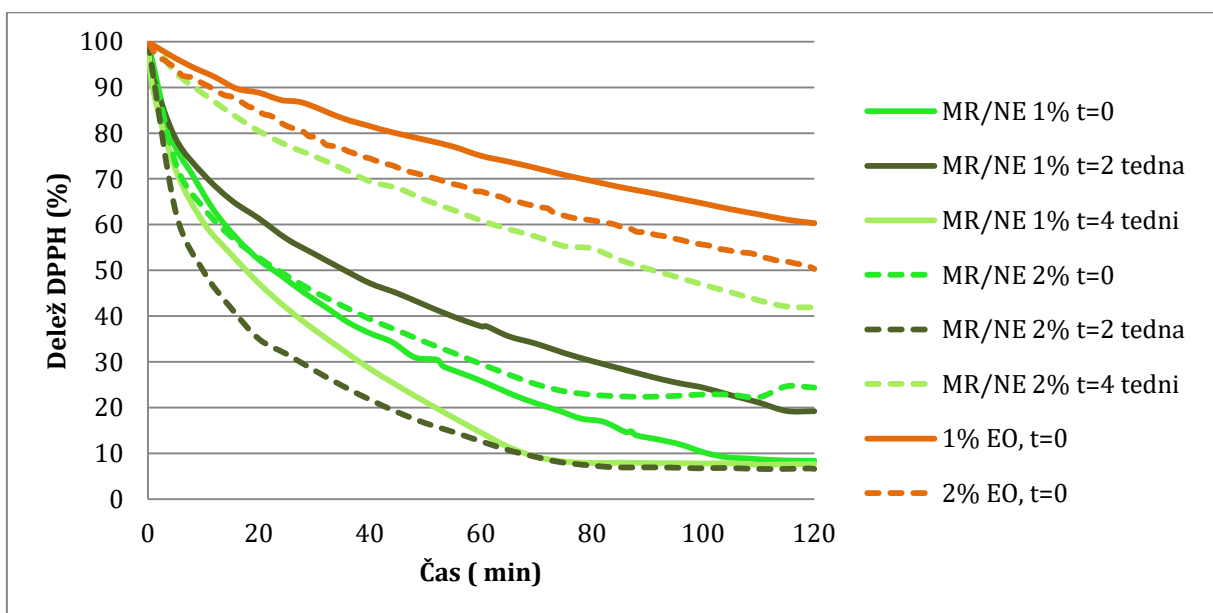
Slika 19 prikazuje spremljanje deleža DPPH odvisnosti od časa pri MR/NE. Z vgradnjo EO v MR/NE dosežemo značilno večjo AOU sistema v primerjavi z metanolno raztopino

EO enake koncentracije. Za MR/NE z EO smo tako zaznali hitrejši padec vsebnosti DPPH radikala; ob času 0 se pri MR/NE z 1% EO krivulja izravna po ~ 100 minutah, pri MR/NE z 2 % EO pa ~ 70 minutah. Čeprav MR/NE z 2% EO vsebuje dvakrat več EO, se oba vzorca v končnem obsegu redukcije DPPH radikala razlikujeta le za okoli 14 %.

Pri EO, ki niso vgrajena v koloidni sistem, delež DPPH pada počasneje; po 120 minutah še nismo bili v področju stacionarnega stanja. Občutna je tudi razlika v končnem obsegu redukcije DPPH radikala glede na MR/NE z EO, kar nakazuje, da je k AOU slednjih morda prispeva tudi solubilizator Tween 20, ki je poleg vode edina sestavina MR/NE. V literaturi res lahko zasledimo raziskave, ki omenjajo Tween 20 kot možno sestavino, ki lahko izkazuje antioksidativne lastnosti oz. sodeluje pri povečanju AOU. V raziskavi, ki je bila izvedena v okviru doktorske dizertacije na univerzi Massachusetts, A. Panya (69) omenja možno antioksidativno aktivnost Tween-a 20. Vrednotili so emulzije z različnimi koncentracijami Tween-a 20 (0, 0,1, 0,5, 1,0 in 2,5 %) in na podlagi pridobljenih rezultatov zaključili, da Tween 20 ne izkazuje antioksidativne aktivnosti. Zanimivo pa je, da se je pri emulzijah (O/V), ki so sicer tudi same izkazovale antioksidativno aktivnost, AOU povečala z večanjem koncentracije Tweena 20, kar je v skladu z našimi rezultati.

Richards s sodelavci (70) pa je poročal, da miceli Brijia 700 lahko povečajo antioksidativno aktivnost TBHQ (terciarni butilhidrokinon) v emulziji O/V (notranjo fazo je predstavljalo lososovo olje).

Če se osredotočimo na odvisnost AOU MR/NE z 1 oz. 2 % EO od časa shranjevanja vzorcev pri sobni temperaturi (z vsakodnevnim odpiranjem vsebnikov), vidimo, da so rezultati nekonsistentni. Na primeru MR/NE z 1 % EO tako vidimo, da AOU po 2 tednih hranjenja vzorcev pričakovano pade, po 4 tednih pa smo za isti vzorec določili še višjo AOU kot ob času 0, kar ni razumljivo. Podobno nekonsistentni so tudi rezultati za MR/NE z 2 % EO. Sklepamo, da je na meritve vplival še kakšen drug dejavnik. Glede na to, da sta omenjena sistema nakazovala določeno fizikalno nestabilnost, je možno, da je vzorec nehomogen in na rezultat AOU vpliva tudi mesto vzorčenja iz vsebnika.



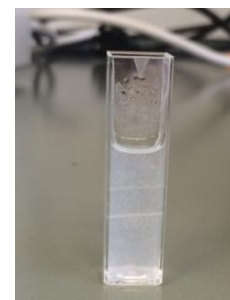
Slika 19: Spremljanje deleža DPPH v odvisnosti od časa pri micelarni raztopini/nanoemulziji (MR/NE) z 1 % ali 2 % vgrajenega EO. Oranžni krivulji prikazujeta čisto EO (nevgrajeno v koloidni sistem), topilo: metanol

## NLC

Za določanje AOU NLC-jev smo disperzijo slednjih najprej združili v reakcijsko zmes tako, da smo 1500  $\mu\text{L}$  disperzije NLC-jev dodali 1500  $\mu\text{L}$  raztopine DPPH. Zmes je postala zelo motna, s prisotnimi oborjenimi delci. Sklepali smo, da se ena od sestavin NLC-jev (najverjetneje trda mast) nezadostno raztaplja v metanolu. Želeli smo preveriti, ali lahko težavo rešimo z večjo količino topila, zato smo pripravili še reakcijske zmesi, ki disperzijo NLC in metanol vsebovale v naslednjih razmerjih: 500  $\mu\text{L}$  /2500  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$  /2600  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$  /2700  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  /2800  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  /2900  $\mu\text{L}$ .

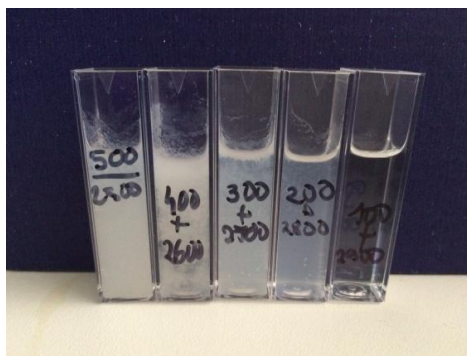
Zmes je tudi pri največji redčitvi (100  $\mu\text{L}$  NLC/2900  $\mu\text{L}$  metanola) ostala

motna z vidnimi oborjenimi delci (slika 20). V takšnem vzorcu merjenje absorbance (in posledično AOU) ni možno, saj prihaja do sipanja svetlobe na oborjenih delcih. Ker je prisotnost oborjenih delcev povezana z neustrezno topnostjo trde masti, smo metanol nadomestili z drugim topilom – etanolom, v katerem se trda mast nekoliko boljše raztaplja, po literaturnih podatkih pa se prav tako pogosto uporablja za izvedbo DPPH metode. Zopet smo pripravili več reakcijskih zmesi z različnim razmerjem med disperzijo NLC in etanolom, ki so prikazane na sliki 21. Začeli smo z najmanjšo redčitvijo (500  $\mu\text{L}$  NLC/2500  $\mu\text{L}$  etanola) in jo nato povečevali. Pri največji redčitvi (100  $\mu\text{L}$  NLC/2900  $\mu\text{L}$



Slika 20 : Disperzija NLC, ki smo jo redčili z metanolom (100  $\mu\text{L}$  NLC + 2900  $\mu\text{L}$  metanola ).

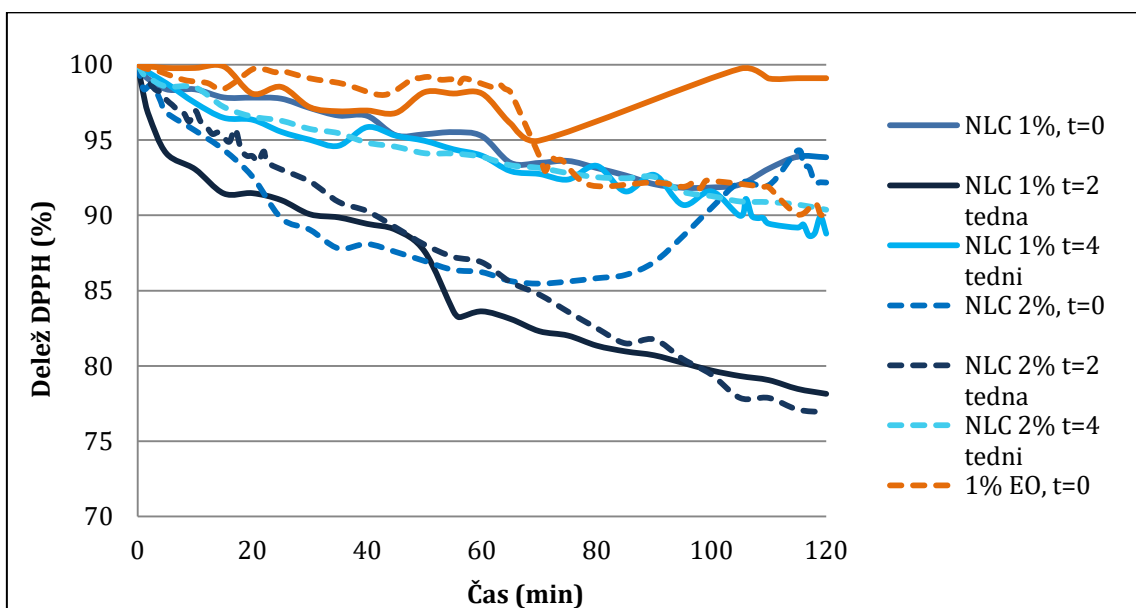
etanola) je bil vzorec bister – torej so se delci dobro raztopili. Ta redčitev je sicer precej večja kot pri ostalih koloidnih sistemih, kjer smo reakcijsko zmes pripravili iz 1500  $\mu\text{L}$  disperzije koloidnega sistema in 1500  $\mu\text{L}$  metanola. Kljub temu smo se odločili, da bomo poskusili določiti AOU za NLC z EO na podlagi te redčitve, zato smo izdelali novo umeritveno premico za etanolno raztopino DPPH, nato pa v reakcijski zmesi združili 2900  $\mu\text{L}$  etanolne raztopine DPPH in 100  $\mu\text{L}$  disperzije NLC.



Slika 21: Redčitve NLC z etanolom

Rezultati meritev (spremljanje deleža DPPH radikala v reakcijski zmesi v odvisnosti od časa) so prikazani na sliki 22.

Na podlagi rezultatov meritev, ki smo jih pridobili, ne moremo podati zanesljivih sklepov. Delež DPPH se je pri NLC z obema koncentracijama EO (1 in 2%) ves čas spreminjal. Takoj po dodatku etanola k disperziji NLC-jev je sicer nastala bistra raztopina, toda sčasoma je najverjetneje prišlo do delnega obarjanja trde masti, izločeni delci pa so motili meritve. Dejstvo je, da je trda mast le delno topna v brezvodnem etanolu (55), mi pa smo uporabili 96 % etanol. Neustrezni rezultati so deloma tudi posledica velike redčitve disperzije NLC z EO (100  $\mu\text{L}$  NLC/2900  $\mu\text{L}$  DPPH), zaradi česar je reakcijska zmes vsebovala bistveno manjšo količino koloidnega sistema (NLC) v primerjavi z ostalimi testiranimi vzorci. Slednje je verjetno tudi razlog za neponovljivost rezultatov v primeru določanja učinkovitosti vgrajevanja EO v NLC.



Slika 22: Spremljanje deleža DPPH v NLC z vgrajenim 1% IN 2% eteričnega olja poprove mete, redčeno 100/2900  $\mu\text{L}$ . topilo: etanol

Učinkovitost vgrajevanja 1% EO v NLC smo nameravali določati posredno – s primerjavo AOU supernatanta disperzije NLC po ultracentriranju (v katerem je prisotno nevgrajeno EO) in AOU enakega volumna celotne disperzije NLC. Na ta način bi relativno določili, kolikšen del EO se je vgradil v NLC.

Vzorec supernatanta smo pred meritvijo na UV/VIS spektrofotometru redčili po istem sistemu kot NLC, torej 100  $\mu\text{L}$  supernatanta/2900  $\mu\text{L}$  etanolne raztopine DPPH. Nato smo pomerili absorbanco pri valovni dolžini 516 nm. Ker je izmerjena koncentracija nevgrajenega EO presegala koncentracijo celotnega EO, učinkovitosti vgrajevanja nismo mogli določiti.

## 5 SKLEPI

Zaradi številnih pozitivnih učinkov (protibakterijsko, antioksidativno, protivnetno delovanje itd.) in nekaterih slabših intrinzičnih lastnosti (visoka hlapnost, slaba topnost v vodi) je vgrajevanje EO poprove mete v različne koloidne sisteme smiselno. Izdelali smo 3 različne nanosisteme: NLC-je, liposome in MR/NE, v katere smo vgradili različne koncentracije EO (1 in 2%).

V procesu optimizacije recepture za NLC sta se kot optimalni sestavini pokazala lipid trda mast in stabilizator Phospholipon 80. Z uspešno optimizacijo recepture smo znižali tudi temperaturo združevanja sestavin za izdelavo NLC (s 75 °C na 45°C, saj ima trda mast nižjo temperaturo tališča kot GMS).

Izmed pripravljenih koloidnih nosilcev so najboljšo fizikalno stabilnost v disperziji izkazovali liposomi, kar smo določili s spremljanjem velikosti delcev, PI in ZP. Vgradnja večje koncentracije EO (2% vs. 1%) je le malo vplivala na povečanje velikosti delcev in ZP v primerjavi s praznimi liposomi. Skozi spremljano časovno obdobje (1 mesec) se je velikost liposomov ohranjala, absolutna vrednost ZP pa padala. Pri NLC-jih in MR/NE je v nasprotju s pričakovanji hitrejše naraščanje velikosti izkazoval vzorec z 1 % EO. ZP teh dveh sistemov je variiral med 0 in -20 mV, kar pomeni, da je naboja na površini delcev oz. kapljic precej manj kot pri liposomih. S časom so se vrednosti ZP ustalile v območju med 0 in -10 mV.

Z DPPH metodo smo potrdili, da z večanjem koncentracije metanolne raztopine EO, narašča tudi AOU raztopine. Ko EO vgradimo v koloidne sisteme, večja koncentracija EO ne kaže nujno tudi na večjo AOU sistema. Domnevamo, da lahko na AOU vpliva tudi katera izmed sestavin koloidnih sistemov oz. je v primeru slabše topnosti sestavin v topilu v procesu merjenja težje določiti AOU (npr. pri NLC). V splošnem se je MR/NE izkazala kot dober nosilec za EO poprove mete, sledijo pa liposomi. NLC-jem z uporabljeno metodo nismo uspeli zanesljivo določiti AOU zaradi nezadovoljive topnosti lipida (trda mast) v topilih (metanol oz. etanol), zato njihove AOU ne moremo primerjati z ostalima nosilcema. Zaradi neprimernosti DPPH metode za vrednotenje sistemov s trdno mastjo tudi nismo uspeli določiti učinkovitosti vgrajevanja EO v NLC.

V prihodnosti bi bilo smiselno preizkusiti tudi druge koloidne dostavne sisteme za vgradnjo EO ter tudi druge metode izdelave le-teh. Prav tako bi bilo smiselno uporabiti

širši spekter metod (tako *in vitro* kot *in vivo*) za določanje AOU koloidnih dostavnih sistemov z EO .

## 6 LITERATURA

1. Rao P.S.V, Pandley D: Extraction of essential oil and its applications. Poročilo o projektu. Pridobljeno: 20.8.2016, [http://ethesis.nitrkl.ac.in/4292/1/Extraction\\_of\\_Essential.pdf](http://ethesis.nitrkl.ac.in/4292/1/Extraction_of_Essential.pdf). 2006.
2. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer R.L: Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*. 2012; 3: 1-21.
3. Janeš D, Ilaš J, Tomašič T et al. : Znanstveno-kritičen pogled na komplementarno in alternativno medicino II. [ured.] Nina Kočevar Glavač in Alenka Zvonar Pobirk. 2016.
4. Asbahani A, Miladi K, Badri W et al.: Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, 483: 220-243.
5. Namestnik Rak M: Biokemija in farmakognozija. Višješolski učbenik. 2013.
6. SCCS (Scientific committee of consumer safety). Opinion on fragrance allergen in cosmetic products, 26.-27. junij 2012.
7. Uredba(ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in sveta. [Elektronski] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:sl:PDF>. Dostop: 15.7.2016
8. Maryam I, Huzaifa U, Hindatu H, Zubaida S: Nanoencapsulation of essential oils with enhanced antimicrobial activity: A new way of combating antimicrobial Resistance. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2015, 4 (3): 165-170.
9. Aburjai T, Natsheh M.F: Plants used in cosmetics. *Phytotherapy research*, Wiley Interscience. 2003, 17: 978-1000.
10. Falcao D.Q, Mourao S. C et al.: Challenges in development of essential oil nanodelivery systems and future prospects, Ch. 23. [ured.] Jitendra Naik. *Nano Based Drug Delivery*. IAPC Publishing, 2015, 557-578.
11. Babar A, Naser A, Shams S, Ahamad A et al: Essential oils used in aromatherapy: A systematic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015, 5(8): 601-611.
12. Singh R, Shushni M, Belkheir A: Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, 8: 322-328.
13. Skalicka-Wozniak K, Walasek M: Preparative separation of menthol and pulegone from peppermint oil high-performance counter-current. *Phytochemistry Letters*. 2014, 10: 94-98.



14. Riachi L.G, De Maria C: Peppermint antioxidants revisited. *Food Chemistry*. 2015, 176: 72-81.
15. Alam M.S, Roy P.K, Miah A.R et al: Efficacy of Peppermint oil in diarrhea predominant IBS – A double blind randomized placebo - controlled study. *Mymensingh Medical Journal*. 2013, 22: 27-30.
16. Khanna R, MacDonald J.K, Levesque B.G: Peppermint oil for the treatment of irritable bowel syndrome: A systemic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2014, 48: 505-512.
17. Janeš D, Kočevar Glavač N et al.: *Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora*. 1. izdaja, Širimo dobro besedo, d.o.o, 2015, 343-344.
18. Pedro A, Santo I, Silva C.V et al.: The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. [ured.] A. Méndez-Vilas. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science technology and education*. Formatex Research center, 2013, 1364-1374.
19. Solorzano-Santos F, Miranda-Novales M.G: Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, 23: 136-141
20. Trojak A, Kristl J: Antioksidanti: aktivne sestavine kozmetičnih izdelkov. *Farmacevtski Vestnik*. 1999, 50: 443-453.
21. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A: Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2013, 19: 29-43.
22. Kristl J, Zvonar A: Nanoinkapsuliranje v živilski industriji: metode in prednosti. *Prispevek na konferenci*. 2012, 31-47
23. Kristl J, Kokol D, Šmid-Korbar J: Trdni lipidni nanodelci: izdelava, vrednotenje in možnosti za dostavo učinkovin. *Farmacevtski vestnik*. 1997, 48. 123-131.
24. Pardeike J, Hommos A, Müller R.H: Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, 366: 170-184.
25. Fathi M, Mozafarib M.R, Mohebbi M: Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*. 2012, 23: 13-27.
26. Bilia A.R, Bergonzi M.C, Guccione C et al.: Vesicles and micelles: Two versatile vectors for the delivery of natural. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016, 32: 241-255.

27. Mukherjee B, Patra B, Layek B, Mukherjee A: Sustained release of acyclovir from nano-liposomes and nano-niosomes: An in vitro study. *International Journal of Nanomedicine*. 2007, 2. 213-225.
28. Gulati M, Grover M, Singh S et al: Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998, 165: 129-168.
29. Immordino M.L, Dosio F, Cattel L: Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*. 2006, 3: 297-315.
30. <https://www.google.si/search?q=liposomi+slika&espv=2&biw=1517&bih=714&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwiDleiXu-HOAhXCEywKHUf8CeoQsAQIIA&dpr=0.9#imgsrc=NOYCbylBBaEbaM%3A>.  
Dostopano: 15.7.2016
31. Batzri S, Korn E.D: Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1973, 298 (4): 1015-1019.
32. Jaafar-Maalej C, Diab R, Andrieu V et al: Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *Journal of Liposome Research*. 2010, 20 (3): 228-243.
33. Maherani B, Arab-Tehrany E, Mozafari M.R, Gaiani C, Linder M: Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience*. 2011, 7(3): 436-452.
34. Sherry M, Charcosset C, Fessi H et al: Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *Journal of Liposome Research*. 2013, 23(4): 1-8.
35. Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/Micelle>. Dostopano: 1.8.2016
36. Dominguez-Villegas V, Clares-Naveros B, Garcia-Lopez M.A et al: Development and characterisation of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, 116: 183-192.
37. Zulli F, Belser E, Schmid D, Liechti C, Suter F: Preparation and properties of coenzyme Q10 nanoemulsions. *Cosmetic Science Technology*. 2006, 40-46.
38. Solans C, Sole I: Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2012, 17(5): 246-254.

39. Wollinger A, Perrin E, Chahboun J, Jeannot V et al.: Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus Officinalis L.* leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie*. 2016, 19(6): 1-12.
40. Gašperlin M, Gosenca M: Main approaches for delivering antioxidant vitamins through the skin to prevent skin ageing. *Expert opinion in drug delivery*. 2011, 8(7): 1-15.
41. Osredkar J: Oksidativni stres. *Zdravstveni vestnik*. 2012, 81: 393-406.
42. De S, Adhikari S, Tilak-Jain J, et al. Antioxidant activity of an aminothiazole compound: Possible mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*. 2008, 173(3): 215-223.
43. Zvezdanovic J, Daskalova L, Yancheva D, Cvetkovic D, et al: 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones as novel and promising lipid peroxidation inhibitors. *Monatsh Chem*. 2014, 154: 945–952.
44. Dawidowicz A.L, Wianowska D, Olszowy M: On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*. 2012, 131(3): 1037-1043.
45. <https://en.wikipedia.org/wiki/DPPH#/media/File:DPPH.svg>. [Dostopano: 10. avgust 2016.]
46. Huang D, Ou B, Prior R.L: The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53(6): 1841-1856.
47. Alam M.N, Bristi N.J, Rafiquzzaman M: Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, 21: 143-152.
48. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol*. 2004, 26(2): 211-219.
49. Carmona-Jiménez Y, García-Moreno M.V, Igartuburu J.M, Barroso C.G: Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2014, 165: 198-204.
50. Sendra J.M, Sentandreu E, Navarro J. L: Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *Eur Food Res Technol*. 2006, 223(5): 615-624.
51. Locatelli M, Gindro R, Travaglia: Study of DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*. 2009, 114(3): 889-897.

52. Villano D, Fernandez-Pachon M.S, Troncoso A.M, Garcia-Parrilla M.C: Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta*. 2005, 538(1-2):391-398.
53. Sánchez-Moreno C: Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. 2002, 8(3): 121-137.
54. Marangoni de Oliveira G, Badan Ribeiro A.P, Oliveira dos Santos A et al: Hard fats as additives in palm oil and its relationships to crystallization process and polymorphism. *Food Science and Technology*. 2015, 63(2): 1163-1170.
55. European Pharmacopoeia 8.0 vol.2. s.l. : Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia, 2014. str. 2355-2356, 2386- 2387, 3052-3054.
56. Rowe R.C, Sheskey P.J, Quinn M.E: Handbook of Pharmaceutical Excipients. Sixth Edition. London, Washington : Pharmaceutical Press in American Pharmacists Associations, 2009. str. 308-310, 304-305, 662-663.
57. Chemical book. Glyceryl monostearate. [Dostopano: 13. junij 2016.]  
[http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB4234694.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4234694.htm).
58. Prospector. MIGLYOL® 812 N (F). [Dostopano: 13. junij 2016.]  
<https://www.ulprospector.com/en/la/PersonalCare/Detail/29670/557895/MIGLYOL-812-N-F>.
59. Baumgartner S, Zvonar A. Kozmetični izdelki I: vaje in teoretične osnove: univerzitetni študijski program Kozmetologija. Ljubljana, 2013. str. 52.
60. Company, American Lecithin. Phospholipon 80. [Dostopano: 13. junij 2016.]  
[http://www.americanlecithin.com/TDS/TDS\\_80.PDF](http://www.americanlecithin.com/TDS/TDS_80.PDF).
61. GmbH, Phospholipid. Phospholipon 80 H. 2007.  
[http://www.americanlecithin.com/TDS/TDS\\_80H.PDF](http://www.americanlecithin.com/TDS/TDS_80H.PDF). [Dostopano: 13. junij 2016.]
62. Spectrum Chemical Mfg Corp.  
<https://www.spectrumchemical.com/chemicals/Poloxamer>. [Dostopano: 1. avgust 2016.]
63. Wikipedia.  
[https://www.google.com/search?q=holesterol&espv=2&biw=1242&bih=545&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjrzI-Q0ajOAhWsAMAKHRTBDN4Q\\_AUIBigB&dpr=1.1#tbm=isch&q=cholesterol&imgrc=d3N0YNDXMI3gmM%3A](https://www.google.com/search?q=holesterol&espv=2&biw=1242&bih=545&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjrzI-Q0ajOAhWsAMAKHRTBDN4Q_AUIBigB&dpr=1.1#tbm=isch&q=cholesterol&imgrc=d3N0YNDXMI3gmM%3A). [Dostopano: 4. avgust 2016].

64. Sigma-Aldrich. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. [Elektronski] [Dostopano: 13. junij 2016.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d9132?lang=en&region=SI>.
65. Ahlin Grabnar P, Zajc N, Kristl J: Improvement of ascorbyl palmitate stability in lipid nanoparticle dispersions for dermal use. *Journal of drug delivery science and technology.*, 2006, 16(6): 443-448.
66. Zhang Y, Čeh B, Lasic D: *Liposomes in Drug Delivery*. [ured.] Severian Dumitriu. *Polymeric Biomaterials*. Marcel Dekker Inc, New York, druga izdaja. 2002, poglavje 29: 783-821.
67. Solans C, Solé I: Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2012, 17(5): 246-254.
68. Polatoglua K, Karakoc Ö.C, Görenc N: Phytotoxic, DPPH scavenging, insecticidal activities and essential oil composition of *Achillea vermicularis*, *A. teretifolia* and proposed chemotypes of *A. biebersteinii* (Asteraceae). *Industrial Crops and Products* . 2012, 51: 35-45.
69. Panya Atikorn. *Strategies to Improve the Performance of Antioxidants in Oil-in-Water Emulsions*. Dissertations. 2012. str. 89-93.
70. Richards M. P et al.: Ability of surfactant micelles to alter the partitioning of phenolic antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002, 50: 1254-1259.
71. Zelišča Cvetka. <http://zelisca-cvetka.si/poprova-meta-mentha-x-piperita/>. [Dostopano: 17.8.2016 ]
72. Wikiwand. <http://www.wikiwand.com/pl/Mentol>. [Dostopano: 17.8.2016 ]
73. Wikimedia Commons. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:\(%2B\)-Menthone\\_structure.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:(%2B)-Menthone_structure.svg). [Dostopano: 17.8.2016]