

**POLITECHNIKA KRAKOWSKA**

im. Tadeusza Kościuszki

**WYDZIAŁ INŻYNIERII i TECHNOLOGII  
CHEMICZNEJ**

**INSTYTUT CHEMII i TECHNOLOGII ORGANICZNEJ**

## **PRACA DOKTORSKA**

**Nanocząstki lipidowe jako nośniki substancji  
aktywnych biologicznie**

**mgr inż. Elwira Lasoń**

PROMOTOR:

**Prof. dr hab. inż. Jan Ogonowski, prof. zw. PK**

PROMOTOR POMOCNICZY:

**dr inż. Elżbieta Sikora**

**KRAKÓW 2018**

## **Podziękowania**

Dziękuję mojemu Promotorowi, prof. dr hab. inż. Janowi Ogonowskiemu, za poświęcony czas oraz cenne rady związane z niniejszą pracą, a także za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość.

Składam serdeczne podziękowania promotorowi pomocniczemu, dr inż. Elżbiecie Sikorze za opiekę naukową, wszechstronną pomoc i poświęcony mi czas. Dziękuję za życzliwą i miłą atmosferę, która przyczyniła się do pomyślnego napisania mojej pracy.

Szczególne podziękowania składam Rodzicom i moim kochanym dzieciom, bez ich wsparcia ta praca by nie powstała. Aruś, dziękuję za wyrozumiałość i wsparcie w chwilach zwątpienia.

## Spis treści

<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Wstęp .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Cel i zakres pracy .....</b>	<b>12</b>
<b>3. Forma pracy doktorskiej oraz wkład doktoranta.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Charakterystyka materiałów.....</b>	<b>15</b>
<b>5. Metody otrzymywania Nanocząstek Lipidowych stosowane w pracy doktorskiej ....</b>	<b>17</b>
<b>6. Ocena właściwości fizykochemicznych otrzymanych NLC .....</b>	<b>18</b>
<b>7. Krótki opis badań składających się na rozprawę doktorską.....</b>	<b>21</b>
<b>8. Podsumowanie przeprowadzonych badań .....</b>	<b>25</b>
<b>Spis literatury .....</b>	<b>27</b>
<b>Dorobek naukowy .....</b>	<b>31</b>
<b>Załączniki .....</b>	<b>37</b>
<b>Przedruk publikacji [Lasoń, Acta Biochim Pol, 2013].....</b>	<b>37</b>
<b>Przedruk publikacji [Lasoń, Colloid Surface A, 2016] .....</b>	<b>43</b>
<b>Przedruk publikacji [Lasoń, Colloid Surface A, 2017] .....</b>	<b>50</b>
<b>Przedruk publikacji [Lasoń, Acta Biochim Pol, 2018].....</b>	<b>57</b>

## STRESZCZENIE

Efektywne dostarczanie związków bioaktywnych do naszego organizmu jest niezwykle istotne, bez względu na fakt, czy jest to produkt pochodzenia farmaceutycznego, kosmetycznego czy spożywczego. Dobranie odpowiedniego nośnika, odznaczającego się brakiem toksyczności i neutralnego dla naszego organizmu oraz, co bardzo ważne, kompatybilnego z substancją aktywną, jest stosunkowo trudne. Doskonałym rozwiązaniem tej kwestii okazały się w ostatnich latach nanocząstki lipidowe, jako alternatywa dla tradycyjnych liposomów i innych systemów nośnikowych. Nanocząstki lipidowe zalicza się do biodegradowalnych i biozgodnych nośników substancji aktywnych, których matryce stanowią lipidy stałe w temperaturze ludzkiego ciała. Występują w postaci zawiesin w fazie wodnej, stabilizowanych przez dodatek emulgatorów. Liczne, publikowane dotychczas prace odnoszące się do zastosowania nanocząstek lipidowych na skórę dotyczyły dostarczania substancji aktywnych, które ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne, nie nastroczały wielu problemów w recepturowaniu. Często jednak, substancje o dużym potencjale prozdrowotnym należą do grupy związków silnie lipofilowych, bardzo trudno rozpuszczalnych, co poważnie ogranicza ich biodostępność.

Celem badań było opracowanie stabilnych formułacji nanocząstek lipidowych drugiej generacji (NLC) jako formy nośników dla silnie hydrofobowych i trudno rozpuszczalnych substancji aktywnych, przeznaczonych do zastosowań miejscowych na skórę.

Pierwszy etap pracy polegał na opracowaniu optymalnego składu i sposobu otrzymywania nanostrukturalnych nośników lipidowych charakteryzujących się odpowiednimi właściwościami fizykochemicznymi i stabilnością fizyczną. W badaniach zastosowano kilka rodzajów lipidów stałych (modyfikowany воск pszczeli, behenian glicerolu, palmitynian cetylu, воск z sumaka lakierodajnego) i ciekłych (triglicerydy kwasów kaprynowego i kaprylowego czy oleinian decylu). Układy NLC stabilizowano, stosując niejonowe surfaktanty takie jak: alkilopoliglukozydy, oksyetylenowane estry kwasów tłuszczowych i sorbitanu, kopolimer blokowy tlenku etylenu i tlenku propylenu, czy z grupy jonowych związków powierzchniowo czynnych - cholan sodu. Fazy emulgowano w czasie 5 minut, w temperaturze 80°C, za pomocą mieszadła szybkoobrotowego. Przygotowane wstępnie pre-emulsje poddawano procesowi ultrasonifikacji, badając wpływ parametrów procesu, takich jak: czas homogenizacji



i moc nadźwiękawiania, na stabilność i właściwości otrzymanych układów. Optymalne układy NLC, stabilne w czasie, otrzymano stosując modyfikowany воск pszczeli i triglicerydy kaprylowo/kaprynowe w stosunku 7:3 (w/w), a glukozyd decylowy jako emulgator. Rozmiary cząstek analizowano stosując metodę DLS (Zetasizer, NanoZS, Malvern Instruments). Średni rozmiar cząstek mieścił się w granicach 60-80nm, a wartość potencjału zeta sięgała -30mV.

Kolejnym, a zarazem najistotniejszym etapem badań była ocena potencjału wytypowanych formułacji nanocząstek lipidowych jako systemów nośnikowych dla wybranych związków z grupy mono-, di- i triterpenów o zróżnicowanej lipofilowości. Otrzymane nanocząstki z zainkorporowanym składnikiem aktywnym charakteryzowały się jednorodnością i sferycznym kształtem (analiza SEM), ich średni rozmiar wynosił 101, 106 i 98 nm, odpowiednio dla NLC z kwasem geraniowym, forskoliną i kwasem ursolowym (analiza DLS), a wartości potencjału zeta były bliskie -30 mV. Badania *in vitro* uwalniania substancji aktywnych z otrzymanych układów NLC przeprowadzone metodą dializacyjną wykazały, że mono-, di- i triterpeny uwolniły się z nanocząstek lipidowych w stosunkowo dużej ilości, (56,8% - kwas geraniowy, 55,6% - forskolina i 61,7% - kwas ursolowy). Uzyskane profile uwalniania dla wszystkich badanych substancji charakteryzował przebieg dwufazowy, z szybkim uwalnianiem w początkowej fazie procesu (8 godzin) oraz stopniowym utrzymującym się na stałym poziomie uwalnianiem, w ciągu kolejnych 16 godzin. Otrzymane wyniki potwierdziły, że na przebieg uwalniania substancji aktywnych wpływają ich właściwości, m.in. masa cząsteczkowa i lipofilowość.

W następnym etapie badań, potencjał opracowanych układów NLC jako obiecującego systemu dostarczania hydrofobowych związków aktywnych, potwierdzono z udziałem naturalnego antyoksydantu jakim jest kwas  $\alpha$ -liponowy (ALA). Określono profil uwalniania ALA z NLC oraz opisano kinetykę uwalniania kwasu  $\alpha$ -liponowego stosując różne modele matematyczne. Największą zgodność wyników eksperymentalnych uzyskano w przypadku modelu Korsmeyer'a – Peppas'a i Higuchi'ego, co świadczy o tym, że proces uwalniania substancji aktywnej z nanocząstek lipidowych jest kontrolowany przez proces dyfuzji. Otrzymane układy mogą być obiecującym rozwiązaniem dla kontrolowanego uwalniania kwasu liponowego z preparatów aplikowanych na skórę.

W końcowym etapie badań przeprowadzono analizę *in vitro* przenikania substancji aktywnej przez skórę z układów NLC. Ze względu na szerokie spektrum aktywności

biologicznej i potencjalnego zastosowania zarówno w produktach kosmetycznych jak i farmaceutycznych do badania wytypowano diterpen – forskolinę. Jako formułacje bazowe wybrano NLC, w skład których wchodziły triglicerydy kwasów kaprynowego i kaprylowego, modyfikowany воск pszczeli oraz alkilopoliglukozyd jako emulgator, a do otrzymania NLC zawierających forskolinę zastosowano metodę homogenizacji pod zwiększonym ciśnieniem (HPH). Badania przenikania przeprowadzono w termostatowanych komorach dyfuzyjnych Franza (przy użyciu systemu MicroettePlusR, Hanson Research) w temperaturze 32°C, stosując mieszaninę PBS/etanol (60:40, V/V) jako roztwór akceptorowy. W badaniach zastosowano ludzki naskórek, pochodzący z zabiegów chirurgicznych, od tego samego dawcy. Próbkę roztworu akceptorowego do analizy zawartości forskoliny (stężenie substancji aktywnej oznaczano metodą HPLC, Waters Instrument) pobierano automatycznie przez 24 godziny. W celach porównawczych badano także przenikanie forskoliny z nanoemulsji o analogicznym składzie. Profile przenikania forskoliny z NLC i nanoemulsji wykazywały podobny charakter. W przypadku obu nanoformulacji uzyskano zbliżoną wartość współczynników przenikania  $K_p$ . Uzyskane wyniki potwierdziły, że otrzymane preparaty NLC można stosować jako skuteczne systemy do kontrolowanego dostarczania forskoliny do skóry.

Podsumowując, opracowane w trakcie realizacji pracy, stabilne, bezpieczne w stosowaniu układy nanostrukturalnych nośników lipidowych mogą znaleźć zastosowanie jako potencjalne nośniki dla hydrofobowych, trudno rozpuszczalnych związków, pozwalające na kontrolowane w czasie dostarczanie substancji aktywnych w głębsze warstwy skóry.

## ABSTRACT

Effective delivery of bioactive compounds to our body is extremely important, regardless if a product is of pharmaceutical, cosmetic or food origin. Selection of the right carrier, which is non-toxic and neutral for our body and, what is very important, compatible with the active substance, is relatively difficult. Lipid nanoparticles occurred to be an excellent solution to these problems and in recent years they have been performed as an alternative to traditional liposomes and other carrier systems. This type of particles belong to the biodegradable and biocompatible drug carriers which are solid at the temperature of the human body. They occur as suspensions in the aqueous phase, stabilized by the addition of emulsifiers. Numerous reports published so far pertaining to the use of lipid nanoparticles on the skin, concerned the supply of active substances that did not pose many problems in formulation. However, often substances with high pro-health potential belong to the group of strongly lipophilic compounds, very sparingly soluble, what significantly limits their bioavailability.

The aim of the study was to develop stable formulations of the second generation lipid nanoparticles (NLC) as forms of carriers for strongly hydrophobic and hardly soluble active substances, dedicated for topical skin application.

The first stage of the work was to determine the optimal composition and production method for nanostructured lipid carriers, characterized by appropriate physicochemical properties and physical stability. Several types of solid lipids (modified beeswax, glycerol behenate, cetyl palmitate, berry wax) and liquid lipids (caprylic/capric triglycerides, decyl oleate) were used. NLC systems were stabilized, by non-anionic surfactants such as: alkylpolyglucosides, Tween 80, Poloxamer 188, or ionic - sodium cholate. The phases were emulsified for 5 min at 80° C, using a high shear mixer. Then, the obtained pre-emulsions were ultrasonified, investigating the influence of process parameters, such as the time of homogenization and the power of sonification, on the stability and properties of the obtained systems. The optimal formulation with long-term stability were obtained using modified beeswax and caprylic/capric triglycerides in a ratio of 7: 3, and decyl glucoside as an emulsifier. Their average particle size was in the range of 60-80nm and the zeta potential value was -30mV.

The next, and at the same time the most important stage of the study, was the assessment of the potential of selected lipid nanoparticle formulations as carrier systems

for certain compounds from the group of mono-, di- and triterpenes varying in lipophilicity. The obtained nanoparticles with the active compound were spherical and uniformly nano-sized (SEM analysis) with mean particle size of 101, 106 and 98 nm, respectively for NLC with geranic acid, forskolin and ursolic acid (DLS analysis), zeta potential values of the formulations were close to  $-30$  mV. *In vitro* release studies have shown that mono-, di- and triterpenes incorporated into the NLC released in high percentage from the lipid nanoparticles (56.8% - geranic acid, 55.6% - forskolin and 61.7% - ursolic acid). Release profiles for all terpenes were found to be biphasic, with the burst effect at the beginning (8h), followed by gradual release (16h). The obtained results confirmed that release profiles of active substances are influenced by their properties, including molecular weight and lipophilicity.

The potential of selected nanoparticles as a promising delivery system of hydrophobic active compounds was confirmed in the next stage of the studies by incorporating natural antioxidant -  $\alpha$ -lipoic acid (ALA) into the NLC. The release profile of the active and the lipoic acid kinetics release, using different mathematical models, were determined. The highest correspondence of experimental results was obtained in case of the Korsmeyer - Peppas and Higuchi models, which proves that the release of the active from lipid nanoparticles is controlled by the diffusion process. The obtained systems can be a promising solution for the controlled release of lipoic acid from the products for skin application.

In the final stage of the research, the *in vitro* analysis of the penetration of the active through the skin from the NLC system was carried out. The active compound selected for the permeation study was forskolin, due to the wide spectrum of biological activity and the potential application in both, cosmetic and pharmaceutical products. As a basic formulation, NLC included triglycerides of caprylic/capric acids, modified beeswax and alkylpolyglucoside as an emulsifier, were selected and the high pressure homogenization technique (HPH) was applied for the forskolin-loaded NLC production. The experiment was carried out on human skin samples in Franz cells at  $32^{\circ}\text{C}$  using a PBS/ethanol mixture (60:40, V/V) as a receptor solution. *In vitro* permeation experiments through human epidermis from the same donor were investigated using the MicroettePlusR system (Hanson Research, USA). Samples were collected automatically for 24 hours. For comparative purposes, the penetration of forskolin from nanaoemulsion with similar composition was also studied. Both systems were characterized by comparable permeation profiles and a similar value of permeation coefficients  $K_p$ . The results

showed, that the obtained NLC formulations can be used as effective systems for the controlled release of forskolin through the skin.

To sum up, stabile, safe in use nanostructured lipid carriers developed during this work can be used as potential carriers for hydrophobic, sparingly soluble compounds, allowing for controlled delivery of active substances into deeper layers of the skin.

## 1. Wstęp

Nanotechnologia jest kluczową technologią XXI wieku, która oferuje szerokie spektrum naukowych rozwiązań oraz innowacyjnych zastosowań w różnych gałęziach przemysłu. W ciągu ostatnich dwóch dekad wzrost znaczenia nanotechnologii dał się szczególnie odczuć w dziedzinie dostarczania substancji aktywnych do organizmu człowieka. Odkrywane są coraz to nowsze substancje o nieocenionym działaniu terapeutycznym, jednak w większości przypadków największym wyzwaniem jest ich dostarczenie do układów biologicznych. Naukowcy prześcigają się w pomysłach na dostarczanie związków aktywnych, których skuteczność terapeutyczna jest często ztracana z powodu nieodpowiedniego transportu do organizmu przez błony biologiczne. Olbrzymim pozytywem dzisiejszej nanotechnologii jest fakt, że pozwala ona osiągnąć rzeczywisty postęp w dostarczaniu substancji biologicznie czynnych o czym świadczą nie tylko doniesienia naukowe, ale i globalne inicjatywy wspierające badania z tego obszaru.

Rozwój nanomedycyny, będącej gałęzią medycyny korzystającej z osiągnięć nanotechnologii, skoncentrowany jest na ukierunkowanym i specyficznym dostarczaniu związków o działaniu terapeutycznym do konkretnych miejsc w organizmie [1]. Liczne strategie nanomedycyny opierają się na poprawie biodostępności leków poprzez zwiększenie absorpcji, penetracji do tkanek docelowych oraz rozpuszczalności substancji leczniczej. Ograniczona penetracja leku do tkanek, w których jego działanie jest najbardziej konieczne, może mieć negatywny wpływ na skuteczność leczenia, a nawet działać toksycznie [2].

Pomimo tak powszechnego rozwoju nanotechnologii, w dalszym ciągu nie ma jednoznacznej definicji nanocząstek jako podstawowego nośnika leków. Według amerykańskiej agencji federalnej do spraw badań i rozwoju (National Nanotechnology Initiative – NNI), nanotechnologia obejmuje nośniki lub układy nośnikowe substancji aktywnych, o wymiarach w zakresie od 1 do 100 nm, ale granice te mogą być rozszerzone nawet do 1000 nm [3]. Wiele jest także rodzajów klasyfikacji nanocząstek jako nośników leków. Jako podstawę podziału przyjmuje się np. materiał, z którego otrzymywane są nanonośniki (nanocząstki polimerowe, lipidowe, oparte o metale czy krzemionkę), ale także kształt nośników (płaskie, sferyczne, nieregularne). Nanocząstki mogą być ponadto podzielone na organiczne lub nieorganiczne, bądź sklasyfikowane ze względu na ich, rozmiar, ładunek powierzchniowy lub właściwości fizykochemiczne. Z punktu widzenia

interakcji stosowanych nośników z błonami biologicznymi i skórą, racjonalny wydaje się być podział na cząstki miękkie i sztywne, zaproponowany przez Papakostos i wsp. [4]. Na ogół do miękkich nanocząstek zaliczane są materiały organiczne, np. lipidy, proteiny, polimery, które mogą okresowo zmieniać kształt przez kontakt z powierzchnią, czyli ulegać deformacji. Do drugiej grupy zalicza się nieorganiczne nośniki, np. metale (złoto, srebro), tlenki metali (tlenek żelaza) lub krzemionka, które nie ulegają deformacji w kontakcie ze skórą czy błonami biologicznymi.

Nanocząstki lipidowe stanowią alternatywny, koloidalny system dostarczania substancji aktywnych dla tradycyjnych nośników, takich jak liposomy czy nanocząstki polimerowe. Są bardzo atrakcyjnymi układami do stosowania miejscowego z powodu dodatkowych, dobroczynnych właściwości dla skóry. Nadają się do aplikacji nawet na skórę zmienioną chorobowo (stany zapalne, podrażnienia), ponieważ bazują na nietoksycznych i niedrażniących surowcach lipidowych [5].

W niniejszej pracy podjęto się opracowania stabilnych formułacji nanocząstek lipidowych jako potencjalnych nośników substancji aktywnych biologicznie do zastosowań miejscowych (na skórę). Badano wpływ składu (dobór jakościowy i ilościowy surowców) oraz parametrów procesu emulsyfikacji, na właściwości fizykochemiczne opracowanych układów.

## 2. Cel i zakres pracy

Zasadniczym celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie stabilnych formułacji nanocząstek lipidowych jako efektywnej formy nośników substancji aktywnych dla produktów kosmetycznych i farmaceutycznych, poprzez dobór naturalnych i biokompatybilnych surowców i optymalnej metody otrzymywania, a także ocena skuteczności ich działania w badaniach uwalniania i przenikania wybranych substancji aktywnych przez skórę.

W badaniach zastosowano szereg metod analitycznych oraz instrumentalnych, między innymi technikę dynamicznego rozproszenia światła (DLS), mikroskopię optyczną, skaningową mikroskopię elektronową, badania reologiczne, spektroskopię UV-Vis czy wysokosprawną chromatografię cieczową.

Prezentowana praca doktorska ma duże znaczenie dla rozwoju technologii otrzymywania nie tylko innowacyjnych preparatów kosmetycznych i farmaceutycznych, ale także agrochemicznych oraz wpisuje się w nowoczesną tematykę badań w dziedzinie nanotechnologii.

### Zakres pracy:

- Dokonano krytycznego przeglądu literatury naukowej dotyczącej różnorodnych form nośników substancji aktywnych oraz problemów związanych z dostarczaniem tych substancji *in vivo*, ze szczególnym uwzględnieniem nanocząstek lipidowych.
- Zbadano wpływ różnych lipidów (rodzaju i stężenia) na otrzymanie efektywnych nośników, odpowiednich dla wybranych substancji aktywnych.
- Określono wpływ rodzaju i stężenia surfaktantów na stabilność i właściwości fizykochemiczne otrzymanych formułacji.
- Przeprowadzono analizę właściwości fizykochemicznych (stabilność, właściwości reologiczne, rozmiar cząstek i potencjał Zeta) otrzymanych nanocząstek lipidowych.
- Wytypowano optymalną formułację jako nośnik substancji aktywnych z grupy terpenów.
- Przeprowadzono badania kinetyki uwalniania wybranych składników aktywnych oraz badanie przenikania przez skórę.



- Zaproponowano możliwości praktycznego zastosowania otrzymanych układów nośników.

Wyniki badań przedstawiono w czterech oryginalnych artykułach opublikowanych w czasopismach naukowych znajdujących się na liście Journal Citation Reports [6-9].

### 3. Forma pracy doktorskiej oraz wkład doktoranta

Przedstawiona rozprawa doktorska pt. „Nanocząstki lipidowe jako nośniki substancji aktywnych biologicznie” jest wynikiem kilkuletnich szczegółowych i nowatorskich badań, które zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych:

1. **[Lasoń, Acta Biochim Pol, 2013]** E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation, Acta Biochimica Polonica, 60 (4) (2013) 773–777.

*Udział: Elwira Lasoń – 85%; Elżbieta Sikora – 10%; Jan Ogonowski – 5%.*

*Liczba cytowań: 17*

*Impact Factor: 1.187, 5-letni Impact Factor: 1.463*

Mój udział polegał na: zaplanowaniu badań, przygotowaniu formulacji, określeniu optymalnego składu i parametrów otrzymywania układów nanocząstek lipidowych, określeniu właściwości fizykochemicznych nanostrukturalnych nośników (analiza DLS, LDV, TEM), opracowaniu wyników oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu.

2. **[Lasoń, Colloid Surface A, 2016]** E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, M. Tabaszewska, Ł. Skoczylas, Release study of selected terpenes from nanostructured lipid carriers, Colloids and Surfaces A:Physicochem. Eng. Aspects 510 (2016) 87–92

*Udział: Elwira Lasoń – 70%; Elżbieta Sikora – 15%; Jan Ogonowski – 5%; Małgorzata Tabaszewska – 5%; Łukasz Skoczylas – 5%.*

*Liczba cytowań: 5*

*Impact Factor: 2.714, 5-letni Impact Factor: 2.838*

Mój udział polegał na: zaplanowaniu i przeprowadzeniu badań, przygotowaniu układów nośników zawierających różne substancje aktywne, makro- i mikroskopowej ocenie

stabilności, scharakteryzowaniu właściwości fizykochemicznych preparatów, badaniu uwalniania substancji aktywnych, opracowaniu wyników oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu.

3. **[Lasoń, Colloid Surface A, 2017]** E. Lasoń, E. Sikora, M. Miastkowska, P. Socha, J. Ogonowski, NLC delivery systems for alpha lipoic acid: Physicochemical characteristics and release study, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 532 (2017) 57–62

*Udział: Elwira Lasoń – 70%; Elżbieta Sikora – 15%; Małgorzata Miastkowska – 5%; Paulina Socha – 5%, Jan Ogonowski – 5%.*

*Liczba cytowań: 0*

*Impact Factor: 2.714, 5-letni Impact Factor: 2.838*

Mój udział polegał na: zaplanowaniu badań, charakterystyce właściwości fizykochemicznych, makro- i mikroskopowej ocenie stabilności, badaniu uwalniania substancji aktywnej, analizie wyników oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu.

4. **[Lasoń, Acta Biochim Pol, 2018]** E. Lasoń, E. Sikora, M. Miastkowska, E. Escibano, M. J. Garcia-Celma, C. Solans, M. Llinas, J. Ogonowski, NLC as a potential carrier system for transdermal delivery of forskolin, Acta Biochimica Polonica, 65 (2018) – *przyjęty do druku*

*Udział: Elwira Lasoń – 65%; Elżbieta Sikora – 10%; Małgorzata Miastkowska – 5%, Elvira Escibano – 5%, Maria Jose Garcia-Celma – 5%, Conxita Solans – 3%, Meritxell Llinas – 5%, Jan Ogonowski – 2%.*

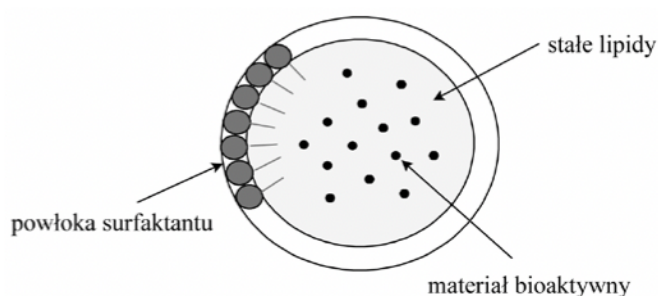
*Liczba cytowań: 0*

*Impact Factor: 1.187, 5-letni Impact Factor: 1.463*

Mój udział polegał na: zaplanowaniu badań, przygotowaniu formulacji, określeniu optymalnego składu i parametrów otrzymywania układów nanocząstek lipidowych dla badanego związku aktywnego, określeniu właściwości fizykochemicznych „pustych” NLC oraz NLC obciążonych forskoliną (analiza DLS, Turbiscan, analiza mikro- i makroskopowa), przygotowaniu układów nanocząstek do badania przenikania przez skórę, opracowaniu wyników oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu.

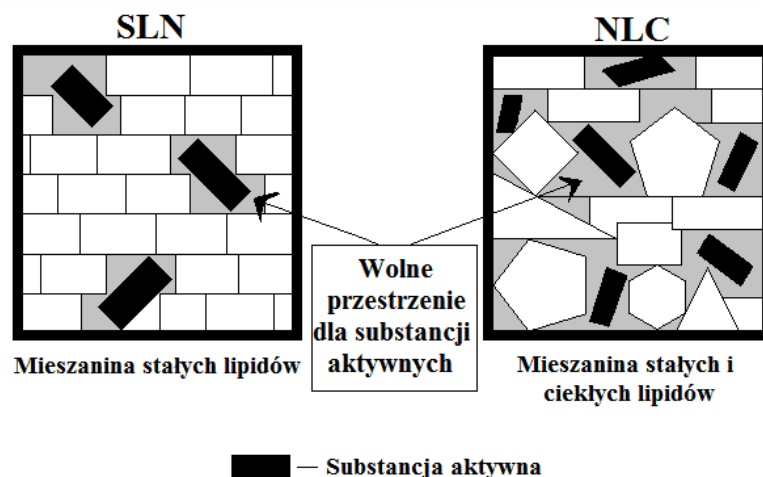
#### 4. Charakterystyka materiałów

Nanocząstki lipidowe składają się z rdzenia stałych lipidów z materiałem bioaktywnym będącym częścią lipidowego podłoża (Rys. 1). Częstka taka jest stabilizowana przez powłokę surfaktantu (lub mieszaninę surfaktantów). Pod pojęciem lipid rozumie się tu glicerydy, częściowe glicerydy, kwasy tłuszczowe, steroidy i woski. Jeżeli chodzi o emulgatory, to wszystkie klasy mogą być użyte do stabilizowania dyspersji lipidowej [10].



Rys.1. Struktura nanocząstki lipidowej stabilizowanej przez powłokę surfaktantu.

Wyróżnia się dwie generacje nanocząstek lipidowych. Pierwsza z nich, czyli stałe nanocząstki lipidowe (SLN) produkowane są przez zastąpienie ciekłego oleju emulsji O/W stałym lipidem, bądź mieszaniną stałych lipidów. Ich zawartość w roztworze wodnym nie powinna przekraczać 30% masowych, a całość stabilizowana jest surfaktantem w ilości od 0,5 do 5%. Drugą generację nanocząstek lipidowych, nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC), opracowano na potrzeby uporania się z niektórymi ograniczeniami związanymi ze strukturą SLN. Częstki te są otrzymywane przez dodatek ciekłego lipidu, w związku z tym zmienia się całkowicie struktura matrycy lipidowej, jest ona znacznie mniej uporządkowana, przez co zwiększa się liczba wolnych przestrzeni, gdzie może zostać zaincorporowana substancja aktywna (Rys. 2). Stałe lipidy miesza się zwykle z ciekłymi w stosunku masowym od 70:30 do 99,9:0,1. W wyniku dodatku ciekłego lipidu następuje obniżenie temperatury topnienia, jednak otrzymana mieszanina jest wciąż stała w temperaturze pokojowej i temperaturze ciała. W porównaniu z SLN, NLC odznaczają się większą ładownością substancji czynnej, a także minimalizują jej potencjalne usuwanie w trakcie przechowywania [11-13].



Rysunek 2. Uporządkowana struktura krystaliczna matrycy lipidowej SLN oraz chaotyczny układ kryształów NLC pozostawiający więcej wolnych przestrzeni dla związku aktywnego.

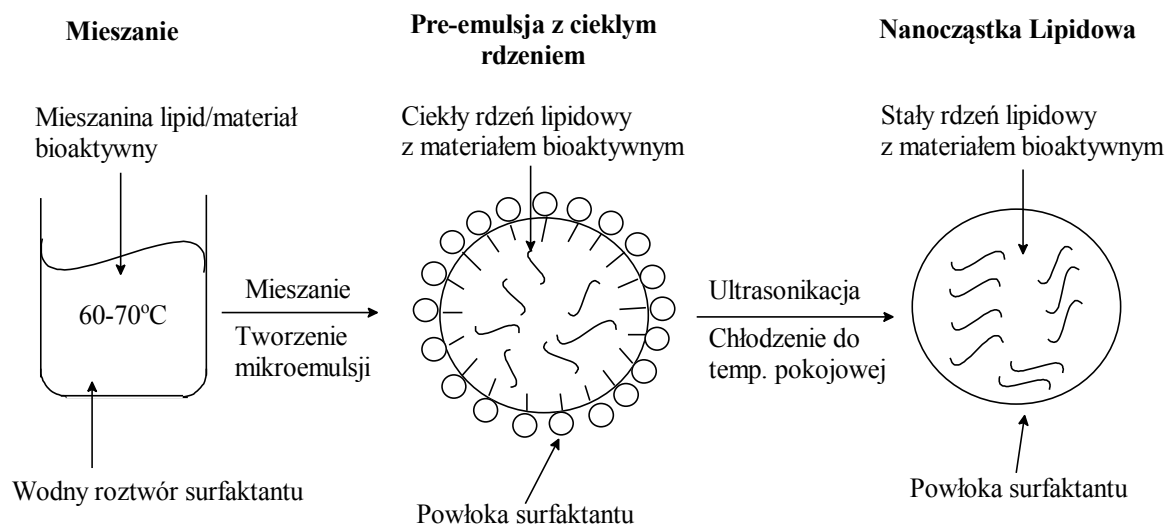
W rozprawie doktorskiej zastosowano wybrane substancje z grupy lipidów oraz surfaktantów, które w znakomitej większości odznaczają się biodegradowalnością, biozgodnością i biokompatybilnością ze skórą. Znajdują się one również na liście substancji o statusie GRAS (Generally Recognized as Safe). Z grupy stałych lipidów do badań użyto, m.in.: modyfikowany воск pszczeli, behenian glicerylu, palmitynian cetylu, воск z sumaka lakierodajnego (berry wax). Jako ciekłe lipidy przetestowano średniołańcuchowe triglicerydy (caprylic/capric triglyceride) oraz oleinian decylu. Układy stabilizowano surfaktantami: z grupy alkilopoliglukozydów (glukozyd decylowy, glukozyd cetearylowy), Poloxamerem 188 (kopolimer blokowy tlenu etylenu i tlenu propylenu), estrami kwasów oleju kokosowego i sacharozy, monooleinianem polioksyetylenosorbitolu i cholanem sodu.

## **5. Metody otrzymywania Nanocząstek Lipidowych stosowane w pracy doktorskiej**

Istnieje wiele różnych technik otrzymywania nanocząstek lipidowych, w zasadzie są one wspólne zarówno dla pierwszej jak i drugiej generacji. Najbardziej popularnymi metodami są: homogenizacja pod zwiększonym ciśnieniem, homogenizacja za pomocą ultradźwięków, metoda mikroemulsyjna, emulsyfikacja i odparowanie rozpuszczalnika oraz metoda kontraktora membranowego. W pracy zastosowano dwie metody otrzymywania nanocząstek lipidowych – homogenizację wysokociśnieniową oraz ultrasonifikację.

Homogenizacja pod zwiększonym ciśnieniem (HPH) jest najchętniej stosowaną metodą ze względu na szereg zalet w porównaniu do innymi innych technik, tj. łatwość przenoszenia skali, unikanie rozpuszczalników organicznych oraz krótki czas produkcji [14]. Wysokociśnieniowe homogenizatory przepuszczają ciecz przez wąskie rurki o średnicy kilku mikronów pod ciśnieniem od 100 do 2000 barów. Ciecz ta, na bardzo krótkich odcinkach osiąga ogromną prędkość, ponad 1000 km/h. Bardzo duże siły ścinające i kawitacyjne rozbijają cząstki do rozmiarów submikronowych. Typowa zawartość lipidów mieści się w granicach 5-10% i nie stanowi problemu dla homogenizatora, ale udało się również osiągnąć lipidową nanodyspersję przy wyższych stężeniach lipidów, nawet do 40% [15].

Metoda wysokoobrotowej homogenizacji i dyspersji ultradźwiękami jest dość rozpowszechniona i łatwa w przeprowadzeniu. Fazę lipidową ogrzewa się powyżej temperatury topnienia lipidów i wprowadza substancję aktywną, a następnie dysperguje się w wodnym roztworze surfaktantu. W trakcie procesu, krople emulsji osiągają rozmiary poniżej 1  $\mu\text{m}$ , poprzez energię mechaniczną homogenizatora lub ultradźwięki. Powstaje wówczas układ o wysokiej energii wewnętrznej, co może prowadzić do aglomeracji cząstek lipidu podczas przechowywania. Proces ten można zahamować zwiększając stężenie emulgatora, pamiętając przy tym, że jego nadmiar może prowadzić do toksyczności produktu [16]. Na rysunku 3 przedstawiono schematycznie proces otrzymywania nanocząstek lipidowych z zastosowaniem ultradźwięków.



Rysunek 3. Schemat ogólny otrzymywania nanocząstek lipidowych z zastosowaniem ultradźwięków.

## 6. Ocena właściwości fizykochemicznych otrzymanych NLC

Charakterystyka właściwości fizykochemicznych otrzymanych nanonośników jest możliwa dzięki różnym technikom analitycznym, które z powodzeniem pozwalają określić ich jakość. Kluczowe parametry konieczne do oceny NLC to, m.in.:

- rozmiar oraz rozkład wielkości cząstek,
- potencjał zeta,
- stabilność fizyczna w funkcji czasu (ocena makroskopowa, turbiscan),
- morfologia cząstek,
- lepkość.

Średnia wielkość cząstek oraz rozkład wielkości cząstek, wyrażony zazwyczaj w postaci wskaźnika polidispersyjności (PDI), należą do najważniejszych właściwości NLC, ponieważ określają ich stabilność fizyczną, a także mają wpływ na szybkość uwalniania substancji aktywnej. Sam rozmiar nanostrukturalnych nośników lipidowych zależy od szeregu czynników, jak chociażby składu formułacji czy metody i warunków jej otrzymywania. Średni rozmiar mieści się w zakresie submikronowym i wynosi od kilkudziesięciu do kilkuset nanometrów [9]. W niniejszej pracy pomiary rozmiarów cząstek wykonano przy zastosowaniu instrumentu analitycznego opartego na technice

dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Technika ta pozwala na dokładne, wiarygodne i powtarzalne oszacowanie wielkości cząstek dyspersji. Wymagane stężenie cząstek w zawiesinie wynosi zwykle od 0,001% do 40%. Metoda pomiaru polega na określaniu współczynnika dyfuzji małych cząstek zawieszonych w płynnym ośrodku, dzięki pomiarowi intensywności rozpraszanego przez nie światła. Cząstki rozpraszają światło, powodując fluktuacje natężenia rozproszenia w funkcji czasu. Dzięki korelacji fluktuacji możliwe jest określenie rozkładu wielkości cząstek. Technika DLS umożliwia analizę cząstek o średnicy od kilku nanometrów do około 3 mikronów, czyli takich, które wykazują zauważalne ruchy Browna. Wartość wskaźnika polidispersyjności (PDI), który stosowany jest do określania rozkładu wielkości cząstek, pozwala określić fizyczną stabilność NLC. W celu uzyskania stabilnej dyspersji wartość PDI powinna znajdować się w przedziale 0,1 – 0,5 [17-19].

Ważnym parametrem stosowanym do oceny stabilności dyspersji nanocząstek lipidowych jest także potencjał zeta (ZP). Potencjał zeta (potencjał elektrokinetyczny) nie jest potencjałem powierzchni cząstki. Tworzy się on w miejscu, gdzie stykają się jony znajdujące się na powierzchni fazy zdyspergowanej z jonami fazy ciągłej, czyli na granicy poślizgu. Potencjał ten jest miarą oddziaływania elektrostatycznego między cząstkami, które mogą przemieszczać się względem siebie zachowując się jak niezależne byty. Wysoka wartość potencjału zeta powoduje, że agregacja cząstek jest mniej prawdopodobna, co jest spowodowane odpychaniem między cząstkami. Minimalna wartość potencjału zeta, która pozwala na uzyskanie stabilnego układu wynosi  $\pm 30$  mV. W przypadku wartości około  $\pm 20$  mV można stwierdzić krótkotrwałą stabilność dyspersji. Jeżeli wszystkie cząstki w układzie mają wysoką dodatnią lub ujemną wartość potencjału elektrokinetycznego, wtedy ze względu na taki sam ładunek będą się one wzajemnie odpychać i nie dojdzie do ich agregacji [6,18,20]. Wiele komercyjnych przyrządów stosowanych do pomiaru potencjału zeta jest zintegrowanych z urządzeniami DLS w celu analizy ładunku cząstek oraz ich rozmiaru za pomocą jednego instrumentu analitycznego. W pracy pomiaru średniego rozmiaru cząstek (z-ave), rozkładu wielkości cząstek (PDI) oraz potencjału zeta (ZP) dokonano za pomocą jednego urządzenia (Zetasizer, NanoZS, Malvern Instruments).

Stabilność otrzymanych układów badano także makroskopowo, potwierdzając lub wykluczając mogące wystąpić w czasie procesy destabilizacyjne, jak śmietanowanie czy koalescencja. Po obserwacjach makroskopowych stabilność wytypowanych formuacji dodatkowo potwierdzano za pomocą urządzenia analitycznego Turbiscan Lab<sup>®</sup> Expert



analizującego próbkę przez wsteczne rozpraszanie światła. Metoda ta ma wiele zalet, jest niedestrukcyjna gdyż nie wymaga rozcieńczenia próbki do analizy i daje informacje o mogącym wystąpić w czasie procesie destabilizacji. Pomiary za pomocą urządzenia Turbiscan opierają się na zmienności frakcji objętościowej cząstek (kremowanie/sedymentacja) lub średniej wielkości (koalescencja), co skutkuje zmianami sygnału wstecznego i sygnałów transmisyjnych [21,22]. Sygnały te występują w funkcji czasu i są przedstawione graficznie w postaci dodatnich (wzrost rozproszenia wstecznego) lub ujemnych pików (spadek rozproszenia wstecznego). Gdy profil rozproszenia wstecznego znajduje się w przedziale  $\pm 2\%$  mamy do czynienia ze stabilnym w czasie układem NLC, odchylenia powyżej 10% oznaczają mogącą wystąpić w czasie destabilizację.

Mikroskopia optyczna jest ważną procedurą pozwalającą ustalić czy stosunkowo większe cząstki wykryte za pomocą techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS) są w rzeczywistości cząstkami czy też większymi aglomeratami nanocząstek. Analiza mikroskopowa z zastosowaniem światła spolaryzowanego dostarcza również informacji o obecności kryształów zarówno wynikających z rekrytalizacji matrycy lipidowej jak również kryształów pochodzących od zainkorporowanej substancji aktywnej. W pracy do obserwacji zmian zachodzących w układach nanocząstek lipidowych zastosowano mikroskop optyczny MotiC B1 Series.

Zaawansowane techniki mikroskopowe, jak SEM (skaningowa mikroskopia elektronowa) czy TEM (transmisyjna mikroskopia elektronowa) są często stosowane w celu uzyskania informacji dotyczących rozmiaru cząstki, topografii powierzchni, morfologii oraz wewnętrznej struktury nanostrukturalnych nośników lipidowych. Technika SEM pozwala na uzyskanie trójwymiarowego obrazu powierzchni próbki. Jest ona bombardowana skoncentrowaną wiązką elektronów, a informacja dotycząca morfologii obiektu jest otrzymywana dzięki elektronom wtórnym, które są emitowane z powierzchni próbki. W celu przeprowadzenia analizy NLC muszą one zostać wysuszone, a następnie pokryte złotem lub platyną. Pomiary prowadzone są w warunkach próżni. TEM pozwala na uzyskanie dwuwymiarowych obrazów. Technika ta w porównaniu do SEM charakteryzuje się lepszą zdolnością rozdzielczą i pozwala na uzyskanie informacji o wewnętrznej strukturze nanocząstek lipidowych. Podobnie jak w przypadku SEM próbka musi być w postaci suchego proszku. Ponadto, w celu uzyskania lepszego kontrastu zostaje ona wybarwiona solami metali ciężkich, a jej grubość do analizy nie powinna przekraczać 100 nm [18]. W pracy morfologię



nanocząstek charakteryzowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego pracującego w trybie transmisyjnym (JEOL JSM-7500F).

Najbardziej znany sposób wytwarzania preparatów zawierających nanocząstki lipidowe o pożądanych właściwościach reologicznych obejmuje wprowadzenie dyspersji NLC do produktów do miejscowych zastosowań na skórę, takich jak kremy czy hydrożele. Niestety, tego rodzaju interwencja ma kilka wad polegających, m.in. na ograniczonej, realnej do wprowadzenia do końcowego preparatu, ilości NLC, możliwej niezgodności ze stosowanymi związkami zwiększającymi lepkość i innych bardziej złożonych etapach wytwarzania [23,24]. Dlatego właściwości reologiczne, takie jak lepkość, są bardzo ważnymi parametrami dyspersji NLC przeznaczonych do zastosowań miejscowych [25]. W pracy pomiary lepkości przeprowadzono za pomocą reometru rotacyjnego Brookfield, stosując układ pomiarowy stożek/płytki.

## **7. Krótki opis badań składających się na rozprawę doktorską**

Początkowo przeprowadzone w ramach realizacji pracy doktorskiej badania dotyczyły opracowania parametrów otrzymywania i charakterystyki nanocząstek lipidowych (NLC). Badano zarówno wpływ parametrów otrzymywania jak i składu pre-emulsji na właściwości otrzymanych formulacji. W celu otrzymania optymalnych pod względem właściwości fizykochemicznych dyspersji nanocząstek lipidowych zastosowano kilka rodzajów lipidów stałych (modyfikowany воск pszczeli, behenian glicerolu, palmitynian cetylu, воск z sumaka lakierodajnego) i ciekłych (triglicerydy kaprylowo/kaprynowe, oleinian decylu). Układy stabilizowano różnymi surfaktantami (alkilopoliglukozydami, Tweenem 80, Poloxamerem 188, cholanem sodu) bądź ich mieszaniną. Otrzymane preemulsje poddawano ultrasonifikacji, gdzie zmiennymi parametrami były czas i moc. Średni rozmiar i rozkład wielkości cząstek badano stosując technikę dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Ruchliwość elektroforetyczną cząstek mierzono za pomocą urządzenia Malvern Zetasizer Nano ZS, a przekształceń do wartości potencjału zeta przeprowadzono z zastosowaniem równania Helmholtza-Smoluchowskiego. Morfologię nanocząstek określono za pomocą mikroskopu skaningowego JEOL JSM-7500F pracującego w trybie transmisyjnym. Otrzymane wyniki dowiodły, że zarówno parametry procesu otrzymywania jak i skład mają znaczący wpływ na właściwości i strukturę NLC. Rozmiar optymalnych cząstek mieścił się

w granicach 60-80nm, a wartość potencjału zeta sięgała -30mV. Stabilność tych układów została następnie potwierdzona przez obserwacje makroskopowe [6].

Nanocząstki lipidowe wykazują potencjał jako transdermalne systemy nośników dla słabo rozpuszczalnych, hydrofobowych związków aktywnych, a dodatkowo mogą kontrolować ich uwalnianie i zmniejszać ogólnoustrojowy efekt uboczny [26]. Zrozumiałym jest zatem fakt, że dobór odpowiednich układów NLC odgrywa kluczową rolę w transdermalnym dostarczaniu substancji czynnych.

Głównym założeniem kolejnego etapu badań składających się na niniejszą rozprawę była ocena potencjału wytypowanych formułacji NLC jako systemów nośnikowych dla wybranych związków z grupy mono-, di- i triterpenów. Przedstawicielem monoterpenów był kwas geraniowy, który oprócz tego, że jest znany ze swych właściwości przeciwrzybiczych [27], może także działać jako środek depigmentacyjny dla skóry, gdyż jest inhibitorem tyrozynazy [28]. Forskolina, przedstawiciel diterpenów, wykazuje korzyści terapeutyczne w objawach łuszczycy i reguluje poziom cAMP w komórkach skóry [29]. Co więcej, dowiedziono, że związek ten wykazuje aktywność przeciwnowotworową [30,31]. Jest ona również naturalną substancją pozwalającą uzyskać zdrową opaleniznę [32]. Reprezentantem triterpenów był kwas ursolowy, który jest bardzo dobrze znany ze swych właściwości antyoksydacyjnych [33], przeciwzapalnych [34] oraz immunoregulacyjnych [35]. Ponadto, kwas ursolowy wykazuje działanie hepatoprotekcyjne i przeciwnowotworowe [36,37].

W ramach badań rozpatrywano wpływ struktury chemicznej substancji aktywnych na profile uwalniania, oraz oceniono właściwości fizykochemiczne NLC z wybranymi terpenami [7]. Układy otrzymano metodą homogenizacji ultradźwiękowej stosując wytypowane w wyniku wcześniejszych badań, optymalne receptury nanocząstek lipidowych. Charakteryzowały się one sferycznym kształtem i stosunkową jednorodnością (analiza SEM), a średni rozmiar cząstek wynosił 101, 106 i 98 nm, odpowiednio dla NLC z kwasem geraniowym, forskoliną i kwasem ursolowym (analiza DLS). Wartości potencjału zeta formułacji były bliskie -30 mV wskazując na ich dobrą stabilność fizyczną. Badania *in vitro* uwalniania substancji aktywnych z NLC przeprowadzono metodą dializacyjną [38] stosując membrany celulozowe (Spectra/Por® Dialysis Membrane) oraz mieszaninę PBS/etanol jako roztwór akceptorowy. Wyniki badań wykazały, że struktura chemiczna substancji aktywnej wpływa na proces jej uwalnianie z nośnika NLC. Badane mono-, di- i triterpeny uwolniły się z nanocząstek lipidowych w stosunkowo dużej ilości, (56,8% - kwas geraniowy, 55,6% - forskolina

i 61,7% - kwas ursolowy). Otrzymane profile uwalniania charakteryzował przebieg dwufazowy z gwałtownym wyrzutem w ciągu pierwszych kilku godzin, po którym nastąpiło stopniowe uwalnianie. Przeprowadzone badania potwierdziły duży potencjał nanocząstek lipidowych jako systemów dostarczania aktywnych związków terpenowych zarówno do natychmiastowego jak i przedłużonego w czasie uwalniania. Biorąc pod uwagę wprowadzanie substancji aktywnych do skóry, istotne jest zarówno szybkie jej uwalnianie w początkowych godzinach kontaktu preparatu ze skórą (np. w przypadku kosmetyków), jak również stopniowe, przedłużone w czasie, zapewniające dostarczania leku przez dłuższy okres czasu.

By dodatkowo potwierdzić potencjał aplikacyjny wytypowanych nanocząstek jako obiecujących systemów dostarczania hydrofobowych związków aktywnych, przeprowadzono próby otrzymania stabilnych formułacji z kwasem  $\alpha$ -liponowym (ALA). Jako naturalny antyoksydant, kwas ten cieszy się w ostatnim czasie coraz większym zainteresowaniem. Działanie przeciwutleniające kwasu liponowego, jak i jego zredukowanej formy – kwasu dihydroliponowego (DHLA), polega na reagowaniu z wolnymi rodnikami i reaktywnymi formami tlenu w celu ich unieszkodliwienia. W reakcji kwasu liponowego z wolnym rodnikiem powstaje kationorodnik kwasu liponowego, który stanowi zdecydowanie mniejsze zagrożenie dla komórek niż np. rodnik hydroksylowy. Kationorodnik ALA jest łatwo przeprowadzany w kwas liponowy dzięki innym przeciwutleniaczom wewnątrzkomórkowym, które następnie są regenerowane przez DHLA. Proces ten prowadzi do ostatecznego wyeliminowania wolnego rodnika [39]. Dodatkowo, ALA i DHLA wspomaga regenerację przeciwutleniaczy wewnątrzkomórkowych takich jak witamina C czy E, a także zredukowanej formy glutationu [40]. Co więcej, ALA ma zdolność do chelatowania metali ciężkich, a ostatnio wykazano również jego działanie przeciwzapalne [41]. Z racji swoich właściwości jest potencjalnym związkiem do stosowania w kosmetykach anti-ageing, ponieważ może zapobiegać skutkom stresu fotooksydacyjnego w skórze. Jednakże ze względu na jego wysoką lipofilowość zastosowanie ALA w tradycyjnych nośnikach, takich jak emulsja, jest znacznie utrudnione. Dodatkowym problemem jest fakt, że kwas ten jest wyjątkowo podatny na degradację przez światło słoneczne i charakteryzuje się nieprzyjemnym zapachem związków siarki [42].

Aby uniknąć wyżej wymienionych trudności i poprawić stabilność fizykochemiczną kwasu  $\alpha$ -liponowego zaincorporowano go do, opartych na modyfikowanym wosku pszczelim i triglicerydach karylowo/kaprynowych,

nanostukturalnych nośników lipidowych [8]. Głównym celem badań na tym etapie pracy doktorskiej było przygotowanie układów nośnikowych o różnym stosunku lipidu stałego do ciekłego, przeznaczonych do miejscowego podania kwasu liponowego. Możliwość zastosowania preparatów ALA-NLC została zilustrowana przez kompleksową charakterystykę nośników. Określono profil uwalniania substancji czynnej wraz z właściwościami fizykochemicznymi NLC obciążonych substancją aktywną. Dodatkowo zbadano kinetykę uwalniania kwasu liponowego przez dopasowanie danych eksperymentalnych do czterech modeli kinetycznych: zerowego rzędu, pierwszego rzędu, Higuchi'ego, Korsmeyer'a – Peppas'a. W celu określenia mechanizmu uwalniania kwasu liponowego obliczono wykładnik uwalniania dyfuzyjnego ( $n$ ) [43], zaś wybór najlepiej pasującego modelu kinetycznego oparto na porównaniu współczynnika determinacji ( $R^2$ ). Opracowane formułacje charakteryzowały się dobrą stabilnością fizykochemiczną i odpowiednimi właściwościami reologicznymi. Uwalnianie ALA z systemów NLC okazało się, podobnie jak w przypadku terpenów, dwuetapowe, z początkowym „wyrzutem” substancji aktywnej, a następnie stopniowym uwalnianiem w czasie. Stężenie fazy lipidowej i stosunek lipidów stałych do ciekłych wpływały na szybkość uwalniania ALA z preparatów. Kinetyka uwalniania substancji aktywnej przebiegała zgodnie z modelami matematycznymi zakładającymi, że głównym czynnikiem wpływającym na kinetykę uwalniania substancji aktywnej z NLC jest proces dyfuzji. W przypadku formułacji o mniejszym stężeniu emulgatora, kinetyka przebiegała zgodnie z modelem Higuchi'ego, co wskazuje, że proces uwalniania substancji czynnej z NLC jest złożony. Oprócz dyfuzji, na uwalnianie substancji aktywnej może wpływać erozja matrycy lipidowej [44].

Wyniki potwierdzają, że otrzymane układy mogą być obiecującym rozwiązaniem dla kontrolowanego uwalniania kwasu liponowego z preparatów do zastosowań na skórę.

Ostatni etap przeprowadzonych w ramach realizacji pracy doktorskiej badań obejmował analizę *in vitro* przenikania wybranej substancji aktywnej przez skórę [9]. Jako substancję aktywną wytypowano forskolinę, zaś jako optymalną formułację, NLC otrzymane metodą homogenizacji pod zwiększonym ciśnieniem (HPH). Badanie przenikania przeprowadzono stosując jako membranę skórę ludzką, pochodzącą z zabiegów chirurgii plastycznej. Przed każdym eksperymentem oceniano integralność skóry mierząc transepidermalną utratę wody (TEWL). Badania prowadzono przy użyciu systemu MicroettePlusR (Hanson Research, USA), w komorach Franza, w temperaturze 32°C, stosując mieszaninę PBS/etanol (60:40, V/V) jako roztwór akceptorowy. Próbkę roztworu do analizy, (w celu pomiaru u stężenia stosowano technikę HPLC), pobierano

automatycznie przez 24 godziny. W celach porównawczych badano także przenikanie forskoliny z nanaoemulsji o podobnym składzie.

Wyniki potwierdziły, że otrzymane preparaty NLC można zastosować jako skuteczne systemy do kontrolowanego uwalniania forskoliny przez skórę, np. jako nośniki dla preparatów o dużym potencjale w leczeniu raka skóry, ze względu na właściwości samej substancji aktywnej.

Dokładny opis wszystkich eksperymentów, materiałów, metod analitycznych oraz dyskusja wyników znajdują się w publikacjach [Lasoń, *Acta Biochim Pol*, 2013], [Lasoń, *Colloid Surface A*, 2016], [Lasoń, *Colloid Surface A*, 2017], [Lasoń, *Acta Biochim Pol*, 2018], stanowiących załączniki do pracy. W publikacjach można odnaleźć także krytyczny przegląd literatury światowej omawiającej problemy w recepturowaniu i dostarczaniu hydrofobowych i wrażliwych substancji czynnych oraz zalety wynikające z zastosowania w tym celu nanostrukturalnych nośników lipidowych.

## 8. Podsumowanie przeprowadzonych badań

W ramach pracy doktorskiej otrzymano i scharakteryzowano, pod kątem właściwości fizykochemicznych, szereg formułacji nanostrukturalnych nośników lipidowych (NLC). Najważniejsze osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych badań to:

- wykazanie, że zarówno skład jak i parametry procesu otrzymywania znacząco wpływają na właściwości NLC,
- potwierdzenie, że obydwie metody otrzymywania formułacji NLC (HPH i ultrasonifikacja) pozwalają otrzymać stabilne układy ze związkiem aktywnym,
- wskazanie optymalnych formułacji nanostrukturalnych nośników lipidowych opartych na biodegradowalnych i biozgodnych surowcach, jako potencjalnych nośników substancji aktywnych do zastosowań dermatologicznych,
- otrzymanie stabilnych układów nośnikowych dla związków z grupy mono-, di- i triterpenów o zadowalających właściwościach fizykochemicznych (średni rozmiar cząstek i potencjał zeta) oraz reologicznych,

- wykazanie, że badane terpeny, w tym kwas geraniowy, forskolina i kwas ursolowy, uwalniają się z NLC w stosunkowo dużych ilościach, a ich struktura chemiczna wpływa na profile uwalniania,
- potwierdzenie na przykładzie kwasu  $\alpha$ -liponowego, że opracowane formułacje NLC stanowią obiecujący nośnik dla zwiększenia stężenia i wydłużenia trwałości substancji aktywnej,
- zwrócenie uwagi na dwufazowy profil uwalniania substancji aktywnych z NLC, z szybkim początkowym przebiegiem i stopniowym uwalnianiem w drugim etapie; obydwa etapy są interesujące w przypadku preparatów nanoszonych na skórę, pierwszy może być przydatny w celu poprawy przenikania składników aktywnych, drugi w przypadku przedłużonego i kontrolowanego w czasie dostarczania związków czynnych przez skórę,
- wykazanie, że modele matematyczne Higuchi'ego oraz Korsmeyer'a – Peppas'a najlepiej opisują kinetykę uwalniania z NLC lipofilowych substancji aktywnych,
- wykazanie na podstawie badań *in vitro* przenikania przez skórę, że otrzymane układy NLC można zastosować jako skuteczne systemy do kontrolowanego dostarczania związków aktywnych, takich jak forskolina, do głębszych warstw skóry.

Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdzają, że przygotowane układy są odpowiednimi nośnikami do kontrolowanego uwalniania badanych związków aktywnych i mogą być obiecującym rozwiązaniem dla dostarczania lipofilowych substancji czynnych przez skórę.

## Spis literatury

1. R. Saraceno, A. Chiricozzi, M. Gabellini, S. Chimenti, Emerging applications of nanomedicine in dermatology, *Skin Research and Technology*, 2013, 19: 13–19.
2. D.M. Moss, M. Siccardi, Optimizing nanomedicine pharmacokinetics using physiologically based pharmacokinetics modelling, *British Journal of Pharmacology*, 2014, 171: 3963–3979.
3. D.J. Bharali, M. Khalil, M. Gurbuz, T.M. Simone, S.A. Mousa, Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers, *Int. J Nanomedicine*, 2009, 4:1-7.
4. D. Papakostas, F. Rancan, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, A. Vogt, Nanoparticles in dermatology, *Arch Dermatol Res.*, 2011, 303: 533-550.
5. M. Uner, G. Yener, Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives, *Int. J Nanomedicine*, 2007, 2(3): 289-300.
6. E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation, *Acta Biochimica Polonica*, 2013, 60(4): 773–777.
7. E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, M. Tabaszewska, Ł. Skoczylas, Release study of selected terpenes from nanostructured lipid carriers, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2016, 51: 87–92.
8. E. Lasoń, E. Sikora, M. Miastkowska, P. Socha, J. Ogonowski, NLC delivery systems for alpha lipoic acid: Physicochemical characteristics and release study, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2017, 532: 57–62.
9. E. Lasoń, E. Sikora, M. Miastkowska, E. Escibano, M. J. Garcia-Celma, C. Solans, M. Llinas, J. Ogonowski, NLC as a potential carrier system for transdermal delivery of forskolin, *Acta Biochimica Polonica*, 2018, 65: [https://doi.org/10.18388/abp.2017\\_](https://doi.org/10.18388/abp.2017_)
10. J. Pardeike, A. Hommoss, R.H. Müller, Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *Int. J. Pharm.*, 2009, 366: 170–184.
11. J. Wiechers, J.W. Solutions, E.B. Souto, Delivering Actives via Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Part I, *Cosmetic and Toiletries*, 2010



12. E. Lasoń, J. Ogonowski, Stałe Nanocząsteczki Lipidowe - charakterystyka, zastosowanie i otrzymywanie, *Chemik*, 2011, 10: 960-967.
13. R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, 54 (1): 131–155.
14. M. Sala, R. Diab, A. Elaissari, H. Fessi, Lipid nanocarriers as drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications, *Int. J. Pharm.* 2018, 535: 1-17.
15. A. Lippacher, R.H. Muller, K. Mader, Investigation on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers, *Int. J. Pharm.*, 2000, 196: 227-230.
16. M. Üner, G. Yener, Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives, *Int. J. Nanomed.*, 2007, 2(3): 289–300.
17. K.L. Guimarães, M.I. Ré, Lipid nanoparticles as carriers for cosmetic ingredients: The first (SLN) and the second generation (NLC). In: Beck R, Guterres S, Pohlmann A, editors. *Nanocosmetics and Nanomedicines: New approaches for skin care*. Germany: Springer; 2011.
18. F. Tamjidi, M. Shahedi, J. Varshosaz, A. Nasirpour, Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2013.
19. B. Baroli, Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality?, *J. Pharm. Sci.*, 2010, 99: 21–50.
20. K. Mitri, R. Shegokar, S. Gohla, C. Anselmi, R.H. Müller, Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *Int. J. Pharm*, 2011, 414(1-2): 267–275.
21. D. Paolino, A.H.S. Stancampiano, F. Cilurzo, D. Cosco, G. Puglisi, R. Pignatello, Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for the Topical Delivery of Lutein, *Drug Deliv. Letters*, 2011, 1: 32-39.
22. G. Caldero, M.J. Garcia-Celma, C. Solans, Formation of polymeric nano-emulsions by a low-energy method and their use for nanoparticle preparation. *J Colloid Interface Sci.*, 2011, 353(2): 406–411.
23. M. Joshi, V. Patravale, Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib, *Int. J. Pharm.*, 2008, 346: 124–132.



24. V.B. Junyaprasert, V. Teeranachaideekul, E.B. Souto, P. Boonme, R.H. Müller, Q10- loaded NLC versus nanoemulsions: stability, rheology and in vitro skin permeation, *Int. J. Pharm.*, 2009, 377: 207–214.
25. Y. Yang, A. Corona III, S.R. Bhatia, M.A. Henson, The controlled aggregation and tunable viscosity of nanostructured lipid carrier dispersions, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2015, 482: 138–147.
26. H. Chen, Y. Wang, Y. Zhai, G. Zhai, Z. Wang, J. Liu, Development of a ropivacaine-loaded nanostructured lipid carrier formulation for transdermal delivery, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 2015, 465: 130–136.
27. T. Yang, G. Stoopen, N. Yalpani, J. Vervoort, R. de Vos, A. Voster, F. Verstappen, H. Bouwmeester, M. Jongsma, Metabolic engineering of geranic acid in maize to achieve fungal resistance is compromised by novel glycosylation patterns, *Metab. Eng.*, 2011, 13: 414–425.
28. S. Choi, Inhibitory effects of geranic acid derivatives on melanin biosynthesis, *J. Cosmet. Sci.*, 2012, 63: 351–358.
29. H. Ammon, A. Müller, Forskolin: from an ayurvedic remedy to a modern agent, *Planta Med.*, 1985, 51: 473–477.
30. J. Caprioli, M. Sears, Combined effect of forskolin and acetazolamide on IOP and aqueous flow in rabbit eye, *Exp. Eye Res.*, 1984, 39: 47–50.
31. H. Shivaprasad, S. Pandit, M. Bhanumathy, D. Manohar, V. Jain, S. Afsar, X. Su, Ethnopharmacological and phytomedical knowledge of *Coleus forskohlii*: an approach towards its safety and therapeutic value, *Orient. Pharm. Exp. Med.*, 2014, 14: 301–312.
32. M. Spry, J. Vanover, T. Scott, O. Abona-Ama, K. Wakamatsu, S. Ito, J. D’Orazio, Prolonged treatment of fair-skinned mice with topical forskolin causes persistent tanning and UV protection, *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2009, 22: 219–229.
33. S. Balanehru, B. Nagarajan, Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation, *Biochem. Int.*, 1991, 24: 981–990.
34. Z. Ovesna, A. Vachalkova, K. Horvathova, D. Tothova, Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds Minireview, *Neoplasma*, 2004, 51: 327–333.

35. T. Raphael, G. Kuttan, Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system, *Phytomedicine*, 2003, 10: 483–489.
36. E. de Oliveira, J. Saraiva, S. de Albuquerque, J. Marchetti, Solid dispersion of ursolic acid in Gelucire 50/13: a strategy to enhance drug release and trypanocidal activity, *AAPS PharmSciTech*, 2012, 13: 1436–1445.
37. G. Li, X. Zhang, J. You, Y. Song, Z. Sun, L. Xia, Y. Suo, Highly sensitive and selective pre-column derivatization high-performance liquid chromatography approach for rapid determination of triterpenes oleanolic and ursolic acids and application to *Swertia* species: optimization of triterpenic acids extraction and pre-column derivatization using response surface methodology, *Anal. Chim. Acta*, 2011, 688: 208–218.
38. W. Hanson, Theoretical concepts, in: *Handbook of Dissolution Testing*, Pharmaceutical Technology Publications, 1982.
39. Y. Li, Y. Zhao, W. Yu, Scavenging ability on ROS of alpha-lipoic acid (ALA), *J. Food Chem.*, 2004, 84: 563–567.
40. J. Wang, Q. Xia, Alpha-lipoic acid-loaded nanostructured lipid carrier: sustained release and biocompatibility to HaCaT cells in vitro, *Drug Deliv.*, 2014, 21: 328–341.
41. S. Salinthon, R.V. Schillace, C. Tsang, et al., Lipoic acid stimulates cAMP production via G protein-coupled receptor-dependent and independent mechanisms, *J. Nutr. Biochem.*, 2011, 22: 681–690.
42. J. Wang, J. Tang, X. Zhou, Q. Xia, Physicochemical characterization, identification and improved photo-stability of lipoic acid-loaded nanostructured lipid carrier, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2014, 40: 201–210.
43. S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Pol. Pharm.*, 2010, 67(3): 217–233.
44. M. Pradhan, D. Singh, S.N. Murthy, M.R. Singh, Design, characterization and skin permeating potential of Fluocinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis, *Steroids*, 2015, 101: 56–63.

## Dorobek naukowy

Publikacje naukowe (\* - autor korespondencyjny, IF - pięcioletni Impact Factor na podstawie *Journal Citation Reports*):

1. **E. Lasoń\***, E. Sikora, M. Miastkowska, E. Escibano, M. J. Garcia-Celma, C. Solans, M. Llinas, J. Ogonowski, NLC as a potential carrier system for transdermal delivery of forskolin, *Acta Biochimica Polonica*, 2018, 65: *In press*. **IF: 1.463**
2. M. Miastkowska\*, M. Konieczna, **E. Lasoń**, M. Tabaszewska, E. Sikora, J. Ogonowski, The release of perillyl alcohol from the different kind of vehicles, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2018, 19(7): 573-580. system for transdermal delivery of forskolin, *Acta Biochimica Polonica*, 2018, *In press*. **IF: 2.14**
3. M. Miastkowska\*, E. Sikora, **E. Lasoń**, M.J. Garcia-Celma, E. Escibano-Ferrer, C. Solans, M. Llinas, Nano-emulsions as vehicles for topical delivery of forskolin, *Acta Biochimica Polonica*, 2017, 64(4): 713-718. **IF: 1.463**
4. **E. Lasoń\***, E. Sikora, M. Miastkowska, P. Socha, J. Ogonowski, NLC delivery systems for alpha lipoic acid, Physicochemical characteristics and release study, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2017, 532: 57-62. **IF: 2.838**
5. **E. Lasoń\***, E. Sikora, M. Miastkowska, J. Ogonowski, Nanocząstki lipidowe jako nowy system nośników ekologicznych środków ochrony roślin, *Przemysł Chemiczny*, 2016, 95(10): 1924-1927. **IF: 0.385**
6. **E. Lasoń\***, E. Sikora, J. Ogonowski, M. Tabaszewska, Ł. Skoczylas, Release study of selected terpenes from nanostructured lipid carriers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2016, 510: 87-92. **IF: 2.838**
7. M. Miastkowska\*, A. Michalczyk, D. Belechowicz, E. Sikora, **E. Lasoń**, K. Matras-Postołek, J. Ogonowski, Nanoemulsje na bazie aldehydu cytrynowego jako nowoczesne środki o działaniu grzybobójczym, *Przemysł Chemiczny*, 2016, 95(10): 1932-1935. **IF: 0.385**

8. **E. Lasoń\***, E. Sikora, J. Ogonowski, Nanocząstki lipidowe jako forma ochrony olejów bogatych w NNKT pozyskanych na drodze ekstrakcji nadkrytycznym CO<sub>2</sub>, *Ekokosmetyki*, 2016, 79-88.
9. **E. Lasoń\***, E. Sikora, J. Ogonowski, Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers demonstrating the stabilizing effect against peroxidation of strawberry and black currant seed oils, *Agro FOOD Industry Hi Tech*, 2015, 17-21. **IF: 0.225**
10. E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, Nanocząstki lipidowe jako nośniki bioaktywnych substancji kosmetycznych i farmaceutycznych, *Ziółolecznictwo, biokosmetyki, żywność funkcjonalna*, 2015, 228-237.
11. **E. Lasoń\***, E. Sikora, J. Ogonowski, Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation, *Acta Biochimica Polonica*, 2013, **60**(4): 773–777. **IF: 1.463**
12. J. Kwaśny, O. Vogt, **E. Lasoń**, Wpływ sposobu pozyskiwania olejków eterycznych z wybranych roślin baldaszkowatych (Apiaceae) na ich skład chemiczny, *Przemysł Chemiczny*, 2012, **91**(11): 2136-2141. **IF: 0.385**
13. J. Kwaśny, O. Vogt, **E. Lasoń**, Analiza instrumentalna kompozycji olejków eterycznych z roślin baldaszkowatych (apiaceae) na przykładzie olejku anyżowego, *Czasopismo Techniczne*, 2012
14. **E. Lasoń\***, J. Ogonowski, Solid Lipid Nanoparticles – characteristics, application and obtaining, *Chemik*, 2011, **65**(10): 960-967.
15. **E. Lasoń\***, Ogonowski J., Lipase – characterization, applications and method of immobilization, *Chemik*, 2010, **64**, 97-102.
16. **E. Lasoń\***, Ogonowski J., Microencapsulation in cosmetics, *Polish Journal of Commodity Science*, 2010, 4 (25): 97-105.

Inne osiągnięcia naukowe:

**a) granty i projekty badawcze** (numer projektu, źródło finansowania, tytuł, miejsce realizacji, pełniona funkcja):

- PK:C-2/625/2011, Opracowanie 9 innowacyjnych produktów - receptur profesjonalnych kosmetyków naturalnych o działaniu regenerującym i

przeciwstarzeniowym, do pielęgnacji skóry, zgodnych z regułami Ecocert, (2011-2013), Politechnika Krakowska - wykonawca

- C-2/333/2014/DS-M, MNiSW, Nanocząstki Lipidowe jako nośniki wybranych przedstawicieli terpenów w transporcie przezskórnym, Politechnika Krakowska – kierownik grantu
- PK:C-2/410/2016/P, na zlecenie firmy FHU Ars et Natura Agnieszka Hoborowicz, Opracowanie receptur i określenie właściwości fizykochemicznych określonych produktów kosmetycznych, (2016), Politechnika Krakowska – wykonawca
- RPMA.01.02.00-14-5729/16, realizowany we współpracy z firmą Finea Sp. z o.o., Stworzenie ekologicznych, bezpiecznych w stosowaniu perfum na bazie wody, z udziałem kompozycji zapachowych nie zawierających alergenów, Politechnika Krakowska – wykonawca
- C-2/500/2018/DS-M, MNSiW, Optymalizacja składu ilościowego i jakościowego emulsji wielokrotnych, Politechnika Krakowska - wykonawca

**b) staże naukowe** (państwo, nazwa instytucji, charakter pobytu, okres pobytu):

- Hiszpania (Barcelona), Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC), trzymiesięczny zagraniczny staż naukowy, wrzesień – grudzień 2012
- Polska, Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera, Polska Akademia Nauk, staż naukowy, lipiec - wrzesień 2013

**c) staże przemysłowe** (państwo, nazwa instytucji, charakter pobytu, okres pobytu):

- Polska, Laboratorium Analiz Kosmetycznych NOVA, trzymiesięczny staż przemysłowy, czerwiec - sierpień 2013

**d) zgłoszenia patentowe**

- P.413254, Formulacja nanostrukturalnych nośników lipidowych i sposób jej wytwarzania, E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, 2015
- P.413255, Formulacja nanostrukturalnych nośników lipidowych i sposób jej wytwarzania, E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, 2015

- P.426104, “Sposób wytwarzania perfum bez alkoholowych”, wniosek o udzieleni patentu przyjęty w UP 28.06.2018
- P.426105, “Perfumy bez alkoholowe i sposób wytwarzania perfum bez alkoholowych”, wniosek o udzieleni patentu przyjęty w UP 28.06.2018

#### e) wdrożenia

- Licencja – PK dla Warszawskiego Domu Kosmetyków sp. z o.o. na wynalazek P.413254, Formulacja nanostrukturalnych nośników lipidowych i sposób jej wytwarzania – umowa licencyjna podpisana 16.02.2016
- Licencja – PK dla firmy Euphora na wynalazek P. 413255, Formulacja nanostrukturalnych nośników lipidowych i sposób jej wytwarzania – umowa podpisana 29.07.2016

#### f) inne osiągnięcia

- monografia w języku polskim  
E. Lasoń, K. Nowak, J. Ogonowski, M. Olszańska, K. Rutkowski, E. Sikora, K. Śliwa, *Ćwiczenia laboratoryjne z technologii kosmetyków*, Skrypt akademicki, Wydawnictwo PK, Kraków 2013, ISBN 978-83-7242-751-9
- autor i współautor licznych doniesień konferencyjnych zagranicznych i polskich:
  1. E. Lasoń, E. Sikora, M. Miastkowska, E. Escibano, M.J. Garcia-Celma, C. Solans, M. Llinas, J. Ogonowski, *NLC as a potential carrier system for transdermal delivery of forskolin*, 6th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech 2013, Krakow, Poland, 11-14 wrzesień 2017
  2. E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, *Nanocząstki lipidowe jako forma produktów kosmetycznych*, I Konferencja Naukowa pt. Chemia dla urody i zdrowia, Toruń, 8-10 czerwiec 2017
  3. E. Lasoń, P. Socha., E. Sikora, M. Miastkowska, J. Ogonowski, *Formation of stable NLC delivery systems for alpha lipoic acid: physicochemical characteristics and release study*, 30th Conference European Colloid and Interface Society, Rzym, Włochy, 4-9 września 2016
  4. E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, *Release study of selected terpenes from*

- nanostructured lipid carriers*, 29th Conference European Colloid and Interface Society, Bordeaux, Francja, 6-11 września 2015
5. E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, *Nanocząstki lipidowe jako nośniki bioaktywnych substancji kosmetycznych i farmaceutycznych*, II Międzynarodową konferencja w Krośnie, 6-7 maj 2015
  6. E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, B. Betcher, *Nanocząstki lipidowe jako forma ochrony przed promieniowaniem ultrafioletowym*, Kongres Technologiczny, wrzesień 2015
  7. E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, *Nanocząstki lipidowe jako potencjalne nośniki ekologicznych środków ochrony roślin*, XXXIX Międzynarodowe Seminarium naukowo-Techniczne Chemistry for Agriculture, Karpacz, 23-26 listopad 2014
  8. N. Orrego, M.J. García-Celma, E. Lasoń, M. Jaworska, R.M. Lamuela-Raventós, C. Solans, E. Escibano, E. Sikora, *In vitro skin permeation of an antioxidant from nanostructured lipid carriers*, Sisena Jornada de l'Institut de Nanociència I Nanotecnologia (IN2UB), Barcelona, Hiszpania, 5 czerwiec 2014
  9. E. Escibano, M. Jaworska, E. Lasoń, E. Sikora, M. Llinàs, C. Solans, M.J. García-Celma, *Nano-emulsions and nanostructured lipid carriers for transdermal delivery of forskolin*, Sisena Jornada de l'Institut de Nanociència I Nanotecnologia (IN2UB), Barcelona, Hiszpania, 5 czerwiec 2014
  10. E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, *Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation*, 5<sup>th</sup> Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech 2013, Krakow, Poland, 8-11 październik 2013
  11. E. Escibano, M.J. García-Celma, N. Orrego, E. Lasoń, M. Jaworska, E. Sikora, R.M. Lamuela-Raventós, C. Solans, *Influence of formulation on in vitro skin permeation of naringenin*, 24<sup>th</sup> Skin Permeation Modelling Symposium, London, UK, 25 czerwiec 2013
  12. M. Jaworska, E. Sikora, E. Lasoń, M.J. Garcia-Celma, E. Escibano, C. Solans, *The influence of active substance structure on their release from nano-emulsions*, 27th Conference European Colloid and Interface Society, Sofia, Bułgaria, 1-6 wrzesień 2013

13. E. Lasoń, M. Jaworska, E. Sikora, C. Solans, *NLC as a potential carrier system for chemically labile active compounds*, 27th Conference European Colloid and Interface Society, Sofia, Bułgaria, 1-6 wrzesień 2013
14. M. Jaworska, E. Sikora, E. Lasoń, M. Llinas, M.J. Garcia-Celma, E. Escibano, C. Solans, *Effect of Caprylic/Capric Triglyceride-based nanoemulsion on the skin permeation of forskolin*, NanoFormulation 2013 Conference, Manchester, UK, 18-21 czerwiec 2013
15. E. Lasoń, E. Sikora, M. Jaworska, M. Llinas, M.J. Garcia-Celma, E. Escibano, C. Solans, *Optimization of NLC formulations for transdermal delivery of forskolin*, NanoFormulation 2013 Conference, Manchester, UK, 18-21 czerwiec 2013
16. E. Lasoń, O. Vogt, J. Ogonowski, *Porównanie metod izolacji substancji aktywnych biologicznie z materiału roślinnego*, I Międzynarodowa Konferencja Ziołolecznictwo, Biokosmetyki i Żywność Funkcjonalna, Krosno 2013
17. E. Lasoń, *Nanocząstki lipidowe – nowatorskie podejście w dostarczaniu substancji aktywnych biologicznie*, Konferencja naukowa „Promocja zdrowia wyzwaniem XXI w.”, Krakowska Wyższa Szkoła Promocji Zdrowia, Kraków 2012

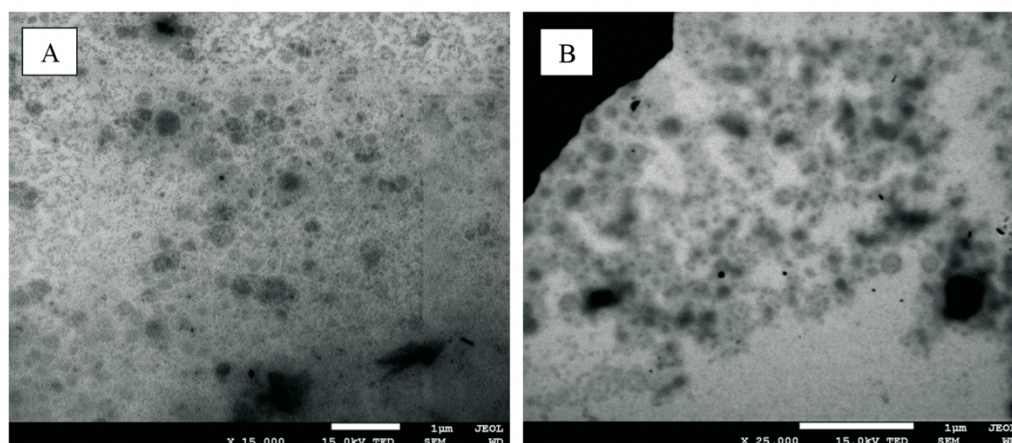


## Załączniki

Przedruk publikacji [Lasoń, Acta Biochim Pol, 2013]

[Lasoń, Acta Biochim Pol, 2013]

E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation, Acta Biochimica Polonica, 2013, Vol. 60, No 4, 773–777.



## Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation\*

Elwira Lason<sup>✉</sup>, Elżbieta Sikora and Jan Ogonowski

Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, Kraków, Poland

Nanostructured lipid carriers (NLC) are stable colloidal formulations with notable advantages for drug delivery systems. Thanks to their physicochemical stability, biocompatibility, biodegradability and controlled drug release, they have received increasing attention for the last several years. The aim of the study was to prepare and characterize nanostructured lipid carriers (NLC). Both, the effect of the process parameters and the effect of the preemulsion composition on the NLC properties were investigated. In the work, different type of surfactants (i.e. decyl glucoside, Poloxamer188, Tween 80, sodium cholate) and their combinations were used to stabilize NLC dispersions. Moreover, several kinds of solid lipids (modified beeswax, glyceryl behenate, cetyl palmitate and berry wax) and liquid lipids (caprylic/capric triglyceride and decyl oleate) were applied. An ultrasonication method using a probe type sonicator was used to obtain NLC, and the time and energy of the process were modified throughout. The physicochemical properties of the formulations, such as particle size, size distribution, polydispersity index were studied using the dynamic light scattering (DLS) method. The electrophoretic mobility of obtained particles was also measured, using the Zetasizer Nano ZS Malvern Instrument based on the Laser Doppler Velocimetry (LDV) technique. Knowing the value of electrophoretic mobility of particles for given conditions, the zeta potential was determined. The obtained results showed that the process parameters and the composition of the preemulsion had significant impact on the nanoparticles structure. The optimal formulations size ranged between 60 and 80 nm, and the value of their zeta potential was up to  $-30\text{mV}$ . The stability of these systems was further confirmed by macroscopic observation.

**Key words:** nanostructured lipid carriers, NLC, liquid lipids, solid lipids, ultrasonication

**Received:** 14 October, 2013; **revised:** 04 December, 2013; **accepted:** 04 December, 2013; **available on-line:** 29 December, 2013

### INTRODUCTION

Nanosized drug delivery systems have been intensively investigated in recent years (Saraf *et al.*, 2011a; Saraf *et al.*, 2011b). They can generally be divided into two groups: polymeric and lipidic systems. The number of products containing polymeric nanoparticles on the market, is restricted due to the toxicity of polymers and a lack of proper large-scale production techniques. That is why a great deal of interest has been focused on lipid-based carriers represented by solid lipid nanoparticles

(SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) (Sawant *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). Both of them can be widely applied to deliver active ingredients through oral, parenteral and topical routes (Almeida *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2007; Schafer-Korting *et al.*, 2007).

SLN are prepared by replacing the liquid lipid (oil) of an oil in water (o/w) emulsion with a solid lipid or a blend of solid lipids. These lipids consist of biodegradable, physiological lipids or lipidic substances and stabilizers, which are generally recognized as safe (GRAS) (Das *et al.*, 2011). However, there are some potential limitations concerning SLN's structure. During storage, they can transform to the low energy, more ordered  $\beta$  modification. Due to their high degree of order, the number of imperfections in the crystal lattice is reduced, leading to active ingredient expulsion within a short period of time (Westesen *et al.*, 1997). NLC were introduced to overcome the potential difficulties with the SLN's structure. They are composed of the blend of solid and liquid lipids (oils), which induces a melting point depression compared to the pure solid lipid, but the particles are still solid at room and body temperature. The incorporation of liquid lipids in those structures inhibits the crystallization process by mixing "spatially" different molecules. This results in significant differences in the particle matrix structure. NLC possess many imperfections, which supports an increase in active loading capacity and a decrease in or avoidance of active substance expulsion during storage (Müller *et al.*, 2002a; Radtke *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2006).

Lipid nanoparticles can be produced by various traditional dispersion techniques. Considering industrial needs, high pressure homogenization is conventionally, the most preferred and popular method for the preparation of these nanocarriers (Müller *et al.*, 1995; Pardeike *et al.*, 2009). However, ultrasonic dispersion may offer an appropriate alternative for the laboratory scale, due to a relatively low cost of the apparatus and, what is also very important, a rapid nature of production (Schwarz *et al.*, 2012).

Most of the reports about lipid nanoparticles focus on certain bioactive-loaded carriers. Entrapment efficiency, loading capacity, release profile and stability of active in these formulas are investigated. As for drug-free NLC systems, the effect of various surfactants (Han *et al.*, 2008; Kovacevic *et al.*, 2011) and influence of different lipids on the formulation (Zheng *et al.*, 2013) have been

<sup>✉</sup>e-mail: elason@chemia.pk.edu.pl

\*Presented at the 5th Central European Congress of Life Sciences „EUROBIOTECH 2013”, Kraków, Poland.

**Abbreviations:** NLC, Nanostructured lipid carriers

**Table 1. Formulation of NLC systems (%wt.)**

Composition of the lipid nanoparticle dispersions produced with six surfactants and their combination. The particle matrix consisted of Apifil as solid lipid and Myritol as liquid lipid with changed ratios is from 1 to 15. Formulation 16 was prepared with different liquid lipid and 17-19 with different solid lipid.

No	Apifil (%) solid lipid	Myritol 312 (%) liquid lipid	PlantaCare 2000UP (%)	Poloxamer188 (%)	TegoCare CG-90 (%)	Crodesta SL40LQ (%)	Tween80 (%)	Sodium cholate (%)	Water (%)
1	7	3	4	–	–	–	–	–	86
2	10	5	4	–	–	–	–	–	86
3	–	10	4	–	–	–	–	–	86
4	9	1	4	–	–	–	–	–	86
5	7	3	2.5	1.5	–	–	–	–	86
6	7	3	–	4	–	–	–	–	86
7	7	3	2.5	–	1.5	–	–	–	86
8	7	3	–	–	4	–	–	–	86
9	7	3	2.5	–	–	1.5	–	–	86
10	7	3	–	–	–	4	–	–	86
11	7	3	–	–	2	–	–	–	86
12	7	3	2.5	–	–	–	1.5	–	86
13	7	3	–	–	–	–	4	–	86
14	7	3	2.5	–	–	–	–	1.5	86
15	7	3	–	–	–	–	–	4	86
16	7	3 Cetiol V	4	–	–	–	–	–	86
17	7 Compritol	3	4	–	–	–	–	–	86
18	7 Cutina Cp	3	4	–	–	–	–	–	86
19	7 Berrywax	3	4	–	–	–	–	–	86

also studied. The validity of such research could provide useful information for further application.

In this study, the drug-free NLC were prepared through the ultrasonication method. The effect of composition (different kind of surfactants, solid and liquid lipids) and parameters of the emulsification process on NLC formation and their properties were investigated. The physicochemical features of the obtained formulations were analyzed using the dynamic light scattering (DLS) electron microscope working in transmission mode (TEM).

#### MATERIALS AND METHODS

**Materials.** As solid lipids, Apifil® (modified bees-wax) and Compritol® 888ATO (glyceryl behenate from Gattefossé GmbH, Germany), Cutina® CP (cetyl palmitate from BASF, Germany) and Berry Wax (Kahl-Wax, Germany) were used. As liquid lipids, Myritol®312 (caprylic/capric triglyceride) and Cetiol®V (decyl oleate) from BASF, Germany, were applied. PlantaCare® 2000UP (decyl glucoside from BASF, Germany), Poloxamer 188 (Sigma-Aldrich, Poland), TegoCare CG-90 (Evonik Degussa International, Poland), Crodesta SL40LQ (Croda, Poland), Tween-80 (Caleo, Poland) and sodium cholate (Sigma-Aldrich, Poland) were chosen as surfactant. The distilled water was obtained by Millipore Direct-Q 5UV purification system.

**Preparation of NLC.** NLC were prepared by the melt-emulsification and ultrasonication processes. A certain amount of solid lipid and liquid lipid was blended and melted at 80°C, to form a homogenous and clear oil phase. The melted lipid phase was then dispersed in the 4%wt. surfactant water solution, at

the same temperature, by the aid of agitation at 800 rpm for 5 min. The obtained preemulsion was further treated by probe-type sonicator (Sonics Vibracell, Sonics & Materials, INC.), at varying time (2, 5, 10 min) and energy (15 and 35 W) of the process (Fig. 2d), and while maintaining the temperature at least 5°C above the melting point of the lipids. Subsequently the dispersions were cooled down to room temperature. The composition of the obtained formulations is shown in Table 1.

**Particle size analysis.** Particle size analysis was performed by dynamic light scattering (DLS), using the Zetasizer Nano ZS Malvern Instrument. Prior to the measurements all samples were diluted using ultra-purified water to generate suitable scattering intensity. DLS yields the hydrodynamic diameter (mean diameter, z-average) and the polydispersity index (PI) as a measure of the particle size distribution. The mean diameter and PI of the investigated samples were obtained by calculating the average of three measurements, at an angle 173°, in 10 mm diameter disposable plastic polystyrene cells. All the experiments were performed at 25°C.

**Zeta potential analysis.** Zeta potential (ZP) of NLC dispersion was determined by the measurement of the electrophoretic mobility, using Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, UK). The conversion into the ZP was performed using Helmholtz-Smoluchowski equation. The measurements for each sample were repeated three times.

**Morphology analysis.** The morphology of lipid nanoparticles was investigated using the JEOL JSM-7500F microscope, working in the transmission mode. For each measurement, the samples were prepared by dispersing a drop of the NLC formulation on a copper grid, which was covered with a carbon film.

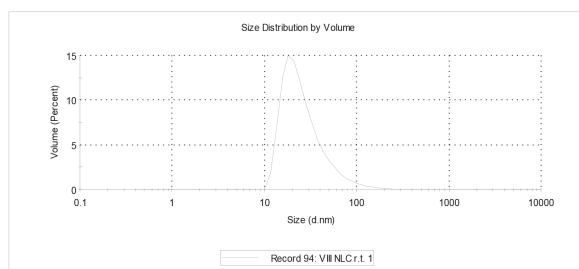


Figure 1. Particle size distribution curves of the optimal formulation (no 1).

## RESULT AND DISCUSSION

### Particle size analysis and physical stability

It is believed that the particle size distribution is one of the most important parameter for the evaluation of the stability of colloidal systems. Figure 1 shows the particle size distribution of the nanoparticulate dispersion. The mean particle size of sample number 1 is 56 nm. This formulation indicated the maximum stability.

### Effect of different parameters on a particle size and zeta potential measurement

As a result of comparison of the influence of different lipids on a particle size (Fig. 2A), it has been found that the average particle size of NLC dispersions is the highest for Compritol 888 ATO. This is the solid lipid characterized by a melting point (69–74°C) much more higher than for other lipids. Moreover PI for this type of lipidic matrix possesses values of 0.367, which implies polydisperse populations. Typical values for o/w emulsions range from 0.1 to 0.25 (Kovacevic *et al.*, 2011). The best size result was obtained for the

formulation containing Apifil.

Concerning emulsifiers, the best results were obtained for PlantaCare (alkylpolyglucoside) and its combination with other surfactants (Fig. 2B).

The data presented in Fig. 2C show that particle size increases with the increase of the lipid content, which is in agreement with the other research group (Sickmann *et al.*, 1994). The same situation was observed when solid to liquid lipid ratio increased (Fig. 2C, formulation no 1 and 4).

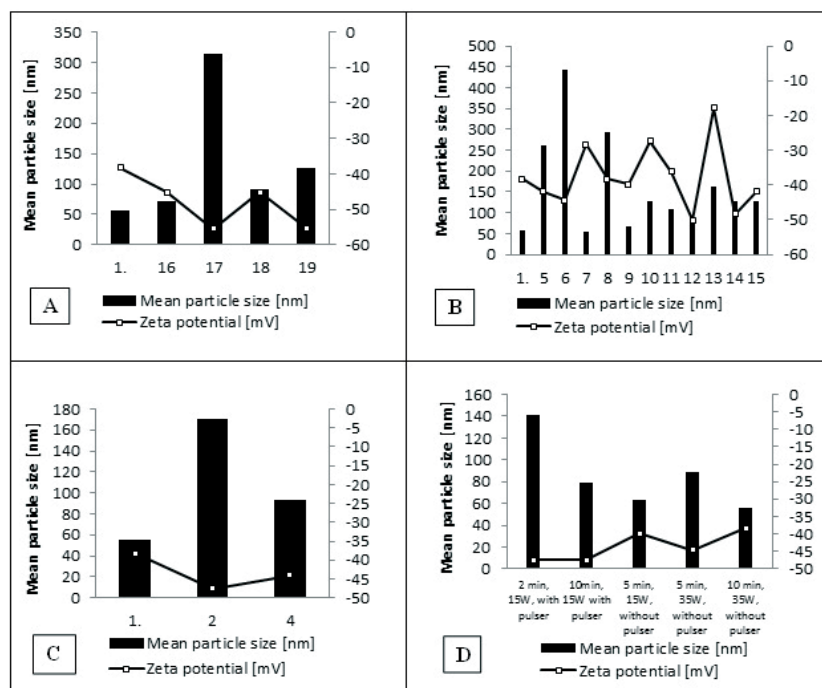
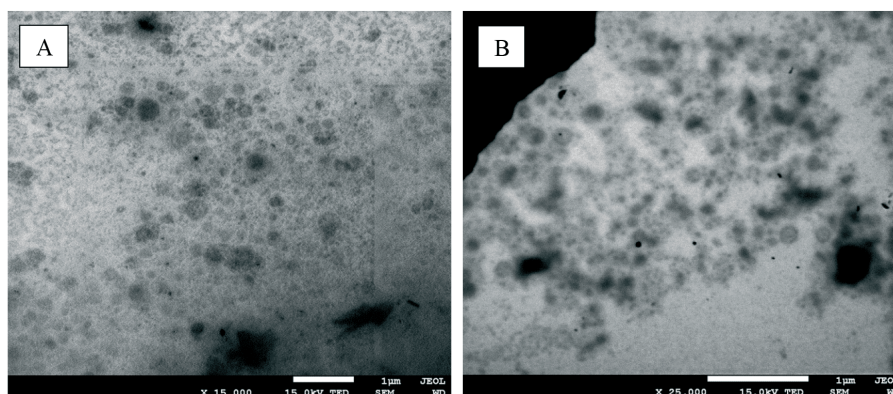


Figure 2. Influence of different parameters on a particle size and zeta potential measurement. (A) Influence of different lipid (solid and liquid), (B) Influence of emulsifier (single or combination), (C) Influence of solid to liquid lipid ratio, (D) Influence of ultrasound parameters. The number of samples from the figures corresponds to the one from Table 1.



**Figure 3. Microphotographs of NLC formulation.** A and B represent the views from different positions with different amplification factors (15000 and 25000 respectively).

Ultrasonication parameters, applied to obtain the formulations containing Apifil and Myritol (7:3), dispersed in 4% wt. PlantaCare solution, influenced the mean particle size. The smallest particle size was achieved by treating the sample with a probe-type sonicator for 10 min at 35 W and its value was 56 nm (Fig. 2D).

Zeta potential is an important factor used to evaluate the stability of lipid nanoparticle dispersions. Generally, particles are stable when the absolute value of the zeta potential is more than 30 mV. In our case, for the optimal formulation (no 1) ZP was around -38 mV. This is the formulation with nonionic surfactant, which could not ionize into charging group like ionic, but demonstrated its ZP. The same observation was made by other researchers (Jain *et al.*, 2011). The reason might be molecular polarization and the adsorption of emulsifier molecule on the charge in water. It was adsorbed to the emulsifier layer of particle/water interface, and an electric double layer similar to ionic was formed. Even better results of ZP value were also obtained for Poloxamer 188 (44.3 mV) and its mix with PlantaCare (-41.9 mV) but the mean particle size of these formulations was too large (263 and 442 nm, respectively). Also good results of ZP value were observed for the system based on the combination of PlantaCare with Tween-80 (-50.1 mV), but in the case of the formulation containing only Tween-80, ZP dramatically increased (17.9 mV). On the other hand, nanoparticle dispersion obtained using the combination of PlantaCare as nonionic surfactant with ionic Sodium cholate exhibited not only reasonable ZP values (48.5 mV), but also mean particle size (120 nm). Unfortunately, in contrast to formulation 1 (chosen as optimal), they were stable for no longer than 2 weeks.

#### TEM observation

TEM images of the dried suspension of NLC (no 1) are presented in Fig. 3. The two pictures represent the views from different positions with different amplification factors. Both indicate that the NLC particles are spherical. The diameter is around 60–200 nm. The sample for TEM images was 10% lipid (solid to liquid 7:3), dispersed in 4% PlantaCare® aqueous solution. According to the size data based on DLS method, the mean diameter was 56 nm. The size difference obtained by

TEM and DLS may come from the fact that DLS do not “measure” the particle size but detect the light scattering effects, which are used to calculate the particle size. What is more, our NLC formulation, obtained by ultrasonication method, was not a perfect homogenous system (PI 0.237).

#### CONCLUSION

The obtained results showed that the composition of preemulsion and the process parameters exert significant influence on the nanoparticles structure. Stable formulation, of particles size approximately 60 to 80 nm, was prepared by ultrasonication of the mixture for 10 min, at 35 W, maintaining the temperature at least 5°C above the lipid melting point. APG and its combination showed best results, as a stabilizing agent.

#### Acknowledgements

The research (work) was supported by the European Union through the European Social Fund within „Cracow University of Technology development program — top quality teaching for the prospective Polish engineers; University of the 21st century” project (contract no. UDA-POKL.04.01.01-00-029/10-00).

#### REFERENCES

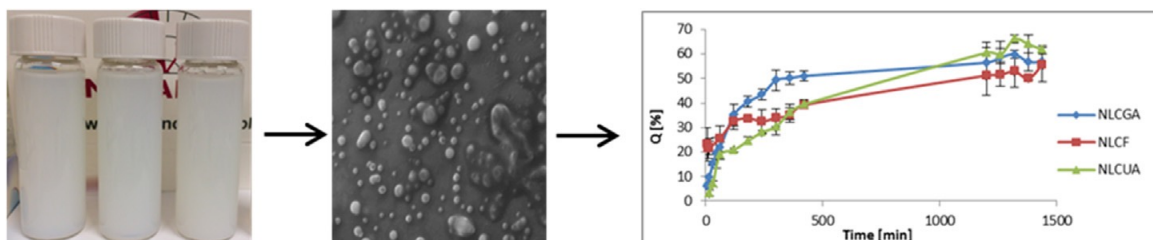
- Almeida AJ, Souto E (2007) Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev* **59**: 478–490.
- Chen CC, Tsai TH, Huang ZR, Fang JY (2010) Effects of lipophilic emulsifier on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. *Eur J Pharm Biopharm* **74**: 474–482.
- Das S, Chaudhury A (2011) Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS Pharm Sci Tech* **12**: 62–76.
- Han F, Li S, Yin R, Liu HZ, Xu L (2008) Effect of surfactant on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf A* **315**: 210–216.
- Hu FQ, Jiang SP, Du YZ, Yuan H, Ye Y, Zeng S (2006) Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm* **314**: 83–89.



- Jain NK, Ram A (2011) Development and characterization of nanostructured lipid carriers of oral hypoglycemic agent: selection of surfactants. *Int J Pharm Sci Res* 7: 125–130.
- Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Müller RH, Keck CM (2011) Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effect on size, physical stability and particle matrix structure. *Int J Pharm* 406: 163–172.
- Müller RH, Mehnert W, Lucks JS, Schwarz C, zur Muhlen A, Weyhers H, Freitas C, Ruhl D (1995) Solid lipid nanoparticles (SLN): an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 41: 62–69.
- Müller RH, Petersen RD, Hommos A, Pardeike J (2007) Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 522–530.
- Müller RH, Radtke M, Wissing SA (2002a) Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm* 242: 121–128.
- Pardeike J, Hommos A, Müller RH (2009) Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 366: 170–184.
- Radtke M, Souto EB, Müller RH (2005) Nanostructured lipid carriers: a novel generation of solid lipid drug carriers. *Pharm Technol Eur* 17: 45–50.
- Saraf S, Gosh A, Kaur CD, Saraf S (2011a) Novel modified nanosystem based lymphatic targeting. *Res J Nanosci Nanotechnol* 1: 60–74.
- Saraf S, Rath R, Kaur CD, Saraf S (2011b) Colloidosomes an Advanced Vesicular System in Drug Delivery. *Asian J Sci Res* 4: 1–15.
- Sawant KK, Dodiya SS (2008) Recent advances and patents on solid lipid nanoparticles. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2: 120–135.
- Schafer-Korting M, Mehnert W, Korting HC (2007) Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 427–443.
- Schwarz JC, Weixelbaum A, Pagitsch E, Löw M, Resch GP, Valenta C (2012) Nanocarriers for dermal drug delivery: Influence of preparation method, carrier type and rheological properties. *Int J Pharm* 437: 83–88.
- Siekman B, Westesen K (1994) Melt homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxopol. Preparation and particle size determination. *Pharm Pharmacol Lett* 3: 194–197.
- Westesen K, Bunjes H, Koch MHJ (1997) Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J Control Release* 48: 223–236.
- Zheng M, Falkeborg M, Zheng Y, Yang T, Xu X (2013) Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloids Surf A* 430: 76–84.

[Lasoń, Colloid Surface A, 2016]

E. Lasoń, E. Sikora, J. Ogonowski, M. Tabaszewska, Ł. Skoczylas, Release study of selected terpenes from nanostructured lipid carriers, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 510 (2016) 87–92

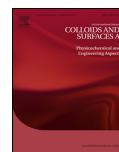




ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/colsurfa](http://www.elsevier.com/locate/colsurfa)

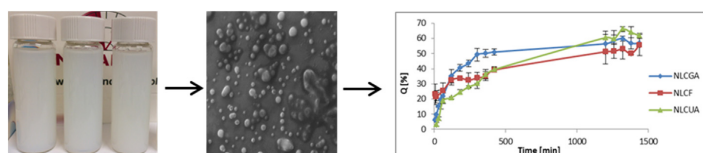
## Release study of selected terpenes from nanostructured lipid carriers

Elwira Lasoń<sup>a,\*</sup>, Elżbieta Sikora<sup>a</sup>, Jan Ogonowski<sup>a</sup>, Małgorzata Tabaszewska<sup>b</sup>, Łukasz Skoczylas<sup>b</sup><sup>a</sup> Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, Warszawska 24, Krakow, 31-155, Poland<sup>b</sup> Department of Fruit, Vegetable and Mushroom Processing, University of Agriculture, Cracow, Poland

## HIGHLIGHTS

- The stable, nanostructured lipid carriers (NLC) were obtained.
- The different kind of terpenes: mono-, di- and triterpene were incorporated into NLC.
- In vitro release tests of geranic acid, forskolin and ursolic acid from NLC were carried out.
- The release rate of terpenes from the nanocarriers was very high.
- NLC can be used as terpenes controlled delivery systems.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 February 2016

Received in revised form 13 June 2016

Accepted 15 June 2016

Available online 16 June 2016

## Keywords:

Nanostructured lipid carriers

Terpenes

Controlled release

Geranic acid

Forskolin

Ursolic acid

## ABSTRACT

The main objective of this study was to evaluate the potential of nanostructured lipid carriers (NLC) as a delivery system for mono- (geranic acid), di- (forskolin) and triterpenes (ursolic acid). The influence of the active chemical structure on their release profile were investigated along with the physicochemical properties of terpene-loaded NLC. The formulations were prepared by ultrasound homogenization method using modified beeswax as a solid lipid and caprylic/capric triglyceride as a liquid lipid. The systems were stabilized by alkylpolyglucoside. The average particle size for formulations with geranic acid (NLCGA), forskolin (NLCF) and ursolic acid (NLCUA) was  $101.1 \pm 0.4$ ,  $106.4 \pm 1.4$  and  $97.6 \pm 0.9$  nm, respectively. In vitro release studies of the terpenes were performed at the 32 °C, using cellulose membrane (Spectra/Por® Dialysis Membrane) and PBS/ethanol mixture as a receptor solution. The obtained results confirmed a high physical stability of the formulations and showed that the achieved systems are suitable carriers for all, mono- di- and triterpenes.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Terpenes represent the most various group of structurally different natural compounds with more than 40,000 representatives. They are widely applied not only as fragrance or flavor compound, but also as pharmaceuticals, nutraceuticals and even agrichemicals [1]. Terpenes consist of isoprene units ( $C_5H_8$ ), they may be

lipophilic or hydrophilic, volatile or non-volatile, cyclic or acyclic [2,3].

Monoterpenes, apart from their fragrance properties show antibacterial or antifungal activity, while di- and triterpenes are known for their significant biological activity [4].

Geranic acid (Table 1) is a monoterpene representative which can be applied as a perfuming agent [5] and is also known for strong antifungal properties against the two maize pathogens *Fusarium graminearum* and *Colletotrichum graminicola* [6]. Because of its inhibitory effect for tyrosinase [7,8] and low cell toxicity, geranic acid can act as a skin depigmentation agent [9].

\* Corresponding author.

E-mail address: [elason@chemia.pk.edu.pl](mailto:elason@chemia.pk.edu.pl) (E. Lasoń).<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.06.021>

0927-7757/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.



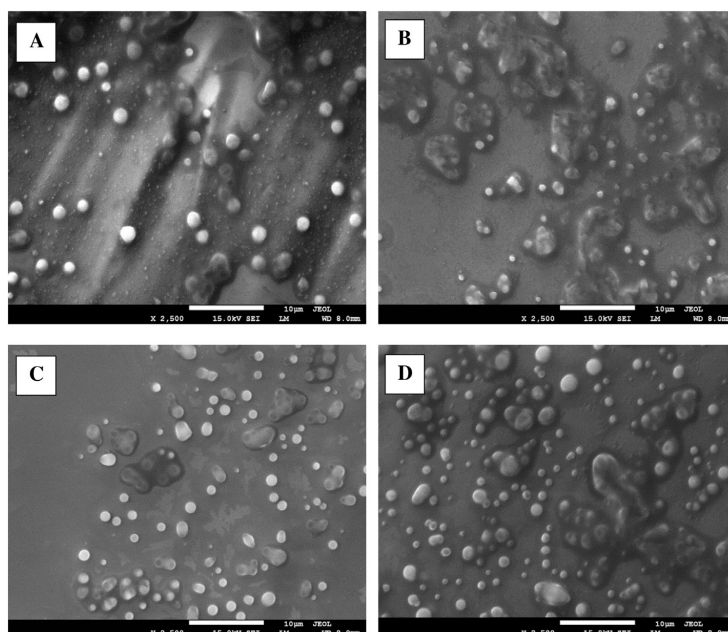


Fig. 1. SEM micrographs of NLC formulation. A is unloaded NLC, B, C and D represent terpene-loaded formulations, NLCGA, NLCF and NLCUA, respectively.

**Table 1**  
Characteristics of used terpenes.

Common name	Structure	Molecular weight	logP	Polar surface area (Å <sup>2</sup> )
Geranic acid	<chem>CC(C)=CCCCC(=O)O</chem>	168.23	2.82	37.30
Forskolin	<chem>CC12C(C3C(C(C1)O)C(C(C2)OC(=O)C3)O)O</chem>	410.501	1.36	113.29
Ursolic acid	<chem>CC12C(C3C(C(C1)O)C(C(C2)OC(=O)C3)O)O</chem>	456.36	6.58	57.53

Forskolin (Table 1), a labdane diterpene, can be used for treatment of allergies, cardiovascular diseases, as natural remedy for urinary tract infections [10] or weight loss enhancer. It activates

adenylate cyclase, resulting increases of the cAMP level [11]. The therapeutic benefit of forskolin in symptoms of psoriasis and its ability to regulate the cAMP levels in skin cells has been reported [12]. There are also clinical studies demonstrating the effect of forskolin in reducing intraocular pressure in glaucoma [13–15]. Moreover, this diterpenoid has been reported to possess anticancer activity [10,16] and appeared in the literature as a natural substance to obtain a healthy tan [17].

Ursolic acid (Table 1) is a pentacyclic triterpenoid very well known for its hepatoprotective and anticancer effects [18,19]. It possess a wide range of biological functions including antioxidative [20], antiinflammatory [21] and immunoregulatory effect [22]. It has been also reported that ursolic acid inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake [23].

Since the mentioned above terpenes, appear to offer great benefits, it is understood that the proper carrier plays an important role in their release. Therefore, the development of an efficient terpene-loaded system is of great interest.

Nowadays, lipid nanoparticles demonstrate a potential as transdermal delivery systems for low soluble, lipophilic active compounds. They can control release of drug into the systemic circulation and reducing systemic side effects [24]. Lipid-based colloid

**Table 2**  
Physicochemical properties of the terpene loaded NLC and "placebo" NLC formulations.

Formulation Name	T = 0			T = 24h		
	Z-ave [nm] ± SD	ZP [mV] ± SD	PDI ± SD	Z-ave [nm] ± SD	ZP [mV] ± SD	PDI ± SD
NLCGA	101.1 ± 0.4	−33.1 ± 0.1	0.275 ± 0.007	103.6 ± 0.6	−29.3 ± 0.9	0.265 ± 0.009
NLCF	106.4 ± 1.4	−30.3 ± 1	0.220 ± 0.010	108.3 ± 1.1	−37.0 ± 0.3	0.197 ± 0.006
NLCUA	97.6 ± 0.9	−38.2 ± 0.1	0.204 ± 0.013	97.7 ± 1.5	−38.3 ± 1.4	0.203 ± 0.010
NLC	108.8 ± 0.6	−40.1 ± 1.1	0.265 ± 0.004	103.1 ± 0.6	−36.0 ± 0.7	0.224 ± 0.009

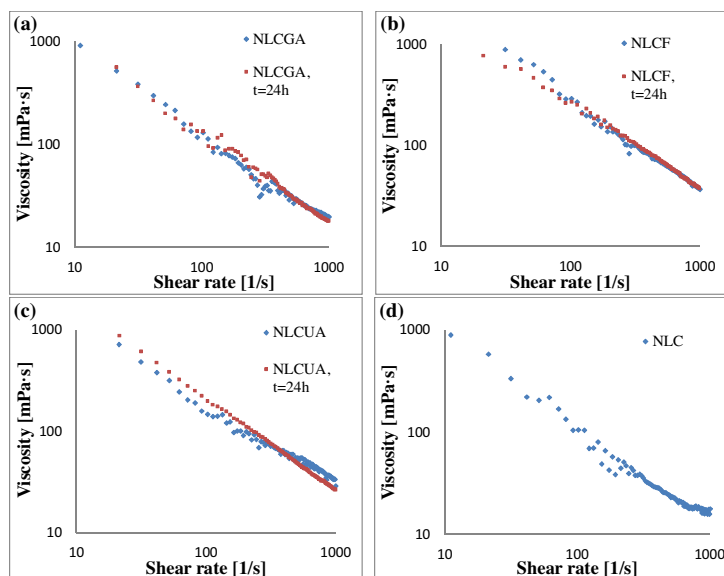


Fig. 2. Viscosity curves of terpene-loaded NLC before and after 24 h release for (a) – geranic acid, (b) – forskolin, (c) – ursolic acid and (d) – “placebo” NLC.

carriers possess numerous features that are advantageous for topical route of application [25]. Both, solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC), are systems providing controlled release profiles for many active ingredients [26–28]. They are composed of biodegradable and biocompatible lipids and could be good transdermal systems for decreasing cytotoxicity of some drugs [29]. NLC consist of a mixture of solid and liquid lipids and were introduced as a second generation of lipid-based nanoparticle drug vehicles. They overcome the limitations associated with SLN including limited drug-loading, drug expulsion during storage and risk of gelation [30–32]. However it should be noted that the efficiency of topical delivery system depends not only on the carrier properties but also on the physicochemical characteristics of the active penetrant.

The aim of the study was to investigate the effect of the terpenes chemical structure on their release from NLC.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Geranic acid (GA) and ursolic acid (UA) were purchased from SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Germany. Forskolin was provided by Sabinsa Europe GmbH, Langen, Germany. The characteristics of used terpenes are presented in Table 1. Apifil® (modified beeswax) from Gattefossé GmbH, Germany was used as solid lipid material of NLC. Medium chain triglyceride oil, Labrafac®CC, was chosen as liquid lipid material of NLC. All formulations were stabilized by alkylpolyglucoside (PlantaCare®2000UP), which was supplied by BASF Chem Trade GmbH, Burgbenheim, Germany. Ethanol (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Germany) was of high performance liquid chromatography (HPLC) grade. All other reagents and solvents were of analytical reagent grade. The ultra-purified water was freshly prepared by a MilliQ® System (Millipore, Schwalbach, Germany).

### 2.2. Preparation of nanostructured lipid carriers

Terpene-loaded NLC dispersions were prepared by ultrasound homogenization method. At the beginning, aqueous and oil phases were prepared separately. Solid lipid (7% wt), liquid lipid (3% wt) and proper terpene active compound (0.075% wt) were melted at 80° C to prevent recrystallization of lipids during the process. The mixture of the surfactant (4% wt) and water was heated to the same temperature and added to the melted oil phase, under magnetic agitate with 600 rpm for 5 min. The obtained milk-like, hot pre-emulsion was further processed by probe-type sonicator (Sonics Vibra-Cell, Sonics & Materials, INC.) for another 5 min. Subsequently, the homogenous NLC dispersions were cooled down to room temperature. Terpene-loaded oils for comparative study were prepared by mixing actives with Labrafac®CC oil by a Vortex machine and gently heating, if necessary, until their total dissolution.

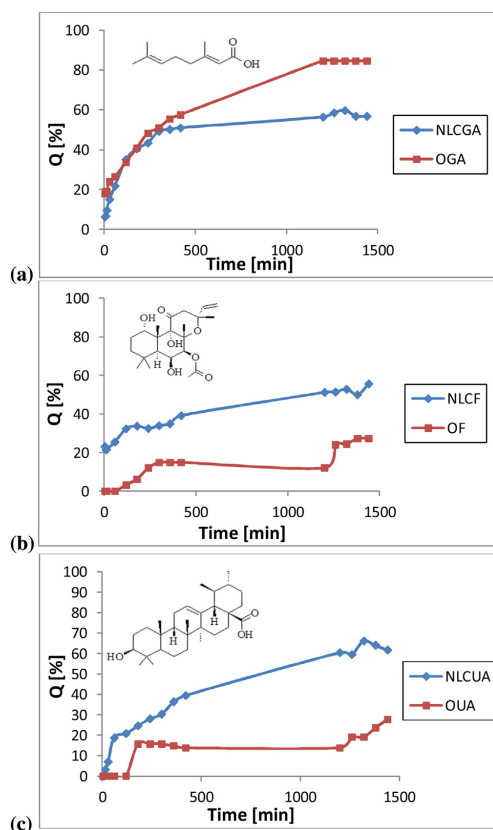
### 2.3. NLC characterization

#### 2.3.1. Particle size and polydispersity index analysis

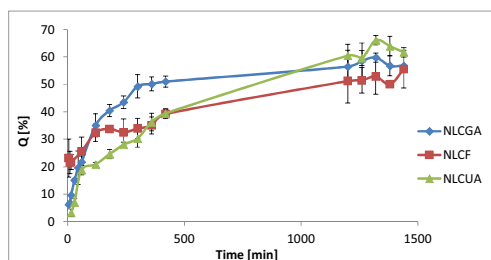
The average particle size and polydispersity index (PI), which stands for the width of particle size distribution, were characterized by dynamic light scattering technique (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) at a fixed angle of 173° and a temperature of 25° C. The samples were analyzed after appropriate dilution with using double-distilled water prior to generate a suitable scattering intensity. The measurements were carried out in triplicate and standard deviation was calculated.

#### 2.3.2. Measurement of zeta potential

Long-term stability of the prepared NLC was determined by Zeta potential measurement. The zeta potential was measured using Zetasizer Nano ZS and the measurements were conducted in triplicate. The samples were diluted in double-distilled water before the



**Fig. 3.** Comparative release profiles of terpenes from NLC dispersions and oil (O) as reference formulation, for geranic acid (a), forskolin (b) and ursolic acid (c) respectively, expressed as percentage wt% of released actives (Q[%]) as a function of time. Each value represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 3).



**Fig. 4.** Release profiles of terpenes from NLC dispersions for geranic acid (NLCGA), forskolin (NLCF) and ursolic acid (NLCUA) respectively, expressed as percentage wt% of released actives (Q[%]) as a function of time. Each value represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

analysis. Particles with a large positive or negative zeta potential ( $\pm 30$  mV) will repel each other and will not aggregate [33].

### 2.3.3. Morphology

To determine the shape and surface morphology of the nanoparticles JEOL JSM-7500F microscope, working in the transmission mode, was used. A drop of terpene-loaded NLC dispersion was placed on the surface of carbon-coated copper grid. Then, the sample was allowed to dry for contrast enhancement and analyzed.

### 2.3.4. Rheological measurement

Viscosity measurements of NLC formulations were performed using a Brookfield Rheometr Model – R/S plus, equipped with a cone/plate measuring system (cone C75-1), at 25 °C, in the range of shear rate values from 1 to 1000 s<sup>-1</sup>. The measurements were carried out for the fresh formulations (t = 0) and after 24 h of the release test.

### 2.4. In vitro release study

In vitro release studies of terpene-loaded NLC were performed by dialysis bag method [34], using the cellulose membrane (Spectra/Por® Dialysis Membrane) of molecular weight cut-off between 6 and 8 kDa. An appropriate amount of active-loaded NLC was placed in the dialysis bag which was sealed and suspended in the compartment with 200 ml of receptor solution (the mixture of PBS/ethanol in ratio 60/40 v/v) maintained at 32 °C  $\pm$  0.5 °C and stirred at 200 rpm. Sink conditions were accomplished for all of the terpenes during the performance of the dialysis. The concentration of the release terpenes in the receptor medium was analyzed by HPLC (Dionex Ultimate 3000 DAD) equipped with UV detector and XBridge column (250 mm  $\times$  4.6 mm; 3.5  $\mu$ m) with precolumn. The mobile phase was isocratic, acetonitrile:water (80:20) and the flow rate was set to 0.5 ml/min. The assay was monitored at the wavelength of 210 nm, sample injection volume was 20  $\mu$ l, run time for mono- and diterpene 20 min and for triterpene 25 min.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Preparation and physicochemical characterization of NLC

Terpene-loaded (0.075% wt) nanostructured lipid carriers with the same components and composition, only differing in kind of the actives was obtained from natural and skin friendly materials. The solubility of the actives in oil used was first determined and was 3.5  $\mu$ g/mL for forskolin and ursolic acid and 8  $\mu$ g/mL for geranic acid. The formulations contained geranic acid (NLCGA), forskolin (NLCF) and ursolic acid (NLCUA) and also “placebo” NLC (without the active) were prepared by the ultrasound method. All obtained systems appeared as a milky-like dispersions, bluish after dilution.

For colloidal systems like NLC, the particle size and repulsive forces between the particles are very important in assessing the stability [35]. The average particle size distribution reported as the polydispersity index (PDI) and zeta potential of the prepared formulations are presented in Table 2. To confirm stability of the systems the data for freshly prepared samples (T = 0) and after 24 h were compared. The mean particle size (T = 0) of 101.1, 106.4, 97.6 and 108.8 nm were obtained for NLCGA, NLCF, NLCUA and NLC, respectively, with PDI values lower than 0.3, suggesting a narrow size distribution [25]. Zeta potential (ZP) for NLC systems, was –33.1, –30.3, –38.2 and –40.1 mV for NLCGA, NLCF, NLCUA and NLC, respectively. The ZP values higher than, or close to  $[-30]$  mV, confirm good physical stability of the formulations. No significant changes between mentioned physicochemical parameters, were observed after 24 h (Table 2).

The morphology of terpene-loaded NLC and unloaded NLC is shown in Fig. 1. The images revealed the presence of nearly spherical particles, uniform in size. Micrographs also exhibited the agglomeration of nanoparticles (especially Fig. 1B correspond to geranic acid-loaded NLC), which might be due to the lipid nature of the carrier and the drying process during sample preparation for SEM analysis [36].

### 3.2. Rheological properties

Rheological properties like viscosity are critical parameters of NLC dispersions for applications in pharmaceutical and cosmetic products [37]. Fig. 2 shows the viscosity curves of the samples. The obtained formulations showed non-Newtonian, pseudoplastic flow character and shear thinning behavior, as the viscosity decreased with increasing shear rate and reached an approximately constant value at high shear rates. No significant differences were observed in all systems before and after the terpenes release tests.

### 3.3. In vitro release study

In vitro release of terpenes from NLC was studied by dialysis method, using PBS (pH = 7.4)/ethanol mixture as receptor solution, in accordance to the European Pharmacopoeia [38]. The released actives, expressed as weight percent ratio between released active and the total entrapped active, is reported as a function of incubation time. Samples were investigated for a period of 24 h and each sample was analyzed in triplicate.

In Fig. 3 release from terpene-loaded NLC was observed over terpene oil (caprylic/capric triglycerides) solution serving as reference formulations. The release rates became higher from oil only in case of geranic acid and it might be due to the higher solubility of this terpene in oil, which ultimately increased the loading of the active and could be easily released by diffusion. Another reason might be due to the linear molecule structure and the lowest molecular weight when compared to two other terpenes. The NLC dispersions of forskolin and ursolic acid showed much higher release than those from the oil. An inescapable fact was that the terpenes release from NLC started with an initial burst in the first few hours, then followed by a sustained release behavior. Burst release can be useful to improve the penetration of the active, whereas sustained release provides the active over an extended period of time.

The terpenes release profiles from NLC with time are shown in Fig. 4. In all cases the release was found to be biphasic, with the burst effect at the beginning followed by gradual release of all the actives. The initial fast release might be due to the fact that most of the liquid lipid being located in the outer shell of the nanoparticles, which lead to a drug-enriched shell and consequently to burst release at initial step [36]. Another reason might be explain by presence of untrapped drug in the NLC dispersion. The observed differences are probably the effect of terpene structure and lipophilicity and their association with the lipid matrix of NLC. Lipophilicity is one of the most important physicochemical parameters influencing bioavailability of actives. Strongly lipophilic molecules (with high logP, value > 4) are characterized by low bioavailability because of their high affinity to the carrier structures [39]. The terpenes with lower lipophilicity like forskolin (logP = 1.36) were able to remain associated for a longer time with the lipid nanoparticles, while the highest lipophilic one – ursolic acid (logP = 6.58) was released more easily from the NLC matrix.

Another parameter linked closely to bioavailability is polar surface area (PSA). It is a parameter by which we can provide the ease of molecules passive transport through the biological membranes. Currently, an equally large cognitive role is assigned to this parameter as to that of logP (lipophilicity). Taking into consideration these two parameters, the most preferred bioavailability of bioactive

compounds are reached by those with the highest logP value and PSA below 100 Å<sup>2</sup> [39]. In our case the highest final release of active (nearly 70%) was achieved in case of ursolic acid (NLCUA) which represent the uppermost lipophilicity and PSA = 57.53 Å<sup>2</sup> (Table 1).

## 4. Conclusions

Stable, terpene-loaded nanostructured lipid carriers have been prepared by applying ultrasound homogenization method. The obtained geranic acid (GA), forskolin (F) and ursolic acid (UA) – NLC were spherical and uniformly nano-sized with mean particle size of 101.1 ± 0.4, 106.4 ± 1.4 and 97.6 ± 0.9 nm, respectively. Zeta potential values of the formulations were close to –30 mV, indicating their good physical stability. The results of release studies have shown that mono-, di- and triterpenes (geranic acid, forskolin and ursolic acid) incorporated in the NLC released in high percentage (up to 56.79 ± 3.95%, 55.57 ± 6.89%, 61.68 ± 3.67%, respectively). The actives release was found to be biphasic, with the burst effect at the first few hours, followed by gradual release. The terpenes with lower lipophilicity were able to remain associated for a longer time with the lipid nanoparticles, while higher lipophilic was released easier from the NLC matrix. Generally, it can be concluded that the terpenes chemical structure influence on their release profiles.

The obtained results support the great potential of the nanostructured lipid carriers as the terpenes delivery system and both, burst and sustained release, which are of interest for dermal application. Burst release can be useful to improve the penetration of the actives, sustained in turn, supplied the active over a prolonged period of time.

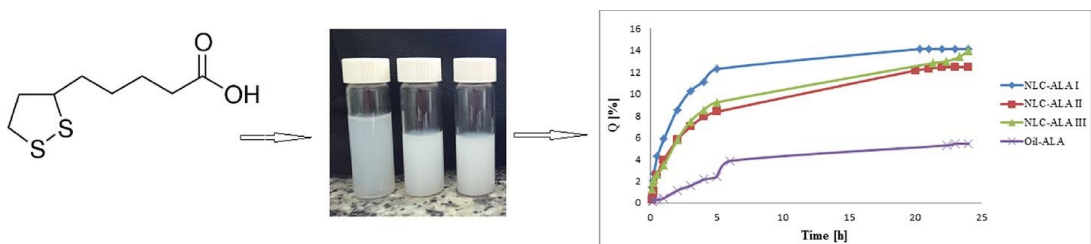
## References

- [1] M. Bution, G. Molina, M. Abrahão, G. Pastore, Genetic and metabolic engineering of microorganisms for the development of new flavor compounds from terpenic substrates, *Crit. Rev. Biotechnol.* 35 (2015) 313–325.
- [2] P. Charoenputtakun, B. Pamornpathomkul, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, Terpene composited lipid nanoparticles for enhanced dermal delivery of all-trans-retinoic acids, *Biol. Pharm. Bull.* 37 (2014) 1139–1148.
- [3] L. Reddy, P. Couvreur, Squalene: a natural triterpene for use in disease management and therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 1412–1426.
- [4] K. Cal, S. Janicki, M. Sznitowska, In vitro studies on penetration of terpenes from matrix-type transdermal systems through human skin, *Int. J. Pharm.* 224 (2001) 81–88.
- [5] J. Mi, D. Becher, P. Lubuta, S. Dany, K. Tusch, H. Schewe, M. Buchhaupt, J. Schrader, De novo production of the monoterpenoid geranic acid by metabolically engineered *Pseudomonas putida*, *Microb. Cell Fact.* 13 (2014) 170.
- [6] T. Yang, G. Stoop, N. Yalpani, J. Vervoort, R. de Vos, A. Voster, F. Verstappen, H. Bouwmeester, M. Jongsma, Metabolic engineering of geranic acid in maize to achieve fungal resistance is compromised by novel glycosylation patterns, *Metab. Eng.* 13 (2011) 414–425.
- [7] T. Masuda, Y. Odaka, N. Ogawa, K. Nakamoto, H. Kuninaga, Identification of geranic acid, a tyrosinase inhibitor in lemongrass (*Cymbopogon citratus*), *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 597–601.
- [8] N. Wang, D. Hebert, Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life, *Pigment Cell Res.* 19 (2006) 3–18.
- [9] S. Choi, Inhibitory effects of geranic acid derivatives on melanin biosynthesis, *J. Cosmet. Sci.* 63 (2012) 351–358.
- [10] M. Patel, Forskolin a successful therapeutic phytochemical, *East Cent. Afr. J. Pharm. Sci.* 13 (2010) 25–32.
- [11] J. Fradkin, G. Cook, M. Kilhoffer, J. Wolff, Forskolin stimulation of thyroid adenylate cyclase and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate accumulation, *Endocrinology* 111 (1982) 849–856.
- [12] H. Ammon, A. Müller, Forskolin: from an ayurvedic remedy to a modern agent, *Planta Med.* 51 (1985) 473–477.
- [13] J. Caprioli, M. Sears, Combined effect of forskolin and acetazolamide on IOP and aqueous flow in rabbit eye, *Exp. Eye Res.* 39 (1984) 47–50.
- [14] P. Lee, S. Podos, J. Serle, C. Camras, C. Severin, Intraocular pressure effects of multiple doses of drugs applied to glaucomatous monkey eyes, *Arch. Ophthalmol.* 105 (1987) 249–252.
- [15] S. Matsumoto, T. Yamashita, M. Araie, S. Kametani, T. Hosokawa, M. Takase, The ocular penetration of topical forskolin and its effects on intraocular pressure, aqueous flow rate and cyclic AMP level in the rabbit eye, *Jpn. J. Ophthalmol.* 34 (1990) 428–435.
- [16] H. Shivaprasad, S. Pandit, M. Bhanumathy, D. Manohar, V. Jain, S. Afsar, X. Su, Ethnopharmacological and phytochemical knowledge of *Coleus forskohlii*: an

- approach towards its safety and therapeutic value, *Orient. Pharm. Exp. Med.* 14 (2014) 301–312.
- [17] M. Spry, J. Vanover, T. Scott, O. Abona-Ama, K. Wakamatsu, S. Ito, J. D'Orazio, Prolonged treatment of fair-skinned mice with topical forskolin causes persistent tanning and UV protection, *Pigment Cell Melanoma Res.* 22 (2009) 219–229.
  - [18] E. de Oliveira, J. Saraiva, S. de Albuquerque, J. Marchetti, Solid dispersion of ursolic acid in Gelucire 50/13: a strategy to enhance drug release and trypanocidal activity, *AAPS PharmSciTech* 13 (2012) 1436–1445.
  - [19] G. Li, X. Zhang, J. You, Y. Song, Z. Sun, L. Xia, Y. Suo, Highly sensitive and selective pre-column derivatization high-performance liquid chromatography approach for rapid determination of triterpenes oleanolic and ursolic acids and application to *Swertia* species: optimization of triterpenic acids extraction and pre-column derivatization using response surface methodology, *Anal. Chim. Acta* 688 (2011) 208–218.
  - [20] S. Balanehr, B. Nagarajan, Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation, *Biochem. Int.* 24 (1991) 981–990.
  - [21] Z. Ovesna, A. Vachalkova, K. Horvathova, D. Tothova, Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds Minireview, *Neoplasma* 51 (2004) 327–333.
  - [22] T. Raphael, G. Kuttan, Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system, *Phytomedicine* 10 (2003) 483–489.
  - [23] W. Zhang, D. Hong, Y. Zhou, Y. Zhang, Q. Shen, J. Li, et al., Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake, *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (2006) 1505–1512.
  - [24] H. Chen, Y. Wang, Y. Zhai, G. Zhai, Z. Wang, J. Liu, Development of a ropivacaine-loaded nanostructured lipid carrier formulation for transdermal delivery, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 465 (2015) 130–136.
  - [25] M. Joshi, V. Patravale, Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib, *Int. J. Pharm.* 346 (2008) 124–132.
  - [26] R.H. Müller, W. Mehnert, J.S. Lucks, C. Schwarz, A. Zur Mühlen, H. Weyhers, C. Freytag, D. Rühl, Solid lipid nanoparticles (SLN)—an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 62–69.
  - [27] E.B. Souto, S.A. Wissing, C.M. Barbosa, R.H. Müller, Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 71–77.
  - [28] E.B. Souto, R.H. Müller, SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole, *J. Microencapsul.* 5 (2005) 501–510.
  - [29] T. Guo, Y. Zhang, J. Zhao, C. Zhu, N. Feng, Nanostructured lipid carriers for percutaneous administration of alkaloids isolated from *Aconitum sinomontanum*, *J. Nanobiotechnol.* 13 (2015) 1–14.
  - [30] R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 131–155.
  - [31] R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, *Int. J. Pharm.* 242 (2002) 121–128.
  - [32] R. Tiwari, K. Pathak, Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake, *Int. J. Pharm.* 415 (2011) 232–243.
  - [33] C.H. Loo, M. Basri, R. Ismail, H. Lau, B. Tejo, M.S. Kanthimathi, H.A. Hassan, Y.M. Choo, Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion, *Int. J. Nanomedicine* 8 (2013) 13–22.
  - [34] W. Hanson, Theoretical concepts, in: *Handbook of Dissolution Testing*, Pharmaceutical Technology Publications, 1982.
  - [35] S. Okonogi, P. Riangjanapatee, Physicochemical characterization of lycopene-loaded nanostructured lipid carrier formulations for topical administration, *Int. J. Pharm.* 478 (2015) 726–735.
  - [36] D. Patel, S. Dasgupta, S. Dey, Y.R. Ramani, S. Ray, B. Mazumder, Nanostructured lipid carriers (NLC)-Based gel for the topical delivery of aceclofenac: preparation, characterization, and In vivo evaluation, *Sci. Pharm.* 80 (2012) 749–764.
  - [37] Y. Yang, A. Corona III, S.R. Bhatia, M.A. Henson, The controlled aggregation and tunable viscosity of nanostructured lipid carrier dispersions, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 482 (2015) 138–147.
  - [38] M.L. Bondi, A. Azzolina, E.F. Craparo, C. Botto, E. Amore, G. Giammona, M. Cervello, Entrapment of an EGFR inhibitor into nanostructured lipid carriers (NLC) improves its antitumor activity against human hepatocarcinoma cells, *J. Nanobiotechnol.* 12 (2014) 21, <http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-12-21>.
  - [39] T. Grabowski, S.W. Gumulka, B. Borucka, W. Raszelewski, Analysis relationships between pharmacokinetic parameters in *silico/in vivo* of selected antiviral drugs based on structural analysis, *Adv. Clin. Exp. Med.* 17 (2008) 285–292.

[Lasoń, Colloid Surface A, 2017]

E. Lasoń, E. Sikora, M. Miastkowska, P. Socha, J. Ogonowski, NLC delivery systems for alpha lipoic acid: Physicochemical characteristics and release study, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 532 (2017) 57–62

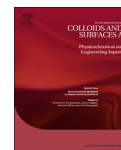






Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/colsurfa](http://www.elsevier.com/locate/colsurfa)

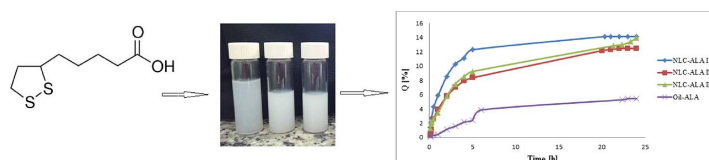
## NLC delivery systems for alpha lipoic acid: Physicochemical characteristics and release study



Elwira Lasoń\*, Elżbieta Sikora, Małgorzata Miastkowska, Paulina Socha, Jan Ogonowski

Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, Poland

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Nanostructured lipid carriers  
Alpha lipoic acid  
Controlled release  
Topical delivery

### ABSTRACT

The main objective of this study was to prepare nanostructured lipid carriers as long term stable carrier systems for the topical delivery of alpha lipoic acid (ALA). The ALA-loaded NLC were prepared by the ultrasound homogenization method, using mixture of Apifil CG and Myritol 312 as the lipid phase. The systems were stabilized by Plantacare 2000 UP. The stability of obtained formulations was assessed using macroscopic and microscopic analysis. Physicochemical properties of the carriers, such as particle size, polydispersity index, zeta potential and their viscosity were studied. *In vitro* release studies of the active were performed at the 32 °C, using cellulose membrane and the phosphate buffer (PBS, pH = 7,4) as a receptor solution. The obtained results confirmed a high physical stability of the empty and ALA-loaded formulations and showed that the prepared systems are suitable carriers for controlled release of ALA and can be a promising solution for skin delivery of this antioxidant.

### 1. Introduction

Alpha lipoic acid (ALA), also known as thioctic acid is naturally occurring kind of organosulfur compounds, synthesized by some plants and animals, involving humans [1]. As a biological antioxidant, ALA had received significant attention for the last few years [2,3]. Along with its reduced form, dihydrolipoic acid (DHLLA), they have been considered as possessing reactive oxygen species scavenging action [4] and are recognized to revitalize other antioxidants from their inactive forms [5]. ALA also works as a chelator of transition and heavy metals and more recently, has been introduced to have anti-inflammatory properties [6]. Its versatile benefits as an antioxidant allows to apply it

in many fields such as curing drug, vitamins supply in health food and in cosmetic as an anti-aging active material because it may prevent photooxidative stress in the skin [7]. ALA shows favorable physicochemical properties for dermal delivery but high lipophilicity makes it difficult to formulate in traditional carriers like emulsion. Additional problem is that the acid is extremely vulnerable to degradation by the sunlight and is characterized by unpleasant sulfur smell [8,9].

To avoid the above-mentioned shortcomings and improve physicochemical stability of alpha lipoic acid, its encapsulation in nanostructured lipid carriers (NLC) was implemented. NLC in comparison to the traditional carriers like emulsions, liposomes and polymeric nanoparticles show some advantages i.e. biocompatibility and physiological

\* Corresponding author.

E-mail address: [elason@chemia.pk.edu.pl](mailto:elason@chemia.pk.edu.pl) (E. Lasoń).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.06.083>

Received 28 February 2017; Received in revised form 31 May 2017; Accepted 29 June 2017  
Available online 13 July 2017

0927-7757/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

lipids-like composition, avoidance of organic solvents in the preparation process, high bioavailability, controlled release behavior of the active substance and suitability to scaling-up production [10–12].

So far, results of numerous investigations have demonstrated the ability of lipid nanoparticles to be great carriers for delivering lipophilic compound improving at the same time insolubility challenges [13–16]. Nanostructured lipid carriers offer effective, controlled delivery and bioavailability of the lipophilic drugs [5]. Therefore, these colloidal lipid systems are recommended for many administration routes of the numerous actives, including its topical application [17,18].

The principal aim of this study was to prepare ALA-loaded NLC formulations as long term stable carrier systems for the alpha lipoic acid topical delivery. The applicability of the ALA-NLC formulations was illustrated by comprehensive characterization of the carriers. The release profile of the active was investigated along with the physico-chemical properties of ALA-loaded NLC.

## 2. Materials and methods

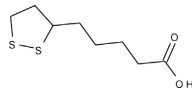
### 2.1. Materials

The active ingredient ( $\pm$ )- $\alpha$ -Lipoic acid (ALA) was purchased from SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Germany. Table 1 shows the main properties of the acid. Modified beeswax (Apifil<sup>®</sup>) used as solid lipid and medium chain triglyceride (Myritol<sup>®</sup>312) chosen as liquid lipid were delivered from Gattefossé GmbH, Germany and BASF Chem Trade GmbH, Burgbenheim, Germany, respectively. All NLC formulations were stabilized by alkylpolyglucoside surfactant (PlantaCare<sup>®</sup>2000UP), which was supplied by BASF Chem Trade GmbH, Burgbenheim, Germany. All reagents and solvents were of analytical grade. The ultra-purified water was freshly prepared by a MiliQ<sup>®</sup> System (Millipore, Schwalbach, Germany).

### 2.2. NLC preparation

All NLC dispersions in accordance with the composition presented in Table 2 were prepared by ultrasound homogenization method. The oil and aqueous phases were prepared independently. The proper quantity of solid lipid, liquid lipid and the active compound in the case of the ALA-loaded formulations, were melted at 80 °C. The concentration of  $\alpha$ -lipoic acid (ALA) was 0.5% wt. for all loaded NLC. The aqueous phase with an adequate concentration of the surfactant were heated to the same temperature and added to the melted oil phase, under magnetic stirring, with 600 rpm, for 5 min. So, obtained dispersion of the hot pre-emulsion, was further processed for another 5 min, by ultrasound homogenization, using probe-type sonicator (Sonics Vibra-Cell, Sonics & Materials, INC.) Subsequently, the obtained homogenous NLC systems were cooled down to room temperature resulting in lipid phase recrystallization to form empty or ALA-loaded nanoparticles. ALA oil solution for comparative study were prepared by dispersing the active in Myritol<sup>®</sup>312, using IKA<sup>®</sup> Vortex shaker.

**Table 1**  
Characteristics of lipoic acid.

Structure	Molecular weight	logP	Polar surface area (Å <sup>2</sup> )
	206.318	2.11	37.3

**Table 2**  
The composition of loaded and unloaded NLC formulations.

Formulation Name	Ingredients (% wt.)				
	Oil	Solid Lipid	Surfactant	Water	ALA
NLC I	13	2	7	q.s.	–
NLC-ALA I	13	2	7	q.s.	0.5
NLC II	3	7	4	q.s.	–
NLC-ALA II	3	7	4	q.s.	0.5
NLC III	2	8	5	q.s.	–
NLC-ALA III	2	8	5	q.s.	0.5
Oil-ALA	99.5	–	–	–	0.5

### 2.3. NLC characterization

#### 2.3.1. Particle size, polydispersity index and zeta potential analysis

The particles size (Z-ave), polydispersity index (PDI) and zeta potential of the systems studied were determined using dynamic light scattering technique (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK), at a fixed angle of 173°, and a temperature of 25 °C. The Zeta potential (ZP) as a quantification of a particle surface charge was performed by measuring the electrophoretic mobility of particles dispersed in a liquid. The formulations samples were analyzed after appropriate dilution, with double-distilled water prior, to generate a suitable scattering intensity. For each samples the measurements were carried out in triplicate and average values of the parameters and standard deviation were calculated.

#### 2.3.2. Stability study

The stability of NLC formulations was firstly evaluated by macroscopic observation and estimating the cream increase in time. The samples were checked during storage at room temperature, for three weeks, in case of any destabilization processes (creaming or coalescence) would occur. Light microscopy is an important procedure to know if the relatively larger particles detected by dynamic light scattering technique (DLS) are really particles or agglomerates of nanosized particles as well as solid lipid crystals formation. Motic B1 Series optical microscope, equipped with a camera was used to observe changes of the formulations structure during storage time.

#### 2.3.3. Rheological measurement

Viscosity measurements of NLC formulations were performed using Brookfield Rheometr Model – R/S plus, equipped with a cone and plate type measuring system (cone C75-1), at 25 °C, in the range of shear rate values from 1 to 1000 s<sup>−1</sup>. The measurements were carried out for the fresh formulations (t = 0) and after 24 h storage.

### 2.4. In vitro release investigation

*In vitro* release behavior of lipoic acid from various NLC systems were performed by dialysis bag method [19], using the dialysis cellulose membrane (Spectra/Por<sup>®</sup> Dialysis Membrane) of molecular weight cut-off between 6 and 8 kDa. An appropriate amount of ALA-loaded NLC was filled into the dialysis bag which next was placed into thermostatic dialysis chamber, containing 200 cm<sup>3</sup> of a receptor solution (PBS, pH = 7.4), maintained at 32 °C  $\pm$  0.5 °C and stirred at 200 rpm. Sink conditions were accomplished for all of the terpenes during the performance of the dialysis. At the predetermined intervals of time, 1 cm<sup>3</sup> of the receptor solution with the released active was withdrawn and the same volume of fresh receptor solution was added to maintain the constant volume. The concentration of the released ALA, in the receptor medium, was analyzed spectrophotometrically using Nanocolor UV–vis Spectrophotometer (Machery-Nagel), at room temperature. The amount of active released from the formulations was expressed as the ratio of the quantities of substances released to the total



amount of the incorporated compound, as a function of time. Samples were collected and analyzed for 24 h.

### 2.5. Study of the ALA release kinetic

Kinetic evaluation of release profiles was determined by fitting the experimental data to equations describing different kinetic orders and plotted as percent of the ALA released vs time (zero order equation), log percentage of the active released vs time (first order equation), percentage of the active released  $v/s$  square root of time (according to Higuchi equation), and as log of the drug released percentage vs log time (in accordance with Korsmeyer–Peppas Eq.). To determine the mechanism of the drug release the diffusional release exponent ( $n$ ) was calculated [20–22]. The selection of the best fitting kinetic model was based on the comparison of a determination coefficient ( $R^2$ ).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Preparation and physicochemical characterization of NLC systems

In the present study NLC obtained as a suitable carriers for  $\alpha$ -Lipoic acid (ALA) were composed with natural and skin friendly materials. All of the dispersions, varying in different solid to liquid lipid ratio and surfactant concentration, were produced by the ultrasound homogenization method and appeared as a milky-like systems, bluish after dilution.

The assessment of NLCs stability by macroscopic observation of all the prepared nanocarriers was satisfying and any destabilization process, like creaming or sedimentation occurred in time. The obtained lipoic acid loaded nonstructural lipid carriers (NLC-ALA) were examined by optical microscopy (OM) to detect roughly any presence of agglomerates or crystals. Fig. 1 shows the micrographs of ALA-loaded NLCs. The samples presented in Fig. 1 are homogeneous in particle size and contain no crystals.

The particle size and polydispersity index (PDI) are important characteristics of NLCs that influence the distribution of nanoparticles

[23]. The average particle size (Z-ave), size distribution reported as the PDI and zeta potential of the prepared formulations are presented in Table 3. The mean particle size of fresh unloaded NLC was  $189.3 \pm 1.2$ ,  $184.4 \pm 0.6$  and  $119.0 \pm 0.6$  nm for NLC I, NLC II and NLC III, respectively. Z-ave of appropriate ALA-loaded NLC indicate insignificant changes in particle size and was  $225.9 \pm 2.9$ ,  $273.3 \pm 4.2$  and  $280.8 \pm 1.7$  nm for NLC-ALA I, NLC-ALA II and NLC-ALA III, respectively. For all formulations PDI values were equal or lower than 0.3, suggesting a narrow size distribution [24]. The data for freshly prepared samples ( $T = 0$ ) and after 24 h were of close value what confirm stability of the systems. In addition, all ZP values exceeded an absolute value of 20 mV also pointing to satisfying stability.

### 3.2. Rheological properties of ALA-loaded NLC

The most known method to produce lipid nanoparticles formulations with the desired rheological properties involves incorporating NLC dispersions into topical products like creams or hydrogels. Unfortunately, this kind of intervention has several drawbacks like limited NLC loading, possible incompatibilities with the added viscosity enhancer and more complex manufacturing steps [18,25,26]. That is why rheological properties such as viscosity are very important parameters of NLC dispersions for topical applications [27,28]. The viscosity of each sample as a function of shear rate is presented in Fig. 2. The results showed a shear thinning behavior for all the samples, as the viscosity decreased with increasing shear rate, indicating non-Newtonian, pseudoplastic flow character. Unloaded formulations (NLC I, NLC II, NLC III) are characterized by a lower viscosity when compared to fresh systems loaded with active substance. But when we collate the viscosity of the fresh loaded formulations and systems after 24 h it can be observed, that in case of NLC-ALA I their viscosity increased after storage, whereas for NLC-ALA II and NLC-ALA III the insignificant decrease was noticed. This is most likely related to the different solid to liquid lipid ratio. For NLC-ALA I it was like 2:13 (%wt.) and for NLC-ALA II as well as NLC-ALA III it was 7:3 and 8:2 (%wt.), respectively.

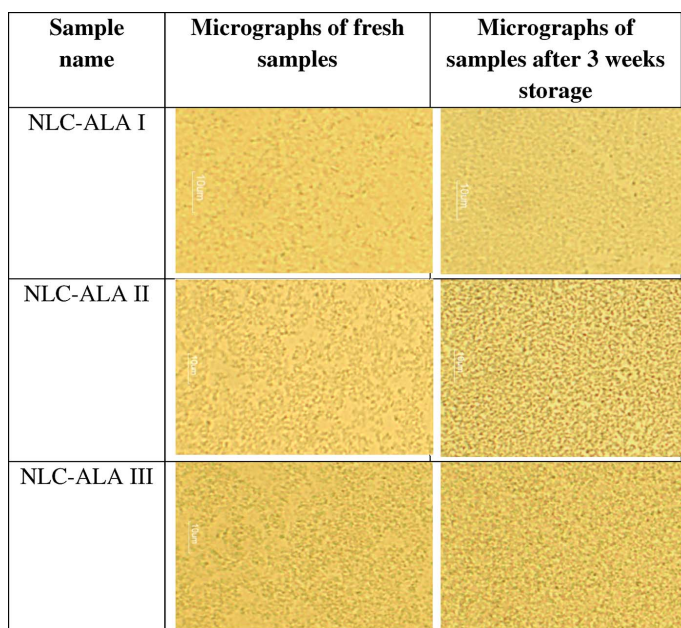
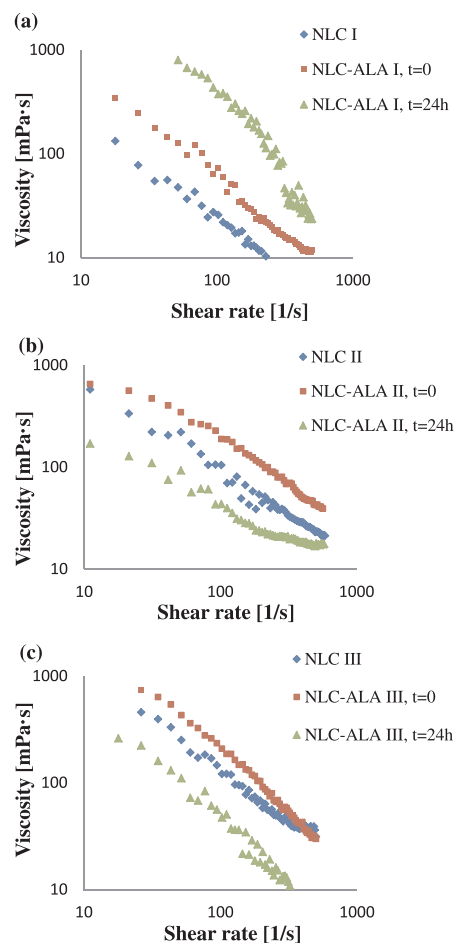


Fig. 1. Juxtaposition of OM photographs showing different stable ALA-loaded NLC in the day of preparation and after 3 weeks. No crystals and agglomerates could be detected after storage at room temperature (magnification  $100 \times 10$ ).

**Table 3**  
Physicochemical parameters of the NLC and NLC-ALA formulations freshly prepared and after 24 h.

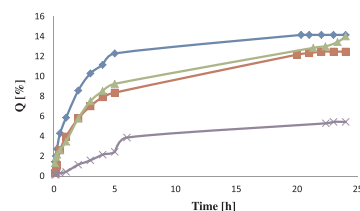
Formulation Name	T = 0			T = 24h		
	Z-ave [nm] ± SD	ZP [mV] ± SD	PDI ± SD	Z-ave [nm] ± SD	ZP [mV] ± SD	PDI ± SD
NLC I	189.3 ± 1.2	−35.8 ± 0.1	0.081 ± 0.006	187.7 ± 0.6	−32.3 ± 0.4	0.165 ± 0.017
NLC-ALA I	225.9 ± 2.9	−34.1 ± 0.1	0.214 ± 0.010	209.6 ± 1.4	−31.1 ± 0.9	0.183 ± 0.014
NLC II	184.4 ± 0.6	−36.5 ± 0.3	0.309 ± 0.009	174.8 ± 3.6	−32.3 ± 1.1	0.281 ± 0.004
NLC-ALA II	273.3 ± 4.2	−22.1 ± 1.4	0.226 ± 0.007	322.7 ± 2.9	−24.2 ± 1.6	0.223 ± 0.011
NLC III	119.0 ± 0.6	−34.7 ± 0.1	0.177 ± 0.013	122.7 ± 0.8	−31.6 ± 0.9	0.187 ± 0.012
NLC-ALA III	280.8 ± 1.7	−22.5 ± 1.1	0.179 ± 0.009	303.1 ± 2.3	−21.0 ± 1.5	0.230 ± 0.007



**Fig. 2.** Viscosity curves of unloaded and ALA-loaded NLCs for fresh samples and after 24 h storage for (a) – NLC-ALA I, (b) – NLC-ALA II, (c) – NLC-ALA III.

### 3.3. *In vitro* release study

The studies of active compound release from nanostructured lipid carriers is not only an important step during the development stages of new formulations but also a routine quality control test for ensuring uniformity of the final product [18]. In the *in vitro* ALA release tests,



**Fig. 3.** Release profiles of alpha lipoic acid from NLC dispersions with different solid to liquid lipid ratio and from oil solution, expressed as percentage wt% of released actives.

dialysis method, with pH 7.4 PBS solution as receptor medium was applied. The reason of use this dissolution medium was in accordance to the European Pharmacopoeia [29]. The amount of released active, expressed as weight percent ratio between concentration of the released active and the total amount of entrapped active, was reported as a function of incubation time. The active containing receptor solution samples were collected for a period of 24 h, each sample was analyzed in triplicate.

The release profiles of lipoic acid are shown in Fig. 3. Comparing results presented in Fig. 3 we can see that the highest and comparable amount of the active substance was released from NLCs (for NLC-ALA I, NLC-ALA II, NLC-ALA III was 14.143%, 14.007%, 12.471%, respectively) than from the oil solution (5.428%). However, in case of NLC-ALA I the active release rates is a bit higher than for NLC-ALA II and NLC-ALA III. This might be the effect of higher content of the liquid lipid in the formulations. The enriched shells possessed considerable higher solubility for lipophilic actives so the substance was easier loaded to higher amount and as the consequence the drug could be easily released as well as by the its diffusion or the matrix erosion manners [30,31]. NLC-ALA II and NLC-ALA III contained the same amount of total lipid concentration varying insignificantly in solid to liquid lipid ratio and their release trends appeared quite similar. What is more NLCs with a smaller particle size and consequently a high surface area show rapid and higher release rates like it can be observed in case of NLC-ALA I [23,32]. Additionally, the observed difference between release profiles of lipoic acid from NLC-ALA I and NLC-ALA II and NLC-ALA III could be related to the viscosity of the formulations. The NLC-ALA I system is less viscous than the others. However, in all cases the release from ALA-loaded NLC was higher than that observed from the oil solution (Oil-ALA).

From the character of ALA release profiles it could be concluded that its release from the NLC systems showed two-step characteristic, with the burst effect at the beginning followed by gradual release during the last hours of the process. Both, burst and sustained release are of great interest for dermal applications. Burst release can be useful to improve the penetration of the active, whereas sustained release provides the active over an extended period of time [30].

**Table 4**  
The kinetic model parameters fitting to the release results.

Model	Parameter	Formulation			
		NLC-ALA I	NLC-ALA II	NLC-ALA III	Oil-ALA
Zero-order	$R^2$	0.6988	0.8217	0.8466	0.9573
	$K_0$ [mg/h]	0.0003	0.0003	0.0003	0.0002
First order	$R^2$	0.5145	0.5014	0.6438	0.6079
	$K_1$ [h <sup>-1</sup> ]	0.0565	0.0853	0.0665	0.1156
Higuchi	$R^2$	0.8461	0.9410	0.9509	0.9942
	$K_H$ [mg/h <sup>1/2</sup> ]	0.3473	0.3294	0.3555	0.1691
Korsmeyer-Peppas	$R^2$	0.9275	0.9138	0.9788	0.9648
	$K_{HP}$ [h <sup>-n</sup> ]	0.05	0.025	0.039	0.00664
	$n$	0.3876	0.5892	0.4187	0.7161

### 3.4. Kinetic analysis

Kinetic evaluation of release profiles was determined by fitting the experimental data to equations describing different kinetic orders. The selection of the best fitting kinetic model was based on the comparison of the determination coefficient ( $R^2$ ). The calculated parameters of kinetic models used for description of the lipoic acid release from different nanostructured lipid carriers and the oil are presented at Table 4.

The data shown in Table 4 indicated that the simple kinetic models for drug release *i.e.*, a zero-order or a first-order do not fit the observed results. In case of formulation NLC-ALA II, and Oil-ALA the release profiles could be best explained by Higuchi model as the plots showed high linearity ( $R^2 = 0.9410$ , and  $R^2 = 0.9942$ , respectively). This model suggests that pure diffusion release mechanism took place and the release medium did not enter into nanoparticles. The drug release mechanism from these carriers was diffusion controlled. However, in the case of NLC-ALA II, the  $n$  value was higher than 0.5 suggesting that more than one mechanism may be involved in release process like erosion or swelling of the matrix. Whereas, the release of lipoic acid from vehicle NLC-ALA I and NLC-ALA III occurred according to the Korsmeyer-Peppas model and Fickian diffusion release ( $n = 0.3876$  and  $n = 0.4187$ , respectively) which indicates predominantly diffusional drug release.

The obtained data are in accordance with the literature reports confirming that the release of drugs from nanostructured lipid carriers occurs mainly according to the Higuchi and Korsmeyer-Peppas models [33–36].

## 4. Conclusions

Our studies provided the evidence that the stable ALA-loaded NLCs were successfully prepared by the ultrasonification method. The elaborated formulations are promising vehicle to improve the alpha lipoic acid loading capacity and elongate the half-life of the active. The obtained carriers are nano-sized with good physicochemical stability and satisfying rheological properties. The release of ALA from the NLC systems was found to be two-step, with the burst effect at the beginning followed by gradual release of the active during the time. The initial rapid release can be useful to improve the penetration of the active, whereas sustained release provides the active over an extended period of time. Lipid phase concentration and solid to liquid lipid ratio influenced the release rate of ALA from the formulations. The Higuchi or Korsmeyer-Peppas models for drug release, fits well the experimental data.

To sum up the obtained results confirm that the prepared systems are suitable carriers for controlled release of ALA and can be a promising solution for skin delivery of lipophilic active substances.

## References

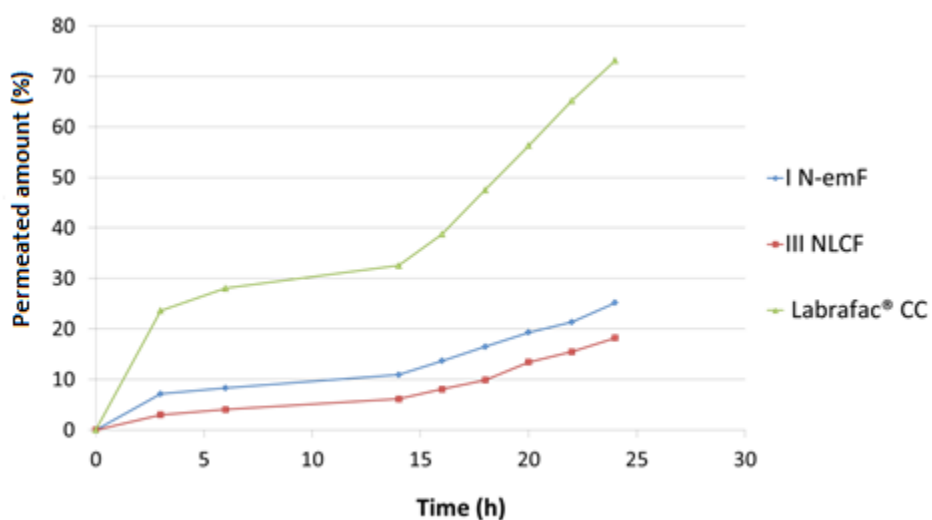
- [1] W. Houn, C. Lin, J. Shen, et al., Dihydroliipoic acid induces cytotoxicity in mouse blastocysts through apoptosis processes, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 3988–4002.
- [2] A. Bliska, L. Wlodek, Lipoic acid—the drug of the future? *Pharmacol. Rep.* 57 (2005) 570–577.
- [3] S. Brown, M. Ross, A. Sanjuan-Pla, Targeting lipoic acid to mitochondria: synthesis and characterization of a triphenylphosphonium-conjugated  $\alpha$ -lipoil derivative, *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 1766–1780.
- [4] Y. Li, Y. Zhao, W. Yu, Scavenging ability on ROS of alpha-lipoic acid (ALA), *J. Food Chem.* 84 (2004) 563–567.
- [5] J. Wang, Q. Xia, Alpha-lipoic acid-loaded nanostructured lipid carrier: sustained release and biocompatibility to HaCaT cells *in vitro*, *Drug Deliv.* 21 (2014) 328–341.
- [6] S. Salinithone, R.V. Schillace, C. Tsang, et al., Lipoic acid stimulates cAMP production via G protein-coupled receptor-dependent and -independent mechanisms, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 681–690.
- [7] T. Tankova, S. Cherninkova, D. Koev, Treatment for diabetic mononeuropathy with  $\alpha$ -lipoic acid, *Int. J. Clin. Pract.* 59 (2005) 645–650.
- [8] U. Ruktanonchai, P. Bejrapha, U. Sakulku, et al., Physicochemical characteristics, cytotoxicity, and antioxidant activity of three lipid nanoparticulate formulations of alpha-lipoic, *AAPS PharmSciTech* 10 (2009) 227–234.
- [9] J. Wang, J. Tang, X. Zhou, Q. Xia, Physicochemical characterization, identification and improved photo-stability of  $\alpha$ -lipoic acid-loaded nanostructured lipid carrier, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 40 (2014) 201–210.
- [10] R.H. Müller, W. Menhert, J.S. Lucks, Solid lipid nanoparticles (SLN) – an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 62–69.
- [11] J. Pardeike, A. Hommos, R.H. Müller, Lipid nanoparticles (SLN: NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *Int. J. Pharm.* 366 (2009) 170–184.
- [12] A.C. Silva, E. Gonzalez-Mira, M.L. Garcia, M.A. Egea, Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 86 (2011) 158–165.
- [13] Y.P. Fang, Y.K. Lin, Y.H. Su, J.Y. Fang, Tryptanthrin-loaded nanoparticles for delivery into cultured human breast cancer cells, MCF7: the effects of solid lipid/liquid lipid ratios in the inner core, *Chem. Pharm. Bull.* 59 (2011) 266–271.
- [14] M. Fathi, J. Varshosaz, Novel hesperetin loaded nanocarriers for food fortification: production and characterization, *J. Funct. Foods* 5 (2013) 1382–1391.
- [15] A. Pezeshki, B. Ghanbarzadeh, M. Mohammadi, I. Fathollahi, H. Hamishehkar, Encapsulation of vitamin A palmitate in nanostructured lipid carrier (NLC) – effect of surfactant concentration on the formulation properties, *Adv. Pharm. Bull.* 4 (2014) 563–568.
- [16] Y. Chen, X. Yang, L. Zhao, L. Almásy, V.M. Garamus, R. Willumeit, et al., Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble drug, *Colloids Surf. A* 455 (2014) 36–43.
- [17] R.P. Thattipamula, C.R. Palem, R. Gannu, et al., Formulation and *in vitro* characterization of domperidone loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers, *DARU J. Pharm. Sci.* 19 (2011) 23–32.
- [18] M. Joshi, V. Patravale, Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib, *Int. J. Pharm.* 346 (2008) 124–132.
- [19] W. Hanson, Theoretical concepts, *Handbook of Dissolution Testing*, Pharmaceutical Technology Publications, 1982.
- [20] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Pol. Pharm.* 67 (3) (2010) 217–233.
- [21] V. Cojocaru, A.E. Ranetti, L.G. Hinescu, M. Ionescu, C. Cosmescu, A.G. Postorac, L.O. Cinteza, Formulation and evaluation of *in vitro* release kinetics of NaCaDTPA decorporation agent embedded in microemulsion-based hydrogel formulation for topical delivery, *FARMACIA* 63 (5) (2015) 656–664.
- [22] M. Miastkowska, E. Sikora, J. Ogonowska, M. Zielina, A. Ludzik, The kinetic study of isotretinoin release from nanoemulsion, *Colloids Surf. A* 510 (2016) 63–68.
- [23] H.S. Rahman, A. Rasedee, C.W. How, A.B. Abdul, N.A. Zeenathul, H.H. Othman, et al., Zerubone-loaded nanostructured lipid carriers: preparation, characterization, and antileukemic effect, *Int. J. Nanomed.* 8 (2013) 2769–2781.
- [24] S. Okonogi, P. Riangnanapatee, Physicochemical characterization of lycopene-loaded nanostructured lipid carrier formulations for topical administration, *Int. J. Pharm.* 478 (2015) 726–735.
- [25] E.B. Souto, S.A. Wissing, C.M. Barbosa, R.H. Müller, Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 71–77.
- [26] V.B. Junyaprasert, V. Teeranachadeekul, E.B. Souto, P. Boonme, R.H. Müller, Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: stability, rheology and *in vitro* skin permeation, *Int. J. Pharm.* 377 (2009) 207–214.
- [27] J.C. Schwarz, A. Weixelbaum, E. Pagitsch, M. Löw, G.P. Resch, C. Valenta, Nanocarriers for dermal drug delivery: influence of preparation method, carrier type and rheological properties, *Int. J. Pharm.* 437 (2012) 83–88.
- [28] Y. Yang, A. Corona III, S.R. Bhatia, M.A. Henson, The controlled aggregation and tunable viscosity of nanostructured lipid carrier dispersions, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 482 (2015) 138–147.
- [29] M.L. Bondi, A. Azzolina, E.F. Craparo, C. Botto, E. Amore, G. Giammona, M. Cervo, Entrapment of an EGFR inhibitor into nanostructured lipid carriers (NLC) improves its antitumor activity against human hepatocarcinoma cells, *J. Nanobiotechnol.* 12 (2014) 21, <http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-12-21>.
- [30] K. Bhaskar, J. Anbu, V. Ravichandiran, V. Venkateswarlu, Y.M. Rao, Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen: formulation, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies, *Lipids Health Dis.* 26 (2009), <http://dx.doi.org/10.1186/1476-1476-26>.

- 511x-8-6.
- [31] D. Patel, S. Dasgupta, S. Dey, Y.R. Ramani, S. Ray, B. Mazumder, Nanostructured lipid carriers (NLC)-based gel for the topical delivery of aceclofenac: preparation, characterization, and in vivo evaluation, *Sci. Pharm.* 80 (2012) 749–764.
  - [32] A.V. Jithan, M. Swathi, Development of topical diclofenac sodium liposomal gel for better anti-inflammatory activity, *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.* 3 (2010) 986–992.
  - [33] M. Üner, E.F. Karaman, Z. Aydoğmuş, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers of loratadine for topical application: physicochemical stability and drug penetration through rat skin, *Trop. J. Pharm. Res.* 013 (5) (2014) 653–660, <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v13i5.1>.
  - [34] U. Nagaich, N. Gulati, Nanostructured lipid carriers (NLC) based controlled release topical hydrogel of clobetasol propionate: design and in vivo characterization, *Drug Deliv. Transl. Res.* 6 (2016) 289–298, <http://dx.doi.org/10.1007/s13346-016-0291-1>.
  - [35] M. Pradhan, D. Singh, S.N. Murthy, M.R. Singh, Design, characterization and skin permeating potential of Fluocinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis, *Steroids* 101 (2015) 56–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2015.05.012>.
  - [36] Ü. Gönüllü, M. Üner, G. Yener, E.F. Karaman, Z. Aydoğmuş, Formulation and characterization of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers and nanoemulsion of lornoxicam for transdermal delivery, *Acta Pharm.* 65 (1) (2015) 1–13, <http://dx.doi.org/10.1515/acph-2015-0009>.

Przedruk publikacji [Lasoń, Acta Biochim Pol, 2018]

[Lasoń, Acta Biochim Pol, 2018]

E. Lasoń, E. Sikora, M. Miastkowska, E. Escribano, M. J. Garcia-Celma, C. Solans, M. Llinas, J. Ogonowski, NLC as a potential carrier system for transdermal delivery of forskolin, Acta Biochimica Polonica, 2018, [przyjęty do druku]



## NLCs as a potential carrier system for transdermal delivery of forskolin\*

Elwira Lasoń<sup>1</sup>✉, Elżbieta Sikora<sup>1</sup>, Małgorzata Miastkowska<sup>1</sup>, Elvira Escribano<sup>2</sup>, Maria Jose Garcia-Celma<sup>2</sup>, Conxita Solans<sup>3</sup>, Meritxell Llinas<sup>3</sup> and Jan Ogonowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Chemical Engineering and Technology, Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, Kraków, Poland; <sup>2</sup>Department of of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical-Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain. IN, UB members; <sup>3</sup>Institute for Advanced Chemistry of Catalonia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC-CSIC) Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) Barcelona, Spain

Nanostructured lipid carriers (NLC) composed of the substances generally recognized as safe (GRAS) were obtained by using a hot high-pressure homogenization technique (HPH). The influence of the number of homogenization cycles and concentration of a decyl glucoside surfactant on the NLC properties were studied. The system's stability was assessed by macroscopic observation, light backscattering and zeta potential measurements. NLC particle size was measured using dynamic light scattering (DLS). The kinetically stable formulations were loaded with forskolin and selected for *in vitro* drug permeation study using the Franz cell method. Concentration of forskolin in the receptor solution (i.e. ethanol/PBS mixture) was analyzed with high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection. The obtained results have shown that NLC formulations could be used as effective carriers for forskolin permeation through the skin.

**Key words:** Forskolin, NLC, nanostructured lipid carrier, skin permeation

**Received:** 19 January, 2018; **revised:** 04 April, 2018; **accepted:** 26 July, 2018; **available on-line:** 15 September, 2018

✉ e-mail: elason@chemia.pk.edu.pl

\*Preliminary report presented at 6th Central European Congress of Life Sciences. EUROBIOTECH, 11–14 September, 2017. Kraków, Poland

**Abbreviations:** NLC, nanostructured lipid carrier; SLN, solid lipid nanoparticle; HPH, high pressure homogenization

### INTRODUCTION

Nanostructured lipid carriers (NLCs) one of the main types of lipid nanoparticles, are alternative carrier systems next to emulsions, liposomes and polymeric nanocapsules. And as a second generation of lipid nanoparticles they have many advantages over solid lipid nanoparticles (SLN). NLCs are produced using blends of solid and liquid lipids (oils) in contrast to SLNs, which contain only solid lipids. A certain amount of oil in NLCs leads to a less perfect crystal structure, which contributes to an increased active loading capacity and minimizes, or even prevents, the expulsion of drug during storage (Müller *et al.*, 2002a; Zheng *et al.*, 2013).

Therefore, lipid nanoparticle formulations with solid matrix have shown great potential as carriers for topical administration of poorly soluble active ingredients. Over the past few years they have been studied intensively for dermal applications, for both pharmaceutical and cosmetic applications (Müller *et al.*, 1995; Müller

*et al.*, 2002a; Pardeike *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2007). They have many advantages important for this kind of products, e.g. they increase skin hydration and occlusive properties (Wissing & Müller, 2003) enable the modified release profile (Jenning *et al.*, 2000; Souto *et al.*, 2004) increase skin penetration related to a targeting effect and avoidance of systemic absorption (Liu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006). Moreover, lipid nanoparticles enhance the stability of chemically labile drugs and active ingredients (Souto & Müller, 2005; Üner *et al.*, 2005; Junyapraserta *et al.*, 2009).

Recent research has indicated that nanoparticulate systems, such as lipid nanoparticles (SLNs, NLCs) show improved uptake and skin targeting (Gelfuso *et al.*, 2016). Nanoparticles like liposomes (De Leeuw *et al.*, 2009) oil-based dispersions (Konan *et al.*, 2002) polymeric particles (Gomes *et al.*, 2007) or gold nanoparticles (Cheng *et al.*, 2008) have been successfully applied to create a new drug delivery system for treatment of skin cancer. The main focus has been put on diagnosing and treating metastatic melanoma, which is the deadliest skin cancer (Vyas *et al.*, 2012). Many chemotherapeutics administered systemically are cytotoxic to healthy cells, therefore nanomedicine aims to design nanoparticles which could selectively deliver drug specifically to the melanoma cells (Chen *et al.*, 2010; Dhar *et al.*, 2011).

Forskolin is a diterpene produced by the Indian Coleus plant (*Coleus forskohlii*) and an interesting active compound showing potential to protect skin from the UVB damage. It activates adenylyl cyclase and therefore increases the intracellular levels of cAMP (cyclic adenosine monophosphate) (Burlando *et al.*, 2010). It has been demonstrated that inducing pigmentation with forskolin provides effective protection against UVB-induced DNA damage and skin cancer in mice deficient for a DNA repair enzyme. Passeron and others (Passeron *et al.*, 2009) demonstrated in their study that forskolin protects keratinocytes from UVB induced apoptosis independently of the amount of melanin in the skin. They proved that it enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers and 6,4-photoproducts, which are the two major types of UVB-induced DNA damage, and facilitates DNA repair. These results imply new preventive approaches with topical formulations containing forskolin, which could be applied to the skin before sun exposure. Moreover, forskolin has appeared in the literature as a natural substance to obtain a healthy tan (Spry *et al.*, 2009).

The objective of this study was to develop and optimize stable NLC formulations based on mixture of



beeswax and caprylic/capric triglycerides as the carriers for topical administration of forskolin, which could be potentially used as an alternative drug carrier.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** In this study we used the following solid lipids: Apifil® (PEG-8 beeswax; Gattefossé GmbH, Weil am Rhein, Germany) Cutina®CP (cetyl palmitate, BASF Chem Trade GmbH, Burgbenheim, Germany) Compritol®888ATO (glyceryl behenate, Gattefossé GmbH, Weil am Rhein, Germany) Carnauba wax (Kahlwax, Kahl GmbH & Co. KG, Trittau, Germany). Labrafac®CC (caprylic/capric triglycerides, Gattefossé GmbH, Weil am Rhein, Germany) and Cetiol®V (decyl oleate, BASF Chem Trade GmbH, Burgbenheim, Germany) were liquid lipid used. PlantaCare®2000UP (decyl glucoside, BASF Chem Trade GmbH, Burgbenheim, Germany) was applied as a surfactant. An active substance, Forslean (*Coleus Forskohlii* Root Extract containing 95% of forskolin) was purchased from Sabinsa Europe GmbH, Langen, Germany). The ultra-purified water was freshly prepared by a MilliQ® System (Millipore, Schwalbach, Germany).

**Forskolin solubility.** Prior to the NLCs production a lipid screening was performed to determine the most suitable lipids with respect to the solubility of forskolin to be incorporated. This was done by heating the solid lipid, 5°C above its melting point, and dissolving an increasing amount of forskolin therein. After dissolution, the mixture of lipids and the active ingredient was cooled down to room temperature for solidification and then visually examined for the presence of crystalline forskolin. Additionally, to exclude presence of forskolin crystals in the lipid matrix, we used Leica Reichert Polyvar 2 microscope with a hot plate and a polarizer.

**Preparation of NLC.** Free and forskolin-loaded NLCs were prepared using hot high-pressure homogenization method (HPH). A certain amount of solid lipid (Apifil®) and liquid oil (Labrafac®CC) were melted in various solid to liquid lipid ratios (Table 1) at 80°C, to get a uniform oil phase. When needed, forskolin was added to the oil phase. Next, the melted lipid phase was dispersed in the hot surfactant water solution by using high speed magnetic stirrer (Agimatic-N, P Selecta) at 750 rpm, for 5 min. The obtained pre-emulsion was subsequently homogenized at 75°C, using the high-pressure homogenizer (Microfluidics Corporation, Newton Massachusetts) at 275 bar. The number of homogenization

cycles ranged from 3 to 6. For a comparative study, a nanoemulsion was prepared, using Labrafac®CC as an oil phase, and production parameters that were the same as for NLCs with 3 homogenization cycles.

**Zeta potential analysis.** Zeta potential (ZP) of NLC dispersions was determined by the measurement of the electrophoretic mobility, using Malvern 4700C Sub Micron Particle Analyzer. The conversion into the ZP was performed using Helmholtz-Smoluchowski equation. ZP was measured at room temperature after dilution of samples with deionized water. The measurements for each sample were repeated three times.

**Particle size measurements.** Mean particle size of the lipid dispersions (z-ave) and the polydispersity index (PI) which is a measure of the width of the size distribution, were determined using Dynamic Light Scattering (DLS) method, using Malvern 4700C Sub Micron Particle Analyzer. Analyses were performed using a 90° scattering angle at 25°C. Prior to the measurements, all samples were diluted with deionized water to have a suitable scattering intensity. During the experiment, refractive index of the samples was set at 1.450. For each sample the analysis was performed three times to determine mean values.

**NLC stability studies.** The stability of NLC formulations was firstly evaluated by macroscopic observation and estimating the “cream” increment in time by measuring the height of delamination. The samples of equal volume were observed daily over three weeks, and any destabilization processes (creaming or coalescence) were measured.

After macroscopic observation, the stability of the most stable NLC formulations was additionally assessed by light backscattering, by means of a Turbiscan Lab® Expert (Formulation SA, France) at constant temperature (32°C). Transmission and backscattering data were acquired for 24 h, in intervals of 2 hour, according to the method proposed by Caldero and others (Caldero *et al.*, 2011).

**In vitro skin permeation studies.** For the skin permeation study, human skin samples obtained by abdominoplasty surgeries were kindly provided by Clínica Sagrada Familia, Barcelona, Spain. Before each experiment, skin integrity was evaluated by measuring the transepidermal water loss (TEWL) of skin pieces. *In vitro* permeation through human epidermis (0.4 mm) from the same donor was assessed using the MicroettePlusR system (Hanson Research, USA). The experiments were performed at 32°C±0.5, 400 rpm, using mixture of PBS

Table 1. The NLC systems' composition and obtaining parameters.

Formulation name	Ingredients (%wt.)			Number of homogenization cycles
	oil	solid lipid	surfactant	
NLC-3	3	7	2	3
NLC-4	3	7	4	
NLC-5	4.5	10.5	2	
NLC-6	6	14	2	
NLC-7	4.5	10.5	4	
NLC-8				4
NLC-9	6	14	4	
NLC-10				
NLC-11				

\*water up to 100% wt., 270 bar, 75°C

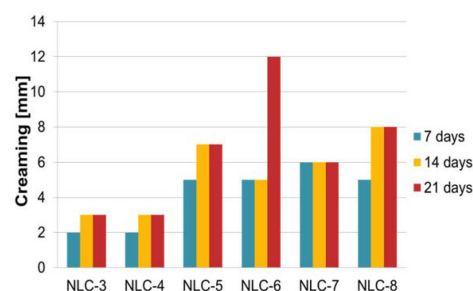


Figure 1. Effect of NLC's composition on creaming phenomena (3 cycles,  $p=275$  bar,  $T=75^{\circ}\text{C}$ ).

(pH 7.4)/ethanol (60:40, V/V) as receptor solution (sink conditions). An adequate amount of formulation (0.350 ml) was placed in the donor part at Franz diffusion cells. Samples of 700  $\mu\text{l}$  were withdrawn automatically from the receptor compartment. The acceptor fluid was collected subsequently during 24 h. The number of replicates per formulation was  $n=6$ .

Estimated permeation parameters were: flux at steady state ( $J_{ss}$ ) by means of a linear regression (cumulative permeated amount *vs.* time, slope) lag time (TL) (X-intercept) permeability coefficient ( $K_p = J_{ss}/C_{\text{formulation}}$ ) partition parameter  $P_1$  and the apparent length of diffusion parameter  $P_2$  (according to: Okamoto (Okamoto *et al.*, 1986) and Selzer (Selzer *et al.*, 2013). The steady state flux through the membrane is given by:  $J_{ss} = C_0 \cdot K_p = C_0 \cdot (K \cdot D)/L$ , where  $C_0$  is the constant forskolin concentration in the donor compartment,  $K$  is the partition coefficient vehicle/skin,  $D$  is the diffusion coefficient of the permeant in the skin and  $L$  is the effective diffusion path length. Since  $L$  is unknown, the expression  $(K \cdot D)/L$  can be replaced by the product of  $P_1$  and  $P_2$  parameters, being  $P_1 = K \cdot L$  and  $P_2 = D/L^2$ ; the calculation of  $P_2$  is obtained from  $1/6 \cdot T_L$ .

The parameters calculated were compared by a non-parametric statistical assay (Kruskal-Wallis 'Z') ( $p < 0.05$ ) according to Williams and others (Williams *et al.*, 1992) and followed by Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test.

**HPLC analysis.** Concentration of the active ingredient in acceptor medium of the permeation assays was analyzed using HPLC Waters instrument, operated at room temperature, consisting of an automatic auto sampler system, equipped with UV detector and Spherisorb ODS column (5 mm $\times$ 15 cm $\times$ 0.46 cm). The mobile phase was isocratic (60 volumes of acetonitrile and 40 volumes of water) which remained constant throughout the entire analysis. The flow rate was set to 0.5 ml/min. The assay was monitored at the wavelength of 210 nm, sample injection volume was 20  $\mu\text{l}$  and run time 10 min. The active ingredient's content was identified by comparing its retention time and UV spectra. The calibration curve was constructed from linear plots of peak area versus concentration.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Forskolin solubility in lipids

A precondition for a successful encapsulation of forskolin into NLC system is its applicable solubility

Table 2. Solubility of forskolin in solid and liquid lipids.

Lipids	max solubility, mg/mL
Apifil®	3.2
Cutina CP®	n.d.
Compritol® 888 ATO	1.3
Carnauba wax	n.d.
Labrafac® CC	3.5
Cetiol V	1.5
Apifil® / Cetiol V	1.3
Apifil® / Labrafac® CC	6.2
Compritol® 888 ATO / Labrafac® CC	1.2
Compritol® 888 ATO / Cetiol V	1.2
Cutina CP® / Labrafac® CC	n.d.

\*Ratio of solid to liquid lipid ratio was 70/30; n.d., not analyzed amount

in the lipid. Therefore, the four chosen solid lipids (Apifil®, Cutina®CP, Compritol®888ATO, Carnauba wax) and their mixture with liquid lipids (Labrafac®CC, Cetiol®V) in the ratio 70:30 were screened. The obtained results showed that the best solvent for forskolin was Apifil®/ Labrafac®CC mixture (Table 2). It was further chosen to produce forskolin-loaded NLCs.

### NLC stability

The high-pressure homogenization technique, using a varying number of process cycles was applied for NLCs preparation. Moreover, influence of lipids' concentration, solid to liquid lipids ratio, and concentration of surfactant on NLCs' stability were studied.

Figure 1 shows the results of creaming phenomena for formulations with different composition, obtained by HPH method (3 cycles,  $p=275$  bar,  $T=75^{\circ}\text{C}$ ). It has been found that increase in the solid lipid content in formulation: 7, 10.5, and 14% for NLC-3, NLC-5, and NLC-6, respectively, resulted in a creaming increase.

NLC formulations were prepared applying a varying number of homogenization cycles (3, 4, 5, or 6). Figure 2 shows the influence of the number of homogenization cycles on NLCs' stability (composition of the formulations, pressure and temperature of homogenization were maintained constant). The obtained results show that creaming with 3 homogenization cycles and

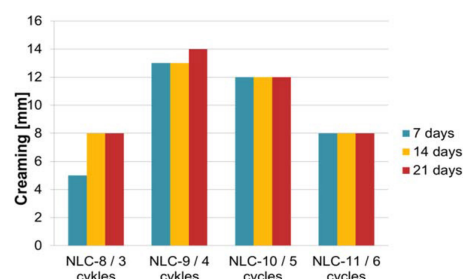
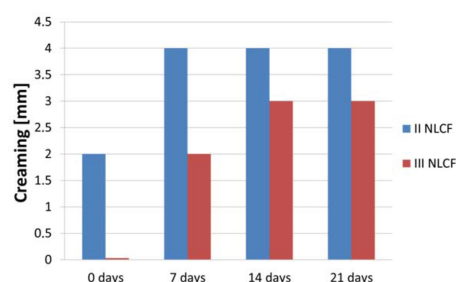


Figure 2. Influence of the number of homogenization cycles on creaming phenomena.



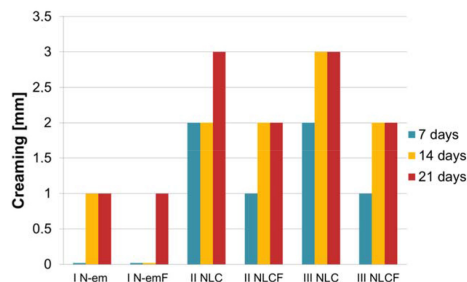


**Figure 3. Influence of surfactant concentration on creaming phenomena (II NLCF, 2% of surfactant; III NLCF, 4% of surfactant).**

6 homogenization cycles were similar. Taking into consideration the economy and efficiency of the homogenization process, 3 cycles of the microfluidizer setting were finally chosen to obtain forskolin loaded NLC.

The choice of surfactant and its concentration has an impact on the quality of NLC dispersion (Mulla & Khazi, 2009). In our work decyl glucoside (PlantaCare®2000UP) was chosen as an emulsifier because of its dermatologically compatible properties and unperfected form, which is very important in skin care products. A sufficient amount of a surfactant must be used to cover the newly formed surfaces, created during high-pressure homogenization process. The influence of the surfactant content on creaming phenomena in the formulations of the same lipid concentration is presented in Fig. 3. Increasing the surfactant content from 2% to 4% wt. resulted in an increase of the systems stability. The concentration above 4% wt. was not considered, as it was observed that higher concentration of PlantaCare®2000UP caused foam formation during the high-pressure homogenization process.

Zeta potential (ZP) is often a key factor used to evaluate the stability of colloidal dispersion. Particle aggregation is less likely to occur for charged particles with high zeta potential (more than  $|30|$  mV) because of electric repulsion. Generally, lipid nanoparticles (SLNs, NLCs) are negatively charged on the surface (Schwarz & Menhert, 1999). In our formulations all the zeta potential values were less than  $-30$  mV; nevertheless, destabilization processes in form of creaming were observed in many cases. Non-ionic surfactant, like alkyl polyglucoside, cannot ionize into charging group like the ionic surfactants, but indicates its ZP. It might be because of molecular polarization and adsorption of surfactant molecule on the charge in water, it was absorbed to the emulsifier layer of particle/water interface, and an electric double layer similar to ionic was formed (Han *et al.*, 2008).



**Figure 4. Influence of forskolin on creaming phenomena**

I N-em, nanoemulsion; I N-emF, forskolin-loaded nanoemulsion; II NLC formulation with 2% wt. of surfactant; II NLCF, forskolin-loaded formulation with 2% wt. of surfactant; III NLC formulation with 4% wt. of surfactant; III NLCF, forskolin-loaded formulation with 4% wt. of surfactant.

#### Characterization of forskolin-loaded NLC

Considering the results obtained in the first part of our study, we chose the optimal formulation for the active ingredient incorporation. NLCs that contained 0.075% wt. of forskolin, 3% wt. of Labrafac®CC, 7% wt. of Apifil® and 2% (II NLCF) or 4% wt. (III NLCF) of PlantaCare®2000UP were prepared and characterized. Moreover, a nanoemulsion (I N-emF) with this same percentage of oil/surfactant was also prepared for comparison (Table 3).

During stability study of forskolin-loaded NLCs it was confirmed (Fig. 3) that 4% wt. content of surfactant in the formulations (III NLCF) is sufficient to obtain a stable system. It was also found that addition of forskolin positively affected the stability of NLC systems. Figure 4 shows the effect of forskolin presence in the formulations (II NLCF, III NLCF) compared to formulations without the active ingredient (II NLC, III NLC) on the process of creaming. It can be clearly seen, that NLCs containing forskolin (II NLCF, III NLCF) do not show the further creaming process after 7, 14 and 21 days, contrary to formulations without the active ingredient.

Additionally, the stability analysis of the pre-selected for *in vitro* skin permeation study formulation (III NLCF) and the nanoemulsion prepared for a comparison (I N-emF) were also assessed using Turbiscan Lab® Expert. This method is non-destructive, as no dilution of the sample is necessary, and gives the information on the kind of destabilization process. Turbiscan measurements are based on the variation of the droplet volume fraction (creaming/sedimentation) or mean size (coalescence) which result in the variation of backscattering and transmission signals (Paolino *et al.*, 2011). These signals occur as a function of time (and particle migration) and

**Table 3. The optimal formulations for drug encapsulation.**

Formulation name	Ingredients (% wt.)				ZP [mV]	Z-ave [nm] ± S.D.	PDI
	Oil	Solid lipid	Surfactant	Forskolin			
I N-emF	10	–	2	0.075	–44.2	168.5±6.6	0.211
II NLCF	3	7	2	0.075	–32.3	174.8±5.3	0.315
III NLCF	3	7	4	0.075	–36.5	184.4±3.8	0.309

\*water up to 100% wt.

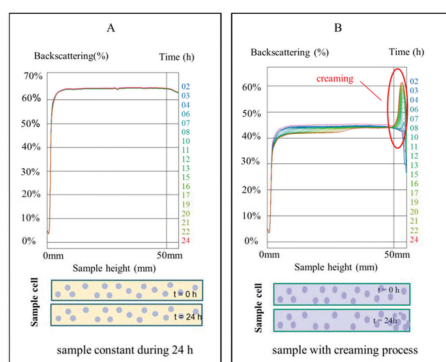


Figure 5. Comparison of backscattering data of (A) nanoemulsion (I N-emF) and (B) III NLCF

are graphically reported in the form of positive (backscattering increase) or negative peaks (backscattering decrease). No variations of particle size take place when the backscattering profile is within the interval  $\pm 2\%$ . Variations greater than 10% represent destabilization which will occur over time (Fig. 5).

#### *In vitro* skin permeation

The skin permeation of forskolin contained in the NLC system (III NLCF) nanoemulsion (I N-emF) and Labrafac®CC was studied. The results of the *in vitro* percutaneous permeation experiments are presented in Fig. 6 and Table 4. As it can be observed, the highest permeation through the skin profile of forskolin was achieved in Labrafac CC® ( $p < 0.05$ ) and could be mainly attributed to a higher skin/vehicle partition coefficient (reflected in the value of the parameter  $P_1$ ) that could favor the active ingredient's penetration through the stratum corneum. The percentage of forskolin permeated at 24 h was very high (near 80%).

Both assayed nanoformulations showed similar permeation profiles. According to the permeation parameters (Table 4) the calculated Kp enhancement ratio of IN-emF with respect to IIINLCF is close to 1 (1.12). This shows that the permeability coefficients were very similar, which would be in accordance with the high lipophilicity of forskolin and the lipophilic nature of the stratum corneum. However, the permeation was slightly higher in case of the emulsion. This higher permeation could be explained by a higher thermodynamic activity of forskolin in the oil of the nanoemulsion (Labrafac

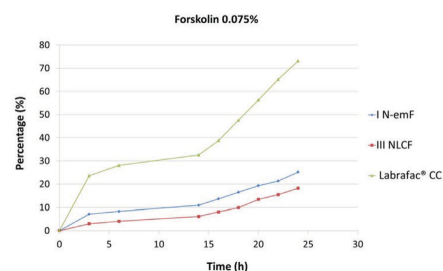


Figure 6. Mean skin permeation profile of forskolin in nanoemulsion (I N-emF) NLC (III NLCF) and oil (Labrafac CC®).

CC®) with respect to the mixture Apifil/Labrafac CC® of the NLC, according to its solubility in the oil phases (Table 2). Thermodynamic activity is the main driving force for skin permeation (Kemken, 1991) and it would lead to fast diffusion of forskolin through the skin. This is reflected in the  $P_2$  diffusion parameter (median value of  $2.74 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  vs.  $1.74 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  for nanoemulsion and NLC, respectively). Moreover, in this study, the occlusive effect of the NLC component (solid lipid) that usually gives an enhancing effect on skin permeation, did not exceed the effect of thermodynamic activity in the nanoemulsion.

The nanocarrier systems composed of caprylic/capric triglycerides and a biologically compatible surfactant can be considered as good vehicles for forskolin delivery into the skin. According to the obtained results and considering that the developed formulations are for topical application and local purposes, the NLC formulation would provide less forskolin in blood than the nanoemulsion and in this sense it would be more appropriate.

#### CONCLUSION

The obtained results showed that not only composition (content of solid lipid, surfactant concentration) but also parameters of homogenization influence the stability of nanostructured lipid carrier formulations (NLCs). The kinetically stable NLCs for forskolin encapsulation containing 4% of emulsifier (decyl glucoside) were obtained by HPH process, at  $T=75^\circ\text{C}$ ,  $p=275 \text{ bar}$  and 3 pass number of the high-pressure homogenization setting. Moreover, forskolin positively influenced the stability of NLC formulations. The skin permeation results have shown that the obtained NLC formulations could be used as effective carriers for a controlled release of forskolin to the skin, and hence also as an alternative drug carrier in the anticancer drug delivery.

Table 4. Median (and range) of permeation parameters (steady state flux ( $J_{ss}$ ), lag time ( $T_l$ ), permeability coefficient ( $K_p$ ),  $P_1$  and  $P_2$  parameters, and percentage of permeated forskolin at 24 h ( $n=6$ ).

Formula	$J_{ss}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ )	$T_l$ (h)	$K_p \cdot 10^3$ ( $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ )	$P_1$ (cm)	$P_2 \cdot 10^2$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Percentage 24 h
IN-emF	$1.96 \pm 0.47$	$6.66 \pm 3.28$	$2.82^* \pm 0.42$	$0.119^* \pm 0.071$	$3.29 \pm 2.27$	$25.15 \pm 3.05$
IIINLCF	$1.77 \pm 0.35$	$8.68 \pm 2.54$	$2.37^* \pm 0.46$	$0.124^* \pm 0.045$	$2.18 \pm 1.10$	$18.21^* \pm 3.62$
Labrafac®CC	$6.11 \pm 0.44$	$6.26 \pm 1.00$	$8.15 \pm 0.58$	$0.306 \pm 0.054$	$2.72 \pm 0.47$	$73.12 \pm 5.01$

\* $p < 0.05$  with Labrafac CC (Kruskal-Wallis Z-test)

### Acknowledgment of Financial Support

The research (work) was supported by the European Union through the European Social Fund within "Cracow University of Technology development program - top quality teaching for the prospective Polish engineers; University of the 21st century" project (contract no.UDA-POKL.04.01.01-00-029/10-00). Financial support from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, MINECO (grant CTQ 2011-29336-CO3-01 and CTQ 2011-29336-CO3-03) is also acknowledged. The authors thank Dr Luis Asmarats from Clínica Sagrada Familia (Barcelona, Spain) for providing skin samples.

### REFERENCES

- Burlando B *et al* (2010) Herbal Principles in Cosmetics: Properties and Mechanisms of Action, pp 212–216. CRS Press Taylor & Francis Group
- Caldero G, Garcia-Celma MJ, Solans C (2011) Formation of polymeric nano-emulsions by a low-energy method and their use for nanoparticle preparation. *J Colloid Interface Sci* **353**: 406–411. doi: 10.1016/j.jcis.2010.09.073
- Chen H, Chang X, Du D, Liu W, Liu J, Weng T, Yang Y, Xu H, Yang X (2006) Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *J Control Release* **110**: 296–306. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.052
- Chen Y, Zhu X, Zhang X, Liu B, Huang L (2010) Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Mol Ther* **18**: 1650–1656. doi: 10.1038/mt.2010.136
- Cheng Y, Samia A, Meyers J, Panagopoulos I, Fei B, Burda C (2008) Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for *in vivo* photodynamic therapy of cancer. *J Am Chem Soc* **130**: 10643–10647. doi: 10.1021/ja801631c
- De Leeuw J, de Vrijlder H C, Bjerring P, Neumann H (2009) Liposomes in dermatology today. *J Eur Acad Dermatol Venerol* **23**: 505–516. doi: 10.1111/j.1468-3083.2009.03100
- Dhar S, Kolishetti N, Lippard SJ, Farokhzad OC (2011) Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 1850–1855. doi: 10.1073/pnas.1011379108
- Gelfuso G, Cunha-Filho M, Gratieri T (2016) Nanostructured lipid carriers for targeting drug delivery to the epidermal layer. *Ther Deliv* **7**: 735–737
- Gomes AJ, Lunardi C, Tedesco A (2007) Characterization of biodegradable poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with bacteriochlorophyll-a for photodynamic therapy. *Photomed Laser Surg* **25**: 428–435. https://doi.org/10.1089/pho.2007.2089
- Han F, Li S, Yin R, Liu HZ, Xu L (2008) Effect of surfactant on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf A* **315**: 210–216. doi: 10.1016/j.colsurfa.2007.08.005
- Jenning V, Schäfer-Korting M, Gohla S (2000) Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J Control Release* **66**: 115–126. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00223-0
- Junyapraserta VB, Teeranachaiadeekula V, Souto EB, Boonmed P, Müller RH (2009) Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: Stability, rheology and *in vitro* skin permeation. *Int J Pharm* **377**: 207–214. doi: 10.1016/j.jipharm.2009.05.020
- Kemken J, Ziegler A, Müller BW (1991) Investigations into the pharmacodynamics effects of dermally administered microemulsions containing beta-blockers. *J Pharm Pharmacol* **43**: 679–684. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb03457.x
- Konan Y N, Gurny R, Allemann E (2002) State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **66**: 89–106. https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00267-6
- Liu J, Hu W, Chen H, Ni Q, Xu H, Yang X (2007) Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *Int J Pharm* **328**: 191–195. doi: 10.1016/j.jipharm.2006.08.007
- Mulla JS, Khazi IM (2009) Influence of process variables on particle size of solid lipid nanoparticles. *Indian J Novel Drug Delivery* **1**: 47–49
- Müller RH, Mehnert W, Lucks JS, Schwarz C, zur Mühlen A, Weyhers H, Freitas C, Ruhl D (1995) Solid lipid nanoparticles (SLN): an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* **41**: 62–69
- Müller RH, Petersen RD, Hommos A, Pardeike J (2007) Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev* **59**: 522–530. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.012
- Müller RH, Radtke M, Wissing SA (2002a) Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm* **242**: 121–128. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00180-1
- Okamoto, Kamatsu H, Hashida M, Sezaki H (1986) Effects of  $\beta$ -cyclodextrin and di-o-methyl- $\beta$ -cyclodextrin on the percutaneous absorption of butylparaben, indomethacin and sulfanilic acid. *Int J Pharm* **30**: 34–35
- Paolino D, Stancampiano AHS, Cilurzo F, Cosco D, Puglisi G, Pignatello R (2011) Nanostructured lipid carriers (NLC) for the topical delivery of lutein. *Drug Delivery Lett* **1**: 32–39. doi: 10.2174/2210304x11101010032
- Pardeike J, Hommos A, Müller RH (2009) Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* **366**: 170–184. doi: 10.1016/j.jipharm.2008.10.003
- Passeron T, Namiki T, Passeron H, Le Pape E, Hearing VJ (2009) Forskolin protects keratinocytes from ultraviolet (UV) B-induced apoptosis and increases DNA repair independent of its effects on melanogenesis. *J Invest Dermatol* **129**: 162–166. doi: 10.1038/jid.2008.182
- Schwarz C, Mehnert W (1999) Solid lipid nanoparticles (SLN) for the controlled drug delivery. II. Drug incorporation and physicochemical characterization. *J Microencapsul* **16**: 205–213. doi: 10.1080/026520499289185
- Selzer D, Abdel-Mottaleb MMA, Hahn T, Schaefer UF, Neumann D (2013) Finite and infinite dosing: difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Adv Drug Deliv Rev* **65**: 278–294. doi: 10.1016/j.addr.2012.06.010
- Souto EB, Müller RH (2005) SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. *J Microencapsul* **22**: 501–510. doi: 10.1080/02652040500162436
- Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Müller RH (2004) Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm* **278**: 71–77. doi: 10.1016/j.jipharm.2004.02.052
- Spry ML, Vanover JC, Scott T, *et al.* (2009) Prolonged treatment of fair-skinned mice with topical forskolin causes persistent tanning and UV protection. *Pigment Cell Melanoma Res* **22**: 219–229
- Üner M, Wissing SA, Yener G, Müller RH (2005) Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for application of ascorbyl palmitate. *Pharmazie* **60**: 577–582
- Vyas A, Kisore Das S, Singh D, Sonker A, Gidwani B, Jain V, Singh M (2012) Recent nanoparticulate approaches of drug delivery for skin cancer. *Trends Appl Sci Res* **7**: 620–635. doi: 10.3923/tasr.2012.620.635
- Williams AC, Cornwell PA, Barry BW (1992) On the non-gaussian distribution of human skin permeability. *Int J Pharm* **86**: 69–77. https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90032-W
- Wissing SA, Müller RH (2003) The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – *in vivo* study. *Eur J Pharm Biopharm* **56**: 67–72. https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00040-7
- Zheng M, Falkeborg M, Zheng Y, Yang T, Xu X (2013) Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloids Surf A* **430**: 76–84. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.03.070