

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA FORSTER
DIPLOMSKA NALOGA
UN KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA FORSTER

**IZDELAVA IN FIZIKALNO VREDNOTENJE HIDROGELA Z VGRAJENIM
ROŽMARINOVIM OLJEM**

**MANUFACTURE AND PHYSICAL EVALUATION OF HYDROGEL WITH
ROSEMARY OIL**

UN KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom prof. dr. Saše Baumgartner.

ZAHVALA

Lepo se zahvaljujem mentorici prof. dr. Saši Baumgartner za strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Za vso pomoč v laboratoriju se zahvaljujem Tatjani Hrovatič in Mojci Keržan.

Zahvaljujem se tudi družini in prijateljem za moralno podporo tekom celotnega študija.

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Saše Baumgartner.

VSEBINA

POVZETEK	I
KLJUČNE BESEDE / KEYWORDS.....	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1. UVOD.....	1
1.1. ROŽMARIN.....	2
1.2. TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CHANNELS - TRP KANALI.....	2
1.3. UPORABA ROŽMARINOVEGA OLJA IN POMEMBNE SPOJINE	6
1.4. REOLOGIJA.....	9
2. NAMEN DELA.....	11
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1. MATERIALI IN APARATURE.....	14
3.2. METODE IN POGOJI	15
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	20
4.1. IZDELAVA IN VREDNOTENJE HIDROGELOV Z VISOKO VISKOZNO (K4M) HPMC IN NIZKO VISKOZNO (K100 LV) HPMC	20
4.2. IZDELAVA IN VREDNOTENJE HIDROGELOV IZ KARBOMERA	22
4.3. VGRADNJA ETERIČNEGA OLJA	24
4.4. DODATEK DRUGIH SPOJIN	25
4.5. VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI HIDROGELOV:	26
5. SKLEP.....	35
6. LITERATURA.....	36

POVZETEK

Znanstveniki se že vrsto let ukvarjajo s spojinami, ki bi pomagale ublažiti mišično občutljivost oziroma bolečino, ki nastane zaradi športne aktivnosti. Sodobna raziskovalna odkritja omogočajo načrtovanje izdelkov na znanstvenih osnovah in opredelitev prijemališč za kozmetično aktivne učinkovine. Ena takih učinkovin je rožmarinovo eterično olje, ki z delovanjem na TRP (Transient Receptor Potential Channels) kanale deluje analgetično. Glavna sestavina olja s tem delovanjem je 1,8-cineol, ki aktivira TRPM8 in zavira TRPA1. TRP kanali predstavljajo področje, ki ga bo potrebno, za natančno razumevanje poteka procesa delovanja podrobneje raziskati.

Namen diplomske naloge je bila izdelava in fizikalno ovrednotenje kozmetičnega izdelka, ki bi bil namenjen masaži in s tem relaksaciji utrujenih in razbolelih mišic po športni aktivnosti. S tremi sredstvi za geliranje (visoko viskozna HPMC, nizko viskozna HPMC, karbomer) smo izdelali različne vrste hidrogelov, ki naj bi služili kot vehikel za vgradnjo rožmarinovega olja. Pozornost smo namenili izgledu, razmaznosti, vpojnosti in občutku na koži. Izbrali smo vehikel iz karbomera, saj je imel najustreznejše organoleptične lastnosti in določili, da je za njegovo izdelavo najbolj optimalna koncentracija 0,55% karbomera. Za opredelitev fizikalne ustreznosti smo hidrokele izpostavili stresnim pogojem (centrifugiranje, ciklični temperaturni test) ter jim izmerili reološke parametre in pH. Reološko ovrednotenje sistema je zajemalo določitev deleža elastičnega in viskoznostnega doprinosa k viskoelastičnemu odzivu.

Merjenje reoloških lastnosti je pomembno pri razvojnem procesu, saj omogoča razjasnitev notranje strukture sistemov in spremljanje fizikalne stabilnosti ter s tem kakovosti izdelka. Po izpostavitvi stresnim pogojem ni prišlo do bistvenih sprememb reoloških parametrov ne glede na število ciklov, dodatek kozmetično aktivne sestavine in koncentracijo polimera, ki smo jo uporabili. Kljub izpostavitvi stresnim pogojem je izdelan hidrogel ohranil stabilno gelsko strukturo, zato na podlagi dobljenih rezultatov ocenjujemo, da je stabilnost našega izdelka neproblematična. Za dokončno potrditev stabilnosti bi morali narediti še dodatne teste, ki jih predlagajo smernice kozmetične industrije.

KLJUČNE BESEDE / KEYWORDS

Rožmarinovo olje / rosemary oil

TRP kanali / TRP channels

Hidrogel / hydrogel

Karbomer / carbomer

Reologija / rheology

SEZNAM OKRAJŠAV

G' - elastični modul (storage modulus) [Pa]

G'' - viskozni ali plastični modul (loss modulus) [Pa]

HPMC - hidroksipropilmetilceluloza

KAS - kozmetično aktivna sestavina

LVO - linearno viskoelastično območje

TEA - trietanolamin

TRP kanali - napetostno odvisni ionski kanali (transient receptor potential channels)

1. UVOD

Med športno aktivnostjo mišice ponavljajoče obremenjujemo in velikokrat je obremenitev večja kot smo vajeni. Tako po intenzivni vadbi po navadi pride do pojava mišične bolečine. Običajno gre za prehodno neprijetno občutenje dražljaja ustvarjenega v somatskih in visceralnih tkivih. To zaznamo kot preobčutljivost in čeprav je izvor na mehanske, toplotne in/ali kemijske dražljaje ter spremljajoče simptome kompleksen, naj bi v osnovi šlo za mikro poškodbe mišičnih vlaken. Občutljivost oz. bolečina, ki jo zaznamo, je torej povzročena zaradi vnetja v mišicah, znanstveniki pa se že vrsto let ukvarjajo s spojinami, ki bi jo pomagale ublažiti (1, 2, 3, 4).

V raziskovanje na področju lajšanja mišične preobčutljivosti sodi tudi športna kozmetika, uvrščamo pa jo med kozmecevtike. Gre za skupino pripravkov, ki imajo lastnosti kozmetičnih izdelkov in farmacevtikov. Niso zdravila, saj pri mišični bolečini ne gre za bolezensko stanje, temveč normalen stranski učinek procesa obnove mišic, hkrati pa niso običajni kozmetični izdelki, ker s stimuliranjem celičnih mehanizmov povzročijo aktivno delovanje v koži. Sodobna raziskovalna odkritja omogočajo načrtovanje izdelkov na znanstvenih osnovah in opredelitev prijemališč za nove kozmetično aktivne učinkovine. Raziskujejo predvsem mehanizme bolečinske preobčutljivosti, to pa izvajajo s spremljanjem obnašanja ionskih kanalov, ki imajo pomembno vlogo pri procesih stimulacije ali zaviranja bolečine. Znano je že, da je veliko kompleksnih snovi-naravnih izvlečkov, sposobno aktivirati ali zavirati te kanale. To je ustvarilo velik interes za identifikacijo predvsem specifičnih spojin z upanjem, da bodo imele te molekule analgetični potencial. Nekatere od njih so sestavine eteričnih olj, zato se le ta v alternativni medicini in športni kozmetiki pogosto uporabljajo kot protibolečinska in protivnetna sredstva. Specifične sestavine, ki zagotavljajo njihove učinke in molekularni mehanizmi delovanja, pa so večinoma še neznani. Neželeni učinki so ob uporabi primernih koncentracij običajno minimalni ali odsotni, zato so lahko eterična olja obetaven vir za razvoj analgetikov. Eno od teh eteričnih olj, ki potencialno blaži simptome bolečine, je tudi rožmarinovo olje (1, 4, 5).

ROŽMARIN

Navadni rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) je do 2m visok aromatičen zimzelen grm sredozemskega izvora, ki spada v družino ustnatic (*Lamiaceae*). Ima 2-4 cm dolge ter 2-5 mm široke močno dišeče igličaste liste, ki so na zgornji strani zeleni, spodaj pa belo dlakavi. Cvetovi so beli, roza, vijolični ali modri.

Rožmarinu pripisujejo protimikrobne, antioksidativne, protitumorne, antipruritične, protivnetne, antimutagene in protivirusne lastnosti. Eterično olje pospešuje prekrvavitev in deluje spazmolitično. Najbolj poznana je sicer uporaba svežih ali posušenih listov za začinjanje mediteranskih jedi, saj ima trpek okus in oster vonj, v živilstvu pa se uporablja tudi kot konzervans. Večstransko je uporaben v zdravstvu pri prebavnih težavah, motnjah krvnega obtoka, revmatizmu, depresiji in krčih gladkega mišičja. Pomembno vlogo pa ima tudi v kozmetični industriji. Prisoten je v pripravkih za masažo, za ustno higieno, vodících po britju in pri izdelkih proti zgodnjemu pojavu plešavosti (6).

Najpogostejše sestavine rožmarinovega olja:

Listi in vejice vsebujejo 1,0 - 2,5% eteričnega olja, katerega glavne sestavine so 1,8-cineol (20-50%), kafa (10-25%), α -pinen (15- 25%), kampen, borneol, bornil acetat, limonen, mircen, α -terpineol, ostale snovi pa so še drugi terpeni, rožmarinska kislina, flavonoidi, karnozol in ursolna kislina (5, 6, 7, 8, 9).

TRP KANALI

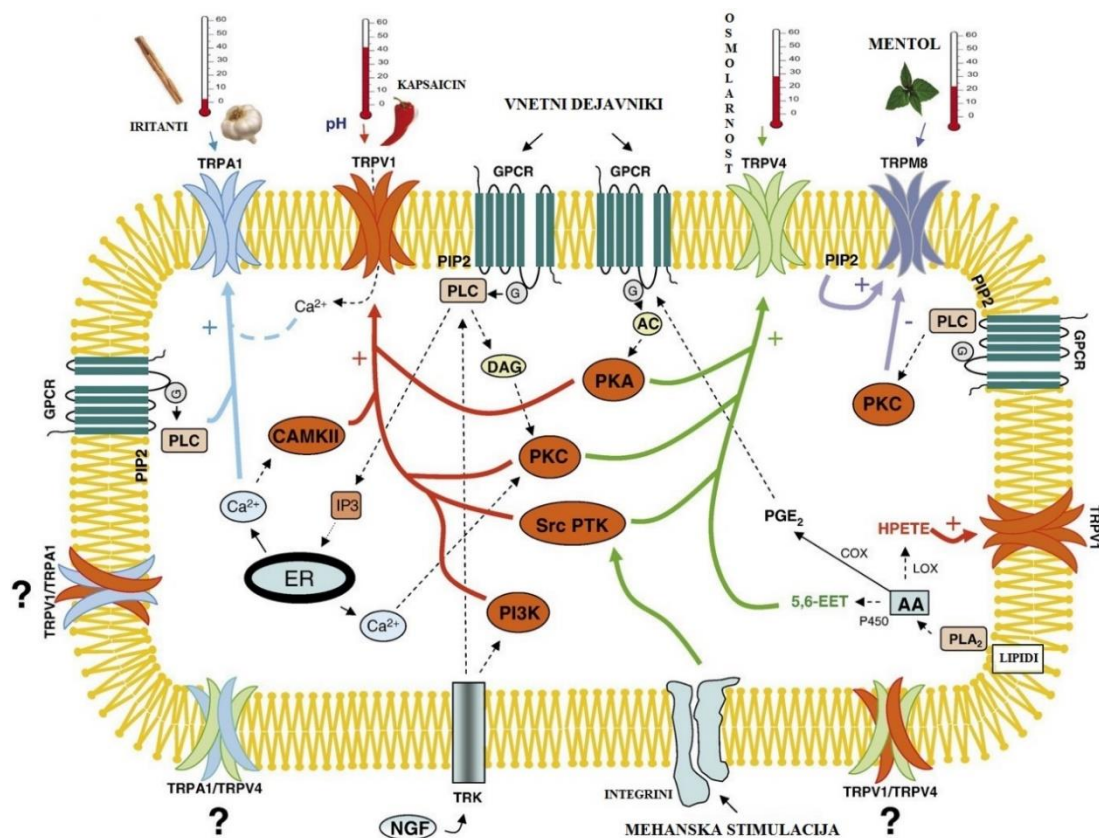
Senzorično zaznavanje zagotavljajo kožni receptorji, tisti, ki reagirajo na prisotno ali potencialno poškodbo tkiva, pa se imenujejo nociceptorji. Gre za bolečinske receptorje oziroma proste končiče živčnih vlaken, ki jih stimulirajo toplotni, kemijski ali mehanski dražljaji (1). Biokemijsko so to beljakovinske molekule, ki tvorijo kanale in delujejo kot molekulski senzorji teh fizikalnih in kemijskih stimulacij. Med njimi imajo pomembno vlogo ionski kanali iz družine TRP (Transient Receptor Potential Channels), ki je ena izmed največjih družin ionskih kanalov (10). Sekvenčna homologija sesalskih TRP kanalov je majhna, zato so med seboj presenetljivo raznoliki. Na podlagi aminokislinskega zaporedja so razdeljeni v 6 poddružin: kanonični (TRPC-canonical), vaniloidni (TRPV-vanilloid), melastatski (TRPM-melastatin), policistinski (TRPP-polycystin), mukolupinski (TRPML-mucolipin) in anikrinski (TRPA-anykrin) TRP kanali (2). Raznolikost aminokislinskega

zaporedja je tudi razlog za najrazličnejše načine aktivacije (temperatura, kemijske spojine, osmolarnost, mehanska stimulacija, lipidi, svetloba, oksidativni stres, kisline, feromoni, membranska napetost), regulacije (transkripcija, alternativno spajanje, glikozilacija, fosforilacija), ionske selektivnosti, distribucije in fiziološke funkcije (11).

VRSTE TRP KANALOV:

Za študij ionskih kanalov je najbolj primerno izolirano molekularno okolje, zato jih izvajamo na živalih in celičnih kulturah z izraženimi le določenimi TRP kanali. Preiskovanje vlog vsakega od fizikalno ali kemijsko občutljivih kanalov je pomembno za razumevanje senzorične transdukcije in odkrivanje molekulskih determinant za njihovo občutljivost (2, 12). Rezultati študij nam podajo pregled vlog TRP kanalov in mehanizmov delovanja ter nam pomagajo bolje razumeti razmerje med strukturo in delovanjem preiskovanih kanalov. Za večino kanalov obstajajo specifične majhne molekule, ki delujejo kot aktivatorji ali zaviralci, zato je funkcija kanalov močno modulirana preko posttranslacijskih modifikacij in znotrajceličnih signalnih poti. Treba pa se je zavedati, da so študije TRP ionskih kanalov običajno obremenjene s pomanjkanjem farmakološke selektivnosti uporabljenih spojin, ali pa s pomanjkanjem znanja o njihovem obnašanju ter, da sprožajo vprašanja o specifičnosti in stranskih učinkih (12). Trenutna klinična preizkušanja prispevkov agonistov in antagonistov kot analgetičnih substanc bodo, upajmo, kmalu zagotovila bolj dokončen odgovor o vlogi TRP kanalov pri različnih modelih bolečine (2).

Za raziskovanje zaznavanja bolečine so najbolj pomembna odkritja o TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 in TRPM8 kanalih (Slika 1). TRPV1, TRPV2, TRPV3 in TRPM8 pogosto uvrstimo med termoreceptorje, TRPV4 in TRPA1 pa med mehanoreceptorje, vendar pa je posebnost TRP kanalov njihova polimodalnost (sposobnost odziva na različne stimulacije), zato TRPV1, TRPV3, TRPM8 in TRPA1 uvrščamo med kemoreceptorje, TRPV4 in TRPA1 pa med termoreceptorje (2, 24).



Slika 1 Shematski prikaz nekaterih TRP kanalov in različne signalne poti. Prirejeno po (2).

TRPV1 je bil prvotno imenovan vanilloid receptor 1 (VR1) in je splošno poznan kot kapsaicinski receptor. Prvič so ga opisali kot receptor, ki ga aktivirajo trije potencialno boleči dražljaji: vaniloidne spojine, zmerna vročina ($\geq 43^{\circ}\text{C}$) in nizek pH ($< 5,9$). Kasneje so poročali tudi o aktivaciji z drugimi spojinami (kafro, alicinom, dušikovim oksidom, pajkovimi toksini, potenciranju z etanolom in moduliranju z zunajceličnimi kationi). Ugotovitve kažejo, da aktivirani TRPV1 kanali, ki so najštevilčnejše izraženi v senzoričnih nevronih, ne sodelujejo samo pri kemijsko izzvani bolečini in ob zmerni vročini, ampak prispevajo tudi k periferni senzibilizaciji, tako da delujejo kot končni substrat za številne vnetne mediatorje, ki indirektno senzibilizirajo TRPV1 (6, 24). S tem pomembnim spoznanjem so se začele prve klinične preiskave morebitne vloge TRPV1 pri modelih akutne in kronične bolečine, namen katerih je nadaljnje razvozlati funkcijo TRPV1 in oceniti prispevek TRPV1 k bolečini. Poleg tega TRPV1 tkivno izražanje jasno kaže, da vloga TRPV1 ni omejena le na zaznavanje bolečine, temveč da kanali sodelujejo tudi pri fizioloških in patoloških procesih. Čeprav niso bile vse študije izvajane s podobnimi testi in pod primerljivimi pogoji, se pojavlja skupna ugotovitev, da je TRPV1 pomemben dejavnik za bolečino, čeprav je njegova vloga očitno bolj zapletena, kot so sprva mislili (2).

TRPV2 je strukturni homolog TRPV1 in je neobčutljiv na kapsaicin in protone, aktivirajo pa ga visoke temperature (okoli 52°C). Njegova vloga v senzoričnih nevronih ni popolnoma jasna, toda študije nakazujejo na prispevek k periferni preobčutljivosti med vnetnim procesom. Zaradi različne distribucije TRPV2 v primerjavi s TRPV1 ter visoke temperature, ki mora biti presežena, za aktivacijo TRPV2 obstaja manj študij TRPV2 kot TRPV1. Pomen teh kanalov pri zaznavanju bolečine je treba še podrobneje raziskati (2).

TRPV3 močno aktivira kafa ter zmerna toplota ($\geq 34^\circ\text{C}$), odziv pa se okrepi pri naslednjih ponavljajočih se stimulacijah. Gre za proces, ki po dolgotrajni izpostavljenosti povzroči, da je za enak učinek potreben večji odmerek ali pa povzroči preobčutljivost na normalne koncentracije neurotransmiterja. Lahko vodi v odvisnost, toleranco in abstinenco po odtegnitvi. Tkivno izražanje se razlikuje glede na vrsto (človek, glodalci), kar je še dodaten prispevek h kompleksnosti razumevanja vloge TRPV3 pri bolečini. Najbolj proučujejo njihovo vlogo v keratinocitih, kjer je ta protein pomemben pri zaznavanju tako neškodljivih kot tudi škodljivih toplotnih dražljajev (2, 13, 14, 15).

TRPV4 je polimodalni receptor, ki se aktivira s temperaturo nad 27 °C, kislim pH-jem ter različnimi kemijskimi spojinami. TRPV4 je prav tako kot TRPV3 močno izražen v kožnih keratinocitih, za opredelitev relativnega prispevka funkcije TRPV4 senzoričnih nevronov v keratinocitih pri kemijskem in temperaturnem induciranju bolečine, pa so potrebne nadaljnje raziskave. Rezultati kažejo na pomembno vlogo TRPV4 pri razvoju termalne in mehanske preobčutljivosti, ki sledi izpostavitvi vnetnim mediatorjem. Trenutno znanje o funkciji TRPV4 pa nakazuje, da pri povzročitvi periferne senzitivacije deluje komplementarno s TRPV1 (2, 13, 14).

TRPM 8 je znan predvsem kot s hladnim ($<30^\circ\text{C}$) aktiviran kanal in z izrazitimi napetostno odvisnimi lastnostmi odpiranja. TRPM8 aktivirajo tudi spojine kot so mentol, evkaliptovo olje in icilin, aktivacija pa je odvisna od različnih dejavnikov kot sta koncentracija intracelularnega in ekstracelularnega Ca^{2+} ter pH (2, 15). Posreduje pri zaznavanju hladnih dražljajev in tako prispeva k učinkom hladne analgezije. Razpon neškodljivih in škodljivih temperatur, na katere se odziva, regulatorna vloga znotrajcelične kislosti in njegova sposobnost prilagajanja dolgo trajajočim dražljajem kažejo, da je TRPM8 kandidat senzorične transdukcije, ki prispeva k bolečinski preobčutljivosti povezani z vnetjem ali

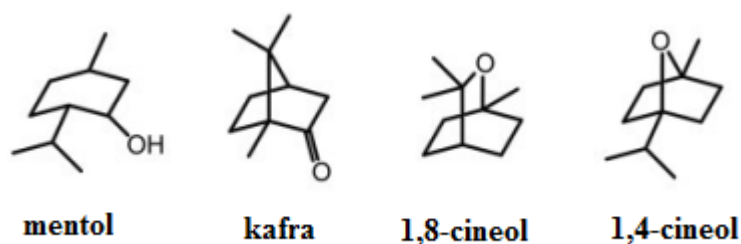
nevropatijo. Deluje v povezavi z receptorjem TRPV1 ter preko signalov iz različnih vlaken različnih temperaturnih občutljivosti posreduje pri našem zaznavanju teh dražljajev. V nasprotju s TRPV1 receptorjem, ki se aktivira z nizkim pH, kisli pogoji zavirajo TRPM8. Domnevajo da TRPV1 in TRPM8 receptorji delujejo skupaj pri odgovoru na vnetna stanja. TRPV1 z delovanjem protonov povečuje pekoč občutek bolečine, medtem ko kislost zavira TRPM8 in s tem blokira prijetnejši občutek hlajenja. Dolgotrajna izpostavljenost aktivatorjem TRPM8 lahko privede do desenzibilizacije receptorjev, kar lahko povzroči izgubo učinka, ustvari potrebo po večjih odmerkih za doseg enakega učinka, ali pa vpliva na neodzivnost na normalne koncentracije nevrottransmitorja (11, 15).

TRPA1 je vzdražni ionski kanalček aktiviran in signaliziran z iritantnimi snovmi (cinamalaldehid, metilsalicilat), ki povzročajo akutno boleče ter pekoče in zbadajoče dražljaje. Izražen je v heterolognih sistemih ter deluje v različnih senzoričnih procesih, vključno z intenzivno hladno nocicepcijo (zamrznitev) in vnetno bolečino. Strukturna osnova za njegovo aktiviranje ni jasna, je pa njegova vloga občutljivosti na iritante potrjena, zato je TRPA1 znan predvsem kot kemični nociceptor za najrazličnejše spojine. Priznavajo ga tudi kot senzor pri zaznavanju škodljivega mraza, vendar njegova vloga in vivo še vedno ni povsem razumljiva (2, 16). Aktivira ga tudi alkalen pH in mehanska stimulacija. TRPM8 je toplotno občutljiv receptor, ki zazna padec temperature, medtem ko je TRPA1 senzor zelo nizkih temperatur. TRPA1 je izražen skupaj s TRPV1, medtem ko je le redko hkrati izražen s TRPM8. Njegovo sočasno izražanje in domnevno funkcionalna interakcija s TRPV1 nakazujejo na obstoj prispevka TRPV1 k delovanju TRPA1 in s tem na zaznavanje bolečine (11, 16). Čeprav ostaja veliko vprašanj glede natančnega načina aktivacije TRPA1, je njegov prispevek k nocicepciji povsem potrjen, zato je raziskovanje TRPA1 zaviralcev obetavno predvsem za ugotavljanje njihove vloge kot protibolečinske spojine (2).

UPORABA ROŽMARINOVEGA OLJA IN POMEMBNE SPOJINE

Za izdelavo pripravkov za lajšanje bolečin so v farmaciji in kozmetiki zaželjene naravne analgetične spojine, ki ne pospešijo signalizacije bolečine. Idealen učinkovit analgetik bi bila spojina, ki bi selektivno aktivirala TRPM8 in zavirala TRPA1, hkrati pa ne aktivirala TRPV1. Tako delujoča spojina bi domnevno povzročala občutek lagodja, saj aktivacija TRPM8 povzroča ugodne hladne občutke, TRPA1 in TRPV1 pa bolečino. Da bi našli obetavne tarče za razvoj analgetikov, so Takaishi in sodelavci (11) v študiji pregledali in

ocenili učinke različnih eteričnih olj in njihovih dišavnih komponent. Spremljali ter primerjali so sposobnost aktiviranja TRPM8 in TRPA1, ter na podlagi preprostega izračuna (vrednost aktiviranja TRPM8/vrednost aktiviranja TRPA1) podali razmerje med njima. Do opredelitve konkretnjših rezultatov jih je pripeljala analiza evkaliptovega olja in njegovih dišavnih spojin. Evkaliptovo olje vsebuje poleg 1,8-cineola tudi 1,4-cineol. S primerjavo štirih spojin s podobnimi strukturami (mentol, kafra, 1,8-cineol in 1,4-cineol) (Slika 2) so prišli do zanimivega odkritja, da čeprav so spojine strukturno podobne nimajo enakega učinka na TRPM8 in TRPA1. Mentol in 1,4-cineol sta aktivirala TRPM8 ter TRPA1, kafra je zavrla delovanje TRPA1, 1,8-cineol pa je aktiviral TRPM8 in hkrati zavrl TRPA1. Dejstvo, da štiri podobne spojine povzročajo različne učinke na TRPM8 in TRPA1 kaže, da bi podrobnejše analize pripomogle k boljšemu razumevanju strukturne podlage za delovanje teh spojin. Glavna učinkovina, ki torej deluje analgetično in se v največjih koncentracijah nahaja tudi v rožmarinovem eteričnem olju je 1,8-cineol, sledi pa ji še zelo podobna kafra (7).



Slika 2 Strukturne formule spojin, ki delujejo na TRP kanale. Prirejeno po (11).

- 1,8-CINEOL

V študiji so Takaishi in sodelavci spojino identificirali kot glavno izstopajočo sestavino novih naravnih antagonistov TRPA1, saj je izkazala izredno visoko sposobnost aktivacije TRPM8 ob hkratni zaviralni regulaciji TRPA1. V odvisnosti od odmerka je 1,8-cineol zavrl TRPA1 dražljaje, katerih aktivacija je bila povzročena s TRPA1 agonisti različnih mehanizmov delovanja, kar dokazuje, da 1,8-cineol zavira kemično nocicepcijo. TRPM8 je protein oziroma toplotni kanal, ki zazna hladnost ali padec temperature, TRPA1 pa intenzivno mrzle dražljaje. Iz prakse vemo, da eterična olja bogata z 1,8-cineolom tudi pri zelo visokih koncentracijah ne povzročajo močnejšega občutka hlajenja. Razlog je zavrtje TRPA1, ki zavira občutek intenzivne hladnosti. Zato lahko 1,8-cineol opredelimo kot

agonista TRPM8 in antagonista TRPA1 kanalov (11). Odkrili so tudi, da 1,8-cineol aktivira tudi TRPV3 kanale, ki so vpleteni v zaznavanje toplote. Ta nenavadna kombinacija učinkov na TRPV3 (toplota in analgetični učinek), TRPM8 (hlajenje in analgetični učinek) ter TRPA1 (zavrt občutek intenzivne hladnosti) je na molekularnem nivoju pojasnila dolgoletno uporabo substanc, ki so vsebovale 1,8-cineol, v analgetične namene (11, 17). Opazili so še nezmožnost aktivacije TRPV1 in TRPV2 ter zaviralne učinke na nastanek prostaglandinov in citokinov in vitro. Kljub temu pa molekularne tarče in podobni mehanizmi delovanja 1,8-cineola ostajajo nejasni (11, 25).

Povezava z mentolom

Za lajšanje bolečin se uporablja tudi mentol, glavna sestavina poprove mete. Za mentol je znano, da aktivira tako TRPM8 in TRPA1, kar lahko povzroči lagodne ali pa dražeče občutke. Analgetično deluje preko aktivacije TRPM8, senzorično iritacijo pa povzroča z aktivacijo TRPA1. Sočasna uporaba mentola z 1,8-cineolom bistveno zmanjša draženje, verjetno zaradi zaviranja TRPA1 z 1,8-cineolom. Čeprav se mentol v vsakdanjem življenju veliko uporablja za lajšanje bolečin, sposobnost, da aktivira TRPA1, omejuje njegovo širšo uporabo kot analgetika (11, 15, 23).

- KAFRA

Je naravno prisotna sestavina eteričnih olj, ki imajo protibolečinsko delovanje in predstavlja do 25 % vsebnosti v rožmarinovem eteričnem olju (18). Za kafro je značilno, da omogoča tako vroče kot mrzle zaznave. Občutljivost na vročino lahko razložimo z aktivacijo na toploto občutljivih TRPV1 in TRPV3 kanalov. Deluje tudi z aktivacijo TRPM8, kar lahko pojasni rezultate psihofizičnih študij na ljudeh, ki so navajali hladna občutja ob njeni aplikaciji (21). TRPM8 kanali se aktivirajo na koncentracijsko in temperaturno odvisen način, občutljivost pa je najvišja v temperaturnem območju med 25 in 32 °C. Prav tako se na njihove različne domene vežejo različne spojine (11, 18, 19). Ko primerjamo delovanje kafe in mentola, je zanimivo, da je kafa zaviralec z mentolom sproženih odzivov, saj aktivacija TRPM8 poteka na drugačen način. Sposobnost zaviranja z mentolom sproženih odgovorov ima tudi 1,8-cineol. Kafa in 1,8-cineol spadata med biciklične monoterpe, mentol pa med monociklične monoterpe. Ta razlika lahko pojasni drugačno delovanje teh

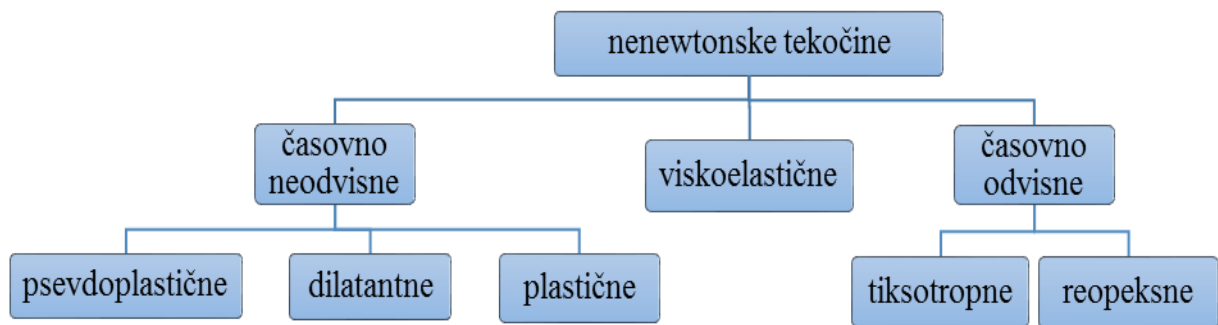
dveh spojin na TRPM8, različno koncentracijsko območje učinkovanja in možen drug mehanizem aktivacije (12, 19). Hipotezo drugačnega načina delovanja kafe in mentola pa potrjuje tudi sinergistični učinek icilina in kafe, saj je tak efekta pri icilinu in mentolu odsoten (22). S tem so lahko farmakološke lastnosti nadaljnjo razširjene in sicer na predpostavko, da imata icilin in kafa enako domeno za aktivacijo TRPM8. Potrebne so seveda nadaljnje študije, da bomo dobili še več podatkov o molekularnih dejavnikih in mehanizmih vključenih v odpiranje TRPM8 kanalov in s tem zagotovili pomembne informacije za kozmetično in farmacevtsko industrijo (11, 18, 19). Zagotovo pa lahko uporabimo znanje, ki ga imamo sedaj. Tako lahko trdimo, da kafa ni najbolj primeren adjuvans v izdelkih, ki vsebujejo mentol, katerega delovanje je usmerjeno v aktivacijo TRPM8, saj s kafro dosežemo ravno nasprotni učinek. Lahko pa je učinkovita pri icilin vsebujočih pripravkih, saj potencira aktivacijo TRPM8 (11, 19). Dvomljiva je tudi uporaba kafe kot samostojne substance, saj z domnevno aktivacijo TRPV1 povzroča tople in vroče zaznave, kar bi potencialno lahko ustvarilo pekoč občutek in s tem morebitno povečalo bolečino. Rezultati različnih študij pa kažejo tudi, da kafa lahko aktivira TRPM8 v območju koncentracij, ki so nižje od tistih, ki se običajno nahajajo v topikalnih pripravkih (11, 19, 20).

REOLOGIJA

Z reološkega vidika delimo tekočine v dve skupini:

- Newtonske tekočine so idealizirane tekočine pri katerih viskoznost ni odvisna od smeri, jakosti in časa delovanja striga, zato pri danem tlaku in temperaturi izkazujejo konstantno viskoznost. Z naraščajočo temperaturo viskoznost zaradi povečanega Brownovega gibanja molekul pada, odvisnost med strižno napetostjo in strižno hitrostjo pa je linearna. Veliko realnih tekočin v določenem območju strižnih napetosti ali temperaturnem območju izkazuje newtonsko obnašanje (27).

- Nenewtonske tekočine so realne tekočine pri katerih odvisnost med strižno hitrostjo in strižno napetostjo ni linearna. Ločimo različne sisteme:



- pseudoplastični (viskoznost z večanjem strižne obremenitve pada),
- dilatantni (viskoznost z večanjem strižne obremenitve narašča),
- plastični (kot pseudoplastični, le, da je potrebna določena sila-mejna napetost, da snovi stečejo),
- viskoelastični (kompleksno obnašanje-viskozno in elastično, po razbremenitvi pa shranjena energija omogoča vrnitev v prvotno obliko, za tisti delež, ki pripada elastičnosti),
- tikotropni (viskoznost s časom in naraščajočo obremenitvijo pada, v razbremenitveni fazi pa se struktura po določenem času ponovno zgradi – proces je reverzibilen),
- reopeksni (nasprotje tikotropnemu, v obremenitveni fazi se strukturiranost veča, v razbremenitveni fazi pa se vzpostavi prvotno stanje) (27, 28).

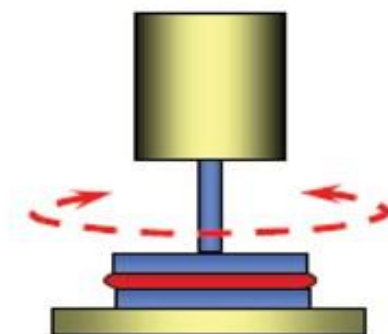
MERJENJE REOLOŠKIH LASTNOSTI

Merjenje reoloških lastnosti je ključno za spremljanje kakovosti izdelkov in njihovih lastnosti ter se večinoma uporablja v proizvodnji hrane, gum, plastičnih mas, barv, črnih in mnogih drugih izdelkov. Pomembno mesto ima tudi v kozmetologiji, saj omogoča razjasnitev notranje strukture sistemov, spremljanje fizikalne stabilnosti in obnašanja vhodnih materialov pod vplivom temperature ter pomaga pri razvojnem procesu, optimizaciji, formuliranju, kontroli kakovosti končnih izdelkov in izbiri ustreznih vhodnih surovin (27, 28, 29).

V osnovi sta mogoča dva načina izvedbe meritev: rotacija in oscilacija.

Rotacija se uporablja bolj za raziskovanje psevdoplastičnosti, plastičnosti in dilatance. Metoda je podobna merjenju viskoznosti z rotacijskimi viskozimetri (29).

Oscilacija (Slika 3) se pogosteje uporablja za proučevanje reoloških lastnosti viskoelastičnih snovi kot so polimerne raztopine, geli, elastomeri. Pri oscilaciji spreminjamo deformacijo (amplitudo) in frekvenco obremenitve (29). Različni pogoji izvajanja meritev oz. obremenitve vplivajo na rezultate, saj lahko prevelika amplituda poruši vezi v materialu in spremeni lastnosti, prevelika frekvenca pa zakrije viskoznost materiala. Velikost teh dveh parametrov je odvisna od testiranega materiala in namena uporabe. Potrebno je zagotoviti, da je amplituda v območju linearno viskoelastičnih deformacij materiala, sicer ne dobimo smiselnih rezultatov (27, 29).



Slika 3 Prikaz oscilacije z vzporednima ploščama (29).

VISKOELASTIČNE LASTNOSTI SNOVI

Notranja mikrostruktura tekočin pri pogojih mirovanja zavzame energetsko najugodnejše stanje. Ob obremenitvi sistema se pojavi deformacija, ki z vneseno silo do neke mere linearno narašča, po deformaciji pa sile v sistemu težijo k povrnitvi mikrostrukture v stanje pred mirovanjem oziroma ravnotežno stanje. Pri tem procesu se delež energije uporabi za preoblikovanje sistema, delež pa se shrani in omogoča vrnitev sistema v prvotno obliko. Dve osnovni lastnosti materialov kot odziv na delovanje strižnih sil sta viskoznost/plastičnost in elastičnost, realne snovi pa opredelimo kot viskoelastične, saj izkazujejo obe vrsti lastnosti. Vrednotenje viskoelastičnih lastnosti nam omogoča sklepanje na strukturo materiala in razlaganje različnih pojavov znotraj sistema (27).

Namen reološke karakterizacije z oscilacijskim testom je določitev elastične in viskozne komponente. Elastični modul (G') je modul shranjene energije, viskozni ali plastični modul (G'') pa je modul energetskih izgub. Idealna trdna snov ima $G'' = 0$, idealna tekočina pa $G' = 0$. Odziv materiala na periodično delovanje strižne deformacije prikazuje frekvenčna odvisnost dinamičnih modulov G' in G'' . Snov izraža pretežno viskozne/plastične lastnosti, ko je $G'' > G'$ (npr. polimerna raztopina) in pretežno elastične lastnosti, ko je $G'' < G'$ (npr. gelska struktura). Pri viskoznem obnašanju opazimo zelo velik vpliv frekvence oscilacije na dinamična modula, ki pa sta izrazito frekvenčno neodvisna pri gelski strukturi. Takrat na grafu opazimo plato, ki je značilno za viskoelastične poltrdne snovi (27).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je izdelava in fizikalno ovrednotenje kozmetičnega izdelka, ki bi bil namenjen masaži in s tem relaksaciji utrujenih in razbolelih mišic po športni aktivnosti.

V začetku bomo razvili hidrogel kot vehikel, zato bomo najprej izbrali ustrezno gelirno sredstvo za njegovo izdelavo. Poizkusili bomo z višje viskozno in nižje viskozno hidroksipropilmetilcelulozo (HPMC) ter karbomerom, odločitev o primernosti pa bo temeljila na ustreznosti organoleptičnih lastnosti. Na podlagi senzoričnih lastnosti bomo določili tudi njegovo optimalno koncentracijsko sestavo. Kozmetično aktivna sestavina, ki jo bomo vgradili, bo rožmarinovo eterično olje, saj smo pri pregledu literature ugotovili, da ima velik potencial pri lajšanju bolečin. Izdelan kozmetični izdelek bomo nato izpostavili stresnim pogojem in ga ovrednotili z vidika fizikalne stabilnosti. Po izpostavitvi stresnim pogojem bomo spremljali morebitne spremembe videza in rezultate reoloških meritev.

3. MATERIALI IN METODE

- **MATERIALI IN APARATURE:**

MATERIALI:

- HPMC Methocel K4M Premium (molska masa = 86000 g/mol; viskoznost (2% vodna raztopina, 20°C) = 100 mPa·s; stopnja čistosti \geq 99%), Colorcon, Velika Britanija,
- HPMC Methocel K100 LV Premium (molska masa = 26000 g/mol; viskoznost (2% vodna raztopina, 20°C) = 4000 mPa·s; stopnja čistosti \geq 99%), Colorcon, Velika Britanija,
- karbomer Carbopol 940, stopnja čistosti $>$ 99% Lex d.o.o., Slovenija,
- trietanolamin, stopnja čistosti \geq 99%, Sigma-Aldrich, Nemčija,
- natrijev metilparahidroksibenzoat, stopnja čistosti $>$ 99.0% Lex d.o.o., Slovenija,
- glicerol, stopnja čistosti $>$ 99.0%, Pharmachem Sušnik Jožef s.p., Slovenija,
- eterično olje navadnega rožmarina, Lex d.o.o., Slovenija,
- prečiščena voda.

APARATURE:

- precizna tehtnica Vibra AJ Tuning-fork Balance (max 1200g), Japonska,
- precizna tehtnica Kern KB (max 360g), Nemčija,
- pH meter Mettler Toledo SevenCompact, Švica,
- centrifuga Centric 322 A, Slovenija,
- hladilnik Gorenje, Slovenija,
- termostat SP-45 Kambič, Slovenija,
- reometer Physica MCR 301, Anton Paar[®], Avstrija, nastavek: CP50-2, D = 50mm, kot 2°.

- **METODE IN POGOJI:**

3.1 IZDELAVA HIDROGELOV Z VISOKO VISKOZNO (K4M) HPMC IN NIZKO VISKOZNO (K100 LV) HPMC

Naredili smo dve seriji gelov (ena serija z visoko viskozno HPMC in druga serija z nizko viskozno HPMC). Znotraj vsake serije smo poizkusili z dvema načinoma izdelave in sicer s postopkom nabrekanja ter toplim postopkom. Izdelali smo po 100g posameznega gela.

Postopek z nabrekanjem:

Izdelali smo 2,5%, 5% in 10% hidrogelov. V patene smo natehtali različne količine HPMC in jih s pomočjo pestila raztrli z različnimi količinami glicerola. Nato smo postopoma dodajali prečiščeno vodo do 100g. Sestava hidrogelov je prikazana v Preglednici I. Izdelane hidrogelov smo pokrili s parafilmom in jih 1 uro pustili nabrekati na sobni temperaturi.

Preglednica I: Izdelava hidrogelov s postopkom nabrekanja.

	HPMC (%)	HPMC (g)	glicerol (g)	voda (g)
HIDROGEL S HPMC K4M	2,5%	2,5	5	do 100g
			10	
	5%	5	5	
			10	
	10%	10	5	
			10	
HIDROGEL S HPMC K100 LV	2,5%	2,5	5	do 100g
			10	
	5%	5	5	
			10	
	10%	10	5	
			10	

Topli postopek:

Izdelali smo hidrogelov z 2% in 4% in 6% deležem HPMC. Sestava hidrogelov je prikazana v Preglednici II. V čašah smo 1/3 destilirane vode segreli na 90°C. Dodali smo HPMC in močno zmešali, da je prišlo do čimbolj popolnega dispergiranja HPMC. Nato smo ob konstantnem mešanju postopoma dodajali mešanico 3g glicerola in preostalih 2/3 destilirane vode, ki je imela sobno temperaturo.

Preglednica II: Izdelava hidrogelov s toplim postopkom.

	HPMC (%)	HPMC (g)	glicerol (g)	voda (g)
HIDROGEL S HPMC K4M	2%	2	3	1/3 vode - 90 °C
	4%	4		do 100g
	6%	6		2/3 vode - sobna temp.
HIDROGEL S HPMC K100 LV	2%	2	3	1/3 vode - 90 °C
	4%	4		do 100g
	6%	6		2/3 vode - sobna temp.

3.2 IZDELAVA HIDROGELOV IZ KARBOMERA

Izdelali smo gele z različnimi koncentracijami karbomera (2,0%, 1,0%, 0,65%, 0,60%, 0,50%, 0,55%, 0,45%, 0,25%). Izdelali smo 100g posameznega gela, postopki so opisani v nadaljevanju.

Karbomer smo v pateni s pomočjo pestila raztrli s 3g glicerola. Ob mešanju smo postopoma dodajali vodo. Pateno smo pokrili s parafilmom in segrevali v vodni kopeli, ki je imela 70°C. Vmes smo večkrat premešali. Ko je prišlo do popolnega raztapljanja karbomera (po 20-30 minutah) smo pateno vzeli iz vodne kopeli in počakali, da se je raztopina ohladila na sobno temperaturo. Sledila je nevtralizacija karbomera tako, da smo postopoma in ob konstantnem mešanju k raztopljenemu karbomeru vlili raztopino vode in trietanolamina (TEA), ki smo jo vnaprej pripravili iz 20g vode in iz ustreznih količin TEA. Ustrezne količine TEA smo določili empirično tako, da smo karbomer nevtralizirali do pH vrednosti 6 ± 0.5 . Po vlitju raztopine vode in TEA smo mešali 5-10 minut, da je prišlo do enakomerne razporeditve in s tem tudi do enakomerne nevtralizacije karbomera. Pri tem smo pazili, da smo vmešali čimmanj zračnih mehurčkov. Na koncu smo nadomestili izparelo vodo na skupno maso 100g.

3.3 VGRADNJA ETERIČNEGA OLJA IN DODATEK KONZERVANSA

Na podlagi senzoričnih lastnosti smo izbrali ustrezno podlago v katero smo dodali eterično olje rožmarina. Vgradili smo 0,5%, 1% in 1,5% olja in na podlagi intenzivnosti vonja določili želeno količino za vgradnjo.

Izbrani podlagi smo dodali tudi 0,4g natrijevega metilparahidroksibenzoata.

3.4 VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI HIDROGELOV:

- CENTRIFUGIRANJE

Falkonke smo napolnili z enako maso vzorcev (30g) in jih za 30 minut izpostavili 3000 obratom na minuto. Sledila je organoleptična ocenitev hidrogela. Opazovali smo homogenost vzorca, mazljivost, vpojnost in občutek po nanosu.

- CIKLIČNI TEMPERATURNI TEST

Po izdelavi vzorcev smo le te pustili 24 ur na sobni temperaturi. Sledila je izvedba temperaturnega stabilnostnega testa. Vzorce smo napolnili v falkonke in jih izmenično izpostavili povišanim temperaturam v komori (40°C) in nižanim temperaturam v hladilniku (4°C). Izvedli smo 3 cikle. En cikel traja 48 ur; 24 ur na 40°C in 24 ur na 4°C. Vmes smo vzorce 1 uro hranili na sobni temperaturi, da so se postopoma temperirali. Sledilo je merjenje pH in reoloških parametrov. Po koncu vsakega cikla in pred meritvami smo vzorce 1 uro hranili na sobni temperaturi.

MERJENJE pH

Merjenje smo izvedli s pH-metrom in sicer tako, da smo elektrodo postavili v izdelan hidrogel in odčitali vrednost na ekranu. Za čimbolj točne in verodostojne rezultate smo pred vsakim merjenjem elektrodo temeljito sprali z destilirano vodo. Merili smo pri sobni temperaturi.

MERJENJE REOLOŠKIH LASTNOSTI

Meritve reoloških lastnosti smo izvajali z reometrom Physica MCR 301 (Slika 4). Uporabili smo merilni sistem stožec-ploščica (CP 50-2) in merili pri temperaturi 25°C. Na spodnjo statično ploščo smo dali približno 1mL vzorca, nato pa stožec spustili do merilne pozicije, ki je izpodrinila višek vzorca, ki smo ga nato odstranili.



Slika 4 Reometer Physica MCR 301 z merilnim sistemom stožec-plošča (vir: osebni arhiv).

Vzorci smo najprej pomerili 24 ur po izdelavi in nato po koncu vsakega cikla. Pred meritvami smo vzorec 1 uro hranili na sobni temperaturi. Za način merjenja smo izbrali oscilacijo. Za vsakega od vzorcev smo naredili amplitudni in frekvenčni test s katerima smo določali viskoelastične lastnosti naših poltrdih vzorcev. Reološko ovrednotenje sistema je zajemalo določitev deleža elastičnega (G') in viskoznega (G'') doprinosa k viskoelastičnemu odzivu.

- Amplitudni test

Amplitudni test smo izvedli pri konstantni frekvenci oscilacije in določili linearno viskoelastično območje (LVO). Merili smo pri frekvenci 10 rad/s in pri tem zvezno povečevali strižno deformacijo od 0.01 do 100% ter merili G' in G'' . Iz dobljenih meritev pa ugotovili območje linearnega odziva in določili strižno deformacijo, pri kateri bomo izvajali frekvenčne teste.

- Frekvenčni test

Frekvenčne teste smo izvajali pri strižni deformaciji znotraj LVO. V našem primeru pri 1% deformaciji. Merili smo elastični (G') in viskoznostni (G'') modul v 20 merilnih točkah v frekvenčnem območju od 0.1 do 100 rad/s. Meritve smo izvajali pri nedestruktivnih strižnih pogojih. Da bi rezultate lahko neposredno primerjali med seboj, smo meritve vseh vzorcev opravili pod enakimi pogoji (pri strižni deformaciji 1%). Opazovali smo oblike izrisanih krivulj, ki so nam služile kot osnovna informacija o reološkem obnašanju sistemov.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Geli so zelo razširjena dostavna oblika različnih KAS, lastnosti gelov pa so odvisne od interakcij med 3-D rešetko premreženega polimera in v njej ujete tekoče komponente (30, 31). S tremi sredstvi za geliranje (visoko viskozna HPMC, nizko viskozna HPMC, karbomer) smo izdelali različne vrste hidrogelov, ki naj bi služili kot vehikel za vgradnjo rožmarinovega olja. Na podlagi organoleptičnih lastnosti smo empirično določili optimalen delež tvorilca gelske rešetke. Sledilo je senzorično ovrednotenje in izbor najustrežnejšega. Pozornost smo namenili izgledu, razmaznosti, vpojnosti in občutku na koži. Izbranemu hidrogelu smo nato dodali različne količine rožmarinovega eteričnega olja (0,5%, 1%, 1,5%) in na podlagi intenzivnosti vonja določili želeno količino za vgradnjo. Dodali smo tudi 0,4g natrijevega metilparahidroksibenzoata, ki ima v hidrogelu vlogo konzervansa, nato pa smo izdelane hidrokele izpostavili stresnim pogojem (centrifugiranje, temperaturni test) ter jim izmerili reološke lastnosti in pH ter jih tako fizikalno ovrednotili. Podrobnosti sledijo v nadaljevanju poglavja.

4.1 IZDELAVA IN VREDNOTENJE HIDROGELOV Z VISOKO VISKOZNO (K4M) HPMC IN NIZKO VISKOZNO (K100 LV) HPMC

Primerjava postopkov priprave

Pri izdelavi hidrogelov iz HPMC smo najprej poizkusili s postopkom nabrekanja, saj je to najbolj pogost način izdelave hidrogela s HPMC. HPMC raztremo z glicerolom, dodamo vodo, pokrijemo s parafilmom in jih pustimo 1 uro na sobni temperaturi. V tem času HPMC nabrekne in gelira.

Topli postopek izdelave gelov iz HPMC temelji na dejstvu, da je HPMC pri temperaturi 80-90°C zelo slabo topna. Topnost se ob dodatku hladnejše (sobna temperatura ali nižja) vode poveča in pripravek z ohlajanjem gelira (32, 33). Kljub dobremu mešanju so na vrhu ostajali beli kosmiči, ki pa so se (če koncentracija polimera ni bila prevelika) sčasoma raztopili.

Postopek nabrekanja je časovno potratnejši od toplega postopka, vendar bi morebitna slabost toplega postopka lahko bila vgradnja hlapne oziroma termično nestabilne kozmetično aktivne sestavine (KAS). Le ta pri vgradnji pred geliranjem ne bi bila stabilna.

Taka sestavina je tudi rožmarinovo eterično olje, zato bi ga ob uporabi tega postopka morali dodati šele po končanem nabrekanju. Sicer pa sta bila oba postopka ustrezna in nista vplivala na končni rezultat izdelanih hidrogelov.

Vpliv različnih koncentracij HPMC na organoleptične lastnosti

Sledilo je organoleptično vrednotenje izdelanih hidrogelov. Vsi nastali geli so bili prozorni z veliko zračnih mehurčkov. Takoj smo ugotovili, da je 5% koncentracija HPMC K4M občutno previsoka, saj jo je bilo pri hladnem postopku težko raztreti, poleg tega je bil videz nastalega gela nehomogen, pri toplen postopku pa so na vrhu ostajali beli kosmiči, ki se niso raztopili. 2,5% koncentracija HPMC K100 LV je bila 2,5% občutno prenizka, saj je bil pripravek tekoč.

Naslednje spoznanje do katerega smo prišli je bilo, da za vehikel HPMC K4M ne bo primerna, saj gel med nanosom pušča bele lise in lepljiv občutek ter ob sušenju na koži tvori film, ki zateguje in se lušči v belih kosmih. Hidrogeli s HPMC K100 LV so bili bistveno bolj mazljivi kot geli iz HPMC K4M in niso puščali vidnih lis med nanosom, vendar pa so bili prav tako lepljivi ter so ob sušenju na koži tvorili počasi vpojen film, ki se je luščil.

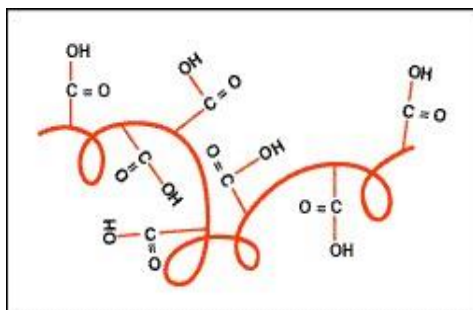
Vpliv glicerola na senzorične lastnosti

Pri izdelavi hidrogelov smo uporabili tudi glicerol, ki ima v hidrogelu vlogo vlažilca. Potreben je bil že zaradi raztrta HPMC (pri postopku nabrekanja), pri izdelavi pa smo ga enkrat namenoma izpustili. Vemo namreč, da je glicerol zelo viskozna tekočina, ki je rahlo lepljiva, zato nas je zanimalo, če njegova prisotnost vpliva na lepljivost gela. Ugotovili smo, da z zmanjšanjem količine glicerola iz 10% na 5% hidrogel s HPMC (K4M in K100 LV) ostaja lepljiv, s poizkusom, kjer je bil glicerol odstoten pa smo potrdili, da lepljivost povzroča sama hidroksipropilmetilceluloza in ne glicerol.

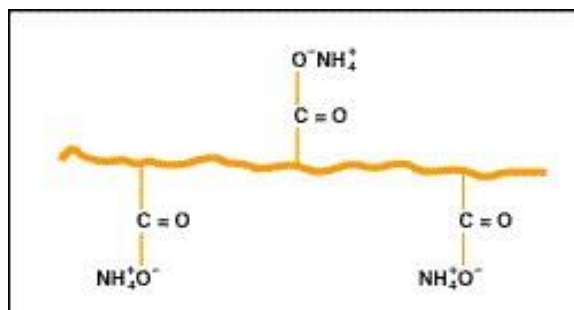
Po izdelavi z obema postopkoma smo sicer opredelili okvirno koncentracijsko območje, ki bi bilo ustrezno za različni vrsti HPMC (za HPMC K4M bi to bilo pri 2%, za HPMC K100 LV pa pri 6%), vendar smo zaradi neustreznih senzoričnih lastnosti nadaljnje raziskovanje opustili in se usmerili v izdelavo gelov iz karbomera.

4.2 IZDELAVA IN VREDNOTENJE HIDROGELOV IZ KARBOMERA

Sledila je izdelava gelov s karbomerom. Uporabili smo Carbopol 940, ki je le eden izmed mnogih. Že po prvem organoleptičnem ovrednotenju je bila izbira tega vehikla ustrežnejša. Pri ustreznih koncentracijah so namreč nastali transparentni nelepljivi geli zelo dobre razmaznosti in vpojnosti. Imeli so torej vse lastnosti na katere smo upali in si želeli, da bi jih imela naša podlaga za vgradnjo rožmarinovega olja. Odločili smo za osnovo iz karbomera, zato smo še podrobneje preučili literaturo o njem. Spoznali smo, da so karbomeri premreženi homopolimeri akrilne kisline, ki se v farmaciji in kozmetologiji večstransko uporabljajo in sicer kot sredstva za geliranje, stabilizatorji emulzij, suspendirajoča sredstva in zgoščevala. Uporabljajo se v kremah, gelih in mazilih ter za aplikacijo v oči. Nahajajo se v suhi obliki kot bel, voluminozen, higroskopen, močno ioniziran in rahlo kisel prah z značilnim vonjem (34). Po nevtralizaciji močno nabreknejo na 1000-kratni svoj volumen. Kot baze za nevtralizacijo in geliranje karbomerov se najpogosteje uporabljajo natrijev hidroksid (NaOH), kalijev hidroksid (KOH) ali trietanolamin. NaOH in KOH dajta zelo čvrste gele, amini (TEA) pa šibkejše (35). Odločili smo se za nevtralizacijo s trietanolaminom, saj aplikacija izdelka za masažo zahteva le zmerno čvrstost gela. Nevtralizacija privede do tvorbe gela, saj pride do iztega molekul polimera in s tem nastanka 3-D gelske rešetke v katero se ujame voda. Do iztega molekul pride z nevtralizacijo karboksilnih skupin polimera zaradi vezave amino skupin dodane baze. To povzroči prerazporeditev medmolekulskih interakcij, ki spremenijo molekulo karbomera iz premreženega v iztegnjeno stanje (Slika 5 in Slika 6). Nastala sol se nato raztopi in ionizira ter omogoči ureditev/premreženje molekul v obliko gelske rešetke, ki je odgovorna za zgoščevanje (36).



Slika 5 Molekula karbomera v osnovnem stanju (36).



Slika 6 Molekula karbomera v iztegnjenem stanju (po nevtralizaciji-tvorba soli) (36).

Za doseženo ustrezno viskoznost hidrogela so dovolj že zelo nizke koncentracije Carbopola 940 (0,1% do 2%) (37). Za osnovno orientacijo, kolikšna bo primerna količina karbomera, smo izdelali več hidrogelov z različnimi koncentracijami karbomera (2%, 1%, 0,5%, 0,25%). Takoj smo ugotovili da sta 2% in 1% občutno previsoki koncentraciji ter 0,25% občutno prenizka. Koncentracija 0,5% je bila najbližja želeni. Za podrobnejšo opredelitev pa smo izdelali še gele z 0,45%, 0,50%, 0,55%, 0,60%, 0,65%. V Preglednici III so podane ugotovitve o senzoričnih lastnostih za vsako koncentracijo posebej.

Preglednica III: Senzorične lastnosti gelov glede na koncentracijo karbomera.

KONCENTRACIJA KARBOMERA	LASTNOSTI
0,45%	preveč voden
0,50%	malenkost voden
0,55%	najbolj ustrezen
0,60%	ustrezno čvrst, vendar se po aplikaciji predolgo časa obdrži na koži
0,65%	preveč kompakten, nehomogen, se predolgo časa obdrži na koži

Ostali rezultati:

- Raztrtje karbomera z glicerolom ni bilo ustrezno, saj je nastala žvečilnemu gumiju podobna gmota. Le ta se nato na kopeli ni popolnoma raztopila. Zato smo poizkusili polimer raztrtiti z raztopino glicerola in vode, kar se je izkazalo za izredno ustrezno. Pomešali smo 3g glicerola in 2,5g vode in s tem raztrli karbomer. Nato smo do 100g dopolnili z vodo. Na ta način smo uspeli karbomer gladko in enakomerno omočiti pred dodatkom preostale vode, ki smo jo vlili ob postavitvi patene na kopel.

- Preostalo vodo smo dodajali postopoma, da se je karbomer počasi razprostiral. Pri tem smo pazili, da niso nastajali večji skupki. Pomembno je bilo, da smo v pateno dolili hladno (sobna temperatura) vodo, da se je karbomer med segrevanjem vsebine počasi raztapljal. Dodatek tople ali vroče vode namreč povzroči le nabrekanje zunanosti polimera, kar onemogoči enakomerno hidratacijo ostalih molekul v njegovi notranjosti. Tako nastanejo granule, ki se ne glede na čas segrevanja ne raztopijo popolnoma, zaradi česar nastane nehomogen gel. (35, 36, 37).

- Za homogen videz je bilo pomembno tudi, da smo karbomer dovolj dolgo segrevali na kopeli, da se je popolnoma raztopil (ni vidnih večjih skupkov polimera). Določili smo, da je za 100g izdelka potrebno 20 do 30-minutno segrevanje.
- Nabrekli karbomer smo vzeli iz vodne kopeli in počakali, da se je ohladil na sobno temperaturo. Nevtralizirali smo ga z raztopinami različnih količin TEA in vode. Uporabili smo 5g, 10g ali 20g vode in ugotovili, da je najbolje nevtralizirati s TEA raztopljenim v 20g vode, saj se baza enakomernejše razporedi čez vsebino in nevtralizacija poteče hitreje. Kljub temu smo za enakomerno nevtralizacijo morali mešati nekaj minut, s tem pa je prišlo tudi do neželenega umešanja zraka. Raztopina je pred nevtralizacijo rahlo motnega videza, po nevtralizaciji pa pripravek postane popolnoma transparenten z veliko zračnih mehurčkov. Količina TEA, ki je zadostovala za nevtralizacijo 0,5% karbomera na pH vrednost 6 ± 0.5 je bila 0,4g.
- Pomembno je obvezno pokrivanje patene s parafilmom, saj zaradi dolgega segrevanja na vodni kopeli pride do zelo velikega izhlapevanja vode. Tako izdelan gel ne odraža zastavljene koncentracije karbomera, zato na koncu nadomestimo izparelo vodo.
- Glicerol ima poleg raztrtja karbomera tudi vlogo vlažilca in fizikalnega stabilizatorja, saj karboksilne skupine karbomera s hidroksilnimi skupinami glicerola tvorijo vodikove vezi, ki povečajo rigidnost strukture (37, 38).

4.3 VGRADNJA ETERIČNEGA OLJA

Izdelali smo vzorce brez KAS in s KAS. Geli brez KAS so bili transparentni, geli, ki smo jim dodali rožmarinovo eterično olje pa so ob dodatku postali opalescentni. To je posledica drugačnih lomnih količnikov vodne in oljne faze. Jakost opalescentnosti je bila odvisna od količine dodanega olja. Več kot ga je bilo, bolj je bil gel opalescenten. Količino dodanega eteričnega olja omejuje tudi uredba o varnosti kozmetičnih izdelkov, ki za uporabo dovoljuje maksimalno koncentracijo 1,5 % eteričnega olja (39, 40). V naš izdelek smo se odločili dati le 1%, saj je pri večji koncentraciji vonj preveč izrazit in s tem moteč. Pomembno pri sami vgradnji kozmetično aktivne sestavine je, da rožmarinovo olje dodamo šele takrat, ko je raztopina karbomera skoraj popolnoma ohlajena na sobno temperaturo, da ne pride do

prevelikega izhlapevanja eteričnega olja. Zaradi enakomerne razporeditve učinkovine pa je priporočena nevtralizacija šele ob koncu formuliranja (36).

Pred vgradnjo bi bilo za želeno funkcijo izdelka smiselno zagotoviti olje s čim večjo koncentracijo 1,8-cineola. Ugotovili smo, da je to velikokrat problematično, saj proizvajalci skoraj nikoli ne navajajo popolne sestave olja. Le ta pa močno variira glede na številne dejavnike (genetika, geografski izvor, klimatski pogoji, čas žetve, pogoji shranjevanja, metode pridobivanja, itd.). To lahko negativno vpliva na vsebnost aktivnih komponent olja in s tem na kakovost kozmetičnega izdelka (41, 42). Za zagotovitev želenega aktivnega delovanja rožmarinovega olja bi bilo torej potrebno od proizvajalca oziroma dobavitelja eteričnega olja zahtevati podatke o natančni analizi sestave olja. Tako kot večini eteričnih olj na trgu, tudi našemu olju primanjkuje podatkov o sestavi. Poizkusili smo sicer kontaktirati dobavitelja, vendar žal neuspešno, zato z vidika delovanja posameznih substanc težko z gotovostjo trdimo o pričakovanem učinkovanju na TRP kanale. Menimo pa, da bi te podatke lahko dobili, če ne bi šlo le za namene raziskovalne naloge, temveč bi jih zahtevali kot poslovni partnerji.

4.4 DODATEK DRUGIH SPOJIN

Rožmarinovo olje bi lahko kombinirali še z drugimi eteričnimi olji, vendar bi bila pred tem potrebna zelo natančna preučitev lastnosti njihovih sestavin. Morali bi se namreč prepričati, da ne povzročajo nasprotno delujočega učinka na TRP kanale. Najboljši pa bi bil dodatek olj, ki bi zagotovila sinergistično delovanje. Za opredelitev katera so to, so potrebna dodatna odkritja, saj zaenkrat obstaja ogromno študij z nasprotujočimi rezultati.

Da bi izboljšali transparentnost izdelka bi v hidrogel lahko dodali solubilizator vendar, ker je prisotna opalescentnost le povsem običajen pojav sipanja svetlobe, se za kaj takega nismo odločili.

Dodali bi lahko tudi UV absorbent, saj pod vplivom UV žarkov lahko pride do razgradnje karbomera. To bi povzročilo izgubo viskoznosti, kar bi lahko imelo negativen vpliv na fizikalno stabilnost (30, 37). Za dodatek UV absorbenta pa se nismo odločili, saj lahko namesto tega uporabimo ne-transparentno ovojnino.

Sestavina, ki jo moramo v izdelek nujno dodati je konzervans, saj je zaradi velike vsebnosti vode hidrogel močno podvržen mikrobiološki kontaminaciji. Uporabili smo natrijev metilparahidroksibenzoat. Zaradi enakomernejše porazdelitve smo konzervans dodali pred nevtralizacijo s TEA. Dodali smo 0,4%, kar je maksimalna dovoljena koncentracija, regulirana z uredbo o kozmetičnih proizvodih (39). Največjo dovoljeno koncentracijo smo uporabili, da smo se v večji meri izognili morebitni razrasti mikroorganizmov v vzorcih, saj bi to lahko motilo proces našega testiranja. Eterično olje rožmarina ima sicer protimikrobne lastnosti (26), zato bi najverjetneje zadostovala že manjša količina konzervansa, vendar bi bilo za določitev minimalne zaviralne koncentracije potrebno še mikrobiološko testiranje, ki pa ni bilo del našega vrednotenja.

4.5 VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI HIDROGELOV

Učinkovit razvoj in izdelava kvalitetnega izdelka sta tesno povezana z vrednotenjem fizikalno-kemijskih lastnosti in s tem stabilnosti. Evropska uredba o kozmetičnih proizvodih za zagotavljanje fizikalne, kemijske in mikrobiološke kakovosti kot tudi funkcionalnosti in estetike predlaga izvedbo vrednotenja z različnimi metodami in pod posebnimi pogoji . Stabilnostni testi so eksperimenti, s katerimi vzorce izpostavimo različnim vrstam obremenitev za določen čas in tako simuliramo stresne pogoje, ki bi jim bil izdelek potencialno lahko izpostavljen. Opravimo jih v začetni fazi razvoja formulacije (39, 44). S tem dobimo informacijo o lastnostih izdelka, posledično pa tudi o njegovi kakovosti in funkcionalnosti. Za ugotavljanje lastnosti izdelkov ne obstaja povsem standardnih protokolov vrednotenja in točno določenih principov testiranja, zato priporočilom institucij in njihovim predpisanim smernicam sledimo skladno z lastno strokovno presojo. Kozmetični izdelki imajo zelo raznoliko sestavo, kar upoštevamo tudi pri izbiri analiznih tehnik. Naš hidrogel je tako preстал centrifugiranje in ciklični temperaturni test, za popolnejše ovrednotenje pa smo opazovali tako organoleptične kot reološke lastnosti ter izmerili pH vrednost. Glede na senzorične in reološke lastnosti smo določali stabilnost in s tem ustreznost izdelka za uporabo.

Centrifugiranje

Centrifugalni test je obremenitveni test, pri katerem vzorce izpostavimo centrifugalni sili in tako preizkušamo in opazujemo obnašanje izdelka pod stresnimi pogoji. Običajno

stimuliramo ekstremnejše pogoje, kot jim je izdelek v resnici izpostavljen. To naredimo z namenom ugotavljanja, napovedovanja in zagotavljanja stabilnosti, saj tekom transporta prihaja do različnih vibracij, ki pa ne smejo vplivati na fizikalne lastnosti našega izdelka. Vzorce smo izpostavili 3000 obratom/min za 30 minut, kar je zaradi velike sile in dolge časovne enote kar precejšna obremenitev. Ni bilo vidne porušitve strukture vzorcev, kar nakazuje na razmeroma visoko stabilnost izdelanih hidrogelov. Karbomer očitno tvori zelo stabilno 3-D rešetko in vanjo dobro veže tekočo fazo. Najverjetneje pa do razplastitve ni prišlo tudi zaradi količinsko le majhnega dodatka olja. Vzorci so ostali praktično nespremenjeni razen najvidnejše stvari-izginotja zračnih mehurčkov. To je bila pozitivna sprememba, saj vemo, da prisotnost zraka lahko sproži ali pospeši različne neželene procese znotraj izdelka. Centrifugiranje bi torej lahko uporabili kot način priprave vzorcev pred nadaljnjim testiranjem. Tako bi dobili realnejše rezultate, saj bi tudi med resnično proizvodnjo uporabljali mešala sklopljena z vakumskimi sesalniki, ki bi odstranili odvečen zrak.

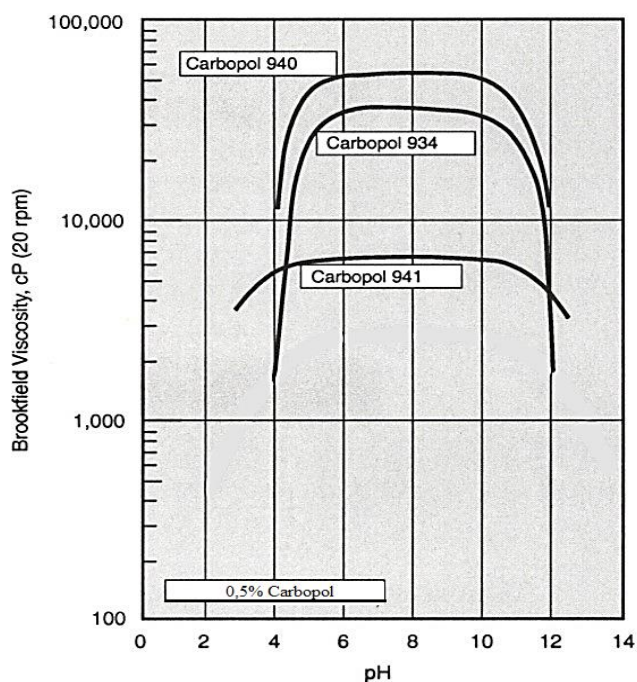
Ciklični temperaturni test

Cikli temperaturnih obremenitev so zelo uporabljena in priporočena metoda stresnega testiranja poltrdnih sistemov. Pri takih izdelkih namreč velikokrat pride do ločitve faz, kar lahko negativno vpliva na predvideno in želeno funkcijo. Vzorce izmenično izpostavimo seriji večkratnih hitrih in ekstremnih sprememb poviševanja in zniževanja temperatur. Sprememba temperature je glavni parameter, ki povzroči hitre kemijske in fizikalne spremembe v formulacijah (45). S temperaturnim ciklanjem, ki je stresna oblika testiranja fizikalne stabilnosti, lahko v kratkem časovnem obdobju dobimo pomembne informacije o fizikalni stabilnosti izdelka. Testiranje je uporabno predvsem za napovedovanje in zagotavljanje stabilnosti za namene transporta, saj lahko podnevi in ponoči prihaja do velikih temperaturnih preobratov, ki bi lahko vplivali na lastnosti. Rezultati pa koristijo tudi kot informacija za navodila o pravilnemu shranjevanju izdelka med rokom uporabe. Testirali smo tri različne koncentracije gela (0,50%, 0,55%, 0,60%). Vzorca z najmanjšo (0,45%) in največjo (0,65%) koncentracijo karbomera smo že pred tem izločili iz testiranja, saj senzorično nista ustrezala zahtevam za optimalen izdelek. Smernice predlagajo 3-5 ciklov (43). Izvedli smo jih le 3, saj smo tekom meritev ugotovili, da test ni povzročil večjih opaznih razlik (organoleptično in reološko). Prednost tega testa je razmeroma kratek čas testiranja (~8 dni) s katerim hitro ugotovimo in napovemo kako problematična zna biti stabilnost

našega sistema. Za dokončno potrditev stabilnosti bi morali narediti še dodatne teste, ki jih predlagajo smernice kozmetične industrije. Najprimernejše je teste izvajati v originalni ovojni, saj to prikaže najbolj realno stanje, vendar je naš izdelek ni imel, zato smo stabilnost določali v falkonkah. Po koncu ciklanja smo vzorcem pomerili pH, reološke lastnosti pa smo spremljali že med posameznimi cikli. Zaradi porabe vzorcev pri reološkem testiranju smo morali za nemoteno delo zagotoviti zadostno količino hidrogela, kar se je v našem primeru izkazalo za okoli 200g (45).

Merjenje pH

Karbomeri imajo zaradi prisotnih $-COOH$ vezi (vsebujejo 56–68 % karboksilnih skupin glede na suho snov) anionski značaj in so kisli (pH 3-4). Po dodatku baze pride do ionskih interakcij med kislimi karboksilnimi skupinami polimera in amino skupinami dodane baze. Posledica je iztegnitev molekul in nastanek gelske rešetke, v katero se ujame voda. Našo formulacijo smo nevtralizirali na pH vrednost $6 \pm 0,5$, saj smo želeli zagotoviti rahlo kisel pH, ki bi ustrezal pH-ju človeške površine kože. S tem namreč poskrbimo za vzdrževanje kislinsko-bazičnega ravnotežja človeške povrhnjice. Velika prednost uporabe tega gelirnega sredstva je torej tudi možnost prilagajanja pH na želeno vrednost. Poleg tega pripravki iz karbomera ostanejo stabilni v zelo širokem pH območju (36). To prikazuje tudi Slika 7, na kateri je razvidno da je v območju pH vrednosti 4,5-11 viskoznost praktično konstantna.



Slika 7 Učinek pH na viskoznost 0,5% raztopine različnih vrst Carbopola. Prirejeno po (36).

Vrednosti pH pred in po cikličnem testiranju smo med seboj primerjali in opredelili, če je temperaturni test povzročil kakršnokoli signifikantno spremembo pH. V Preglednici IV so prikazane izmerjene vrednosti. Spremembe pH spremljamo, saj so lahko pokazatelj porušitve gelske strukture. Zaradi majhne količine oljne faze smo pričakovali, da ne bo prišlo do večjih sprememb, naša pričakovanja pa so se uresničila. Zaključimo lahko, da ni prišlo do skoraj nikakršne spremembe pH, saj se vrednosti med seboj razlikujejo le za okoli 0,05 enote, kar je najverjetneje le posledica načina delovanja aparature in našega odčitavanja.

Preglednica IV: pH vrednosti hidrogelov.

KONCENTRACIJA	HIDROGEL BREZ KAS		HIDROGEL S KAS	
	pH ob izdelavi	pH po 3. ciklu	pH ob izdelavi	pH po 3. ciklu
0,50 %	6,10	6,10	6,05	6,20
0,55 %	5,95	5,90	5,85	5,95
0,60 %	5,80	5,75	5,80	5,80

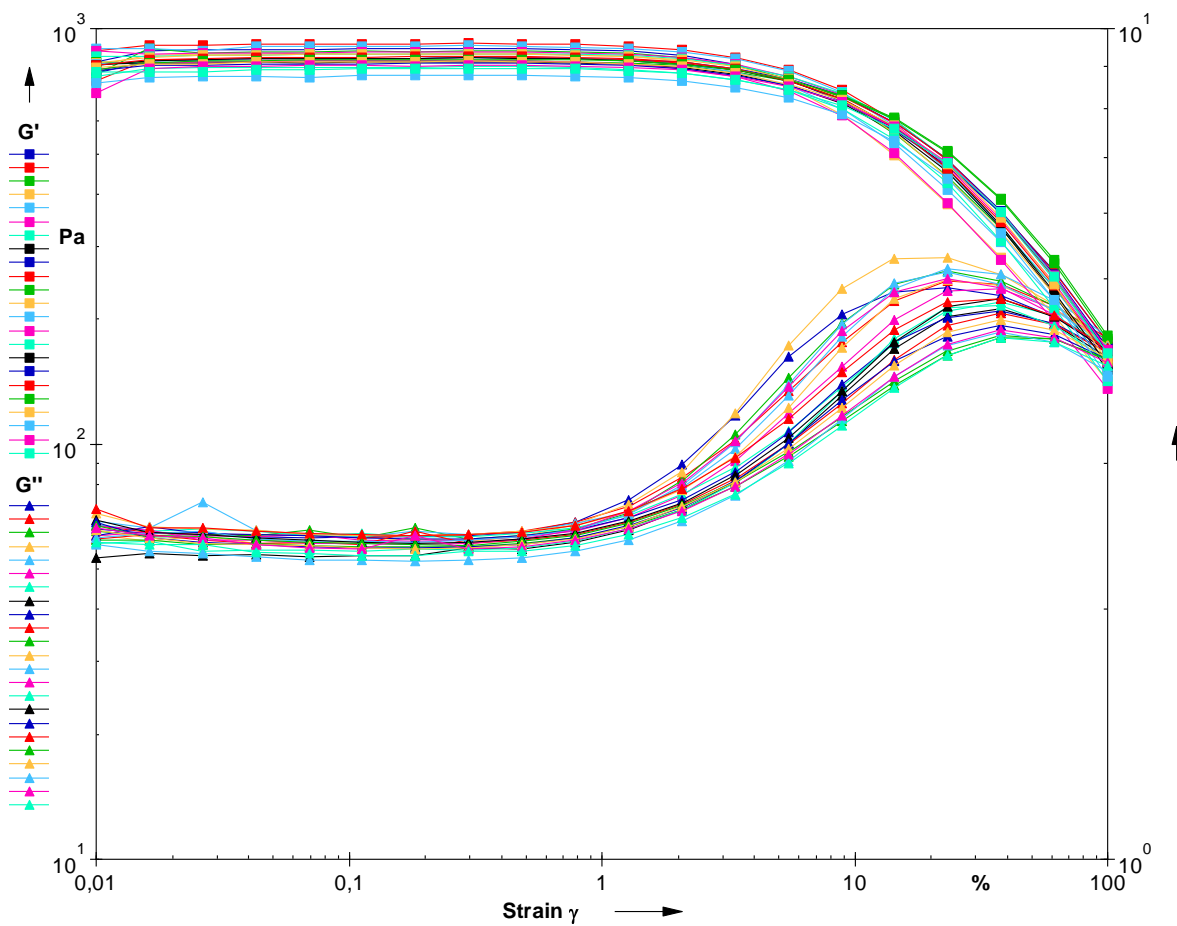
Količino trietanolamina, ki je potrebna za nevtralizacijo na željen pH smo morali najprej eksperimentalno določiti. Pri orientaciji so nam pomagali podatki iz literature (35, 36, 37). Naša naloga je bila fizikalno ovrednotenje izdelanega kozmetičnega pripravka, zato se nismo toliko posvetili mikrobiološki stabilnosti, ki pa seveda mora biti zagotovljena, saj to posledično lahko vpliva tudi na fizikalno stabilnost. Izdelek je namreč hidrogel, kar pomeni, da vsebuje veliko vode in mu je zato za zaščito pomembno in praktično nujno dodati konzervans. Pred izpostavitvijo temperaturnemu testu smo zaradi visokih temperatur in s tem še povečanih možnosti za razvoj mikroorganizmov hidrogelu dodali natrijev metilparahidroksibenzoat, ki ima kationski značaj. Zanimivo je bilo, da je že ob dodatku konzervansa pripravek rahlo geliral. Kot že omenjeno, so karbomeri polimeri akrilne kisline in imajo anionski značaj, kar pomeni, da normalno interagirajo z vsemi vrstami kationov. Ta proces je nujen za nevtralizacijo, saj so ravno kationi dodanih baz tisti, ki sprožijo geliranje. S polimerom tvorijo sol in spremenijo obliko molekule karbomera, ki nato tvori 3-D gelsko rešetko. Reakcije s kationi pa niso vedno zaželene, saj lahko povzročijo težave ali nevesočnosti pri formuliranju (35). V manjši meri se je to zgodilo nam ob dodatku konzervansa. Ugotovili smo, da že sam konzervans dvigne pH pripravka, za kar so očitno odgovorni njegovi natrijevi kationi, ki se sprostijo ob raztopitvi soli-natrijevega

metilparahidroksibenzoata v vodi in se razporedijo okoli polimera ter ga že deloma nevtralizirajo. To je pomenilo, da smo morali ponovno najti ustrezno količino TEA za zastavljeno stopnjo nevtralizacije. Za nevtralizacijo okoli 0,5g karbomera na pH 6 ± 0.5 smo sprva potrebovali 0,4g TEA, nato pa je zadostovalo že 0,2g TEA.

Merjenje reoloških lastnosti

Pred meritvami smo vzorce 1 uro hranili na sobni temperaturi, da so se temperirali. To je bilo pomembno, saj drugače rezultati niso odražali realnega stanja, kar je zahtevalo ponovitev meritve. Vzorce smo pomerili ob izdelavi in nato po koncu vsakega cikla. Za način merjenja smo izbrali oscilacijo, uporabili pa smo merilni sistem stožec-ploščica. Prednosti tega senzorskega sistema so enostavnost doziranja vzorca in čiščenje merilnega sistema po opravljeni meritvi ter majhne količine potrebnega vzorca. Vzorec se pri premikanju znotraj merilnega sistema upira z določenim navorom, ki ga merilni inštrument zazna. Ta signal se pretvori v električnega, računalniški program pa lahko izračuna reološke parametre. Izdelane hidrogelne vzorce smo podvrgli termičnemu stresu in jim po točno določenem časovnem razporedu izmerili viskoelastične lastnosti. Reološko ovrednotenje sistema je zajemalo določitev deleža elastičnega (G') in viskoznoelastičnega (G'') doprinosa k viskoelastičnemu odzivu. Idealno elastično snov predstavimo samo z G' , medtem ko idealno viskozno snov opišemo samo z G'' . V realnosti skoraj vsi materiali izkazujejo tako elastične kot viskozne lastnosti in jih zato lahko z vidika reologije natančno opišemo le s proučevanjem obeh modulov. Opazovali smo oblike izrisanih krivulj, ki so nam služile kot osnovna informacija o reološkem obnašanju sistemov. Za našo formulacijo smo pričakovali visoko stabilnost, saj se je hidrogel zelo dobro izkazal že pri testu s centrifugiranjem.

Prva stopnja določanja viskoelastičnih parametrov je bila izvedba amplitudnega testa pri konstantni frekvenci oscilacije. Z njim smo določili linearno viskoelastično območje (LVO), torej območje nedestruktivnih pogojev. Test izvajamo tako, da zvezno povečujemo amplitudo strižne deformacije in merimo odziv. Ko notranja struktura vzorca popusti, se vrednosti reoloških količin spremenijo in odziv ni več linearen. Takrat pride do porušitve strukture, v tem območju pa rezultatov ni več smiselno interpretirati. Nadaljnje teste (frekvenčne) zato izvajamo v območju nižjih amplitud kot je zgornja meja linearnega viskoelastičnega odziva. Linearno viskoelastično območje je bilo do 1% strižne deformacije ter je prikazano na Sliki 8.

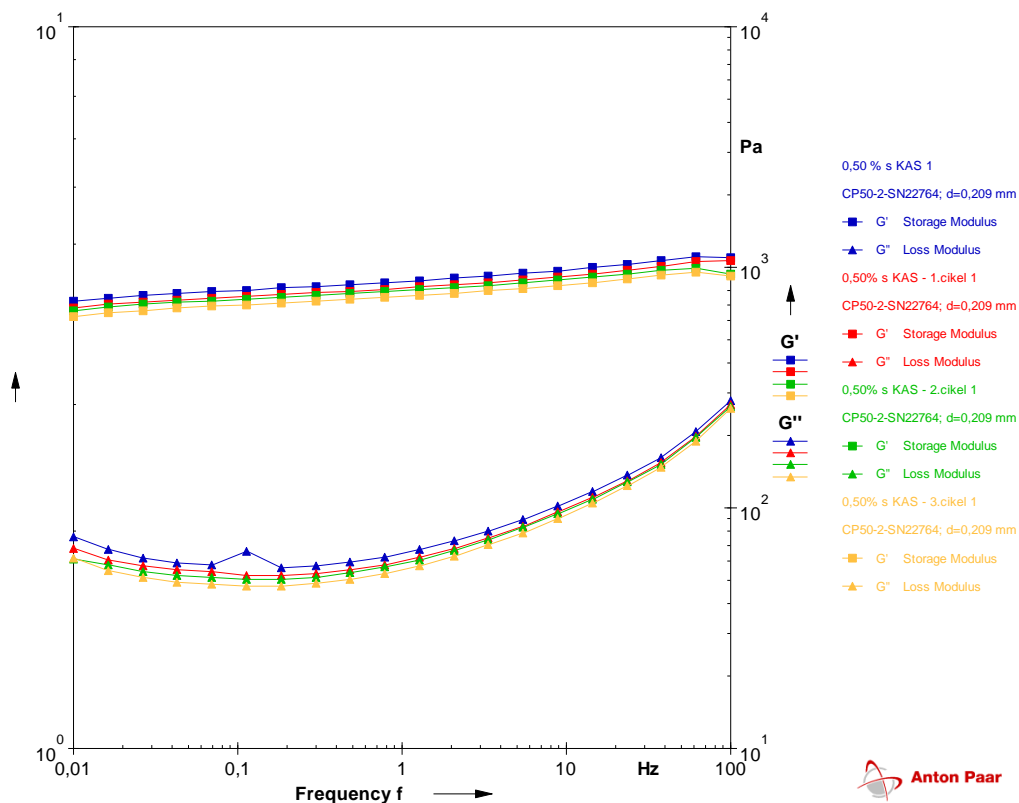


Slika 8 Grafični prikaz linearnega viskoelastičnega območja (LVO) vseh meritev (tri različne koncentracije (0,50%, 0,55%, 0,60%) v štirih različnih časovnih točkah - ob izdelavi in po vsakem ciklu).

Določitev LVO je bila potrebna po vsakem ciklu in za vsako koncentracijo posebej. Med posameznimi cikli so velikosti modulov ostajale konstantne do 1% strižne deformacije, kar je pomembno, saj nam meritve pri enakih pogojih omogočajo primerljivost frekvenčnih grafov.

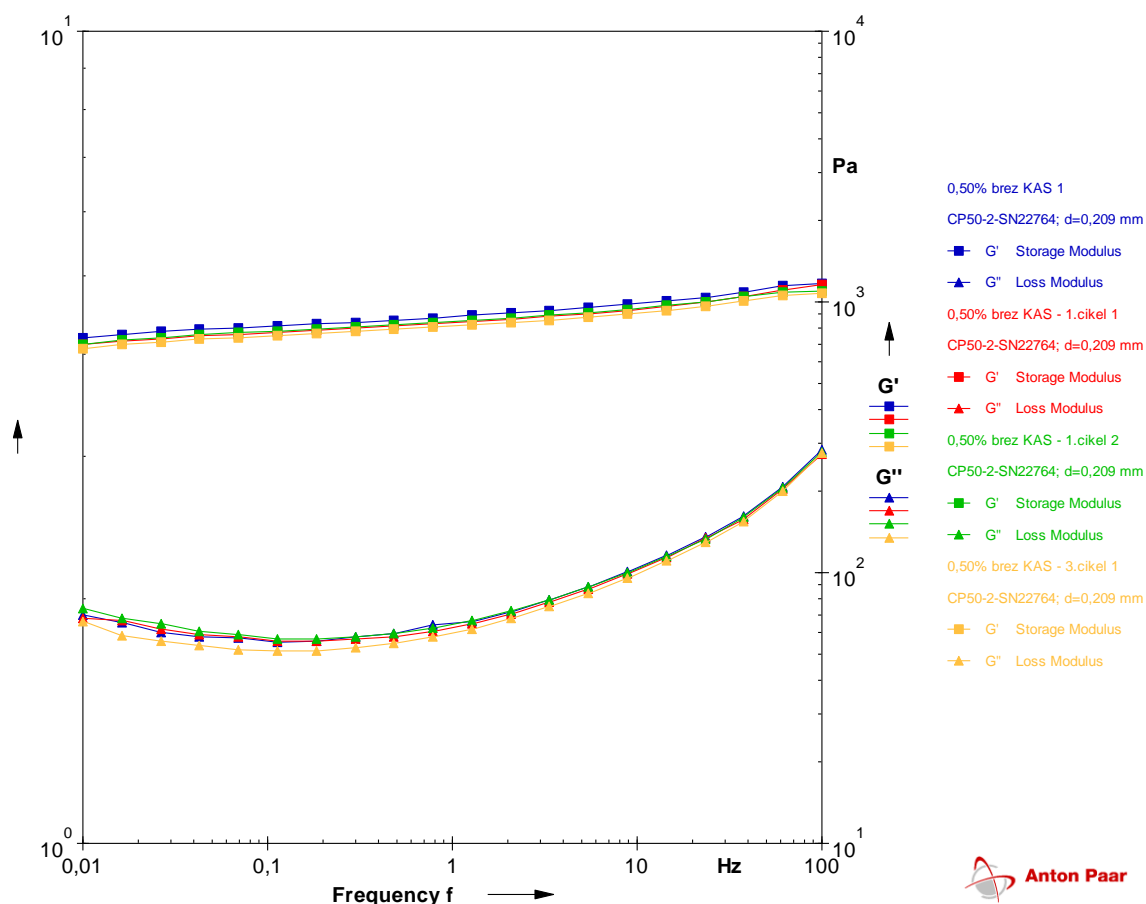
Naslednji korak pri meritvah viskoelastičnih lastnosti snovi so frekvenčni testi, ki zajemajo stopenjsko povečevanje frekvence oscilacije. Tako določimo frekvenčno odvisnost dinamičnih količin v pogojih, ko se notranja struktura snovi ne podira. S spreminjanjem frekvence oscilacije med meritvijo spreminjamo hitrost vnesene deformacije. Kot rezultat dobimo spekter odzivov snovi na časovni potek eksperimenta. To nam omogoča sklepanje na tip mikrostrukture proučevane snovi, na jakost vezi med strukturnimi elementi in stopnjo geliranosti (45).

Skozi ciklanje smo pri hidrogelih s KAS opazili manjši upad obeh modulov, kar nakazuje na rahlo porušitev strukture. Kot primer prikaza upada modulov prilagamo graf hidrogela s koncentracijo karbomera 0,50% (Slika 9), saj je le ta zaradi najmanjše količine dodanega karbomera imel najšibkejšo gelsko strukturo. Grafi pri ostalih koncentracijah prikazujejo podoben upad, zato niso priloženi.



Slika 9 Upad modulov po posameznih ciklih (hidrogel s 0,50% koncentracijo karbomera in dodano KAS).

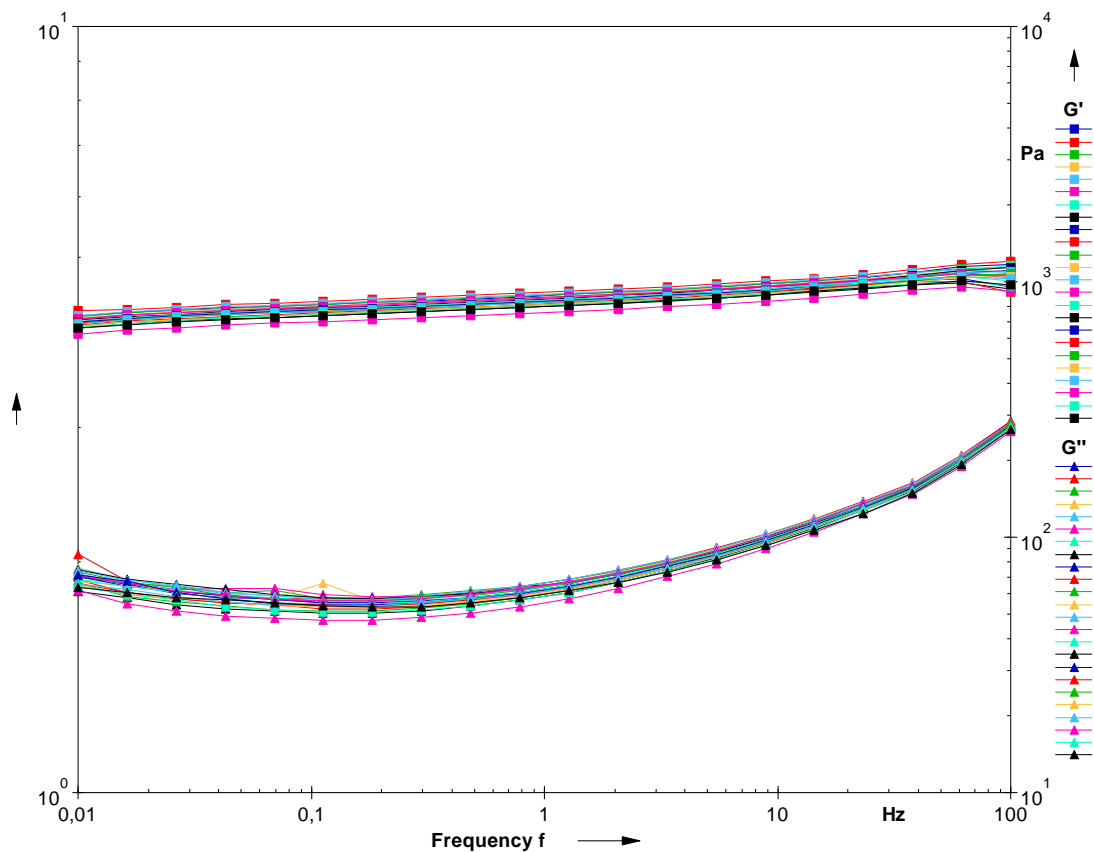
Za primerjavo prilagamo graf hidrogela z enako koncentracijo, vendar brez KAS (Slika 10).



Slika 10 Hidrogel z 0,50% koncentracijo karbomera brez dodane KAS.

Pri hidrogelih s KAS smo po ciklanju sicer opazili manjši upad obeh modulov, vendar je upad zanemarljivo majhen, zato lahko trdimo, da dodatek KAS ni bistveno vplival na stabilnost hidrogela. Opazen je tudi prevladujoč elastični doprinos in zelo majhen vpliv frekvence oscilacije na dinamična modula. Da je prispevek elastičnega (G') modula višji od viskoznega (G'') lahko razberemo iz tega, da se na grafu nahaja nad viskoznim (G'') modulom. Taka oblika grafov je značilna za šibko gelsko strukturo, zato je bila za naš sistem pričakovana. Stopnja zamreženosti je zadovoljiva, saj za popolnoma zamrežen polimer velja, da ima pri vseh frekvencah obremenjevanja enak elastični strižni modul, kar pa je razvidno tudi iz Grafa 2 in Grafa 3.

Naslednji graf (Slika 11) prikazuje rezultate vseh frekvenčnih meritev (tri različne koncentracije (0,50%, 0,55%, 0,60%) v štirih različnih časovnih točkah - ob izdelavi in po vsakem ciklu).



Slika 11 Rezultati vseh frekvenčnih meritev.

Iz prikaza vseh frekvenčnih meritev na istem grafu lahko vidimo, da so oblike krivulj konstantne ter, da se izrisujejo skoraj druga na drugo. Pri izpostavitvi vzorcev cikličnim temperaturnim obremenitvam torej ni prišlo do bistvenih sprememb reoloških parametrov ne glede na število ciklov, dodatek KAS in koncentracijo polimera, ki smo jo uporabili. To nakazuje na ohranitev stabilne gelske strukture.

Zaključimo lahko, da so izdelane formulacije uspešno prestale cikle temperaturnih obremenitev, saj so opazovani reološki parametri v posameznih časovnih točkah pred začetkom in po koncu ciklov podobni.

5. SKLEP

- S pregledom literature nam je uspelo potrditi znanstveno ozadje delovanja rožmarinovega olja na TRP kanale in s tem dokazati smiselnost vgradnje rožmarinovega eteričnega olja kot kozmetično aktivne učinkovine.
- Ugotovili smo, da TRP kanali predstavljajo področje, ki ga bo potrebno, za natančno razumevanje poteka procesa delovanja podrobneje raziskati.
- Predlagamo spremljanje znanstvenih objav o novih odkritjih delovanja TRP kanalov, saj pričakujemo, da bo v prihodnosti možno natančneje določiti optimalne koncentracije za maksimalne učinke na kanale in s tem zagotoviti popolnejšo funkcionalnost izdelkov z vgrajenim rožmarinovim oljem.
- Zaključujemo, da je za funkcionalnost izdelka smiselno zagotoviti olje s čim večjo koncentracijo 1,8-cineola, od proizvajalca ali dobavitelja pa iz tega razloga zahtevati natančno analizo sestave eteričnega olja.
- Karbomer je imel ustrežnejše organoleptične lastnosti od HPMC, zato je bil vehikel našega izbora, najprimernejša koncentracija karbomera pa je bila 0,55%.
- Ocenjujemo, da je stabilnost našega izdelka neproblematična, saj je formulacija dobro prestala stresne teste, za dokončno potrditev stabilnosti pa bi morali narediti še dodatne teste, ki jih predlagajo smernice kozmetične industrije.
- Izdelek bi lahko testirali tudi mikrobiološko in opredelili minimalno inhibitorno koncentracijo konzervansa, saj ima že samo rožmarinovo olje protimikrobne lastnosti. Z manjšo količino uporabljenega konzervansa bi namreč pri občutljivih posameznikih lahko zmanjšali možnost pojava alergijskih reakcij, ki smo jim pri tem izdelku izpostavljeni že z eteričnim oljem.

LITERATURA

1. Ionescu MA, Tache S, Berceanu M: Biochemical and physiological basis of muscle pain. *Palestrica of the third millennium – Civilization and Sport* 2012; 13 (1): 48-51.
2. Levine J, Alessandri-Haber N: TRP channels: Targets for the relief of pain. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1772: 989-1003.
3. Bajrović F: Plastičnost in bolečina. *Rehabilitacija* 2012; 11: 30-33
4. <https://www.acsm.org/docs/brochures/delayed-onset-muscle-soreness-%28doms%29.pdf> (dostopano marec 2015).
5. Pergentino de Sousa D: Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. *Molecules* 2011; 16: 2233-2252.
6. http://www.newpharma.ch/sites/default/files/newpharma/pdf/New_Pharma_Rosmarinus_officinalis_monograph_eng_0407.pdf (dostopano marec 2015).
7. Raskovic A, Milanovic I, Pavlovic N, Milijasevic B, Ubavic M, Mikov M: Analgesic effects of rosemary essential oil and its interactions with codeine and paracetamol in mice. *European Review for Medical and Pharmacological Science* 2015; 19: 165-172.
8. Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M: Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48: 3144-3152.
9. Szumny A, Figiel A, Gutiérrez-Ortiz A, Carbonell-Barrachina A: Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering* 2010; 97: 253-260.
10. Sherkheli MA, Vogt-Eisele A, Weber K, Hatt H: Camphor modulates TRPV3 cation channels activity by interacting with critical pore-region cysteine residues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 26 (3): 431-8.
11. Takaishi et al.: 1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. *Molecular Pain* 2012; 8-86.
12. Şelescu TR: Investigations into pharmacological selectivity in the TRP ion channel family. Doctoral thesis abstract. Faculty of Biology 2013, University of Bucharest; 1-13.

13. Khairatkar-Joshi N, Maharaj N, Thomas A: The TRPV3 Receptor as a Pain Target: A Therapeutic Promise or Just Some More New Biology? *The Open Drug Discovery Journal* 2010; 2: 89-97.
14. Sherkheli MA, Vogt-Eisele A, Weber K, Hatt H: Camphor modulates TRPV3 cation channels activity by interacting with critical pore-region cysteine residues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 26 (3): 431-8.
15. McKemy D: Therapeutic Potential of TRPM8 Modulators. *The Open Drug Discovery Journal* 2010; 2: 81-88.
16. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J; Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D: TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 2006; 124(6): 1269-1282
17. <http://www.plantagea.hr/dev/cikloeteri-oksidi> (dostopano marec 2015).
18. Xu H, Blair NT, Clapham DE: Camphor Activates and Strongly Desensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Channel in a Vanilloid-Independent Mechanism. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25 (39): 8924–8937.
19. Selescu T, Ciobanu AC, Dobre C, Reid G, Babes A: Camphor Activates and Sensitizes Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) to Cooling and Icilin, *Chemical Senses* 2013; 38: 563-575.
20. Green B: Sensory characteristics of camphor. *Journal of Investigative Dermatology*. 1990; 94 (5): 662-6.
21. Atti-Santos AC, Rossato M, Pauletti GF, Rota LD, Rech JC, Pansera MR, Agostini F, Serafini LA, Moyna P: Physico-chemical Evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2005; 48 (6): 1035-1039.
22. Kühn FJP, Kühn C, Lückhoff A: Inhibition of TRPM8 by icilin distinct from desensitization induced by menthol and menthol derivatives. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284 (7): 4102–4111.
23. Wasner G, Schattschneider J, Binder A and Baron R: Topical menthol-a human model for cold pain by activation and sensitization of C nociceptors. *Brain* 2004; 127: 1159-1171.
24. Wetsel WC: Sensing hot and cold with TRP channels. *International Journal of Hyperthermia* 2011; 27 (4): 388–398.

25. Silveira e Sá R, Andrade LN, Pergentino de Sousa D: A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. *Molecules* 2013; 18: 1227-1254.
26. Bassolé IHN, Juliani HR: Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules* 2012; 17: 3989-4006
27. Zupančič-Valant A. (2007) Uvod v reologijo. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 1997: 1-93.
28. Planinšek O, Srčič S: Vaje iz fizikalne farmacije, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2008: 48-58.
29. Kariž M, Šernek M: Spremljanje reoloških lastnosti lepil med utrjevanjem. *Les* 2009; 41: 178-186.
30. <http://www.lfjthg.com/english/product.asp?action=show&productid=12&classid=2> (dostopano junij 2015).
31. <http://obeliscosmetics.net/?s=stability> (dostopano junij 2015).
32. http://soapbubble.wikia.com/wiki/Polymers_-_Mixing (dostopano junij 2015)
33. www.colorcon.com (dostopano junij 2015).
34. Obreza A, Bevc B, Baumgartner S, Sollner-Dolenc M, Humar M: Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravilu. Spletni učbenik za študente farmacije, industrijske farmacije in kozmetologije, Fakulteta za farmacijo, 2015: 119.
35. <http://www.ingredientstodiefor.com/files/Carbomer940.pdf> (dostopano junij 2015)
36. Noveon Inc: Applications Technology for Carbopol®* Polymers and Cosmetic Formulations. *The Specialty Chemicals Innovator™* 1997; 60: 1-5.
37. Lubrizol company: Thickening properties. *Pharmaceutical Bulletin* 2011; 5: 2-5
38. Shalaby S, Shukr M: The Influence of the Type and Concentration of Alcohol on the Rheological and Mucoadhesive Properties of Carbopol 940 Hydroalcoholic Gels. *Der Pharmacia Sinica* 2011; 2 (6):161-171.
39. <http://ec.europa.eu> (dostopano junij 2015).
40. Fiume M: Safety Assessment of Rosmarinus Officinalis (Rosemary)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *Cosmetic Ingredient Review* June 2013; 1-38.
41. Kamal-Genena A, Hense H, Smânia-Junior A, Machado De Souza S: Rosemary (Rosmarinus officinalis) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2008; 28(2): 463-469.

42. Fox LT, Gerber M, Du Plessis J, Hamman JH: Transdermal Drug Delivery Enhancement by Compounds of Natural Origin. *Molecules* 2011; 16: 10507-10540.
43. http://cosmetictestlabs.com/cosmetic_freeze_thaw_stability_testing.html
(dostopano junij 2015).
44. CTFA and Colipa: Guidelines on stability testing of cosmetic products. *Colipa guidelines* 2004; 3 (94): 1-8.
45. Islam MT, Rodríguez-Hornedo N, Ciotti S, Ackermann C: Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different pH. *Pharmaceutical Research* 2004; 21: 1192-1199.