

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA MEKE

**IZDELAVA IN VREDNOTENJE LIPIDNIH NANOSISTEMOV Z
RESVERATROLOM**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA MEKE

**IZDELAVA IN VREDNOTENJE LIPIDNIH NANOSISTEMOV Z
RESVERATROLOM**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF RESVERATROL-
LOADED LIPID NANOSYSTEMS**

Ljubljana, 2014

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar.

Zahvala:

Za vso strokovno pomoč, usmerjanje in potrpežljivost se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar in za strokovno pomoč doc. dr. Alenki Zvonar.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in fantu Nejcu za vso podporo in spodbudo tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar.

Andreja Meke

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj

Člani komisije: doc. dr. Mojca Lunder

Vsebina

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1 UVOD	1
1.1 NANOSISTEMI	1
1.1.1 Trdni lipidni nanodelci	1
1.1.2 Nanostrukturirani lipidni nosilci	3
1.1.3 Nanoemulzije.....	5
1.1.4 Liposomi	6
1.2 IZDELAVA NANOSISTEMOV.....	7
1.3 RESVERATROL	8
1.4 RAZISKAVE VGRAJEVANJA RESVERATROLA V NANOSISTEME	9
1.4.1 Trdni lipidni nanodelci	10
1.4.2 Nanostrukturirani lipidni nosilci	11
1.4.3 Nanoemulzije.....	12
1.4.4 Liposomi	12
2 NAČRT DELA.....	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Lipidne snovi.....	14
3.1.2 Površinsko aktivne snovi.....	15
3.1.3 Učinkovina	15
3.1.4 Topila	16
3.2 METODE.....	16
3.2.1 Izdelava nanosistemov	16
3.2.2 Fizikalno vrednotenje nanosistemov	19
3.2.3 Določanje učinkovitosti vgrajevanja resveratrola v nanosisteme z UV-VIS spektrofotometrijo	
21	
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	22

4.1	Izdelava in vrednotenje nanosistemov	22
4.1.1	Optimizacija sestave SLN z 2% RSV in vpliv posameznih komponent	26
4.2	Fizikalna stabilnost disperzij nanodelcev v času shranjevanja.....	27
4.3	Umeritvena krivulja in centrifugiranje.....	31
4.3.1	Umeritvena krivulja	31
4.3.2	Centrifugiranje in priprava vzorcev	32
4.4	Učinkovitost vgrajevanja.....	32
4.4.1	Absorbanca posameznih komponent in komponent v kombinaciji z RSV	35
4.5	DSC analiza.....	36
5	SKLEP.....	41
6	LITERATURA.....	42

POVZETEK

Resveratrol (RSV) je neflavonoidni polifenol, ki ga v glavnem najdemo v rdečem grozdju. Je močan antioksidant, ki je s svojimi koristnimi učinki na človeško telo pritegnil pozornost raziskovalcev iz različnih področij. Poleg antioksidativnega delovanja, mu pripisujejo tudi protivnetno, kardioprotektivno in kemoprotektivno delovanje ter upočasnitev staranja. V zadnjih letih je poleg prehranskih dopolnil postal zanimivejši tudi na področju dermalne uporabe. Prav tako na področju dermalne uporabe narašča zanimanje za nanosisteme, tako v kozmetiki kot v farmaciji. Le-ti omogočajo bolj učinkovito dostavo učinkovin v globlje plasti kože ter zaščito učinkovine pred zunanjimi vplivi in posledično pred razpadom.

V magistrskem delu smo raziskovali štiri različne nanosisteme, in sicer: trdne lipidne nanodelce, nanostrukturirane lipidne nosilce, nanoemulzije in liposome. Nanosisteme brez učinkovine, kot tudi nanosisteme z resveratrolom smo izdelali z metodo vroče visokostržne homogenizacije. Velikost nanosistemov se po vgraditvi resveratrola ni bistveno spremenila. V času shranjevanja 30 dni se velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial nanosistemov brez resveratrola ter nanoemulzij in nanostrukturiranih lipidnih nosilcev z resveratrolom niso bistveno spremenili, kar kaže na njihovo dobro fizikalno stabilnost. Trdni lipidni nanodelci in liposomi z resveratrolom so se izkazali za fizikalno nestabilne disperzne sisteme, saj se je po tridesetih dneh pojavila oborina.

Največjo učinkovitost vgrajevanja smo določili liposomom (78%), sledili so nanoemulzija (39%), trdni lipidni nanodelci (21%) in nanostrukturirani lipidni nosilci (17%). V nadaljevanju smo z DSC analizo dokazali, da se glicerol monostearat lahko nahaja v dveh polimorfnih oblikah, α in β . Z DSC analizo različnih fizikalnih zmesi smo potrdili, da se resveratrol ob prisotnosti Phospholipona 80H nahaja v amorfni obliki, prav tako se v amorfni obliki nahaja tudi v disperzijah nanosistemov.

ABSTRACT

Resveratrol is a non-flavonoid polyphenol which is principally found in red grapes. It is a strong antioxidant which has attracted a lot of attention of researchers from various fields due to its beneficial effects on human body. In addition to antioxidant activity it has attributed anti-inflammatory, cardioprotective, chemopreventive and antiaging activities. In recent years it has become more attractive in the field of dermal application beside use as a dietary supplement. There has also been increased interest for nanosystems in both cosmetics and pharmacy. Nanosystems are able of more effective delivery of active substance into deeper layers of the skin and can protect active substances from external influences and thus against degradation.

We have been investigating four different nanosystems i.e. solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, nanoemulsions and liposomes. Nanosystems with as well as without active substance were prepared with hot high-shear homogenization. Average diameter of nanostructures did not significantly change after resveratrol incorporation.

During 30 days of shelf time average diameter, polydispersity index and zeta potential have not significantly changed with nanosystems without resveratrol as well as with nanoemulsion and nanostructured lipid carriers with resveratrol, which indicates their good physical stability. Solid lipid nanoparticles and liposomes with resveratrol appeared to be physically unstable disperse systems, due to aggregation after thirty days.

Liposomes have the highest entrapment efficiency (78%), followed by nanoemulsion (39%), solid lipid nanoparticles (21%) and nanostructured lipid carriers (17%). Later we proved with DSC analysis that glycerol monostearate can be found in two different polymorphic forms, α and β . With DSC analysis of different physical mixtures, we also confirmed that resveratrol occurs in an amorphic form in presence of Phospholipon 80H as well as in disperse nanosystems.

SEZNAM OKRAJŠAV

C888	Compritol® 888 ATO (glicerilbehenat)
CD	ciklodekstrin
d	povprečni premer nanostruktur
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija
GMS	glicerol monostearat
L	liposomi
NE	nanoemulzija
NLC	nanostrukturirani lipidni nosilci (nanostructured lipid carriers)
P188	poloksamer 188, Lutrol F68®
P80H	Phospholipon 80H®
PAS	površinsko aktivna snov
PDI	polidisperzni indeks
RSV	resveratrol
SLN	trdni lipidni nanodelci (solid lipid nanoparticles)
UV	ultravijolična svetloba
VIS	vidna svetloba
ZP	zeta potencial
ZU	zdravilna učinkovina

1 UVOD

1.1 NANOSISTEMI

Ciljana dostava učinkovine na določen del organa je eno najbolj zahtevnih področij v farmaciji. Z razvojem koloidnih nosilcev učinkovin se je ponudilo veliko število potencialnih prednosti v vlogi dostavnih sistemov, kot je na primer boljša biološka uporabnost za slabo vodotopne učinkovine. Poleg nanoemulzij, nanosuspenzij, mešanih micelov in liposomov so bili razviti lipidni nanodelci, trdni pri sobni in telesni temperaturi (1). Velikost nanosistemov se giblje med približno 1nm in 1µm. Da lahko sistem označimo kot koloid, mora vsaj ena dimenzija delca pasti v to območje (2).

1.1.1 Trdni lipidni nanodelci

Trdni lipidni nanodelci (SLN) so bili razviti v začetku devetdesetih let kot alternativni nosilni sistem emulzijam, liposomom in polimernim nanodelcem. SLN so izdelani z nadomestitvijo tekočega lipida pri O/V emulzijah s trdnim lipidom ali zmesjo trdnih lipidov. SLN so sestavljeni iz 0,1-30% (w/w) trdnega lipida dispergiranega v vodnem mediju in iz 0,5-5% (w/w) površinsko aktivne snovi. Lipidni matriks delca je trden tako pri sobni, kot tudi pri telesni temperaturi (3).

SLN združujejo prednosti in se hkrati izognejo slabostim nekaterih drugih koloidnih nosilcev, kot so fizikalna nestabilnost, slaba zaščita vgrajene zdravilne učinkovine pred razgradnjbo, odsotnost prirejenega sproščanja in slaba toleranca. Razvite in temeljito ovrednotene *in vitro* in *in vivo* so bile SLN formulacije za različne poti aplikacije (parenteralna, peroralna, dermalna, okularna, pulmonalna, rektalna) (4).

Prednosti SLN:

- uporaba biološko razgradljivih fizioloških lipidov, ki zmanjša nevarnost za akutno in kronično toksičnost;
- izognemo se uporabi organskih topil med izdelavo;
- izboljšana biološka uporabnost slabo vodotopnih učinkovin;
- dostava učinkovine na točno določeno mesto ter večja penetracija učinkovine v kožo pri dermalni uporabi;

- zaščita kemijsko labilnih učinkovin pred razpadom v telesu in zunanjim okoljem.

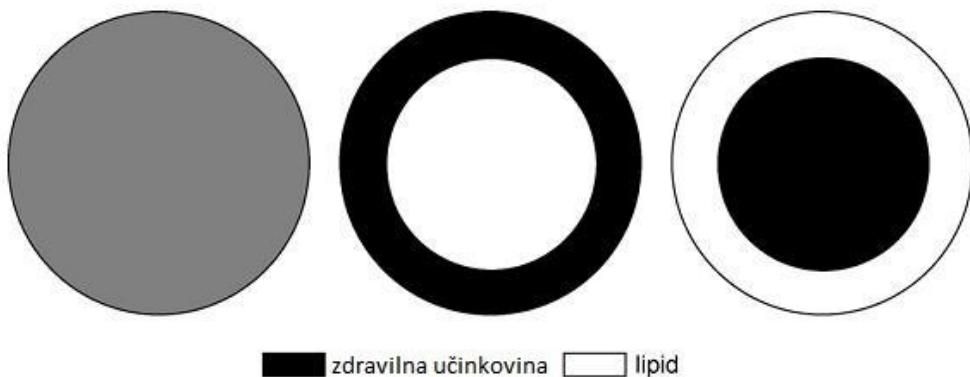
Slabosti SLN:

- slaba učinkovitost vgrajevanja učinkovin;
- izključitev učinkovine iz delcev s spremembo polimorfne oblike v času shranjevanja;
- relativno velika vsebnost vode v disperzijah (70-99,9%) (4).

Količina učinkovine, ki jo lahko vgradimo v SLN je omejena s topnostjo učinkovine v staljenem lipidu, strukturo lipidnega matriksa in polimorfno obliko lipidnega matriksa. Vgrajena učinkovina se lahko nahaja med verigami maščobnih kislin, med lipidnimi sloji in na področju kristalnih nepravilnosti. Če je lipidni matriks sestavljen iz izredno podobnih molekul (gliceriltristearat ali gliceriltripalmitat) ali visoko prečiščenih lipidov se tvori zelo urejena kristalna struktura z malo nepravilnostmi in s tem malo prostora za učinkovino (5). SLN so izdelani samo iz trdnih lipidov in po izdelavi le-ti kristalizirajo v višje energijske polimorfne modifikacije (α ali β'). Skozi shranjevanje se te modifikacije lahko transformirajo v nižjo energijsko in bolj urejeno β modifikacijo. Zaradi njene visoke stopnje urejenosti se zmanjša število nepravilnosti v kristalni mreži, kar vodi do izključitve učinkovine iz kristalne mreže. Z ustvarjenjem manj urejenega lipidnega matriksa, z mešanjem trdnega lipida s tekočim lipidom, lahko dosežemo večjo vgradnjo učinkovine v nanodelce (3).

Poznamo tri osnovne razporeditve aktivne komponente v lipidnem delcu (Slika 1). Katera od teh razporeditev bo nastala je odvisno od recepture (lipid, učinkovina, površinsko aktivne snovi, količina posameznih komponent) in pogojev izdelave nanodelcev (hladna ali vroča homogenizacija). Pri prvem tipu je učinkovina homogeno porazdeljena v matriksu delca. Učinkovina je lahko molekularno dispergirana ali pa je prisotna v obliki amorfnih skupkov. Takšen tip razporeditve nastane s hladno homogenizacijo ali ko vgrajujemo zelo lipofilne učinkovine v SLN z vročo homogenizacijo (6). S takšno porazdelitvijo učinkovine v SLN lahko dosežemo podaljšano sproščanje skozi več tednov (7). Za drugi tip je značilna razporeditev učinkovine na površini delcev. Za nastanek tega tipa je lahko odgovorna ločitev faz, ko pride do pretvorbe iz tekoče oljne kapljice v trden lipiden nanodelec med procesom ohlajanja. Iz O/V emulzije se najprej obori lipidno jedro, ki je praktično brez učinkovine. Istočasno se med nastajanjem lipidnega jedra koncentracija

učinkovine v preostalem, še tekočem, lipidu konstantno povečuje. Na koncu kristalizira še del lipida z učinkovino in tako nastanejo SLN z zdravilno učinkovino (ZU) na površini delcev (6). Zanje je značilno hitro sproščanje. Ta tip SLN je zaželen pri aplikaciji za dermalno uporabo, kjer potrebujemo povečano količino učinkovine za penetracijo, še posebno če hkrati potrebujemo okluzivni efekt, ki ga omogočijo lipidna jedra (8). Pri tretjem tipu pa se ZU nahaja v notranjosti delcev. To pomeni, da se najprej obori učinkovina in bo imela zunanja plast matriksa izrazito manj učinkovine. Posledica obarjanja v tem vrstnem redu je membransko nadzorovano sproščanje, ki ga narekuje Fickov zakon o difuziji (6). Nastanek takšne oblike SLN lahko opazimo, ko raztopljena učinkovina v lipidu doseže nasičeno topnost ali pa je le-tej zelo blizu (7).



Slika 1: Shematski prikaz možnosti vgrajevanja ZU v SLN: homogeno razporejena učinkovina po celotnem matriksu (levo), učinkovina je skoncentrirana na površini SLN (na sredini), učinkovina je skoncentrirana v notranjosti SLN (desno).

1.1.2 Nanostrukturirani lipidni nosilci

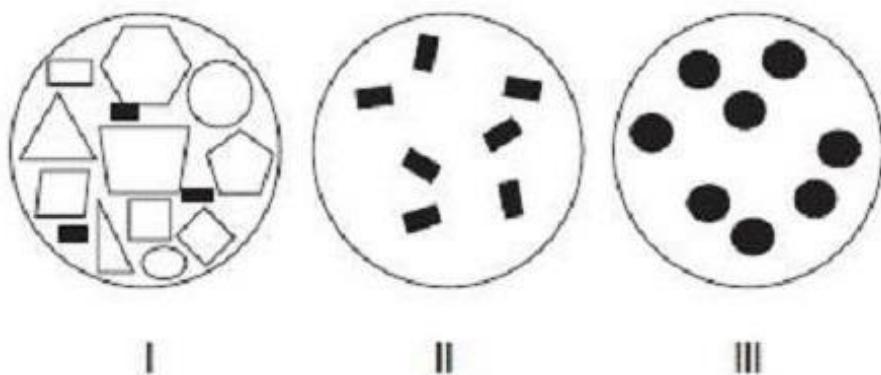
Nanostrukturirani lipidni nosilci (NLC) so bili razviti kot druga generacija tehnologije lipidnih nanodelcev. Razviti so bili z namenom premostitve nekaterih potencialnih omejitev povezanih s SLN. Delci so pripravljeni z uporabo zmesi trdnih in tekočih lipidov. Razmerje le teh se giblje od 70:30 pa tja do razmerja 99,9:0,1. Zaradi olja prisotnega v teh zmeseh lahko opazimo nižjo temperaturo tališča v primerjavi s samim trdnim lipidom. Nastali delci so trdni pri sobni in telesni temperaturi (3).

Prednosti druge generacije lipidnih nanodelcev v primerjavi s SLN so v povečani količini vgrajene aktivne komponente in čvrstejši vključitvi učinkovine v matriks delca skozi čas

shranjevanja. S tem se poveča tudi fizikalna stabilnost disperznega nanosistema. Uporaba zmesi s tekočim lipidom, z različno dolgimi molekulami, deformira urejenost trdnega lipida. Matriks delca vsebuje veliko nepravilnosti in tako omogoči dodaten prostor za ZU v molekularni obliki ali v obliki amorfnih skupkov (9). Učinkovine, ki izkazujejo višjo topnost v oljih kot v trdnih lipidih, so lahko raztopljlene v olju in hkrati z obdajajočim trdnim lipidom zaščitene pred razgradnjo (5).

V nasprotju s SLN, ki vsebujejo 70-99,9% vode, lahko izdelamo NLC disperzije z višjo vsebnostjo lipida. To nam olajša vključitev nanosistemov v končni produkt. NLC disperzija (na primer 40-50% trdne vsebine (w/w)) se lahko preprosto primeša v dermalno formulacijo izdelano z zmanjšano količino vode (3).

Kot pri SLN, tudi pri NLC poznamo več tipov NLC z vgrajeno učinkovino. Opisani so trije tipi, in sicer: (I) nepopoln tip, (II) amorfni tip in (III) večvrstni tip (Slika 2).



Slika 2: Tipi NLC z vgrajeno učinkovino: I-nepopoln tip, II-amorfni tip in III-večvrstni tip (črni deli v NLC predstavljajo ZU).

Nepopoln tip NLC nastane z mešanjem majhnih količin kemijsko zelo različnih tekočih in trdnih lipidov. S tem želimo doseči čim večjo nekompatibilnost, ki vodi do najvišjega vgrajevanja ZU. Nepravilnosti v kristalu prisrbijo zmesi različnih lipidov, na primer zmes gliceridov različnih maščobnih kislin. Med verigami maščobnih kislin nastanejo večje razdalje, če uporabimo gliceride z zelo različnimi maščobnimi kislinami. Matriks vsebuje nepravilnosti in s tem prostor, kjer se lahko nahaja učinkovina v molekularni obliki ali v obliki amorfnih skupkov. Amorfni tip NLC lahko dosežemo z mešanjem trdnih lipidov s posebnimi lipidi, kot sta na primer izopropilmiristat ali triglyceridi s srednje dolgimi verigami. Izključitev učinkovine, ki jo povzroči proces kristalizacije v β obliko tekom

shranjevanja, prepreči posebna struktura lipidnega matriksa, ki NLC ohrani v amornem in ne v kristaliničnem stanju. Tretji, večvrstni tip, lahko nastane, če za izdelavo uporabimo trden lipid, v katerem je učinkovina slabše topna in večjo količino tekočega lipida. Znano je, da je veliko učinkovin bolj topnih v tekočih lipidih kot v trdnih. Tako pri tem tipu združimo prednost trdnega matriksa, ki prepreči izključitev učinkovine in prednost tekočih predelov, ki so izkazali razmeroma visoko topnost za lipofilne učinkovine (7).

1.1.3 Nanoemulzije

Nanoemulzije (NE) so del široke skupine večfaznih koloidnih disperzij. Definiramo jih lahko kot emulzijski sistem z velikostjo kapljic med 30 in 300 nm. So prozorne ali prosojne disperzije olja v vodi ali vode v olju, ki so stabilizirane z medfaznim filmom emulgatorja in koemulgatorja. Nanoemulzije, ki vsebujejo kapljice večje od 100 nm so bele, tiste s kapljicami od 70 do 100 nm so opalescentne in tiste s kapljicami manjšimi od 70 nm so transparentne (10, 11).

S farmacevtskega stališča nanoemulzije predstavljajo izboljšano transdermalno in dermalno dostavo učinkovin v primerjavi s klasičnimi dostavnimi oblikami *in vivo* ter *in vitro*. Prav tako z njimi dosežemo večjo topnost v vodi slabo topnih učinkovin (10). Majhna velikost kapljic daje nanoemulzijam stabilnost proti razslojevanju ali sedimentaciji. Vendar pa so nanoemulzije v primerjavi z mikroemulzijami, ki so termodinamsko stabilne, neuravnotežen sistem, ki je lahko podvržen flokulaciji, koalescenci in/ali Ostwaldovi rasti. Vseeno lahko z ustrezno izbiro komponent, sestavo in metodo izdelave dosežemo nanoemulzije z visoko kinetično stabilnostjo. Splošno pa je sprejeto, da je glavni vzrok nestabilnosti pri nanoemulzijah Ostwaldova rast (12).

V primerjavi z mikroemulzijami so nanoemulzije bolj vzdržljive v pogojih destabilizacije kot sta redčenje in temperaturne spremembe. Redčenje mikroemulzije privede do zmanjšanja velikosti kapljic, medtem ko pri nanoemulzijah redčenje nima vpliva na velikost kapljic. Spremembe v temperaturi močno vplivajo na velikost kapljic mikroemulzij. Nanoemulzije imajo prednosti, kot so enostavna priprava, biokompatibilnost pomožnih snovi in manjša velikost kapljic (13). Za izdelavo mikroemuzij potrebujemo večje količine površinsko aktivnih snovi, v območju 20% in več. V nasprotju z izdelavo mikroemulzij, pri izdelavi nanoemulzij ne potrebujemo tako visokega odstotka površinsko aktivnih snovi. Zadostuje že 5-10% (14).

1.1.4 Liposomi

Liposomi (L) so sferični vezikli, ki jih oblikujemo s hidracijo fosfolipidov, ko jih zmešamo z vodo z majhno strižno silo. Fosfolipidi se uredijo v obliko dvoslojne membrane, katere konci se združijo in tvorijo vezikle. V sredini fosfolipidnega vezikla je tako prisotna voda. Liposomi so fleksibilni nosilci, ki lahko vsebujejo tako vodotopne kot tudi slabo vodotopne ali nevodotopne učinkovine hkrati. Postali so eni izmed najbolj raziskovanih farmacevtskih nanodostavnih sistemov za različne namene (15, 16).

Običajno so sestavljeni iz holesterola in fosfolipidov. Njihove fizikalno-kemijske lastnosti pa so odvisne od materialov, ki jih uporabimo za izdelavo in od načina izdelave (16). Fosfolipidi so glavna komponenta membran živih celic, lipidna sestava pa se med različnimi tipi celic razlikuje. Glicerofosfolipidi so najpogosteje uporabljeni naravni fosfolipidi za izdelavo liposomov. Drugi pomembnejši lipidi, ki tvorijo membrane pa so sfingolipidi, glikosfingolipidi in glikoglycerolipidi. Holesterol in proteini so dodatna pomembna sestavina membran. Hidrofilna glava glicerofosfolipidov je odgovorna za raznolikost. Glava opredeli značaj hidrofilne regije fosfolipida kot ion dvojček, kation ali anion (17).

Klasifikacija liposomov je pogosto izvedena na podlagi njihove velikosti in števila dvoslojev. Tako lahko v tem primeru liposome razdelimo v tri skupine. Multilamelarni vezikli so običajno večji od 100 nm in imajo več dvoslojev, veliki unilamelarni vezikli obsegajo velikosti od 100 do 1000 nm, majhni unilamelarni vezikli pa so manjši od 100 nm. Poleg te klasifikacije, lahko liposome razdelimo v pet skupin glede na sestavo in mehanizem *in vivo* dostave: (I) konvencionalni liposomi, (II) pH-občutljivi liposomi, (III) kationski liposomi, (IV) imunoliposomi in (V) dolgo-cirkulirajoči liposomi (18).

Površina liposomov je lahko nevtralna, negativno ali pozitivno nabita, kar je odvisno od vrste lipidov, ki jih uporabimo (2). Narava in gostota naboja na površini liposomov sta pomembna parametra, ki vplivata na mehanizem in obseg reakcije med liposomom in celico. Oba parametra lahko prilagajamo s spremenjanjem lipidne sestave. Manjši površinski nabolj lahko z agregacijo privede do zmanjšane fizikalne stabilnosti majhnih unilamelarnih liposomov (18).

1.2 IZDELAVA NANOSISTEMOV

Visokostrižna homogenizacija je disperzna tehnika, ki pri svoji izdelavi ne potrebuje organskih topil, velike količine površinsko aktivnih snovi ali drugih pomožnih snovi. Največja prednost te metode je enostavnost in naprava, ki je v laboratorijih zelo pogosta in se imenuje rotor-stator homogenizator. Prvotno se uporablja za izdelavo trdnih lipidnih disperzij, za katere je metoda zanesljiva (5). Lahko pa se uporabi tudi za izdelavo liposomov in nanoemulzij (12, 18). Pri liposomih je ta metoda uporabljena redkeje, saj obstajajo primernejše metode, kot je na primer hidratacija suhega lipidnega filma (19). Metod za izdelavo posameznih nanosistemov je veliko, visokostrižna homogenizacija pa se lahko uporablja pri vseh.

Slabost visokostrižne homogenizacije je nizka kvaliteta disperzije, kar se kaže s široko distribucijo velikosti delcev. Te disperzije lipidnih nanodelcev pogosto vsebujejo delce v mikronskem obsegu, ki lahko vodijo do fizikalne nestabilnosti pri shranjevanju (5, 7). Poleg tega je možna slabost tudi velik vnos energije in potencialno uničenje občutljivih bioloških molekul.

Procesni parametri, s katerimi lahko vplivamo na velikost delcev, so čas izvajanja homogenizacije, hitrost mešanja in pogoji ohlajanja (20). Manjšo velikost delcev lahko dosežemo z višjimi procesnimi temperaturami, zaradi manjše viskoznosti lipidne faze pri teh temperaturah. Vendar lahko višja temperatura vodi do razgradnje učinkovine in nosilca (4).

Poznamo vročo in hladno homogenizacijo. Vroča homogenizacija se običajno izvaja pri temperaturah, ki so višje od temperature tališča lipida. Staljen lipid oziroma lipidne komponente dodamo in dispergiramo v vodo ali vodno raztopino PAS z visokostrižno homogenizacijo. Nastalo emulzijo nato ohladimo na sobno temperaturo (5). Hlajenje emulzije povzroči kristalizacijo lipida in s tem tvorbo trdnih lipidnih delcev. Da bi se izognili težavam povezanim s temperaturno razgradnjo in izgubo učinkovine v vodno fazo so razvili hladno homogenizacijo. Učinkovino vključimo v staljen lipid in staljeno zmes hitro ohladimo s suhim ledom ali tekočim dušikom. Trdne delce zmeljemo z mlinom, nastale mikrodelce pa nato dispergiramo v vodni raztopini emulgatorja pri ali pod sobno temperaturo. Slaba stran hladne homogenizacije v primerjavi z vročo, so večji delci in širša porazdelitev velikosti (4).

1.3 RESVERATROL

Povezavi med prehrano in zdravjem se ne moremo izogniti, saj se v prehrani nahajajo določene biološko aktivne komponente, ki zavirajo vpliv in tveganje za številne bolezni (21). Razne jedi in pičače rastlinskega izvora vsebujejo številne antioksidante, ki jih rastline sintetizirajo same. Med njimi je tudi resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), ki je ena izmed pomembnejših aktivnih komponent med stilbenoidnimi fitoaleksini in ima dobrodejne učinke na človeško zdravje (22).

Resveratrol je neflavonoidni polifenol, ki ga najdemo v grozdju, rdečem vinu, arašidih in drugih rastlinah. Bogat vir resveratrola predstavljajo tudi korenine japonskega dresnika (*Polygonum Cuspidatum*), ki ga veliko kultivirajo v Aziji. Resveratrol je sintetiziran v različnih rastlinah kot obramba pred stresom, poškodbami, pretirano sončno svetlobo, UV-radiacijo, infekcijami in vdorom gliv (23).

Z asociacijo zdravja in vina je poznan izraz »francoski paradoks«. Ta govori o prebivalcih mediteranskega predela Francije, kjer je statistično potrjeno manj miokardnih infarktov kot drugje po Evropi. Zasluge za to naj bi šle ustreznu uživanju vina kljub prehrani, ki je bogata z nasičenimi maščobami (21). Trenutno je zaradi svojih koristnih učinkov v telesu v središču pozornosti povsod po svetu (22). Do danes so znanstvene raziskave poročale o širokem spektru ugodnega biološkega delovanja resveratrola, vključno s kardioprotективnim in kemoprotективnim delovanjem ter podaljšanjem življenske dobe različnim vrstam (24). Prav tako resveratrol izkazuje nevroprotективne učinke in preprečuje agregacijo trombocitov (25). Velika pozornost je namenjena tudi dermalni aplikaciji resveratrola v različnih fiziološki in patoloških pogojih. Je v fazi raziskovanja kot preventiva kožnega raka ali pri zdravljenju vnetnih bolezni kot je na primer psoriaza. Poročali so tudi o pozitivni vlogi resveratrola pri procesu celjenja ran (26).

Resveratrol je zelo nestabilna molekula, ki se ob izpostavitvi sončni svetlobi spremeni iz *trans* oblike v manj aktivno *cis* obliko. Zato dermalna uporaba *trans*-resveratrola za kozmetične ali terapevtske namene zahteva razvoj primernih formulacij, ki so zmožne zagotoviti biološko uporabnost in stabilnost učinkovine. Uporaba nanotehnologije za dermalno aplikacijo učinkovin je izkazala različne prednosti, številni produkti so že na trgu ali pa v kliničnih raziskavah (26).

1.4 RAZISKA VE VGRAJEVANJA RESVERATROLA V NANOSISTEME

Vse od leta 1990 do danes, znanstvene raziskave poročajo o širokem spektru ugodnega biološkega delovanja resveratrola, vključno s kardioprotektivnim in kemoprotektivnim delovanjem ter podaljševanjem življenske dobe različnim vrstam. Resveratrolu biološke lastnosti pripisujejo sposobnost inhibiranja oksidacije človeških lipoproteinov z nizko gostoto ter z zaviranjem ciklooksigenaze-2 in inducibilne NO-sintaze prispeva k svojim protivnetnim in antioksidativnim učinkom. Terapevtska aplikacija teh koristnih učinkov resveratrola ostaja zelo omejena zaradi njegove kratke biološke razpolovne dobe, nestabilnosti ter hitrega metabolizma in eliminacije (24).

Zaradi svoje slabe topnosti v vodi in izjemne fotosenzitivnosti je v svoji prosti obliki, trden v kapsulah ali raztopljen/razredčen/suspendiran v različnih vehiklih, daleč od optimizirane oblike za aplikacijo. Medtem, ko je trdna oblika zelo slabo topna v vodi, imajo raztopljene oblike RSV pogosto takšne pomožne snovi, ki so znane po značilnih reakcijah ali učinkih (npr. etanol) (24). Raziskovalci so preučevali povečanje topnosti *trans*-resveratrola z različnimi ciklodekstrini (CD). Lu s sodelavci je dokazal, da lahko topnost v vodi povečamo z vključitvijo resveratrola v komplekse s CD. Hidroksipropil- β -CD je izkazal večjo sposobnost vključitve kot osnoven β -CD. Antioksidativna aktivnost prostega resveratrola je bila malo večja od resveratrola vključenega v komplekse s CD pri enaki koncentraciji. Ta rezultat nakazuje, da resveratrol v kompleksih s CD ohranja svojo antioksidativno aktivnost (27). CD se lahko poleg tega uporablajo tudi kot nosilni sistemi. To so v svoji študiji dokazali Lucas-Abellán in sodelavci z uporabo β -CD in maltozil- β -CD. S kompleksacijo resveratrola s CD so povečali skupno količino resveratrola v vodni raztopini. Prav tako pa so opazili zakasnjeno oksidacijo resveratrola zaradi vključitve resveratrola znotraj CD (28).

Razvoj formulacij z lastnostmi podaljšanega sproščanja, ki bi omogočile transport in dostavo resveratrola na želene lokacije, je obetajoča strategija, zato so jih preučevali v številnih študijah, od mikro pa vse do nanometrskih velikosti (24). Med te formulacije spadajo tudi SLN, NLC, NE ter L.

1.4.1 Trdni lipidni nanodelci

K. Teskač in J. Kristl sta v svoji študiji s pomočjo vroče rotor-stator homogenizacije izdelali SLN z 2% Compritol 888ATO, 1% Phospholipon 80H, 0,1% Poloxamer 188 in 1% RSV. Velikost delcev se je gibala okoli 180 nm z ozko porazdelitvijo (PDI ~ 0,3). ZP nastalih delcev je izkazoval dobro fizikalno stabilnost, saj je njegova vrednost znašala -38 mV. Nadzorovano sproščanje učinkovine je bilo tipično za učinkovine vgrajene v SLN: začetnemu hitremu sproščanju je sledilo podaljšano sproščanje učinkovine skozi več ur. Učinkovitost vgrajevanja sta določili posredno iz profila sproščanja RSV iz nanodelcev in jo ocenili na 85%. Iz profila sproščanja so predpostavili, da je zaradi hitrega začetnega sproščanja približno 40% vgrajenega RSV skoncentriranega na površini nanodelcev, preostali RSV pa naj bi se nahajal v lipidnem matriksu (29).

Z enako metodo izdelave so lipidne nanodelce z RSV izdelali E. H. Gokce in sodelavci. Nanodelci so bili zgrajeni iz Compritol-a 888 ATO (C888), Poloxamer-a 188, Tween-a 80 in RSV. Njihova velikost je zavzemala vrednosti okoli 161 nm, PDI pa približno 0,3. Majhen ZP, -15,3 mV, ni izkazoval velike fizikalne stabilnosti. Optimalno količino RSV so osnovali na podlagi razmerja lipid-učinkovina 60:1 in je znašala približno 3,3%. Učinkovitost vgrajevanja so določili s HPLC in je znašala 73%. S pomočjo DSC analize so dokazali, da je C888 v SLN v kristaliničnem stanju, hkrati pa so dokazali izgubo vrha RSV v SLN formulaciji, ki bi lahko bila posledica solubilizacije RSV v lipidni fazi (29).

A. R. Neves s sodelavci je metodo vroče rotor-stator homogenizacije kombinirala s soniciranjem. Za izdelavo nanodelcev so uporabili cetilpalmitat, Tween 60 in RSV. Velikost nastalih delcev se je gibala okoli 180 nm, vrednost polidisperznega indeksa je bila približno 0,2. Pri primerjavi praznih SLN in SLN z RSV so ugotovili, da med njimi ni statistično signifikantne razlike v velikosti. Iz tega so sklepali, da RSV ne vpliva na povprečni premer nanodelcev. ZP je predstavljal zadovoljivo vrednost okoli -30 mV. Te fizikalne lastnosti so ostale nespremenjene tekom dveh mesecev. Učinkovitost vgrajevanja so določili s pomočjo centrifugiranja, pri čemer so se nanodelci posedli in je v supernatantu ostal le nevgrajen RSV. Slednjega so določili s pomočjo spektrofotometrije. Učinkovitost vgrajevanja se je zmanjševala z večanjem količine RSV (0,4% - 3% glede na lipid) od 88% proti 64%. Z DSC študijo so potrdili, da so SLN trdni pri sobni in telesni temperaturi. Ugotovili so tudi, da prisotnost RSV ne vpliva na temperaturo tališča SLN, povzroči pa neurejeno kristalno strukturo nanodelcev in s tem zmanjša talilno entalpijo. Z

zmanjšanjem urejenosti kristalne strukture SLN se poveča fizikalna stabilnost in bolj kontrolirano sproščanje (31).

Na področju vgrajevanja RSV v SLN je bilo narejeno kar nekaj raziskav, v katerih so uporabili različne lipide, različne površinsko aktivne snovi in metode izdelave. Zaradi svoje ekonomičnosti in enostavne uporabe pa se velikokrat uporablja visokostrižna homogenizacija.

1.4.2 Nanostrukturirani lipidni nosilci

NLC so raziskovalci razvili z namenom premostenja pomanjkljivosti SLN, kot je izrizvanje učinkovine skozi čas shranjevanja. Še vedno kljub veliko raziskavam prednosti NLC pred SLN niso popolnoma dokazali. Kot pri SLN se tudi tu uporablajo različni trdni lipidi, PAS in metode izdelave, kot tekoči lipid pa se najpogosteje uporablja Miglyol 812 (32).

E. H. Gokce s sodelavci je poleg SLN preučeval tudi NLC. Metoda izdelave NLC je bila enaka SLN in je opisana v poglavju 1.4.1. Ugotovili so, da dodatek Miglyola zmanjša velikost delcev v primerjavi s SLN. Z naraščajočim deležem Miglyola pa se je velikost delcev povečevala. Za najbolj optimalno koncentracijo tekočega lipida so določili 15% celotnega lipida. Povprečni premer delcev se je gibal okoli 110 nm, PDI 0,26 in ZP okoli -14 mV. Pri tem so dosegli tudi najvišjo učinkovitost vgrajevanja (91%). Tudi tu je DSC analiza pokazala odsotnost vrha RSV v NLC formulaciji. Opazili pa so tudi nekoliko nižjo temperaturo tališča C888 v NLC formulaciji (30).

Zmanjšanje velikosti nanodelcev ob zamenjavi 30% trdnega lipida z Miglyolom, so opazili tudi v študiji, ki jo je opravila A. R. Neves s sodelavci (opisana v poglavju 1.4.1). Delci so zavzemali vrednost okoli 150 nm s PDI okoli 0,2 in ZP -30 mV. Tudi pri NLC se je učinkovitost vgrajevanja RSV s povečevanjem količine RSV (0,4% - 3% RSV glede na lipid) zmanjševala od 75% proti 65%. Enako stabilnost kot so dokazali za SLN so potrdili tudi pri NLC. Delci se skozi čas shranjevanja niso spremenili. Prav tako so z DSC analizo dokazali, da so NLC trdni pri sobni in telesni temperaturi (31).

1.4.3 Nanoemulzije

C. Hung in sodelavci so v svoji študiji izdelali 2 nanoemulziji in micelarni sistem. Vgrajevali so 0,2% RSV, eni nanoemulziji so dodali še vitamin E. Izdelava sistemov je bila sestavljena iz treh metod, in sicer so najprej hidratirali suh lipidni film, sledila je visokostrižna homogenizacija, na koncu so emulzijo še sonicirali. Velikosti kapljic nanoemulzije z vitaminom E, brez vitamina E in micelov so bile sledeče: 100-150 nm, 60-100 nm in 30-100 nm. ZP nanoemulzij nakazuje na dobro fizikalno stabilnost, saj so absolutne vrednosti presegale 30 mV, za kar so odgovorni negativno nabiti fosfolipidi v P80H. Ugotovili so, da prisotnost vitamina E poveča kapljice, kar velja tudi za RSV. Pri testu stabilnosti pa so prišli do sklepa, da lahko uporaba vitamina E kot antioksidanta znatno pripomore k stabilnosti sistema (33).

1.4.4 Liposomi

V študiji vpliva v liposome vgrajenega RSV na proliferacijo in UV-B zaščito celic so C. Caddeo in sodelavci izdelali liposome z metodo soniciranja, ki ji je sledila ekstruzija. Velikost liposomov se je gibala med 70 in 100 nm, PDI okoli 0,25 in ZP okoli -40 mV. Učinkovitost vgrajevanja so določali s HPLC po predhodni dializi in dosegli približno 75% učinkovitost vgrajevanja. Dokazali so stabilnost sistemov, saj se skozi čas shranjevanja fizikalne lastnosti niso spremenile, prav tako niso opazili agregacije (34).

Liposome z RSV, izdelane z različnimi metodami, je preučevala B. D. Isailović s sodelavci. Multilamelarne liposome so izdelali iz proliposomov in z metodo tankih filmov, nato so velikost liposomov zmanjšali z ekstruzijo ali s soniciranjem. Z DSC analizo so prišli do ugotovitve, da je RSV ujet znotraj liposomov ter da med RSV in komponentami dvosloja obstaja interakcija, saj na termogramu ni prisotnega vrha taljenja RSV. Ugotovili so, da so za izdelavo velikih multilamelarnih liposomov z RSV primerni obe metodi, hkrati pa liposomi omogočajo visoko učinkovitost vgrajevanja in ohranjajo antioksidativno sposobnost resveratrola (nad 90%). Za zmanjšanje velikosti liposomov se je za bolj primerno metodo izkazala ekstruzija, s katero so dosegli bolj homogeno porazdelitev liposomov in boljšo učinkovitost vgrajevanja (~90% z ekstruzijo in ~50% s soniciranjem) (35).

2 NAČRT DELA

Cilj magistrske naloge bo primerjava učinkovitosti vgrajevanja RSV v štiri različne nanosisteme, določitev fizikalne stabilnosti disperzij nanosistemov z in brez RSV ter termična analiza fizikalnih zmesi sestavin in disperzij nanosistemov.

Delo bo obsegalo izdelavo štirih nanosistemov, in sicer: trdne lipidne nanodelce, nanostrukturirane lipidne nosilce, nanoemulzije in liposome. Vse nanosisteme bomo izdelali z vročo homogenizacijo z rotor-stator homogenizatorjem. Koncentracija posameznih komponent bo v vseh nanosistemih enaka, spremnjali bomo le vrsto lipida ali pa bomo le-tega odstranili. Nadalje bomo v nanosisteme vključili resveratrol kot aktivno komponento. Vsem nanosistemom, tako praznim kot tudi tistim z RSV, bomo določili povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial dispergirane faze ter spremljali fizikalno stabilnost disperznih sistemov skozi 30 dni.

Učinkovitost vgrajevanja RSV bomo določili indirektno z UV-VIS spektrofotometrijo. V supernatantu bomo namreč določali količino RSV, ki se ni vgradila v koloidne nosilce.

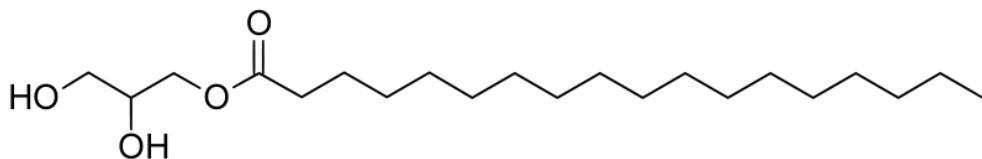
Z diferenčno dinamično kalorimetrijo bomo ovrednotili lipidne komponente, njihove fizikalne zmesi ter disperzije nanosistemov brez in z RSV. Pri tem bomo določili polimorfne oblike lipida in temperature tališča posameznih lipidnih komponent, v fizikalnih zmeseh in nanodisperzijah pa bomo spremljali kristaliničnost oziroma amorfnost resveratrola.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Lapidne snovi

- *Glicerol monostearate 35-50* (Lex, Slovenija) (Slika 3) je zmes monoacilglicerolov, v glavnem monostearilglicerolov s spremenljivimi količinami di- in triacilglicerolov. Številke ob imenu nam povedo koliko odstotkov je monoacilglicerolov (35-50%). Je bela, na otip rahlo voskasta praškasta snov (36). Uporablja se kot neionogen sterični stabilizator, emulgator, vlažilec, plastifikator in sredstvo proti sprijemanju. Uporablja se v farmacevtski, kozmetični kot tudi v prehranski industriji. V našem primeru ga uporabljamo kot lipid, ki tvori matriks trdnih lipidnih nanodelcev in nanostrukturiranih lipidnih nosilcev. Temperatura tališča se giblje med 55 in 60°C. Je praktično netopen v vodi in obstaja v dveh polimorfnih oblikah, α in β (37).

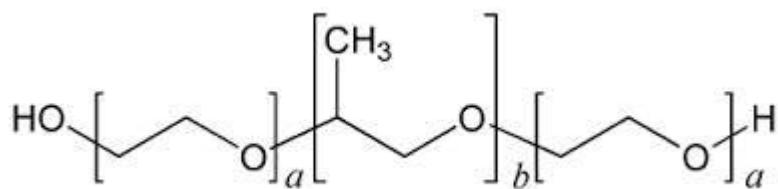


Slika 3: *Glicerol monostearat.*

- *Miglyol® 812* nevtralno olje je zmes triglyceridov z nasičenimi maščobnimi kislinami kot sta, kaprilna in kaprinska kislina in je pridobljeno iz kokosovega in palmovega olja. Je brezbarvno ali rahlo rumenkasto obarvano olje ter praktično brez vonja in okusa. Pri sobni temperaturi je v tekočem stanju, strdi pa se pri približno 0°C. V farmaciji se uporablja v peroralnih, dermalnih in parenteralnih pripravkov. Lahko prevzame vlogo emulgatorja ali topila (37). V našem primeru pa je sestavni del matriksa NE in NLC.

3.1.2 Površinsko aktivne snovi

- *Lutrol® F68* (Sigma-Aldrich, Nemčija) je poloksamer 188, neionogen blok kopolimer etilenoksida in propilenoksida (Slika 4). Polietilenoksidni del molekule predstavlja hidrofilni del, medtem ko osrednji, polipropilenoksidni predstavlja hidrofobni del. Zaradi njegove narave se v farmaciji največ uporablja kot emulgator in solubilizator ter tako kot v našem primeru, sterični stabilizator. Je bela, voskasta snov v obliki zrnčic, dobro topna v vodi in alkoholu. Je praktično brez vonja in okusa. Njegova temperatura tališča pa se giblje med 52 in 57°C (37).



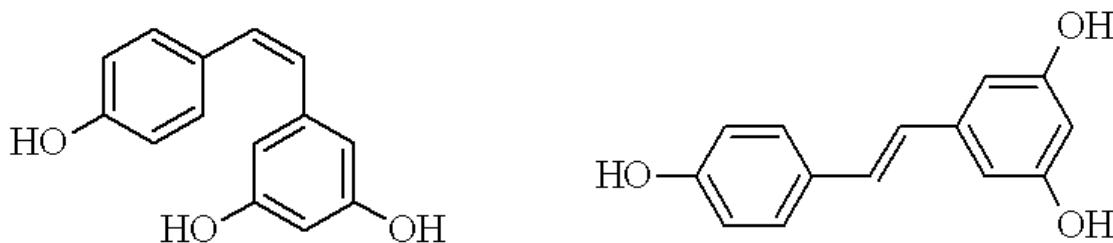
Slika 4: *Poloxamer 188; a=80, b=27*

- *Phospholipon® 80H* (Natterman, Nemčija) je zmes hidrogeniranih fosfolipidov pridobljenih iz soje. 70% predstavlja hidrogeniran fosfatidilholin, preostali del pa drugi fosfolipidi. V majhnih količinah so prisotni tudi drugi lipidi, kot so na primer trigliceridi in maščobne kisline, palmitinska in stearinska. Sestava lecitina je odvisna tako od vira pridobivanja kot tudi od stopnje čiščenja. Je v obliki belega ali rahlo rumenkastega praška. Pri približno 52°C se nahaja točka faznega prehoda (38). V farmaciji se uporablja kot emulgator in stabilizator, pogosto pa se uporablja za tvorjenje različnih liposomov (37).

3.1.3 Učinkovina

- *Resveratrol* (Chromadex, ZDA) je neflavonoidna polifenolna komponenta, ki jo v večjih količinah najdemo v rdečem grozdju. Je trden, umazano bel prašek z molekulsko formulo C₁₄H₁₂O₃ in temperaturo tališča med 253 in 255°C. Obstaja v dveh strukturnih izomerih in sicer v *cis*- (Z) ter *trans*- (E) (Slika 5). *Trans*-izomer je biološko aktivnejši od *cis*-izomera, ki nima planarne konformacije. Topnost v metanolu je približno 90

mg/mL, v etanolu približno 50 mg/ml, v vodi pa le 3 mg/100ml. Resveratrol je zelo fotosenzibilen in se pri izpostavljenosti UV svetlobi pretvori iz *trans*- v *cis*-izomer, zato ga moramo hraniti v temnih vsebnikih (24).



Slika 5: Kemijska struktura resveratrola. *Cis*-resveratrol (levo) in *trans*-resveratrol (desno).

3.1.4 Topila

- Prečiščena voda
- 96% etanolna raztopina (Kefo, Slovenija)
- Metanol (Merck, Nemčija)

3.2 METODE

3.2.1 Izdelava nanosistemov

3.2.1.1 Izdelava trdnih lipidnih nanodelcev

Na precizni tehnici (Mettler Toledo) smo natehtali vse komponente za izdelavo nanodelcev. Lipidne komponente (GMS, P80H in RSV) smo združili v prvo epruveto, prečiščeno vodo in P188 pa v drugo. Recepture prikazuje tabela I. Epruveto z lipidnimi komponentami smo segrevali na vodni kopeli 15 minut pri 70°C, to je približno 10°C nad temperaturo tališča lipida. Drugo epruveto smo opremili z zamaškom, s katerim smo preprečili izhlapevanje vode tekom segrevanja in jo segrevali 10 minut. Vodno fazo smo nato dodali lipidni in pričeli s homogeniziranjem na vodni kopeli. Homogenizacijo smo izvajali z rotor-stator homogenizatorjem (Omni PDH) 10 minut pri 20000 obratih/minuto ter konstantni temperaturi (70°C). Nastalo disperzijo smo dali v zamrzovalnik za 5 minut

in jo tako hitro ohladili. Prazni SLN so bili narejeni po enakem postopku, le da ni bilo prisotne učinkovine. Nanodelce smo pripravili z različnimi količinami RSV (1, 2, 3, 5 oziroma 10% RSV glede na količino GMS) ter tako na podlagi fizikalnih lastnosti določili najbolj optimalno recepturo.

Tabela I: *Recepture disperzij SLN z različno količino RSV.*

	Vsebnost v % (do 100% prečiščena voda)			
	GMS	P80H	P188	RSV
SLN	3,5	1	1,5	-
SLNR1	3,5	1	1,5	0,35
SLNR2	3,5	1	1,5	0,175
SLNR3	3,5	1	1,5	0,105
SLNR4	3,5	1	1,5	0,07
SLNR5	3,5	1	1,5	0,035

S spremenjanjem, večanjem in manjšanjem, posameznih komponent kot so GMS, P80H ter P188, smo želeli oceniti vpliv posameznih komponent na povprečno velikost in porazdelitev velikosti trdnih lipidnih nanodelcev. Recepture smo zbrali v tabeli II.

Tabela II: *Recepture disperzij SLN s spremenjenimi količinami posameznih komponent (GMS, P80H, P188).*

Vzorci so vsebovali 2% RSV glede na količino GMS.

	Vsebnost v % (do 100% prečiščena voda)			
	GMS	P80H	P188	RSV
SLN1	2,5	1	1,5	0,07
SLN2	4,5	1	1,5	0,07
SLN3	3,5	0,83	1,5	0,07
SLN4	3,5	1,33	1,5	0,07
SLN5	3,5	1	0,5	0,07
SLN6	3,5	1	2	0,07

3.2.1.2 Izdelava nanostrukturiranih lipidnih nosilcev

Za izdelavo NLC smo ohranili enak postopek izdelave kot smo ga uporabili za SLN, le da smo 30% trdnega lipida GMS nadomestili s tekočim lipidom, in sicer z Miglyol-om 812. Recepture smo zbrali v tabeli III.

Tabela III: Recepture disperzij NLC z različno količino RSV.

	Vsebnost v % (do 100% prečiščena voda)				
	GMS	Miglyol 812	P80H	P188	RSV
NLC	2,45	1,05	1	1,5	-
NLCR1	2,45	1,05	1	1,5	0,35
NLCR2	2,45	1,05	1	1,5	0,175
NLCR3	2,45	1,05	1	1,5	0,105
NLCR4	2,45	1,05	1	1,5	0,07
NLCR5	2,45	1,05	1	1,5	0,035

3.2.1.3 Izdelava nanoemuzije

Nanoemulzije smo izdelali po enakem postopku kot je opisan pri SLN, le da smo v tem primeru celoten trden lipid, GMS, zamenjali s tekočim, Miglyol 812. Recepture nanoemulzij smo zbrali v tabeli IV.

Tabela IV: Recepture nanoemulzij z različno količino RSV.

	Vsebnost v % (do 100% prečiščena voda)			
	Miglyol 812	P80H	P188	RSV
NE	3,5	1	1,5	-
NER1	3,5	1	1,5	0,35
NER2	3,5	1	1,5	0,175
NER3	3,5	1	1,5	0,105
NER4	3,5	1	1,5	0,07
NER5	3,5	1	1,5	0,035

3.2.1.4 Izdelava liposomov

P80H smo natehtali v epruveto, skupaj z RSV, v drugo epruveto pa smo natehtali prečiščeno vodo. Obe epruveti smo na vodni kopeli segreli na približno 60°C ter nato vodno fazo dodali lipidni. Homogenizirali smo z rotor-stator homogenizatorjem 10 minut pri 15000 obratih/minuto in temperaturi 60°C. Prazne liposome smo izdelali po enakem postopku ob odsotnosti učinkovine. Recepture disperzij liposomov smo zbrali v tabeli V.

Tabela V: Recepture liposomov z različno količino RSV.

	Vsebnost v % (do 100% prečiščena voda)	
	P80H	RSV
L	1	-
LR1	1	0,35
LR2	1	0,175
LR3	1	0,105
LR4	1	0,07
LR5	1	0,035

3.2.2 Fizikalno vrednotenje nanosistemov

3.2.2.1 Merjenje velikosti in zeta potenciala

Vsem vzorcem, tako praznim kot tistim z učinkovino, smo še isti dan določili povprečni premer nanostruktur (d), polidisperzni indeks (PDI) in zeta potencial (ZP). Disperzije nanosistemov smo ocenili tudi po izgledu (barva oziroma transparentnost, prisotnost usedline).

Velikost delcev in PDI smo izmerili s fotonsko korelacijsko spektroskopijo (angl. Photon Correlation Spectroscopy, PCS) (Zetasizer Nano ZS; Malvern Instruments, Velika Britanija) pri 25°C in kotu 173°. Za vsak vzorec smo naredili 2 ponovitvi merjenja. Lomni količnik medija je znašal 1,330 ter λ laserske svetlobe (He-Ne laser) 633nm.

S to metodo merimo nihanje intenzitete sipane svetlobe, ki je posledica Brownovega gibanja delcev. Le-to temelji na predpostavki, da je naključno gibanje delcev posledica trkov med njimi in molekulami disperznega medija. Kot rezultat nam poda povprečni premer nanostruktur in PDI, ki predstavlja merilo za širino porazdelitve velikosti delcev. Vrednosti PDI obsegajo vrednosti od 0 do 1. Bližje ko so vrednosti 0, bolj je homogena porazdelitev velikosti nanostruktur (35).

Za merjenje velikosti in PDI nanodelcev smo uporabili nerazredčene vzorce. S plastično pipeto smo v kiveto odpipetirali vzorec do približno 1 cm višine kivete ter pomerili.

ZP nam pove kakšen in kolikšen naboj ima površina delca. Je pomemben in uporaben indikator, ki nam omogoča predvideti fizikalno stabilnost disperznih nanosistemov skozi čas shranjevanja. Z metodo laserske Dopplerjeve elektroforeze naprava (Zetasizer Nano

ZS, Malvern Instruments, VB) iz elektroforezne mobilnosti določi ZP. Večji ko je ZP delcev, večja je možnost, da bo koloidna disperzija fizikalno stabilna, saj bo električni odboj med delci večji. Absolutna vrednost ZP večja od 30 mV predstavlja dobro, večja od 60 mV pa zelo dobro elektrostatično stabilnost in s tem dobro fizikalno stabilnost disperzije (39).

Za merjenje ZP smo vzorce redčili v razmerju 1:20. Odmerili smo 1 ml vzorca in dopolnili do 20 ml s prečiščeno vodo. S pomočjo injekcijske brizge smo pripravljeno disperzijo vbrizgali v elektroforezno celico. ZP smo merili pri 25°C ter tudi v tem primeru naredili 2 ponovitvi merjenja, dielektrična konstanta disperznega medija pa je znašala 78,5.

3.2.2.2 Spremljanje fizikalne stabilnosti disperzij nanosistemov

Na zgoraj opisani način smo ovrednotili koloidne sisteme ob prisotnosti in odsotnosti RSV še po 7 in 30 dneh. Hkrati smo opazovali tudi sam izgled disperzij nanosistemov. Vsi vzorci so bili shranjeni na sobni temperaturi in zaščiteni pred svetlobo.

3.2.2.3 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Z diferenčnim dinamičnim kalorimetrom (DSC) (Mettler Toledo DSC 1, STAR^e System) smo izvedli analizo posameznih snovi (GMS, P80H, RSV) in njihovih fizikalnih zmesi v razmerju, ki nastopa v formulaciji SLN in razmerju 1:1. Nato smo izvedli še analizo disperzij nanosistemov z in brez RSV. Kot referenco smo uporabili prazen aluminijast lonček.

Pogoji meritve:

- Aluminijast lonček (40 µL)
- Dušikova atmosfera, pretok 50 ml/min
- Največji temperaturni interval: 0°C - 360°C
- Hitrost segrevanja: 5 K/min

3.2.3 Določanje učinkovitosti vgrajevanja resveratrola v nanosisteme z UV-VIS spektrofotometrijo

3.2.3.1 Umeritvena krivulja resveratrola

Vsebnost RSV smo določali z UV-VIS spektrofotometrom, saj omogoča hitro in finančno ugodno kvantifikacijo.

Kot medij smo uporabili metanol, saj topnost RSV v njem znaša 90 mg/ml. Preden smo začeli z umeritveno krivuljo, smo posneli celotni UV spekter RSV ter tako določili absorpcijski maksimum, ki je bil pri 307 nm.

Standardno raztopino smo pripravili tako, da smo natančno natehtali 15 mg RSV in ga raztopili v 500 ml metanola. Da se je zagotovo raztopil ves RSV, smo bučko z raztopino za 10 min postavili v ultrazvočno kadičko, nato pa še 30 min mešali na magnetnem mešalu. Iz standardne raztopine smo z redčenjem pripravili delovne standarde. Absorbanco smo merili pri 307 nm.

Zveza je bila linearna v koncentracijskem območju 1,2-5,4 mg/L ($r^2=0,99981$).

Vse raztopine smo pripravili v temnih bučkah ter skozi ves čas priprave pazili, da vzorci z RSV niso bili izpostavljeni svetlobi.

3.2.3.2 Priprava vzorcev in določanje učinkovitosti vgrajevanja

Učinkovitost vgrajevanja resveratrola v nanosisteme smo določili s pomočjo centrifugiranja. Pripravljene disperzije smo natehtali v centrifugirke in centrifugirali z ultracentrifugo (WX Ultra Series, Thermo Scientific, ZDA) 30 min pri 20°C in 40000 rpm. Uporabili smo 0,5 ml supernatanta in ga ustrezno razredčili s prečiščeno vodo. Koncentracijo nevgrajenega resveratrola v supernatantu smo določili z UV-VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 307 nm. Prost resveratrol v supernatantu (m_{RSV}) nam poda količino nevgrajene učinkovine. Učinkovitost vgrajevanja smo izračunali po enačbi 1 in rezultat izrazili kot odstotek vgrajene učinkovine glede na celotno količino resveratrola, ki smo ga uporabili pri izdelavi (m_{RSV}).

$$učinkovitost vgrajevanja (\%) = \frac{m_{RSV} - m_{RSV'}}{m_{RSV}} \times 100$$

Enačba 1: Enačba za izračun učinkovitosti vgrajevanja RSV v odstotkih.

V prvih nekaj serijah smo v centrifugirke natančno natehtali nerazredčene koloidne disperzije. Kasneje pa smo prvočne vzorce razredčili na 10ml in nato te vzorce uporabili za centrifugiranje.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Izdelava in vrednotenje nanosistemov

Povprečni premer nanostruktur, širina porazdelitve velikosti ter zeta potencial so ključni parametri, ki se uporabljam za ocenjevanje fizikalne stabilnosti disperzij nanodelcev. Vsem vzorcem smo zato določili velikost in PDI s fotonsko koreacijsko spektroskopijo ter ZP z lasersko Dopplerjevo elektroforezo. S tem smo želeli oceniti vpliv deleža RSV na fizikalne lastnosti nanodelcev. Poleg teh treh parametrov, smo disperzijam nanosistemov ocenili tudi njihov izgled.

Začeli smo z izdelavo in vrednotenjem SLN, NLC, NE in L brez ZU. Vrednosti nanosistemov brez RSV so podane v tabeli VI.

Tabela VI: Povprečni premer, PDI ter ZP nanosistemov (SLN, NLC, nanoemulzije, liposomi) brez RSV.

Oznaka	d [nm] ± SD	PDI ± SD	ZP [mV] ± SD
SLN	331,8 ± 18,1	0,425 ± 0,08	-38,0 ± 3,2
NLC	203,4 ± 18,8	0,370 ± 0,06	-36,1 ± 1,0
NE	225,9 ± 5,2	0,264 ± 0,01	-41,9 ± 3,4
L	238,1 ± 16,9	0,380 ± 0,05	-56,5 ± 3,6

Najbolj transparentni so bili liposomi, sledili so NLC in nato SLN. NE pa je bila netransparentno bele barve. Disperzije so bile brez usedline ali posameznih vidnih delcev. Med izdelavo posameznih nanosistemov nismo opazili velikega odstopanja, ponovljivost je bila dobra. Izpostavimo pa lahko SLN, ki izstopajo tako po velikosti delcev kot tudi po

velikosti PDI. Za primerjavo velikosti SLN smo izbrali študijo, kjer so izdelali nanodelce z 10% GMS, 5% Tween 20 in 1% lecitina. Metoda izdelave je bila prav tako vroča visokostržna homogenizacija z razliko mešanja v intervalih. Dosegli so velikosti nanodelcev 231 ± 11 nm (40). Manjša velikost bi lahko bila posledica uporabe drugačnih emulgatorjev in pogojev izdelave. K izmerjeni manjši velikosti bi lahko pripomoglo tudi redčenje vzorcev pred izvajanjem meritve. V raziskavi, kjer so pripravili SLN z 10% glicerilbehenata in 2,5% Poloxamera 188 z visokotlačno homogenizacijo, so preučevali vpliv redčenja disperzij z nanodelci pred meritvami velikosti delcev (meritve so izvajali z Zetasizer 4, Malvern Instruments). Dokazali so veliko razliko med razredčenim in nerazredčenim vzorcem SLN in NLC. Tako so v nerazredčenem vzorcu izmerili velikost SLN 735 nm, v razredčenem (1:100) pa 198 nm. Manjši vpliv redčenja pa so dokazali tudi na merjenje velikosti kapljic nanoemulzije (nerazredčen vzorec: 267 nm, razredčen vzorec: 156 nm) (1).

Velikost delcev NLC je v primerjavi s SLN manjša. Razlog za to naj bi bil, da smo delež GMS zamenjali z Miglyolom. Zmanjšanje delcev bi lahko pojasnili z večjo učinkovitostjo emulgiranja sistema. Staljen trden lipid ima v času homogeniziranja težnjo po vrnitvi v trdno stanje. Prisotnost tekočega lipida v primeru NLC sistema pripomore k bolj homogeni porazdelitvi toplotne energije. Olja, ki vsebujejo visok delež zaestrenih nenasičenih maščobnih kislin, ki so v glavnem tekoče, in dvojne vezi med ogljikovimi atomi znižajo temperaturo tališča. Vse to je lahko razlog za učinkovitejše emulgiranje pri izdelavi NLC sistema in posledično manjšo velikost oblikovanih nanodelcev (30). Prav tako bi lahko nastanek manjših delcev pojasnili z zmanjšanjem viskoznosti lipidne faze, ki predstavlja notranjo fazo emulzije. Enak vnos energije med homogenizacijo lahko tako kapljice razbije v manjše.

Po velikosti ZP izstopajo liposomi, saj pri njih nismo pričakovali tako močno negativnega naboja. P80H poleg hidrogeniranega fosfatidilholina vsebuje tudi druge fosfolipide, ki so nabiti (fosfatidne kisline, fosfatidilglicerol, fosfatidilinozitol, fosfatidilserin) in dajejo negativen naboj liposomom. Hkrati pa lahko nabiti del v deionizirani vodi zaradi adsorpcije hidroksilnih ionov pripomorejo k še večjemu ZP (2). Vzrok za nekoliko manjšo absolutno vrednost ZP pri ostalih nanostrukturah je prisotnost steričnega stabilizatorja P188. V študiji, kjer so preučevali vpliv P188 na ZP, so za SLN uporabili stearilamin, sojin lecitin, α -tokoferol in P188 ter prišli do ugotovitve, da povečanje količine P188 zmanjša ZP delcev (41).

Vgrajevanje RSV smo pričeli z 10% RSV glede na celoten lipid. Pripravljene disperzije nanostruktur smo nato ovrednotili in rezultate zbrali v tabeli VII.

Tabela VII: *Povprečni premer, PDI in ZP nanosistemov z 10% RSV.*

Oznaka	d [nm] ± SD	PDI ± SD	ZP [mV] ± SD
SLNR1	731,7 ± 78,5	0,906 ± 0,04	-40,7 ± 3,8
NLCR1	292,4 ± 36,1	0,636 ± 0,05	-33,0 ± 1,5
NER1	297,4 ± 23,7	0,309 ± 0,01	-44,3 ± 1,8
LR1	270,0 ± 38,0	0,540 ± 0,05	-52,0 ± 1,4

Po izgledu je najbolj izstopal koloidni sistem s SLN, saj je bilo prisotnih veliko večjih delcev, ki so se čez čas posedli in tvorili opazno usedlino. Prav tako smo usedlino opazili pri ostalih koloidnih sistemih, pri katerih večjih delcev ni bilo opaziti, ampak le usedlino v obliki finih delcev, ki so se nabrali na dnu epruvete. Glede na izgled te usedline bi lahko sklepali, da je šlo za RSV, ki se ni mogel vgraditi v nastale nanostrukture. Transparentnost je bila manjša kot v primeru praznih koloidnih disperzij, vendar se vrstni red ni spremenil. Tudi porazdelitev velikosti delcev je bila pri SLN najbolj nehomogena, na kar kaže zelo visok PDI. Sama velikost dispergirane faze, se glede na prazne, z izjemo SLN, ni pomembno spremenila. Prisotnost rahle usedline bi lahko bil vzrok za povišanje PDI, kar smo opazili tako pri NLC in liposomih, kot tudi pri nanoemulzijah. Prisotnost samega antioksidanta na ZP ni vplivala, le-ta je pri vseh koloidnih sistemih ostal približno enak kot pri praznih.

V tabeli VIII, so predstavljeni rezultati ovrednotenja nanodisperzij s 5% RSV glede na lipid. Še vedno smo s prostim očesom pri SLN opazili več delcev. Tudi pri nanoemulziji in liposomih je bilo opaziti še nekaj usedline, ki pa enako kot pri predhodnih vzorcih, ni imela prisotnih večjih delcev kot smo to opazili pri SLN. Transparentnost disperzij se je izboljšala v primerjavi z disperzijami, kjer smo vgrajevali 10% RSV glede na GMS.

Razlike v velikosti nanosistemov glede na prazne ni bilo. Po vrednostih PDI vidimo, da nekateri koloidni sistemi niso tako homogeni, kot si želimo, najvišjo vrednost imajo SLN. Zmanjšanje RSV iz 10% na 5% glede na GMS ne vpliva na vrednost ZP.

Tabela VIII: Povprečni premer, PDI in ZP nanosistemov s 5% RSV.

Oznaka	d [nm] ± SD	PDI ± SD	ZP [mV] ± SD
SLNR2	356,0 ± 45,9	0,629 ± 0,07	-42,0 ± 5,3
NLCR2	241,7 ± 8,2	0,586 ± 0,01	-39,7 ± 1,1
NER2	285,0 ± 14,4	0,278 ± 0,01	-42,6 ± 1,9
LR2	266,4 ± 7,0	0,437 ± 0,04	-52,9 ± 2,5

V tabelah IX, X in XI so zbrani rezultati ovrednotenja nanostruktur s 3, 2 in 1% RSV glede na lipid.

Transparentnost je bila pri posameznih nanosistemih enaka in se s količino RSV ni več spremenjala. Še vedno smo lahko pri SLN opazili kakšen večji delec, vendar se je njihovo število v primerjavi s prejšnjima vzorcema občutno zmanjšalo.

Na večjo homogenost z zmanjševanjem RSV nakazuje tudi zmanjševanje vrednosti PDI. Velikosti ostalih nanostruktur se niso spremenile. Smo pa dosegli manjši PDI pri NLC. Nanoemulzije in liposomi imajo skoraj konstanten PDI, kot tudi velikost delcev/kapljic, že od najvišje vrednosti RSV.

Tabela IX: Povprečni premer, PDI in ZP nanosistemov s 3% RSV.

Oznaka	d [nm] ± SD	PDI ± SD	ZP [mV] ± SD
SLNR3	308,7 ± 13,5	0,628 ± 0,05	-36,9 ± 3,15
NLCR3	227,5 ± 3,0	0,527 ± 0,01	-38,3 ± 0,8
NER3	230,6 ± 20,4	0,231 ± 0,01	-40,1 ± 0,7
LR3	269,0 ± 28,0	0,483 ± 0,03	-59,2 ± 0,9

Tabela X: Povprečni premer, PDI in ZP nanosistemov z 2% RSV.

Oznaka	d [nm] ± SD	PDI ± SD	ZP [mV] ± SD
SLNR4	301,5 ± 24,5	0,588 ± 0,04	-44,0 ± 2,9
NLCR4	229,1 ± 12,1	0,389 ± 0,04	-38,8 ± 1,9
NER4	266,3 ± 22,3	0,286 ± 0,04	-46,8 ± 3,0
LR4	285,5 ± 16,8	0,461 ± 0,03	-60,0 ± 2,0

Tabela XI: Povprečni premer, PDI in ZP nanosistemov z 1% RSV.

Oznaka	d [nm] ± SD	PDI ± SD	ZP [mV] ± SD
SLNR5	378,6 ± 2,1	0,499 ± 0,03	-40,0 ± 0,1

NLCR5	$212,5 \pm 7,3$	$0,502 \pm 0,01$	$-38,4 \pm 1,2$
NER5	$273,9 \pm 12,6$	$0,314 \pm 0,02$	$-44,1 \pm 1,8$
LR5	$231,5 \pm 18,8$	$0,468 \pm 0,03$	$-57,2 \pm 1,3$

Vrednosti ZP so pri vseh nanosistemih visoko negativne, kar kaže na dobro fizikalno stabilnost disperznih nanosistemov. Prisotnost RSV ni pomembno vplivala na velikost NLC, nanoemulzij in liposomov saj se je presežek RSV pojavil kot oborina, le-to smo opazili samo pri višjem deležu RSV. Največji vpliv deleža RSV glede na lipid smo opazili pri SLN. Kot je prikazano v tabelah VII, VIII, IX, X, XI, se je z večanjem deleža RSV v SLN formulaciji povečala tudi velikost delcev ter njihov PDI. To nakazuje na to, da ima lipid omejeno kapaciteto vgrajevanja RSV, zato se presežek obori v obliki večjih delcev (32).

SLN z 10% RSV so se pri merjenju velikosti in PDI izkazali kot nehomogeni. Prav tako je bilo po homogeniziraju s prostim očesom opaziti več delcev, ki so se kasneje posedli. Delci s 5% RSV so imeli primerno velikost, a je bilo še vedno preveč usedline. Naš cilj je bil izbrati SLN s čim večjim deležem RSV ter hkrati izbrati koloidni sistem s čim manj usedline. Za nadaljnjo optimizacijo sestave SLN in ugotavljanja vpliva posameznih komponent na fizikalne parametre delcev smo uporabili disperzije z 2% RSV glede na GMS.

4.1.1 Optimizacija sestave SLN z 2% RSV in vpliv posameznih komponent

Recepturo SLN z 2% RSV smo še dodatno optimizirali. S spremenjanjem deleža lipida, emulgatorja in ko-emulgatorja smo opazovali kako posamezna komponenta vpliva na velikost in PDI delcev. V tabeli II so prikazani deleži posameznih komponent, v tabeli XII pa pripadajoče velikosti in PDI.

Z zmanjšanjem količine lipida smo prišli do manjših delcev, kljub temu pa se homogenost ni izboljšala. Še vedno smo opazili nekaj usedline, v nasprotju s tem pa se je transparentnost vzorca izboljšala. Ko smo količino GMS povečali, se je transparentnost zmanjšala, vzorec je bil bolj belkaste barve. Opazili smo tudi več usedline. Znano je, da

povečevanje vsebnosti lipida na več kot 5-10% v večini primerov povzroči večje delce in širšo distribucijo velikosti (42).

Z zmanjšanjem količine P80H so nastali manjši delci, PDI pa se je nekoliko povečal. Pri povečanju količine P80H so se delci povečali, PDI pa se je zmanjšal. Vpliv P80H na PDI je v našem primeru zelo majhen, večji vpliv ima na samo velikost nanodelcev.

Vpliv P188 pa je ravno obraten. Z zmanjšanjem količine P188 se delci povečajo in PDI zmanjša, pri večjem deležu P188 pa se delci zmanjšajo in PDI poveča. V študiji, kjer so preučevali vpliv koncentracije emulgatorja, so ugotovili, da so serije izdelane z nižjo koncentracijo emulgatorja vsebovale večjo količino delcev v mikronskem območju (42). S spremjanje količine posameznih komponent nismo prišli do bistveno boljših rezultatov, zato smo za nadaljnje delo obdržali prvotno recepturo za izdelavo disperzije SLN.

Tabela XII: *Vpliv povečevanja oziroma zmanjševanja posameznih komponent na povprečni premer in PDI SLN z 2% RSV glede na lipid.*

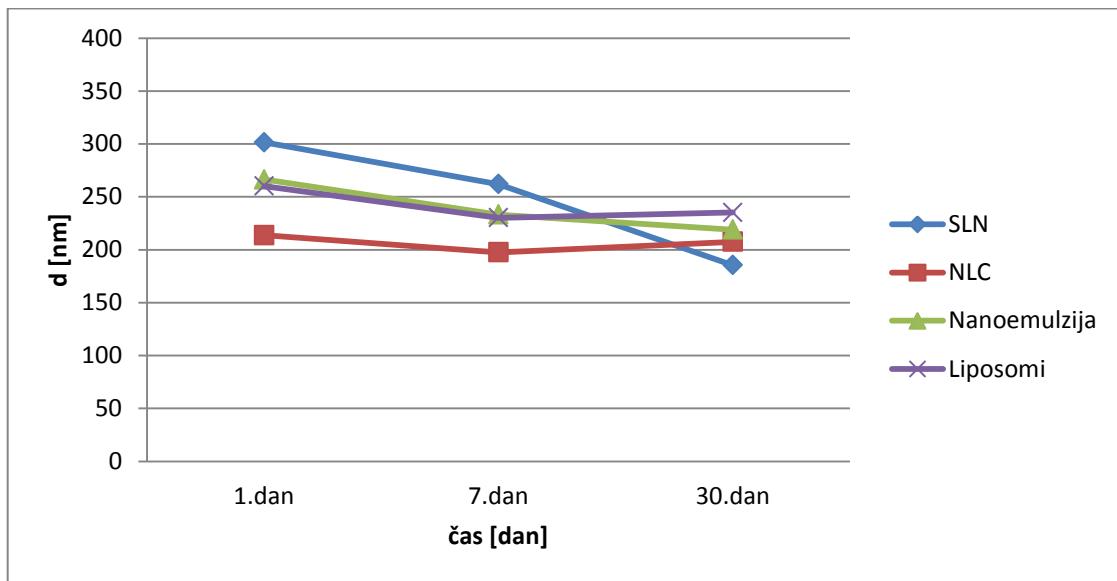
Oznaka	d [nm]	PDI
SLN1 (\downarrow GMS)	$193,3 \pm 0,2$	$0,617 \pm 0,01$
SLN2 (\uparrow GMS)	$380,8 \pm 1,5$	$0,535 \pm 0,02$
SLN3 (\downarrow P80H)	$252,0 \pm 11,3$	$0,645 \pm 0,06$
SLN4 (\uparrow P80H)	$347,7 \pm 1,7$	$0,598 \pm 0,01$
SLN5 (\downarrow P188)	$423,3 \pm 18,0$	$0,406 \pm 0,08$
SLN6 (\uparrow P188)	$193,7 \pm 19,1$	$0,708 \pm 0,09$

4.2 Fizikalna stabilnost disperzij nanodelcev v času shranjevanja

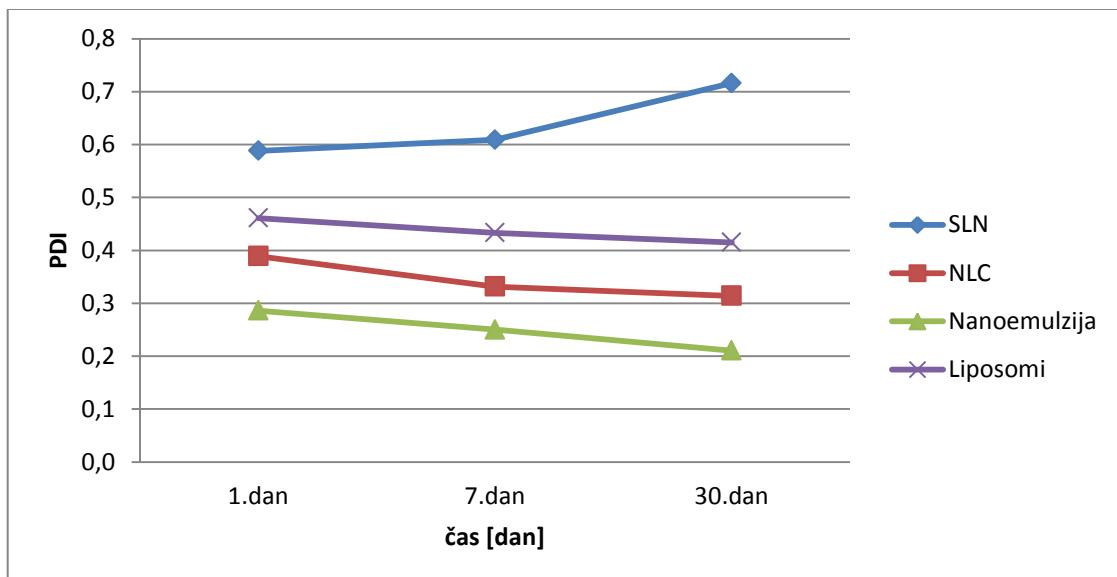
RSV je fotolabilna učinkovina, ki pod vplivom svetlobe podleže kemični spremembi. Ker želimo med shranjevanjem ohraniti enake pogoje in preveriti fizikalno stabilnost disperzij nanosistemov, smo vse disperzije brez RSV in z 2% RSV shranjevali v temi pri sobni temperaturi 30 dni. Meritve smo izvedli prvi, sedmi in trideseti dan.

Na slikah 6, 7, 8 so predstavljeni rezultati disperznih nanosistemov z 2% RSV. Največje spremembe v velikosti smo opazili pri SLN, pri katerih so se delci skozi čas zmanjšali. To bi lahko pripisali razpadu nanodelcev in tvorbi agregatov, saj smo opazili povečanje usedline že po sedmih dneh. Na njihovo nestabilnost nam kaže tudi povečanje PDI, ki je bil že na začetku visok. Med shranjevanjem se je količina usedline še povečevala. Pri

ostalih nanosistemih ni bilo velikih sprememb v velikosti, kljub temu smo pri liposomih opazili občutno povečanje usedline. Iz tega lahko sklepamo, da sam P80H ni dovolj za učinkovito vgradnjo in stabilizacijo liposomov z RSV. NLC in nanoemulzija sta se izkazala kot najbolj fizikalno stabilna vzorca, saj se velikost skozi čas ni spremenila, malo usedline smo opazili le 30. dan.

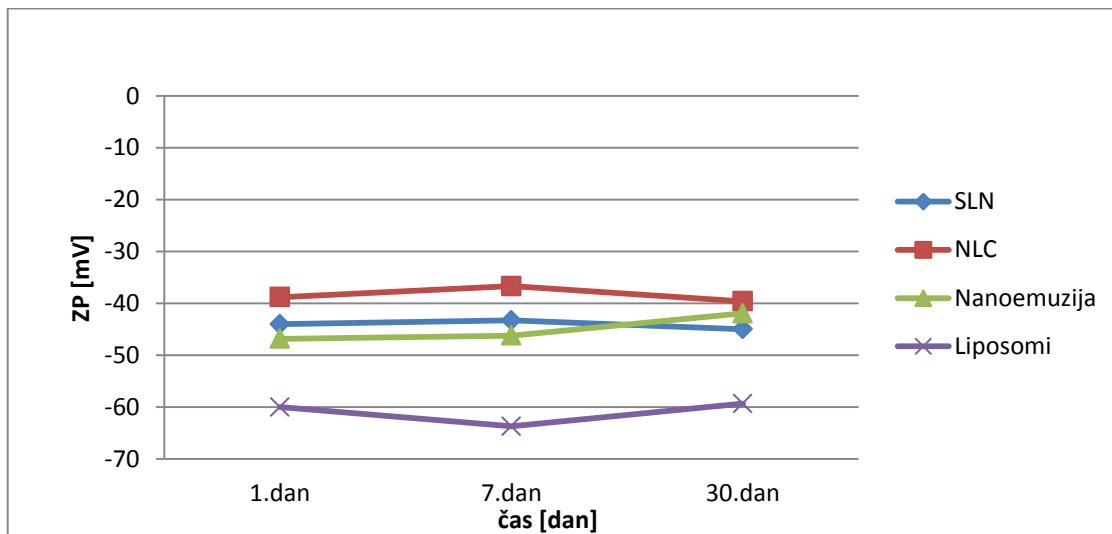


Slika 6: Fizikalna stabilnost disperzij nanosistemov z 2% RSV: povprečni premer nanostruktur v disperzijah 1., 7. in 30. dan.



Slika 7: Fizikalna stabilnost disperzij nanosistemov z 2% RSV: PDI nanostruktur v disperzijah 1., 7. in 30. dan.

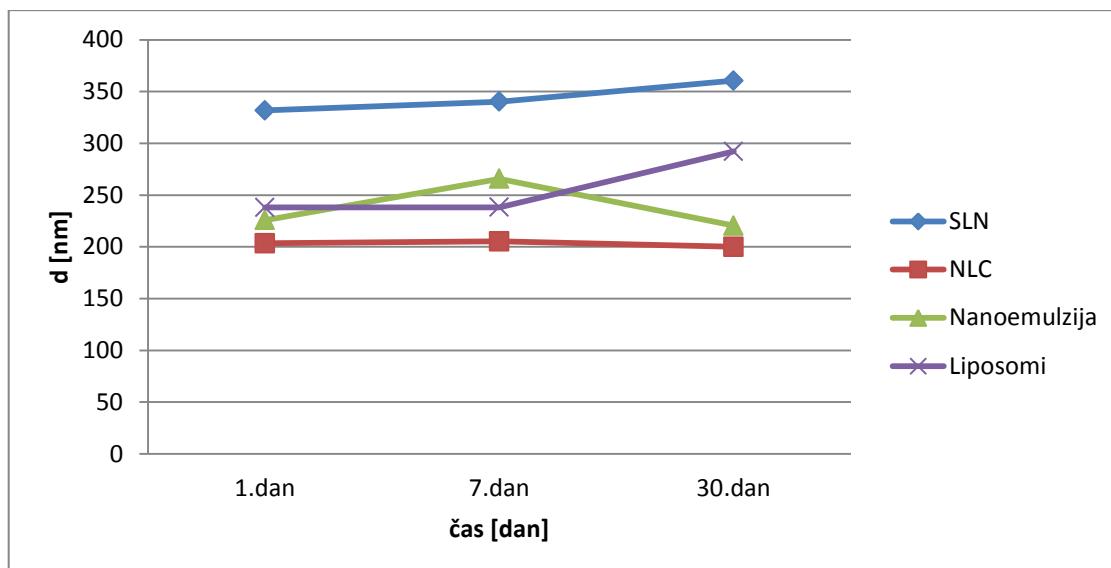
ZP je električni potencial na strižni ploskvi, sloja tekočine in premikajočih se delcev v mediju. Je zelo dober pokazatelj fizikalne stabilnosti disperzij, saj večji naboј in s tem večji odboj med delci, prepreči aglomeracijo delcev ter posledično nestabilnost samega sistema (39). Vsi disperzni nanosistemi izkazujejo dobro fizikalno stabilnost ($ZP > |30 \text{ mV}|$), vendar po izgledu disperzije SLN in liposomov temu nasprotujeta, saj je viden nastanek usedline.



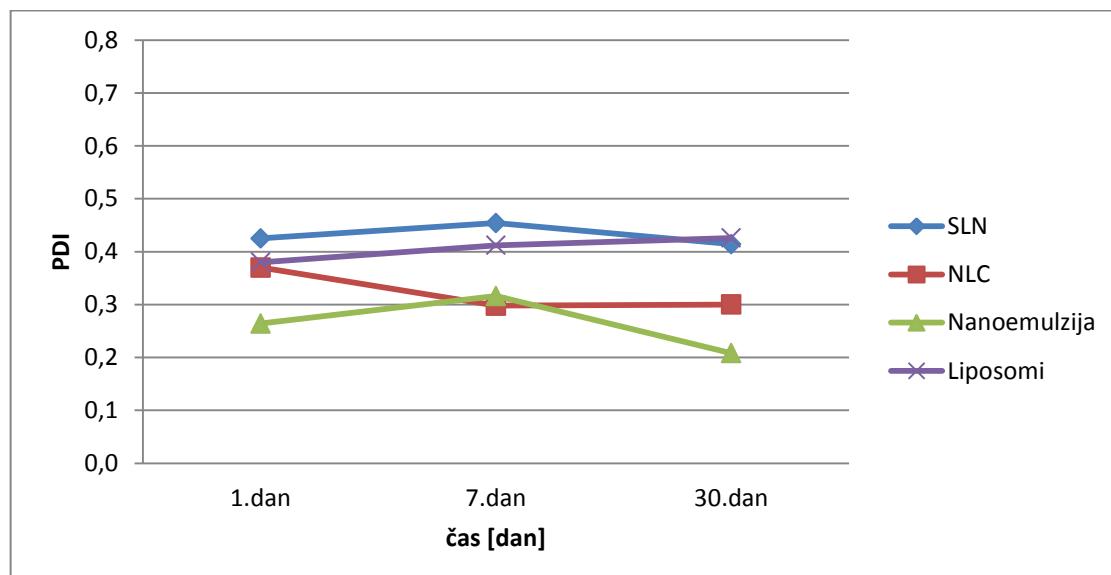
Slika 8: Fizikalna stabilnost disperzij nanosistemov z 2% RSV: ZP nanostruktur v disperzijah 1., 7. in 30. dan.

Zaradi izkazane nestabilnosti SLN in liposomov z RSV, smo preverili še stabilnost praznih disperzij nanosistemov. Slike 9, 10, 11 prikazujejo spremenjanje fizikalnih lastnosti disperznih nanosistemov v času shranjevanja.

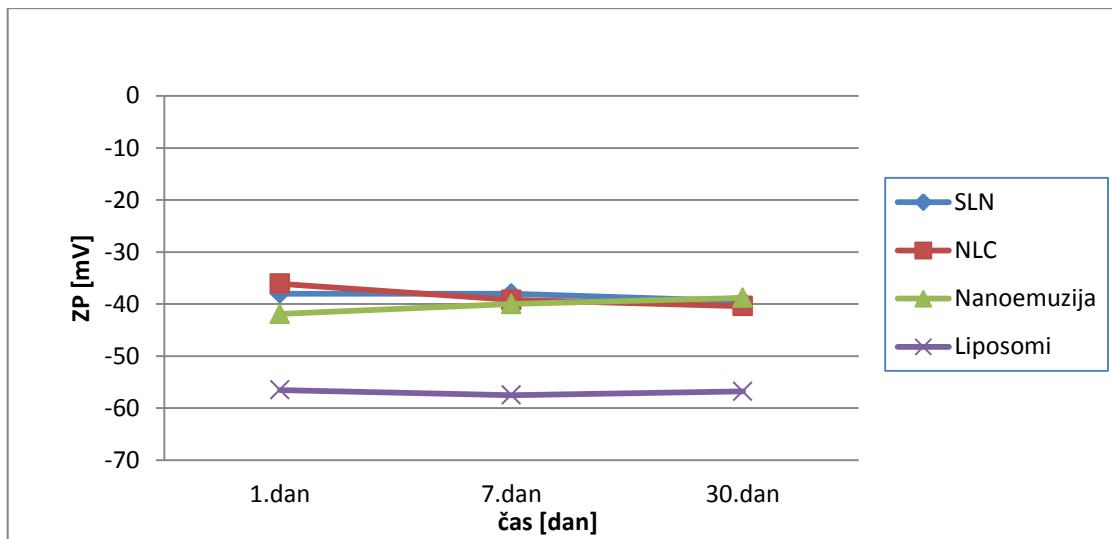
Kljub manjšim spremembam velikosti in PDI skozi 30 dni, pa konstantnost ZP kaže na dobro fizikalno stabilnost. Le-to lahko potrdimo z nespremenjenim izgledom vseh disperznih nanosistemov. Tako lahko za nestabilnost disperzij nanosistemov z RSV kot vzrok izpostavimo samo učinkovino, saj so brez prisotnosti RSV disperzije nanosistemov fizikalno stabilne.



Slika 9: Fizikalna stabilnost disperzij nanosistemov brez RSV: povprečni premer nanostruktur v disperzijah 1., 7. in 30. dan.



Slika 10: Fizikalna stabilnost disperzij nanosistemov brez RSV: PDI nanostruktur v disperzijah 1., 7. in 30. dan.

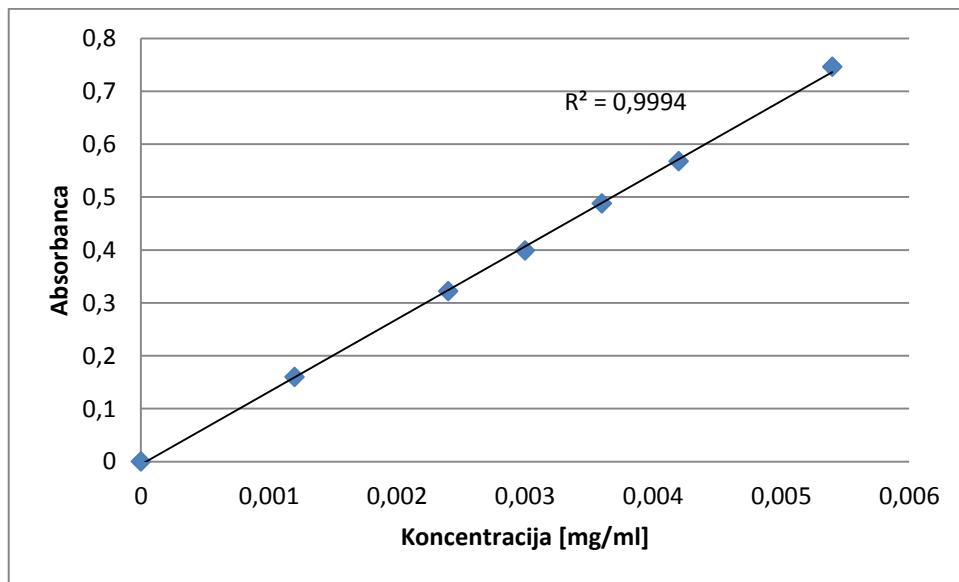


Slika 11: *Fizikalna stabilnost disperzij nanosistemov brez RSV: ZP nanostruktur v disperzijah 1., 7. in 30. dan.*

4.3 Umeritvena krivulja in centrifugiranje

4.3.1 Umeritvena krivulja

Zaradi slabe topnosti RSV v vodi, smo umeritveno krivuljo (Slika 12) izvedli v metanolu, kjer je njegova topnost približno 90,0 g/l. Pripravili smo 6 delovnih raztopin, jim pomerili absorbanco in narisali umeritveno krivuljo.



Slika 12: *Umeritvena krivulja resveratrola v metanolu.*

4.3.2 Centrifugiranje in priprava vzorcev

V prvih serijah smo izdelane disperzije natančno natehtali v centrifugirke in jih centrifugirali 30 min pri 40000 rpm. Po centrifugiranju smo si ogledali izgled vzorcev.

Vzorci z liposomi so imeli v konici usedlino, ki je bila zelo svetlo roza obarvana, iz tega bi lahko sklepali, da gre za resveratrol. Nad to kompaktno usedlino je bila približno 7mm debela plast z večjo viskoznostjo od vode in rumenkasto obarvanostjo. Vzorci s SLN so imeli na dnu nekaj kompaktnejše usedline, nad njim nekaj belega gela, nad njim pa enako, vendar tanjšo, rumenkasto plast kot pri liposomih. Pri pipetiranju smo pazili, da v naš vzorec (supernatant) nismo zajeli nobene od teh usedlin.

Težave so se pojavile pri vzorcih z NLC in pri nanoemulzijah, kjer je kot sestavina prisoten tudi Miglyol. Le-ta se po centrifugiranju ne posede ampak plava na vodi. V tem primeru smo najprej s pomočjo kapilare odstranili zgornjo plast, kolikor se je dalo natančno. Kljub temu nismo mogli zagotoviti popolne odsotnosti Miglyola, saj je premikanje centrifugirke in dotikanje vzorca s kapilaro in kasneje s pipeto povzročilo, kontaminacijo supernatnta z Miglyolom.

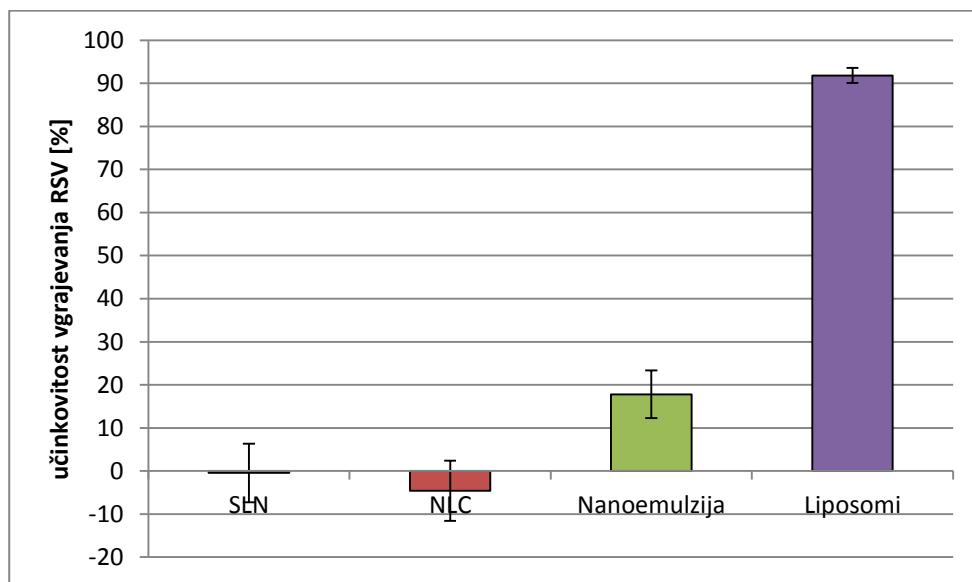
Kasneje smo, zaradi lažjega in natančnejšega računanja odstotka vgrajene učinkovine, prvotne vzorce najprej razredčili na 10 ml ter jih šele nato centrifugirali. Poleg natančnejših rezultatov, nam je ta način omogočal tudi več paralel za določanje absorbance in s tem ugotavljanje ponovljivosti.

4.4 Učinkovitost vgrajevanja

Količino vgrajenega RSV smo vsem 4 disperznim nanosistemom določili z UV-VIS spektroskopsko metodo. Lipid v SLN po vroči homogenizaciji rekristalizira v višje energijske modifikacije, to sta α in β oblici. Skozi čas shranjevanja se lahko polimorfne oblike preoblikujejo v bolj urejeno modifikacijo (β), ki ima nižjo energijo in višjo stopnjo kristaliničnosti. Pri SLN lahko pride do izrinjenja učinkovine, ko se lipid pretvori iz modifikacije z visoko energijo (α), za katero so značilne nepravilnosti, v obliko z nižjo energijo (β), ki oblikuje popolne kristale brez prostora za druge molekule. Kot rešitev temu problemu je pripomogel razvoj NLC. Lipidni matriks teh delcev je sestavljen iz trdnih in tekočih lipidov, ki so lahko pomešani v takšni kombinaciji, da se delci strdijo pri ohladitvi,

vendar ne rekristalizirajo temveč ostanejo v amorfni obliki (43). Večjo učinkovitost vgrajevanja RSV smo zato pričakovali pri NLC sistemih.

Slika 13 predstavlja primerjavo učinkovitosti vgrajevanja RSV (%), ki smo jo določili prvim serijam nanosistemov. Vzorcev pred centrifugiranjem nismo redčili, ampak le razdelili v centrifugirke ter centrifugirali. Rezultati, so bili zelo presenetljivi.

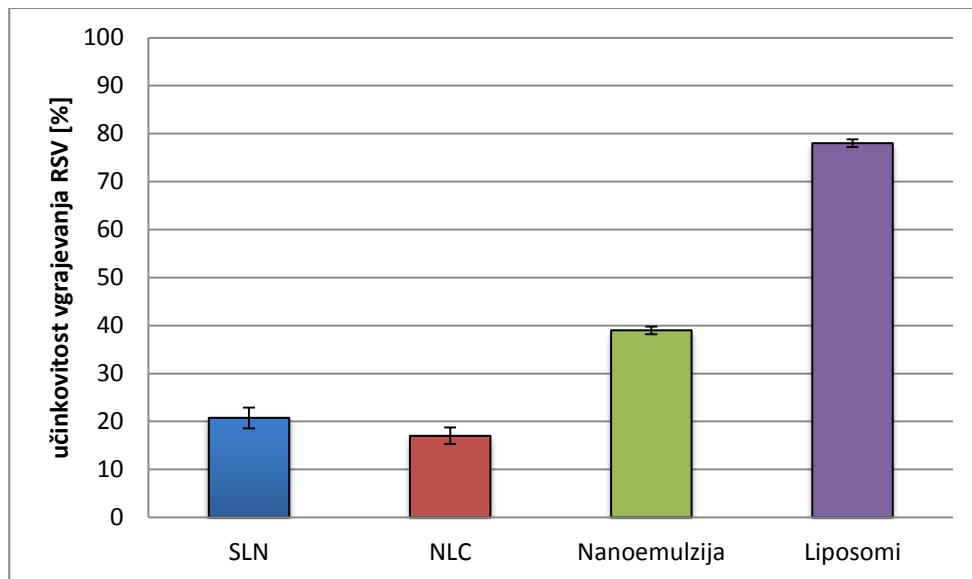


Slika 13: Učinkovitost vgrajevanja 2 % RSV v nanosisteme (%). Vzorci so bili centrifugirani brez predhodnega redčenja.

V supernatantu SLN in NLC smo določili količino RSV, ki je predstavljala več RSV, kot smo ga uporabili za vgrajevanje, to je 2,10mg. Torej je bila učinkovitost vgrajevanja manjša od 0%. Poleg tega so bili rezultati zelo neponovljivi. Enkrat smo na primer izmerili 7% učinkovitost vgrajevanja, drugič manjšo od 0%. Vgrajevanje bi lahko bilo sprejemljivo za nanoemulzijo in liposome, vendar smo bili zaradi nenavadnih rezultatov SLN in NLC do njih skeptični. Poleg tega smo pri emulzijah prav tako naleteli na slabo ponovljivost pri določevanju učinkovitosti vgrajevanja, kar je tudi razvidno iz standardne deviacije.

Naslednje serije vzorcev smo najprej razredčili na 10ml ter nato centrifugirali. Rezultati so bili v tem primeru realnejši.

Kot je razvidno s slike 14 smo največjo učinkovitost vgrajevanja, 78%, dosegli z liposomi, ki so zgrajeni le iz P80H. Rezultat je primerljiv s podobno študijo, v kateri so za izdelavo liposomov uporabili le lecitin in dosegli 73% učinkovitost vgrajevanja (34).



Slika 14: Učinkovitost vgrajevanja 2% RSV v nanosisteme (%). Vzorci so bili pred centrifugiranjem razredčeni z vodo na 10 ml.

V nasprotju z drugimi študijami, ki so dosegli učinkovitost vgrajevanja učinkovine višje v NLC kot v SLN, so naši rezultati kazali obratno (30, 31). Višjo učinkovitost vgrajevanja smo dobili v primeru SLN. Razlika med njima sicer ni velika, saj znaša le približno 3%. V primerjavi z drugimi študijami smo dosegli v obeh primerih precej nižjo učinkovitost vgrajevanja. S Compritolom 888 ATO kot lipidom, je E. H. Gokce s sodelavci dosegla 73% učinkovitost vgrajevanja v SLN ter 91% v NLC (30). Razloge smo iskali s preverjanjem absorbance posameznih komponent in le teh v kombinaciji z RSV ter jih predstavili poglavju 4.4.1.

Nanoemulzije, ki jih sestavljajo tekoči lipid in stabilizatorji, imajo večjo učinkovitost vgrajevanja ZU kot SLN. Zaradi večje topnosti resveratrola v tekočem lipidu smo v primeru NE pričakovali višji odstotek vgrajene učinkovine kot v SLN in približno enak odstotek kot v NLC. Kot smo zasledili v drugih študijah je vgrajevanje v NLC učinkovitejše ali enako učinkovito kot vgrajevanje v nanoemulzije, odvisno od uporabljenega lipida in učinkovine (44, 45). Trdno stanje lipidnih nanodelcev pri NLC

imobilizira vgrajeno učinkovino in vodi do višje učinkovitosti vgrajevanja v primerjavi z nanoemulzijami (15).

Rezultati nam kažejo veliko sposobnost vgrajevanja učinkovine v P80H, vendar pa se tu pojavlja vprašanje stabilnosti. Po centrifugiranju smo namreč na dnu epice opazili trdno usedlino, ki bi lahko bila RSV. Prav tako smo nestabilnost dokazali tekom 30. dnevnega shranjevanja disperznega sistema. Visoko absorbanco supernatanta v primeru SLN, NLC in nanoemulzije lahko pojasnimo s prisotnostjo drugih koloidnih struktur kot so miceli, mešani miceli in liposomi, ki lahko predstavljajo dodaten nosilni sistem za RSV (29).

V primerjavi z drugimi študijami smo dosegli majhno učinkovitost vgrajevanja RSV v različne nanodisperzne sisteme. Vzrok za to je lahko več, od drugačne sestave nanosistemov, izdelave le-teh pa vse do metod za določevanje učinkovitosti vgrajevanja.

4.4.1 Absorbanca posameznih komponent in komponent v kombinaciji z RSV

Izmerjena količina RSV v supernatantu je v primerih SLN, NLC in nanoemulzije zelo visoka. Vzroke za to smo žeeli poiskati v možni absorbanci drugih komponent oziroma preveriti ali se s posameznimi komponentami in RSV tvorijo manjši delci, ki se pri centrifugiranju ne posedejo.

Najprej smo z rotor-stator homogenizatorjem pripravili disperzije s posameznimi komponentami v vodi. Pogoje izdelave in razmerje sestavin smo ohranili takšne, kot so bili pri pripravi nanodisperzij. Pripravljenim disperzijam smo nato pomerili absorbanco.

Lipida, tako trdni kot tudi tekoči, nimata absorbcjskega maksimuma v tem območju ter nista izkazala pomembne absorbance. Enaka je bila situacija pri P188, ki v vodni raztopini tvori micele. Miceli se oblikujejo v vodni raztopini blok kopolimerja, ko le-ta preseže določeno koncentracijo, ki jo imenujemo kritična micelarna koncentracija (46). P80H oblikuje liposome, katerim smo izmerili absorbanco, ki predstavlja 11% RSV. Po centrifugiranju disperzije P80H pa smo izmerili zanemarljivo majhno absorbanco. RSV se je takoj po končani homogenizaciji začel obarjati na dnu epruvete, izmerjena absorbanca pa je predstavljala približno 3% RSV. Ta količina je enaka topnosti RSV v vodi. Enak rezultat smo dobili, ko smo disperzijo RSV centrifugirali. Iz tega lahko sklepamo, da RSV

v vodi ne oblikuje micelov ali njim podobnih struktur, ki bi povzročile večjo absorbanco v supernatantu.

Kombinacije posameznih sestavin GMS, P188, P80H z RSV so po izdelavi disperzij dale pomembno vrednost absorbance, zato smo te vzorce centrifugirali in ponovno preverili njihovo absorbanco po centrifugiranju. Miglyol z RSV ni izkazal pomembne absorbance, zato tega vzorca nismo nadaljnje centrifugirali. Po centrifugiranju smo do enake ugotovitve prišli tudi za GMS z RSV. Približno 20% RSV predstavlja supernatant disperzije P80H z RSV. V tem primeru imamo liposome z vgrajeno učinkovino, ki se pri centrifugiranju niso posedli. Najvišjo absorbanco, ki predstavlja skoraj 60% RSV pa nam je dal supernatant disperzije P188 z RSV. Amfifilni kopolimeri, med katere spada tudi P188, pokrivajo široko območje strukturne raznolikosti in polarnosti za solubilizacijo številnih slabo vodotopnih učinkovin. Notranje hidrofobno jedro micelov omogoča vgrajevanje slabo vodotopnih učinkovin in tako izboljša njihovo stabilnost in biološko uporabnost (46). K večji absorbanci supernatanta torej lahko prispevajo miceli P188 z vgrajenim RSV ter liposomi P80H z vgrajenim RSV, ki se med centrifugiranjem niso posedli.

Da bi izvedeli, kako veliki delci se niso posedli, smo določenim supernatantom izmerili velikost in PDI delcev. Delci v supernatantu P188 in RSV so merili 33,3 nm s PDI 0,558. Prav tako smo velikost delcev izmerili supernatantoma NLC in SLN z RSV. Pri prvem smo izmerili delce v velikosti 100,7 nm, pri drugem pa 78,34 nm. K višji absorbanci torej lahko prispeva tudi prisotnost samih SLN oziroma NLC, ki so kljubovali centrifugalni sili in se niso posedli.

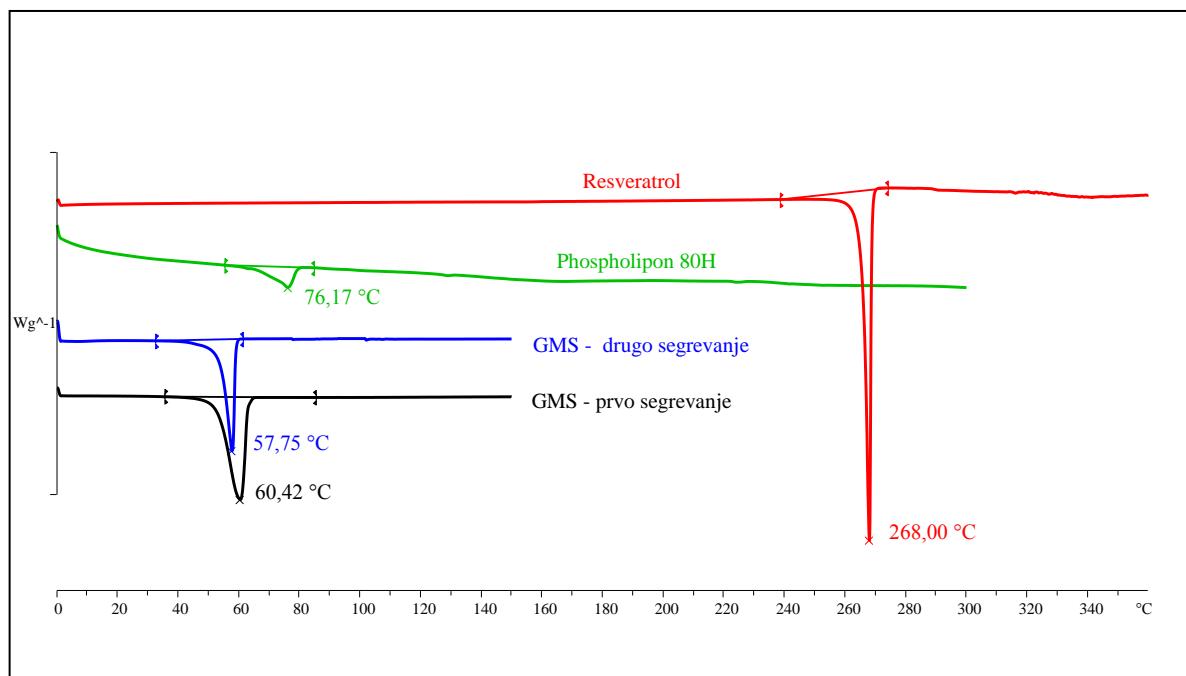
4.5 DSC analiza

DSC analiza nam omogoča vpogled v taljenje in rekristalizacijo kristaliničnih materialov, kot so lipidni nanodelci. Rezultati nam dajejo informacije o polimorfizmu, kristalni ureditvi, evtektičnih zmesih ali procesu steklastega prehoda (30). DSC analize so uporabne za razumevanje interakcij med učinkovino in lipidom ter obnašanja zmesi kot je GMS in P80H.

Z DSC analizo smo ovrednotili posamezne lipidne komponente (GMS, RSV, P80H) kot tudi fizikalne zmesi teh komponent v dveh različnih razmerjih, in sicer v razmerju 1:1 ter v realnem masnem razmerju, ki nastopa v SLN formulaciji. Prav tako smo naredili DSC

analizo posameznih disperzij nanosistemov brez in z RSV. Za analizo smo uporabili približno 5 mg vzorca posameznih komponent oziroma njihovih fizikalnih zmesi in približno 10 mg vzorca posameznih disperzij nanosistemov.

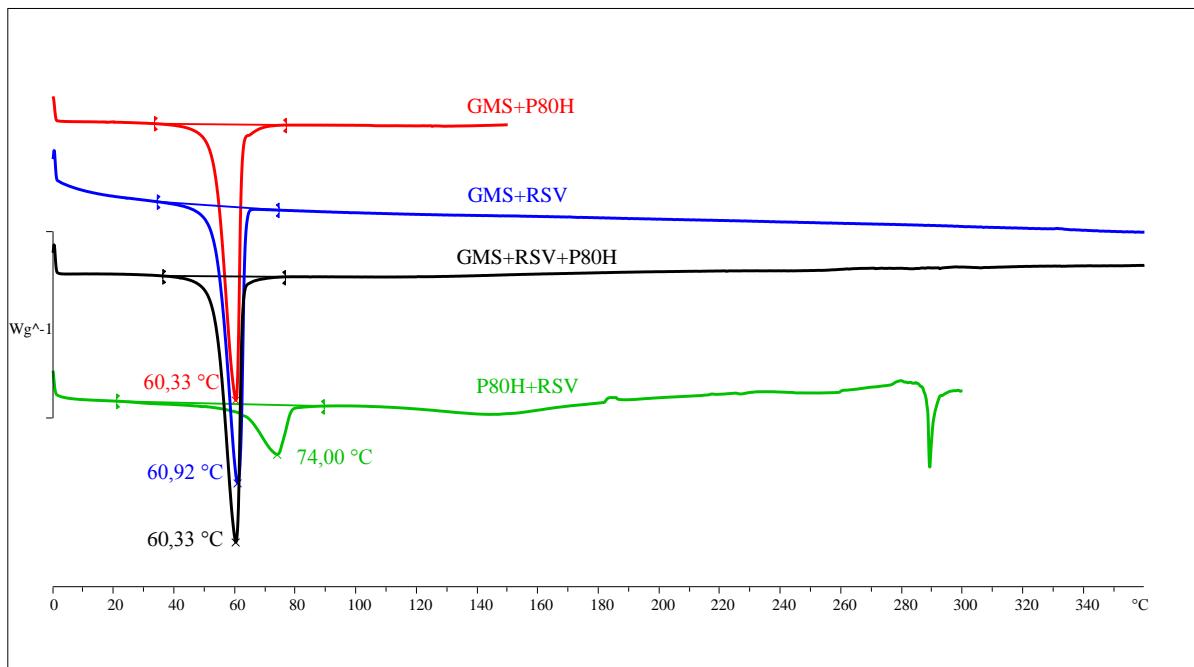
Na sliki 15 lahko vidimo termograme posameznih komponent. Phospholipon 80H ima širši endotermen vrh, ki se razteza od 65 do 80°C in doseže najnižjo točko pri 76°C. Tališče resveratrola predstavlja oster endotermen vrh pri 268°C. GMS smo segrevали zaporedoma dvakrat, saj smo želeli preveriti v kakšni polimorfni obliki se nahaja. Hitro ohlajanje staljenega lipida povzroči nastanek α oblike, ki se skozi čas preko β' oblike uspešno transformira v stabilnejšo β obliko (47). Ker je β oblika stabilnejša, ima višjo temperaturo tališča. Pri prvem segrevanju smo določili endotermen vrh pri temperaturi 60,4°C, ki predstavlja temperaturo tališča β oblike. Lipid smo nato ohladili in zopet segrevali. Pri drugem segrevanju smo dobili vrh pri 57,8°C, le-ta predstavlja tališče α oblike.



Slika 15: DSC analiza resveratrola, Phospholipona 80H in glicerol monostearata (1. in 2. segrevanje).

Slika 16 nam prikazuje termograme fizikalnih zmesi GMS, P80H in RSV v realnem razmerju. V primeru fizikalne zmesi GMS in P80H ne opazimo vrha P80H, iz česar lahko sklepamo, da ga je premalo, da bi se to poznalo na termogramu ali pa se je raztopil v lipidu. Prav tako v kombinaciji z GMS ni vidnega vrha značilnega za RSV. Kombinacija

P80H in RSV nam prikazuje le steklast prehod P80H, brez vrha RSV. Pri temperaturi nad 280°C vidimo več vrhov, ki so po vsej verjetnosti posledica razpada P80H. Ko smo zmešali vse 3 komponente smo kot rezultat dobili le endotermen vrh GMS, brez ostalih posebnosti. V tem primeru tudi ni bilo vrhov, ki bi nakazovali na razpad P80H. Vzrok za to je verjetno solubilizacija P80H v GMS. Enako si razlagamo tudi manjkajoč vrh RSV.

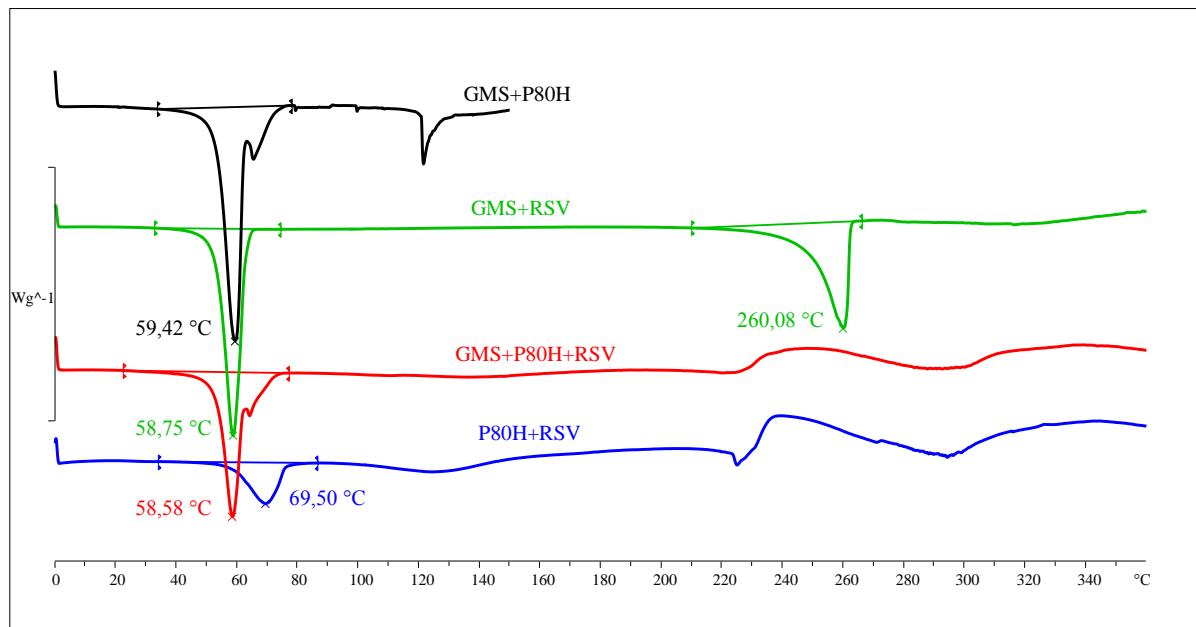


Slika 16: DSC analiza fizikalnih zmesi GMS+P80H, GMS+RSV, GMS+RSV+P80H in P80H+RSV v realnem razmerju, ki nastopa v SLN formulaciji.

Ker smo se želeli prepričati ali je izostanek vrhov v posameznih kombinacijah posledica majhne količine komponente ali gre za kakšno interakcijo med komponentami, ki posledično zakrijejo endotermen vrh, smo komponente v fizikalni zmesi pomešali v razmerju 1:1 (Slika 17).

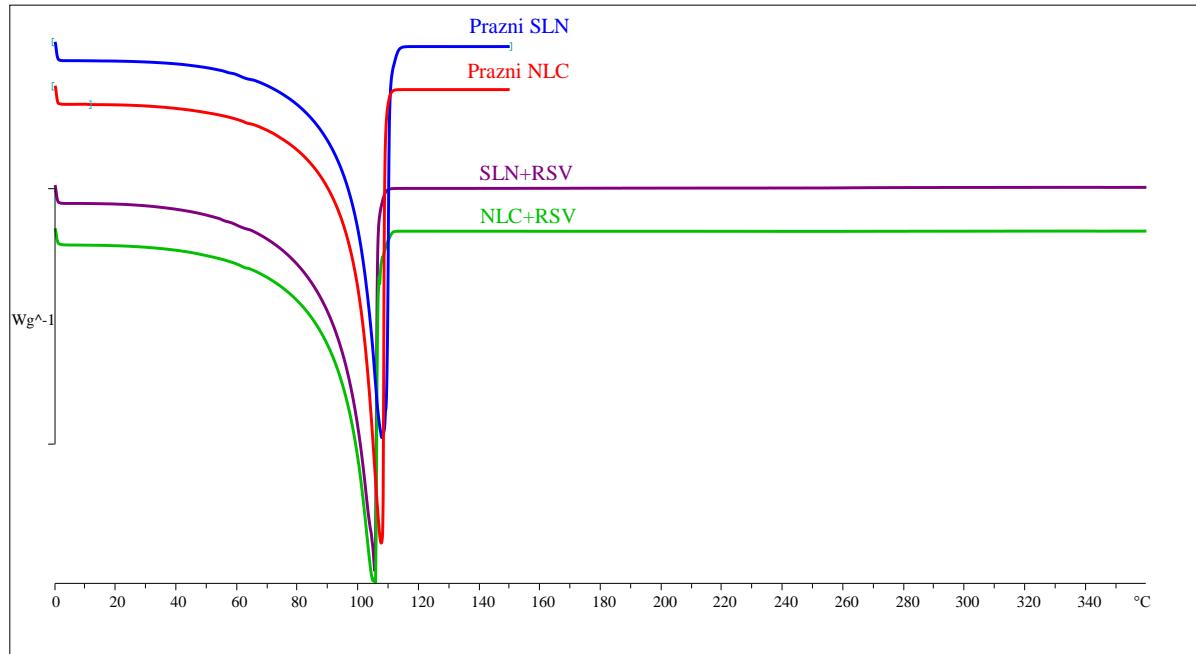
Zmes GMS in P80H nam poleg že znanega endoternega vrha GMS prikazuje še manjši vrh, ki je posledica prisotnosti P80H. Na termogramu fizikalne zmesi GMS in RSV vidimo vrh GMS pri 58,8°C in manjši vrh RSV pri 260°C. Iz tega lahko sklepamo, da GMS v takšnem razmerju nima dovolj sposobnosti, da bi raztopil ves RSV. Situacija je drugačna v primeru fizikalne zmesi P80H in RSV. Na termogramu vidimo vrh, ki predstavlja steklasti prehod P80H, ne pa tudi vrha RSV. To pomeni, da se celotna količina RSV raztopi v P80H, zato ni vidnega endoternega vrha RSV. S termogramom fizikalne zmesi GMS,

P80H in RSV lahko potrdimo zadnjo ugotovitev. Na tem termogramu vidimo vrhova GMS ter P80H, odsoten pa je vrh RSV.

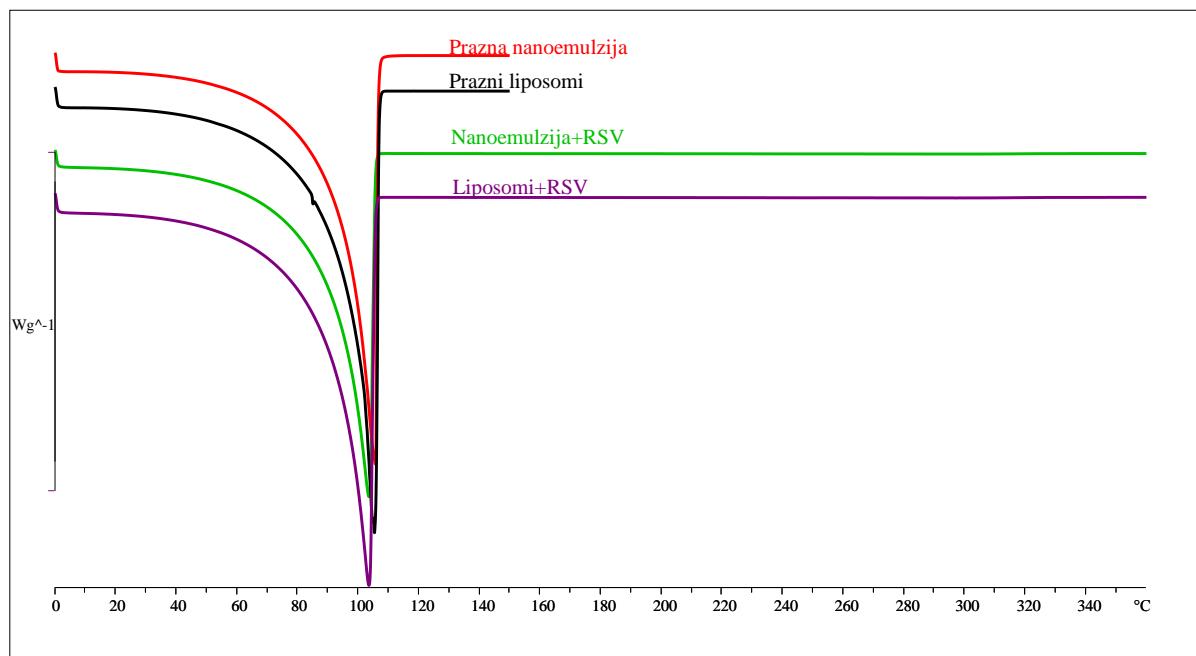


Slika 17: DSC analiza fizikalnih zmesi GMS+P80H, GMS+RSV, GMS+RSV+P80H, P80H+RSV v razmerju 1:1.

Iz fizikalnih zmesi lahko torej sklepamo, da pri analizi disperzij nanosistemov ne bo vidnega endoternega vrha RSV. Slika 18 prikazuje DSC analizo disperzij lipidnih nanodelcev ob prisotnosti oziroma odsotnosti RSV in slika 19 DSC analizo disperzij liposomov in nanoemulzije z in brez RSV. Na nobenem od termogramov ne vidimo vrha RSV, vrh pri 100°C pa je posledica izhlapevanja vode, ki hkrati zakrije vrh GMS.



Slika 18: DSC analiza disperzij SLN in NLC z in brez resveratrola.



Slika 19: DSC analiza disperzij liposomov in nanoemulzije z in brez resveratrola.

5 SKLEP

Zaradi svojih pozitivnih farmakoloških učinkov in nekaterih slabših intrinzičnih lastnosti (slaba topnost v vodi, fotosenzitivnost) je vgrajevanje resveratrola v različne nanosisteme še kako smiselna. Izdelali smo štiri različne nanosisteme, in sicer: trdne lipidne nanodelce, nanostrukturirane lipidne nosilce, nanoemulzije in liposome. V nanosisteme smo vgradili različne količine resveratrola (1, 2, 3, 5 in 10% resveratrola glede na lipid). Količina resveratrola na povprečni premer in zeta potencial nanostruktur ni vplivala, je pa presežek (pri večjih odstotkih resveratrola) učinkovine vplival na porazdelitev velikosti. Kot najbolj optimalna količina se je izkazala 2% količina resveratrola glede na lipid, ki smo jo uporabili za nadaljnjo optimizacijo SLN. Pri tem smo ugotovili, da s povečanjem količine GMS ali P80H nastanejo večji delci in s povečanje količine P188 manjši delci. Kljub temu, pa sprememba količine posameznih komponent ni vodila do bistveno boljših rezultatov, zato smo delo nadaljevali s prvotno recepturo.

V času shranjevanja nanodisperzij, so se kot fizikalno stabilne izkazale vse disperzije nanosistemov brez RSV ter NE in NLC z RSV. Pri disperzijah SLN in L z RSV je prišlo do agregacije, zato ocenjujemo, da so fizikalno nestabilne.

Učinkovitost vgrajevanja smo določali indirektno z UV-VIS spektrofotometrijo s predhodnim centrifugiranjem. V vse nanosisteme smo vgradili 2% RSV glede na GMS. Največjo učinkovitost vgrajevanja smo dosegli z liposomi, sledili so nanoemulzija, SLN in NLC. Z DSC analizo pa smo dokazali amorfno obliko RSV v prisotnosti P80H, tako v fizikalnih zmeseh, kot tudi v disperzijah nanosistemov. Prav tako je RSV v amorfni obliki ob prisotnosti GMS, vendar do določene količine, saj pri razmerju 1:1 GMS ni več sposoben popolne solubilizacije RSV.

Največ težav smo imeli pri določanju učinkovitosti vgrajevanja, saj nam je Miglyol po centrifugiraju v primeru NLC in NE otežil dostop do supernatanta. V nadaljevanju, bi bilo smiselno učinkovitost vgrajevanja določiti s kakšno drugo metodo, na primer s HPLC po predhodni dializi.

6 LITERATURA

1. Jores K, Mehner W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mäder K: Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J Control Release* 2004; 95: 217-227.
2. Swarbrick J: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Third Edition, Informa Healthcare USA, New York, 2007: 636, 4117.
3. Pardeike J, Hommoss A, Müller RH: Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 2009; 366: 170-184.
4. Garud A, Singh D, Garud N: Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications. *Int Current Pharm J* 2012; 1: 384-393.
5. Mukherjee S, Ray S, Thakur RS: Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System. *Indian J Pharm Sci* 2009; 71: 349-358.
6. Müller RH, Radtke M, Wissing SA: Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 131-155.
7. Üner M: Preparation, characterization and physico-chemical properties of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie* 2006; 61: 375-386.
8. Kamble MS, Vaidya KK, Bhosale AV, Chaudhari PD: Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – an overview. *IJPCBS* 2012; 2: 681-691.
9. Müller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J: Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 522-530.
10. Domínguez-Villegas V, Clares-Náveros B, García-López MA, Calpena-Campamany AC, Bustos-Zagal P, Garduno-Ramírez M: Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from Eysenhardtia platycarpa. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014; 116: 183-192.
11. Zülli F, Belser E, Schmid D, Liechti C, Suter F: Preparation and properties of coenzyme Q10 nanoemulsions. *Cosmetic Science Tehnology* 2006; 40-46.
12. Solans C, Solé I: Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2012; 17: 246-254.

13. Sood S, Jain K, Gowthamarajan K: Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014; 113: 330-337.
14. Lovelyn C, Attama AA: Current state of nanoemulsions in drug delivery. *J Biomater Nanobiotechnol* 2011; 2: 626-639.
15. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A: Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2013; 19: 29-43.
16. Escobar-Chávez JJ, Díaz-Torres R, Rodríguez-Cruz IM, Domínguez-Delgado CL: Nanocarriers for transdermal drug delivery. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery* 2012; 1: 3-17.
17. Franzen U, Østergaard J: Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance–liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* 2012; 1267: 32-44.
18. Park JB, Noh H, Jung JH, Kim JM, Kan CY: Enhanced transdermal delivery and optimization of nano-liposome preparation using hydrophilic drug. *Int J Pharm Investig* 2012; 42: 57-63.
19. Sharma A, Sharma US: Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int J Pharm* 1997; 154: 123-140.
20. Bhushan B: Encyclopedia of Nanotechnology. Springer Science+Business Media, New York, 2012: 2473.
21. Murtaza G, Latif U, Najam-Ul-Haq M, Sajjad A, Karim S, Akhtar M, Hussain I: Resveratrol: An active natural compound in red wines for health. *J Food Drug Anal* 2013; 21: 1-12.
22. Gülcin I: Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2010; 11: 210-218.
23. Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, Maciang A, Puca AA, Vecchione C: Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol* 2013; 61: 215-226.
24. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C: Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Control Release* 2012; 158: 182-193.

25. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekers T: Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res* 2008; 658: 68-94.
26. Scognamiglio I, De Stefano D, Campani V, Mayol L, Carnuccio R, Fabbrocini G, Ayala F, La Rotonda MI, De Rosa G: Nanocarriers for topical administration of resveratrol: A comparative study. *Int J Pharm* 2013; 440: 179-187.
27. Lu Z, Cheng B, Hu Y, Zhang Y, Zou G: Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. *Food Chem* 2009; 113: 17-20.
28. Lucas-Abellán C, Fortea I, López-Nicoás JM, Núñez-Delicado E: Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chem* 2007; 104: 39-44.
29. Teskač K, Kristl J: The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int J Pharm* 2010; 390: 61-69.
30. Gokce EH, Korkmaz E, Dellera E, Sandri G, Bonferoni MC, Ozer O: Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 1841-1850.
31. Neves AR, Lúcio M, Martins S, Costa Lima JL, Reis S: Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 177-187.
32. Das S, Ng WK, Tan RBH: Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur J Phar Sci* 2012; 47: 139-151.
33. Hung CF, Fang CL, Liao MH, Fang JY: The effect of oil components on the physicochemical properties and drug delivery of emulsions: Tocol emulsion versus lipid emulsion. *Int J Pharm* 2007; 335: 193-202.
34. Caddeo C, Teskač K, Sinico C, Kristl J: Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *Int J Pharm* 2008; 363: 183-191.
35. Isailović BD, Kostić IT, Zvonar A, Đorđević VB, Gašperlin M, Nedović VA, Bugarski BM: Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *IFSET* 2013; 19: 181-189.
36. European Pharmacopoeia. Fifth edition. Vol. 2: 1677.
37. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME: Handbook of Pharmaceutical Excipients. Sixth Edition, Pharmaceutical Press in American Pharmacists Association, London, Washington, 2009: 290, 560, 499.

38. Phospholipid GmbH (February 2008): *Phospholipon® 80H*. Cologne.
39. Wu L, Zhang J, Watanabe W: Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 456-469.
40. Gardouh AR, Gad S, Ghonaim HM, Ghorab MM: Design and characterization of glyceryl monostearate solid lipid nanoparticles prepared by high shear homogenization. *Br J Phar Res* 2013; 3(3): 326-346.
41. Pandita D, Ahuja A, Lather V, Benjamin B, Dutta T, Velpandian T, Khar RK: Development of lipid-based nanoparticles for enhancing the oral bioavailability of paclitaxel. *AAPS Pharm Sci Tech* 2011; 12(2): 712-722.
42. Mehnert W, Mäder K: Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 47: 165-196.
43. Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Müller RH: Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm* 2004; 278: 71-77.
44. Teeranachaideekul V, Souto EB, Junyaprasert VB, Müller EH: Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and *in vitro* release studies. *Eur J Phar Biopharm* 2007; 67: 414-148.
45. Li B, Ge ZQ: Nanostructured lipid carriers improve skin permeation and chemical stability of idebenone. *AAPS Pharma Sci Tech* 2012; 13: 267-283.
46. Xu W, Ling P, Zhang T: polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. *J Drug Deliv* 2013; 2013: 340315.
47. Yajima T, Itai S, Takeuchi H, Kawashima Y: Determination of optimum processing temperature for transformation of glyceryl monostearate. *Chem. Pharm. Bull.* 2002; 50(11): 1430-1433.