

Primjena eteričnih ulja u nanotehnološkim pripravcima s uklopljenim djelatnim tvarima za dermalnu primjenu

Maljić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:244883>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivan Maljić

**Primjena eteričnih ulja u nanotehnološkim pripravcima s
uklopljenim djelatnim tvarima za dermalnu primjenu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na predmetu Kozmetologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivana Pepića.

Zahvaljujem se svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Ivanu Pepiću na pomoći i savijetima, a najviše na podršci pri izradi diplomskog rada.

Hvala mom bratu na pomoći kod oblikovanja slika, ali najviše na društvu zadnje dvije godine.

Hvala svim prijateljima koji su mi ovaj period života učinili ljepšim.

Najveća hvala mojim roditeljima, bez njih ništa ne bi bilo moguće...

1. UVOD.....	1
1.1. Mogućnosti dermalne primjene eteričnih ulja.....	1
1.1.1. Antimikrobni i antivirusni učinak.....	2
1.1.2. Antioksidacijski i protuupalni učinak.....	4
1.1.3. Učinak na cijeljenje rana.....	5
1.1.4. Repelentni učinak eteričnih ulja.....	5
1.1.5. Eterična ulja kao promotori penetracije.....	6
1.2. Nanoemulzije za dermalnu primjenu.....	7
1.2.1. Nanoemulzije s uklopljenim eteričnim uljima.....	8
1.3. Mikroemulzije za dermalnu primjenu.....	9
1.3.1. Mikroemulzije s uklopljenim eteričnim uljima.....	10
1.4. Nanogelovi za dermalnu primjenu.....	11
1.4.1. Nanogelovi s uklopljenim eteričnim uljima.....	12
1.5. Nanočestice za dermalnu primjenu.....	12
1.5.1. Nanočestice s uklopljenim eteričnim uljima.....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4.1. Nanoemulzije s uklopljenim eteričnim uljima i djelatnim tvarima.....	17
4.1.1. Primjer 1.....	17
4.1.2. Primjer 2.....	19
4.1.3. Primjer 3.....	22
4.2. Mikroemulzije s uklopljenim eteričnim uljima i djelatnim tvarima.....	23
4.2.1. Primjer 1.....	23
4.2.2. Primjer 2.....	25
4.2.3. Primjer 3.....	29
4.3. Nanogelovi s uklopljenim eteričnim uljima i djelatnim tvarima.....	33
4.4. Nanočestice s uklopljenim eteričnim uljima i djelatnim tvarima.....	36
4.4.1. Primjer 1.....	36
4.4.2. Primjer 2.....	41
5. ZAKLJUČCI.....	44
6. LITERATURA.....	45
7. SAŽETAK.....	51
8. SUMMARY.....	52
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

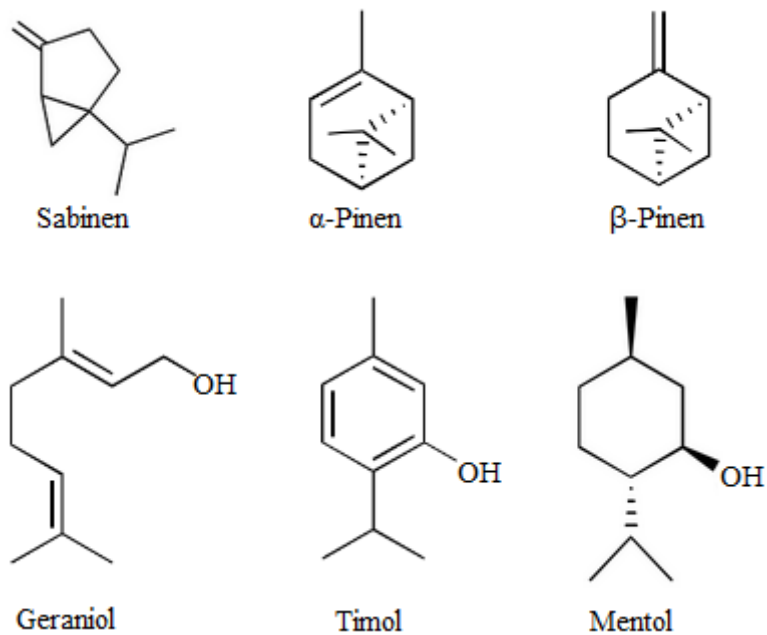
1. UVOD

1.1. Mogućnosti dermalne primjene eteričnih ulja

Eterična ulja su hlapljive, prirodne, kompleksne smjese koje karakterizira snažan miris, a proizvode ih biljke kao sekundarne metabolite. U prirodi eterična ulja imaju funkciju zaštite od fitopatogenih mikroorganizama, smanjenja transpiracije, privlačenja insekata pri oprašivanju, odbijanja biljojeda i inhibicije rasta drugih biljaka. Sintetiziraju se u svim biljnim organima (cvjetovima, listovima, sjemenkama, plodovima, korjenju, kori...) te se pohranjuju u sekretornim stanicama, epidermalnim stanicama, međustaničnim šupljinama i kanalima ili u žlijezdanim stanicama (Bakkali i sur., 2008).

Eterična su ulja tekuća, lako hlapljiva, prozirna te rijetko obojana. Teško su topljiva u vodi, a dobro su topljiva u lipidima i organskim otapalima te uglavnom imaju manju gustoću od vode. Najčešće se ekstrahiraju postupcima vodene destilacije ili prikladnim mehaničkim procesima bez zagrijavanja (tještenjem) (Miguel, 2010).

Eterična ulja su složene prirodne smjese koje mogu sadržavati od 20 do 60, a prema nekoj literaturi i do 200, različitih sastavnica u različitim koncentracijama. Sastav eteričnog ulja i koncentracije u kojima su prisutne sastavnice ne ovise samo o biljnoj vrsti, već i o klimatološkim uvjetima u kojoj je biljka rasla te o godišnjem dobu branja. Eterična ulja obično sadrže dvije ili tri glavne sastavnice u relativno visokim koncentracijama (20-70%) u usporedbi s ostalim sastavnicama koje su prisutne u tragovima (manje od 1%). Glavne sastavnice uobičajeno određuju biološka svojstva eteričnih ulja. Daleko najčešći kemijski spojevi prisutni u sastavu eteričnih ulja su terpeni i terpenoidi te u manjoj mjeri aromatski derivati fenilpropana. Svi spojevi su karakterizirani malom molekulskom masom (Bakkali i sur., 2008).



Slika 1. Primjeri kemijskih struktura nekih komponenti eteričnih ulja (Bakkali i sur., 2008).

Eterična ulja se ekstrahiraju iz mnogih aromatičnih biljaka karakterističnih za područja umjerene do tople klime, kao što je Mediteran, gdje predstavljaju važan dio tradicionalnih farmakopeja i narodne medicine. Još od davnina eterična su ulja imala svoju primjenu te su bila poznata njihova baktericidna, virucidna, fungicidna, insekticidna i druga svojstva. I danas imaju svoju primjenu kako u farmaceutskoj industriji i kozmetici, tako i u agrikulturi i industriji hrane (Bakkali i sur., 2008).

1.1.1. Antimikrobni i antivirusni učinak

S obzirom na razvoj rezistencije mikroorganizama, sve se više pažnje posvećuje razvoju novih antimikrobnih agensa s novim mehanizmima djelovanja. S obzirom na otprije poznata antimikrobna svojstva eteričnih ulja, i ona su predmet istraživanja. Kako je jedna od osnovnih prirodnih funkcija eteričnih ulja obrana od mikroorganizama, većina ih pokazuje određenu antimikrobnu aktivnost (Reichling i sur., 2009). Neki primjeri su navedeni u tablici 1.

Tablica 1. Neke od biljaka s eteričnim uljima antimikrobnih svojstava (Reichling i sur., 2009).

Podrijetlo eteričnih ulja	Gram (+)	Gram (-)	Plijesni	Gljivice
<i>Allium sativum</i>			+	+
<i>Foeniculum vulgare</i>	+	+		
<i>Juniperus communis</i>	+	+		
<i>Lavandula angustifolia</i>			+	
<i>Melaleuca alternifolia</i>		+	+	
<i>Mentha arvensis</i>	+	+		+
<i>Mentha spicata</i>	+	+		
<i>Nigella sativa</i>	+		+	+
<i>Pimpinella anisum</i>			+	+
<i>Salvia sclerea</i>				+
<i>Thymus pulegioides</i>			+	+

Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja prema bakterijama i gljivicama očituje se u interferenciji s metabolizmom komponenti citoplazmatske membrane i stanične stijenke. Nekoliko je istraživanja pokazalo kako komponente eteričnih ulja, posebice monoterpeni, povećavaju fluidnost i permeabilnost citoplazmatske membrane, remete red membranskih proteina, inhibiraju stanično disanje i mijenjaju procese transporta iona (Reichling i sur., 2009).

Poznati su primjeri topikalne primjene eteričnih ulja kao antimikrobnog agensa. Tako je, naprimjer, istraživana potencijal pripravka za pranje koji sadrži 5% eterično ulje čajevca (*Melaleuca alternifolia*) na eradikaciju meticilin-rezistentne *Staphylococcus aureus* (MRSA) s kože pacijenata. Pokazalo se kako je razina eradikacije u razini s onom kod standardnih postupaka koji uključuju sintetske antiseptike (Caelli i sur., 2000).

Moguća je i upotreba eteričnih ulja kao konzervansa u kozmetičkim pripravcima. U jednom istraživanju uspoređene su kozmetičke emulzije s eteričnim uljima kao konzervansima, nasuprot istovjetnih emulzija sa standardnim konzervansom metilparabenom. Eterična ulja lavande (*Lavandula officinallis*), čajevca (*Melaleuca alternifolia*) i cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*), uklopljena u pripravak u koncentraciji 2,5%, testirana su protiv određenih sojeva bakterija *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* te gljivice *Candida albicans*. Eterična su ulja pokazala snažniju inhibicijsku aktivnost protiv testiranih sojeva u usporedbi s metilparabenom. Istraživanje je pokazalo kako eterična ulja mogu potencijalno zamijeniti sintetske konzervanse garantirajući mikrobiološku stabilnost kozmetičkih proizvoda (Herman i sur., 2013).

Eterična ulja pokazuju antivirusnu aktivnost protiv DNA i RNA virusa s virusnom ovojnicom. Naprotiv, na viruse bez ovojnice nemaju utjecaja. Istraživanja su pokazala kako

neke sastavnice eteričnih ulja interferiraju s virusnom ovojnicom, maskirajući komponente koje su odgovorne za adsorpciju ili ulazak virusa u stanicu domaćina. Neka od eteričnih ulja koja pokazuju snažan antivirusni učinak na aciklovir-rezistentne sojeve *Herpes Simplex* virusa, eterična su ulja limuna (*Citrus limon*), eukaliptusa (*Eucalyptus globulus*), čajevca (*Melaleuca alternifolia*), mente (*Mentha piperita*), đumbira (*Zingiber officinale*) i ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) (Reichling i sur., 2009).

U jednom randomiziranom istraživanju procijenjivana je učinkovitost eteričnog ulja čajevca u obliku 6% gela za lokalnu terapiju herpesa na usnama. Srednje vrijeme re-epitelizacije, nakon tretmana eteričnim uljem, bilo je 9 dana u usporedbi s 12,5 dana nakon primjene placeba, što jasno ukazuje na korist tretmana eteričnim uljem. Eterično ulje čajevca potencijalno je korisna, jeftinija alternativa za topikalnu terapiju herpesa koja ne predstavlja prijetnju razvoja rezistencije (Reichling i sur., 2009).

1.1.2. Antioksidacijski i protuupalni učinak

Cilj je istraživanja antioksidacijske aktivnosti eteričnih ulja njihov potencijal kao kozmeceutika i konzervansa u farmaceutskoj, kozmetičkoj i industriji hrane. Istraživanjima je pokazano kako sastavnice eteričnih ulja djeluju antioksidacijski, prevenirajući lipidnu peroksidaciju kroz hvatanje slobodnih radikala (*eng. radical scavenging*) te u manjoj mjeri kelacijom metalnih iona. Također, važno je saznanje kako konstituenti eteričnih ulja djeluju sinergistički jer se pokazalo kako pojedinačne komponente imaju slabiju antioksidativnu aktivnost od aktivnosti samih eteričnih ulja (Miguel, 2010).

Protuupalni učinak eteričnih ulja, osim antioksidacijskoj aktivnosti, pripisuje se i interakciji sa signalnim kaskadama koje uključuju citokine i regulatorne faktore transkripcije te posljedično utječu na smanjenu ekspresiju proupalnih gena. Eterično ulje kamilice (*Matricaria spp.*), na primjer, od davnina je poznato po svom protuupalnom učinku, te se zbog toga koristilo za olakšavanje simptoma povezanih s ekcemima, dermatitisom i drugim kožnim iritacijama (Miguel, 2010).

1.1.3. Učinak na cijeljenje rana

Učinak eteričnih ulja na cijeljenje rana temelji se prije svega na njihovom antiseptičkom te kombiniranom antimikrobnom i protuupalnom učinku. Takav je učinak potvrđen mnogim radovima. U jednom istraživanju procijenjen je učinak 6% otopine eteričnog ulja lavande u kombinaciji sa 6% otopinom eteričnog ulja kamilice na zacjeljivanje rana u pacijenata s kroničnim ranama u periodu od 3 do 4 mjeseca. Otopine su primjenjene direktno na rane i dodane zavoju, te se pokazalo kako rane tretirane otopinama eteričnih ulja zarastaju brže od kontrole. Štoviše, dokazano je kako eterično ulje kamilice, uz umjeren antimikrobni, pokazuje značajan antitrombotski učinak *in vitro*, što može biti značajno u zacjeljivanju rana (Woollard i sur., 2007).

Za eterično ulje timijana (*Thymus spp.*) postoje mnogi dokazi o pozitivnom utjecaju na zacjeljivanje opekline. Osim antimikrobnog i antifungalnog učinka, ono utječe na smanjenu proizvodnju dušikovog oksida važnog medijatora upale kod opekline. Istraživanjem na štakorima pokazano je kako, osim pozitivnog protuupalnog učinka zbog smanjene proizvodnje dušikovog oksida, ono olakšava zacjeljivanje rana. Naime, topikalna primjena eteričnog ulja timijana poboljšava odlaganje kolagena, angiogenezu i migraciju keratinocita, procese važne kod zacjeljivanja opekline (Woollard i sur., 2007).

Eterično ulje bosiljka (*Ocimum spp.*) također ima pozitivna svojstva na cijeljenje rana, dokazana *in vivo*. Temelje se na antiseptičkim te, ponajviše, protuupalnim učincima koji se očituju kroz snažnu inhibiciju povećanja vaskularne permeabilnosti i inhibiciju migracije leukocita, kao i blokiranje cikloksigenaze i lipoksigenaze (Woollard i sur., 2007).

1.1.4. Repelentni učinak eteričnih ulja

Eterična ulja pokazuju optimalni repelentni učinak protiv mnogih vrsta insekata. Repelentna aktivnost se povezuje s prisustvom monoterpena i seskviterpena te je zamijećen sinergistički učinak ovih sastavnica eteričnih ulja. Neke od biljaka koje imaju eterična ulja s repelentnim svojstvima su ružmarin (*Rosmarinus officinalis*), bosiljak (*Ocimum basilicum*), menta (*Mentha × piperita*) te više vrsta eukaliptusa (*Eucalyptus spp.*) (Nerio i sur., 2010).

Budući da su eterična ulja vrlo hlapljiva, kako bi se produžio repelentni učinak nakon topikalne primjene, potrebno je uklopiti eterična ulja u pogodne nosače. Istraživane

formulacije koje se temelje na kremama, polimernim smjesama ili mikrokapsulama pokazuju značajno produženje repelentne aktivnosti nakon topikalne primjene. Budući da neka eterična ulja posjeduju jači repelentni učinak od najčešćih sintetskih repelenata, a s obzirom na njihovu sigurnost i ekološku prihvatljivost, postoji velik potencijal za razvoj formulacija za topikalnu primjenu s eteričnim uljima i njihovim sastavnicama kao repelentnim sredstvima (Nerio i sur., 2010).

1.1.5. Eterična ulja kao promotori penetracije

Promotori penetracije su agensi koji povećavaju difuzivnost lijeka kroz kožu, smanjujući barijerni otpor *stratum corneum* bez oštećenja stanica. Idealno, promotori penetracije imaju sljedeća svojstva: farmakološki su inertni, ne iritiraju, nisu toksični ni alergeni, kompatibilni su s lijekovima, imaju dobra svojstva otapanja, pristupačne su cijene, ne uzrokuju gubitak tjelesnih tekućina (vode) te se lako uklanjaju s kože koja nakon toga mora brzo povratiti svoju barijernu funkciju. Danas su poznati mnogi prirodni i sintetski promotri penetracije kao što su sulfoksidi, urea, masne kiseline i njihovi derivati, alkoholi i surfaktanti, a u posljednje se vrijeme intenzivno istražuje potencijal eteričnih ulja i njihovih izoliranih sastavnica kao promotora penetracije. Pokazalo se kako eterična ulja s visokim sadržajem terpena i terpenoida djeluju kao potentni promotori penetracije (Pathan i Setty, 2009).

Eterična ulja i njihove sastavnice su sigurni i pogodni pojačivači penetracije kako za hidrofilne, tako i za hidrofobne lijekove. U pozadini takvog djelovanja su razni mehanizmi od kojih neki još nisu u potpunosti razjašnjeni. Tako je, na primjer, pokazano kako je eterično ulje paprene metvice (*Mentha × piperita*) u niskoj koncentraciji smanjilo perkutanu apsorpciju određenih lijekova, dok je u visokoj koncentraciji smanjilo integritet dermalne barijere pa je apsorpcija bila povećana. Eterično ulje bosiljka unaprijedilo je perkutanu apsorpciju indometacina, poboljšavajući raspodjelu lijeka u *stratum corneum* te remeteći staničnu morfologiju (Herman i Herman, 2015).

Mehanizam djelovanja aktivnih sastavnica eteričnih ulja kao promotora penetracije temelji se na mijenjanju strukture barijere *stratum corneum* i interakciji s membranskim lipidima *stratum corneum*. Tako, na primjer, u istraživanju penetracije tamoksifena, terpeniski alkoholi timol i mentol djeluju poboljšavajući raspodjelu lijeka u *stratum corneum*,

dok terpenoidi karvon i eukaliptol djeluju na preraspodijelu membranskih lipida *stratum corneuma* (Herman i Herman, 2015).

Toksičnost i citotoksičnost eteričnih ulja dobro je dokumentirana. Dokazano je kako je toksičnost eteričnih ulja i njihovih sastavnica relativno mala u usporedbi s većinom sintetskih promotora penetracije. Smatra se, stoga, kako su eterična ulja sigurna za upotrebu kao promotori penetracije (Herman i Herman, 2015).

1.2. Nanoemulzije za dermalnu primjenu

Nanoemulzije su transparentni, termodinamički stabilni sustavi dviju tekućina koje se ne miješaju, kao što su ulje i voda, koji su stabilizirani međupovršinskim filmom molekula surfaktanta. Veličina čestica dispergirane faze najčešće je između 5 i 200 nm. Za pripremu nanoemulzija koriste se kosurfaktanti i suotapala. Surfaktanti smanjuju površinsku napetost na granici faza, te tako smanjuju količinu energije potrebnu za nastajanje nanoemulzije, omogućujući spontano formiranje istih. Zbog velike količine surfaktanta, potrebna su ispitivanja biokompatibilnosti emulzija (Devarajan i Ravichandran, 2011).

Najčešće vrste nanoemulzija su: ulje u vodi, gdje su kapljice uljne faze dispergirane u kontinuiranoj vodenoj fazi; zatim voda u ulju, gdje su kapljice vodene faze dispergirane u kontinuiranoj uljnoj fazi; te bidisperzne nanoemulzije, gdje su mikorodomene ulja i vode dispergirane unutar sustava. Kod sva tri sustava međupovršina je stabilizirana prikladnom kombinacijom surfaktanata i kosurfaktanata (Devarajan i Ravichandran, 2011).

Nanoemulzije mogu poboljšati apsorpciju i biodostupnost djelatnih tvari, štite molekulu od oksidacije i hidrolize, omogućuju primjenu hidrofilnih i lipofilnih djelatnih tvari te se mogu koristiti za različite putove primjene. Značajna prednost nanoemulzija pred drugim vrstama emulzija je veća ukupna površna čestica zbog njihove male veličine. Utvrđeno je da se smanjivanjem veličina čestica poboljšava stabilnost i povećava prikladnost sustava za prenošenje aktivnih sastojaka (Devarajan i Ravichandran, 2011).

Topikalna primjena lijekova može imati mnoge prednosti od kojih je jedna izbjegavanje metabolizma prvog prolaska kroz jetru i s njim povezanih toksičnosti. Druga je direktna i ciljana dostava lijeka na zahvaćeno područje kože. Posebno je značajno što moduliranjem sastava nanoemulzije može biti prilagođavana penetracija lijeka kroz kožu (Devarajan i Ravichandran, 2011).

1.2.1. Nanoemulzije s uklopljenim eteričnim uljima

Prisutni su brojni primjeri uklapanja eteričnih ulja kao i bioaktivnih komponenti eteričnih ulja u nanoemulzije. Tako su, na primjer, Lu i suradnici izradili nanoemulzije sa citralom. Citral je monoterpen koji je prisutan u nekim eteričnim uljima te posjeduje antimikrobna svojstva. Međutim, slabo je topljiv u vodi te je podložan oksidacijskoj razgradnji koja dovodi do gubitka antimikrobne aktivnosti. Uklapanjem u nanoemulzije osigurana je biološka aktivnost citrala (Lu i sur., 2018).

Barradas i i suradnici razvili su nanoemulzije tipa ulje u vodi za dostavu eteričnog ulja koromača (*Foeniculum vulgare*). Razvijene su i karakterizirane nanoemulzije s eteričnim uljem kao uljnom fazom uz upotrebu neionskih surfaktanata. Pripremljeno je 11 vrsta nanoemulzija s različitim omjerom surfaktanata te su 4 pokazale zadovoljavajuću stabilnost. Nanoemulzije su pokazale komapatibilnost s pH ljudske kože, te je pretpostavljeno kako takve nanoemulzije imaju potencijal za topikalnu primjenu (Barradas i sur., 2015).

Također, uspješno su izrađene nanoemulzije s eteričnim uljem sjemenki kumina (*Cuminum cyminum*). Eterično ulje sjemenki kumina sadrži fenolne spojeve koji posjeduju svojstva hvatanja slobodnih radikala (*eng. radical scavenging*). Cilj je bio izraditi nanoemulzije za transdermalnu dostavu eteričnog ulja s dugotrajnim sistemskim antioksidacijskim i hepatoprotektivnim učinkom. Autori su izradili i karakterizirali 6 nanoemulzija različitog omjera surfaktanata i kosurfaktanata kako bi pronašli nanoemulzije zadovoljavajuće stabilnosti i kapaciteta uklapanja eteričnog ulja. Provedene su *ex vivo* studije prodiranja fenolnih komponenti eteričnog ulja kroz *stratum corneum*. Također, *in vitro* sudijama dokazana je antioksidacijska aktivnost formulacije, dok su *in vivo* studijama na štakorima dokazana antioksidacijska i hepatoprotektivna aktivnost (Mostafa i sur., 2015).

1.3. Mikroemulzije za dermalnu primjenu

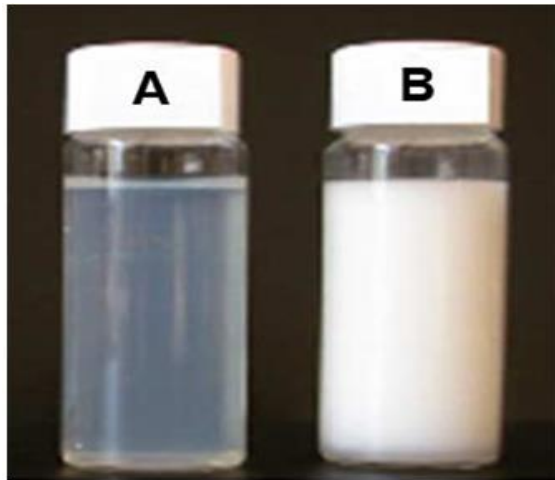
Mikroemulzije su termodinamički stabilne disperzije dvije tekuće faze koje se međusobno ne miješaju uz dodatak emulgatora i koemulgatora koji stabiliziraju mikroemulzijski sustav. Nastaju spontano ili uz vrlo mali utrošak energije. Veličina kapljica disperzne faze mikroemulzije je 20-200 nm. Zbog velike dodirne površine faza sustava, potrebna je velika količina površinski aktivnih tvari za njegovu stabilizaciju. Mikroemulzije su transparentni sustavi u usporedbi s makroemulzijama koje su mliječno bijelog izgleda (Pepić i sur., 2012).

Tablica 2. Najčešće sirovine koje se koriste za izradu mikroemulzija (Pepić i sur., 2012).

Funkcija	Podrijetlo	Sirovine
Hidrofobna faza	Prirodna ulja	maslinovo, sojino, kukuruzno, kokosovo, ricinusovo, jojobino
	Sintetska ulja	izopropilni miristat, izopropilni palmitat, etilni laurat, oleinska kiselina, cetilni behenat
Površinski aktivne tvari (PAT); surfaktanti	Prirodne	lecitin, alkilni glukozidi, alkilni esteri
	Sintetske	anionske: Na-dodecilsulfat, Na-lauretsulfat neionske: Tween, Span, Brij, Pluronic, cetanol, kokoamidni monoetanolamin kationske: cetiltrimetilamonijev bromid amfolitske: dodecilni betain, kokamidopropilni betain
Kosurfaktanti	Prirodni	fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilglicerol i njihovi derivati
	Sintetski	etanol, izopropanol, propanol, transkutol, polietilenglikol (PEG), propilenglikol
Hidrofilna faza		voda

Mikroemulzije su velikog kapaciteta uklapanja kozmeceutika. Uklopljeni kozmeceutici otopljeni su u disperznoj fazi. Hidrofobni kozmeceutici uklapaju se u mikroemulzije tipa ulje u vodi (U/V), dok se hidrofilni kozmeceutici uklapaju u mikroemulzije tipa voda u ulju (V/U). Primjeri kozmeceutika koji su uklapani u mikroemulzijski sustav su: kemijski UV filtri (avobenzon, oksibenzon), vitamini (A, D, E, K, β -karoten, L-askorbinska kiselina), antiperspiransi (aluminijeve soli, aluminij-cirkonijeve

soli), antibakterijske tvari (triklozan, soli kvarternih amonijevih spojeva, soli cinka i bakra) te tvari za izbjeljivanje (kojična kiselina, arbutin) (Pepić i sur., 2012).



Slika 2. Transparentna mikroemulzija (A) i mliječno bijela (makro)emulzija (B) (Pepić i sur., 2012).

Upotreba mikroemulzija u dermatokozmetičkim pripravcima ima mnoge prednosti. Uz već spomenut veliki kapacitet uklapanja, mikroemulzije imaju privlačna kozmetička svojstva (izgled) zbog upotrebe novih sirovina i tehnologija te osiguravaju učinkovitu opskrbu kože lipidima i vlagom. Poboljšana dermalna apsorpcija različitih kozmeceutika omogućena je učinkom površinski aktivnih tvari kao pospješivača apsorpcije, izrazitom hidratacijom površinskog sloja kože te povećanom adhezijom zbog nanometarskih dimenzija disperzne faze i relativno niske površinske napetosti sustava. Nedostaci mikroemulzija posljedica su visokog udjela površinski aktivnih tvari, nužnih za njihovu pripremu, a s kojima su povezane mogućnosti iritacije kože (Pepić i sur., 2012).

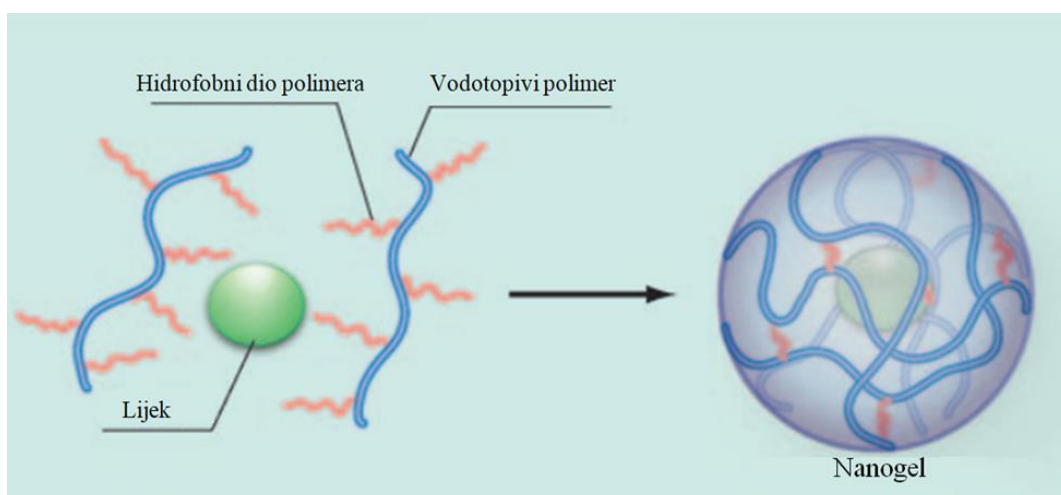
1.3.1. Mikroemulzije s uklopljenim eteričnim uljima

Jedan od primjera uklapanja eteričnog ulja u mikroemulzije je sustav s eteričnim uljem đumbira vrste *Zingiber cassumunar*. Ovo eterično ulje ima izrazita protuupalna svojstva, te je pretpostavljeno kako će se uklapanjem u mikroemulzije povećati njegova stabilnost i protuupalni učinak. Razvijene su mikroemulzije u kojima se uljna faza sastojala od eteričnog ulja, vodena faza od propilen glikola i vode (2/1), a kao surfaktant je korišten Tween 20. Dokazana je sigurnost za primjenu na ljudima jer pripremljene mikroemulzije nisu pokazivale

toksične učinke na ljudske mononuklearne stanice iz periferne krvi. Takve mikroemulzije pokazivale su zadovoljavajuću stabilnost, štoviše, povećana je fizička stabilnost komponenti eteričnog ulja. Naime, pokazalo se kako mikroemulzija štiti spoj sabinen od isparavanja zagrijavanjem, sastojak eteričnog ulja odgovoran za protuupalni učinak. Postavljena hipoteza se pokazala točnom jer su mikroemulzije s uklopljenim eteričnim uljem pokazale veću protuupalnu aktivnost od samog eteričnog ulja. Stoga je zaključeno kako su mikroemulzije prikladan sustav za dostavu eteričnog ulja jer je poboljšana i stabilnost i efikasnost (Chaiyana i sur., 2017).

1.4. Nanogelovi za dermalnu primjenu

Nanogelovi su vodene disperzije čestica hidrogela nanometarskih veličina koje se formiraju fizičkim ili kemijskim umrežavanjem (*eng. cross-linking*) hidrofilnih ili amfifilnih polimera. Razvijeni su kao nosači lijekova i mogu biti dizajnirani tako da spontano uklope biološki aktivne molekule formirajući ionske, vodikove ili hidrofobne veze. Nanogelovi imaju visoki kapacitet uklapanja, veliku stabilnost te mogućnost „odgovora“ na promjene u okolišu kao što su ionska jakost, pH i temperatura, što ih čini odličnim nosačima lijekova. Kemijskim prilagodbama nanogelova moguće je postići ciljanu dostavu lijekova. (Kabanov i Vinogradov, 2009).



Slika 3. Formiranje nanogela s uklopljenom djelatnom tvari u vodenom mediju (Kabanov i Vinogradov, 2009).

Nanogelovi za topikalnu primjenu izrađeni su od biokompatibilnih i biorazgradivih sintetičkih i polusintetičkih polimera uključujući poli(laktid-co-glikolid) (PLGA), poli(ϵ -kapolakton) (PCL), kitozan te kombinaciju kitozana i poli gama-glutaminske kiseline (gamma-PGA). Hidrofilni nanogel poboljšava dostavu lijeka u kožu. Naime, gel pomaže stvaranju ujednačene disperzije nosača u matriksu i produžuje vrijeme kontakta s kožom kao i odlaganje nosača na kožu (Batheja i sur., 2011).

1.4.1. Nanogelovi s uklopljenim eteričnim uljima

Poznato je korištenje eteričnih ulja uklopljenih u nanogel u tehnologiji konzervacije hrane. Eterično ulje ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) uklopljeno u kitozanski nanogel pokazalo je poboljšana svojstva. Uz povećanu stabilnost, uklapanjem u nanogel povećao se inhibitorni učinak eteričnog ulja na bakteriju *Staphylococcus aureus* (Mohsenabadi i sur., 2018).

Almeida i suradnici pripremili su nanogel s uklopljenim eteričnim uljem limunske trave (*Cymbopogon citratus*). Nanogel je pripremljen od poli(laktid-co-glikolida) (PLGA) te *ex vivo* eksperimentom ispitana inhibicijska aktivnost protiv *Herpes simplex* virusa. Formulacija je snažno inhibirala virus u ne-citotoksičnoj koncentraciji koja je bila 42 puta niža od samog eteričnog ulja. Nadalje, utvrđeno je kako ova formulacija štiti eterično ulje od hlapljenja. Zaključeno je kako ovakva formulacija, s obzirom na iskazane prednosti, ima potencijal za topikalnu primjenu protiv virusa herpesa (Almeida i sur., 2018).

1.5. Nanočestice za dermalnu primjenu

Nanočestice su sustavi u kojima je aktivni sastojak uklopljen ili zarobljen unutar čvrstog matriksa. Ovisno o tipu matriksa nanočestice mogu biti klasificirane u polimerne i lipidne nanočestice. Nanočestice se najčešće koriste kada aktivni sastojak nije stabilan niti u kontinuiranoj, niti u disperznoj fazi emulzija (Golubovic-Liakopoulos i sur., 2011).

Polimerne nanočestice često se koriste za transdermalnu dostavu lijekova jer povećavaju stabilnost lijeka, povećavaju prodiranje lijeka kroz *stratum corneum* i omogućavaju kontrolirano oslobađanje. Za formuliranje polimernih nanočestica koristi se

širok spektar polimernih materijala, te stoga strukture čestica mogu varirati od čestica s kontinuiranom ovojnicom do onih s otvorenom i poroznom strukturom. Aktivne tvari mogu biti adsorbirane na površinu nanočestice, uklopljene unutar kontinuirane ovojnice ili dispergirane u polimernom matriksu. Najčešći prirodni polimer za izradu nanočestica za dermalnu primjenu je kitozan, dok su najčešći sintetski polimeri poli(laktid-co-glikolid) (PLGA), polilaktidi (PLA) i poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) (Carter i sur., 2018).

Najčešće korištene lipidne nanočestice su čvrste lipidne nanočestice (*eng. solid lipid nanoparticles, SLN*). Takve čvrste sferične čestice sastoje se od hidrofobne jezgre triglicerida ili derivata masnih kiselina s relativno visokim talištem koja je okružena slojem fofolipida. Prednost čvrstih lipidnih nanočestica, pred polimernim česticama, uključuje biorazgradivost lipida kao i odsutnost potencijalno toksičnih aditiva potrebnih za polimerizaciju (Golubovic-Liakopoulos i sur., 2011). Također, čvrste lipidne nanočestice povećavaju stabilnost uklopljenih djelatnih tvari u usporedbi s djelatnim tvarima uklopljenima u U/V nanoemulzije. Imaju pozitivna kozmetička svojstva jer, primjenom na kožu, čvrste lipidne nanočestice stvaraju film okluzivnog učinka koji sprečava isparavanje vode s površine kože. Emulgatori iz čvrstih lipidnih nanočestica sprečavaju nastanak pora u strukturi lipidnog filma, značajno pridonoseći stvaranju okluzivnog učinka, što u konačnici rezultira poboljšanom dermalnom apsorpcijom aktivnih tvari (Goreta i Pepić, 2014).

1.5.1. Nanočestice s uklopljenim eteričnim uljima

Razvijene su nanokapsule na bazi prirodnih polimera kitozana i alginata za uklapanje eteričnih ulja s primarnim ciljem povećanja stabilnosti lakohlapljivih eteričnih ulja. S obzirom na stabilnost pripravka, utvrđen je najprihvatljiviji omjer kitozana i alginata u sastavu nanokapsula za uklapanje nekoliko različitih vrsta eteričnih ulja. Potvrđeno je kako su tako pripremljene nanokapsule hemokompatibilne i netoksične za ljudski organizam. Utvrđeni su i profili oslobađanja te je potvrđeno kako je zadržana biološka aktivnost eteričnih ulja uklopljenih u takve nanokapsule, dok se njihova stabilnost povećala. Na osnovu takvih saznanja potvrđeno je kako je takav sustav prikladan za biomedicinsku primjenu (Natrajan i sur., 2015).

Nadalje, postoje primjeri uklapanja eteričnih ulja u čvrste lipidne nanočestice (SLN). Lai i suradnici istraživali su utjecaj uklapanja eteričnog ulja jedne vrste pelina (*Artemisia*

arborescens) u čvrste lipidne nanočestice na transdermalnu dostavu i njegovu antiviralnu aktivnost. Pripremljene su dvije vrste čvrstih lipidnih nanočestica s eteričnim uljem te su obje pokazale pozitivna svojstva što se tiče fizičke stabilnosti, kao i kapaciteta uklapanja eteričnog ulja. *In vitro* ispitivanjem aktivnosti formulacija protiv *Herpes simplex* virusa pokazalo se kako uklapanje u nanočestice nije imalo negativan utjecaj na antiviralnu aktivnost eteričnog ulja. Permeacijskim *in vitro* ispitivanjima pokazalo se kako je uklapanjem u nanočestice uvelike poboljšana akumulacija eteričnog ulja u koži, dok je izostala potencijalno štetna permeacija kroz kožu (Lai i sur., 2007).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ljekovita svojstva eteričnih ulja poznata su od davnina te se i danas koriste u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Eterična ulja i njihove sastavnice sadržane su u mnogim proizvodima za topikalnu primjenu. Mnogim je istraživanjima utvrđena pozadina njihovog biološkog djelovanja. U novije su vrijeme otkrivena i istražena nova svojstva eteričnih ulja koja povećavaju mogućnosti njihove upotrebe. Jedno od takvih svojstava je mogućnost nekih eteričnih ulja da djeluju kao promotori penetracije.

Nanotehnološki pripravci imaju sve širu primjenu u farmaciji. Nanočestice obuhvaćaju čestice različite građe, oblika, površinskih svojstava i raspodjele veličina unutar nanometarskog područja (<1000 nm). Koriste se, kako za dermalnu primjenu lijekova, tako i za transdermalnu dostavu djelatnih tvari u sistemsku cirkulaciju. Nanotehnološki pripravci omogućuju primjenu nestabilnih i teško topljivih aktivnih tvari, poboljšavaju dermalnu raspoloživost uklopljene djelatne tvari i omogućuju kontrolirano oslobađanje djelatnih tvari. Također, samom primjenom nanotehnoloških pripravaka mogu se ostvariti neki pozitivni učinci na kožu.

Postoje brojni primjeri uklapanja eteričnih ulja u nanotehnološke nosače, prije svega, kako bi se povećala stabilnost i produžilo terapijsko djelovanje inače lako hlapljivih eteričnih ulja. Nanotehnološke nosače moguće je dizajnirati na način da eterična ulja budu njihov sastavni dio ili da budu uklopljena u nosač kao djelatna tvar.

Predmet proučavanja bili su mi nanotehnološki nosači s uklopljenim djelatnim tvarima koji u nekom obliku sadrže eterična ulja. Cilj je bio istražiti može li uklapanje eteričnih ulja u nanotehnološke nosače s djelatnim tvarima poboljšati svojstva formulacije te utječe li uklapanje eteričnih ulja na stabilnost i sigurnost formulacija.

3. MATERIJALI I METODE

Pretraživanje literature online baza podataka obavljeno je elektroničkim putem pomoću umreženog računala koje ima online pristup bazama podataka. Pretražene su bibliografska baza podataka (PubMed) i baza podataka s cjelovitim tekstom (Science Direct).

Literatura je pretražena prema temi istraživanja, predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Pri pretraživanju literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana za problematiku diplomskog rada. Literatura je pretraživana od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabrani članci relevantni za problematiku diplomskog rada.

Relevantni članci proučavani su analitično i kritično, a vezano uz: definiranje znanstvenog i/ili stručnog problema, istraživanje postojećih znanja o definiranom problemu (literaturni navodi), oblikovanje radne hipoteze, odabir eksperimentalnih metoda za ispitivanje hipoteze, prikaz i analizu rezultata te izvedene zaključke. Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci, koji su prikazani diplomskim radom. Na temelju proučavanih članaka izvedena su vlastita razmatranja proučavane problematike, koja su sastavni dio diplomskog rada.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Nanoemulzije s uklopljenim eteričnim uljima i djelatnim tvarima

4.1.1. Primjer 1

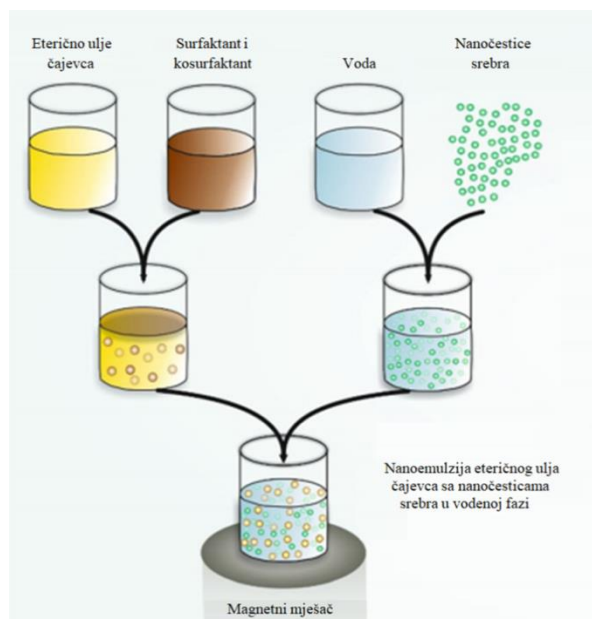
Najafi-Taher i suradnici izradili su nanoemulzije s eteričnim uljem čajevca (*Melaleuca alternifolia*) s uklopljenim nanočesticama srebra u vodenoj fazi za terapiju lokalnih infekcija. Na dobivenoj nanoemulziji provedena su ispitivanja citotoksičnosti, antimikrobne aktivnosti i procijenjen je sinergistički antimikrobni učinak nanoemulzija s eteričnim uljem čajevca i srebrnih nanočestica (Najafi-Taher i sur., 2018b).

Nanočestice srebra su poznate kao antibiotski agens koji pokazuje snažnu citotoksičnost protiv širokog spektra mikroorganizama. Antimikrobna aktivnost srebrnih nanočestica, između ostalog, uključuje vezanje za DNA i blokiranje transkripcije, produkciju slobodnih radikala, vezanje za negativno nabijene komponente bakterijskih proteina, uzrokujući strukturne promjene i deformacije bakterijske membrane (Duran i sur., 2016).

Eterično ulje čajevca (*Melaleuca alternifolia*) dobiva se parnom destilacijom listova čajevca. Ovo eterično ulje pokazuje snažnu antimikrobnu aktivnost s malim potencijalom za razvoj rezistencije. Antimikrobna aktivnost uključuje interferenciju s homeostazom kalija, bakterijskom respiracijom, kao i lizu cijelih stanica (Lins i sur., 2016).

U prethodnim istraživanjima utvrđeno je kako kombinacija srebrnih iona i eteričnog ulja čajevca pokazuje značajnu antimikrobnu aktivnost protiv vrsta *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* (Low i sur. 2013).

Najafi-Taher i suradnici pripremili su nanoemulzije eteričnog ulja čajevca, koristeći kao surfaktant smjesu Tween 80® i Span 80® u omjeru 72:28. Vodena faza pripremljena je otapanjem smjese surfaktanta i etanola u vodi korištenjem magnetnog mješača. Zatim je u vodenu fazu umiješana uljna faza uz umjereno miješanje 15 minuta, te je dobivena transparentna nanoemulzija. Na kraju su u smjesu dodane nanočestice srebra (Najafi-Taher i sur., 2018b).



Slika 4. Shematski prikaz postupka pripreme nanoemulzije eteričnog ulja čajevca s nanočesticama srebra u vodenoj fazi (prilagođeno prema Najafi-Taher i sur., 2018b).

Tako pripravljena nanoemulzija podvrgnuta je testiranju mikrobiološke aktivnosti na standardnim i rezistentnim sojevima bakterija *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Disk difuzijski testovi pokazali su značajnu mikrobiološku aktivnost u usporedbi s tetraciklinom, pogotovo prema rezistentnim sojevima. Također, metodom mikrodilucije pokazano je kako je minimalna inhibitorna koncentracija srebrnih nanočestica i eteričnog ulja čajevca značajno smanjena u takvom sustavu, u usporedbi sa samim srebrnim nanočesticama i sa samim eteričnim uljem čajevca, što je objašnjeno sinergističkim učinkom. Takvim smanjenjem koncentracije potrebne za antimikrobnu aktivnost smanjuju se potencijalni toksični učinci pojedinih komponenti (Najafi-Taher i sur., 2018b).

Tablica 3. Minimalna inhibitorna koncentracija srebrnih nanočestica i eteričnog ulja čajevca kao zasebnih komponenti i u kombinaciji (Najafi-Taher i sur., 2018b).

Formulacija		MIC za rezistentne <i>E. coli</i>	MIC za rezistentne <i>S. aureus</i>
Nanočestice srebra	same	25 µg/ml	25 µg/ml
	kombinacija	8 µg/ml	12,5 µg/ml
Eterično ulje čajevca	samo	5 µg/ml	5 µg/ml
	kombinacija	0,8 µg/ml	1,25 µg/ml

Također, provedena su istraživanja citotoksičnosti na ljudskim plućnim stanicama fibroblasta, te je utvrđeno kako dizajnirani nanosustav ne uzrokuje značajnu toksičnost na ljudskim stanicama. Dakle, utvrđeno je kako takav sustav predstavlja potencijal kao uspješan antimikrobni agens, pogotovo prema rezistentnim patogenima (Najafi-Taher i sur., 2018b).

4.1.2. Primjer 2

Najafi-Taher i suradnici dizajnirali su i optimizirali gel za topikalnu primjenu koji se bazira na nanoemulzijama eteričnog ulja čajevca (*Melaleuca alternifolia*) u koje je uklopljena aktivna tvar adapalen za lokalnu terapiju akni. Cilj je bio dizajnirati formulaciju te nakon toga usporediti djelotvornost i sigurnost primjene s gelom registriranim na tržištu koji sadrži 0,1% adapalena (Najafi-Taher i sur., 2018a).

Adapalen je retinoid, sintetski derivat naftoične kiseline, često korišten u lokalnoj terapiji akni. Djeluje na komedone, regulirajući staničnu diferencijaciju, te djeluje i na upalne i ne-upalne lezije (Czernielewski i sur., 2001). Također, već su istraživani potencijali nano-nosača s adapalenom za lokalnu terapiju akni vulgaris (Prasad i sur., 2012).

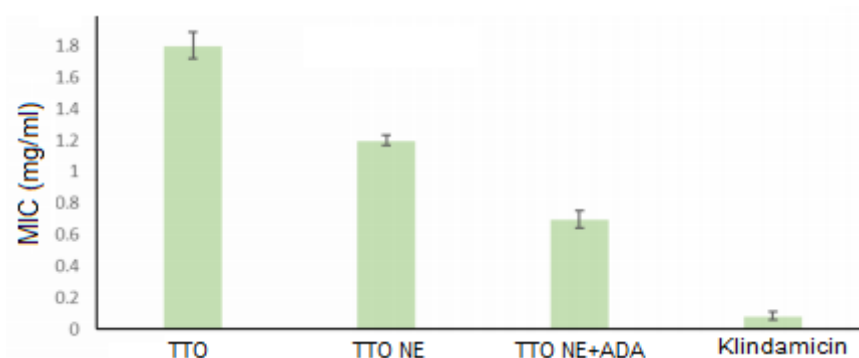
Eterična ulja često su u upotrebi kao dodatak terapije akni. Eterično ulje čajevca učinkovito je u lokalnoj terapiji akni, između ostalog, zbog svojih antimikrobnih svojstava (Najafi-Taher i sur., 2018a).

Proučavan je utjecaj vrste i koncentracije surfaktanta na veličinu i stabilnost nanoemulzija. Kao najbolji surfaktant pokazala se smjesa Tweena 80 i Spana 80 u omjeru 75:25. Organska faza građena je od eteričnog ulja čajevca (6%), adapalena (0,1%) i dimetil sulfoksida (DMSO) (10%). Organska je faza zatim dodana u vodenu fazu građenu od etanola i surfaktanata. Nakon pripreme nanoemulzije spontanom emulgiranjem, u formulaciju je dodana gelirajuća tvar, 1% Carbopol 934, kako bi se dobio pripravak pogodan za topikalnu primjenu (Najafi-Taher i sur., 2018a).

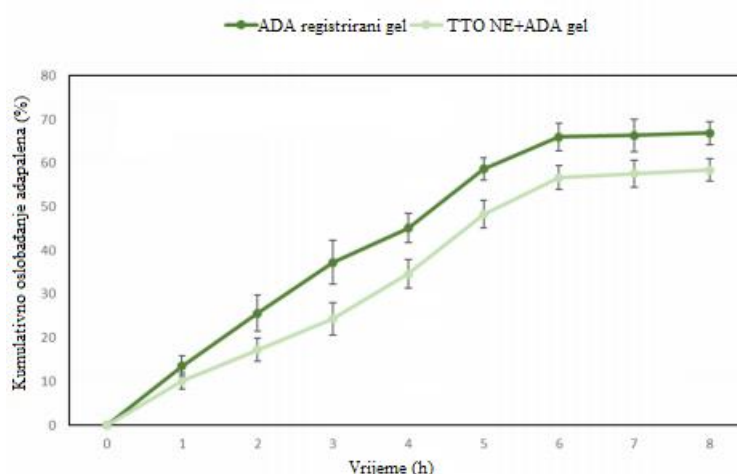
Karakterizacijom dobivenih nanoemulzija utvrđeno je kako je veličina čestica nanoemulzije 105 ± 5 nm. Zeta potencijal iznosio je 0,073 mV. Tako niska vrijednost zeta potencijala bila je očekivana s obzirom na primjenu neionskih surfaktanata. Kako bi se procijenila stabilnost formulacije, podvrgnuta je ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja, te je utvrđeno kako nema značajnije promjene u veličini čestica. Također, nije bilo promjene u

morfoloiji i veličini čestica nakon dugotrajne pohrane, te je zaključeno kako je formulacija stabilna u uvjetima skladištenja (Najafi-Taher i sur., 2018a).

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti protiv *Propionibacterium acnes*, provedeno je mjerenjem minimalne inhibitorne koncentracije pripremljene formulacije u usporedbi s eteričnim uljem čajevca i nanoemulzijama bez uklopljenog adapalena (Slika 5.). Minimalna inhibitorna koncentracija nanoemulzija eteričnog ulja čajevca s uklopljenim adapalenom niža je od minimalne inhibitorne koncentracije nanoemulzija bez uklopljenog adapalena. Pokazalo se da, iako adapalen sam po sebi nema antimikrobna svojstva, uklapanje adapalena u nanoemulzije eteričnog ulja čajevca povećava antimikrobnu aktivnost formulacije (Najafi-Taher i sur., 2018a).



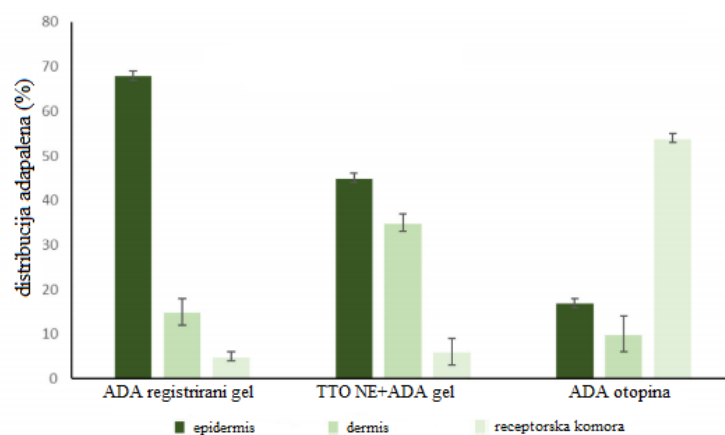
Slika 5. Rezultati procjene minimalne inhibitorne koncentracije za čisto eterično ulje čajevca (TTO), nanoemulziju eteričnog ulja čajevca (TTO NE), nanoemulziju eteričnog ulja čajevca s adapalenom (TTO NE + ADA) i klindamicin protiv *P. acnes* (Najafi-Taher i sur., 2018a).



Slika 6. *In vitro* oslobađanje adapalena iz nanoemulzije eteričnog ulja čajevca s uklopljenim adapalenom u obliku gela (TTO NE + ADA gel) u usporedbi s gelom s adapalenom registriranim na tržištu (ADA registrirani gel) (Najafi-Taher i sur., 2018a).

Uz pomoć Franzove difuzijske ćelije proučavano je oslobađanje lijeka iz dobivene formulacije, u usporebi s oslobađanjem iz gela registriranog na tržištu (Slika 6.). Tijekom prvih 6 sati primjećeno je produženo oslobađanje iz obje formulacije. Kumulativno oslobađanje adapalena iz nanoemulzija eteričnog ulja čajevca bilo je nešto niže od kumulativnog oslobađanja iz registriranog gela. Međutim, razlika nije bila značajna, te je zaključeno kako je oslobađanje adapalena iz pripremljene formulacije zadovoljavajuće (Najafi-Taher i sur., 2018a).

Utvrđeno je kako ova formulacija ima za posljedicu mnogo bolju raspodjelu lijeka u koži nego formulacija s adapalenom prisutna na tržištu (Slika 7.). Naime, primjenom gela s adapalenom, adapalen prodire u epidermalni sloj, ali ne i u dermis. Primjenom samo otopine adapalena, većina adapalena prodire kroz epidermis i dermis te doseže sistemsku cirkulaciju. Najbolju raspodjelu pokazuju nanoemulzije eteričnog ulja čajevca u koje je uklopljen adapalen jer njihovom primjenom adapalen prodire kroz epidermis, te se zadržava u dermisu, gdje pokazuje terapijsko djelovanje (Najafi-Taher i sur., 2018a).



Slika 7. Raspodjela adapalena primjenom gela s adapalenom registriranog na tržištu (ADA registrirani gel), nanoemulzije eteričnog ulja čajevca s uklopljenim adapalenom u obliku gela (TTO NE + ADA gel) i otopine adapalena (ADA otopina) u slojevima kože i receptorskoj komori (Najafi-Taher i sur., 2018a).

Također, provedeno je istraživanje kožne iritacije, te je pokazano kako primjenom formulacije ne dolazi do iritacije. Nadalje, testiranjem na životinjama pokazano je kako nema mjerljive sistemske apsorpcije adapalena iz takve formulacije, čime je dokazana sigurnost pripravka (Najafi-Taher i sur., 2018a).

Nanoemulzije eteričnog ulja čajevca s uklopljenim adapalenom pokazale su značajno poboljšanje u raspodjeli adapalena, kao i povećanje antimikrobne aktivnosti. S obzirom na dokazanu sigurnost, pripravljena formulacija ima značajan potencijal za daljnja istraživanja i buduću primjenu u lokalnoj terapiji akni vulgaris (Najafi-Taher i sur., 2018a).

4.1.3. Primjer 3

Barradas i suradnici razvili su nanoemulzije na bazi eteričnih ulja za topikalnu primjenu psoralena, te je ispitana dermalna raspodjela psoralena iz takvih sustava. Komponente nanoemulzija (eterična ulja i surfaktanti) odabrane su na temelju topljivosti aktivne tvari i veličine čestica. Dobivene su nanoemulzije tipa ulje u vodi temeljene na eteričnom ulju; prva na bazi eteričnog ulja koromača (*Foeniculum vulgare*) i druga na temelju eteričnog ulja klinčića (*Syzygium aromaticum*), za transdermalnu primjenu 8-metoksalena. Korišten je kitozan kao ugušćivač kako bi se dobila nanoemulzija u obliku hidrogela koja je pogodna za topikalnu primjenu (Barradas i sur., 2017).

Psoraleni su triciklički furanokumarini koji se u kombinaciji s ultraljubičastim svjetlom koriste u fotokemoterapiji (PUVA terapiji) psorijaze. PUVA terapija uključuje topikalnu ili sistemsku primjenu psoralena te izlaganje UV svjetlu (de Wolff i Thomas, 1986). Lokalna je primjena mnogo sigurnija zbog pojave neželjenih učinaka psoralena nakon sistemske primjene. Međutim, psoraleni imaju slab kapacitet prodiranja u dublje dijelove kože, te se istražuju sustavi koji bi poboljšali prodiranje psoralena (Barradas i sur., 2017).

Eterična ulja koromača i klinčića izabrana su između 13 različitih eteričnih ulja na temelju topljivosti 8-metoksalena u njima. Surfaktanti su izabrani na temelju ispitivanja veličine čestica i stabilnosti sustava, te je za nanoemulzije s eteričnim uljem klinčića odabran Pluronic F68 u koncentraciji od 10%, a za nanoemulzije s eteričnim uljem koromača Cremophor RH40 u koncentraciji 3% (Barradas i sur., 2017).

Primjena nanoemulzija s eteričnim uljem klinčića dovela je do smanjenog stupnja transdermalnog prijenosa psoralena i njegovog povećanog dermalnog zadržavanja. Takva svojstva sustava zadržana su i dodatkom kitozana kao ugušćivača. Zaključeno je kako takva formulacija ima potencijal za primjenu u PUVA terapiji zbog visoke djelotvornosti (povećanog dermalnog zadržavanja psoralena) i smanjenog potencijala sistemske izloženosti lijeku. Nažalost, sustav s eteričnim uljem koromača promijenio je svojstva dodatkom kitozana. Naime, povećano je transdermalno prodiranje psoralena koje bi povećalo sistemsku apsorpciju (Barradas i sur., 2017).

4.2. Mikroemulzije s uklopljenim eteričnim uljima i djelatnim tvarima

4.2.1. Primjer 1

Volpe i suradnici razvili su mikroemulzije tipa ulje u vodi bazirane na eteričnom ulju bosiljka (*Ocimum basilicum*) kao nosač za kemijski UVB filter – oktil-p-metoksi cinamat. Također, uz osnovnu namjenu kao UVB filtar, predloženo je protuupalno i repelentno djelovanje pripravka (Volpe i sur., 2018).

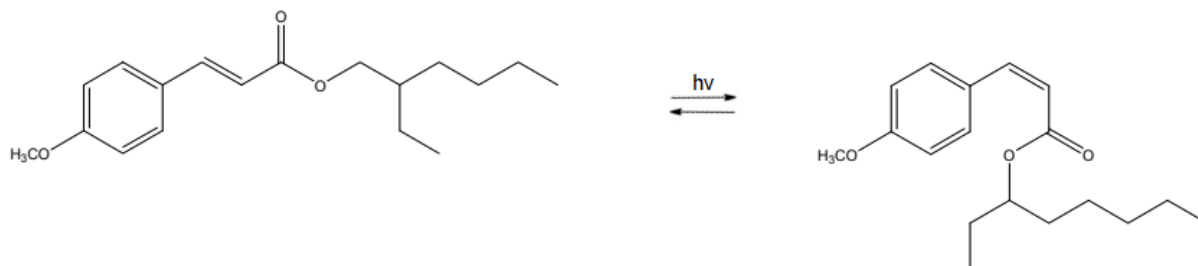
Oktil-p-metoksi cinamat (OMC) je organski spoj koji ima svojstvo apsorpcije UV zračenja. Upotreba OMC-a široko je raširena u proizvodima za zaštitu od Sunca i on predstavlja jedan od najčešćih lipofilnih UV filtara. OMC apsorbira zračenje u UVB dijelu spektra (290-320nm). Međutim, izlaganjem Sunčevoj svjetlosti primjećuje se smanjenje UV apsorpcije zbog fotolize OMC-a (Pattanaargson i sur., 2004). Takvo smanjenje djelotvornosti može se donekle izbjeći uklapanjem OMC-a u prikladne nosače. Kao prikladan nosač nedavno je predložena mikroemulzija tipa ulje u vodi (Nascimento i sur., 2018).

Eterično ulje bosiljka (*Ocimum basilicum*) poznato je u tradicionalnoj medicini zbog svojeg protuupalnog, antioksidacijskog, antimikrobnog, antifungalnog i repelentnog učinka. Za takva svojstva odgovorna je prisnost bioaktivnih komponenti kao što su, između ostalih estragol, linalol, cineol, α -pinen, β -pinen. Studijama je potvrđen protuupalni i antiedematogeni učinak. Dobro je istražena repelentna aktivnost, posebno protiv komaraca vrste *Aedes aegypti*, glavnog vektora uzročnika mnogih bolesti. Također, važno je istaknuti biokompatibilnost eteričnog ulja bosiljka. Prethodnim studijama, temeljenima na testu kožne iritacije, nisu opažene nikakve reakcije na takvo eterično ulje (Rodrigues i sur. 2016).

Mikroemulzije su priređene korištenjem biokompatibilnih materijala. Kao surfaktanti korišteni su dekaetilen glikol mono-dodecil eter (DME) i etanol u omjeru 2:1. Razvijeno je 6 vrsta mikroemulzija s koncentracijom eteričnog ulja bosiljka između 6 i 10%. Oktil-p-metoksi cinamat (OMC) dodan je u mikroemulzije u koncentraciji od 1,5%, a uklopljen je umješavanjem u uljnu fazu. Ispitana je stabilnost pripremljenih mikroemulzija, te je zaključeno kako bi bile stabilne u uvjetima transporta i skladištenja (Volpe i sur., 2018).

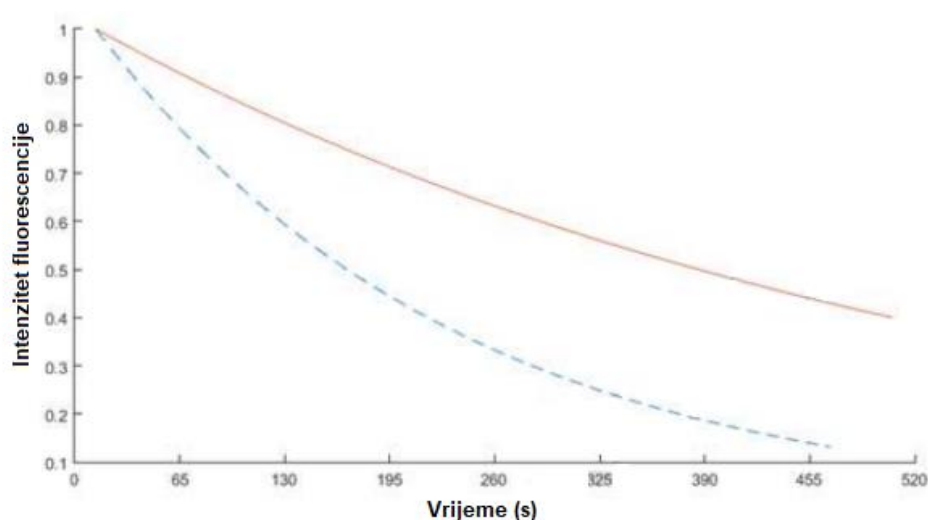
Jedan od glavnih ciljeva istraživanja bio je usporediti kinetiku fotolize OMC-a u priređenim mikroemulzijama u usporedbi s OMC-om u vodenom mediju kako bi se utvrdile potencijalne prednosti primjene mikroemulzija kao nosača (Volpe i sur., 2018). Naime, fotoliza OMC-a očituje se u njegovoj transformaciji iz E u Z izomer. Apsorpcijski koeficijent

Z izomera je značajno niži od apsorpcijskog koeficijenta E izomera, što uzrokuje smanjenje učinkovitosti OMC-a kao UV filtera (Hanson i sur., 2016).



Slika 8. Izomerizacija oktil-p-metoksi cinamata iz E izomera u Z izomer (Pattanaargson i sur., 2004).

Kako su i E-OMC i Z-OMC fluorescentne molekule, fotoizomerizacija se može pratiti uz pomoć molekularne fluorescencije. Kao što se vidi sa slike 9., ispitivanje je pokazalo veći stupanj izomerizacije za OMC u vodenoj otopini nego za OMC uklopljen u mikroemulzije s eteričnim uljem bosiljka. Ispitivanje ukazuje da uklapanje u takav sustav smanjuje stupanj fotoizomerizacije OMC-a induciran UVB zračenjem (Volpe i sur., 2018).



Slika 9. Prikaz fotoizomerizacije oktil-p-metoksi cinamata (OMC); isprekidana linija odgovara profilu fotoizomeracije OMC-a u vodenom mediju; puna linija odgovara profilu fotoizomeracije OMC-a uklopljenog u mikroemulzije s eteričnim uljem bosiljka (Volpe i sur., 2018).

Također, prethodno opisanom *in vitro* metodom, procijenjen je zaštitni faktor takve formulacije, te je zaključeno kako je on optimalan za ovu vrstu formulacije (Volpe i sur., 2018).

Mikroemulzije tipa ulje u vodi s eteričnim uljem bosiljka predstavljaju djelotvoran nosač za OMC kao kemijski UV filter. Sustav je priređen od prihvatljivih, dostupnih i biokompatibilnih materijala za topikalnu upotrebu. Uklapanjem eteričnog ulja bosiljka u sustav postignuta su protuupalna i repelentna svojstva. Dobiven je sustav jedinstvenih svojstava koji bi u isto vrijeme štitio od Sunca, djelovao blagotvorno na prethodno nastalu upalu kože zbog izlaganja Suncu te imao i repelentno djelovanje, posebno na komarce, što bi dalo dodatnu vrijednost konačnom kozmetičkom proizvodu (Volpe i sur., 2018).

4.2.2. Primjer 2

Lv i suradnici istraživali su potencijal mikroemulzija temeljenih na eteričnim uljima kako bi poboljšali topljivost, pH stabilnost, fotostabilnost i kožnu permeaciju kvercetina (Lv i sur., 2017).

Kvercetin je flavonoidni spoj koji se smatra jednim od najjačih prirodnih antioksidansa. *In vitro* i *in vivo* eksperimentima demonstrirano je kako kvercetin štiti keratinocite od egzogenih oksidirajućih sredstava, hvata slobodne radikale i inhibira lipidnu peroksidaciju nakon izlaganja UV zračenju. Pored navedenih, pokazuje protuupalne, antibakterijske, antiviralne, antikancerogene učinke, ima pozitivno djelovanje na cijeljenje rana te posjeduje *anti-ageing* učinke na keratinocite. Dakle, topikalna primjena kvercetina ima mnoge pozitivne učinke na kožu (Hatahet i sur., 2016). Međutim, terapijski učinci kvercetina su ograničeni zbog njegove slabe topljivosti u vodi, slabog prodiranja u kožu i njegove nestabilnosti s obzirom na svijetlost, alkalne uvijete i tempertauru. Takva se ograničenja mogu nadvladati uklapanjem kvercetina u prikladne nosače kao što su mikroemulzije (Lv i sur., 2017).

S obzirom na poznata svojstva eteričnih ulja kao promotora apsorpcije, pretpostavljeno je kako će se uklapanjem u mikroemulzije temeljene na eteričnim uljima poboljšati stabilnost, topljivost i permeacija kvercetina u kožu, dok će u isto vrijeme eterična ulja zadržati svoja pozitivna biološka svojstva i zajedno s kvercetinom sinergistički djelovati na zaštitu kože. Korištena eterična ulja bila su eterična ulja paprene metvice (*Mentha × piperita*), klinčića (*Syzygium aromaticum*) i ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) (Lv i sur., 2017).

Mikroemulzije su pripremljene tako da su surfaktant i kosurfaktant, Cremophor EL i 1,2-propandiol, pomiješani u omjeru 2:1 i miješani na sobnoj temperaturi 1 sat. Zatim je u smjesu surfaktanata dodano eterično ulje, tako da surfaktanti s eteričnim uljem čine omjer 7:3, te je u ovakvu smjesu dodan kvercetin. Pripravak je miješan 2 sata kako bi se dobio samoemulgirajući sustav. Mikroemulzije tipa ulje u vodi dobivene su dodavanjem 1 g samoemulgirajućeg sustava u 19 mL deionizirane vode. Tako pripremljene mikroemulzije sadrže 47% Cremophora EL, 23% 1,2-propandiola i 30% eteričnog ulja (Lv i sur., 2017).

Dobivene mikroemulzije su karakterizirane, a rezultati su prikazani u tablici 4. Mikroemulzije s eteričnim uljem klinčića (ME2) pokazale su značajno manji indeks polidisperznosti i zeta potencijal (Lv i sur., 2017).

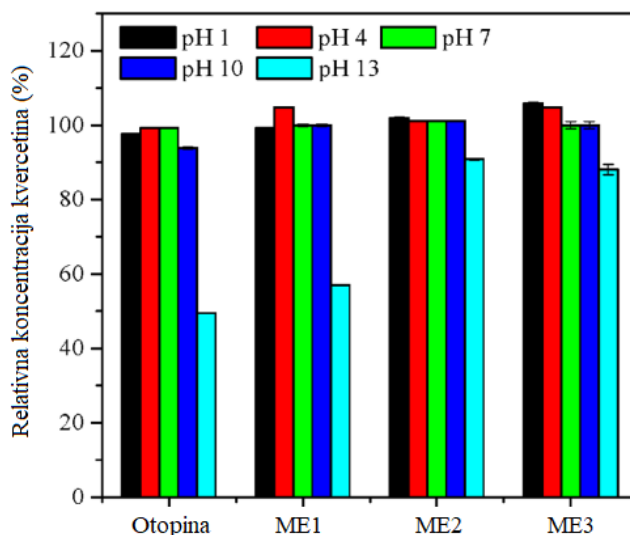
Tablica 4. Vrijednosti veličine čestica (PS), indeksa polidisperznosti (PDI) i zeta potencijala (Z) mikroemulzija temeljenih na eteričnim uljima metvice (ME1), klinčića (ME2) i ružmarina (ME3) (Lv i sur., 2017).

	ME1	ME2	ME3
PS (nm)	12,66±0,54	9,74±0,04	11,61±0,08
PDI	0,265±0,041	0,077±0,008	0,385±0,01
Z (mV)	-4,35±0,25	-0,992±0,05	-4,05±0,14

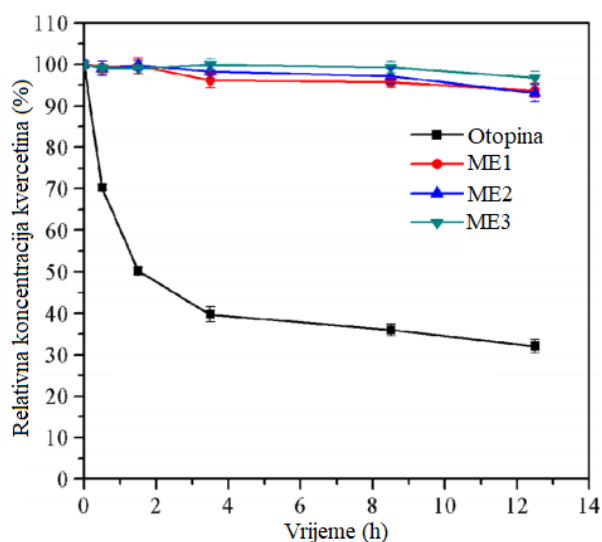
Topljivost kvercetina u vodi iznosi samo 0,013 mg/mL. U istraživanju je utvrđeno kako je topljivost kvercetina bolja u svim komponentama mikroemulzija, te je značajno poboljšana u smjesi surfaktanata s eteričnim uljima u koju je kvercetin dodavan kod pripreme mikroemulzija. Tako je, na primjer, utvrđeno kako je topljivost kvercetina u odnosu na ostala eterična ulja najbolja u eteričnom ulju metvice i iznosi 15,73 mg/mL, dok je topljivost u smjesi surfaktanata i eteričnog ulja metvice iznosila 20,81 mg/mL (Lv i sur., 2017).

S obzirom na poznatu kemijsku nestabilnost kvercetina, čak i u blago bazičnim uvjetima, provedena su ispitivanja stabilnosti pri različitim uvjetima pH. Kako bi se utvrdila stabilnost pripremljenih mikroemulzija u različitim uvjetima pH, mjerene su veličine čestica mikroemulzija u različitim otopinama s rasponom pH vrijednosti između 1 i 13. Promjena veličine s porastom pH bila je zanemariva, te je zaključeno kako su mikroemulzije temeljene na eteričnim uljima stabilne u širokom rasponu pH vrijednosti. Također, utvrđena je i stabilnost kvercetina uklopljenog u mikroemulzije u usporedbi s kvercetinom u vodenoj otopini, s obzirom na promjenu pH. Kao što se vidi iz slike 10., kvercetin je bio stabilan u kiselim i neutralnim uvjetima, međutim dio se razgradio u alkalnim uvjetima. Ipak, pokazalo

se kako mikroemulzije donekle štite kvercetin od razgradnje u alkalnim uvjetima. Utvrđeno je kako mikroemulzije temeljene na eteričnim uljima klinčića (ME2) i ružmarina (ME3) imaju bolji zaštitni učinak od mikroemulzija temeljenih na eteričnom ulju metvice (ME1) (Lv i sur., 2017).



Slika 10. Stabilnost kvercetina pri različitim pH u vodenoj otopini i mikroemulzijama temeljenima na eteričnim uljima metvice (ME1), klinčića (ME2) i ružmarina (ME3) (Lv i sur., 2017).

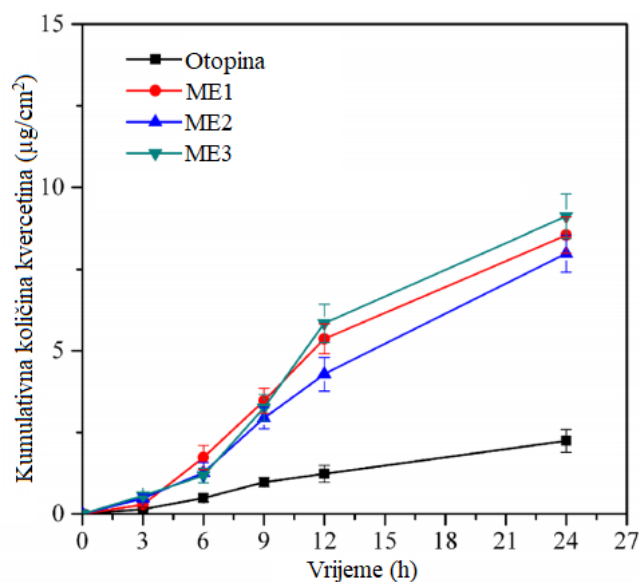


Slika 11. Fotostabilnost kvercetina u vodenoj otopini i mikroemulzijama temeljenima na eteričnim uljima metvice (ME1), klinčića (ME2) i ružmarina (ME3) (Lv i sur., 2017).

Također, kvercetin je podložan razgradnji izlaganjem UV zračenju, stoga je provedeno ispitivanje fotostabilnosti kvercetina uklopljenog u mikroemulzije. Pokazalo se kako se kvercetin u vodenoj otopini pod utjecajem UV zračenja vrlo brzo razgrađuje. Naime, nakon

12,5 sati izlaganja gotovo dvije trećine kvercetina su razgrađene (Slika 11.). Naprotiv, kvercetin uklopljen u mikroemulzije temeljene na eteričnim uljima pokazao je mnogo veću stabilnost jer je i nakon dugotrajnog izlaganja UV zračenju u sva tri sustava ostalo više od 93% od početne količine kvercetina. Među tri vrste mikroemulzija nije bilo značajne razlike i sve su pokazale kako dobro štite kvercetin, te je zaključeno kako prisutnost eteričnog ulja ima važnu ulogu u zaštiti kvercetina od razgradnje (Lv i sur., 2017).

In vitro ispitivanja dermalne permeacije provedena su uz pomoć Franzove difuzijske ćelije, uspoređujući permeaciju kvercetina iz vodene otopine s onom iz mikroemulzija. Kao što je vidljivo iz slike 12., količina permeiranog kvercetina postupno se povećavala s vremenom. Kumulativna količina permeiranog kvercetina iz vodene otopine dosegla je $2,54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, dok je iz mikroemulzija iznosila višestruko više; $8,54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ za mikroemulzije eteričnog ulja metvice, $7,98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ za mikroemulzije eteričnog ulja klinčića te $9,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ za mikroemulzije eteričnog ulja ružmarina. Utvrđeno je kako mikroemulzije temeljene na eteričnim uljima značajno poboljšavaju kožnu permeaciju kvercetina koja je 2,5 do 3 puta veća od one iz vodene otopine. Poboljšanje permeacije pripisano je kombiniranom učinku surfaktanata i eteričnog ulja (Lv i sur., 2017).



Slika 12. *In vitro* profili permeacije kvercetina iz vodene otopine i mikroemulzija temeljenih na eteričnim uljima metvice (ME1), klinčića (ME2) i ružmarina (ME3) (Lv i sur., 2017).

Autori su dokazali kako uklapanje kvercetina u mikroemulzije temeljene na eteričnim uljima znatno poboljšava topljivost, stabilnost, kao i dermalnu permeaciju kvercetina, što je

izrazito korisno pri topikalnoj primjeni kvercetina. S obzirom na iskazana svojstva te poznata pozitivna biološka svojstva uklopljenih eteričnih ulja, takav sustav ima potencijal za daljnje istraživanje i razvoj (Lv i sur., 2017).

4.2.3. Primjer 3

Isti autori proveli su slično istraživanje u kojemu su istraživali utjecaj uklapanja *trans*-resveratrola u mikroemulzije temeljene na različitim eteričnim uljima na njegovu topljivost, fotostabilnost te antioksidacijsko i fotoprotektivno djelovanje. Također, ispitali su potencijal poboljšanja permeacije *trans*-resveratrola iz mikroemulzija temeljenih na eteričnim uljima (Lv i sur., 2018).

Trans-resveratrol je prirodni polifenolni spoj s dobro dokumentiranim antioksidacijskim i protuupalnim svojstvima. Osim što štiti kožu od oksidacijskog stresa uzrokovanog UV zračenjem, može djelovati pozitivno i kod ostalih blažih kožnih upala. U upotrebi je u kozmetičkim proizvodima jer je dokazano kako popravlja izgled naborane, suhe i oštećene kože te poboljšava njezinu elastičnost i fleksibilnost (Baxter, 2008). Međutim, postoje problemi pri topikalnoj primjeni *trans*-resveratrola. Zbog njegove izrazito slabe topljivosti u vodi, ograničena je njegova permeacija u kožu. Nadalje, *trans*-resveratrol je podložan izomerizaciji i razgradnji pod utjecajem svjetlosti. Razvijeno je nekoliko sustava za dermalnu dostavu *trans*-resveratrola, uključujući gelove, liposome i nanočestice kako bi se poboljšala permeacijska svojstva i stabilnost *trans*-resveratrola. Čest problem kod razvoja takvih formulacija bilo je slabo uklapanje *trans*-resveratrola, pa je pretpostavljeno kako bi sustav s mikroemulzijama temeljenima na eteričnom ulju mogao biti pogodniji od dosad istraživanih formulacija (Lv i sur., 2018).

Za pripremu mikroemulzija odabrana su eterična ulja ruže, jasmina i limuna. Pretpostavljeno je kako će se zbog dobre topljivosti *trans*-resveratrola u eteričnim uljima, poboljšati njegovo uklapanje u formulaciju. Također, autori su smatrali kako će iz ovakvog sustava biti poboljšana permeacija *trans*-resveratrola u kožu zbog poznatih svojstava eteričnih ulja kao promotora apsorpcije (Lv i sur., 2018).

Kako bi se usporedio utjecaj različitih eteričnih ulja na topljivost i stabilnost *trans*-resveratrola, pripremljene su mikroemulzije s istim komponentama i sličnim karakteristikama. Kao i u prethodnom istraživanju, za pripremu mikroemulzija odabrani su surfaktanti Cremophor EL i 1,2-propandiol u omjeru 2:1. U smjesu surfaktanata dodavana su eterična

ulja i *trans*-resveratrol te je smjesa miješana 2 sata na magnetnom mješaču kako bi se dobio samoemulgirajući sustav. Mikroemulzije tipa ulje u vodi izrađene su dodavanjem 1 g samoemulgirajućeg sustava u 19 g deionizirane vode. Mikroemulzije se sastoje od 47% Cremophora EL, 23% 1,2-propandiola i 30% eteričnog ulja (Lv i sur., 2018).

Mikroemulzije su karakterizirane, te je utvrđeno kako su sve tri vrste mikroemulzija sličnih veličina čestica. Pokazalo se kako mikroemulzije s eteričnim uljem jasmína (MO2) imaju manji indeks polidisperznosti, odnosno da su homogenije od ostalih formulacija. Također, imale su i nešto niži zeta potencijal od ostalih mikroemulzija (Tablica 5.) (Lv i sur., 2018).

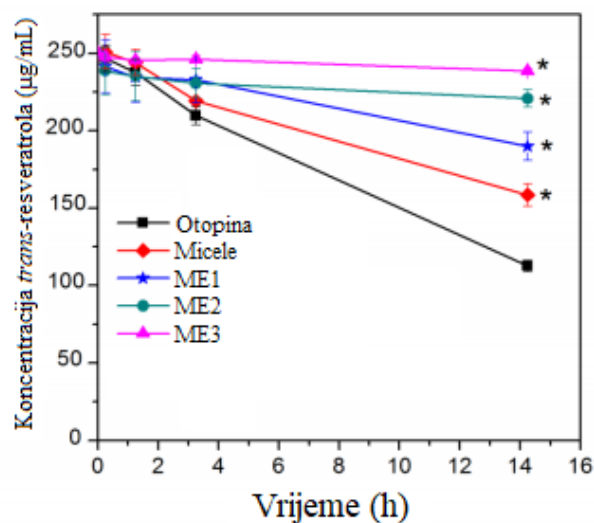
Tablica 5. Vrijednosti veličine čestica (PS), indeksa polidisperznosti (PDI) i zeta potencijala (Z) za dobivene mikroemulzije temeljene na eteričnim uljima ruže (ME1), jasmína (ME2) i limuna (ME3) (Lv i sur., 2018).

	ME1	ME2	ME3
PS (nm)	10,2±0,03	11,33±0,02	9,52±0,02
PDI	0,152±0,031	0,065±0,011	0,244±0,009
Z (mV)	-5,68±0,15	-2,62±0,09	-4,98±0,12

Topljivost *trans*-resveratrola u vodi izrazito je slaba i iznosi 0,0126 mg/mL. Topljivost u eteričnim uljima je mnogostruko bolja, te se pokazalo kako je *trans*-resveratrol najbolje topljiv u eteričnom ulju jasmína, 30,82 mg/mL. Topljivost u eteričnom ulju limuna prilično je slabija i iznosi 0,33 mg/mL što je još uvijek 25 puta više od topljivosti u vodi. Najbolju topljivost *trans*-resveratrol očekivano je pokazao u smjesama surfaktanata i eteričnog ulja, gdje je topljivost iznosila između 9 i 27 mg/mL, ovisno o vrsti eteričnog ulja (Lv i sur., 2018).

Kako bi se utvrdili zaštitni učinci mikroemulzija temeljenih na eteričnim uljima, uspoređena je fotostabilnost *trans*-resveratrola uklopljenog u pripremljene mikroemulzije s fotostabilnošću *trans*-resveratrola vodenoj otopini i s fotostabilnošću *trans*-resveratrola uklopljenog u micelle građene od Cremophora EL. Kao što je prikazano na slici 13., nakon izlaganja UV zračenju nešto dulje od 14 sati, koncentracija *trans*-resveratrola u vodenoj otopini smanjila se s 250 µg/mL na 113 µg/mL. U isto vrijeme, razgradnja *trans*-resveratrola uklopljenog u mikroemulzije bila je značajno niža, a najbolji zaštitni učinak pokazale se mikroemulzije temeljene na eteričnom ulju limuna gdje je preostalo 239 µg/mL nerazgrađenog *trans*-resveratrola. Iako su i micelle građene od Cremophora EL pokazale određeni zaštitni učinak, može se nedvojbeno utvrditi kako prisutnost eteričnih ulja u

formulaciji igra važnu ulogu u smanjenju razgradnje i izomerizacije *trans*-resveratrola pod utjecajem UV zračenja (Lv i sur., 2018).

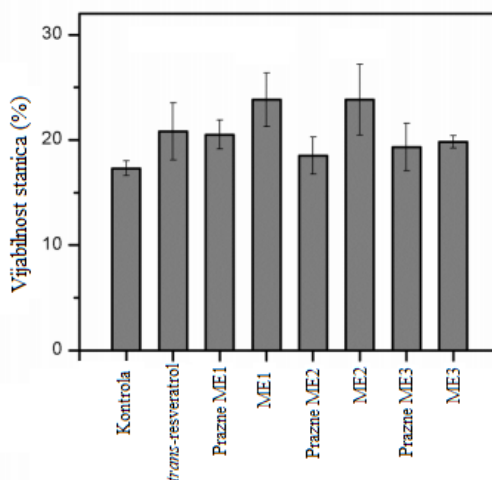


Slika 13. Fotostabilnost *trans*-resveratrola nakon izlaganja UV zračenju, u vodenoj otopini, micelama Cremophora EL i mikroemulzijama temeljenima na eteričnim uljima ruže (ME1), jasmina (ME2) i limuna (ME3) (Lv i sur., 2018).

Uspoređene su antioksidacijske aktivnosti *trans*-resveratrola, praznih mikroemulzija temeljenih na eteričnom ulju i mikroemulzija temeljenih na eteričnom ulju s uklopljenim *trans*-resveratrolom. Antioksidacijska aktivnost ispitana je testiranjem hvatanja slobodnih radikala (eng. *radical scavenging*) uz pomoć molekule DPPH (Lv i sur., 2018). Standardizirani test uključuje otopinu s poznatom količinom molekule DPPH (slobodnog radikala) u koju se dodaje ispitivana formulacija. Smanjenje koncentracije molekule DPPH može se pratiti mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 517 nm, te je u izravnoj korelaciji s antioksidacijskim kapacitetom testirane formulacije (Mishra i sur., 2012). Utvrđeno je kako prazne mikroemulzije temeljene na eteričnim uljima ruže i jasmina pokazuju visok potencijal inaktivacije slobodnih radikala, čak i veću od samog *trans*-resveratrola. Naprotiv, mikroemulzija temeljena na eteričnom ulju limuna pokazala je značajno manju sposobnost inaktivacije slobodnih radikala. Takav se učinak pripisuje prirodnoj antioksidacijskoj aktivnosti eteričnih ulja ruže i jasmina. Najvažnije je istaknuti kako su mikroemulzije temeljene na eteričnim uljima s uklopljenim *trans*-resveratrolom pokazale značajno višu antioksidacijsku aktivnost i od samog *trans*-resveratrola i od praznih mikroemulzija temeljenih na eteričnim uljima (Lv i sur., 2018).

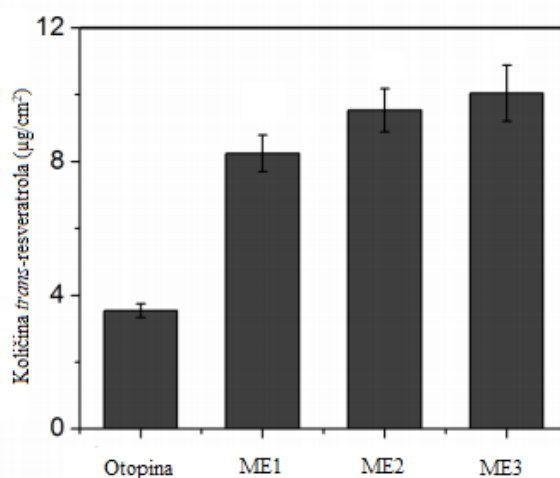
Ispitivanjem na kulturi stanica utvrđen je fotoprotektivni učinak pripremljenih formulacija u usporedbi s praznim mikroemulzijama i samim *trans* resveratrolom (Slika 14.).

Najbolji fotoprotektivni učinak imaju mikroemulzije s eteričnim uljima ruže (ME1) i jasmina (ME2) i uklopljenim *trans*-resveratrolom, dok su mikroemulzije temeljene na eteričnom ulju limuna (ME3) pokazale slabiji fotoprotektivni učinak (Lv i sur., 2018).



Slika 14. Fotoprotektivni učinak mikroemulzija temeljenih na eteričnim uljima ruže (ME1), jasmina (ME2) i limuna (ME3) sa i bez uklopljenog *trans*-resveratrola (Lv i sur., 2018).

Franzovom difuzijskom ćelijom, s mišjom kožom kao modelom, provedeno je *in vitro* ispitivanje permeacije *trans*-resveratrola te je uspoređena permeacija iz vodene otopine s onom iz pripremljenih mikroemulzija (Slika 15.). Pokazalo se kako je kumulativna količina *trans*-resveratrola koji je permeirao iz mikroemulzija 2.3 do 2.8 puta veća od permeiranog *trans*-resveratrola iz vodene otopine. Nedvojbeno je utvrđeno kako su mikroemulzije temeljene na eteričnim uljima poboljšale permeaciju *trans*-resveratrola (Lv i sur., 2018).



Slika 15. *In vitro* permeacija *trans*-resveratrola iz vodene otopine i pripremljenih mikroemulzija temeljenih na eteričnim uljima ruže (ME1), jasmina (ME2) i limuna (ME3) (Lv i sur., 2018).

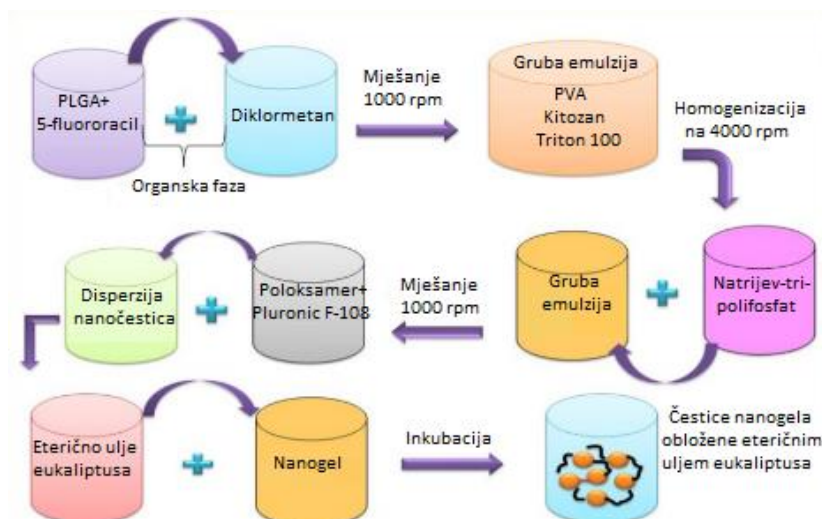
Izrađeni su *in vitro* profili oslobađanja, te je utvrđeno kako se *trans*-resveratrol najbrže oslobađa iz mikroemulzija temeljenih na eteričnom ulju limuna, što se pripisalo njegovoj nešto slabijoj topljivosti u eteričnom ulju limuna u usporedbi s topljivosti u eteričnom ulju ruže i jasmína. Također, na kulturi stanica utvrđena je citotoksičnost pripremljenih mikroemulzija. Pokazalo se kako je citotoksičnost moguća u izrazito velikim koncentracijama, te je utvrđena neškodljiva koncentracija od 125 µg/mL koja će biti korištena u daljnim istraživanjima (Lv i sur., 2018).

Istraživanjem je dokazano kako uklapanje *trans*-resveratrola u mikroemulzije temeljene na eteričnim uljima, osim što povećava njegovu stabilnost i dermalnu permeaciju, poboljšava njegova terapijska svojstva poboljšavanjem antioksidacijskog i fotoprotektivnog učinka. S obzirom na iskazana svojstva, sustav ima potencijal za daljnje istraživanje i razvijanje formulacije za topikalnu primjenu *trans*-resveratrola (Lv i sur., 2018).

4.3. Nanogelovi s uklopljenim eteričnim uljima i djelatnim tvarima

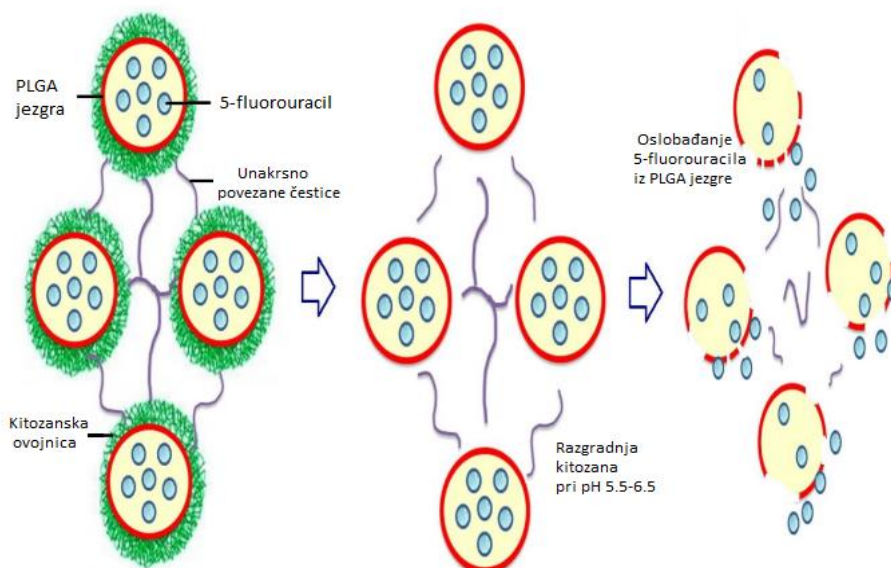
Biorazgradivi polimerni nanogelovi obloženi pojačivačima penetracije i s uklopljenim citotoksičnim lijekovima, primjenjeni topikalno, predstavljaju obećavajuću strategiju u liječenju karcinoma kože. Sahu i suradnici istražili su kemoterapijski potencijal nanogela izgrađenog od PLGA i kitozana s uklopljenim 5-fluorouracilom te obloženog eteričnim uljem eukaliptusa kao promotora penetracije (Sahu i sur., 2017).

Eterično ulje eukaliptusa bogato je seskviterpenima, te su prethodna istraživanja pokazala njegov utjecaj na poboljšanu apsorpciju i raspodjelu 5-fluorouracila. Također, prethodno je utvrđeno kako eterično ulje eukaliptusa u malim koncentracijama značajno poboljšava penetracijska svojstva nanoformulacija. Glavni nedostatak promotora apsorpcije je što se povezuju s iritacijom kože i nastankom edema (Pathan i Setty, 2009). Pretpostavljeno je kako će primjena male količine eteričnog ulja eukaliptusa poboljšati potencijal penetracije polimernih čestica nanogela s uklopljenim 5-fluorouracilom, uz istovremeno izbjegavanje lokalne iritacije i pojave edema (Sahu i sur., 2017).



Slika 16. Shematski prikaz priprave čestica nanogela s dvostrukom ovojnicom od PLGA i kitozana obloženog eteričnim uljem eukaliptusa i uklopljenim 5-fluorouracilom (Sahu i sur., 2017).

5-fluorouracil je zarobljen unutar PLGA jezgre koja je zatim obložena kitozonom, koji ima kationska svojstva, kako bi došlo do ionskih interakcija čestica i anionske površine membrane stanica karcinoma. Zatim je površina obložena eteričnim uljem eukaliptusa u koncentraciji 1% za poboljšanje penetracije čestica u *stratum corneum* (Sahu i sur., 2017).

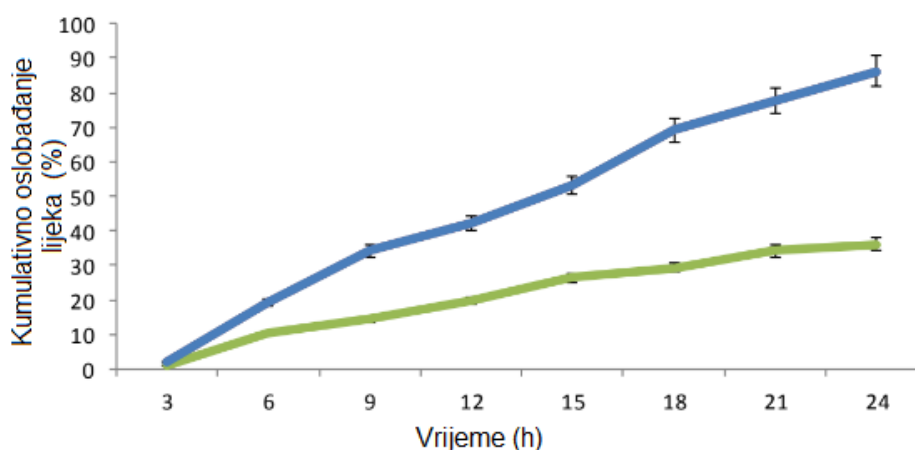


Slika 17. Prikaz mehanizma djelovanja sustava (Sahu i sur., 2017).

Ispitivanjima zeta potencijala utvrđene su vrijednosti +46,10 mV za čestice nanogela i +48,25 za čestice nanogela s uklopljenim 5-fluorouracilom. Pozitivna vrijednost zeta

potencijala otkriva kationsku prirodu čestica i dobru stabilnost, s obzirom na vrijednosti zeta potencijala unutar raspona 40-60 mV koji je granica za stabilne disperije nanoformulacija. Tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*; DLS) utvrđeno je kako je veličina čestica između 190 nm i 220 nm, što je idealna veličina za prolaz kožne barijere. Uklapanje 5-fluorouracila u formulaciju iznosilo je oko 40% što je proglašeno zadovoljavajućim (Sahu i sur., 2017).

Ispitivanje penetracije formulacije provedeno je korištenjem Franzove difuzijske ćelije sa svinjskom kožom između donorskog i akceptorskog odjeljka. Dobiveni su i uspoređeni profili penetracije 5-fluorouracila uklopljenog u istraživanu formulaciju i 5-fluorouracila iz vodene otopine. Utvrđeno je kako je iz formulacije nanogela, unutar 24 sata, oslobođeno 75-80% 5-fluorouracila u usporedbi s otopinom iz koje je oslobođeno 35% 5-fluorouracila. Takav profil pokazuje značajnu *ex vivo* učinkovitost penetracije nanogela obloženog eteričnim uljem eukaliptusa i uklopljenim 5-fluorouracilom (Sahu i sur., 2017).



Slika 18. Kumulativno oslobađanje 5-fluorouracila iz ispitivane formulacije (plavo) i iz otopine 5-fluorouracila (zeleno) (Sahu i sur., 2017).

Stvoren je novi sustav u obliku nanogela obloženog eteričnim uljem eukaliptusa za transdermalnu dostavu 5-fluorouracila. Autori su raznim *in vitro* i *ex vivo* nalazima, koristeći kožu svinje, utvrdili mnoge prednosti takvog sustava u terapiji karcinoma kože, te postoji potencijal za daljnja istraživanja čestica nanogela s dvostrukom ovojnicom od PLGA i kitozana obloženog s eteričnim uljem eukaliptusa i uklopljenim 5-fluorouracilom (Sahu i sur., 2017).

4.4. Nanočestice s uklopljenim eteričnim uljima i djelatnim tvarima

4.4.1. Primjer 1

Kamel i suradnici dizajnirali su lipidne nanočestice s diosminom i različitim eteričnim uljima kao osnovu kozmetičkih proizvoda s fotoprotektivnim djelovanjem i pozitivnim učinkom na starenje kože, tzv. *anti-ageing* učinkom. Cilj je bio utvrditi mogu li neka eterična ulja poboljšati djelovanje diosmina (Kamel i sur., 2017).

Diosmin je prirodni flavonoidni glikozid koji se zbog svog vazoprotektivnog djelovanja koristi u liječenju varikoznih vena i hemeroida. Diosmin posjeduje nekoliko različitih mehanizama djelovanja zbog kojih se koristi i u kozmetičkim proizvodima ostvarujući fotoprotektivne i *anti-ageing* učinke na kožu. Takvi mehanizmi uključuju protuupalno djelovanje kroz smanjenje kapilarne cirkulacije, smanjenje kapilarne permeabilnosti, pojačani limfni protok, inhibiciju nekih medijatora upale i druge. Također, posjeduje antimitotična svojstva i reagira sa slobodnim radikalima. Međutim, vrlo je slabo topljiv u vodi što predstavlja prepreku u njegovoj primjeni (Manthey, 2000).

Istraživanje je imalo za cilj razviti kozmetički proizvod koji sadrži lipidne nanočestice kao nosač za diosmin u kombinaciji s različitim eteričnim uljima s profilaktičkim i kurativnim djelovanjem protiv okolišnih čimbenika s utjecajem na kožu. Naime, uklapanjem u lipidne nanočestice poboljšana je dostava diosmina, a prethodno je utvrđeno kako lipidne nanočestice same po sebi imaju svojstvo zaštite od Sunca. Pretpostavljeno je kako će eterična ulja zbog svojih protuupalnih, antioksidacijskih, antimikrobnih i ostalih svojstava poboljšati željeni učinak diosmina na kožu. Istraživana eterična ulja su: eterično ulje ružmarina (*Rosmarinus officinalis*), eterično ulje đumbira (*Zingiber officinale*) i eterično ulje sjemenki grožđa (*Vitis vinifera*). Pripremljene lipidne nanočestice su karakterizirane, ispitana je njihova stabilnost te je *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima ispitano djelovanje nanočestica s uklopljenim diosminom i eteričnim uljima u usporedbi s lipidnim nanočesticama s uklopljenim diosminom, ali bez eteričnog ulja (Kamel i sur., 2017).

Lipidne nanočestice pripremljene su tako što su lipidne komponente otopljene i zagrijane na temperaturu između 60 i 70°C. Vodena je faza zatim zagrijana na istu temperaturu i dodana uljnoj fazi. Dobivena emulzija podvrgnuta je sonikaciji pri 20 W 90 s. Kod pripreme lipidnih nanočestica bez eteričnog ulja, umjesto eteričnog ulja dodana je ista količina tekućeg parafina. U sve 4 vrste lipidnih nanočestica uklopljen je diosmin u koncentraciji 2% (*m/m*) (Kamel i sur., 2017).

Tablica 6. Sastav pripremljenih lipidnih nanočestica (Kamel i sur., 2017).

Sirovina	Masa (mg)
Apifil® GC	90
Bijeli parafin	150
Ulje*	100
Metanol	60
Propilen glikol	100
Tween 80®	100
Destilirana voda	400
*LN1 – tekući parafin LN2 – eterično ulje ružmarina LN3 – eterično ulje đumbira LN4 – eterično ulje sjemenki grožđa	

Sva 4 tipa lipidnih nanočestica imala su veličinu čestica između 121,1 i 144,3 nm. Iako su u svaku formulaciju uklopljena druga eterična ulja, nije bilo značajne razlike u veličini čestica. Prednost tako malih čestica je što, zbog svoje adhezivnosti, stvaraju okluzivni sloj na koži koji ima učinak vlaženja zbog sprečavanja transepidermalnog gubitka vode (Kamel i sur., 2017).

Mjerenjem indeksa polidisperznosti utvrđena je uniformnost veličina čestica za svaku pojedinu formulaciju. Naime, raspodjela veličina iznosila je između 0,229 i 0,253, a vrijednosti manje od 0,3 odražavaju homogenost veličina čestica. Zeta potencijali sve 4 vrste čestica su oko -30 mV. Takva vrijednost ukazuje na zadovoljavajuću stabilnost čestica zbog inhibicije njihove agregacije koja je posljedica elektrostatske repulzije (Kamel i sur., 2017).

Tablica 7. Vrijednosti veličine čestica (PS), indeksa polidisperznosti (PDI) i zeta potencijala (Z) za dobivene lipidne nanočestice (Kamel i sur., 2017).

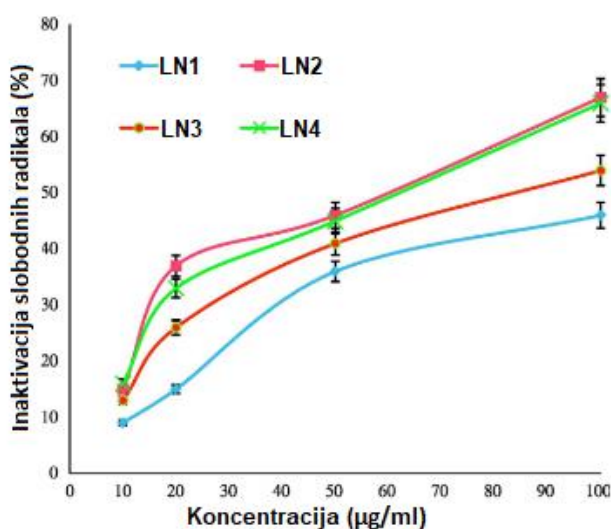
	LN1	LN2	LN3	LN4
PS (nm)	144,3±12,32	121,1±6,95	121,6±9,23	123,3±8,65
PDI	0,240±0,03	0,229±0,04	0,253±0,02	0,252±0,02
Z (mV)	-29,0±1,05	-31,9±2,08	-28,1±0,98	-31,9±1,08

Uklapanje diosmina u pripremljene nanočestice bilo je gotovo potpuno što potvrđuje kako je odabrani tip nosača pogodan za istraživanu djelatnu tvar. Nije bilo značajne razlike u uklapanju diosmina između lipidnih nanočestica s različitim vrstama eteričnog ulja (Kamel i sur., 2017).

Nakon godine dana skladištenja, formulirane nanočestice zadržale su svoj integritet te nije bilo nikakvih promjena konzistencije i boje. Također, nije bilo nikakve značajne promjene veličina čestica nakon skladištenja. Vrijednosti raspodjele veličina čestica i zeta

potencijala i dalje su ostali unutar željenog raspona. Takvi su nalazi potvrdili zadovoljavajuću stabilnost razvijenih lipidnih nanočestica (Kamel i sur., 2017).

Antioksidacijska aktivnost pripremljenih nanočestica ispitana je testiranjem hvatanja slobodnih radikala (eng. *radical scavenging*) uz pomoć prethodno opisane metode s molekulom DPPH. Kao što je prikazano na slici 19., formulacija lipidnih nanočestica bez uklopljenog eteričnog ulja (LN1) pokazala je najmanju inaktivaciju slobodnih radikala. Dakle, pokazano je kako eterična ulja poboljšavaju antioksidacijsku aktivnost formulacije s diosminom. Također, lipidne nanočestice s eteričnim uljem ružmarina (LN2) i eteričnim uljem sjemenki grožđa (LN4) pokazale su nešto veću antioksidacijsku aktivnost od lipidnih nanočestica s eteričnim uljem đumbira (LN3) (Kamel i sur., 2017).



Slika 19. Antioksidacijska aktivnost izrađenih formulacija (Kamel i sur., 2017).

Izmjeren je UV apsorpcijski spektar pripremljenih lipidnih nanočestica za raspon valnih duljina između 290 i 400nm. UV apsorpcijski spektar odražava potencijal pojedinih formulacija da blokiraju UV zračenje. Izračunata je površina ispod krivulje (AUC) koja je u izravnoj korelaciji s potencijalom blokiranja UV zračenja. Kao što se vidi iz tablice 8., lipidne nanočestice s diosminom bez uklopljenog eteričnog ulja imaju uvjerljivo najmanju vrijednost AUC, što pokazuje kako je dodatak eteričnog ulja poboljšao učinak zaštite od Sunca. Pretpostavlja se kako je do ovog učinka došlo jer kombinacija različitih organskih spojeva (diosmin i spojevi u sastavu eteričnih ulja) povećava apsorpcijski potencijal formulacije. Također, izračunat je zaštitni faktor (SPF) koji je u korelaciji s apsorpcijskim spektrom. Najmanji SPF imaju lipidne nanočestice bez eteričnog ulja (Tablica 8.), što znači kako je zaštitni faktor formulacije povećan dodatkom eteričnog ulja. Razlike u izmjerenim vrijednostima između triju formulacija s uklopljenim eteričnim uljima objašnjavaju se

različitim sastavom eteričnih ulja. Najbolji učinak zaštite od Sunca pokazale su lipidne nanočestice s diosminom i eteričnim uljem đumbira (LN3) (Kamel i sur., 2017).

Tablica 8. Izmjereni učinak zaštite od Sunca dobivenih formulacija (Kamel i sur., 2017).

	AUC UV apsorpcijskog spektra	SPF
LN1	204,65	3,75
LN2	264,25	5,14
LN3	351,48	8,14
LN4	334,05	7,34

In vivo studija provedena je na odraslim albino miševima. Dorzalna strana miševa je obrijana te su miševi podjeljeni u šest skupina. Četiri skupine miševa tretirane su izrađenim formulacijama. Na životinje su svaki dan, 1 sat prije izlaganja Suncu, primjenjene formulacije te su životinje izložene izravnom Sunčevom zračenju u trajanju od 2 sata. Peta skupina miševa nije tretirana niti jednom formulacijom, ali je izložena Sunčevoj svjetlosti, te je služila kao pozitivna kontrola. Šesta skupina nije izložena Sunčevoj svjetlosti, te je služila kao negativna kontrola. Koža albino miševa svaki je dan vizualno pregledavana te je stvaranje eritema i bora ocjenjeno od 0 do 3, kao što je prikazano u tablici 9. (Kamel i sur., 2017).

Tablica 9. Sustav procjene kožnih reakcija nakon izlaganja Suncu (Kamel i sur., 2017).

Pojava crvenila	Nema	0
	Ujednačeno crvenilo pravilnih granica	1
	Jako crvenilo s blagim edemom na dodir	2
	Jako crvenilo s izraženim edemom izdignutim iznad ravnine kože	3
Pojava bora	Nema	0
	Pojava plitkih grubih bora	1
	Nekoliko grubih bora	2
	Pojava dubokih bora	3

Tako dizajniran eksperiment poslužio je za ispitivanje zaštitnog utjecaja lipidnih nanočestica s diosminom i eteričnim uljem na kožu izloženu Sunčevom zračenju (eng. *photo-ageing*). Rezultati su prikazani u tablici 10. Prvog dana nije bilo nikakvih vidljivih promjena na koži, osim kod pozitivne kontrole na kojoj su od početka bile vidljive negativne posljedice izloženosti Sunčevom zračenju. Nakon tri dana znakovi fototoksičnosti pojavljuju se kod svih skupina izloženih Sunčevom zračenju. Kod svih se skupina znakovi fototoksičnosti povećavaju produljenjem perioda izloženosti. Međutim, jasno se vidi kako skupine koje su

tretirane formulacijama lipidnih nanočestica (LN1, 2, 3 i 4) pokazuju manju incidenciju pojave kožnih promjena nego skupina koja predstavlja pozitivnu kontrolu, odnosno koja nije tretirana. Tako je dokazan fotoprotektivni potencijal pripremljenih lipidnih nanočestica s diosminom. Također, lipidne nanočestice bez uklopljenog eteričnog ulja (LN1) pokazuju slabiji protektivni učinak od ostalih lipidnih nanočestica, što pokazuje kako kombinacija eteričnog ulja s diosminom ima pozitivan utjecaj na supresiju fototoksičnih utjecaja. Najbolji zaštitini učinak imala je formulacija lipidnih nanočestica s diosminom i eteričnim uljem ružmarina (LN2). Histopatološkom analizom uzoraka tkiva kože, koji su izuzeti nakon završetka eksperimenta, potvrđeni su ovi nalazi (Kamel i sur., 2017).

Tablica 10. Rezultati eksperimenta; utjecaj izlaganja Suncu na kožu albino miševa (Kamel i sur., 2017).

		Negativna kontrola	Pozitivna kontrola	LN1	LN2	LN3	LN4
1. dan	Eritem	0,00	0,44±0,53	0,00	0,00	0,00	0,00
	Bore	0,00	0,33±0,30	0,00	0,00	0,00	0,00
2. dan	Eritem	0,00	0,67±0,53	0,00	0,00	0,00	0,00
	Bore	0,00	0,56±0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
3. dan	Eritem	0,00	1,44±0,53	0,78±0,44	0,11±0,33	0,44±0,53	0,33±0,11
	Bore	0,00	1,33±0,50	0,67±0,33	0,11±0,33	0,33±0,44	0,22±0,11
4. dan	Eritem	0,00	1,78±0,44	1,00±0,50	0,33±0,50	0,56±0,53	0,67±0,60
	Bore	0,00	1,67±0,50	0,89±0,33	0,22±0,44	0,44±0,33	0,56±0,13
5. dan	Eritem	0,00	1,89±0,33	1,22±0,44	0,44±0,53	0,67±0,50	0,78±0,44
	Bore	0,00	1,78±0,44	1,11±0,33	0,33±0,50	0,56±0,33	0,67±0,50
6. dan	Eritem	0,00	2,11±0,60	1,33±0,50	0,56±0,53	0,78±0,44	0,89±0,33
	Bore	0,00	2,00±0,50	1,22±0,44	0,44±0,53	0,67±0,50	0,78±0,44
7. dan	Eritem	0,00	2,67±0,50	1,56±0,53	0,89±0,30	1,00±0,30	1,11±0,33
	Bore	0,00	2,56±0,53	1,44±0,53	0,78±0,33	0,89±0,33	1,00±0,00

Vrijedno je istaknuti kako su lipidne nanočestice s eteričnim uljem ružmarina (LN2) pokazale najbolji zaštitini utjecaj u *in vivo* istraživanju, iako je njihov izmjereni zaštitni faktor (SPF) u *in vitro* istraživanju bio manji u odnosu na preostale dvije formulacije s eteričnim uljima. To se pripisuje nekim intrinzičnim svojstvima eteričnog ulja ružmarina, prije svega najboljem protuupalnom djelovanju (Kamel i sur., 2017).

Rezultati istraživanja potvrdili su kako uklapanje eteričnih ulja u sustav poboljšava svojstva lipidnih nanočestica s diosminom. Naime, poboljšana su antioksidacijska svojstva, zaštitini faktori formulacija, kao i fotoprotektivna svojstva. S obzirom na utvrđenu stabilnost dobivenih formulacija, one predstavljaju potencijal za daljnja istraživanja i eventualnu kozmetičku primjenu (Kamel i sur., 2017).

4.4.2. Primjer 2

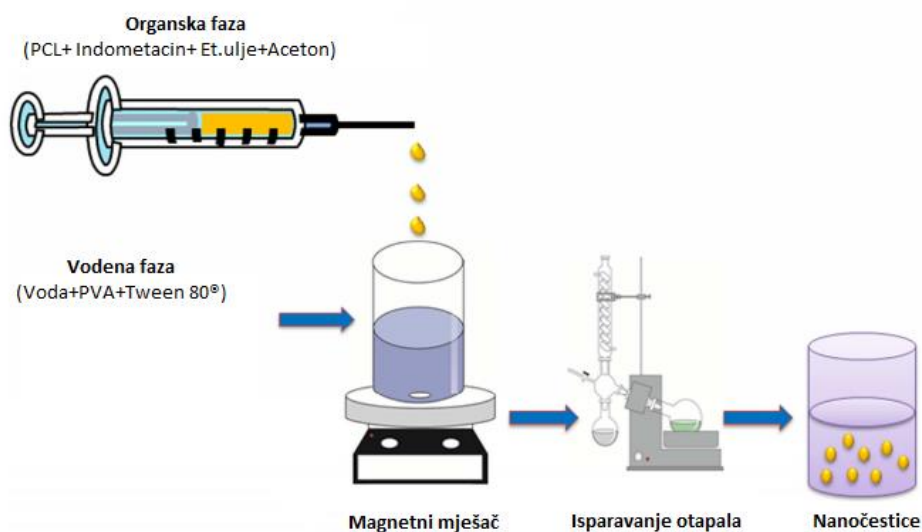
Badri i suradnici razvili su i opisali polimerne nanočestice s uklopljenim eteričnim uljem sjemenki crnog kima (*Nigella sativa*) i indometacinom za topikalnu primjenu. Pretpostavljeno je kako će eterično ulje sjemenki crnog kima povećati protuupalno i analgetsko djelovanje indometacina (Badri i sur., 2018).

Indometacin pripada skupini nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID), te se koristi za terapiju vrućice, boli, otečenosti i ukočenosti. Naime, zbog svojeg snažnog protuupalnog djelovanja indometacin ima zadovoljavajuće učinke kada se primjeni vanjskim putem, odnosno topikalno. Kada je primjenjen oralno, može izazvati nuspojave u probavnom sustavu u obliku gastričkih ulkusa i krvarenja u probavnom sustavu (Sostres i sur., 2010). Još jedna prednost topikalne primjene indometacina je njegova veća djelotvornost u terapiji površinskih ozljeda kada je primjenjen lokalno (Akermark i Forsskahl, 1990). Indometacin je vrlo slabo topljiv u vodi što ga čini idealnim kandidatom za uklapanje u nanočestice (Badri i sur., 2018).

Eterično ulje sjemenki crnog kima (*Nigella sativa*) poznato je u narodnoj medicini u terapiji bolesti i stanja kao što su reumatizam, bronhitis, astma itd. Dobro su opisana protuupalna, analgetska, spazmolitička i antioksidacijska svojstva eteričnog ulja crnog kima (Ahmad i sur, 2013). Najvažnije fitokemijske sastavnice eteričnog ulja sjemenki crnog kima su timokinon, p-cimen, α -pinen, timohidrokinon, linoleinska kiselina i druge. Timokinon je najobilnija komponenta eteričnog ulja sjemenki crnog kima i najodgovornija za njegovo terapijsko djelovanje. Timokinon snažno inhibira produkciju dušikovog oksida (NO), inhibira mnoge medijatore upale kao što su, između ostalih, TNF- α i interleukin 6 te inhibira ciklooksigenazu (COX)-2 (Hossen i sur., 2017).

Prethodno je dobro opisano uklapanje indometacina u nanočestice bazirane na polimeru poli (ϵ -kaprolaktonu). Poli (ϵ -kaprolakton) (PCL) je biokompatibilan i siguran polimer za *in vivo* primjenu (Badri i sur., 2018).

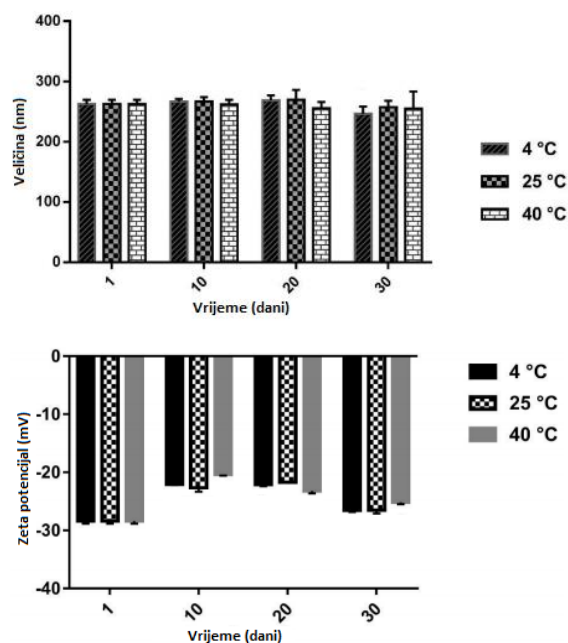
Nanočestice su pripravljene metodom nanoprecipitacije. Organska je faza pripravljena blagim zagrijavanjem 200 mg PCL-a i 25 mL acetona u koje je zatim, miješanjem na magnetnom mješaču, dodano 40 mg indometacina i 300 mg eteričnog ulja sjemenki crnog kima. Vodena faza je pripravljena otapanjem 5 mg polivinil alkohola (PVA) u destiliranoj vodi te je nakon potpunog otapanja dodan Tween-80® u količini od 135 mg. Organska je faza ukapavanjem dodana u vodenu fazu. Na kraju je otparen aceton (Badri i sur., 2018).



Slika 20. Priprema polimernih nanočestica s uklopljenim indometacinom i eteričnim uljem sjemenki crnog kima (Badri i sur., 2018).

Veličina i zeta potencijal dobivenih čestica izmjereni su DLS tehnikom. Veličina nanočestica bila je između 230 i 260 nm. Izmjereni zeta potencijal iznosio je između -20 i -30 mV što pokazuje stabilnost dobivenih nanočestica. Učinkovitost uklapanja indometacina u nanočestice bila je 70 %, dok je učinkovitost uklapanja eteričnog ulja bila 84% (Badri i sur., 2018).

Testiranje stabilnosti formulacije provedeno je skladištenjem 30 dana na različitim temperaturama (4°C, 25°C i 40°C). Svakih 10 dana izvršena su mjerenja veličine čestica i zeta potencijala (Slika 21.). Veličina čestica nije značajno varirala tijekom 30 dana ispitivanja, interval veličina bio je između 250 i 270 nm. Zeta potencijal nešto je više varirao, međutim, vrijednosti su i dalje bile takve, između -30 i -20 mV, da ukazuju na stabilne nanočestice (Badri i sur., 2018).



Slika 21. Rezultati ispitivanja stabilnosti polimernih nanočestica s indometacinom i eteričnim uljem sjemenki crnog kima (Badri i sur., 2018).

Badri i suradnici uspješno su pripremili nanočestice temeljene na poli (ϵ -kaprolaktonu) u koje je uklopljen indometacin i eterično ulje sjemenki crnog kima. Formulacija je uspješno karakterizirana, te je dokazana njezina stabilnost. Pretpostavlja se kako je iz ovakvih nanočestica poboljšana dermalna permeacija indometacina, kao i da su poboljšana terapijska svojstva. Da bi se ove pretpostavke potvrdile, potrebno je provesti daljnja istraživanja (Badri i sur., 2018).

5. ZAKLJUČCI

- Moguće je uspješno izraditi nanotehnološke nosače s eteričnim uljima i uklopljenim djelatnim tvarima koji imaju zadovoljavajuću fizičku stabilnost.
- Formulacije s eteričnim uljima u *in vitro* ispitivanjima pokazuju zadovoljavajuću sigurnost, te eterična ulja kao konstituenti nanonosača imaju prednost pred nekim sintetskim tvarima sa sigurnosnog aspekta.
- Djelatne tvari koje su dobro topljive u eteričnim uljima lako je uklopiti u nanonosače, kao što su mikroemulzije i nanoemulzije, koji sadrže eterično ulje kao uljnu fazu.
- Prisutnost eteričnih ulja u formulaciji može povećati fizičku stabilnost djelatne tvari na vanjske utjecaje kao što su UV zračenje i promjene pH vrijednosti.
- Djelujući kao promotori permeacije, eterična ulja omogućuju bolju permeaciju i raspodjelu djelatne tvari u koži.
- Eterična ulja uklapanjem u nanotehnološke nosače zadržavaju svoja farmakološka svojstva i često djeluju sinergistički s uklopljenom djelatnom tvarima poboljšavajući tako njenu biološku aktivnost.
- S obzirom kako su eterična ulja prirodni spojevi različitog sastava, pojedina eterična ulja pokazuju bolja svojstva od drugih u određenim formulacijama.
- Uklapanjem eteričnih ulja u nanotehnološke nosače moguće je dobiti formulacije jedinstvenih svojstava za kozmetičku primjenu.
- Većina postojećih formulacija je još u početnoj fazi razvoja i provedena su samo *in vitro* ispitivanja te prije eventualne upotrebe treba provesti daljnja *in vivo* ispitivanja.

6. LITERATURA

Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, Damanhoury ZA, Anwar F. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2013, 3, 337-352.

Akermark C, Forsskahl B. Topical indomethacin in overuse injuries in athletes. A randomized double-blind study comparing Elmetacin with oral indomethacin and placebo. *Int J Sports Med*, 1990, 11, 393-396.

Almeida KB, Araujo JL, Cavalcanti JF, Romanos MTV, Mourao SC, Amaral ACF, Falcao DQ. In vitro release and anti-herpetic activity of *Cymbopogon citratus* volatile oil-loaded nanogel. *Rev Bras Farmacogn*, 2018, 28, 495-502.

Badri W, El Asbahani A, Miladi K, Baraket A, Agusti G, Nazari QA, Errachid A, Fessi H, Elaissari A. Poly (epsilon-caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and *Nigella Sativa* L. essential oil for the topical treatment of inflammation. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2018, 46, 234-242.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46, 446-475.

Barradas TN, de Campos VEB, Senna JP, Coutinho CDC, Tebaldi BS, Silva KGDE, Mansur CRE. Development and characterization of promising o/w nanoemulsions containing sweet fennel essential oil and non-ionic surfactants. *Colloid Surface A*, 2015, 480, 214-221.

Barradas TN, Senna JP, Cardoso SA, Nicoli S, Padula C, Santi P, Rossi F, de Holanda ESKG, Mansur CRE. Hydrogel-thickened nanoemulsions based on essential oils for topical delivery of psoralen: Permeation and stability studies. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 116, 38-50.

Batheja P, Sheihet L, Kohn J, Singer AJ, Michniak-Kohn B. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. *J Control Release*, 2011, 149, 159-167.

Baxter RA. Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *J Cosmet Dermatol*, 2008, 7, 2-7.

Caelli M, Porteous J, Carson CF, Heller R, Riley TV. Tea tree oil as an alternative topical decolonization agent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*, 2000, 46, 236-237.

Carter P, Narasimhan B, Wang Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *Int J Pharm*, 2018, 555, 49-62.

Chaiyana W, Anuchapreeda S, Leelapornpisid P, Phongpradist R, Viernstein H, Mueller M. Development of Microemulsion Delivery System of Essential Oil from *Zingiber cassumunar* Roxb. Rhizome for Improvement of Stability and Anti-Inflammatory Activity. *AAPS PharmSciTech*, 2017, 18, 1332-1342.

Czernielewski J, Michel S, Bouclier M, Baker M, Hensby JC. Adapalene biochemistry and the evolution of a new topical retinoid for treatment of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 15 Suppl, 2001, 3, 5-12.

Devarajan V, Ravichandran V, Nanoemulsions: As Modified Drug Delivery Tool, *Pharmacie Globale IJCP*, 2011, 2.

de Wolff FA, Thomas TV. Clinical pharmacokinetics of methoxsalen and other psoralens. *Clin Pharmacokinet*, 1986, 11, 62-75.

Duran N, Duran M, de Jesus MB, Seabra AB, Favaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomed-Nanotechnol*, 2016, 12, 789-799.

Golubovic-Liakopoulos N, Simon SR, Shah B. Nanotechnology Use with Cosmeceuticals. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 2011, 30, 176-180.

Goreta R, Pepić I. Funkcionalne podloge i pripravci za dermalnu primjenu. *Farm Glas*, 2014, 70, 551-576.

Hanson KM, Narayanan S, Nichols VM, Bardeen CJ. Photochemical degradation of the UV filter octyl methoxycinnamate in solution and in aggregates (vol 14, pg 1607, 2015). *Photoch Photobio Sci*, 2016, 15, 1212-1212.

Hatahet T, Morille M, Hommoss A, Devoisselle JM, Muller RH, Begu S. Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 108, 41-53.

Herman A, Herman AP. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67, 473-485.

Herman A, Herman AP, Domagalska BW, Mlynarczyk A. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. *Indian J Microbiol*, 2013, 53, 232-237.

Hossen MJ, Yang WS, Kim D, Aravinthan A, Kim JH, Cho JY. Thymoquinone: An IRAK1 inhibitor with in vivo and in vitro anti-inflammatory activities. *Sci Rep*, 2017, 7, 42995.

Kabanov AV, Vinogradov SV. Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. *Angew Chem Int Edit*, 2009, 48, 5418-5429.

Kamel R, Abbas H, Fayez A. Diosmin/essential oil combination for dermal photo-protection using a lipoid colloidal carrier. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 170, 49-57.

Lai F, Sinico C, De Logu A, Zaru M, Muller R, Fadda AM. SLN as a topical delivery system for *Artemisia arborescens* essential oil: In vitro antiviral activity and skin permeation study. *Int J Nanomed*, 2007, 2, 419-425.

Lins RF, Lustrri WR, Minharro S, Alonso A, Neto DD. On the formation, physicochemical properties and antibacterial activity of colloidal systems containing tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. *Colloid Surface A*, 2016, 497, 271-279.

Low WL, Martin C, Hill DJ, Kenward MA. Antimicrobial efficacy of liposome-encapsulated silver ions and tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Lett Appl Microbiol*, 2013, 57, 33-39.

Lu WC, Huang DW, Wang CR, Yeh CH, Tsai JC, Huang YT, Li PH. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *J Food Drug Anal*, 2018, 26, 82-89.

Lv X, Cong ZX, Liu ZH, Ma XD, Xu M, Tian Y, Zhang XY, Xu BQ, Zhang JB, Tang ZY. Improvement of the solubility, photostability, antioxidant activity and UVB photoprotection of trans-resveratrol by essential oil based microemulsions for topical application. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2018, 48, 346-354.

Lv X, Liu TT, Ma HP, Tian Y, Li L, Li Z, Gao M, Zhang JB, Tang ZY. Preparation of Essential Oil-Based Microemulsions for Improving the Solubility, pH Stability, Photostability, and Skin Permeation of Quercetin. *AAPS PharmSciTech*, 2017, 18, 3097-3104.

Manthey JA. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation*, 2000, 7, S29-34.

Miguel MG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 2010, 15, 9252-9287.

Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH center dot assay: A critical review and results. *Food Chem*, 2012, 130, 1036-1043.

Mohsenabadi N, Rajaei A, Tabatabaei M, Mohsenifar A. Physical and antimicrobial properties of starch-carboxy methyl cellulose film containing rosemary essential oils encapsulated in chitosan nanogel. *Int J Biol Macromol*, 2018, 112, 148-155.

Mostafa DM, Kassem AA, Asfour MH, Al Okbi SY, Mohamed D, Hamed TES. Transdermal cumin essential oil nanoemulsions with potent antioxidant and hepatoprotective activities: In-vitro and in-vivo evaluation. *J Mol Liq*, 2015, 212, 6-15.

Najafi-Taher R, Ghaemi B, Amani A. Delivery of adapalene using a novel topical gel based on tea tree oil nano-emulsion: Permeation, antibacterial and safety assessments. *Eur J Pharm Sci*, 2018a, 120, 142-151.

Najafi-Taher R, Ghaemi B, Kharazi S, Rasoulikoohi S, Amani A. Promising Antibacterial Effects of Silver Nanoparticle-Loaded Tea Tree Oil Nanoemulsion: a Synergistic Combination Against Resistance Threat. *AAPS PharmSciTech*, 2018b, 19, 1133-1140.

Nascimento DS, Insausti M, Band BSF, Grunhut M. Photolysis study of octyl p-methoxycinnamate loaded microemulsion by molecular fluorescence and chemometric approach. *Spectrochim Acta A*, 2018, 191, 277-282.

Natrajan D, Srinivasan S, Sundar K, Ravindran A. Formulation of essential oil-loaded chitosan-alginate nanocapsules. *J Food Drug Anal*, 2015, 23, 560-568.

Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technol*, 2010, 101, 372-378.

Pathan IB, Setty CM. Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems. *Trop J Pharm Res*, 2009, 8, 173-179.

Pattanaargson S, Munhapol T, Hirunsupachot N, Luangthongaram P. Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. *J Photoch Photobio A*, 2004, 161, 269-274.

Pepić I, Vujčić M, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Nanočestice u dermatokozmetičkim pripravcima: liposomi, mikroemulzije i polimerne micle. *Farm Glas*, 2012, 68, 763-772.

Prasad S, Mukhopadhyay A, Kubavat A, Kelkar A, Modi A, Swarnkar B, Bajaj B, Vedamurthy M, Sheikh S, Mittal R. Efficacy and safety of a nano-emulsion gel formulation of adapalene 0.1% and clindamycin 1% combination in acne vulgaris: a randomized, open label, active-controlled, multicentric, phase IV clinical trial. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2012, 78, 459-467.

Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties - an Overview. *Forsch Komplementmed*, 2009, 16, 79-90.

Rodrigues LB, Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins A, Cesario FR, Ferreira ECF, de Albuquerque TR, Martins Fernandes MN, Fernandes da Silva BA, Quintans Junior LJ, da Costa JG, Melo Coutinho HD, Barbosa R, Alencar de Menezes IR. Anti-inflammatory and antiedematogenic activity of the *Ocimum basilicum* essential oil and its main compound estragole: In vivo mouse models. *Chem Biol Interact*, 2016, 257, 14-25.

Sahu P, Kashaw SK, Jain S, Sau S, Iyer AK. Assessment of penetration potential of pH responsive double walled biodegradable nanogels coated with eucalyptus oil for the controlled delivery of 5-fluorouracil: In vitro and ex vivo studies. *J Control Release*, 2017, 253, 122-136.

Sostres C, Gargallo CJ, Arroyo MT, Lanas A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010, 24, 121-132.

Volpe V, Nascimento DS, Insausti M, Grunhut M. Octyl p-methoxycinnamate loaded microemulsion based on *Ocimum basilicum* essential oil. Characterization and analytical studies for potential cosmetic applications. *Colloid Surface A*, 2018, 546, 285-292.

Woollard AC, Tatham KC, Barker S. The influence of essential oils on the process of wound healing: a review of the current evidence. *J Wound Care*, 2007, 16, 255-257.

7. SAŽETAK

Eterična ulja prisutna su u topikalnoj primjeni zbog svojih antimikrobnih, antioksidacijskih, protuupalnih i drugih pozitivnih učinaka. Posebno je ineresantna njihova primjena kao promotora penetracije.

Upotrebom nanotehnoloških nosača, kao što su nanoemulzije, mikroemulzije, nanogelovi i nanočestice, omogućuje se primjena nestabilnih i teško topljivih djelatnih tvari, poboljšava se dermalna raspoloživost i omogućava kontrolirano oslobađanje djelatnih tvari.

Primjenom eteričnih ulja u nanotehnološkim pripravcima s uklopljenom djelatnom tvari, dobivaju se sustavi jedinstvenih svojstava. Eterična ulja dodatno poboljšavaju fizičku stabilnost uklopljene djelatne tvari, njenu permeaciju i raspodjelu u koži, a posljedično i biološku aktivnost djelatne tvari. Upotrebom eteričnih ulja moguće je pripremiti nanotehnološke nosače s boljim kapacitetom uklapanja za određene djelatne tvari. Nadalje, eterična ulja u nanotehnološkim pripravcima zadržavaju svoja farmakološka svojstva i djelujući sinergistički poboljšavaju učinak uklopljene djelatne tvari.

Brojna su *in vitro* ispitivanja pokazala sigurnost i učinkovitost nanotehnoloških formulacija s uklopljenim eteričnim uljima i djelatnim tvarima. Stoga, takve formulacije predstavljaju veliki potencijal za daljnje istraživanje. Prije svega, potrebno je utvrditi njihovu sigurnost i učinkovitost u kliničkoj primjeni.

8. SUMMARY

Essential oils are used for topical application because of their antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and other beneficial effects. Their use as penetration enhancers is particularly interesting.

Nanotechnological carriers, such as nanoemulsions, microemulsions, nanogels and nanoparticles, enable application of unstable and poorly soluble active ingredients, improve dermal availability and enable sustained release of active ingredients.

Use of essential oils in nanotechnological carriers with encapsulated active ingredients enables production of formulations with unique properties. Essential oils further improve active ingredient physical stability, improve active ingredient permeation and skin distribution, and consequently its biological activity. Using essential oils, it is possible to prepare nanotechnological carriers with better encapsulation efficiency for some active ingredients. Furthermore, essential oils in nanotechnological carriers retain their pharmacological properties and acting synergistically, improve the effect of encapsulated active ingredient.

Numerous *in vitro* researches show nanotechnological formulations with encapsulated essential oils safety and efficiency. Therefore, there is a huge potential for further research of such formulations. Especially, their safety and efficiency in clinical trials should be determined.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PRIMJENA ETERIČNIH ULJA U NANOTEHNOLOŠKIM PRIPRAVCIMA S UKLOPLJENIM DJELATNIM TVARIMA ZA DERMALNU PRIMJENU

Ivan Maljić

SAŽETAK

Eterična ulja prisutna su u topikalnoj primjeni zbog svojih antimikrobnih, antioksidacijskih, protuupalnih i drugih pozitivnih učinaka. Posebno je ineresantna njihova primjena kao promotora penetracije.

Upotrebom nanotehnoških nosača, kao što su nanoemulzije, mikroemulzije, nanogelovi i nanočestice, omogućuje se primjena nestabilnih i teško topljivih djelatnih tvari, poboljšava se dermalna raspoloživost i omogućava kontrolirano oslobađanje djelatnih tvari.

Primjenom eteričnih ulja u nanotehnoškim pripravcima s uklopljenom djelatnom tvari, dobivaju se sustavi jedinstvenih svojstava. Eterična ulja dodatno poboljšavaju fizičku stabilnost uklopljene djelatne tvari, njenu permeaciju i raspodjelu u koži, a posljedično i biološku aktivnost djelatne tvari. Upotrebom eteričnih ulja moguće je pripremiti nanotehnoške nosače s boljim kapacitetom uklapanja za određene djelatne tvari. Nadalje, eterična ulja u nanotehnoškim pripravcima zadržavaju svoja farmakološka svojstva i djelujući sinergistički poboljšavaju učinak uklopljene djelatne tvari.

Brojna su in vitro ispitivanja pokazala sigurnost i učinkovitost nanotehnoških formulacija s uklopljenim eteričnim uljima i djelatnim tvarima. Stoga, takve formulacije predstavljaju veliki potencijal za daljnje istraživanje. Prije svega, potrebno je utvrditi njihovu sigurnost i učinkovitost u kliničkoj primjeni.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 52 stranice, 21 grafički prikaz, 10 tablica i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: Eterična ulja, nanotehnoški nosači, nanoemulzije, mikroemulzije, nanogelovi, nanočestice, dermalna primjena

Mentor: **Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Sanda Vladimirić-Knežević, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Anita Hafner, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: prosinac 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

USE OF ESSENTIAL OILS IN NANOTECHNOLOGICAL CARRIERS WITH ENCAPSULATED ACTIVE INGREDIENTS FOR DERMAL APPLICATION

Ivan Maljić

SUMMARY

Essential oils are used for topical application because of their antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and other beneficial effects. Their use as penetration enhancers is particularly interesting.

Nanotechnological carriers, such as nanoemulsions, microemulsions, nanogels and nanoparticles, enable application of unstable and poorly soluble active ingredients, improve dermal availability and enable sustained release of active ingredients.

Use of essential oils in nanotechnological carriers with encapsulated active ingredients enables production of formulations with unique properties. Essential oils further improve active ingredient physical stability, improve active ingredient permeation and skin distribution, and consequently its biological activity. Using essential oils, it is possible to prepare nanotechnological carriers with better encapsulation efficiency for some active ingredients. Furthermore, essential oils in nanotechnological carriers retain their pharmacological properties and acting synergistically, improve the effect of encapsulated active ingredient.

Numerous *in vitro* researches show nanotechnological formulations with encapsulated essential oils safety and efficiency. Therefore, there is a huge potential for further research of such formulations. Especially, their safety and efficiency in clinical trials should be determined.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 52 pages, 21 figures, 10 tables and 51 reference. Original is in Croatian language.

Keywords: Essential oils, nanotechnological carriers, nanoemulsions, microemulsions, nanogels nanoparticles, dermal application

Mentor: **Ivan Pepić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivan Pepić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sanda Vladimir-Knežević Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Hafner Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: December 2018.