

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Synteza i charakterystyka stałych nanocząstek oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych przeznaczonych do celów kosmetycznych i farmaceutycznych

mgr Aleksandra Zielińska

Nanocząstki lipidowe są stosunkowo nowymi substancjami wykorzystywanymi w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym. Przedstawiona rozprawa doktorska zawiera opis budowy stałych nanocząstek lipidowych (ang. *Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) i nanostrukturalnych nośników lipidowych (ang. *Nanostructured Lipid Carriers*, NLC) oraz przykłady najpopularniejszych metod do ich syntezy. Szczególną uwagę poświęcono metodzie homogenizacji wysokociśnieniowej, którą uznaje się obecnie za najszybszą i najskuteczniejszą technikę wykorzystywaną do otrzymywania nanocząstek lipidowych. Na podstawie przeglądu literatury zostały opisane między innymi charakterystyczne właściwości SLN/NLC, takie jak m.in. ich potencjalna toksyczność czy zdolność do przenikania przez skórę. W części teoretycznej rozwinięty został także temat typów uwalniania substancji czynnych oraz rodzajów inkorporowania nanocząstek lipidowych. W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, uwzględniono szczególnie wpływ inkorporowania monoterpenu (α -pinen, cytral, geraniol, limonen), Retinolem 50 C, koenzymem Q₁₀ oraz α -tokoferolem na profil uwalniania substancji czynnych z SLN/NLC, jak również efektywność enkapsulacji, stabilność otrzymanych nanocząstek bądź enkapsulowanych składników aktywnych oraz ich uwalnianie z SLN/NLC. Ponadto, w części teoretycznej niniejszej dysertacji wskazano na możliwe zastosowania tych innowacyjnych nośników w przemyśle kosmetyczno-farmaceutycznym. W opisie badań zwrócono szczególną uwagę na znaczenie matrycy lipidowej, stanowiącej ochronę dla enkapsulowanej substancji aktywnej oraz wyjaśniono znaczenie naturalnych olejów roślinnych w syntezie NLC. Na przykładzie oleju z nasion Meadowfoam, odznaczającego się unikalnym składem kwasów tłuszczowych, przeprowadzono badania reologii preparatów kosmetycznych i oceniono ich działanie pielęgnacyjne na skórę. Tym sposobem wykazano właściwości zimnotłoczonych olejów roślinnych, dzięki którym naturalna matryca lipidowa mogłaby nie tylko przyczynić się do zwiększenia kompatybilności syntezowanych nanostruktur, ale również wykazywałaby dodatkowe działanie pielęgnacyjno-lecznicze.

Głównym celem badań naukowych prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pt. „Synteza i charakterystyka stałych nanocząstek oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych przeznaczonych do celów kosmetycznych i farmaceutycznych” było opracowanie powtarzalnej metodyki otrzymywania SLN/NLC, inkorporowanych wybranymi składnikami aktywnymi, mającymi szczególne znaczenie w przemyśle kosmetyczno-farmaceutycznym oraz otrzymanie w pełni biodegradowalnych nanostrukturalnych nośników lipidowych, zbudowanych z wyłącznie naturalnych składników.

Aby zrationalizować kolejność przeprowadzonych badań, cel pracy podzielono na dwie części, z których pierwsza obejmowała opracowanie powtarzalnej syntezy do enkapsulacji monoterpenu (α -pinen, cytral, geraniol, limonen) w SLN. Druga część pracy dotyczyła

natomiast otrzymania powtarzalnej metodyki enkapsulacji Retinolu 50 C (retinol stabilizowany Polisorbatem 20), koenzymu Q₁₀ i α -tokoferolu w NLC, a następnie próby enkapsulacji ww. substancji aktywnych w NLC, syntezowanych z wykorzystaniem składników pochodzenia organicznego, ze szczególnym uwzględnieniem kompozycji tłuszczowej olejów roślinnych, pełniących rolę matrycy lipidowej.

Po przeprowadzeniu procedur eksperymentalnych, w pierwszej części niniejszej rozprawy doktorskiej dobrano optymalne warunki do syntezy stałych nanocząstek lipidowych, wykorzystując zaawansowaną analizę statystyczną, tj. plany czynnikowych eksperymentów, analizę wariancji (ANOVA), diagram Pareto oraz wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi (3D i 2D). Następnie, właściwości zoptymalizowanego składu SLN identyfikowano za pomocą następujących technik i metod badawczych:

- Spektroskopii korelacji fotonów (Zetasizer Nano ZS, Malvern) – określono wielkości cząstek (Z-Ave) i współczynniki polidispersyjności (PDI).
- Elektroforetycznego rozpraszania światła (Zetasizer Nano ZS, Malvern) – zmierzono stabilność SLN poprzez określenie wartości potencjału zeta (ZP).
- Analizatora dyspersji (LUMiSizer[®], L.U.M. GmbH) – wykonano przyspieszoną analizę stabilności, wyznaczono indeksy niestabilności oraz dokonano analizy prędkości sedymentacji cząstek dla wszystkich otrzymanych próbek SLN.
- Komór dyfuzyjnych Franza oraz spektroskopii UV-Vis (Synergy[™] HT Multi-Mode Microplate Reader) – obliczono czas uwalniania enkapsulowanych monoterpenu.
- Chromatografii gazowej (Varian CP 3800 GC) – oznaczono efektywność enkapsulacji.
- Dyfrakcji promieni rentgenowskich (XRD, Bruker D8 Advance) oraz za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC, XP-10, Thass) – scharakteryzowano wszystkie matryce lipidowe otrzymanych SLN, opisano zachodzące w nich przemiany polimorficzne i przedstawiono przejścia fazowe lipidów, zachodzące pod wpływem ogrzewania i chłodzenia próbek.
- Skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM, Carl Zeiss SMT Evo Series) – wykonano zdjęcia otrzymanych nanostruktur.
- Badań *in vitro* wybranych monoterpenu enkapsulowanych w SLN – analizowano aktywność przeciwzapalną cytralu i geraniolu, a następnie przeprowadzono badania cytotoksyczności SLN inkorporowanych cytralem z wykorzystaniem różnorodnych linii komórkowej HaCaT (nienowotworowej) oraz A431 (nowotworowej).

Na skutek przeprowadzonych badań i przeanalizowaniu otrzymanych wyników dowiedziono, że:

1. Wybrane do badań monoterpenu mogą być z powodzeniem inkorporowane do SLN.
2. Nowo opracowane warunki syntezy zapewniły wysoką stabilność fizyczną i chemiczną otrzymanych nanocząstek lipidowych oraz zawartych w nich substancji aktywnych.
3. Metoda homogenizacji wysokociśnieniowej (na gorąco) okazała się nie tylko najszybszą, ale i najbardziej efektywną metodą syntezy nanocząstek lipidowych.

W drugiej części przedłożonej rozprawy doktorskiej ponownie przeprowadzono wieloaspektowe procedury eksperymentalne, za pomocą których dobrano optymalne warunki do syntezy nanostrukturalnych nośników lipidowych, a następnie właściwości zoptymalizowanego składu NLC identyfikowano za pomocą najważniejszych metod fizykochemicznych stosowanych do charakterystyki otrzymanych nanocząstek lipidowych

(m.in. Z-Ave, PDI, ZP, SEM). Nanostrukturalne nośniki lipidowe inkorporowano składnikami aktywnymi, mającymi szczególne znaczenie w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym, zwłaszcza ze względu na silne właściwości przeciwutleniające (tj. Retinol 50 C, koenzym Q₁₀, α -tokoferol).

W powyżej opisanej części pracy, głównym celem była synteza NLC inkorporowanych ww. substancjami aktywnymi z wykorzystaniem naturalnego odpowiednika dla półsyntetycznego lipidu. W rezultacie, matrycę lipidową NLC stanowił organiczny olej z nasion kwiatów Meadowfoam (MSO) lub też olej z nasion owoców Marula. Badania te miały na celu zarówno zwiększenie kompatybilności NLC, jak i równoczesną poprawę stabilności enkapsulowanych składników aktywnych, które na ogół bardzo szybko ulegają degradacji pod wpływem przechowywania. Dodatkowo przeprowadzone testy *in vivo* potwierdziły skuteczność działania zimnotłoczonego oleju (MSO) na wybrane parametry skóry, takie jak stopień nawilżenia czy elastyczności skóry. Ponadto, nanocząstki lipidowe otrzymywano metodą mikroemulgowania z wykorzystaniem metody sonifikacji, jednak najskuteczniejszą metodą syntezy SLN inkorporowanych monoterpunami okazała się homogenizacja wysokociśnieniowa przeprowadzona „na gorąco”. W procesie tym, stopiona mieszanina lipidów wraz ze składnikiem aktywnym została dodana bezpośrednio do gorącego roztworu surfaktantu.

Biorąc pod uwagę coraz częściej rozpowszechniany trend „zielonej chemii” w przemyśle kosmetyczno-farmaceutycznym, w ramach prezentowanej dysertacji opracowano powtarzalną metodę enkapsulacji Retinolu 50 C oraz koenzymu Q₁₀ w NLC, zbudowanych ze składników wyłącznie pochodzenia roślinnego. Główną ideą tych badań było stworzenie nanostrukturalnych nośników lipidowych, mogących znaleźć zastosowanie w naturalnych i biodegradowalnych kosmetykach, szczególnie preferowanych przez współczesnych konsumentów. Z uwagi na tendencję do ulegania procesowi „jęłczenia” w wyniku degradacji oksydacyjnej przez organiczne lipidy i oleje, mające wysokie stężenie nienasyconych kwasów tłuszczowych, stworzenie w pełni organicznych preparatów kosmetycznych stanowi zawsze duże wyzwanie dla przemysłu. W pracy doktorskiej przeprowadzono również syntezę NLC inkorporowanych α -tokoferolem z zastosowaniem dwóch najpowszechniej stosowanych metod – mikroemulgowania oraz homogenizacji wysokociśnieniowej. Badania te miały przede wszystkim wykazać różnice we właściwościach fizykochemicznych otrzymanych nanocząstek. Oprócz tego, postanowiono porównać efektywności procesu syntezy nanocząstek lipidowych przy użyciu dwóch odmiennych technik.

Po przeprowadzeniu wszystkich powyższych badań, wywnioskowano, że:

1. Naturalne oleje roślinne mogą skutecznie pełnić rolę matrycy lipidowej powstałej podczas syntezy NLC, nie wpływając przy tym na znaczący przyrost średniej wielkości cząstek oraz polidispersyjności w porównaniu do lipidów półsyntetycznych.
2. Wysoka stabilność olejów organicznych, wynikająca z osobliwej kompozycji kwasów tłuszczowych, może korzystnie wpływać na stabilność próbek, zwłaszcza poddanych działaniu wysokich temperatur, co przekładało się na wysokie wartości potencjału zeta.
3. Odpowiednio dobrane i zoptymalizowane składniki organiczne mogą stanowić równie stabilne i skuteczne podłoże do produkcji organicznych NLC, co ich półsyntetyczne zamienniki.

4. Na podstawie uzyskanych wyników zauważono znaczące różnice pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi dla substancji aktywnej (α -tokoferol) enkapsulowanej w NLC, syntezyowanych za pomocą dwóch odmiennych metod – mikroemulgowania (ME) i homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH).

Wszystkie otrzymane wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej mogą tłumaczyć coraz większe zainteresowanie SLN/NLC zarówno wielu ośrodków naukowo-badawczych, jak i nieustannie rozwijającego się przemysłu kosmetyczno-farmaceutycznego na świecie. Z uwagi na mało kosztowną, a przy tym łatwą i szybką technologię produkcji, obecność nietoksycznych i biodegradowalnych nanocząstek lipidowych w różnego typu produktach kosmetycznych lub farmaceutycznych może stać się w najbliższych latach nieoceniona.