

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA

Vaida Juškaitė

**VIETINIO POVEIKIO MIKROEMULSIJŲ
SU RESVERATROLIU MODELIAVIMAS,
OPTIMIZAVIMAS IR KOKYBĖS
VERTINIMAS**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai,
farmacija (08B)

Kaunas, 2017

Disertacija rengta 2012–2017 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Klinikinės farmacijos katedroje.

Mokslinis vadovas

prof. dr. Vitalis Briedis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Farmacijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Jurga Bernatoniienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

Nariai:

prof. dr. Sonata Trumbeckaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

doc. dr. Lina Raudonė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

prof. dr. Vytautas Getautis (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

prof. dr. Reinhard Neubert (Martin Luther universitetas (Vokietija), biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

Disertacija ginama viešame Farmacijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2017 m. rugpjūčio 30 d. 10 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto „Santakos“ slėnio Naujausių farmacijos ir sveikatos technologijų centro 202 auditorijoje.

Adresas: Sukilėlių pr. 13, 50162 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL ACADEMY

Vaida Juškaitė

**MODELLING, OPTIMIZATION AND
QUALITY EVALUATION OF TOPICAL
MICROEMULSIONS CONTAINING
RESVERATROL**

Doctoral Dissertation
Biomedical Sciences,
Pharmacy (08B)

Kaunas, 2017

Dissertation has been prepared at the Department of Clinical Pharmacy of Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2012–2017.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Vitalis Briedis (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Dissertation is defended at the Pharmacy Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences.

Chairperson

Prof. Dr. Jurga Bernatoniene (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Members:

Prof. Dr. Sonata Trumbeckaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Assoc. Prof. Dr. Lina Raudonė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Prof. Dr. Vytautas Getautis (Kaunas University of Technology, Physical Sciences, Chemistry – 03B)

Prof. dr. Reinhard Neubert (Martin Luther University (Germany), Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Dissertation will be defended at the open session of the Pharmacy Research Council of Lithuanian University of Health Sciences on the 30th of August, 2017 at 10 a.m. in the 202 auditorium of “Santaka” valley Center for the Advanced Pharmaceutical and Health Technologies.

Address: Sukilėlių pr. 13, LT-50162 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS.....	7
IVADAS.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1. Mikroemulsijų modeliavimas ir kokybės vertinimas	12
1.1.1. Mikroemulsijų modeliavimui naudojamos pagalbinės medžiagos	12
1.1.2. Mikroemulsijų modeliavimas ir optimizavimas	14
1.1.3. Mikroemulsijų pritaikymo galimybės.....	15
1.1.4. Vietinio poveikio mikroemulsijų modeliavimas	17
1.1.5. Mikroemulsijų kokybės vertinimas	19
1.2. Vietinio poveikio vaistų formų biofarmaciniai tyrimai.....	20
1.2.1. Vaistinių medžiagų atpalaidavimo iš vietinio poveikio vaistų formų tyrimai	20
1.2.2. Vaistinių medžiagų skvarbos į odą iš vietinio poveikio vaistų formų tyrimai	20
1.3. Resveratolio fizikinės-cheminės savybės ir biologinis poveikis.....	21
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI	25
2.1. Tyrimo objektas.....	25
2.2. Reagentai ir medžiagos	25
2.3. Tyrimo metodai ir metodika.....	25
2.3.1. Trans-resveratolio analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu	25
2.3.2. Trans-resveratolio efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos pritaikymas ir validacija.....	26
2.3.3. Resveratolio tirpumo nustatymas	29
2.3.4. Mikroemulsijų gamyba	29
2.3.4.1. Mikroemulsijų su resveratoliu gamyba.....	30
2.3.5. Mikroemulsijų fizikinių-cheminių savybių nustatymas	30
2.3.6. Mikroemulsijų termodinaminio stabilumo nustatymas	30
2.3.7. Mikroemulsijų stabilumo tyrimas.....	31
2.3.8. Resveratolio atpalaidavimo iš mikroemulsijų <i>in vitro</i> tyrimai.....	31
2.3.9. Resveratolio skvarbos į žmogaus odą <i>ex vivo</i> tyrimai.....	32
2.3.10. Resveratolio fotostabilumo eksperimentinėse formuluotėse vertinimas	32
2.3.11. Eksperimentinių formuluočių dirginamojo poveikio odai <i>in vivo</i> tyrimas.....	33
2.3.12. Statistinis duomenų vertinimas.....	34

3. REZULTATAI	35
3.1. Resveratrolio tirpumas aliejuose ir surfaktante	35
3.2. Mikroemulsijų modeliavimas ir optimizavimas	36
3.3. Optimalios sudėties mikroemulsijų kokybės vertinimas	41
3.3.1. Optimalios sudėties mikroemulsijų termodinaminio stabilumo ir fizikinių-cheminių savybių vertinimas	41
3.3.2. Optimalios sudėties mikroemulsijų stabilumo tyrimas	42
3.4. Mikroemulsijų su resveratroliu kokybės vertinimas	47
3.4.1. Resveratrolio įtaka optimalios sudėties mikroemulsijų fizikinėms-cheminėms savybėms	47
3.4.2. Mikroemulsijų su resveratroliu stabilumo tyrimas	54
3.5. Mikroemulsijų su resveratroliu biofarmacinis vertinimas	64
3.5.1. Resveratrolio atpalaidavimo iš mikroemulsijų tyrimas <i>in vitro</i>	64
3.5.2. Resveratrolio skvarbos iš mikroemulsijų į odą tyrimas <i>ex vivo</i>	67
3.6. Mikroemulsijos su resveratroliu (S/KoS 5:1) fotostabilumo tyrimas	69
3.7. Mikroemulsijų su resveratroliu dirginamojo poveikio odai <i>in vivo</i> nustatymas	71
IŠVADOS	73
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS	75
DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	89
SUMMARY	110
PRIEDAI	124
CURRICULUM VITAE	130
PADĖKA	131

SANTRUMPOS

A/V	– aliejus-vandenyje tipo dispersinė sistema
KoS	– pagalbinė paviršinio aktyvumo medžiaga – kosurfaktantas
LoD	– aptikimo riba (angl. <i>Limit of detection</i>)
LogP	– pasiskirstymo koeficiento tarp oktanolio-vandens logaritminė reikšmė
LoQ	– kiekybinio nustatymo riba (angl. <i>Limit of quantitation</i>)
ME	– mikroemulsija
ME-RES	– mikroemulsija su resveratroliu
PAM	– paviršinio aktyvumo medžiaga
PDI	– polidispersiškumo indeksas
PEG 400	– polietilenglikolis 400
PG	– propilenglikolis
S	– pagrindinė paviršinio aktyvumo medžiaga – surfaktantas
S/KoS	– surfaktanto ir kosurfaktanto (pagrindinės ir pagalbinės paviršinio aktyvumo medžiagų) mišinys
UV	– ultravioletiniai spinduliai
UVB	– 280–315 nm bangos ilgio ultravioletiniai spinduliai
VDD	– vidutinis dalelių dydis

IVADAS

Mikroemulsijos yra šiuolaikinė vaisto forma, naudojama siekiant geresnio vaistinių medžiagų tirpumo, jų atpalaidavimo iš vietinio poveikio, transderminių, parenteralių sistemų, skvarbos į/pro biologinius barjerus bei biologinio pasisavinimo. Mokslininkų susidomėjimas mikroemulsijomis yra didelis, nes šios dispersinės sistemos pasižymi svarbiais privalumais – geba inkorporuoti santykinai didelius kiekius įvairios kilmės ir skirtingų fizikinių-cheminių savybių vaistines medžiagas bei gali išlaikyti jų stabilumą [145]. Mikroemulsijoms būdingas mažas dispersinės fazės dalelių dydis, termodinaminis stabilumas, o gamybos technologija nereikalauja specialių sąlygų [11]. Atsižvelgiant į šiuos privalumus, mikroemulsijos laikomos patrauklia vaisto forma, kuri modeliuojama siekiant tikslinio veikliųjų medžiagų patekimo į pažeistos vietą.

Pagrindinis vaistinių preparatų kūrimo tikslas yra efektyvus vaistinių medžiagų tiekimas į tikslinę poveikio vietą siekiant pageidaujamo terapinio poveikio bei išvengiant galimų nepageidaujamų reakcijų [142]. Šiuolaikinės farmacijos požiūriu žmogaus oda yra laikoma viena labiausiai priimtinių vietų vaistinių medžiagų tiekimui į organizmą. Dermatologinių nešiklių naudojimas grindžiamas šiais pagrindiniais vaistinių medžiagų tiekimo į organizmą privalumais: (i) galimas jų patekimas į sisteminę kraujotaką aplenkiant virškinamąjį traktą ir taip išvengiant pirminio metabolizmo kepenyse, (ii) galimas kryptingas, kontroliuojamas vaistinių medžiagų tiekimas į poveikio vietą, (iii) greitas aktyvių junginių poveikis, o reikalui esant, galimas nešiklio pašalinimas nuo odos vengiant galimo nepageidaujamo poveikio, (iv) patogus, neskausmingas naudojimo būdas [78, 116, 123]. Tačiau susiduriama su keliomis esminėmis vaistinių medžiagų tiekimo į organizmą problemomis – vaistinių medžiagų skvarbą riboja natūralios odos barjerinės savybės, kurias lemia išorinis raginis sluoksnis ir šių junginių fizikinės-cheminės savybės [34, 142].

Nedaugelis vaistinių medžiagų pasižymi tokiomis optimaliomis fizikinėmis-cheminėmis savybėmis: maža molekulinė masė, tinkamu lipofiliškumu, žema lydymosi temperatūra, kurios laikomos būtinomis gerai medžiagų skvarbai į audinius [80, 158]. Todėl tiekiant vaistines medžiagas į odą, reikšmingas vaidmuo tenka nešikliams. Daug vilčių siejama su mikro- ir nano-struktūriniais nešikliais dėl jų savybių gerinti biologiškai aktyvių junginių tirpumą ir stabilumą, modifikuoti raginio sluoksnio barjerines savybes bei užtikrinti kryptingą šių medžiagų tiekimą į odą ir biologinį pasisavinimą [92, 126, 142]. Inovatyvių nešiklių kūrimas, vystymas ir praktinio pritaikymo tyrimai yra svarbūs kuriant šiuolaikinius kokybės reikalavimus

tenkinančius farmacinius produktus, todėl mikroemulsijų modeliavimas laikytinas aktualia farmacijos mokslinių ir taikomųjų tyrimų kryptimi.

Tiriamajame darbe buvo pasirinkta modelinė vaistinė medžiaga resveratrolis dėl jo biologinio aktyvumo ir fizikinių-cheminių savybių. Šis junginys pasižymi priešbakteriniu, priešgrybeliniu, priešvirusiniu, priešvėžiniu veikimu bei stipriu antioksidaciniu poveikiu, todėl jis gali būti naudojamas kaip efektyvi profilaktinė priemonė odos funkcijoms palaikyti bei odos sutrikimams gydyti [122, 124, 146]. Moksliniais tyrimais įrodytas resveratrolio gebėjimas inaktyvinti reaktyvius deguonies junginius, todėl jis laikomas efektyvia apsaugos priemone nuo UV sukeltų pažeidimų [119, 162]. Tačiau resveratrolio nestabilumas šviesos poveikiui bei lipofiliškumas sąlygoja ribotas jo praktines taikymo galimybes. Dėl junginio lipofiliškumo jo skvarba į gilesnius odos sluoksnius ar sisteminę kraujotaką yra ribojama jų hidrofiliškumo, todėl resveratrolis kaupiasi paviršiniuose odos sluoksniuose [1]. Siekiant veiksmingo resveratrolio tiekimo į odą ir jo sukeliama biologinio poveikio, mikroemulsijos buvo pasirinktos kaip tinkama priemonė junginio nestabilumo ir lipofiliškumo problemoms spręsti.

Vykdytuose tyrimuose buvo modeliuojamos ir tiriamos mikroemulsijos, į kurias įterptas resveratrolis, bei įvertinta pagamintų nešiklių kokybė ir stabilumas. Modeliuojant vietinio poveikio mikroemulsijas, ypač svarbu patikimai įrodyti jų gebėjimą atpalaiduoti veikliąsias medžiagas bei jų tinkamumą šių medžiagų skvarbai į odą užtikrinti. Biofarmacinių tyrimų rezultatai leido įvertinti mikroemulsijų tinkamumą bei nustatyti veikliosios medžiagos pasiskirstymo odos sluoksniuose pobūdį. Visa tai yra reikšminga efektyviai odos apsaugai nuo galimų pažeidimų bei odos susirgimų gydymui. Tyrimai su biologiniais modeliais leido objektyviai įvertinti sumodeliuotų mikroemulsijų tinkamumą naudoti ant odos. Šių tyrimų rezultatai suteikia galimybę prognozuoti sumodeliuotų mikroemulsijų su resveratroliu biologinį pasisavinimą naudojimo metu, kuris svarbus veiksmingai produkto kokybės kontrolei užtikrinti siekiant tikslingo sumodeliuotų preparatų pritaikymo praktikoje.

Darbo tikslas. Sumodeliuoti optimalias, stabilias mikroemulsijas, pritaikyti jas kaip nešiklius resveratrolio tiekimui į odą ir įvertinti jų kokybę fizikiniais-cheminiais, biofarmaciniais bei biologiniais tyrimais.

Darbo uždaviniai:

1. Sumodeliuoti mikroemulsijas pritaikant eksperimentinį planavimą ir atlikti gautų sudėčių optimizavimą pagal pasirinktus kritinius kokybės parametrus.

2. Įvertinti optimalios sudėties mikroemulsijų kokybinius parametrus ir ištirti jų stabilumą.
3. Pritaikyti atrinktas stabilias mikroemulsijas veikliosios medžiagos įterpimui ir įvertinti sumodeliuotų sistemų kokybę bei stabilumą.
4. Ištirti resveratrolio atpalaidavimo iš mikroemulsijų kinetiką ir įvertinti jo skvarbą į odą tyrimais *ex vivo*.
5. Įvertinti mikroemulsijų su resveratroliu dirginamąjį poveikį eksperimentinių gyvūnų odai *in vivo*.

Mokslinio darbo naujumas. Sumodeliuotos stabilios, optimalios sudėties mikroemulsijos su resveratroliu derinant pagalbines medžiagas, o jų tinkamumas pagrįstas fizikiniais-cheminiais, biofarmaciniais ir biologiniais tyrimais. Biofarmaciniais tyrimais patvirtinta mikroemulsijas sudarančių komponentų įtaka resveratrolio atpalaidavimui. Pirmą kartą įvertinta resveratrolio skvarba į nepažeistą žmogaus odą iš sumodeliuotų mikrostruktūrinių nešiklių tyrimais *ex vivo*. Nustatytas šios modelinės vaistinės medžiagos pasiskirstymas odos sluoksniuose ir įvertinta sumodeliuotų mikroemulsijų su skirtingais pagalbinių medžiagų kiekiais įtaka šiems procesams.

Išvystyta ir validuota efektyviosios skysčių chromatografijos metodika, kuri pritaikyta resveratrolio nustatymui žmogaus odoje. Pritaikius šią metodiką, atlikta mikroemulsijose esančio resveratrolio kokybinė ir kiekybinė analizė.

In vivo tyrimais su eksperimentiniais gyvūnais pagrįstas sumodeliuotų mikroemulsijų su resveratroliu saugumas ir tinkamumas naudoti ant odos.

Praktinė ir teorinė reikšmė. Mikroemulsijų modeliavimui pritaikytas eksperimentinis planavimas, kuris leido pagrįstai sumažinti eksperimentų skaičių ir kryptingai vystyti modeliuojamas mikroemulsijas. Pasirinkto metodo tinkamumas įvertintas praktiškai atliekant sumodeliuotų mikroemulsijų sudėties optimizavimą.

Sumodeliuotos stabilios, optimalios sudėties mikroemulsijos, pritaikytos resveratrolio įterpimui. Tyrimais įrodyta resveratrolio koncentracijos įtaka optimalios sudėties mikroemulsijų kokybei ir stabilumui.

Pritaikyta efektyviosios skysčių chromatografijos metodika leidžia atskirti trans-resveratrolių nuo jo izomerizacijos produkto. Tai yra svarbu siekiant įvertinti sumodeliuotų mikroemulsijų su resveratroliu kokybę.

Ex vivo skvarbos į odą tyrimų rezultatai patvirtino, kad resveratrolio skvarbai ir pasiskirstymui tarp epidermio ir dermos turi įtakos junginio lipofiliškumas. Pritaikius mikroemulsijas kaip efektyvų nešiklį, nustatyta geresnė resveratrolio skvarba į dermą. Gauti biofarmacinių tyrimų *in vitro* ir *ex vivo* rezultatai yra reikšmingi vertinant sumodeliuotų mikroemulsijų su resveratroliu kokybę bei kuriant tikslinio pritaikymo nano- ir mikrostruktūrius nešiklius.

In vivo tyrimais su eksperimentiniais gyvūnais nustatyta, kad santykinai didelės pagalbinių medžiagų koncentracijos nesukėlė dirginamojo poveikio jų odai. Atlikti tyrimai su biologiniais objektais ir gauti rezultatai yra svarbūs siekiant įvertinti mikroemulsijų su resveratroliu pritaikymo naudoti ant odos galimybes.

Darbo rezultatų aprobavimas. Tyrimų rezultatai paskelbti 5 mokslinėse konferencijose: The 4th international conference on pharmaceutical sciences and pharmacy practice dedicated to the 75th anniversary of Lithuanian Pharmacopoeia (2013 m. lapkričio 23 d., Kaunas, Lietuva); Skin Forum 14th Annual Meeting „Percutaneous penetration – measurement, modulation and modelling“ (2014 m. rugsėjo 4–5 d., Praha, Čekija); „1st European Conference on Pharmaceutics Drug Delivery“ (2015 m. balandžio mėn 13–14 d., Reimsas, Prancūzija); 6th BBBB Conference on pharmaceutical sciences „Strategies to improve the quality and performance of modern drug delivery systems“ (2015 m. rugsėjo 10–12 d., Helsinkis, Suomija); PBP World Meeting – 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (2016 m. balandžio 4–7 d., Glazgas, Škotija).

Tyrimų tematika paskelbti 2 moksliniai straipsniai, kurie išspausdinti leidiniuose, įtrauktuose į Mokslinės informacijos instituto duomenų bazę.

Darbo apimtis ir struktūra: disertaciją sudaro įvadas, literatūros apžvalga, tyrimo objektas ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, bibliografijos sąrašas (170 šaltinių), disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas, sumodeliuotų formuluočių sudėtys, mokslinių publikacijų disertacijos tema kopijos, santrauka (anglų k.), mokslinės ir kūrybinės veiklos aprašymas. Darbe pateiktos 9 lentelės ir 18 paveikslų. Disertacijos apimtis 131 puslapis.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mikroemulsijų modeliavimas ir kokybės vertinimas

1.1.1. Mikroemulsijų modeliavimui naudojamos pagalbinės medžiagos

Mikroemulsijos (ME) yra skaidrios, termodinamiškai stabilios, koloidinės sistemos, kurias sudaro lipofilinė ir hidrofilinė fazės bei surfaktantas, naudojamas derinyje su kosurfaktantu [48, 136]. Tai spontaniškai susiformuojanti dispersinė sistema, pasižyminti specifinėmis fizikinėmis-cheminėmis savybėmis: skaidrumu, maža dinamine klampa ir termodinaminiu stabilumu [11, 60, 77]. ME būdingas skaidrumas susijęs su dalelių mažu dydžiu, kuris siekia 10–200 nm [11, 58]. ME susiformuoja tada, kai yra pasiekama labai maža tarpfazinė įtemptis, susidaranti tarp lipofilinės ir hidrofilinės fazių sąlyčio ribos [48, 82]. Tarpfazinės įtampos kitimai priklauso nuo ME gamyboje naudojamų paviršinio aktyvumo medžiagų (PAM) – surfaktanto ir kosurfaktanto. Dažniausiai ME gamybai naudojamos pagalbinės medžiagos pateiktos 1.1.1.1 lentelėje.

1.1.1.1 lentelė. Pagrindiniai komponentai, naudojami mikroemulsijų gamyboje

ME komponentai	Pavyzdžiai	Literatūros šaltiniai
Lipofilinė fazė	Alyvuogių, sojos, kukurūzų, kokosų, ricinos, simondsijų aliejai. Izopropilo miristatas, izopropilo palmitatas, etilo laureatas, etilo oleatas, oleino rūgštis.	[4, 16, 17, 22, 35]
Surfaktantai	Lecitinas, poloksameras, natrio dodecilsulfatas, tviniai, spanai, kaprilokaproilo makrogol-8 gliceridas	[63, 67, 98, 115, 137]
Kosurfaktantai	Etanolis, izopropanolis, propanolis, polietilenglikolis, propilenglikolis, fosfatidilcholinai, poliglyceril-6 dioleatas, poliglyceril-6 izostearatas	[27, 37, 38, 45, 62]
Hidrofilinė fazė	Išgrynintas vanduo, injekcinis vanduo, buferiniai tirpalai	[41, 69, 90]

Lipofilinė fazė. Pagrindiniai kriterijai, kurie lemia lipofilinės fazės pasirinkimą yra geras veikliosios medžiagos tirpimas aliejuje ir tinkamas tarpfazinės ME plėvelės formavimasis [11, 12]. Lipofiline faze gali būti natūralūs ir sintetiniai aliejai (1.1.1.1 lentelė). Dažniausiai ME modeliavimui naudojami sintetiniai esteriai: izopropilo miristatas, izopropilo palmitatas ir etilo oleatas [12]. Kai kurie aliejai, naudojami transderminių ME gamybai, gali veikti kaip skvarbą skatinančios medžiagos, pvz., oleino rūgštis [58].

Hidrofilinė fazė. ME hidrofilinei fazei sudaryti naudojamas išgrynintas ar injekcinis vanduo. Hidrofilinėje fazėje gali būti klampumą didinančių medžiagų, buferinių tirpalų ar konservantų [131]. Jei modeliuojama ME skirta vartoti parenteraliai, tada į hidrofilinę fazę pridedama natrio chlorido, glicerolio, dekstrozės ar sorbitolio [58].

Surfaktantai. Surfaktantas – tai pagrindinė paviršinio aktyvumo medžiaga, naudojama ME gamybai. Jis sudarytas iš dviejų grupių: polinės ir nepolinės. Surfaktantai linkę adsorbuotis dviejų fazių sąlyčio paviršiuje, kur savo hidrofilines grupes išdėsto hidrofilinėje fazėje, o hidrofobines grupes – lipofilinėje fazėje ir taip sumažina tarpfazinę paviršiaus įtęptį [12]. Modeliuojant ME, surfaktantas pasirenkamas pagal hidrofilinį-lipofilinį balansą (HLB).

Surfaktantai gali būti anijoniniai, katijoniniai, cviterjoniniai ir nejoniniai (1.1.1.1 lentelė). ME gamybai naudojami santykinai dideli surfaktanto kiekiai. Net farmacijoje naudoti patvirtinti surfaktantai, didesnėmis nei rekomenduojamomis koncentracijomis, gali sukelti neigiamus nepageidaujamus poveikius (odos dirginimą, alergijas) [21, 84, 164]. Mokslinės literatūros duomenimis ME gamybai geriau naudoti nejoninius surfaktantus, kurie, lyginant su joniniais, pasižymi mažesnėmis odą dirginančiomis savybėmis [89]. Siekiant mažesnio neigiamo poveikio odai, rekomenduojama naudoti ne sintetinius, bet natūralius surfaktantus, pvz., lecitiną ar fosfolipidus.

Kosurfaktantai. Modeliuojant ME, papildomai naudojama pagalbinė paviršinio aktyvumo medžiaga kosurfaktantas. Jis veikia sinergiškai su surfaktantu ir leidžia sumažinti paviršiaus įtęptį bei suformuoti stabilias ME [131]. Kosurfaktantų naudojimas ME gamybai taip pat leidžia sumažinti surfaktanto kiekį ir užkirsti kelią galimiems odos pokyčiams.

Dažniausiai naudojami kosurfaktantai – trumpos anglies atomų grandinės alkoholiai (C3–C8), kurie sumažina paviršiaus įtęptį ir padidina susidariusios tarpfazinės plėvelės lankstumą (1.1.1.1 lentelė) [12]. ME modeliavimui naudojami kosurfaktantai gali veikti kaip skvarbą į odą skatinančios medžiagos, pvz., etanolis, propilenglikolis [58]. Tačiau reikia pažymėti, kad per didelis alkoholių kiekis gali turėti įtakos papildomam odos dirginimui ir dehidratacijai [11]. Pastaruoju metu ME gamybai naudojami mažiau dirginantys, pašalinių poveikių nesukeliantys kosurfaktantai (pvz.: poliglyceril-6

dioleatas, poliglyceril-6 izostearatas, propilenglikolio monokaprilatai, propilenglikolio monolauratai) [12].

Apibendrinus mokslinėje literatūroje pateiktus duomenis, galima teigti, kad ME naudojamų pagalbinių medžiagų pasirinkimas yra gana platus, tačiau kai kurių pritaikymą riboja jų toksiškumas, didelių koncentracijų sukeltas dirginantis poveikis bei nepakankamai aiškus veikimo mechanizmas [11]. Labai svarbu pasirinkti tokias ME formuojančias medžiagas, kurios tarpusavyje būtų biologiškai suderinamos, netoksiškos ir suformuotų neagresyvias, žmogui vartoti tinkančias mikroemulsines sistemas.

1.1.2. Mikroemulsijų modeliavimas ir optimizavimas

ME formavimasis priklauso nuo lipofilinės fazės-hidrofilinės fazės-surfaktanto (surfaktanto / kosurfaktanto) santykio [82]. Modeliuojant ME sudėtis, dažniausiai sudaromos fazių diagramos, kuriose nustatomos ME formuojančių komponentų koncentracijų ribos, apibrėžiančios ME susiformavimo sritį. Įprastai ME modeliavimui naudojamos trys arba keturios pagalbinės medžiagos, todėl mokslinėje literatūroje šios diagramos vadinamos trinarėmis arba pseudo-trinarėmis fazių diagramomis [12, 77, 88].

Fazių diagramos formuojamos taikant fazių titravimo metodą (angl. *phase titration method*) [138, 153]. Formuojant fazių diagramas, dažniausiai taikomas titravimo hidrofiline faze (angl. *water titration method*) metodas: ME gaminamos lipofilinę fazę sumaišant su surfaktanto ir kosurfaktanto mišiniu. Tada į šį mišinį lašinama hidrofilinė fazė, o atsiradęs sistemos nuskaidrėjimas vertinamas kaip ME susidarymas. ME gali būti formuojama titravimo lipofiline faze (angl. *oil titration method*) metodu: hidrofilinę fazę sumaišant su surfaktanto ir kosurfaktanto mišiniu ir titruojant lipofiline faze [42, 170]. Naudojant abu šiuos metodus, lipofilinės arba hidrofilinės fazės pridėjimo metu atsiradęs sistemos nuskaidrėjimas vertinamas kaip ME susiformavimo taškas [104].

ME formavimui gali būti taikomas fazių inversijos metodas (angl. *phase inversion method*) [104, 149]. A/V tipo ME gamybai kaip pagrindas gali būti naudojama V/A tipo emulsija, kurios sudėtyje yra lipofilinė PAM. Maišant pridėdama hidrofilinę PAM, kuri iš pradžių suformuoja kubinę struktūrą, o toliau pridėjus hidrofilinės PAM, suformuoja ME. Vykdam ME formulavimą su vaistinėmis medžiagomis, jos tirpinamos toje fazėje, kurioje geriausiai tirpsta. Mokslinėje literatūroje pateikti duomenys rodo, kad ME gali spontaniškai susiformuoti kartu maišant visus komponentus – lipofilinę ir vandeninę fazes, surfaktantą ir kosurfaktantą [93, 100, 138].

Formuojant fazių diagramas, jose pateikiamos ME sudarančių komponentų koncentracijų ribos, kuriose susiformuoja atitinkamo tipo (A/V ar

V/A) ME, tačiau toks tyrimas reikalauja eksperimentų gausos ir užima daug laiko. Siekiant išspręsti šias problemas, tikslinga taikyti validuotas statistines eksperimentinio planavimo programas, kurios leidžia žymiai sumažinti eksperimentų skaičių ir laiką.

Farmaciniams preparatams kurti, vystyti ir gamybos procesams optimizuoti dažnai naudojamas eksperimentinis planavimas, kuris leidžia greitai ir sistemiškai įvertinti galimus veiksnius bei jų tarpusavio ryšį [33, 121]. Siekiant užtikrinti produkto kokybę, būtina identifikuoti kritinius kokybės parametrus, pagrįstus statistine analize. Kritinių parametrų nustatymas ir eksperimentinių optimizavimo modelių pritaikymas leidžia sumodeliuoti optimalios sudėties formuluotes. Gali būti naudojami įvairūs eksperimentinio (pvz., faktorialo, paviršiaus atsako, atrankos ir mišinio) optimizavimo modeliai, tačiau ME modeliavimui ir optimizavimui dažniausiai taikomas D-optimalus dizaino modelis [17, 37, 50, 85, 97, 114].

1.1.3. Mikroemulsijų pritaikymo galimybės

Šiuolaikinė farmacijos pramonė nuolat ieško naujų ir novatoriškų produktų, kurių sudėtyje esančių veikliųjų medžiagų biologinis aktyvumas būtų įrodytas ir pagrįstas moksliniais tyrimais, o jų pernešimui į poveikio vietą naudojami efektyvūs nešikliai. Tokiais produktais vis dažniau nurodomos ME.

ME apibūdinamos kaip puikūs vaistinių medžiagų nešikliai, pasižymintys stabilumu, dideliu paviršiaus plotu ir mažomis dalelėmis, o svarbiausia – ME leidžia kontroliuoti veikliųjų medžiagų atpalaidavimą [11, 12]. Pagrindinis šios koloidinės sistemos privalumas – gebėjimas įterpti įvairios kilmės ir fizikinių-cheminių savybių vaistines medžiagas [48]. ME yra patraukli vaisto forma, vartojama siekiant pagerinti: (i) vaistinių medžiagų atpalaidavimą iš transderminių, parenterinių, topinių, oralių ir kitų sistemų; (ii) vaistinių medžiagų stabilumą ir biologinį pasisavinimą; (iii) vaistinių medžiagų skvarbą į odą iš transderminių ir vietinio poveikio sistemų [15, 30, 65, 75]. ME yra perspektyvus vaistinių medžiagų nešiklis, pasižymintis plačiomis pritaikymo galimybėmis (1.1.3.1 lentelė).

1.1.3.1 lentelė. Mikroemulsijų pritaikymo pavyzdžiai

Vartojimo būdas	Veiklioji medžiaga	ME poveikis	Literatūros šaltiniai
Transderminis	Lidokainas	pagerino lidokaino tirpumą ir skvarbą į odą	[66]
	Pencikloviras	statistiškai reikšmingai pagerino pencikloviro skvarbą į epidermį ir dermą lyginant su komerciniu kremu	[166]
	Indometacinas Benzokainas	pagerino šių medžiagų skvarbą į odą ir sustiprino anestezinį ir analgetinį jų poveikį	[98]
	Ibuprofenas	pagerino ibuprofeno tirpumą ir skvarbą į odą	[35]
Per os	Itrakonazolis	padidino itraconazolio biologinį pasisavinimą	[61]
	Kurkuminas	pagerino kurkumino absorbciją virškinamajame trakte ir jo biologinį pasisavinimą	[62]
	Sirolimas	pagerino sirolimo tirpumą ir absorbciją	[64]
Akims	Timololis	pagerino timololio absorbciją	[90]
Į nosį	Lorazepamas	pagerino lorazepamo skvarbą pro nosies gleivinę	[141]

Vaistines medžiagas vartojant *per os*, dažnai susiduriama su jų nestabilumu ir blogu tirpumu virškinamojo trakto skysčiuose, todėl tai tampa iššūkiu modeliuojant vaistinių medžiagų nešiklius. Kietoms vaisto formoms patekus į virškinamąjį traktą, vyksta trys pagrindiniai etapai: (i) suirimas, (ii) tirpimas, (iii) absorbcija [30]. Kietos vaisto formos suirimas yra būtinas procesas, kad kietos dalelės galėtų ištirpti skystoje terpėje, o vaisto molekulės galėtų būti absorbuojamos. Šis suirimo etapas nereikalingas skystoms vaisto formoms, kurioms priklauso ME, todėl vaistinė medžiaga gali būti greičiau absorbuojama. ME geba apsaugoti vaistines medžiagas nuo oksidacijos bei fermentų poveikio pagerindamos jų stabilumą ir padidinti membranų laidumą. Mažos ME dalelės dėl didelio paviršiaus ploto ir tūrio santykio pagerina vaistinės medžiagos absorbciją ir biologinį pasisavinimą [30, 141]. ME taip pat naudojamos kuriant dermatologinius ir transderminius produktus. Dėl mažo ME dalelių dydžio ir paviršiaus įtempimo, kuris garantuoja puikų nešiklio sąlytį su oda, bei naudojamų paviršinio aktyvumo medžiagų, kurios keičia raginio sluoksnio laidumą, yra sukuriama didelis vaistinės medžiagos koncentracijos gradientas ir taip pagerinama jos skvarba į odą [12, 68, 82].

1.1.4. Vietinio poveikio mikroemulsijų modeliavimas

Šiuolaikinės farmacijos požiūriu viena labiausiai priimtinių veikliųjų medžiagų tiekimo į organizmą vietų yra laikoma žmogaus oda. Naudojant dermatologinius nešiklius, išskiriami pagrindiniai veikliųjų medžiagų tiekimo į organizmą privalumai: (i) galimas tiesioginis jų patekimas į sisteminę kraujotaką aplenkiant virškinamąją traktą ir išvengiant pirminio metabolizmo kepenyse, (ii) galimas kryptingas, kontroliuojamas veikliųjų medžiagų tiekimas į poveikio vietą, (iii) sukeliamas greitas biologiškai aktyvių junginių poveikis, (iv) patogus, neskausmingas naudojimo būdas [78, 116, 123, 147]. Racionalus dermatologinių nešiklių modeliavimas leidžia pasiekti maksimalų vaistinių medžiagų biologinį pasisavinimą.

Vietinio poveikio ME gamybai yra svarbus pagalbinių medžiagų parinkimas. Tinkamai parinkus pagalbines medžiagas, galima veiksmingai sumažinti paviršiaus įtemptį lipofilinės-hidrofilinės fazių riboje ir suformuoti stabilias mikroemulsines sistemas [85]. Tarp lipofilinės ir hidrofilinės fazių vykstantys pokyčiai skatina spontanišką ME formavimąsi, o šio proceso eigai įtaką daro pasirinktas surfaktantas. Labiau hidrofilinis emulsiklis tinkamas stabilizuoti A/V tipo ME, o labiau hidrofobinis – V/A tipo ME [85]. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad naudojant surfaktantą, kurio hidrofilinis-lipofilinis balansas (HLB) yra didesnis nei 10, formuojamos A/V tipo ME [11, 103, 139]. Surfaktanto, kurio HLB reikšmė yra nuo 3 iki 6, suformuoja V/A tipo ME [103]. Kitas svarbus atrankos kriterijus – surfaktantas turi būti netoksiškas ir nedirginantis odos. Mokslinės literatūros analizė parodė, kad vietinio poveikio ME modeliavimui naudojamas santykinai didelis surfaktanto kiekis, kuris gali pagerinti veikliųjų medžiagų skvarbą į odą bei turėti įtakos jų pasiskirstymui odos sluoksnuose [11, 88]. Tačiau gaminant vietinio poveikio preparatus, naudojamos santykinai didelės PAM koncentracijos, o tai yra nepriimtina, nes gali sukelti stiprų odos dirginimą [45]. Norint išvengti galimo neigiamo surfaktanto poveikio, tikslinga sumažinti jo koncentraciją modeliuojamose ME naudojant papildomas pagalbines medžiagas – kosurfaktantus. Kosurfaktantas veikia sinergiškai su surfaktantu, užtikrina lašelių paviršių dengiančio surfaktanto sluoksnio lankstumą ir dar labiau sumažina tarpfazinio sąlyčio paviršiaus įtemptį [59]. Dėl šios priežasties ME modeliavimui galima naudoti mažesnes surfaktanto koncentracijas.

Mokslinės literatūros analizė parodė, kad vietinio poveikio ME gamybai naudojami naujos kartos nejoniniai surfaktantai, kurie pasižymi stabilumu, gerina veikliųjų medžiagų tirpumą, jų skvarbą į odą, o svarbiausia – yra saugūs naudoti ant odos [11, 165]. Šios teigiamos savybės būdingos nejoniniam surfaktantui kaprilokaproilo makrogol-8 gliceridui, kuris plačiai taiko-

mas modeliuoti vietinio poveikio ME. Kaprilokaproilo makrogol-8 glicerido HLB 12, todėl jis naudojamas formuojant A/V tipo sistemas. Kaprilokaproilo makrogol-8 gliceridas naudojamas žmonėms vartoti skirtų farmacinių produktų (mikroemulsijų, emulsijų, tepalų, gelių) gamybai. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad kaprilokaproilo makrogol-8 gliceridas yra tinkamas prastai tirpių medžiagų tirpumui gerinti ir gali būti naudojamas kaip skvarbą skatinanti, tačiau odos dirginamojo poveikio nesukelianti medžiaga [11, 26]. Rhee ir kt. [125] įrodė, kad veikliųjų medžiagų skvarbai į odą turi įtakos ME formuojančių komponentų kiekiai. Ketoprofenas buvo įterptas į sumodeliuotą mikroemulsiją, sudarytą iš oleino rūgšties, kaprilokaproilo makrogol-8 glicerido, Cremophor RH ir vandens mišinio. Tyrimo rezultatai parodė, kad ketoprofeno skvarbai į žiurkių odą įtakos turėjo surfaktanto kiekis. PAM galimas dirginamasis poveikis odai buvo tirtas atliekant tyrimus su pelėmis [63]. Tyrimo rezultatai parodė, kad ME modeliavimui naudojant 41 proc. kaprilokaproilo makrogol-8 glicerido ir dietilenglikolio monoetilo eterio mišinį, nenustatyta eritemos susidarymo, todėl toks PAM kiekis yra tinkamas formuoti ME ir saugus naudoti ant odos.

Atliekant mokslinės literatūros analizę nustatyta, kad A/V tipo ME modeliavimui kartu su kaprilokaproilo makrogol-8 gliceridu naudojamas poligliceril-6-izostearatas [45, 81, 83, 131]. Kreilgard ir kt. [83] plačiau ištyrė kaprilokaproilo makrogol-8 glicerido ir poligliceril-6-izostearato pritaikymo galimybes. Panaudodami skirtingus lipofilinės fazės, surfaktanto, kosurfaktanto ir hidrofilinės fazės kiekius, sumodeliavo mikroemulsijas su lidokainu ir prilokainu bei palygino jas su rinkoje esančiais šių medžiagų preparatais (kremu ir hidrogeliu). Vertinant mikroemulsijų įtaką lidokaino ir prilokaino skvarbai į žiurkių odą, nustatyta, kad optimalios sudėties ME statistiškai reikšmingai ($P = 0,03$) pagerino šių junginių skvarbą lyginant su kitomis formuluotėmis. Tačiau ME, kurių sudėtyje surfaktanto ir kosurfaktanto mišinio kiekis buvo 70 proc., pasižymėjo nestipriu žiurkių odos dirginimu. Naujaisiais mokslinių tyrimų duomenimis įrodyta, kad naudojant 50 proc. kaprilokaproilo makrogol-8 glicerido ir poligliceril-6-izostearato mišinį, sumodeliuojamos nanoemulsijos, kurios pailgina ferulo rūgšties atpalaidavimą, pagerina junginio tirpumą ir skvarbą į žiurkių odą [55].

Apibendrinus mokslinėje literatūroje pateiktus duomenis, galima teigti, kad ME modeliavimui naudojami šių paviršinio aktyvumo medžiagų deriniai, tačiau trūksta duomenų, vertinančių jų įtaką ME stabilumui, veikliųjų medžiagų skvarbai į žmogaus odą bei jos dirginamajam poveikiui. Todėl aktualu modeliuoti ME naudojant skirtingus šių medžiagų derinius ir įvertinti jų saugumą ir tinkamumą vietiniam naudojimui ant odos.

1.1.5 Mikroemulsijų kokybės vertinimas

Sumodeliuotų ME kokybė vertinama pagal šiuos kriterijus: termodinaminį stabilumą, vidutinį dalelių dydį (VDD), polidispersiškumo indeksą (PDI), pH reikšmę, elektrinį laidį ir klampą.

ME dalelių dydis ir jų pasiskirstymas yra svarbus kriterijus, leidžiantis įvertinti sumodeliuotų ME stabilumą ir numatyti galimą jų poveikį *in vivo* [77, 154]. Dalelių dydžiui nustatyti dažniausiai naudojamas dinaminės šviesos sklaidos metodas (angl. *dynamic light scattering technique*). Atliekant ME dalelių dydžio matavimus, mėginys apšviečiamas lazeriu ir nustatomas išsklaidytos šviesos intensyvumas [35]. Pritaikius dinaminį šviesos sklaidos metodą, nustatomas PDI, kuris parodo sumodeliuotos sistemos homogeniškumą. Šio parametro nustatymas yra reikšmingas vertinant ME kokybę. Dinaminės šviesos sklaidos metodas yra greitas ir patogus, o duomenų analizė – paprasta. Tačiau svarbiausias šio metodo privalumas yra tas, kad tyrimui naudojamos sąlygos neturi įtakos tiriamų mėginių pokyčiams [56, 151].

Sumodeliuotų dispersinių sistemų dalelių dydis gali būti vertinamas naudojant elektroninę mikroskopiją. Kadangi ME būdingas mažas dalelių dydis, todėl dažniausiai naudojama transmisinė elektroninė mikroskopija (TEM). Tačiau taikant TEM, naudojamas didelis slėgis ir elektronų srautas, kurie gali turėti įtakos ME struktūros pokyčiams [131]. Norint kontroliuoti galimą aplinkos veiksnių įtaką, ME dalelių dydžio nustatymui naudojama krio-transmisinė elektroninė mikroskopija (krio-TEM), kuriai reikalingas specialus mėginių paruošimas. Mėginių fiksacija atliekama taikant labai greitą jų užšaldymą ir taip išvengiant kristalų susiformavimo mėginiuose [131]. Pagrindinis elektroninės mikroskopijos privalumas yra galimybė ne tik nustatyti dalelių dydį, bet ir įvertinti jų formą, agregaciją bei sumodeliuotos sistemos struktūrą [56].

ME kokybė vertinama atliekant dinaminės klamos ir elektrinio laidžio matavimus. Klampa yra svarbus kokybės rodiklis, kuris turi įtakos vaistinės medžiagos atpalaidavimui iš sumodeliuotos sistemos [34]. ME būdinga maža dinaminė klampa lyginant su įprastinėmis emulsijomis dėl sąlyginai mažo dalelių dydžio [88, 93]. Elektrinio laidžio matavimai leidžia nustatyti sumodeliuotų ME tipą. A/V tipo ME būdingas didelis elektrinis laidis (10–100 $\mu\text{S}/\text{cm}$) [134], o V/A tipo ME pasižymi mažu elektriniu laidžiu arba yra visiškai nelaidžios [130].

1.2. Vietinio poveikio vaistų formų biofarmaciniai tyrimai

1.2.1. Vaistinių medžiagų atpalaidavimo iš vietinio poveikio vaistų formų tyrimai

Sumodeliuotų vietinio poveikio preparatų kokybė vertinama atliekant biofarmacinius tyrimus: (i) *in vitro* tyrimus su sintetinėmis membranomis; (ii) *ex vivo* tyrimus su eksperimentinių gyvūnų ar žmogaus oda, ir (iii) *in vivo* tyrimus su eksperimentiniais gyvūnais [168].

Sumodeliuoto nešiklio gebėjimas atpalaiduoti veikliąją medžiagą yra vienas pagrindinių kriterijų, vertinančių pagamintų produktų kokybę. Norint pasiekti sumodeliuotų preparatų vietinį ar sisteminį poveikį, pirmiausiai veiklioji medžiaga turi būti atpalaiduota iš nešiklio, o tik po to ji gali skverbti į odą. Vaistinių medžiagų atpalaidavimo pro pusiau laidžias sintetines membranas *in vitro* tyrimai atliekami naudojant difuzines celes (Franz, Hanson) [34]. Tačiau būtina pažymėti, kad *in vitro* tyrimų rezultatai negali būti tiesiogiai siejami su *in vivo* vykstančiu atpalaidavimo procesu, nes odos raginis sluoksnis veikia kaip papildomas barjeras, ribojantis veikliųjų medžiagų skvarbą [78, 102].

1.2.2. Vaistinių medžiagų skvarbos į odą iš vietinio poveikio vaistų formų tyrimai

Vaistinių medžiagų skvarba į odą vyksta nuosekliai. Pirmiausia vyksta junginių atpalaidavimas iš vietiškai vartojamos vaisto formos ir jų patekimas ant epidermio raginio sluoksnio paviršiaus. Toliau vaistinių medžiagų skvarba į odą yra skirstoma į tris etapus: (i) prasiskverbimas pro raginį sluoksnį (angl. *penetration*), (ii) skvarba iš vieno odos sluoksnio į kitą (angl. *permeation*) ir (iii) junginių patekimas į kraujotaką (angl. *absorption*) [19, 24, 70].

Vaistinių medžiagų skvarba į odą gali vykti keliais būdais: per ląsteles (intraląstelinis kelias), tarpląstelinis (interląstelinis kelias), per plaukų folikulus ar liaukų latakus [24, 70, 80, 112]. Mokslinės literatūros analizė parodė, kad veikliųjų medžiagų skvarbos į odą procesą kontroliuoja epidermio raginis sluoksnis [70]. Jis sukuria barjerą, kuris riboja vaistinių medžiagų skvarbą į odą, todėl sunku pasiekti norimą šių medžiagų terapinį poveikį. Vertinant raginio sluoksnio savybes, galima teigti, kad skvarba į odą priklausys nuo junginio giminingumo šio sluoksnio lipidams ir molekulių gebėjimo praskverbti pro korneocitų ląstelių sienelę [70]. Dėl odos komponentų savybių hidrofilinės medžiagos negali lengvai skverbti į odą, nes joms trukdo raginio sluoksnio lipidinė matrica [24]. Šiuo atveju hidro-

filinių medžiagų skvarba vyksta intraląstelinio keliu per raginio sluoksnio korneocitus [24]. Lipofilinių medžiagų skvarba vyksta tarpląstelinio keliu, nes šiomis savybėmis pasižymintys junginiai gali tirpti raginio sluoksnio lipiduose [105]. Tačiau lipofilinių medžiagų patekimą į gilesnius odos sluoksnius riboja gyvojo epidermio ir dermos hidrofilinės savybės. Vaistinėms medžiagoms, kurias naudojant siekiama sukelti sisteminį poveikį, svarbu patekti į dermą ir joje išsidėsčiusį kraujagyslių tinklą [24, 70].

Vaistinių medžiagų skvarba pro plauko folikulus ir liaukas sudaro tik nedidelę dalį visos junginių skvarbos pro odą, nes jie apima tik apie 0,1 proc. bendro odos ploto [80, 112, 158]. Taigi pagrindinis veikliųjų medžiagų patekimo į odą būdas yra pro raginį epidermio sluoksnį.

Vaistinių medžiagų skvarba į odą priklauso nuo jų fizikinių-cheminių savybių. Moksliniais tyrimais įrodyta [53, 80, 158], kad lengvai skverbiasi į odą tos medžiagos, kurios pasižymi optimaliomis savybėmis: (i) maža molekuline mase (< 500 Da), nes nuo jos dydžio priklauso difuzijos greitis; (ii) pasiskirstymo koeficiento tarp oktanolio-vandens ($\log P$) reikšmė nuo 1 iki 3, kuri parodo, kad jos gali tirpti tiek lipiduose, tiek korneocituose ir prasiskverbti į gilesnius odos sluoksnius; (iii) žema lydymosi temperatūra (< 200 °C), kuri rodo geresnį junginių tirpumą lipiduose. Tačiau tik maža dalis vaistinių medžiagų molekulių pasižymi šiomis savybėmis.

Norint pagerinti pasyviąją vaistinių medžiagų skvarbą į odą, kuriami šiuolaikiški transderminiai nanonešikliai (pvz.: liposomos, nanosomos, etosomos, nanoemulsijos, mikroemulsijos), kurių dalelių dydis yra mažesnis nei $1\ \mu\text{m}$ [76, 80, 158]. Nanonešiklių dalelės pasižymi dideliu specifiniu paviršiaus plotu, todėl efektyviai sąveikauja su odos paviršiumi ir taip pagerina vaistinių medžiagų skvarbą į odą [80].

Ex vivo tyrimai yra efektyvūs vertinant vaistinių medžiagų skvarbą į odą [19]. Šių tyrimų metu nustatomas vaistinės medžiagos srautas ir jos pasiskirstymas odoje. *Ex vivo* tyrimams atlikti dažniausiai naudojama izoliuota eksperimentinių gyvūnų oda, tačiau vis dažniau mokslinėje literatūroje galima rasti duomenų apie *ex vivo* tyrimus su žmogaus oda. Šių tyrimų rezultatai leidžia prognozuoti galimą vaistinių medžiagų biologinį pasisavinimą *in vivo* ir yra vertingi kuriant vietinio poveikio preparatus [34].

1.3. Resveratrolio fizikinės-cheminės savybės ir biologinis poveikis

Resveratrolio biologinis poveikis įvairioms organizmo sistemoms įrodytas *in vitro*, *ex vivo* ir *in vivo* tyrimais. Resveratrolis (3, 5, 4'-trihidroksistilbenas) natūraliai randamas polifenolinis junginys, priklausantis stilbenų klasei. Cheminė jo struktūra sudaryta iš dviejų benzeno žiedų, sujungtų dviguba stireno jungtimi, lemiančia resveratrolio struktūrinius pokyčius [52].

Trans-resveratrolis saulės šviesos poveikyje virsta į cis-resveratrolį [31, 36]. Mokslinės literatūros analizė parodė, kad šie junginiai pasižymi skirtingu stabilumu ir biologiniu poveikiu [10, 20, 43, 52, 110].

Nustatyta, kad resveratrolis pasižymi antioksidaciniu, antiradikaliu, priešvirusiniu ir priešvėžiniu aktyvumu [43, 110, 119, 150]. Priešuždegiminis resveratrolio poveikis yra susijęs su jo gebėjimu slopinti prostaglandinų sintenzę reguliuojant ciklooksigenazės-1 ir ciklooksigenazės-2 aktyvumą [152]. Moksliniais tyrimais įrodytas resveratrolio poveikis gydant širdies ir kraujagyslių ligas. Varache-Lembege ir kt. [159] nustatė, kad trans-resveratrolis slopina trombocitų agregaciją. Moksliniais tyrimais su žmogaus adipocitų ląstelėmis įrodytas veikliosios medžiagos gebėjimas reguliuoti lipidų sintezę, padidinti lipolizę, sumažinti lipidų kaupimąsi ir taip sumažinti širdies ir kraujagyslių ligų riziką [87]. Naujausi moksliniai tyrimai patvirtina teigiamą resveratrolio poveikį širdies ir kraujagyslių sistemai [5, 101, 160].

Resveratrolio biologinis pasisavinimas priklauso nuo jo fizikinių-cheminių savybių [96]. Prastas resveratrolio tirpumas vandenyje daro įtaką šio junginio absorbcijai [43]. Tyrimais su gyvūnais ir žmonėmis nustatyta, kad resveratrolį vartojant *per os*, kraujo plazmoje aptinkamas tik 1 proc. laisvo trans-resveratrolio nuo suvartoto jo kiekio [40, 72, 163]. Tiriant kraujo plazmą, didžiausias kiekis nustatomas aktyvių, konjuguotų resveratrolio metabolitų: resveratrolio sulfatų ir resveratrolio gliukuronidų [43, 106]. Resveratrolio veiksmingumas priklauso nuo pakankamo jo kiekio ir gebėjimo pasiskirstyti kraujotakoje ir audiniuose [129]. Siekiant pagerinti resveratrolio biologinį pasisavinimą vartojant *per os*, kuriamos naujos farmacinės vaistų formos. Amiot ir kt. [7] sukūrė inovatyvią vaistų formą kapletes (angl. *caplets*) ir įvertino jų efektyvumą atliekant ikiklinikinius ir klinikinius tyrimus. Tyrimo rezultatai parodė, kad vartojant šią sumodeliuotą vaisto formą, trans-resveratrolio absorbcija padidėjo 10 kartų, o koncentracija kraujo plazmoje buvo 8,8 karto didesnė ir išliko ilgesnį laiką lyginant su kontroliiniu preparatu.

Resveratrolio vaidmuo svarbus gydant odos susirgimus. Dėl stiprių antioksidacinių savybių jis naudojamas kaip efektyvi priemonė odos senėjimo prevencijai bei UV sukeltoms odos pažaidoms ar vėžiniams susirgimams gydyti [119, 162, 167]. Antioksidacinės resveratrolio savybės pagrįstos gebėjimu neutralizuoti susidariusias reaktyvias deguonies ir azoto formas [119]. Tyrimais su HaCaT ląstelėmis nustatyta, kad resveratrolis padidina ląstelių išgyvenamumą bei sumažina reaktyvių deguonies junginių gamybą [91, 113, 162]. *In vivo* tyrimais su gyvūnais įrodytas resveratrolio antioksidacinis poveikis slopinant UVB spinduliuotės sukeltą edemos susiformavimą [3, 14]. Aziz ir kt. [13] nustatė, kad resveratrolis, vietiškai naudojamas

ant odos, reikšmingai sumažino UVB spinduliuotės sukeltų odos navikų paplitimą ir sulėtino tumorogenezės pradžią.

Lipofilinės resveratolio savybės užtikrina jo skvarbą į viršutinį epidermio sluoksnį ir kaupimąsi jame, tačiau tolimesnė jo skvarba ir patekimas į sisteminę kraujotaką yra ribojamas hidrofilinių odos sluoksnių. Siekiant efektyvaus resveratolio poveikio odai, kuriami įvairūs nešikliai, gerinantys junginio skvarbą į odą. Daug vilčių siejama su mikro- ir nano-struktūriniais nešikliais dėl jų savybių gerinti biologiškai aktyvių junginių tirpumą ir stabilumą, modifikuoti raginio sluoksnio barjerines savybes bei užtikrinti kryptingą šių medžiagų tiekimą į odą.

Tyrimais *ex vivo* įrodyta mikro- ir nano-struktūrinių nešiklių įtaka veikliųjų medžiagų skvarbai į odą. Pentek ir kt. [119] sukūrė multifunkcinę vaistų tiekimo sistemą – dendrimerus (angl. *dendrimers*), vienu metu galinčią įterpti ir lipofilinius, ir hidrofilinius junginius. Tyrimais įrodyta, kad šie nešikliai gerina resveratolio tirpumą, stabilumą bei jo skvarbą į žiurkių odą. Resveratolio skvarba į odą buvo 2,1 karto didesnė iš dendrimero-resveratolio formuluotės nei iš kontrolinio resveratolio tirpalo. Apibendrinę šiuos tyrimus, mokslininkai patvirtino, kad dendrimero-resveratolio kompleksai gali būti dedami į odos senėjimo prevencijai ir gydymui skirtus kremus. Mokslininkų sumodeliuotos kietos lipidinės nanodalelės (angl. *solid lipid nanoparticle*) [32] ir nanosuspensijos [150] padidino resveratolio stabilumą ir pagerino šio junginio skvarbą į kiaulių odą. Yutani ir kt. [67, 69] keliose mokslinėse studijose su Yucatan mikrokiaulių oda nustatė, kad sumodeliuotos ME pagerino resveratolio skvarbą į gilesnius odos sluoksnius, ypač į dermą.

Mokslinės literatūros analizė parodė, kad dažniausiai resveratolio skvarba iš įvairių nešiklių vertinama atliekant *ex vivo* tyrimus su eksperimentinių gyvūnų oda, tačiau trūksta mokslinių tyrimų, vertinančių resveratolio skvarbą į žmogaus odą. Shrotriya ir kt. [144] sumodeliavo kietas lipidines nanodaleles su resveratoliu, jas gelifikavo ir vertino resveratolio skvarbą į žmogaus odą bei sumodeliuotos sistemos galimą dirginamąjį poveikį tyrimais *in vivo* naudojant Naujosios Zelandijos triušius. Tyrimo rezultatai parodė, kad sumodeliuotos formuluotės pagerino resveratolio skvarbą į dermą ir neturėjo neigiamo poveikio odai. Polonini ir kt. [122] nustatė panašų resveratolio kiekio pasiskirstymą skirtinguose žmogaus odos sluoksniuose naudojant sumodeliuotą kremą su resveratoliu (kiekis *stratum corneum* buvo 20,48 µg, o gyvajame epidermyje ir kartu dermoje – 21,41 µg). Norint įvertinti nanonešiklių įtaką resveratolio skvarbai į žmogaus odą, Scalia ir kt. [135] sumodeliavo chitozanu dengtas lipidines mikrodaleles su resveratoliu, įterpė jas į kremą ir atliko *in vivo* tyrimus su 6 savanoriais. Resveratolio kiekis raginiame sluoksnyje įvertintas naudojant lipnias

juosteles (angl. *tape stripping technique*). Mokslininkai 15 kartų lipnia juoste pašalino *stratum corneum* ir nustatė resveratrolio kiekį šiose juostelėse. Tyrimo rezultatai parodė, kad chitozanu dengtos lipidinės mikrodalelės reikšmingai pagerino resveratrolio skvarbą ($49,3 \pm 5,6$ proc. nuo tirtos dozės) į odą lyginant su kontrolinėmis formuluotėmis, tačiau didžiausias resveratrolio kiekis buvo nustatytas viršutiniame *stratum corneum* sluoksnyje.

Mokslinė literatūros analizė parodė labai įvairų resveratrolio biologinį aktyvumą. Atsižvelgus į resveratrolio fizikines-chemines savybes, tikslinga modeliuoti inovatyvias farmacines formas, kurios pagerintų jo tirpumą, stabilumą ir užtikrintų kryptingą šio junginio patekimą į kraujotaką ar audinius.

2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Sumodeliuotos eksperimentinės mikroemulsijos, į kurias įterptas resveratrolis ir fizikiniais-cheminiais, biofarmaciniais ir biologiniais rodikliais grindžiamas kokybės modelis.

2.2. Reagentai ir medžiagos

Kaprilokaproilo makrogol-8 gliceridas, poligliceril-6-izostearatas gauti iš Gattefosse (Saint-Priest, Prancūzija). Etilo oleatas, izopropilo miristatas, izopropilo palmitatas, oleino rūgštis, polietilenglikolis (PEG 400) įsigyti iš Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Vokietija).

Analitinis trans-resveratolio standartas ($\geq 99,7$ proc.), acetonitrilas ($\geq 99,9$ proc.), acto rūgštis, alyvuogių aliejus gauti iš Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija). Resveratolio ekstraktas (> 98 proc.) įsigytas iš Naturex (Avignon, Prancūzija). Etanolis (96 proc.) gautas iš AB „Vilniaus degtinė“ (Vilnius, Lietuva), natrio chloridas – iš Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Vokietija), o natrio azidas – iš PoCh (Gliwice, Lenkija). Visi kiti tyrimuose naudoti reagentai buvo analitinio švarumo.

2.3. Tyrimo metodai ir metodika

2.3.1 Trans-resveratolio analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

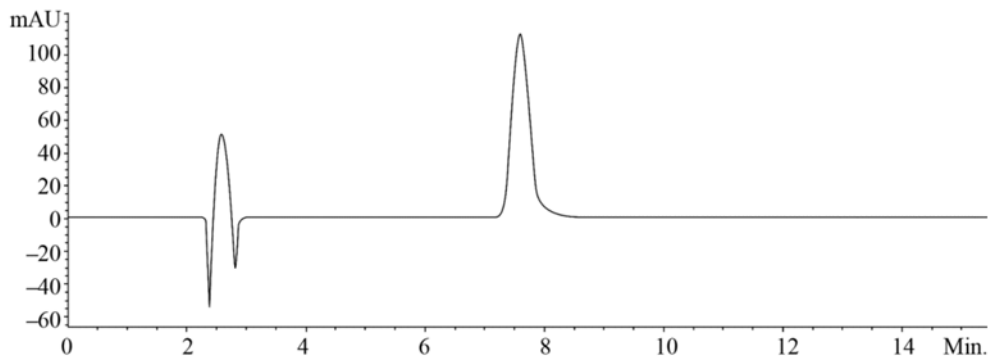
Trans-resveratolio kiekybinė analizė atlikta naudojant Agilent 1260 Infinity kapiliarinį skysčių chromatografą (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, JAV) su diodų matricos detektoriumi. Trans-resveratoliui atskirti nuo skilimo produktų ir endogeninių odos matricos komponentų naudota kapiliarinė Zorbax C18 kolonėlė ($150 \times 0,5$ mm, $5 \mu\text{m}$ dydžio dalelėmis) [46, 108] su Zorbax C18 $5\mu\text{m}$ prieškolone. Judri fazė sudaryta iš dviejų eliuentų: 0,5 proc. acto rūgšties vandeninio tirpalo (eliuentas A) ir acetonitrilo (eliuentas B) [72, 108, 117]. Naudotos izokratinės sąlygos: 75 proc. (v/v) eliuento A:25 proc. (v/v) eliuento B. Judrios fazės tėkmės greitis – $10 \mu\text{l}/\text{min}$, o injekcijos tūris – $0,2 \mu\text{l}$. Kolonėlė termostatuojama palaikant 25°C temperatūrą. Trans-resveratolio detekcija atlikta esant 306 nm UV bangos ilgiui [71, 161]. Prieš atliekant chromatografinę analizę, visi tyrimuose

naudoti mėginiai buvo filtruojami pro Rotilabo® 0,20 µm nailoninius membraninius švirkštų filtrus (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Vokietija).

2.3.2. Trans-resveratrolio efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos pritaikymas ir validacija

Chromatografinės metodikos validacija atlikta nustatant šiuos parametrus: specifiškumą, tiesiškumą, tikslumą, glaudumą, aptikimo (LoD) ir kiekybinio nustatymo (LoQ) ribas.

Naudojant 0,5 proc. acto rūgšties vandeninį tirpalą (eliuentas A) ir acetonitrilą (eliuentas B) bei izokratinį eliuavimą, pasiektas optimalus trans-resveratrolio atskyrimas, kuris pavaizduotas 2.3.2.1 paveiksle.

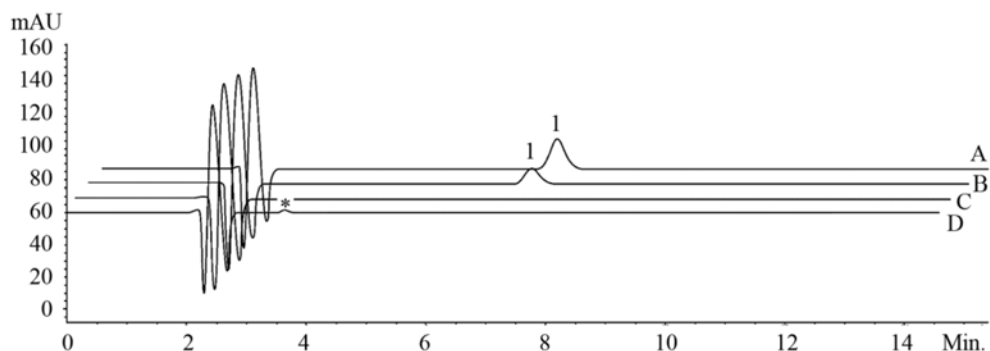


2.3.2.1 pav. Trans-resveratrolio standarto mėginio chromatograma

Nustatytas trans-resveratrolio sulaikymo laikas – 7,91 min, o analizės trukmė – 15 min.

Specifiškumas. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos specifiškumas vertintas naudojant žmogaus odos mėginius ($n = 6$). Atšildyta oda buvo sukarpyta į $0,64 \text{ cm}^2$ ploto gabaliukus. Odos mėginiuose epidermis nuo dermos atskirtas pritaikius „sausos karščio“ metodą. Norint nustatyti ekstrahuojamus junginius, buvo atlikta jų ekstrakcija iš epidermio ir dermos ultragarso vonelėje naudojant 1 ml metanolio. Ekstrakcijos trukmė – 30 min.

Efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos specifiškumas vertintas pagal chromatogramas (2.3.2.2 pav., A, B, C, D), gautas injekavus epidermio ir dermos ekstrakcijos mėginius su ir be trans-resveratrolio. Iš epidermio ir dermos išekstrahuotų komponentų sulaikymo laikai ir UV absorbcijos spektrai buvo lyginami su etaloninio trans-resveratrolio sulaikymo laiku ir UV absorbcijos spektru (2.3.2.1 pav.).



2.3.2.2 pav. *Epidermio ir dermos ekstraktų chromatogramos, gautos esant 306 nm šviesos bangos ilgiui.*

*Odos ekstrakcijos komponentai. 1 – trans-resveratrolis.

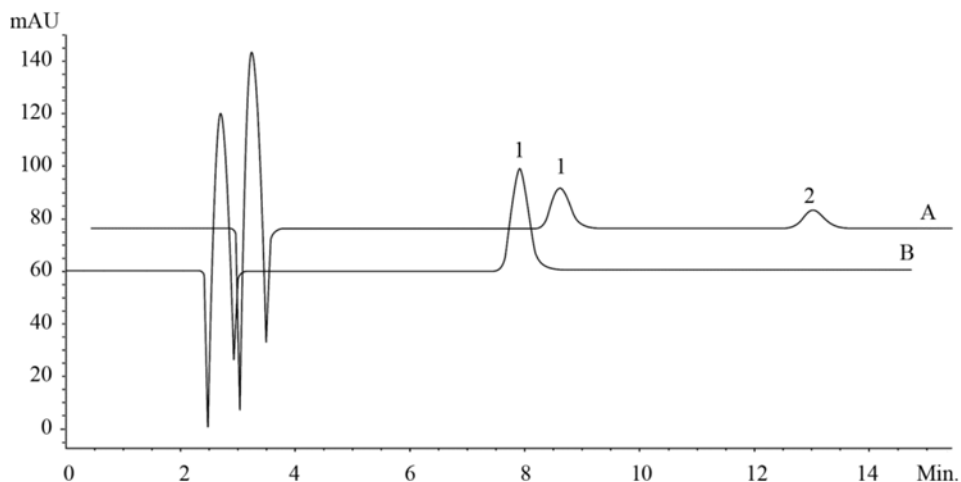
A, B – epidermio ir dermos mėginių su trans-resveratroliu chromatogramos.

C, D – epidermio ir dermos mėginių be trans-resveratrolio chromatogramos.

Analizuojant gautas chromatogramas, nustatyta, kad epidermio ir dermos ekstraktuose, kuriuose buvo pridėta trans-resveratrolio (2.3.2.2 pav. A, B), analitės sulaikymo laikas ir etaloninio junginio sulaikymo laikas nesiskyrė, o UV absorbcijos spektrai sutapo. Vertinant chromatogramas, gautas įjekavus epidermio ir dermos mėginius be trans-resveratrolio (2.3.2.2 pav. C, D), nustatyta, kad taikyta metodika epidermio komponentų neaptiko, o dermos komponentai, nustatyti 3,9 min, netrukdo trans-resveratrolio kiekybiniam nustatymui.

Mokslinės literatūros analizė parodė, jog trans-resveratrolis gali virsti mažiau aktyvia jo forma – cis-resveratroliu [95, 108, 117]. Patvirtinta, kad saulės šviesa yra pagrindinis veiksnys, sukeliantys trans-resveratrolio izomerizaciją. Norint įvertinti ar vystomas metodas geba atskirti trans-resveratrolį nuo jo izomero cis-resveratrolio, pagamintas standartinis trans-resveratrolio tirpalas buvo laikomas 1 valandą dienos šviesoje kambario temperatūroje ir atliktas jo kiekybinis nustatymas.

Vertinant gautą chromatogramą, (2.3.2.3 pav., A) nustatyta, jog trans-resveratrolio sulaikymo laikas nepakito lyginant su standartiniu tirpalu, apsaugotu nuo šviesos (2.3.2.3 pav., B). Tačiau pastebėtas trans-resveratrolio smailės sumažėjimas ir papildomos smailės atsiradimas, kurios sulaikymo laikas (2.3.2.3 pav., A) buvo 12,57 min. Gauti tyrimo rezultatai įrodė, kad vystoma metodika geba nustatyti trans-resveratrolio izomerizacijos produktą, atsiradusį veikiant saulės šviesai.



2.3.2.3 pav. *Trans-resveratolio ir cis-resveratolio mėginių chromatogramos*

A: 1 – trans-resveratolis; 2-cis-resveratolis.

B: 1 – trans-resveratolio standarto mėginio chromatograma.

Aptikimo (LoD) ir kiekybinio nustatymo (LoQ) ribos. Aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos įvertintos lyginant smailės aukštį su bazinės linijos triukšmu. Skaičiuojant aptikimo ribą, smailės aukščio ir bazinės linijos triukšmo santykis turi būti 3:1, o nustatymo riba – 10:1. Remiantis šiais parametrais, aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos apskaičiuotos analizuojant trijų koncentracijų (0,2 µg/ml, 0,6 µg/ml ir 1 µg/ml) standartų tirpalus. Tyrimo metu nustatyta aptikimo riba buvo 0,038 µg/ml, o kiekybinio nustatymo – 0,125 µg/ml.

Tiesiškumas. Tiesiškumas nustatytas vertinant trans-resveratolio smailės ploto priklausomybę nuo jo koncentracijos tiriamajame tirpale. Remiantis kiekybinio nustatymo riba, paruošti šešių skirtingų koncentracijų trans-resveratolio standartų tirpalai (0,13–31,59 µg/ml), kurie naudoti kalibracinei kreivei sudaryti. Kiekvienas tirpalas injekuotas po 3 kartus. Sudaryta kalibracinės kreivės lytis: $y = 74,71x - 2,52$. Nustatytas determinacijos koeficientas $R^2 = 0,99999$, kuris patvirtino kalibracinės kreivės tiesiškumą.

Tikslumas ir glaudumas. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos tikslumas ir glaudumas vertintas ruošiant tris serijas trijų skirtingų koncentracijų tirpalus tą pačią dieną (pakartojamumo validacija) ir skirtingomis dienomis (atkuriamumo validacija). Tikslumas vertinamas pagal procentinę nustatytos analitės kiekį, o glaudumas – pagal santykinį standartinį nuokrypį (SSN, proc.). Tikslumo ir glaudumo rezultatai pateikti 2.3.2.1 lentelėje.

2.3.2.1 lentelė. *Trans-resveratrolio efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos tikslumo ir glaudumo reikšmės pakartojamumo ir atkuriamumo sąlygomis*

Analitė	Pakartojamumas		Atkuriamumas	
	Tikslumas, (proc.)	Glaudumas, SSN (proc.)	Tikslumas, (proc.)	Glaudumas, SSN (proc.)
Trans-resveratrolis	105,4–109,9	0,8–2,5	104,9–109,2	1,0–4,8

Tikslumo ir glaudumo tyrimų rezultatai parodė, kad pakartojamumo sąlygomis tikslumas buvo nuo 105,4 proc. iki 109,9 proc., o atkuriamumo sąlygomis – nuo 104,9 iki 109,2 proc. Glaudumo reikšmės pakartojamumo ir atkuriamumo sąlygomis neviršijo 4,8 proc.

Atsižvelgiant į gautus išvystytos efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos validacijos parametrus, nustatyta, kad ši metodika gali būti taikoma trans-resveratrolio kokybinei ir kiekybinei analizei atlikti tolimesniuose biofarmaciniuose *in vitro* ir *ex vivo* tyrimuose.

2.3.3. Resveratrolio tirpumo nustatymas

Resveratrolio miltelių perteklius buvo pridėtas į mėgintuvėliuose esančius tirpiklius ar tirpiklių mišinius. Mėgintuvėliai termostatinėje purtyklėje (GFL, Vokietija) buvo nuolat purtomi 72 valandas palaikant 37 ± 1 °C temperatūrą. Po inkubacijos mėgintuvėliai buvo centrifuguojami naudojant Eppendorf C5810R centrifugą (Hamburgas, Vokietija) 6000 aps/min greičiu 10 min [148]. Gauti mėginiai praskiesti etanolio, o ištirpęs resveratrolis kiekis nustatytas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

2.3.4. Mikroemulsijų gamyba

Eksperimentinės mikroemulsijos (ME) gamintos taikant titravimo lipofilinė fazė (angl. *oil titration method*) metodą [156]. ME gamyba vykdyta kambario temperatūroje į vandeninę fazę pridedant skirtingą surfaktanto ir kosurfaktanto mišinio (S/KoS) kiekį ir maišant ant magnetinės maišyklės IKAMAG® C-MAG HS7 (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Vokietija) 1250 aps/min greičiu 10 min. Vykstant maišymo procesui, į mišinį lašais lašinama lipofilinė fazė ir stebimas formuluojamos sistemos nuskaidrėjimas. Visų pagamintų eksperimentinių ME ekvibracija vykdyta 24 valandas mėginius laikant kambario (15–25 °C) temperatūroje [25, 134].

2.3.4.1. Mikroemulsijų su resveratroliu gamyba

Apskaičiuotas resveratrolio kiekis tirpintas surfaktante ir aliejuje kambario (15–25 °C) temperatūroje naudojant magnetinę maišyklę. Maišymo greitis – 1250 aps/min. Ištirpus veikliajai medžiagai, ME su resveratroliu (ME-RES) gamyba vykdyta pagal 2.3.4 skyrelyje aprašytą metodiką.

2.3.5. Mikroemulsijų fizikinių-cheminių savybių nustatymas

Sumodeliuotų ME dalelių dydis ir polidispersiškumo indeksas (PDI) nustatytas dinaminiu šviesos sklaidos metodu. Tyrimui naudotas dalelių dydžio matavimo analizatorius Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Jungtinė Karalystė). ME dalelių dydis matuotas 173° kampu 25 °C temperatūroje.

ME klampa (mPa·s) ir pH reikšmė vertinti 25 °C temperatūroje atitinkamai naudojant Vibro-viskozimetrą SV-10 (A&D Company, Japonija) ir pH-metrą 766 Calimatic (Knick, Vokietija).

Sumodeliuotų ME tipas nustatytas matuojant ME elektrinį laidį konduktometru (Cond 3110 SET 1, Vokietija) kambario (15–25 °C) temperatūroje.

Visi matavimai atlikti pasibaigus ME ekvibracijos laikui (praėjus 24 valandoms po ME pagaminimo) [133]. Kiekvienas matavimas atliktas 3 skirtingoms ME serijoms ($n = 3$).

2.3.6. Mikroemulsijų termodinaminio stabilumo nustatymas

Sumodeliuotų ME fizinis stabilumo vertinimas atliktas taikant centrifugavimo testą [139, 156]. Tikslus kiekis ($10 \pm 0,01$ g) pagamintų ME perkeltas į mėgintuvėlius, kurie centrifuguoti 3500 aps/min greičiu 30 min. Atlikus centrifugavimą, kiekvienas mėginys vertintas vizualiai, stebėta ar nėra ME fazių atsiskyrimo, susidrumstimo ar nuosėdų susidarymo. ME, kurios centrifugavimo metu išliko stabilios, atlikti kiti termodinaminį stabilumą patvirtinantys testai.

Šildymo-šaldymo (angl. *heating-cooling cycle*) ir užšaldymo-atšildymo (angl. *freeze-thaw cycle*) ciklai taikyti sumodeliuotų eksperimentinių ME termodinaminiam stabilumui įvertinti [139, 156]. Šildymo-šaldymo ciklo metu pagamintos ME laikytos 4 °C, 20 °C, 32 °C ir 45 °C temperatūroje ne mažiau nei 48 valandas kiekvienoje temperatūroje. ME homogeniškumas vertintas vizualiai kiekvieno temperatūrinio ciklo pabaigoje – stebėta ar nėra ME fazių atsiskyrimo, susidrumstimo ar nuosėdų susidarymo. Mėginių laikymo temperatūra keista tuomet, jei ME išliko skaidri. Jei šis kriterijus

netenkinamas, ME vertinta kaip termodinamiškai nestabili sistema ir tolimesni tyrimai su šiuo mėginiu nevykdyti.

Pasibaigus šildymo-šaldymo ciklui, termodinamiškai stabilioms sistemoms taikytas užšaldymo-atšildymo ciklas. Pasirinktos trys temperatūros ($-21\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), kuriose pagamintos ME laikytos ne mažiau nei 48 valandas kiekvienoje iš jų. ME homogeniškumas vertintas vizualiai, kaip ir šildymo-šaldymo ciklo metu.

2.3.7. Mikroemulsijų stabilumo tyrimas

Stabilumo tyrimo metu sumodeliuotos ME buvo laikomos skirtingomis laikymo sąlygomis: a) kambario ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) temperatūroje, mėginiai apsaugoti nuo šviesos; b) kambario ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) temperatūroje, mėginiai neapsaugoti nuo šviesos; c) ilgalaikio stabilumo tyrimo sąlygomis ($25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra ir 60 ± 5 proc. santykinė drėgmė); d) pagreitinoto stabilumo tyrimo sąlygomis ($40 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra ir 75 ± 5 proc. santykinė drėgmė). Ilgalaikio ir pagreitinoto stabilumo tyrimų metu mėginiai laikyti klimatinėse spintose Binder KBF (Binder GmbH, Vokietija). Mėginiai buvo laikomi sandariose talpyklėse, o jų apsauga nuo šviesos užtikrinta uždengiant talpykles folijos sluoksniu. Mėginių stabilumas vertintas po 1, 2, 4, 7, 14 dienų ir 1, 3, 6 mėnesių nuo jų pagaminimo matuojant vidutinį dalelių dydį (VDD) ir polidispersiškumo indeksą (PDI) pagal 2.3.5 skyrelyje pateiktą metodiką. Resveratrolio stabilumas ME vertintas atliekant veikliosios medžiagos kiekybinį nustatymą efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

2.3.8. Resveratrolio atpalaidavimo iš mikroemulsijų *in vitro* tyrimai

Atpalaidavimo tyrimai *in vitro* ($n = 3$) atlikti naudojant dializės maišelį (angl. *dialysis bag*) [2, 109, 155]. Donorinės fazės begalinė dozė ($1,0 \pm 0,02\text{ g}$) patalpinama į celiuliozinį dializės maišelį (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, JAV), kuris prieš eksperimentą brinkintas išgrynintame vandenyje ne trumpiau kaip 12 valandų [140]. Dializės maišelio galai užtvirtinami spaustukais ir dedami į indą su paruošta akceptorine terpe – 50/50 PEG 400/išgryninto vandens mišinys (500 ml). Viso tyrimo metu akceptorinė terpė nuolat maišoma magnetine maišykle IKAMAG® C-MAG HS-7 palaikant $32 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrą. Akceptorinės terpės mėginiai (1 ml) imti po 0,5, 1, 2, 4 ir 6 valandų nuo tyrimo pradžios kiekvieną kartą įpilant tokį patį šviežios akceptorinės terpės tūrį. Vykstant difuzijos procesui, sudarytos eksperimentinės sąlygos neribojo resveratrolio tirpumo ir tirpimo proceso akceptorinėje terpėje. Resveratrolio kiekis, difuzijos būdu patekęs į akceptorinę terpę, nustatytas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

2.3.9. Resveratolio skvarbos į žmogaus odą ex vivo tyrimai

Tyrimams su žmogaus oda atlikti gautas Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas (2008-11-05, Nr. BE-2-53, atnaujintas 2016-07-14). *Ex vivo* tyrimams atlikti naudota 25–40 metų baltaodžių moterų oda, gauta po plastinių operacijų, atliktų Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Plastinės ir rekonstrukcinės chirurgijos klinikoje. Tyrimuose naudota oda, kuri užšaldyta ir laikyta $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ne ilgiau kaip 6 mėnesius.

Skvarbos į odą *ex vivo* tyrimai ($n = 6$) atlikti naudojant Bronaugh tipo pratakias difuzines celes. Efektyvus celių difuzijos plotas $0,64\text{ cm}^2$. Cėlės įtvirtinamos specialiaje termostatuojamame metaliniame bloke, kuriame cirkuliuojantis vanduo palaiko $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrą. Cirkuliuojančio vandens temperatūrai ($t \leq 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) palaikyti naudojama termostatinė cirkuliacinė vandens vonelė Grant GD120 (Grant Instruments Ltd., Kembridžas, Jungtinė Karalystė). Tyrimo metu celių temperatūra išlieka pastovi dėl tolygaus vandens cirkuliavimo.

Akceptorinė terpė sudaryta iš 0,9 proc. natrio chlorido ir 0,005 proc. natrio azido, kuris naudojamas kaip konservantas. Tyrimo metu palaikomas tolygus akceptorinės terpės cirkuliacinis greitis ($0,6\text{ ml/min}$) naudojant peristaltinį siurbį Masterflex® L/S® su daugiakanale siurblio galva (Cole-Parmer Instruments Co., Ilinojus, JAV).

Odos mėginių paruošimo, analizuojamo mėginio uždėjimo ir nuėmimo bei ekstrakcijos iš odos sluoksnių procedūros atliktos pagal moksliniuose šaltiniuose paskelbtas metodikas [79, 168].

2.3.10. Resveratolio fotostabilumo eksperimentinėse formuluotėse vertinimas

Resveratolio fotostabilumas pagamintose ME vertintas naudojant UVB spinduliuotę. Tiriami mėginiai ($n = 3$) patalpinti į petri lėkšteles, kurios padėtos 20 cm atstumu nuo UVB spindulių šaltinio. Mėginių švitinimas atliktas naudojant MRL-58 Multiple-Ray UV lempą (Ultra-Violet Products Ltd, Jungtinė Karalystė) ir palaikant $< 1\text{ mW/cm}^2$ UVB spinduliuotės intensyvumą [44, 132]. UVB spinduliuotės intensyvumas išmatuotas naudojant UVX radiometrą (Ultra-Violet Products Ltd, Jungtinė Karalystė). Tyrimas vykdytas kambario ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) temperatūroje mėginius saugant nuo kitų papildomų šviesos šaltinių. Tyrimo trukmė – 4 valandos. Mėginiai imti po 15, 30, 60, 120 ir 240 min., praskiesti reikiamu kiekiu etanolio. Trans-resveratolio izomerizacija į cis-resveratrolį ir kiekybinis šių junginių nustatymas atliktas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu. ME fizikinis

stabilumas vertintas matuojant VDD ir PDI po 120 ir 420 min. nuo tyrimo pradžios. Kontrolei naudotas etanolinis resveratrolio tirpalas.

2.3.11. Eksperimentinių formuluočių dirginamojo poveikio odai *in vivo* tyrimas

Tyrimai su eksperimentiniais gyvūnais vykdyti Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos Gyvūnų tyrimo centre, vadovas – doc. dr. Aidas Grigonis.

Histologiniai pelių odos tyrimai atlikti Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Histologijos ir embriologijos katedroje, vadovaujant katedros vedėjai prof. Angelijai Valančiūtei.

Sumodeliuotų eksperimentinių formuluočių biologinis veiksmingumas *in vivo* vertintas atliekant tyrimus su Balb/c linijos pelėmis ($n = 20$) [57, 128]. Tyrimams su gyvūnais atlikti gautas Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas (Nr. G2-37, 2015-12-31). Tyrimams naudotos 3 mėnesių amžiaus vyriškos lyties pelės (25–30 g svorio), kurios auginamos vienodomis sąlygomis: 22 ± 2 °C temperatūroje, maitinamos įprastu pašaru ir girdomos vandeniu *ad libitum*. Tyrime naudotos šios sumodeliuotos eksperimentinės formuluočių: a) ME be resveratrolio (OPT-ME); b) ME su resveratroliu (ME-RES); c) resveratrolis ištirpintas surfaktante (RES-kontrolė). Neigiama kontrole naudotos niekuo nepaveiktos pelės. Kiekvieną tyrimo grupę sudarė 5 pelės. Prieš tyrimo pradžią pelių nugaros buvo nuskustos. Pagamintos eksperimentinės formuluočių (~ 0,2 g) buvo dedamos ant pelių nugarinės pusės (~2 cm²) vieną kartą per dieną tuo pačiu metu 3 dienas [47, 94]. Pelių odos pokyčiai (eritemos ar edemos susiformavimas) vertinti po 24, 48 ir 72 valandų nuo tyrimo pradžios. Kitą dieną po tyrimo pabaigos pelėms taikyta eutanazija ir paimtos odos biopsijos, kurios laikytos 10 proc. formalino tirpale. Pritaikius standartines mėginio paruošimo procedūras, odos mėginiai fiksuoti parafino plokštelėse, iš jų mikrotomu atpjauti tiriamieji mėginiai. Odos mėginiai nudažyti hematoksilino ir eozino dažais [29]. Histologinis paruoštų odos mėginių vertinimas atliktas naudojant OLYMPUS BX 40F4 mikroskopą su XC30 skaitmenine kamera (Olympus Corporation, Japonija), o epidermio storis išmatuotas pritaikius Cellsens Dimension 2010, 1.3 versijos programinę įrangą.

2.3.12. Statistinis duomenų vertinimas

Eksperimentinis planavimas ir optimizavimas atliktas naudojant Design-Expert 6.0.8 paketą ir taikant D-optimalų dizaino modelį (angl. *D-optimal design model*). Statistinis gautų tyrimo rezultatų įvertinimas atliktas naudojant SPSS 19.0 ir Microsoft Office Excel 2016 programas. Apskaičiuoti mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų rezultatų matavimo vidurkiai, standartiniai nuokrypiai, santykiniai standartiniai nuokrypiai. Tyrimų duomenų analizei taikytas vieno faktoriaus dispersinės analizės modelis (angl. *One-Way ANOVA*), naudojant Tukey'o HSD (angl. *Honestly Significant Difference*) kriterijų arba blokuotųjų duomenų vieno faktoriaus dispersinę analizę (angl. *Repeated Measures ANOVA*). Taip pat skaičiuoti Spirmeno ranginės koreliacijos koeficientai. Visiems kriterijams buvo nustatytas reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$.

3. REZULTATAI

3.1. Resveratrolio tirpumas aliejuose ir surfaktante

Vykdamt ME formuojančių pagalbinių medžiagų atranką, būtina įvertinti pasirinktos modelinės medžiagos resveratrolio tirpumą. Tyrimų metu resveratrolio tirpumas vertintas surfaktante ir aliejuose (3.1.1 lentelė). Lipofilinės fazės komponentų pasirinkimas buvo grindžiamas siekiu pagerinti prastai tirpių junginių tirpumą, paskatinti jų skvarbą į odą ir įvertinus jų pritaikymą ME gamybai [11].

3.1.1 lentelė. Resveratrolio tirpumas aliejuose ir surfaktante

	Tirpiklis	Tirpumas (mg/g)
Aliejus	Izopropilo miristatas	0,49 ± 0,05
	Izopropilo palmitatas	0,41 ± 0,04
	Etilo oleatas	0,42 ± 0,07
	Oleino rūgštis	0,07 ± 0,01
	Alyvuogių aliejus	0,20 ± 0,01
Surfaktantas	Kaprilokaproilo makrogol-8 gliceridas	83,85 ± 7,66

Ekspperimentiniais tyrimais nustatyta, kad geriausiai resveratroliis tirpsta surfaktante (3.1.1 lentelė). Resveratrolio tirpumo aliejuose rezultatai patvirtina mokslinėje literatūroje paskelbtus duomenis, kuriuose įrodomas prastas resveratrolio tirpumas aliejuose [127]. Tyrimo metu nustatytas geriausias resveratrolio tirpumas izopropilo miristate, etilo oleate ir izopropilo palmitate. Atlikus statistinę duomenų analizę, nenustatyta statistiškai reikšmingo skirtumo ($p > 0,05$) tarp resveratrolio tirpumo šiuose tirpikliuose. Tolimesnį lipofilinės fazės pasirinkimą lėmė aliejų fizikinių savybių vertinimas. Djekic L. ir Primorac M. nustatė [45], kad kaprilokaproilo makrogol-8 gliceridas pasižymi geresniu etilo oleato tirpinimu lyginant su izopropilo miristatu ar izopropilo palmitatu, todėl nuspręsta ME gamybai kaip lipofilinę fazę naudoti etilo oleatą.

3.2. Mikroemulsijų modeliavimas ir optimizavimas

Mokslinės literatūros analizė parodė, kad A/V tipo ME modeliavimui kartu su kaprilokaproilo makrogol-8 gliceridu dažnai naudojamas poligliceril-6-izostearatas [45, 81, 83, 131]. ME gamybai naudojant šių paviršinio aktyvumo medžiagų derinius, sumodeliuojamos stabilios ME, kurių vietinis vartojimas yra saugus ir nesukelia dirginamojo poveikio odai. Atsižvelgiant į šiuos aspektus, nuspręsta ME modeliavimui išbandyti kosurfaktantą poligliceril-6-izostearatą.

Parinkus tinkamas pagalbines medžiagas, kitame etape vykdyta kryptinga ME sudėčių paieška ir atranka pritaikius eksperimentinį planavimą. Naudojant eksperimentinį planavimą, būtina parinkti ME formuojančių komponentų procentinio kiekio ribas. Atsižvelgiant į mokslinėje literatūroje pateiktus duomenis [83, 88], sumodeliuotos preliminarios A/V tipo ME sudėtys ($n = 35$). Bendras surfaktanto ir kosurfaktanto mišinio kiekis ME svyravo nuo 30 iki 70 proc. Modeliuojant ME, naudoti skirtingi surfaktanto ir kosurfaktanto (S/KoS) santykiai: 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 ir 7:1. Pagamintos preliminarios sistemos vertintos vizualiai – sistemos nuskaidrėjimas buvo laikomas ME susiformavimu. Vertinant gautus tyrimo rezultatus, nustatyta, kad esant S/KoS 1:1, 2:1 ir 3:1, ME susiformavo, kai PAM koncentracija buvo didesnė nei 60 proc. Norint sumodeliuoti ME su kuo mažesne S/KoS koncentracija, dėl galimo nepageidaujamo PAM poveikio odai, nuspręsta tolimesniems tyrimams šių S/KoS santykių atsisakyti. Preliminarių tyrimų metu nustatytas sumodeliuotų sistemų išsisluoksniavimas, kai ME gamybai naudotos 40 proc. ir mažesnės PAM koncentracijos (S/KoS 4:1, 5:1, 6:1 ir 7:1). Padidinus S/KoS koncentraciją iki 45 proc., pasiektas stabilų ME susiformavimas. Apibendrinus mokslinėje literatūroje pateiktus duomenis ir preliminarinių tyrimų metu gautus rezultatus, apibrėžti ME formuojančių pagalbinių medžiagų (veiksnių) procentinio kiekio intervalai (3.2.1 lentelė).

3.2.1 lentelė. Optimizuojamų mikroemulsijų pagalbinių medžiagų (faktorių) procentinio kiekio ribos

ME komponentai	Funkcija	Kiekis, proc.
Vanduo	Hidrofilinė fazė	35–45
Etilo oleatas	Lipofilinė fazė	5–15
Kaprilokaproilo makrogol-8 gliceridas ir poligliceril-6-izostearatas	Surfaktantas ir kosurfaktantas	45–60

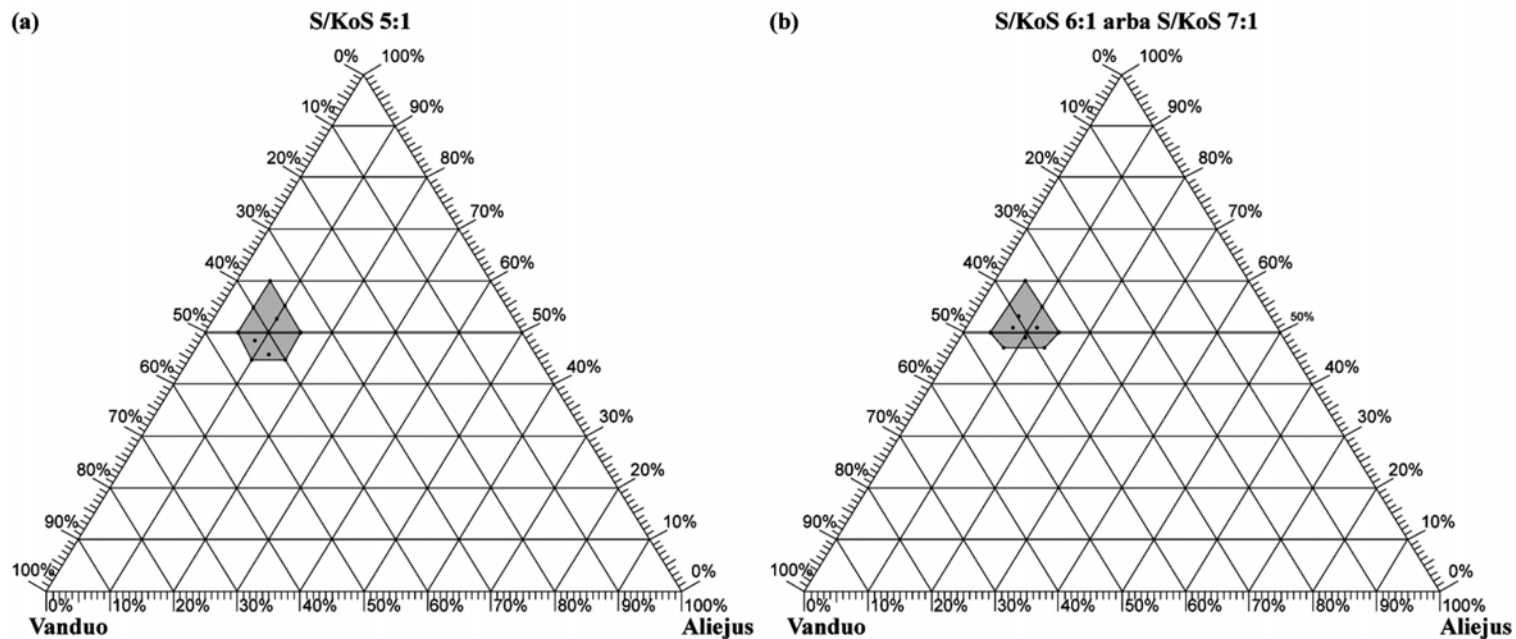
ME modeliavimui pritaikytas eksperimentinis planavimas pasirenkant D-optimalų dizaino modelį. Preliminarūs tyrimai leido apibrėžti ME formuojančių komponentų ribas, kurios buvo panaudotos modeliuojant 14 ME sudėčių (žr. Priedai, 1 lentelė, 124 psl.). Taikant eksperimentinį planavimą, ME nurodyta bendra S/KoS mišinio koncentracija, tačiau gaminant pasiūlytas sudėtis, nuspręsta naudoti skirtingus S/KoS santykius: 4:1, 5:1, 6:1 ir 7:1. Įvedus šį papildomą kintamąjį, iš viso sumodeliuotos 56 skirtingos ME sudėtys (žr. Priedai, 1 lentelė, 124 psl.).

Pagamintų sistemų kokybė pirminiame etape vertinta vizualiai ir pagal vidutinį dalelių dydį (VDD). Tyrimo rezultatai parodė, kad sumodeliuotos sistemos, kuriose S/KoS 4:1 ir 5:1, buvo skaidrios, nepastebėta išsisluoksniavimo ar susidrumstimo. Taikant dinaminės šviesos sklaidos metodą, išmatuotas sumodeliuotų sistemų VDD. Nustatyta, kad esant S/KoS santykiui 4:1, VDD varijavo nuo 53,04 nm iki 91,67 nm, o S/KoS 5:1 – nuo 49,14 nm iki 86,98 nm. Vertinant sumodeliuotas sistemas, kai S/KoS 6:1 ir 7:1, nustatytas vienos sudėties išsisluoksniavimas (S/KoS koncentracija 45 proc., hidrofilinės fazės – 40 proc. ir lipofilinės fazės – 15 proc.). Gauti duomenys rodo (žr. Priedai, 1 lentelė, 124 psl.), kad sudėtyse (S/KoS 6:1 ir 7:1), kuriose lipofilinės fazės koncentracija yra 12,5 proc. arba 15 proc., VDD yra didesnis nei 100 nm. Vertinant šiuos rezultatus, galima daryti išvadą, kad lipofilinės fazės koncentracija mėginiuose yra didelė ir S/KoS koncentracijos nepakanka suformuoti stabilioms sistemoms.

Norint sumodeliuoti stabilias ME (S/KoS 6:1 ir 7:1) ir išlaikyti VDD mažesnę nei 100 nm, S/KoS koncentracija padidinta iki 46 proc. Pritaikant eksperimentinį planavimą, sumodeliuotos naujos ME sudėtys ($n = 28$), kuriose S/KoS koncentracija buvo 46–60 proc. ribose (žr. Priedai, 3, 4 lentelės, 126–127 psl.). Modeliuojant ME, lipofilinės ir hidrofilinės fazių kiekių ribos išliko tokios pačios (3.2.1 lentelė). Vertinant pagamintas sistemas vizualiai, jos išliko skaidrios, nenustatyta išsisluoksniavimo ar susidrumstimo. Tyrimo rezultatai parodė, kad padidinus S/KoS koncentraciją, VDD sumažėjo lyginant su pradinėmis sudėtimis. Sumodeliuotų sistemų, kai S/KoS santykis 6:1 ir 7:1, nustatytas VDD atitinkamai buvo ribose tarp 48,51–79,51 nm ir 47,67–79,94 nm (žr. Priedai, 3, 4 lentelės, 126–127 psl.). Norint įvertinti galimą pagalbinių medžiagų įtaką ME (S/KoS 4:1, 5:1, 6:1 ir 7:1) dalelių dydžiui, atlikta statistinė duomenų analizė. Nustatyta statistškai reikšminga ($p < 0,05$) atvirkštinė koreliacija ($r = -0,855$) tarp hidrofilinės fazės kiekio ir ME VDD, kuri parodė, kad didėjant hidrofilinės fazės kiekiui ME, dalelių dydis mažėja. Statistinė duomenų analizė parodė statistškai reikšmingą ($p < 0,05$) tiesioginę koreliaciją ($r = 0,652$) tarp lipofilinės fazės kiekio ir ME dalelių dydžio – didėjant lipofilinės fazės kiekiui ME, dalelių dydis didėja. Nenustatyta statistškai reikšmingos koreliacijos tarp bendro

S/KoS kiekio ir ME dalelių dydžio. Apibendrinant gautus tyrimo rezultatus, nustatyta, kad visos sumodeliuotos sistemos buvo skaidrios, o VDD nesiekė 200 nm. Šių kriterijų atitikimas leido daryti išvadą, kad sumodeliuotas sistemas galima vertinti kaip ME [12].

Kitame tyrimų etape toliau vykdytas sumodeliuotų ME (S/KoS 4:1, 5:1, 6:1 ir 7:1) kokybės vertinimas. Pagamintų ME stabilumui patikrinti, atliktas centrifugavimo testas (3500 aps/min greičiu, 30 min), kurio rezultatai parodė, kad visos ME išliko skaidrios, nepastebėta susidrumstimo, išsi-sluoksniavimo ar nuosėdų susidarymo. Termodinaminis ME stabilumas vertintas taikant šildymo-šaldymo (angl. *heating-cooling*) ir užšaldymo-atšildymo (angl. *freeze-thaw*) ciklus. Tyrimo rezultatai parodė, kad ME (S/KoS 4:1) laikant 4 °C temperatūroje, įvyksta mėginių susidrumstimas arba fazių atsiskyrimas (išsi-sluoksniavimas), todėl šios sistemos vertintos kaip nestabilios. Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad ME yra termodinamiškai stabili sistema, todėl šios sumodeliuotos sistemos (S/KoS 4:1) negali būti naudojamos tolimesniems tyrimams atlikti [48]. Vertinant gautus termodinaminio stabilumo rezultatus, nustatyta, kad viso tyrimo metu sumodeliuotos ME (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) išliko skaidrios, nebuvo fazių atsiskyrimo, susidrumstimo ar nuosėdų susidarymo. Tyrimo rezultatai patvirtino sumodeliuotų ME (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) stabilumą, todėl pagal pateiktas jų sudėtis suformuotos pseudo-trinarės fazių diagramos (3.2.1 pav.). Sudarytose diagramose apibrėžtos sritys reprezentuoja tirtų ME susiformavimo ribas esant skirtingiems S/KoS santykiams. Analizuojant pseudo-trinaries fazių diagramas, nustatyta, kad ME (S/KoS 5:1) susiformavimo ribos yra didžiausios (3.2.1 pav., a). ME (S/KoS 6:1 ir 7:1) sudarytos pseudo-trinarės fazių diagramos yra vienodos, nes tyrimo metu sumodeliuotos sudėtys sutapo (3.2.1 pav., b).



3.2.1 pav. Pseudo-trinarės fazių diagramos

(a) kai surfaktanto ir kosurfaktanto santykis 5:1; (b) kai surfaktanto ir kosurfaktanto santykis 6:1 arba 7:1.

Norint atlikti sumodeliuotų ME sudėčių optimizavimą, tikslinga detaliau įvertinti jų kokybę. Sumodeliuotų ME (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) homogeniškumas vertintas pagal šiuos kriterijus: polidispersiškumo indeksą (PDI), standartinį nuokrypį nuo VDD ir smailių skaičių, kuris parodo dalelių dydžio pasiskirstymą (žr. Priedai, 2, 3, 4 lentelės, 125–127 psl.). Gauti rezultatai parodė, kad ME PDI buvo ribose 0,248–0,445 (S/KoS 5:1), 0,270–0,473 (S/KoS 6:1), 0,253–0,489 (S/KoS 7:1), o standartinis nuokrypis nuo VDD atitinkamai 50,83–92,49 nm, 46,55–83,72 nm, ir 43,84–80,39 nm. Vertinant dalelių dydžio pasiskirstymo pagal išsklaidytos šviesos intensyvumą grafikus, nustatytas ME (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) dalelių pasiskirstymas vienoje arba dviejose smailėse. Atsižvelgiant į aukštus PDI rodiklius ir dalelių pasiskirstymą keliuose smailėse, keletas sumodeliuotų ME gali būti vertinamos kaip galimai heterogeninės sistemos (žr. Priedai, 2, 3, 4 lentelės, 125–127 psl.).

Siekiant gauti optimalios sudėties, stabilias ir homogeniškas ME, atliktas sumodeliuotų ME (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) optimizavimas. Apibendrinus mokslinės literatūros duomenis ir ankstesnius tyrimų rezultatus, parinkti trys pagrindiniai kriterijai, kurie taikyti pagamintų sistemų optimizavimui: a) VDD intervale 1–100 nm; b) dalelių pasiskirstymas vienoje smailėje; c) mažiausias standartinis nuokrypis nuo dalelių dydžio vidurkio reikšmės.

Optimizavimo rezultatai plačiau aptarti straipsnyje „Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol“ (90–99 psl.).

Įvertinus gautus optimizavimo rezultatus, nustatyta, kad sugeneruotas teorinis optimalių ME VDD, standartinis nuokrypis ir smailių skaičius nuo praktinio reikšmingai nesiskyrė.

3.2.2 lentelė. Optimalios sudėties mikroemulsijos

ME	S/KoS santykis	Komponentų kiekiai, proc.		
		S/KoS	Vanduo	Aliejus
OPT-ME 5:1	5:1	57	38	5
OPT-ME 6:1	6:1	55,5	37,9	6,6
OPT-ME 7:1	7:1	56	37,6	6,4

Tyrimo rezultatai parodė, kad buvo pasirinktas tinkamas optimizavimo modelis, kurį pritaikius, gautos galutinės optimalios sudėties ME (OPT-ME) (3.2.2 lentelė) ir žymiai sumažintas eksperimentų skaičius.

3.3. Optimalios sudėties mikroemulsijų kokybės vertinimas

3.3.1. Optimalios sudėties mikroemulsijų termodinaminio stabilumo ir fizikinių-cheminių savybių vertinimas

Sumodeliuotų optimalios sudėties mikroemulsijų (OPT-ME) kokybę vertinta pagal pagrindinius ME kokybės vertinimo rodiklius: termodinaminį stabilumą, vidutinį dalelių dydį (VDD), polidispersiškumo indeksą (PDI), pH reikšmę, elektrinį laidį ir klampą. 3.3.1.1 lentelėje pateiktos nustatytos OPT-ME fizikinių-cheminių savybių reikšmės.

3.3.1.1 lentelė. *Optimalios sudėties mikroemulsijų fizikinės-cheminės savybės*

ME	VDD, nm	PDI	pH reikšmė	Elektrinis laidis, $\mu\text{S}/\text{cm}$	Klampa, $\text{mPa}\cdot\text{s}$
OPT-ME 5:1	$68,54 \pm 1,18$	$0,288 \pm 0,008$	$7,01 \pm 0,06$	$95,55 \pm 0,07$	$62,80 \pm 0,14$
OPT-ME 6:1	$66,08 \pm 0,16$	$0,275 \pm 0,004$	$7,15 \pm 0,04$	$84,45 \pm 0,07$	$53,95 \pm 0,92$
OPT-ME 7:1	$66,66 \pm 0,56$	$0,274 \pm 0,002$	$7,11 \pm 0,01$	$74,45 \pm 0,07$	$54,35 \pm 1,77$

OPT-ME stabilumas įvertintas atlikus centrifugavimą 3500 aps/min greičiu, 30 min. Vizualiai vertinant sistemas, jos išliko skaidrios, nenustatyta išsisluoksniavimo, drumstumo ar nuosėdų susidarymo.

Termodinaminio stabilumo vertinimas OPT-ME atliktas taikant šildymo-šaldymo bei užšaldymo-atšildymo ciklus. Pagamintos sistemos buvo įvertintos vizualiai po šildymo ir šaldymo bei užšaldymo ir atšildymo etapų. Viso tyrimo metu OPT-ME išliko skaidrios, nebuvo nustatyta fazių atsiskyrimo, susidrumstimo ar nuosėdų susidarymo. Vertinant gautus tyrimų rezultatus, galima teigti, kad sumodeliuotos OPT-ME yra termodinamiškai stabilios, todėl nuspręsta atlikti išsamų jų fizikinių-cheminių savybių tyrimą.

OPT-ME VDD, kai S/KoS santykis 5:1, 6:1 ir 7:1, praktiškai nesisykrė (3.3.1.1 lentelė). Nustatytas VDD yra mažesnis nei 200 nm, todėl pagamintos dispersinės sistemos priskiriamos mikroemulsijoms pagal keliamus dalelių dydžio reikalavimus [134]. Statistiškai reikšmingos VDD priklausomybės nuo S/KoS santykio nenustatyta ($p > 0,05$), todėl galima teigti, kad S:KoS santykis OPT-ME dalelių dydžiui įtakos neturėjo.

Įvertintas OPT-ME PDI, kuris parodo sumodeliuotos sistemos homogeniškumą [23] ir stabilumą [120]. Kai PDI reikšmė yra intervale nuo 0,01 iki 0,5, laikoma, kad ME dalelės pasiskirsčiusios siaurame dydžių intervale [86], o pagaminta sistema vertinama kaip homogeniška. Didesnė nei 0,5 PDI reikšmė rodo sistemos heterogeniškumą [23]. Pagamintų OPT-ME PDI

buvo nuo 0,274 iki 0,288 ir tai patvirtina šių sistemų homogeniškumą ir stabilumą (3.3.1.1 lentelė).

Elektrinio laidžio matavimai atlikti siekiant patvirtinti pagamintų OPT-ME tipą. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad A/V tipo ME elektrinis laidis yra artimas $100 \mu\text{S}/\text{cm}$ [18, 115, 134]. Tyrimo metu nustatyta, kad pagamintų OPT-ME elektrinis laidis yra didesnis nei $74,45 \mu\text{S}/\text{cm}$, todėl patvirtinama, kad jos yra A/V tipo.

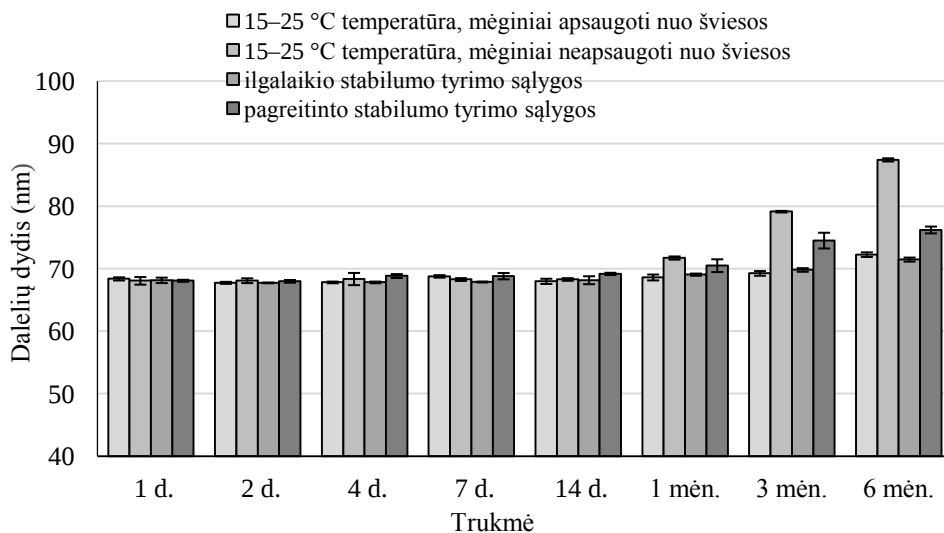
Matuojant OPT-ME pH reikšmes, nustatyta, kad jos buvo ribose nuo 7,01 iki 7,15. Moksliniai tyrimai nurodo, kad žmogaus odos paviršiaus pH reikšmė yra intervale nuo 4 iki 6, o gyvojo epidermio pH reikšmė 5–7, todėl šios ME yra laikomos tinkamomis naudoti ant odos [6, 107].

Nustatyta OPT-ME dinaminė klampa buvo intervale nuo $53,95 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ iki $62,80 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Tyrimo rezultatai rodo, kad didėjant kosurfaktanto kiekiui OPT-ME, dinaminė klampa padidėja. Didžiausia dinaminė klampa nustatyta, kai S/KoS santykis yra 5:1. Statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta ($p > 0,05$) tarp OPT-ME dinaminių klampų ir ME esančio S/KoS santykio, kai S/KoS buvo 6:1 ir 7:1 dėl panašaus kosurfaktanto kiekio šiose ME. Gauti tyrimo rezultatai patvirtino moksliniuose šaltiniuose skelbiamus duomenis, kad A/V tipo ME būdinga sąlyginai maža dinaminė klampa [115, 134].

Atlikus pagamintų OPT-ME kokybės vertinimą, nustatyta, kad sumodeliuotos A/V tipo mikroemulsinės sistemos pasižymėjo termodinaminiu stabilumu ir atitiko ME keliamus reikalavimus. Tyrimo rezultatai patvirtino pagamintų OPT-ME kokybę, todėl kitame etape būtina atlikti jų stabilumo tyrimus.

3.3.2. Optimalios sudėties mikroemulsijų stabilumo tyrimas

Siekiant įvertinti laikymo sąlygų įtaką OPT-ME kokybei, atlikti jų stabilumo tyrimai. OPT-ME stabilumas vertintas esant skirtingoms laikymo sąlygoms. Pasirinkti OPT-ME stabilumo vertinimo kriterijai: a) VDD ir PDI, kurių pokyčiai leidžia numatyti galimus ME struktūrinius pakitimus; b) spalva, skaidrumas, kurių pokyčiai leidžia įvertinti atsiradusį ME nestabilumą. OPT-ME su skirtingu S/KoS santykiu VDD pokyčiai pateikti 3.3.2.1–3.3.2.3 paveiksluose.



3.3.2.1 pav. *Optimalios sudėties mikroemulsijų (S/KoS 5:1) dalelių dydis stabilumo tyrimo metu*

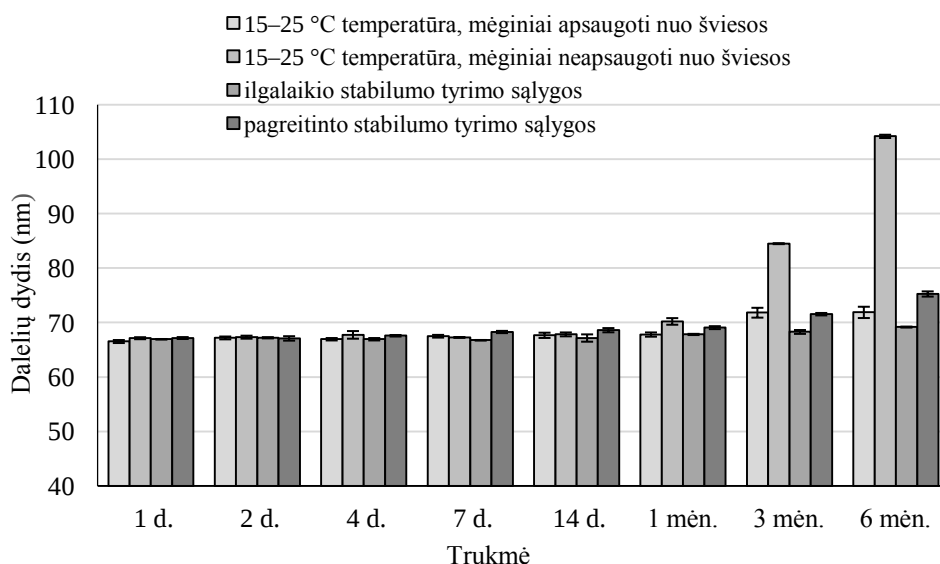
Atlikus stabilumo tyrimą OPT-ME 5:1 (3.3.2.1 pav.), nustatyta, kad mėginius laikant kambario (15–25 °C) temperatūroje apsaugotus nuo šviesos, VDD per 3 mėnesius pakito nežymiai (1,3 proc.). Didesnis VDD pokytis (5,7 proc.) nustatytas po 6 mėnesių. Stabilumo tyrimo metu PDI mažėjo nuo $0,290 \pm 0,001$ iki $0,278 \pm 0,004$ atitinkamai po 1 dienos ir po 6 mėnesių. Vertinant OPT-ME vizualiai, nenustatyta skaidrumo ar spalvos pokyčių.

Didžiausias VDD pokytis nustatytas laikant OPT-ME 5:1 kambario temperatūroje (15–25 °C) neapsaugotus nuo šviesos (3.3.2.1 pav.). Stabilumo tyrimo metu VDD po 1, 3 ir 6 mėnesių atitinkamai padidėjo 5,4 proc., 16,3 proc., 28,4 proc. PDI mažėjo nuo $0,284 \pm 0,006$ iki $0,251 \pm 0,005$ vertinant rezultatus atitinkamai po 1 dienos ir po 6 mėnesių. OPT-ME išliko skaidrios, tačiau po 3 mėnesių nustatyta, kad mėginių spalva pakito nuo gelsvos iki bespalvės.

Nežymūs VDD pokyčiai nustatyti atlikus ilgalaikį OPT-ME 5:1 stabilumo vertinimą (3.3.2.1 pav.). Ilgalaikio stabilumo tyrimo metu VDD po 1 mėnesio padidėjo 1,3 proc., po 3 mėnesių – 2,4 proc., o po 6 mėnesių – 4,9 proc. PDI statistiškai reikšmingai ($p > 0,05$) nepakito: po 1 dienos nustatytas PDI buvo $0,275 \pm 0,002$, po 6 mėnesių – $0,279 \pm 0,006$. OPT-ME skaidrumo ar spalvos pokyčių nenustatyta viso ilgalaikio stabilumo tyrimo metu.

OPT-ME 5:1 pagreitinto stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad nežymūs VDD pokyčiai pastebimi po 14 dienų: VDD padidėjo 1,6 proc. (3.3.2.1 pav.). Didesni VDD pokyčiai nustatyti po 1, 3 ir 6 mėnesių: VDD atitinkamai padidėjo 3,6 proc., 9,4 proc., 11,9 proc. PDI pagreitinto stabilumo tyrimo metu sumažėjo nuo $0,287 \pm 0,006$ (po 1 dienos) iki $0,266 \pm 0,008$ (po 6 mėnesių). Vertinant OPT-ME vizualiai – pokyčių nenustatyta.

OPT-ME S/KoS santykiu 6:1 VDD pokyčiai skirtingu stabilumo tyrimo momentu pavaizduoti 3.3.2.2 paveiksle.



3.3.2.2 pav. *Optimalios sudėties mikroemulsijų (S/KoS 6:1) dalelių dydis stabilumo tyrimo metu*

Stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad OPT-ME 6:1 VDD po 3 mėnesių pakito nežymiai (1,9 proc.) jas laikant kambario (15–25 °C) temperatūroje, mėginius apsaugojus nuo šviesos (3.3.2.2 pav.). Vertinant VDD rezultatus, gautus po 6 mėnesių stabilumo tyrimo, nustatytas 8,0 proc. VDD padidėjimas. Tyrimo pradžioje nustatytas PDI buvo $0,275 \pm 0,006$, o po 6 mėnesių sumažėjo iki $0,261 \pm 0,006$. OPT-ME spalva ir skaidrumas skirtingu stabilumo tyrimo metu nekito.

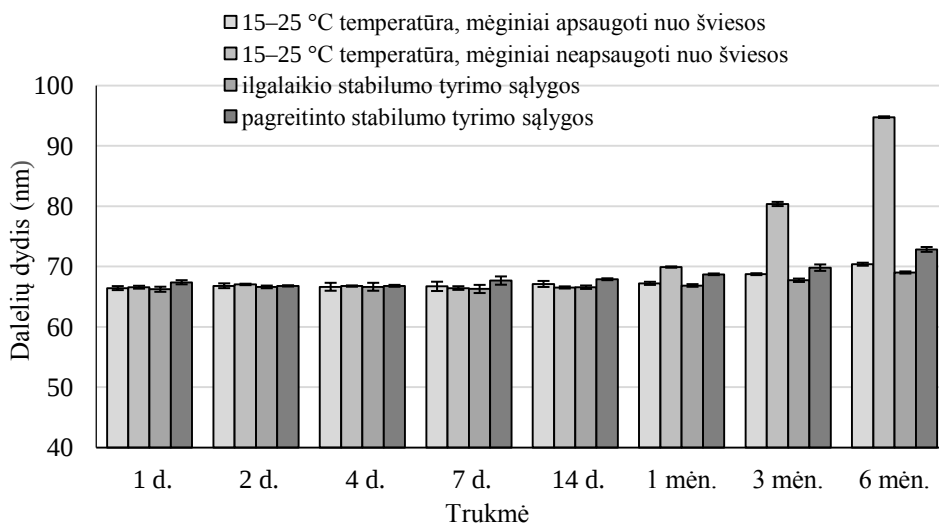
OPT-ME 6:1 VDD kitimui didžiausią įtaką turėjo šviesos poveikis (3.3.2.2 pav.). Tyrimo rezultatai parodė, kad VDD padidėjo 4,6 proc. ir 25,9 proc. atitinkamai po 1 ir 3 mėnesių. Didžiausias VDD pokytis nustatytas po 6 mėnesių stabilumo tyrimo: VDD padidėjo 55,2 proc. PDI sumažėjo nuo $0,269 \pm 0,004$ iki $0,212 \pm 0,009$ vertinant stabilumo tyrimo rezultatus atitin-

kamai po 1 dienos ir po 6 mėnesių. OPT-ME spalvos pokytis nustatytas po 3 mėnesių laikymo šviesoje.

Ilgalaikio stabilumo tyrimo eigoje (iki 6 mėnesių) nustatyti nežymūs OPT-ME 6:1 VDD pokyčiai (3.3.2.2 pav.). Tyrimo rezultatai parodė, kad VDD po 1 mėnesio padidėjo 1,3 proc., po 3 mėnesių – 2,0 proc., o po 6 mėnesių – 3,4 proc. Stabilumo tyrimo eigoje PDI sumažėjo nuo $PDI\ 0,277 \pm 0,002$ (po 1 dienos) iki $0,263 \pm 0,003$ (po 6 mėnesių). OPT-ME skaidrumo ar spalvos pokyčių nenustatyta viso ilgalaikio stabilumo tyrimo metu.

Pagreitinto stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad OPT-ME 6:1 nežymūs VDD pokyčiai pastebimi po 14 dienų: VDD padidėjo 2,1 proc. (3.3.2.2 pav.). Didesni VDD pokyčiai nustatyti po 1, 3 ir 6 mėnesių: VDD atitinkamai padidėjo 2,8 proc., 6,5 proc. ir 12,0 proc. Vertinant gautus pagreitinto stabilumo tyrimo rezultatus, nustatytas PDI sumažėjimas nuo $0,278 \pm 0,005$ (po 1 dienos) iki $0,263 \pm 0,002$ (po 6 mėnesių). OPT-ME skaidrumo ar spalvos pokyčių nenustatyta viso pagreitinto stabilumo tyrimo metu.

OPT-ME 7:1 VDD kitimas skirtingu stabilumo tyrimo momentu pavaizduotas 3.3.2.3 paveiksle.



3.3.2.3 pav. *Optimalios sudėties mikroemulsijų (S/KoS 7:1) dalelių dydis stabilumo tyrimo metu*

OPT-ME 7:1 VDD stabilumo tyrimo eigoje (iki 3 mėnesių) pakito nežymiai (1,2 proc.) mėginius laikant kambario (15–25 °C) temperatūroje apsaugotus nuo šviesos (3.4 pav.). Po 6 mėnesių stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad VDD padidėjo 6,0 proc. Tyrimo pradžioje nustatytas PDI buvo $0,271 \pm 0,002$, o po 6 mėnesių sumažėjo iki $0,263 \pm 0,004$. Vertinant OPT-ME vizualiai, jų skaidrumas ir spalva nekito viso stabilumo tyrimo metu.

Didžiausias OPT-ME 7:1 VDD kitimas nustatytas mėginius laikant kambario (15–25 °C) temperatūroje neapsaugotus nuo šviesos poveikio (3.3.2.3 pav.). Tyrimo rezultatai parodė, kad VDD padidėjo 5,0 proc. ir 20,7 proc. atitinkamai po 1 ir 3 mėnesių. Didžiausias VDD pokytis (42,3 proc.) nustatytas po 6 mėnesių stabilumo tyrimo. PDI sumažėjo nuo $0,269 \pm 0,004$ iki $0,212 \pm 0,009$ vertinant stabilumo tyrimo rezultatus atitinkamai po 1 dienos ir po 6 mėnesių. Vertinant OPT-ME vizualiai, po 3 mėnesių mėginių spalva pakito nuo gelsvos iki bespalvės.

Ilgalaikio stabilumo tyrimo eigoje (iki 6 mėnesių) nustatyti nežymūs OPT-ME 7:1 VDD pokyčiai (3.3.2.3 pav.). Tyrimo rezultatai parodė, kad po 1 mėnesio VDD padidėjo 0,95 proc., po 3 mėnesių – 2,3 proc., o po 6 mėnesių – 3,3 proc. Vertinant gautus rezultatus, nustatyta, kad PDI stabilumo tyrimo eigoje sumažėjo nuo $0,272 \pm 0,001$ iki $0,264 \pm 0,007$. OPT-ME skaidrumo ar spalvos pokyčių nenustatyta viso ilgalaikio stabilumo tyrimo metu.

Pagreitinto stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad po 14 dienų pastebėti nežymūs (1,9 proc.) OPT-ME 7:1 VDD pokyčiai (3.3.2.3 pav.). Didesnis VDD padidėjimas (3,1 proc., 4,7 proc. ir 9,3 proc.) nustatytas atitinkamai po 1, 3 ir 6 mėnesių. Pagreitinto stabilumo tyrimo eigoje PDI sumažėjo nuo $0,276 \pm 0,007$ (po 1 dienos) iki $0,257 \pm 0,010$ (po 6 mėnesių). Vertinant OPT-ME vizualiai, jų skaidrumas ir spalva nekito viso pagreitinto stabilumo tyrimo metu.

Apibendrinus stabilumo tyrimo rezultatus, galima teigti, kad laikymo sąlygos turi įtakos OPT-ME kokybei. Mokslinių tyrimų duomenimis sumodeliuotos ME išlieka stabilios viso ilgalaikio stabilumo tyrimo metu [69]. Vertinant ilgalaikio stabilumo ir mėginių laikymo apsaugojus nuo šviesos tyrimų rezultatus, nenustatyta VDD kitimo tendencijų, todėl galima teigti, kad tyrimo eigoje (iki 6 mėnesių) visos OPT-ME (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) išliko stabilios. Tyrimo rezultatai parodė, kad aukštesnė temperatūra ir šviesos poveikis daro reikšmingą įtaką OPT-ME VDD pokyčiams. Nustatyta OPT-ME VDD didėjimo tendencija, kai mėginiai buvo laikomi pagreitinto stabilumo tyrimo sąlygomis ir šviesos poveikyje. Šie rezultatai gali būti siejami su ME formuojančių pagalbinių medžiagų pokyčiais, atsiradusiais veikiant išoriniams stresiniams veiksniams. Esant aukštesnei temperatūrai ar šviesai, pagamintos sistemos gali būti destabilizuojamos dėl jose vykstančių ME formuojančių komponentų kitimo ir tai gali turėti įtakos OPT-ME VDD padidėjimui. Būtina pažymėti, kad mažiausias VDD pokytis nustatytas OPT-ME 5:1, kai mėginiai buvo laikomi šviesos poveikyje. Šie rezultatai parodo, kad OPT-ME, kurių sudėtyje yra didesnis kosurfaktanto kiekis, ilgiau išlieka stabilios.

Stabilumo tyrimo eigoje nustatytos OPT-ME (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) PDI mažėjimo tendencijos. Vertinant gautus tyrimo rezultatus, reikia pažymėti, kad didžiausias PDI sumažėjimas buvo stebimas tose OPT-ME, kurios buvo veikiamos šviesa. Dėl galimo ME formuojančių komponentų nestabilumo šviesos poveikui OPT-ME vyksta dalelių dydžio fracinės sudėties pokyčiai, tačiau sumodeliuotos sistemos stabilumo tyrimo eigoje vis tiek išliko homogeniškos.

Vertinant gautus stabilumo tyrimo rezultatus, nustatytos tinkamiausios OPT-ME laikymo sąlygos, kurios neturėjo įtakos mėginių kokybei. Todėl atliekant tolimesnius tyrimus, nuspręsta visus mėginius laikyti sandarioje, šviesai nelaidžioje pakuotėje.

3.4. Mikroemulsijų su resveratroliu kokybės vertinimas

3.4.1. Resveratrolio įtaka optimalios sudėties mikroemulsijų fizikinėms-cheminėms savybėms

Ankstesnių tyrimų metu sumodeliuotos stabilios OPT-ME buvo pritaikytos modelinės veikliosios medžiagos resveratrolio įterpimui. Resveratrolis pasirinktas atsižvelgiant į šio junginio fizikines-chemines savybes, nuo kurių priklauso resveratrolio skvarba į skirtingus odos sluoksnius ir sukeltas terapinis poveikis. Resveratrolis pasižymi santykinai stipriomis hidrofobinėmis savybėmis ($\log P = 3,1$) ir santykinai maža molekuline mase ($M = 228,24$ Da) [8, 143]. Dėl prasto resveratrolio tirpumo hidrofilinėje fazėje tikslinga gaminant ME, resveratrolį tirpinti kituose komponentuose. Pagal gautus resveratrolio tirpumo rezultatus, pateiktus 3.1.1 lentelėje (žr. 3.1 skyrelyje *Resveratrolio tirpumas aliejuose ir surfaktante*), nuspręsta formuluojant ME su resveratroliu (ME-RES), jį tirpinti etilo oleate ir kaprilokaproilo makrogol-8 gliceride. Pasirinkus šį resveratrolio įterpimo būdą, sumažinamas galimas resveratrolio persiskirstymas tarp skirtingų ME formuojančių fazių ir užtikrinamas resveratrolio buvimas aliejaus lašelyje (pagal tirpumą resveratrolis ME pasiskirstęs lipofilinėje fazėje ir surfaktante). ME-RES gamybai buvo naudojama tokia pati gamybos technologija kaip ir OPT-ME.

Kitame tyrimų etape buvo vykdoma resveratrolio koncentracijos ME paieška – nustatomi maksimalūs resveratrolio kiekiai, kuriuos galima įterpti į OPT-ME. Atsižvelgiant į veikliosios medžiagos tirpumą bei paskelbtus tyrimų duomenis [39, 68, 150], nuspręsta gaminti 1 proc., 2 proc., 3 proc. ir 4 proc. resveratrolio ME (ME-RES). Resveratrolis buvo įterptas į OPT-ME su skirtingais S/KoS santykiais: 5:1 (ME-RES 5:1), 6:1 (ME-RES 6:1), 7:1 (ME-RES 7:1). Sumodeliuota 12 skirtingų ME-RES sudėčių.

Vertinant sumodeliuotas ME-RES vizualiai, nustatyta, jog įterpus 1 proc., 2 proc. ir 3 proc. resveratrolio, pagamintos sistemos išliko skaidrios. Į OPT-ME įterpus 4 proc. resveratrolio, po 24 valandų ekvibracijos nustatytas pagamintų sistemų drumstumas nepriklausomai nuo pasirinkto S/KoS santykio. Gauti tyrimo rezultatai patvirtino teorinius skaičiavimus, kuriais apskaičiuotas maksimalus įterpiamas resveratrolio kiekis buvo 3,9–4,1 proc. priklausomai nuo S/KoS santykio. Tyrimo rezultatai parodė, kad pavyko į OPT-ME įterpti 4 proc. resveratrolio, tačiau sumodeliuotos ME-RES buvo nestabilios. Atsižvelgiant į gautus rezultatus, nuspręsta tolimesnių tyrimų su 4 proc. ME-RES nevykdyti.

Sumodeliuotų 1 proc., 2 proc. ir 3 proc. ME-RES stabilumas įvertintas atlikus centrifugavimą ir termodinaminio stabilumo tyrimus. Gauti rezultatai parodė, kad ME-RES išliko skaidrios, nenustatyta fazių atsiskyrimo, susidrumstimo ar nuosėdų susidarymo. Vertinant gautus rezultatus, buvo patvirtintas ME-RES termodinaminis stabilumas, todėl nuspręsta išsamiam ME-RES kokybės vertinimui atlikti fizikinių-cheminių savybių nustatymą.

ME-RES kokybei įvertinti atlikti VDD, PDI, pH reikšmės, elektrinio laidžio ir klampos matavimai (3.4.1.1 lentelė).

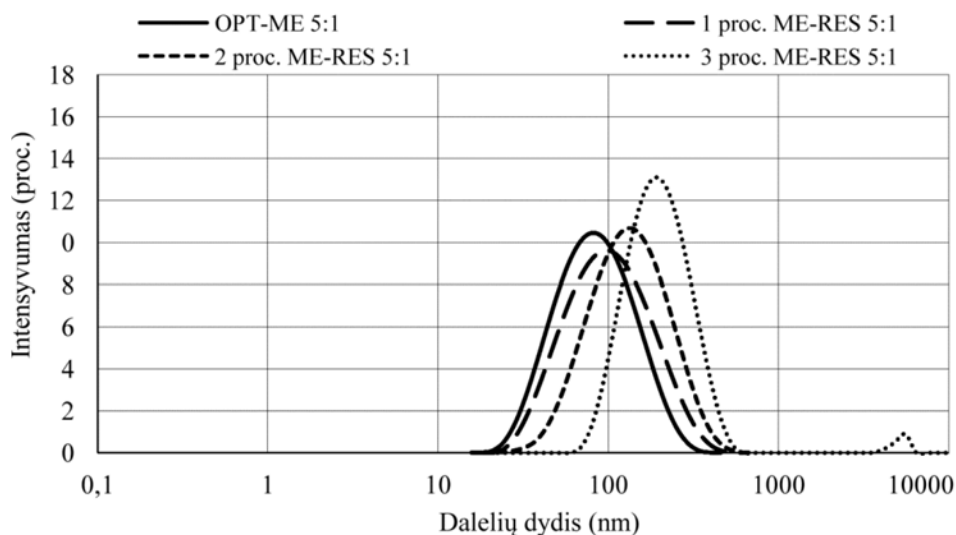
3.4.1.1 lentelė. Mikroemulsijų su resveratroliu fizikinės-cheminės savybės

RES kiekis	ME	VDD, nm	PDI	pH reikšmė	Elektrinis laidis, $\mu\text{S}/\text{cm}$	Klampa, mPa·s
1 proc.	ME-RES 5:1	$80,80 \pm 0,82$	$0,274 \pm 0,004$	$7,16 \pm 0,01$	$96,60 \pm 0,09$	$63,90 \pm 0,89$
	ME-RES 6:1	$80,76 \pm 0,55$	$0,273 \pm 0,007$	$7,15 \pm 0,02$	$85,00 \pm 0,21$	$60,80 \pm 0,45$
	ME-RES 7:1	$79,91 \pm 0,35$	$0,271 \pm 0,005$	$7,18 \pm 0,01$	$74,40 \pm 0,13$	$54,60 \pm 0,69$
2 proc.	ME-RES 5:1	$112,24 \pm 1,98$	$0,259 \pm 0,004$	$6,95 \pm 0,01$	$93,50 \pm 0,14$	$67,30 \pm 1,27$
	ME-RES 6:1	$105,60 \pm 0,30$	$0,265 \pm 0,004$	$6,94 \pm 0,01$	$83,85 \pm 0,35$	$61,65 \pm 1,48$
	ME-RES 7:1	$106,51 \pm 0,68$	$0,269 \pm 0,006$	$6,96 \pm 0,01$	$72,95 \pm 0,07$	$59,35 \pm 1,48$
3 proc.	ME-RES 5:1	$173,70 \pm 0,96$	$0,257 \pm 0,007$	$6,73 \pm 0,02$	$101,2 \pm 0,10$	$79,13 \pm 0,46$
	ME-RES 6:1	$162,90 \pm 0,97$	$0,227 \pm 0,011$	$6,64 \pm 0,04$	$90,83 \pm 0,06$	$68,07 \pm 0,85$
	ME-RES 7:1	$156,20 \pm 1,31$	$0,246 \pm 0,009$	$6,47 \pm 0,02$	$81,53 \pm 0,15$	$65,57 \pm 0,65$

Tyrimo rezultatai parodė, kad resveratrolio įterpimas į OPT-ME daro reikšmingą įtaką VDD. Įterpus veikliąją medžiagą į mikroemulsinę sistemą,

dalelių dydis padidėja atitinkamai nuo pridėto resveratrolio kiekio (3.4.1.1 lentelė). 1 proc. ME-RES VDD, lyginant su OPT-ME VDD, padidėjo 17,9 proc. (S/KoS 5:1), 22,2 proc. (S/KoS 6:1) ir 19,9 proc. (S/KoS 7:1). 2 proc. ME-RES VDD, lyginant su OPT-ME, padidėjo 63,8 proc. (S/KoS 5:1), 59,8 proc. (S/KoS 6:1) ir 59,8 proc. (S/KoS 7:1). 3 proc. ME-RES VDD, lyginant su OPT-ME, padidėjo 153,4 proc. (S/KoS 5:1), 146,5 proc. (S/KoS 6:1) ir 134,3 proc. (S/KoS 7:1). Atlikus statistinę duomenų analizę, nustatyta statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) stipri tiesioginė koreliacija ($r = 0,844$) tarp įterpiamo resveratrolio kiekio ir VDD. Tyrimo rezultatai parodė, kad didėjant resveratrolio koncentracijai, didėja ME VDD. Šie pokyčiai gali būti siejami su dideliu įterpiamo resveratrolio kiekiu, kuris pasiskirsto tarp surfaktanto ir kosurfaktanto molekulių, formuojančių ME dalelių tarpfazinį paviršių [28, 44, 134]. Panašus poveikis dalelių dydžio padidėjimui yra aprašytas mokslinėse publikacijose, kai veiklioji medžiaga įterpiama į dispersines sistemas, pavyzdžiui, mikroemulsijas [134], liposomas [132], nanosuspensijas [54]. Nepriklausomai nuo įterpiamo resveratrolio kiekio, nustatytas padidėjęs VDD yra mažesnis nei 200 nm, todėl pagamintos ME-RES atitinka ME keliamus dalelių dydžio reikalavimus [134].

Dalelių dydžio pasiskirstymo pagal intensyvumą diagramos ir PDI nustatymas leidžia tiksliau įvertinti sumodeliuotų ME dalelių dydžio pasiskirstymo intervalą bei jų išbarstymo plotį. Dalelių dydžio pasiskirstymo pagal intensyvumą smailės, esant skirtingiems S/KoS santykiams, pavaizduotos 3.4.1.1–3.4.1.3 paveiksluose.

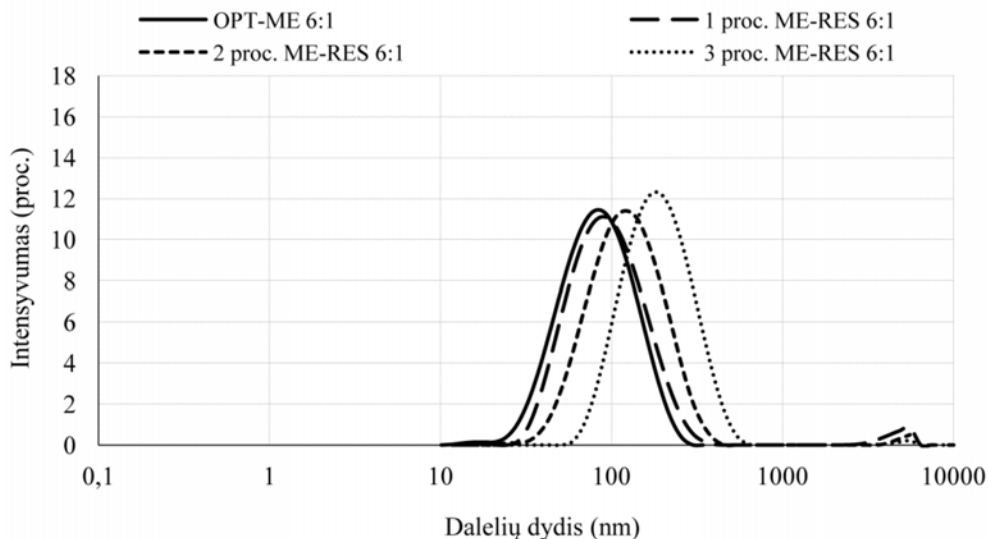


3.4.1.1 pav. Skirtingų resveratrolio koncentracijų įtaka optimalios sudėties mikroemulsijų S/KoS 5:1 dalelių dydžiui

Vertinant tyrimo metu gautas dalelių dydžių pasiskirstymo pagal intensyvumą smailes (3.4.1.1 pav.), nustatyta, kad OPT-ME 5:1 dalelių dydis varijavo nuo 21,04 nm iki 342,0 nm. Įterpus 1 proc. resveratrolio, dalelių dydžio intervalas kito nežymiai (24,36–458,67 nm). Lyginant 2 proc. RES-ME 5:1 ir OPT-ME 5:1 dalelių dydžio pasiskirstymo pagal intensyvumą smailes, nustatytas RES-ME 5:1 didesnio skersmens dalelių atsiradimas (28,21–531,17 nm). Didžiausias dalelių dydžio pokytis, lyginant su OPT-ME 5:1, nustatytas 3 proc. ME-RES 5:1 (3.4.1.1 pav.). Tyrimo rezultatai parodė 3 proc. ME-RES smailės poslinkį link didesnio skersmens dalelių (68,06–531,17 nm) ir antros smailės atsiradimą (4145,44–5559,64 nm). Papildomas smailės buvimas rodo ypač didelių dalelių frakcijos atsiradimą.

Tyrimo rezultatai parodė, kad didėjant resveratrolio koncentracijai OPT-ME, sistemų PDI mažėja (3.4.1.1 lentelė). 3.4.1.1 paveiksle matomas 1 proc. ir 2 proc. RES-ME 5:1 panašus smailių plotis lyginant su OPT-ME 5:1, tačiau 3 proc. ME-RES 5:1 pagrindinė smailė yra aukštesnė, o jos plotis – siauresnis. Vertinant gautus tyrimo rezultatus, galima daryti išvadą, kad įterpiant resveratrolių į OPT-ME 5:1, vyksta sistemos dinaminiai persitvarkymai, tačiau susiformavusios ME-RES 5:1 išlieka homogeniškos.

Dalelių dydžio pasiskirstymo pokyčiai nustatyti įterpus resveratrolių į OPT-ME 6:1 (3.4.1.2 pav.).



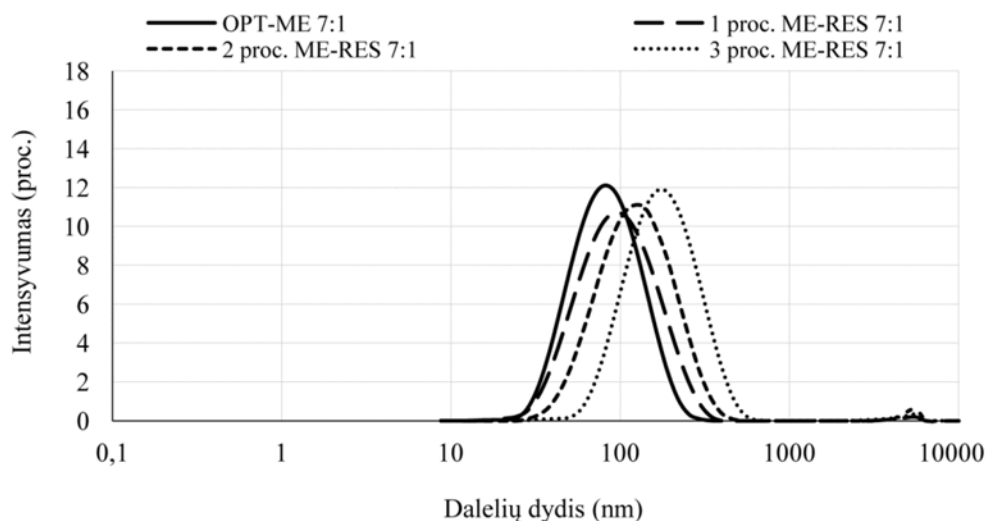
3.4.1.2 pav. Skirtingų resveratrolio koncentracijų įtaka optimalios sudėties mikroemulsijų S/KoS 6:1 dalelių dydžiui

Tyrimo rezultatai parodė, kad OPT-ME 6:1 dalelių dydis varijavo nuo 15,69 nm iki 255,0 nm. Įterpus 1 proc., 2 proc. ir 3 proc. resveratrolio, nustatyti dalelių dydžio pasiskirstymo tarp frakcijų pokyčiai. 3.4.1.2 paveiksle matomas antros smailės atsiradimas ir pagrindinės smailės poslinkis į didesnių dalelių pusę. Dalelių dydžių pasiskirstymo pagal intensyvumą smailės parodo, kad 1 proc. ME-RES 6:1 (28,21–342,0 nm) ir 2 proc. ME-RES 6:1 (24,36–396,06 nm) pirmų smailių dalelių dydžio intervalas yra panašus. Didžiausias dalelių dydžio pokytis, lyginant su OPT-ME 6:1, nustatytas įterpus 3 proc. resveratrolio (3.4.1.2 pav.). Pagrindinė 3 proc. ME-RES 6:1 smailė pasislinkusi link didesnio skersmens dalelių (58,77–615,14 nm). Antra smailė (4145,44–5559,64 nm) išliko būdinga visoms ME-RES 6:1 nepriklausomai nuo jose esančio resveratrolio kiekio.

Vertinant gautus tyrimo rezultatus, nustatyta, kad didėjant resveratrolio koncentracijai OPT-ME 6:1, sistemų PDI mažėja (3.4.1.1 lentelė). 3.4.1.2 paveiksle pateiktuose grafikuose matyti, kad OPT-ME 6:1 ir 1 proc. ME-RES 6:1 dalelių dydžio pasiskirstymo smailės labai panašios. Nors vykstant sistemos dinaminiais persitvarkymams 1 proc. ME-RES 6:1 VDD padidėjo, tačiau dominuojančios dalelių dydžio frakcijos išliko tos pačios. Šiuos rezultatus patvirtina OPT-ME 6:1 ir 1 proc. ME-RES 6:1 PDI matavimai, kurie tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė ($0,275 \pm 0,004$ ir $0,273 \pm 0,007$). 2 proc. ir 3 proc. ME-RES 6:1 VDD padidėjo, tačiau PDI sumažėjo (3.4.1.1 lentelė). Vertinant ME dalelių dydžio pasiskirstymo pagal išsklaidytos šviesos intensyvumą smailės ir PDI matavimo rezultatus, galima daryti išvadą, kad į OPT-ME 6:1 įterpiamas resveratrolio kiekis daro įtaką modeliui dinaminiam pokyčiams, tačiau ME-RES 6:1 galima vertinti kaip stabilias ir homogeniškas sistemas.

Panašūs dalelių dydžio pasiskirstymo pokyčiai nustatyti ME-RES 7:1 (3.4.1.3 pav.).

Vertinant ME dalelių dydžio pasiskirstymo pagal išsklaidytos šviesos intensyvumą smailės, nustatyta, kad OPT-ME 7:1 dalelių dydis varijavo nuo 24,36 nm iki 295,31 nm. Į OPT-ME 7:1 įterpus 1 proc., 2 proc. ir 3 proc. resveratrolio, dalelių dydžio pasiskirstymo pagal intensyvumą smailių tendencijos išliko panašios į ME-RES 6:1. Dalelių dydžio pasiskirstymo rezultatai rodo, kad 1 proc. ME-RES 7:1 (21,04–342,0 nm), 2 proc. ME-RES 7:1 (28,21–458,67 nm) ir 3 proc. ME-RES 7:1 (32,67–615,14 nm) pagrindinė smailė yra pasislinkusi į didesnių dalelių pusę, o antros smailės (4145,44–5559,64 nm) atsiradimas buvo būdingas visoms ME-RES 7:1 nepriklausomai nuo resveratrolio koncentracijos (3.4.1.3 pav.).



3.4.1.3 pav. Skirtingų resveratrolio koncentracijų įtaka optimalios sudėties mikroemulsijų S/KoS 7:1 dalelių dydžiui

Vertinant gautus tyrimo rezultatus, nustatyta, kad didėjant resveratrolio koncentracijai OPT-ME 7:1, sistemų PDI mažėja (3.4.1.1 lentelė). 3.4.1.3 paveiksle pateiktuose grafikuose matyti, kad vykstant sistemos dinaminiam persitvarkymams, 1 proc. ME-RES 7:1 VDD padidėjo, tačiau dominuojančios dalelių dydžio frakcijos, lyginant su OPT-ME 7:1, išliko tos pačios. Šiuos rezultatus patvirtina OPT-ME 7:1 ir 1 proc. ME-RES PDI matavimai, kurie tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė ($0,274 \pm 0,002$ ir $0,271 \pm 0,005$). 2 proc. ir 3 proc. ME-RES 7:1 VDD padidėjo, tačiau PDI sumažėjo (3.4.1.1 lentelė). Vertinant ME dalelių dydžio pasiskirstymo pagal išsklaidytos šviesos intensyvumą smailes ir PDI matavimo rezultatus, galima daryti išvadą, kad įterpiant resveratrolių į OPT-ME 7:1, vyksta sistemos dinaminiai persitvarkymai, tačiau susiformavusios ME-RES 7:1 išlieka homogeniškos ir stabilios.

Tolimesniam ME kokybės vertinimui atliktas ME tipą patvirtinantis testas. Vertinta galima resveratrolio įtaka OPT-ME tipo pokyčiams. Elektrinio laidžio matavimo rezultatai parodė, kad įterpiant resveratrolių į OPT-ME, elektrinis laidis pakito nežymiai (3.3.1.1 lentelė, 3.4.1.1 lentelė). Atlikus statistinę duomenų analizę, nustatyta statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) atvirkštinė koreliacija ($r = -0,946$) tarp elektrinio laidžio ir ME-RES S/KoS santykio bei tiesioginė koreliacija ($r = 0,949$) tarp elektrinio laidžio ir hidrofilinės fazės kiekio. Tyrimo rezultatai parodė, kad didėjant S/KoS santykiui ir mažėjant hidrofilinės fazės kiekiui, ME-RES elektrinis laidis mažėja. Nepriklausomai nuo įvykusių pokyčių, nustatytas ME-RES elektrinis laidis buvo

artimas $100 \mu\text{S}/\text{cm}$, todėl sumodeliuotų ME-RES A/V tipas išliko nepakitęs [18, 115, 134].

Nustatytos ME-RES pH reikšmės buvo ribose 6,47–7,18 (3.4.1.1 lentelė). Statistinė duomenų analizė parodė, kad resveratolio koncentracija turi įtakos ME-RES pH reikšmei ($p < 0,05$). Nustatyta atvirkštinė koreliacija ($r = -0,789$) tarp pH reikšmės ir resveratolio kiekio ME – didėjant resveratolio koncentracijai ME-RES, suformuluotų sistemų pH reikšmė mažėja. Vertinant gautus tyrimo rezultatus ir mokslinių tyrimų duomenis, nustatyta, kad visos sumodeliuotos ME-RES yra tinkamos naudoti ant odos [6, 107].

ME-RES kokybės tyrimo metu įvertinta resveratolio koncentracijos įtaka OPT-ME dinaminės klamos pokyčiams. Nustatyta, kad ME-RES dinaminė klampa varijavo nuo $54,6 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ iki $79,13 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ (3.4.1.1 lentelė). Statistinė duomenų analizė parodė statistiškai reikšmingą ($p < 0,05$) vidutinio stiprumo tiesioginę koreliaciją ($r = 0,595$) tarp ME-RES dinaminės klamos ir resveratolio koncentracijos. Tyrimo rezultatai parodė, kad didėjant resveratolio kiekiui ME-RES, dinaminė klampa didėja (3.4.1.1 lentelė). Vertinant ME S/KoS santykio įtaką dinaminei klampai, nustatyta statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) atvirkštinė koreliacija ($r = -0,701$), kuri parodė, kad didėjant S/KoS santykiui, ME-RES klampa mažėja. Šie pokyčiai gali būti siejami su didesniu kosurfaktanto kiekiu ME-RES, kurių S/KoS santykis 5:1. Gauti tyrimo rezultatai parodė, kad resveratolis turėjo įtakos ME dinaminei klampai ją padidindamas, tačiau išliko A/V tipo ME-RES būdinga sąlyginai maža dinaminė klampa [115, 134].

Atlikus pagamintų ME-RES kokybės vertinimą, nustatyta, kad resveratolio įterpimas į OPT-ME turėjo įtakos jų fizikinių-cheminių savybių pokyčiams. Tyrimo rezultatai patvirtino pagamintų ME-RES kokybę, tačiau dėl vykstančių dalelių dydžio pasiskirstymo pokyčių tikslinga atlikti tolimesnius jų stabilumo tyrimus esant skirtingoms laikymo sąlygoms.

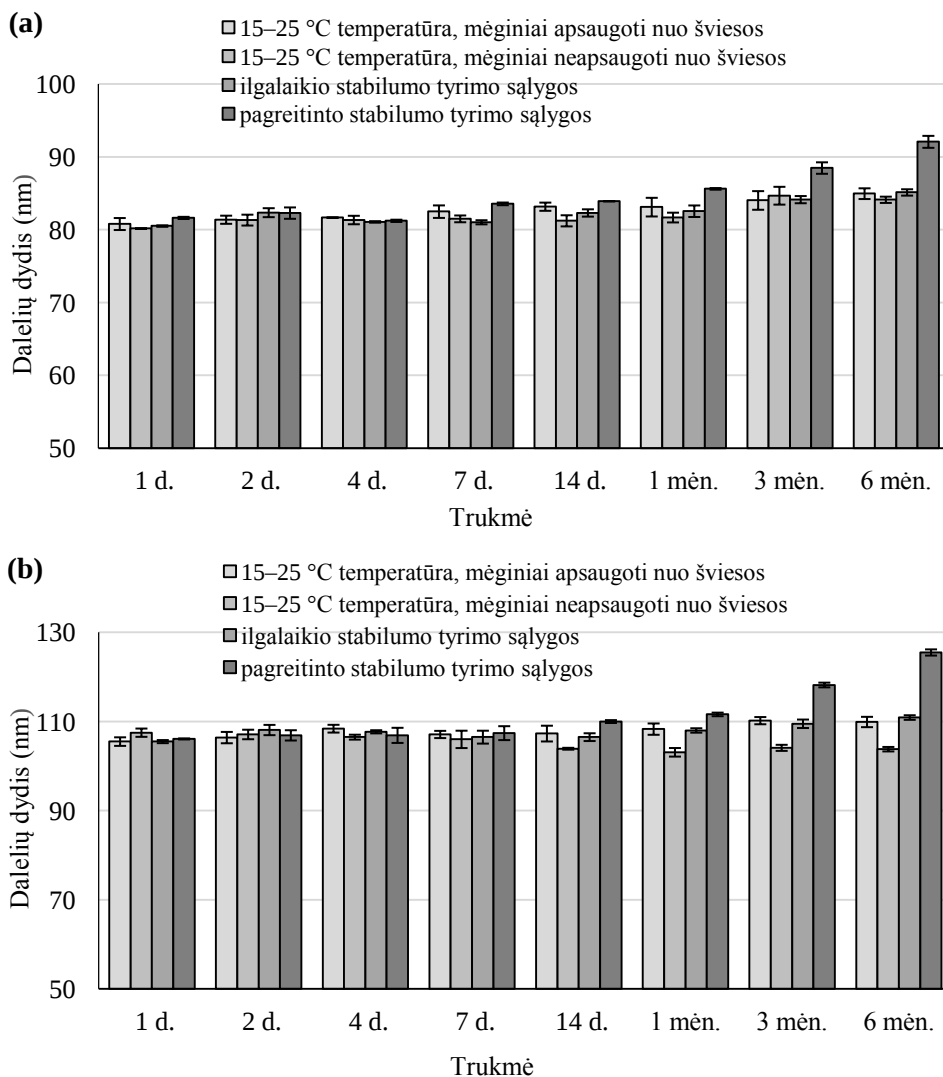
3.4.2. Mikroemulsijų su resveratroliu stabilumo tyrimas

3.4.2.1. Mikroemulsijų su resveratroliu stabilumo tyrimas vertinant dalelių dydį ir polidispersiškumo indeksą

Siekiant įvertinti skirtingų laikymo sąlygų įtaką sumodeliuotų ME-RES kokybei, atlikti jų stabilumo tyrimai. ME-RES stabilumas vertintas tokiais pačiomis laikymo sąlygomis kaip ir OPT-ME. Pasirinkti ME-RES stabilumo vertinimo kriterijai: a) vidutinis dalelių dydis ir polidispersiškumo indeksas, kurių pokyčiai leidžia numatyti galimus mikroemulsijų struktūrinius pakitimus; b) spalva, skaidrumas, kurių pokyčiai leidžia įvertinti galimą mikroemulsijų nestabilumą. ME-RES su skirtingu S/KoS santykiu VDD pokyčiai pateikti 3.4.2.1.1–3.4.2.1.3 paveiksluose.

Atlikus stabilumo tyrimą 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 5:1 (3.4.2.1.1 pav., a, b), nustatyta, kad mėginius laikant kambario (15–25 °C) temperatūroje apsaugotus nuo šviesos, per 1 mėnesio laikotarpį VDD kito nežymiai – padidėjo iki 2,8 proc. Vertinant tyrimo rezultatus po 3 mėnesių, nustatytas VDD padidėjimas 1 proc. ME-RES 5:1 (4,0 proc.) ir 2 proc. ME-RES 5:1 (4,5 proc.). Lyginant abiejų ME-RES 5:1 VDD po 3 ir 6 mėnesių, statistiškai reikšmingų ($p > 0,05$) pokyčių nenustatyta. Stabilumo tyrimo metu 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 5:1 PDI statistiškai reikšmingai ($p > 0,05$) nepakito lyginant PDI po 1 dienos ir po 6 mėnesių. Vertinant ME-RES vizualiai, viso stabilumo tyrimo metu skaidrumo ar spalvos pokyčių nenustatyta.

Tyrimo rezultatai parodė skirtingus VDD pokyčius 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 5:1 laikant kambario (15–25 °C) temperatūroje neapsaugotus nuo šviesos. 1 proc. ME-RES 5:1 VDD stabilumo tyrimo metu didėjo (3.4.2.1.1 pav., a). Po 1, 3 ir 6 mėnesių VDD atitinkamai padidėjo 1,9 proc., 4,9 proc. ir 5,6 proc. Vertinant gautus 2 proc. ME-RES 5:1 tyrimo rezultatus, nustatytas VDD sumažėjimas (3.4.2.1.1 pav., b). Stabilumo tyrimo metu VDD po 1, 3 ir 6 mėnesių sumažėjo atitinkamai 3,2 proc., 3,4 proc. ir 4,1 proc. Stabilumo tyrimo rezultatai parodė statistiškai reikšmingą ($p < 0,05$) PDI sumažėjimą lyginant rezultatus po 1 dienos ir 6 mėnesių. 1 proc. ME-RES 5:1 PDI atitinkamai mažėjo nuo $0,274 \pm 0,005$ iki $0,257 \pm 0,003$, o 2 proc. ME-RES 5:1 – nuo $0,259 \pm 0,006$ iki $0,233 \pm 0,013$. Stabilumo tyrimo pradžioje ME-RES 5:1 išliko skaidrios, tačiau po 1 mėnesio nustatyta 1 proc. ME-RES 5:1, o po 3 mėnesių 2 proc. ME-RES 5:1 spalvos pokyčių.



3.4.2.1.1 pav. Mikroemulsijų su resveratroliu (S/KoS 5:1) dalelių dydis stabilumo tyrimo metu

(a) 1 proc. resveratrolio mikroemulsija; (b) 2 proc. resveratrolio mikroemulsija.

Vertinant tyrimo rezultatus, gautus ME-RES 5:1 laikant ilgalaikio stabilumo tyrimo sąlygomis, nustatytas VDD didėjimas (3.4.2.1.1 pav., a, b). 1 proc. ME-RES 5:1 VDD po 1 mėnesio buvo 2,5 proc., po 3 mėnesių – 4,5 proc., o po 6 mėnesių – 5,7 proc. didesnis nei tyrimo pradžioje. Tyrimo rezultatai parodė, kad 2 proc. ME-RES 5:1 VDD pokytis, lyginant su 1 proc. ME-RES 5:1, buvo panašus (po 6 mėnesių VDD padidėjo 5,1 proc.). Ilgalaikio stabilumo tyrimo metu nustatytas statistškai reikšmingas ($p < 0,05$) PDI

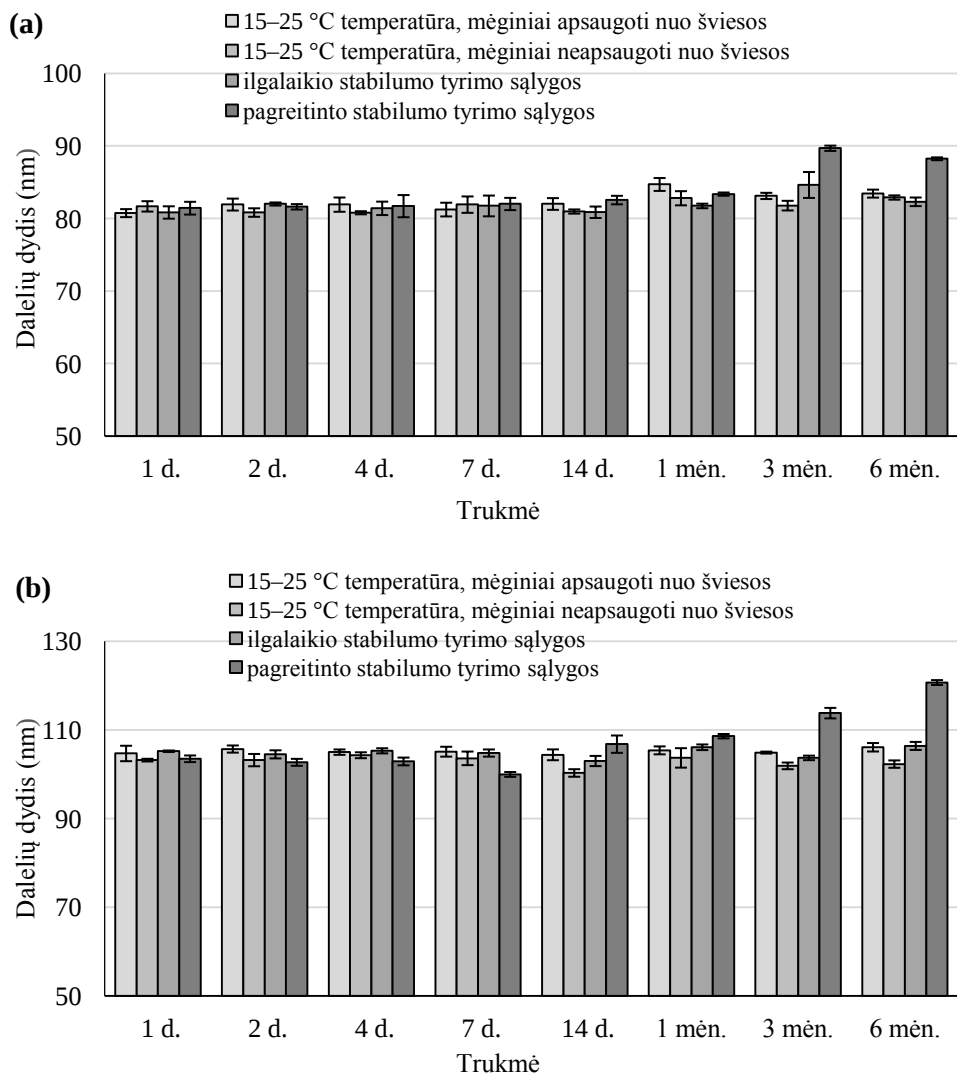
sumažėjimas lyginant rezultatus po 1 dienos ir 6 mėnesių. 1 proc. ME-RES 5:1 PDI po 1 dienos buvo $0,270 \pm 0,004$, o po 6 mėnesių – $0,258 \pm 0,003$. 2 proc. ME-RES 5:1 kito atitinkamai nuo $0,271 \pm 0,004$ iki $0,236 \pm 0,017$. Vertinant ME-RES 5:1 vizualiai, skaidrumo ar spalvos pokyčių nenustatyta viso ilgalaikio stabilumo tyrimo metu.

Tyrimo rezultatai parodė didžiausią VDD pokytį, kai ME-RES 5:1 buvo laikomos pagreitinoto stabilumo tyrimo sąlygomis (3.4.2.1.1 pav., a, b). Nežymūs VDD pokyčiai nustatyti po 14 dienų: 1 proc. ME-RES 5:1 VDD padidėjo 2,8 proc., o 2 proc. ME-RES 5:1 – 3,6 proc. Didesni VDD pokyčiai nustatyti po 1, 3 ir 6 mėnesių: 1 proc. ME-RES 5:1 VDD atitinkamai padidėjo 4,8 proc., 8,4 proc. ir 12,8 proc., o 2 proc. ME-RES 5:1 – 5,1 proc., 11,3 proc. ir 18,3 proc. Pagreitinoto stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad ME-RES 5:1 PDI tyrimo metu statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjo. Vertinant tyrimo rezultatus po 1 dienos ir 6 mėnesių, 1 proc. ME-RES 5:1 PDI sumažėjo nuo $0,280 \pm 0,016$ iki $0,238 \pm 0,011$ o 2 proc. ME-RES 5:1 – nuo $0,260 \pm 0,009$ iki $0,231 \pm 0,001$. Pagreitinoto stabilumo tyrimo metu spalvos ar skaidrumo pokyčių nenustatyta.

Vertinant 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 5:1 dalelių dydžio pasiskirstymo pagal išsklaidytos šviesos intensyvumą smailes, nustatyta, kad esant visoms laikymo sąlygoms, ME-RES 5:1 dalelės buvo pasiskirsčiusios vienoje smailėje. Dominuojančios dalelių dydžio frakcijos smailėse išliko tos pačios, tačiau nustatyti nežymūs dalelių dydžio persiskirstymo tarp frakcijų pokyčiai.

1 proc. ir 2 proc. ME-RES 6:1 VDD pokyčiai skirtingo stabilumo tyrimo metu pavaizduoti 3.4.2.1.2 paveiksle.

Stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad 1 proc. ME-RES 6:1 ir 2 proc. ME-RES 6:1 laikant kambario (15–25 °C) temperatūroje apsaugotas nuo šviesos, VDD po 6 mėnesių padidėjo nežymiai – apie 1,3 proc. (3.4.2.1.2 pav., a, b). Vertinant gautus PDI tyrimo rezultatus, po 6 mėnesių nustatytas statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) PDI sumažėjimas. Tyrimo pradžioje 1 proc. ME-RES 6:1 PDI buvo $0,279 \pm 0,003$, o po 6 mėnesių sumažėjo iki $0,253 \pm 0,002$. 2 proc. ME-RES 6:1 PDI sumažėjo nuo $0,266 \pm 0,009$ (po 1 dienos) iki $0,226 \pm 0,009$ (po 6 mėnesių). Vykdamas stabilumo tyrimus, ME-RES 6:1 spalva ir skaidrumas nekito.



3.4.2.1.2 pav. Mikroemulsijų su resveratroliu (S/KoS 6:1) dalelių dydis stabilumo tyrimo metu

(a) 1 proc. resveratrolio mikroemulsija; (b) 2 proc. resveratrolio mikroemulsija.

Tiriant 1 proc. ME-RES 6:1 ir 2 proc. ME-RES 6:1 stabilumą neapsaugojus nuo šviesos, nustatyti skirtingi VDD pokyčiai. 1 proc. ME-RES 6:1 VDD po 6 mėnesių stabilumo tyrimo padidėjo 1,5 proc. (3.4.2.1.2 pav., a). Vertinant gautus 2 proc. ME-RES 6:1 tyrimo rezultatus, nustatytas VDD sumažėjimas (3.4.2.1.2 pav., b). Po 6 mėnesių tyrimo 2 proc. ME-RES 6:1 VDD sumažėjo 1,3 proc. Stabilumo tyrimo metu nustatytas PDI mažėjimas. Tyrimo rezultatai parodė, kad 1 proc. ME-RES 6:1 PDI statistiškai reikš-

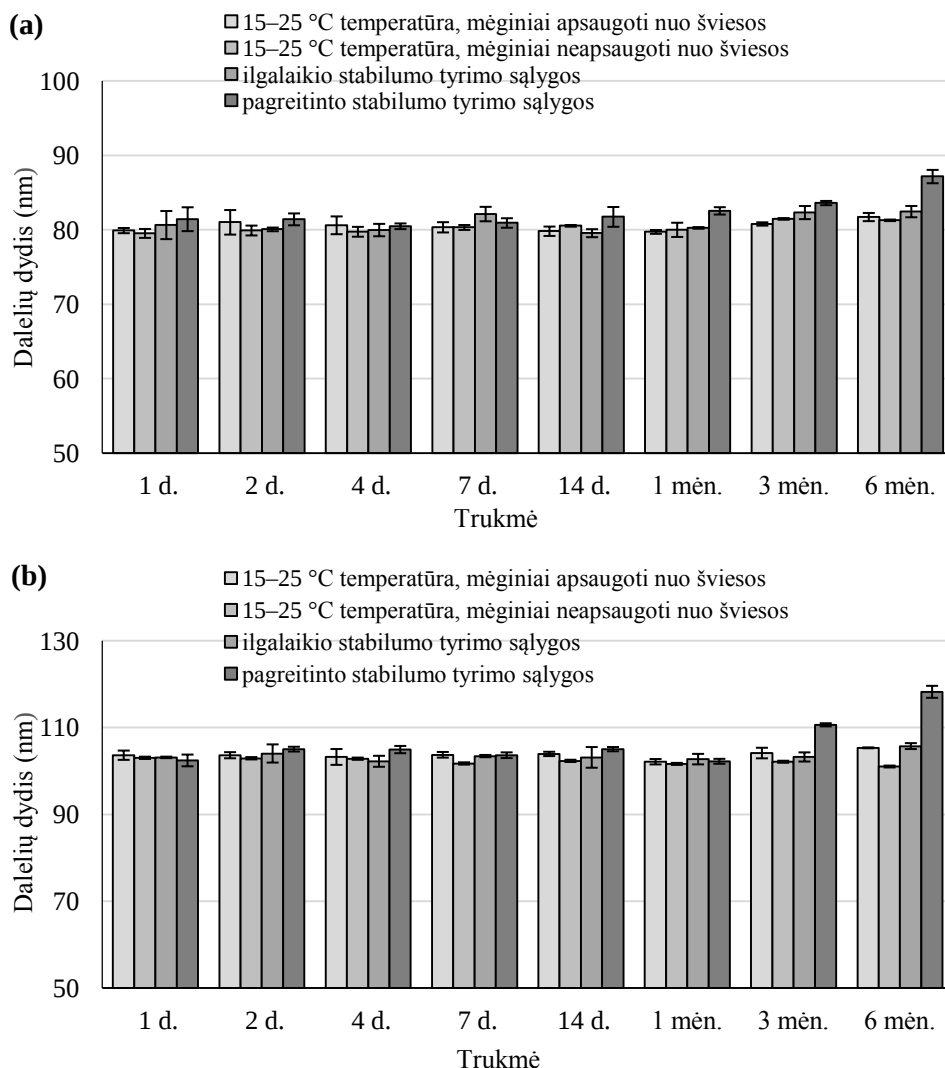
mingai ($p < 0,05$) sumažėjo nuo $0,277 \pm 0,006$ (po 1 dienos) iki $0,248 \pm 0,004$ (po 6 mėnesių). 2 proc. ME-RES 6:1 PDI sumažėjo atitinkamai nuo $0,262 \pm 0,003$ iki $0,230 \pm 0,010$. 1 proc. ME-RES 6:1 spalvos pokyčiai nustatyti po 1 mėnesio, o 2 proc. ME-RES 6:1 po 3 mėnesių laikymo šviesoje.

Ilgalaikio stabilumo tyrimo metu (iki 6 mėnesių) nustatyti nežymūs 1 proc. ME-RES 6:1 ir 2 proc. ME-RES 6:1 VDD pokyčiai (3.4.2.1.2 pav., a, b). Tyrimo rezultatai parodė, kad abiejų ME-RES 6:1 VDD po 6 mėnesių buvo apie 1,3 proc. didesnis nei tyrimo pradžioje. Tačiau nustatyti statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) PDI skirtumai lyginant stabilumo rezultatus tyrimo pradžioje ir po 6 mėnesių. 1 proc. ME-RES 6:1 PDI sumažėjo nuo $0,288 \pm 0,019$ (po 1 dienos) iki $0,244 \pm 0,010$ (po 6 mėnesių), o 2 proc. ME-RES 6:1 – atitinkamai nuo $0,291 \pm 0,027$ iki $0,219 \pm 0,008$. Vertinant ME-RES 6:1 vizualiai, skaidrumo ar spalvos pokyčių nenustatyta viso ilgalaikio stabilumo tyrimo metu.

Didžiausias 1 proc. ME-RES 6:1 ir 2 proc. ME-RES 6:1 VDD kitimas nustatytas pagreitinoto stabilumo tyrimo eigoje (3.4.2.1.2 pav., a, b). Nustatytas nežymus (1,4–3,2 proc.) VDD padidėjimas po 14 dienų tyrimo. Tyrimo rezultatai parodė didesnius VDD pokyčius po 1, 3 ir 6 mėnesių. 1 proc. ME-RES 6:1 VDD atitinkamai padidėjo 2,4 proc., 10,1 proc. ir 8,4 proc. Po 6 mėnesių laikymo pagreitinoto stabilumo tyrimo sąlygomis didžiausias (16,6 proc.) VDD padidėjimas nustatytas 2 proc. ME-RES 6:1. Vertinant gautus pagreitinoto stabilumo tyrimo rezultatus, nustatytas 1 proc. ME-RES 6:1 PDI sumažėjimas nuo $0,276 \pm 0,003$ (po 1 dienos) iki $0,248 \pm 0,002$ (po 6 mėnesių), o 2 proc. ME-RES 6:1 – nuo $0,258 \pm 0,006$ (po 1 dienos) iki $0,226 \pm 0,011$ (po 6 mėnesių). Vykdamas stabilumo tyrimus 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 6:1, skaidrumo ar spalvos pokyčių nenustatyta.

Tiriant stabilumą skirtingomis laikymo sąlygomis, atliktas 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 6:1 dalelių dydžio pasiskirstymo pagal išsklaidytos šviesos intensyvumą vertinimas. Tyrimo rezultatai parodė, kad laikymo sąlygos daro įtaką formuluojamų sistemų dinaminiais pokyčiams. Ankstesniais tyrimais įrodyta, kad 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 6:1, praėjus 24 valandoms po pagaminimo, dalelės buvo pasiskirsčiusios dviejose smailėse. Tačiau stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad ME-RES 6:1 vyksta dinaminiai pokyčiai, nulemiantys dalelių dydžio pasiskirstymą vienoje smailėje praėjus 7 dienoms nuo stabilumo tyrimų pradžios visose laikymo sąlygose. Stabilumo tyrimo eigoje vyko nuolatiniai dalelių dydžio persiskirstymo tarp frakcijų pokyčiai.

VDD kitimas, tiriant 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 7:1 stabilumą esant skirtingoms laikymo sąlygoms, pavaizduotas 3.4.2.1.3 paveiksle.



3.4.2.1.3 pav. Mikroemulsijų su resveratroliu (S/KoS 7:1) dalelių dydis stabilumo tyrimo metu

(a) 1 proc. resveratrolio mikroemulsija; (b) 2 proc. resveratrolio mikroemulsija.

Stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad 1 proc. ME-RES 7:1 ir 2 proc. ME-RES 7:1 VDD po 6 mėnesių padidėjo nežymiai (iki 2,2 proc.) laikant mėginius kambario (15–25 °C) temperatūroje apsaugotus nuo šviesos (3.4.2.1.3 pav., a, b). Vertinant gautus PDI tyrimo rezultatus, po 6 mėnesių nustatytas statistškai reikšmingas ($p < 0,05$) PDI sumažėjimas. Stabilumo tyrimo eigoje 1 proc. ME-RES 7:1 PDI sumažėjo nuo $0,271 \pm 0,005$ (po 1 dienos) iki $0,260 \pm 0,003$ (po 6 mėnesių), o 2 proc. ME-RES 7:1 – nuo

0,265 ± 0,002 (po 1 dienos) iki 0,218 ± 0,007 (po 6 mėnesių). Vertinant ME-RES 7:1 vizualiai, jų skaidrumas ir spalva nekito viso stabilumo tyrimo metu.

Skirtingi VDD pokyčiai nustatyti 1 proc. ME-RES 7:1 ir 2 proc. ME-RES S/KoS 7:1 laikant neapsaugotus nuo šviesos. Vertinant gautus stabilumo tyrimo rezultatus po 6 mėnesių, nustatytas 1 proc. ME-RES 7:1 VDD padidėjimas 2,2 proc. (3.4.2.1.3 pav., a), o 2 proc. ME-RES 7:1 – VDD sumažėjimas 1,9 proc. (3.4.2.1.3 pav., b) lyginant su ME-RES 7:1 VDD po 1 dienos. PDI tyrimo rezultatai parodė, kad 1 proc. ME-RES 7:1 PDI statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjo nuo 0,274 ± 0,007 (po 1 dienos) iki 0,249 ± 0,004 (po 6 mėnesių), o 2 proc. ME-RES 7:1 PDI sumažėjo atitinkamai nuo 0,263 ± 0,010 iki 0,218 ± 0,008. Vertinant pagamintas ME-RES 7:1 vizualiai, po 1 mėnesio laikymo šviesoje nustatytas 1 proc. ME-RES 7:1, o po 3 mėnesių – 2 proc. ME-RES 7:1 tamsesnės spalvos atsiradimas.

Ilgalaikio stabilumo tyrimo eigoje (iki 6 mėnesių) nustatyti nežymūs 1 proc. ME-RES 7:1 ir 2 proc. ME-RES 7:1 VDD pokyčiai (3.4.2.1.3 pav., a, b). Tyrimo rezultatai parodė, kad abiejų ME-RES 7:1 VDD po 6 mėnesių buvo apie 2,5 proc. didesnis nei tyrimo pradžioje. Vertinant PDI tyrimo rezultatus, nustatyti statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) skirtumai tarp PDI tyrimo pradžioje ir po 6 mėnesių. 1 proc. ME-RES 7:1 PDI sumažėjo nuo 0,279 ± 0,006 (po 1 dienos) iki 0,259 ± 0,009 (po 6 mėnesių), o 2 proc. ME-RES 7:1 – atitinkamai nuo 0,261 ± 0,017 iki 0,233 ± 0,004. ME-RES 7:1 skaidrumo ar spalvos pokyčių nenustatyta viso ilgalaikio stabilumo tyrimo metu.

Tyrimo rezultatai parodė didžiausią VDD pokytį, kai 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 7:1 buvo laikomos pagreitinto stabilumo tyrimo sąlygomis (3.4.2.1.3 pav., a, b). 1 proc. ME-RES 7:1 VDD po 1, 3 ir 6 mėnesių atitinkamai padidėjo 1,4 proc., 2,7 proc. ir 7,1 proc., o 2 proc. ME-RES 7:1 – 2,5 proc., 8,1 proc. ir 15,4 proc. Pagreitinto stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad ME-RES 7:1 PDI tyrimo eigoje statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjo. Vertinant tyrimo rezultatus po 1 dienos ir 6 mėnesių, 1 proc. ME-RES 7:1 PDI sumažėjo nuo 0,277 ± 0,003 iki 0,236 ± 0,006, o 2 proc. ME-RES 7:1 – nuo 0,260 ± 0,008 iki 0,225 ± 0,008. Pagreitinto stabilumo tyrimo metu spalvos ar skaidrumo pokyčių nenustatyta.

Tiriant 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 7:1 stabilumą skirtingomis laikymo sąlygomis, atliktas dalelių dydžio pasiskirstymo pagal išsklaidytos šviesos intensyvumą vertinimas. Ankstesniais tyrimais įrodyta, kad praėjus 24 valandoms po 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 7:1 pagaminimo, dalelės pasiskirsčiusios dviejuose smailėse. Vykdamas stabilumo tyrimus, dinaminiai ME-RES 7:1 pokyčiai nustatyti praėjus 7 dienoms nuo tyrimų pradžios. Gauti rezultatai parodė 1 proc. ir 2 proc. ME-RES 7:1 dalelių pasiskirstymą vienoje

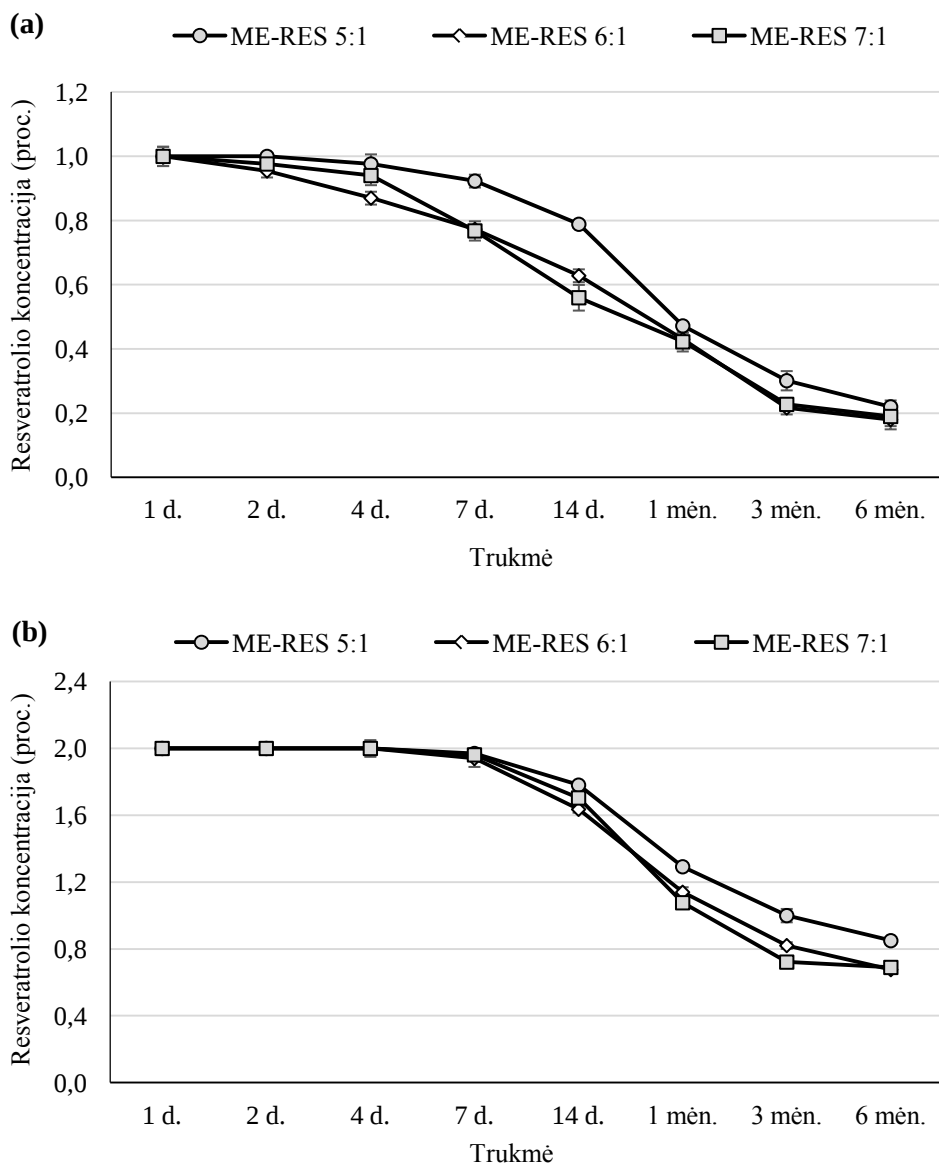
smailėje nepriklausomai nuo skirtingų laikymo sąlygų. Stabilumo tyrimo metu vyko nuolatinis dalelių dydžio persiskirstymas tarp frakcijų.

3.4.2.2. Mikroemulsijų su resveratroliu stabilumo tyrimas vertinant resveratrolio koncentraciją

Siekiant įvertinti skirtingų laikymo sąlygų įtaką resveratrolio stabilumui sumodeliuotose ME-RES, atliktas kiekybinis resveratrolio nustatymas išvystyta ir validuota efektyviosios skysčių chromatografijos metodika. Vykdamas ME-RES stabilumo tyrimus, atlikti ne tik VDD ir PDI matavimai, bet kartu vertinta ir resveratrolio koncentracija eksperimentinėse formuluotėse. Tyrimo rezultatai parodė, kad resveratrolio koncentracija nekito ME-RES laikant kambario (15–25 °C) temperatūroje apsaugotas nuo šviesos, ilgalaikio ir pagreitinto stabilumo tyrimų sąlygomis. Veikliosios medžiagos koncentracijos mažėjimas nustatytas mėginius laikant kambario (15–25 °C) temperatūroje neapsaugotus nuo šviesos. Resveratrolio koncentracijos pokytis 1 proc. ir 2 proc. ME-RES su skirtingais S/KoS santykiais stabilumo tyrimo metu pateiktas 3.4.2.2.1 paveiksle.

Atlikus stabilumo tyrimo rezultatų analizę, nustatytas didesnis resveratrolio koncentracijos sumažėjimas 1 proc. ME-RES (3.4.2.2.1 pav., a). Gauti rezultatai parodė statistiškai reikšmingą ($p < 0,05$) skirtumą tarp resveratrolio koncentracijos tyrimo pradžioje ir po 4 dienų 1 proc. ME-RES 6:1 ir 1 proc. ME-RES 7:1. Vertinant resveratrolio koncentracijos pokyčius 1 proc. ME-RES 5:1, statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) skirtumas nustatytas po 7 dienų nuo tyrimo pradžios. Stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad po 6 mėnesių resveratrolio koncentracija 1 proc. ME-RES 5:1, ME-RES 6:1 ir ME-RES 7:1 sumažėjo atitinkamai 78,0 proc., 82,0 proc. ir 81,0 proc. Vertinant šiuos rezultatus, galima teigti, kad stabilumo tyrimo pabaigoje resveratrolio koncentracija visose 1 proc. ME-RES buvo panaši. Verta pažymėti, kad 1 proc. ME-RES 5:1, lyginant su kitomis ME-RES, ilgiau apsaugojo resveratrolį nuo jo struktūrinių pokyčių.

Resveratrolio koncentracijos kitimas 2 proc. ME-RES su skirtingais S/KoS santykiais laikant mėginius neapsaugotus nuo šviesos, pateiktas 3.4.2.2.1 paveiksle (b). Tyrimo rezultatai parodė, kad resveratrolio koncentracija statistiškai reikšmingai ($p > 0,05$) nepakito iki 7 dienų visose 2 proc. ME-RES. Po 6 mėnesių stabilumo tyrimo resveratrolio koncentracija 2 proc. ME-RES 5:1, ME-RES 6:1 ir ME-RES 7:1 sumažėjo atitinkamai 57,5 proc., 66,0 proc. ir 65,5 proc. Statistinė duomenų analizė parodė, kad nėra statistiškai reikšmingo ($p > 0,05$) skirtumo tarp resveratrolio koncentracijos 2 proc. ME-RES 6:1 ir ME-RES 7:1 viso stabilumo tyrimo eigoje. Vykdamas stabilumo tyrimus, po 1, 3 ir 6 mėnesių nustatytas statistiškai reikšmingas



3.4.2.2.1 pav. Resveratrolio koncentracijos pokytis stabilumo tyrimo metu
(a) 1 proc. resveratrolio mikroemulsija; (b) 2 proc. resveratrolio mikroemulsija.

($p < 0,05$) skirtumas tarp resveratrolio koncentracijos 2 proc. ME-RES 5:1 ir 2 proc. ME-RES 6:1 arba ME-RES 7:1. Šie rezultatai parodė, kad resveratrolis dėl lėtesnės jo izomerizacijos išlieka stabilesnis 2 proc. ME-RES 5:1 lyginant su kitomis 2 proc. ME-RES.

Apibendrinus stabilumo tyrimo rezultatus, nustatyta, kad skirtingos laikymo sąlygos turėjo įtakos 1 proc. ir 2 proc. ME-RES (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) VDD, PDI ir resveratrolio koncentracijos pokyčiams. Tyrimo rezultatai parodė, kad ME-RES laikant kambario (15–25 °C) temperatūroje apsaugotas nuo šviesos ir ilgalaikio stabilumo tyrimo sąlygomis neturėjo reikšmingos įtakos VDD. Po 6 mėnesių nustatytas iki 5,7 proc. ME-RES VDD padidėjimas. Lyginant gautus ME-RES rezultatus su OPT-ME rezultatais po 6 mėnesių stabilumo tyrimo, nustatytas panašus procentinis VDD padidėjimas. Šie rezultatai parodė, kad skirtingo resveratrolio kiekio įterpimas į OPT-ME neturėjo įtakos VDD santykiniams pokyčiams stabilumo tyrimo metu.

Stabilumo tyrimo rezultatai parodė didžiausią VDD padidėjimą 1 proc. ir 2 proc. ME-RES (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1), kai mėginiai buvo laikomi pagreitininto stabilumo tyrimo sąlygomis. Po 6 mėnesių VDD 1 proc. ME-RES padidėjo 7,0–12,8 proc., o 2 proc. ME-RES 15,4–18,3 proc. priklausomai nuo S/KoS santykio. Tyrimo rezultatai parodė, kad VDD po 1 mėnesio laikymo pagreitininto stabilumo tyrimo sąlygomis yra panašus į VDD, nustatytą po 6 mėnesių ilgalaikio stabilumo tyrimo. Atsižvelgiant į šiuos rezultatus, galima teigti, kad ME-RES stabilumą lemia produkto saugojimo temperatūra.

Vertinant gautus tyrimo rezultatus, nustatyti nežymūs, tačiau skirtingi VDD pokyčiai 1 proc. ME-RES ir 2 proc. ME-RES (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) laikant mėginius neapsaugotus nuo šviesos. Po 6 mėnesių nustatyta, kad VDD 1 proc. ME-RES padidėjo iki 4,9 proc., o 2 proc. ME-RES sumažėjo iki 3,4 proc. Tyrimo rezultatai parodė, kad resveratrolio koncentracija daro įtaką ME-RES VDD pokyčiams laikant sumodeliuotas formuluotes šviesos poveikyje.

Ankstesniais tyrimais įrodyta, kad stabilumo tyrimo metu mėginius laikant šviesoje OPT-ME spalva išbluko, o ME-RES – patamsėjo, todėl galima daryti išvadą, kad resveratrolio kitimas ME-RES nulėmė jų spalvos pokytį. Taip pat nustatyta resveratrolio koncentracijos įtaka mėginių spalvos pokyčiams. 1 proc. ME-RES spalvos pokytis nustatytas po 1 mėnesio, o 2 proc. ME-RES – po 3 mėnesių. Skirtingu stabilumo tyrimo metu atsiradęs spalvos pokytis gali būti siejamas su resveratrolio koncentracijos pokyčiais ME-RES. Stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad po 1 mėnesio resveratrolio koncentracija 1 proc. ME-RES sumažėjo 53,0–58,0 proc., o po 3 mėnesių 2 proc. ME-RES – 50,0–64,0 proc. priklausomai nuo S/KoS santykio. Vertinant gautus tyrimo rezultatus, galima daryti išvadą, kad resveratrolio koncentracijos sumažėjimas ME-RES daro įtaką mėginių spalvos pokyčiui.

Tiriant stabilumą skirtingomis laikymo sąlygomis, nustatytas 1 proc. ir 2 proc. ME-RES (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) nuolatinis PDI mažėjimas. Tyrimo

rezultatai parodė, kad didžiausias PDI sumažėjimas buvo 2 proc. ME-RES. PDI sumažėjimas parodo, kad ME-RES vyksta dalelių dydžio pasiskirstymo tarp frakcijų pokyčiai. Tai patvirtina ir gauti ME-RES dalelių dydžio pasiskirstymo pagal išsklaidytos šviesos intensyvumą vertinimo rezultatai. Nustatyta, kad ME-RES S/KoS 5:1 dalelės buvo pasiskirsčiusios vienoje smailėje, o sumodeliuota sistema išliko homogeniška viso stabilumo tyrimo metu. Ankstesniais tyrimais įrodyta, kad praėjus 1 dienai po ME-RES 6:1 ir ME-RES 7:1 pagaminimo, dalelės pasiskirsčiusios dviejose smailėse. Dinaminiai šių ME-RES pokyčiai nustatyti praėjus 7 dienoms nuo stabilumo tyrimų pradžios. Gauti rezultatai parodė ME-RES 6:1 ir ME-RES 7:1 dalelių pasiskirstymą vienoje smailėje nepriklausomai nuo skirtingų laikymo sąlygų. Vertinant gautus rezultatus, nustatyta, kad stabilumo tyrimo metu vyko nuolatiniai visų ME-RES dalelių dydžio persiskirstymo tarp frakcijų pokyčiai.

Vykdam 3 proc. ME-RES (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) stabilumo tyrimus, nustatyta, kad šios ME-RES pagreitinoto stabilumo tyrimo sąlygomis buvo nestabilios. Po 1 savaitės nuo stabilumo tyrimo pradžios nustatytas sumodeliuotų sistemų susidrumstimas. Atsižvelgiant į gautus rezultatus, nuspręsta tolimesnių tyrimų su 3 proc. ME-RES nevykdyti.

Vertinant gautus tyrimo rezultatus, nustatytas didesnis resveratrolio stabilumas 2 proc. ME-RES. Modeliuojant stabilias ME-RES, buvo siekiama į OPT-ME įterpti maksimaliai didelį resveratrolio kiekį. Atsižvelgiant į šiuos kriterijus, tolimesniems biofarmaciniais tyrimams pasirinktos 2 proc. ME-RES (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1).

3.5. Mikroemulsijų su resveratroliu biofarmacinis vertinimas

3.5.1. Resveratrolio atpalaidavimo iš mikroemulsijų tyrimas *in vitro*

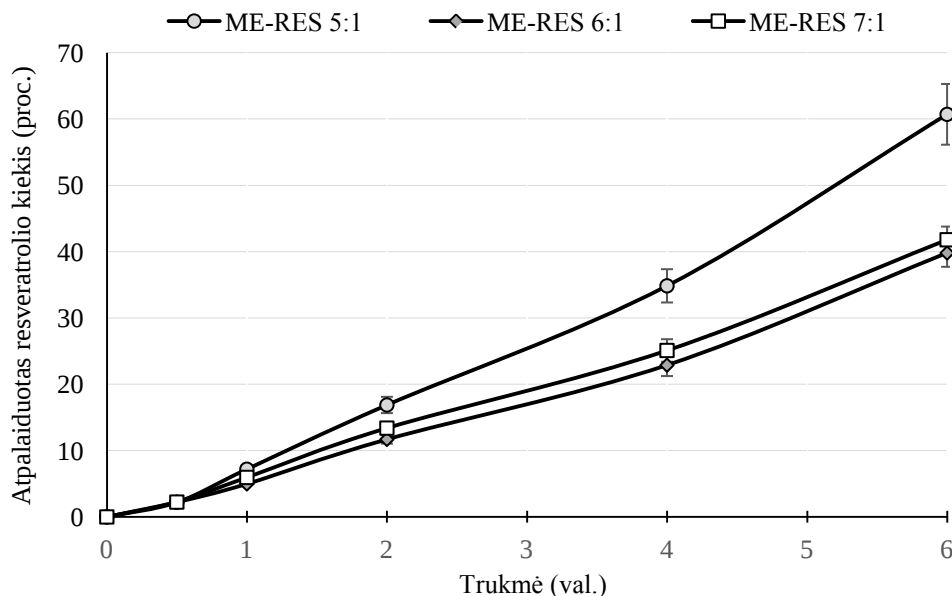
Šiame tyrimų etape buvo vertinama ME kaip nešiklio įtaka resveratrolio atpalaidavimui. Pasirinktas *in vitro* atpalaidavimo testas, kuris leidžia įvertinti nešiklio gebą atpalaiduoti veikliąją medžiagą, nes tai yra būtina sąlyga medžiagai difunduoti į/pro odą. *In vitro* atpalaidavimo testui svarbu parinkti tinkamą akceptorinę terpę, kuri neribotų resveratrolio tirpumo ir tirpimo proceso. Mokslinės literatūros duomenimis resveratrolio yra praktiškai netirpus vandenyje (30 mg/L^{-1} , 0,13 mM), todėl ši terpė nėra tinkama atpalaidavimo tyrimams atlikti [8, 9]. Lipofilinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų atpalaidavimui tirti kaip akceptorinė terpė gali būti naudojami organiniai tirpikliai arba jų mišiniai [2]. Norint parinkti tinkamą akceptorinės terpės sudėtį, įvertintas resveratrolio tirpumas įvairiuose tirpikliuose ir jų mišiniuose (3.5.1.1 lentelė).

3.5.1.1 lentelė. Resveratolio tirpumas įvairiuose tirpikliuose ir jų mišiniuose

Tirpiklis	Resveratolio tirpumas, mg/g $\pm$ SN (n = 3)
PBS	0,05 $\pm$ 0,002
PBS/etanolis (96 proc.) 70/30	2,13 $\pm$ 0,03
30 proc. etanolis	2,80 $\pm$ 0,12
40 proc. etanolis	8,36 $\pm$ 0,14
50 proc. etanolis	26,63 $\pm$ 0,42
PEG 400/etanolis 50/50	108,56 $\pm$ 2,51
PEG 400/vanduo 50/50	160,62 $\pm$ 4,81
PEG 400/PG 50/50	65,73 $\pm$ 2,91
PG/vanduo 50/50	7,77 $\pm$ 0,44
PG/etanolis 50/50	95,85 $\pm$ 6,21

Vertinant gautus tyrimo rezultatus, nustatyta, kad geriausias resveratolio tirpumas buvo šiuose tirpikliuose: PEG 400/etanolis (96 proc.) 50/50, PEG 400/vanduo 50/50, PEG 400/PG 50/50, PG/etanolis 50/50 (3.5.1.1 lentelė). Tirpumo rezultatai parodė, kad resveratolio atpalaidavimo iš ME-RES eksperimentams atlikti gali būti naudojami visi šie tirpikliai. Tačiau norint parinkti tinkamą akceptorinę terpę, svarbu įvertinti mišinio dinaminę klampą, kuri turi įtakos akceptorinės terpės maišymo ir difuzijos proceso efektyvumui [34]. Tyrimo metu nustatyta, kad PEG 400/etanolio (96 proc.) 50/50 mišinio dinaminė klampa buvo 8,02 mPa•s, PEG 400/vandens 50/50 – 7,20 mPa•s, PEG 400/PG 50/50 – 66,30 mPa•s, PG/etanolio 50/50 – 3,50 mPa•s. Etanolio buvimas akceptorinės terpės sudėtyje gali turėti įtakos ME-RES stabilumui ir fizikinėms-cheminėms savybėms, todėl nuspręsta tokios sudėties mišinių nenaudoti atpalaidavimo tyrimams. Atsižvelgiant į mišinio dinaminę klampą ir geriausią resveratolio tirpumą (160,62 $\pm$ 4,81 mg/g), *in vitro* resveratolio atpalaidavimo tyrimams akceptorine terpe pasirinktas PEG 400/vandens 50/50 mišinys.

Parinkus tinkamą akceptorinę terpę, atliktas resveratolio atpalaidavimo iš ME-RES tyrimas *in vitro*. Resveratolio atpalaidavimo iš 2 proc. ME-RES (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) kinetika pavaizduota 3.5.1.1 paveiksle.



3.5.1.1 pav. Resveratrolio atpalaidavimo kinetika iš 2 proc. resveratrolio mikroemulsijų esant skirtingiems surfaktanto ir kosurfaktanto santykiams

In vitro atpalaidavimo tyrimo rezultatai parodė, kad didžiausias resveratrolio kiekis atpalaiduotas iš 2 proc. ME-RES 5:1 ($60,73 \pm 4,58$ proc.). Nustatyta, kad per 6 valandas 2 proc. ME-RES 6:1 ir 2 proc. ME-RES 7:1 atpalaidavo atitinkamai $39,81 \pm 2,08$ proc. ir $41,81 \pm 1,99$ proc. resveratrolio (3.5.1.1 pav.). Atlikus gautų rezultatų statistinę analizę, nenustatyta statistiškai reikšmingo ($p > 0,05$) skirtumo tarp atpalaiduoto resveratrolio kiekio iš 2 proc. ME-RES 6:1 ir 2 proc. ME-RES 7:1. Statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) nustatytas tarp resveratrolio kiekio, atpalaiduoto iš 2 proc. ME-RES 5:1 ir 2 proc. ME-RES 6:1 arba 2 proc. ME-RES 7:1.

Vertinant gautus tyrimo rezultatus, nustatyta, kad per 0,5 valandos visos ME-RES atpalaidavo panašų resveratrolio kiekį (apie 2,2 proc.). Šie rezultatai rodo, kad tyrimo pradžioje resveratrolio atpalaidavimas pro pusiau pralaidžią membraną labiausiai priklauso nuo ME hidrofiliinėje fazėje ištirpusio resveratrolio kiekio. Tolimesnį resveratrolio atpalaidavimo procesą lemia ME gebėjimas atpalaiduoti resveratrolį ir tai gali būti siejama su resveratrolio vieta mikroemulsiniame nešiklyje [48, 118, 155]. Atsižvelgiant į junginio lipofiliškumą, resveratrolis pasiskirstęs iš lipofilinės fazės ir surfaktanto suformuotame ME lašelyje ir jo paviršiuje. Tirtu laiko intervalu resveratrolis atpalaiduojamas iš visų ME-RES pastoviu greičiu. Gauti tyrimo rezultatai parodė, kad visų 2 proc. ME-RES *in vitro* atpalaidavimo

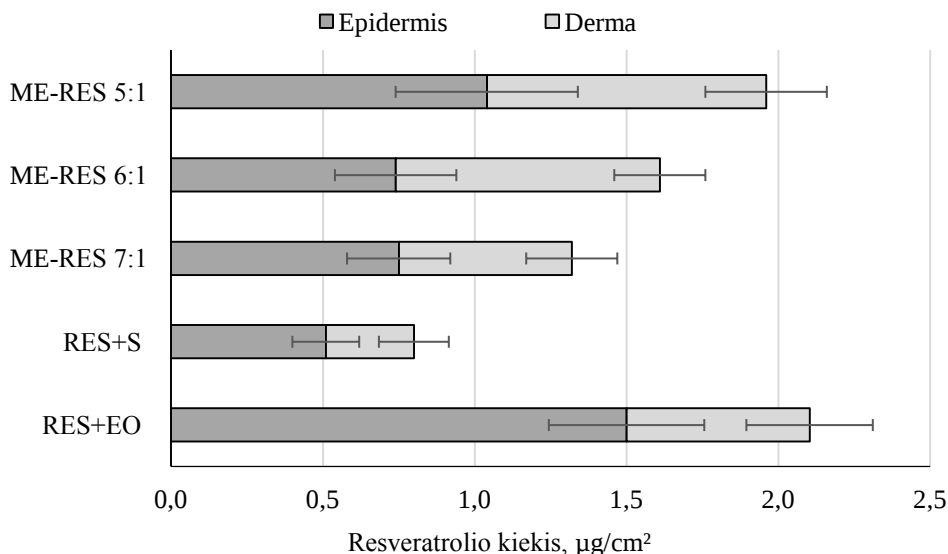
duomenys atitinka nulinės eilės kinetikos (angl. *Zero order kinetic*) matematinį modelį ($R^2 > 0,992$). Nustatyta tiesinė resveratrolio koncentracijos priklausomybė nuo laiko – ilgėjant tyrimo trukmei, didėja atpalaiduoto resveratrolio kiekis.

Moksliniais tyrimais įrodyta, kad veikliosios medžiagos atpalaidavimui iš vaisto formos, naudojamos ant odos, turi įtakos jos klampa (kuo didesnė klampa, tuo lėčiau sumodeliuota sistema atpalaiduoja veikliąją medžiagą) [34, 134]. Ankstesniais tyrimais nustatyta, kad 2 proc. ME-RES 6:1 ir 2 proc. ME-RES 7:1 klamos buvo panašios (atitinkamai $61,65 \pm 1,48$ mPa•s ir $59,35 \pm 1,48$ mPa•s), todėl atpalaiduotas resveratrolio kiekis taip pat statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Tačiau tyrimo rezultatai parodė priešingai – geriausiai resveratrolio atpalaiduojamas iš 2 proc. ME-RES 5:1, kuri pasižymėjo didesne klampa nei kitų sumodeliuotų 2 proc. ME-RES. Didžiausias atpalaiduojamas resveratrolio kiekis turėtų būti siejamas ne su ME-RES klampa, o su dalelių pasiskirstymu sumodeliuotoje sistemoje. Ankstesniais tyrimais įrodyta, kad 2 proc. ME-RES 5:1 dalelės buvo pasiskirsčiusios vienoje smailėje, o 2 proc. ME-RES 6:1 ir 2 proc. ME-RES 7:1 būdingas antros smailės atsiradimas, o tai rodo, kad sumodeliuotoje sistemoje yra didesnio dydžio dalelių, todėl sumažėja santykinis tarpfazinio paviršiaus plotas. Atsižvelgiant į gautus tyrimo rezultatus, galima daryti išvadą, kad 2 proc. ME-RES 5:1 buvo homogeniškesnė, todėl per tą patį laiką atpalaidavo didesnį kiekį resveratrolio.

Sumodeliuoto nešiklio geba atpalaiduoti veikliąją medžiagą yra vienas pagrindinių kriterijų, įvertinančių pagamintų ME-RES kokybę. Apibendrinus *in vitro* atpalaidavimo tyrimo rezultatus, galima daryti išvadą, kad sumodeliuotos ME yra tinkamas nešiklis, kuris geba ne tik inkorporuoti, bet ir atpalaiduoti veikliąją medžiagą, todėl 2 proc. ME-RES (S/KoS 5:1, 6:1 ir 7:1) yra tinkamos skvarbos į/pro odą *ex vivo* tyrimams atlikti.

3.5.2. Resveratrolio skvarbos iš mikroemulsijų į odą tyrimas *ex vivo*

Ex vivo skvarbos į nepažeistą žmogaus odą tyrimai atlikti siekiant nustatyti resveratrolio skvarbą bei pasiskirstymą skirtinguose odos sluoksniuose. Skvarbos tyrimai atlikti su stabiliomis 2 proc. ME-RES 5:1, 2 proc. ME-RES 6:1 ir 2 proc. ME-RES 7:1 formuluoėmis, kurių rezultatai pateikti 3.5.2.1 paveiksle.



3.5.2.1 pav. Resveratrolio skvarba į nepažeistą žmogaus odą iš 2 proc. resveratrolio mikroemulsijų

Ex vivo skvarbos tyrimų rezultatai parodė, kad per 24 valandas daugiausia resveratrolio į odą prasiskverbė iš 2 proc. ME-RES 5:1 ($1,96 \pm 0,41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Mažesnis resveratrolio kiekis odoje nustatytas atlikus skvarbos tyrimus su 2 proc. ME-RES 6:1 ($1,62 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ir 2 proc. ME-RES 7:1 ($1,31 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Vertinant gautus statistinės analizės duomenis, nustatyta statistiškai reikšminga ($p < 0,05$) atvirkštinė koreliacija ($r = -0,689$) tarp resveratrolio skvarbos į odą ir S/KoS santykio. Ši koreliacija parodė, kad didėjant S/KoS santykiui, resveratrolio skvarba į žmogaus odą mažėja. Resveratrolio pasiskirstymo skirtinguose odos sluoksniuose rezultatai parodė, kad nėra statistiškai reikšmingo ($p > 0,05$) skirtumo tarp resveratrolio skvarbos į epidermį iš skirtingų ME-RES. Tačiau nustatytas statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) skirtumas tarp resveratrolio kiekio dermoje, prasiskverbusio iš ME-RES 5:1 arba ME-RES 6:1 ir ME-RES 7:1.

Norint įvertinti ME kaip nešiklio įtaką resveratrolio skvarbai į nepažeistą žmogaus odą, palyginimui pasirinkti du kontroliniai mėginiai. Vertinta veikliosios medžiagos skvarba iš surfaktanto (RES+S) ir ME sudarančios lipofilinės fazės (RES+EO). Resveratrolio koncentracija kaprilokaproilo makrogol-8 gliceride buvo 5,2 proc., o etilo oleate – 0,031 proc. Tyrimo metu nustatyta, kad didžiausias resveratrolio kiekis prasiskverbė į epidermį ir iš surfaktanto ($0,51 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), ir iš etilo oleato ($1,50 \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Tyrimo rezultatai parodė, kad į dermą resveratrolio prasiskverbė mažiau: iš surfaktanto – $0,29 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o iš etilo oleato – $0,60 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

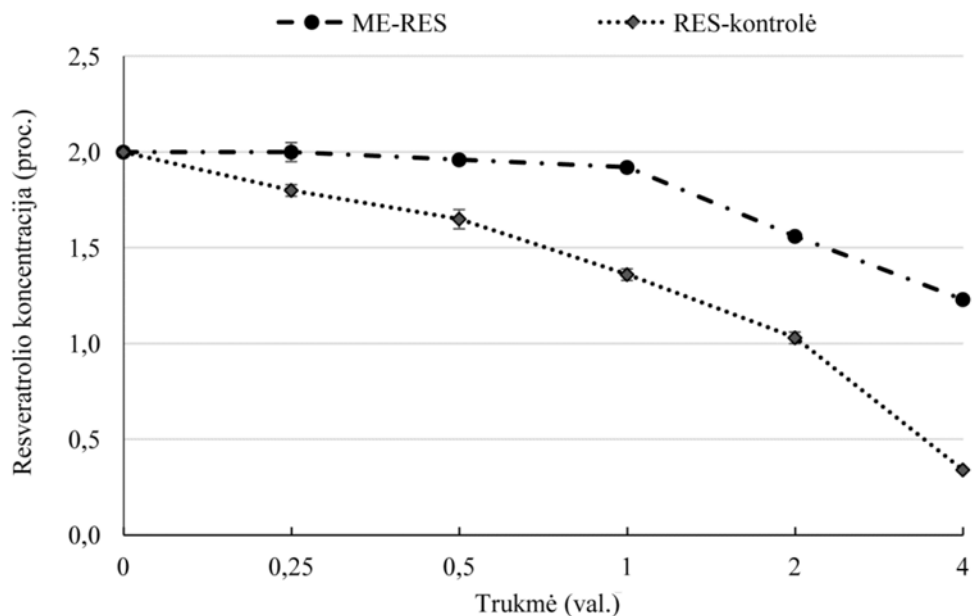
Gauti tyrimo rezultatai patvirtino mokslinėje literatūroje paskelbtus duomenis, kad skvarbai į žmogaus odą yra svarbios veikliųjų junginių lipofilinės savybės [99, 157]. Pagal nustatytą resveratrolio logP 3,1 galima daryti prielaidą, kad resveratrolis turėtų kauptis lipofiliniame raginiame sluoksnyje arba epidermyje [111, 123]. Šią hipotezę patvirtino resveratrolio skvarbos į žmogaus odą iš kaprilokaproilo makrogol-8 glicerido ir etilo oleato tyrimų rezultatai. Nustatyta, kad resveratrolio skvarba iš etilo oleato buvo 2,5 karto geresnė į epidermį nei į dermą, o iš kaprilokaproilo makrogol-8 glicerido – 1,8 karto. Nepriklausomai nuo geros resveratrolio skvarbos į epidermį, vienos šios pagalbinės medžiagos negali būti naudojamos kaip nešikliai veikliųjų medžiagų tiekimui į odą, nes didelės jų koncentracijos gali sukelti odos dirginimą ir pažeisti raginio sluoksnio struktūrą [49, 82]. Norint išvengti galimų odos pažeidimų, tikslinga naudoti šių pagalbinių medžiagų kompozicijas formuluojant mikrostruktūrinius nešiklius. *Ex vivo* skvarbos į žmogaus odą rezultatai parodė, kad suformuluotos 2 proc. ME-RES nuo 0.9 iki 1.3 karto pagerina resveratrolio skvarbą į dermą. Šie tyrimų rezultatai patvirtina mokslinėje literatūroje pateiktus duomenis, kurie nurodo, kad ME yra tinkamas nešiklis resveratrolio skvarbai į gilesnius odos sluoksnius gerinti [67, 69].

Tyrimo rezultatai aptarti straipsnyje „Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol“ (90–99 psl.).

Apibendrinus gautus biofarmacinio tyrimo rezultatus, nustatyta, kad iš visų 2 proc. RES-ME geriausiai resveratrolį atpalaiduoja ir skvarbą į nepažeistą žmogaus odą skatina 2 proc. ME-RES 5:1, todėl nuspręsta tolimesnius tyrimus tęsti su šia formuluote.

3.6. Mikroemulsijos su resveratroliu (S/KoS 5:1) fotostabilumo tyrimas

Fotostabilumo tyrimo metu vertintas ME poveikis resveratrolio fotoizomerizacijai. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad resveratrolis yra jautrus šviesai, kuri sukelia trans-resveratrolio izomerizaciją [51]. Šviesos poveikyje trans-resveratrolis virsta į cis-resveratrolį, kuris pasižymi mažesniu biologiniu aktyvumu [44]. Siekiant išsaugoti resveratrolio biologinį aktyvumą, sumodeliuotos 2 proc. ME-RES 5:1, kurių apsauginis poveikis resveratrolui vertintas naudojant UVB spinduliuotę. Kontrolei naudotas 2 proc. resveratrolio etanolinis tirpalas (RES-kontrolė). Resveratrolio fotostabilumo eksperimentinėse formuluotėse tyrimo rezultatai pateikti 3.6.1 paveiksle.



3.6.1 pav. UVB spinduliuotės poveikis 2 proc. trans-resveratrolio stabilumui mikroemulsijoje (S/KoS 5:1) ir etanoliniame tirpale

Vertinant gautus tyrimo rezultatus, nustatyta, kad UVB poveikyje trans-resveratrolio koncentracija mažėja abiejose eksperimentinėse formuluotėse (3.6.1 pav.). Po 4 valandų UVB apšvitos trans-resveratrolio koncentracija etanoliniame tirpale sumažėjo 83,7 proc., o ME-RES 5:1 – 39,1 proc. Tyrimo rezultatai rodo, kad resveratrolio 2 proc. ME-RES 5:1 išlieka stabilus iki 1 valandos nuo UVB apšvitos pradžios (3.6.1 pav.). Tačiau etanoliniame tirpale resveratrolio koncentracija pastebimai mažėja jau fotostabilumo tyrimo pradžioje. Po 2 valandų UVB poveikio 2 proc. ME-RES 5:1 nustatytas statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) resveratrolio koncentracijos sumažėjimas. Apibendrinus gautus tyrimo rezultatus, nustatyta, kad ME padidina resveratrolio stabilumą UVB poveikyje sumažindama jo izomerizaciją, nes trans-resveratrolio koncentracija ME-RES 5:1 išliko 3,2 karto didesnė nei etanoliniame tirpale. Šie rezultatai gali būti siejami su resveratrolio fizikinėmis-cheminėmis savybėmis. Lipofilinėmis savybėmis pasižymintis resveratrolio ME-RES 5:1 pasiskirstęs tarp lipofilinės fazės ir S/KoS mišinio. Kadangi A/V tipo ME didžiausias resveratrolio kiekis yra vidinėje fazėje, todėl jis yra mažiau pasiekiamas UVB spinduliams. Panašūs fotostabilumo tyrimo rezultatai yra paskelbti keliuose mokslinėse publikacijose, kuriose nurodoma, kad nanostruktūriniai nešikliai (nanokapsulės, nanosferos, liposomos) reikšmingai sumažina resveratrolio izomerizaciją [44, 132].

Atliekant sumodeliuotų sistemų fotostabilumo tyrimą, būtina įvertinti galimą UVB poveikį 2 proc. ME-RES 5:1 struktūriniams pokyčiams. Palyginimui pasirinkta OPT-ME 5:1, kurios sudėtyje nebuvo resveratrolio. Sumodeliuotų sistemų pokyčiai vertinti pagal VDD ir PDI, kurių matavimai atlikti prieš ir po UVB apšvitos.

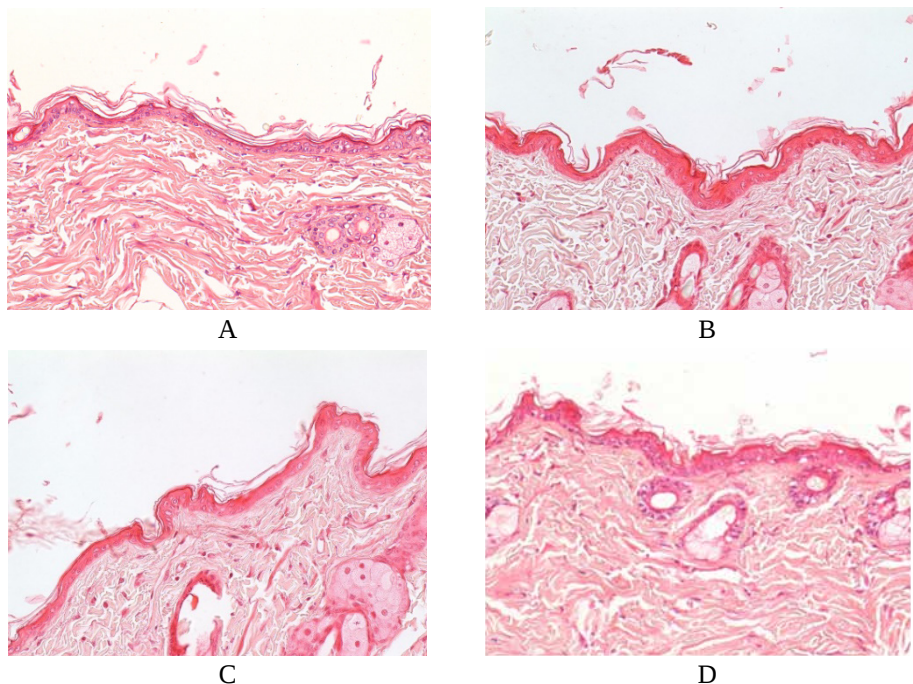
Gauti tyrimo rezultatai paskelbti ir išsamiai aptarti straipsnyje „Testing of resveratrol microemulsion photostability and protective effect against UV induced oxidative stress“ (100–109 psl.).

Nustatyta, kad UVB poveikis turi įtakos sumodeliuotų sistemų stabilumui. Tyrimo rezultatai parodė, kad po 4 valandų UVB apšvitos VDD 2 proc. ME-RES 5:1 padidėjo 37,2 proc., o OPT-ME 5:1 – 65,4 proc. Vertinant PDI rezultatus, po 4 valandų 2 proc. ME-RES 5:1 nustatytas PDI padidėjimas, kuris parodė didesnio dydžio dalelių atsiradimą ir jų pasiskirstymą dviejose smailėse. Priešingi tyrimo rezultatai pastebėti OPT-ME 5:1 veikiant UVB, kurie parodė PDI sumažėjimą ir dalelių persiskirstymą tarp skirtingo dydžio dalelių frakcijų. Apibendrinus gautus tyrimo rezultatus, galima daryti išvadą, kad resveratrolio įterpimas į OPT-ME sumažina UVB sukeltus sistemos struktūrinius pokyčius – ME-RES 5:1 VDD padidėjo 1,7 karto mažiau nei OPT-ME 5:1. Ankstesniais stabilumo tyrimais įrodyta, kad OPT-ME 5:1 VDD statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) padidėjo laikant jas dienos šviesoje, o 2 proc. ME-RES 5:1 VDD kito nežymiai. Lyginant šių tyrimų rezultatus, galima daryti prielaidą, kad OPT-ME struktūriniai pokyčiai vyksta dėl pagalbinių medžiagų gebėjimo absorbuoti UV šviesą. 2 proc. ME RES 5:1 nustatyti mažesni dalelių dydžio pokyčiai, nes dalis UV energijos sunaudojama resveratrolio izomerizacijai sukelti. Tyrimo rezultatai leidžia teigti, kad sumodeliuotos ME padidina resveratrolio atsparumą UVB apšvitai, o resveratrolis savo ruožtu stabilizuoja ME, kurių komponentai yra jautrūs UVB.

3.7. Mikroemulsijų su resveratroliu dirginamojo poveikio odai *in vivo* nustatymas

Vietiniam naudojimui ant odos skirti preparatai turi būti įvertinti ne tik *ex vivo* tyrimais įrodant veikliųjų medžiagų svarbą į odą, bet ir *in vivo* tyrimais, kurie leidžia nustatyti sumodeliuoto preparato galimą toksiškumą odai. Modeliuojant ME, naudotos santykinai didelės surfaktanto koncentracijos, kurios gaminant vietinio poveikio preparatus, gali stipriai dirginti odą [45]. Dėl to nuspręsta įvertinti sumodeliuotų 2 proc. ME-RES 5:1 galimą neigiamą poveikį odai atliekant *in vivo* tyrimus su eksperimentiniais gyvūnais. Tyrime naudotos šios eksperimentinės formuluotės: a) OPT-ME 5:1; b) 2 proc. ME-RES 5:1; c) 2 proc. resveratrolio surfaktante tirpalas

(RES+S). Eksperimentinėmis formuluotėmis paveiktų pelių odos histologinis vaizdas pateiktas 3.7.1 paveiksle.



3.7.1 pav. Eksperimentinėmis formuluotėmis paveiktos odos histologinės nuotraukos

(A – kontrolė, B – OPT-ME 5:1, C – ME-RES 5:1, D – RES+S), objektyvas $\times 20$

Tyrimo rezultatai parodė, kad po 24, 48 ir 72 valandų pelių oda išliko nepakitusi. Pelių nugaros odą vertinant vizualiai, nenustatyta odos išsausėjimo, eritemos ar edemos susiformavimo. Atliekant mėginių histologinį vertinimą, nustatyta, kad sumodeliuotos eksperimentinės formuluotės nesukėlė odos dirginimo ir neturėjo įtakos odos epidermio pokyčiams. Kontrolinių pelių odos epidermio storis siekė $21,3 \pm 3,4 \mu\text{m}$ (3.7.1 pav., A). Paveikus peles OPT-ME 5:1 ir 2 proc. ME-RES 5:1, epidermio storis buvo atitinkamai $23,9 \pm 4,3 \mu\text{m}$ ir $21,9 \pm 3,9 \mu\text{m}$ (3.7.1 pav., B, C). Tyrimo rezultatai parodė, kad epidermio storis buvo didžiausias ($28,0 \pm 6,1 \mu\text{m}$), kai pelių nugara buvo tepama resveratolio surfaktante tirpalu (3.7.1 pav., D). Statistinė duomenų analizė neparodė statistiškai reikšmingo ($p > 0,05$) skirtumo tarp epidermio storių kontrolinių pelių odos ir visomis eksperimentinėmis formuluotėmis paveiktų pelių odos. Apibendrinant *in vivo* tyrimų su eksperimentiniais gyvūnais rezultatus, galima daryti išvadą, kad sumodeliuotos ME nepasižymėjo dirginamuoju poveikiu odai ir yra saugios vietiskai naudoti ant odos.

IŠVADOS

1. Mikroemulsinių sistemų optimalios sudėties paieška vykdyta pritaikius eksperimentinio planavimo modelį pagal pasirinktus kritinius kokybės parametrus: (i) vidutinis dalelių dydžio intervalas 1–100 nm; (ii) dalelių pasiskirstymas vienoje smailėje; (iii) mažiausias standartinis nuokrypis nuo dalelių dydžio vidurkio reikšmės. Pagamintų mikroemulsijų savybių atitikimas sumodeliuotoms mikroemulsijoms patvirtino suformuluoto teorinio modelio ir kritinių kokybės parametrų pasirinkimo teisingumą.
2. Sumodeliuotos termodinamiškai stabilios mikroemulsijos, kurių vidutinis dalelių dydis buvo 66,08–68,54 nm, polidispersiškumo indeksas 0,274–0,288, pH reikšmė 7,01–7,11, elektrinis laidis 74,45–95,55 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ir klampa 53,95–62,80 mPa•s ribose, todėl jos atitiko šioms dispersinėms sistemoms keliamus kokybės reikalavimus ir yra tinkamos naudoti ant odos. Patvirtintas vidutinio dalelių dydžio ir polidispersiškumo indekso rodiklių reikšmingumas vertinant mikroemulsijų stabilumą veikiant šilumai ir šviesai, nes šie veiksniai destabilizavo mikroemulsijas formuojančius komponentus.
3. Ištirtas ir nustatytas resveratrolio koncentracijos poveikis optimalios sudėties mikroemulsijų fizikinių-cheminių savybių pokyčiams. Resveratrolio įterpimas lėmė statistiškai reikšmingą vidutinio dalelių dydžio padidėjimą, kuris priklausė nuo resveratrolio kiekio mikroemulsijose. Santykinai geras resveratrolio tirpumas paviršinio aktyvumo medžiagose lėmė jo buvimą dispersinės sistemos tarpfaziniame sluoksnyje – juo paaiškinami mikroemulsijų dalelių dydžio pokyčiai.
4. Sumodeliuotos mikroemulsijos su resveratroliu išliko stabilios 6 mėnesius jas laikant 15–25 °C temperatūroje apsaugotas nuo šviesos ir ilgalaikio stabilumo tyrimo sąlygomis. Pagreitinto stabilumo tyrimo metu mikroemulsijų su resveratroliu vidutinis dalelių dydis padidėjo 7,1–18,3 proc., o polidispersiškumo indeksas sumažėjo 7,2–15,0 proc., priklausomai nuo surfaktanto ir kosurfaktanto santykio bei resveratrolio koncentracijos, dėl mikroemulsijas formuojančių komponentų jautrumo šilumai. Resveratrolio izomerizacija nustatyta dispersinę sistemą veikiant tik tiesiogine šviesa.
5. Patvirtintas aktyvus mikroemulsijų vaidmuo veikliosios medžiagos atpalaidavimo procese. Skirtingą resveratrolio atpalaidavimo kinetiką iš mikroemulsijų lėmė surfaktanto ir kosurfaktanto santykis, dalelių dydžio pasiskirstymas sumodeliuotoje sistemoje bei jos homogeniškumas. *In vitro* tyrimais nustatyta, kad resveratrolis intensyviau atpalaiduojamas iš

2 proc. resveratrolio mikroemulsijos, kai surfaktanto ir kosurfaktanto santykis yra 5:1, o dispersinė sistema yra homogeniška.

6. *Ex vivo* tyrimais įrodytas mikroemulsijos kaip nešiklio tinkamumas gerinant resveratrolio skvarbą į gilesnius odos sluoksnius. Tyrimais nustatyta, kad suformuluotos mikroemulsijos su resveratroliu nuo 0,9 iki 1,3 karto pagerino resveratrolio skvarbą į dermą, todėl jos gali užtikrinti vietinį apsauginį poveikį.
7. Fotostabilumo tyrimo rezultatai įrodė, kad sumodeliuotos mikroemulsijos padidina resveratrolio atsparumą UVB apšvitai, o resveratrolis stabilizuoja mikroemulsijas, kurių komponentai yra jautrūs UVB. Nustatyta, kad trans-resveratrolio koncentracija sumodeliuotose mikroemulsijose su resveratroliu išliko 3,2 karto didesnė nei etanoliniame tirpale, o po UVB apšvitos vidutinis dalelių dydis padidėjo 1,7 karto mažiau nei optimalios sudėties mikroemulsijų.
8. *In vivo* tyrimų su gyvūnais rezultatai patvirtino, kad mikroemulsijų sudėtyje esantys santykinai dideli paviršinio aktyvumo medžiagų kiekiai nedirgino odos ir neturėjo įtakos epidermio pokyčiams. Įvertinus gautus rezultatus, sumodeliuotos mikroemulsijos su resveratroliu yra laikomos pakankamai saugios vietiniam naudojimui ant odos.

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Abla MJ, Banga AK. Quantification of skin penetration of antioxidants of varying lipophilicity. *Int J Cosmet Sci* 2013; 35: 19–26.
2. Abouelmagd SA, Sun B, Chang AC, Ku YJ, Yeo Y. Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? *Mol Pharm* 2015; 12: 997–1003.
3. Afaq F, Adhami VM, Ahmad N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 186: 28–37.
4. Aggarwal N, Goindi S, Khurana R. Formulation, Characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2013; 105: 158–166.
5. Ahmet I, Tae H, Lakatta EG, Talan M. Long-term low dose dietary resveratrol supplement reduces cardiovascular structural and functional deterioration in chronic heart failure in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2017; 95: 268–274.
6. Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: From basic science to basic skin care. *Acta Derm Venereol* 2013; 93: 261–267.
7. Amiot MJ, Romier B, Anh Dao TM, Fanciullino R, Ciccolini J, Burcelin R *et al.* Optimization of trans-Resveratrol bioavailability for human therapy. *Biochimie* 2013; 95: 1233–1238.
8. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Control Release* 2012; 158: 182–193.
9. Amri A, Le Clanche S, Thérond P, Bonnefont-Rousselot D, Borderie D, Lai-Kuen R *et al.* Resveratrol self-emulsifying system increases the uptake by endothelial cells and improves protection against oxidative stress-mediated death. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 86: 418–426.
10. Anisimova NY, Kiselevsky M V, Sosnov A V, Sadovnikov S V, Stankov IN, Gakh AA. Trans-, cis-, and dihydro-resveratrol: a comparative study. *Chem Cent J* 2011; 5: 88.
11. Azeem A, Khan ZI, Aqil M, Ahmad FJ, Khar RK, Talegaonkar S. Microemulsions as a Surrogate Carrier for Dermal Drug Delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2009; 35: 525–547.
12. Azeem A, Rizwan M, Ahmad FJ, Khan ZI, Khar RK, Aqil M *et al.* Emerging role of microemulsions in cosmetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2008; 2: 275–289.

13. Aziz MH, Reagan-Shaw S, Wu J, Longley BJ, Ahmad N. Chemo-prevention of skin cancer by grape constituent resveratrol : relevance to human disease ? *FASEB J* 2005; 19: 1193–1195.
14. Aziz MH, Afaq F, Ahmad N. Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin. *Photochem Photobiol* 2005; 81: 25–31.
15. Bali V, Bhavna, Ali M, Baboota S, Ali J. Potential of Microemulsions in Drug Delivery and Therapeutics: A Patent Review. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2008; 2: 136–144.
16. Bardhan S, Kundu K, Saha SK, Paul BK. Physicochemical studies of mixed surfactant microemulsions with isopropyl myristate as oil. *J Colloid Interface Sci* 2013; 402: 180–189.
17. Barot BS, Parejiya PB, Patel HK, Mehta DM, Shelat PK. Microemulsion-based antifungal gel delivery to nail for the treatment of onychomycosis: formulation, optimization, and efficacy studies. *Drug Deliv Transl Res* 2012; 2: 463–476.
18. Barot BS, Parejiya PB, Patel HK, Gohel MC, Shelat PK. Microemulsion-Based Gel of Terbinafine for the Treatment of Onychomycosis: Optimization of Formulation Using D-Optimal Design. *AAPS PharmSciTech* 2012; 13: 184–192.
19. Bartosova L, Bajgar J. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. *Curr Med Chem* 2012; 19: 4671–4677.
20. Basly JP, Marre-Fournier F, Bail JC Le, Habrioux G, Chulia AJ. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sci* 2000; 66: 769–777.
21. Bergh M. Allergenic Oxidation Products. *Acta Derm Venereol* 1999; 79: 5–26.
22. Bergonzi MC, Hamdouch R, Mazzacuva F, Isacchi B, Bilia AR. Optimization, characterization and in vitro evaluation of curcumin microemulsions. *LWT - Food Sci Technol* 2014; 59: 148–155.
23. Biruss B, Dietl R, Valenta C. The influence of selected steroid hormones on the physicochemical behaviour of DPPC liposomes. *Chem Phys Lipids* 2007; 148: 84–90.
24. Bolzinger MA, Briçon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2012; 17: 156–165.
25. Boonme P, Krauel K, Graf A, Rades T, Junyaprasert VB. Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij 97:1-butanol. *AAPS PharmSciTech* 2006; 7: E99–E104.

26. Bugaj A, Juzeniene A, Juzenas P, Iani V, Ma LW, Moan J. The effect of skin permeation enhancers on the formation of porphyrins in mouse skin during topical application of the methyl ester of 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B Biol* 2006; 83: 94–97.
27. Butani D, Yewale C, Misra A. Amphotericin B topical microemulsion: Formulation, characterization and evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2014; 116: 351–358.
28. Caddeo C, Manconi M, Fadda AM, Lai F, Lampis S, Diez-Sales O *et al.* Nanocarriers for antioxidant resveratrol: Formulation approach, vesicle self-assembly and stability evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2013; 111: 327–332.
29. Caddeo C, Sales OD, Valenti D, Sauri AR, Fadda AM, Manconi M. Inhibition of skin inflammation in mice by diclofenac in vesicular carriers: Liposomes, ethosomes and PEVs. *Int J Pharm* 2013; 443: 128–136.
30. Callender SP, Mathews JA, Kobernyk K, Wettig SD. Microemulsion Utility in Pharmaceuticals: Implications for Multi-Drug Delivery. *Int J Pharm* 2017. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.05.005.
31. Camont L, Cottart CH, Rhayem Y, Nivet-Antoine V, Djelidi R, Collin F *et al.* Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Anal Chim Acta* 2009; 634: 121–128.
32. Carlotti ME, Sapino S, Ugazio E, Gallarate M, Morel S. Resveratrol in Solid Lipid Nanoparticles. *J Dispers Sci Technol* 2012; 33: 465–471.
33. Chang RK, Raw A, Lionberger R, Yu L. Generic development of topical dermatologic products, Part II: quality by design for topical semisolid products. *AAPS J* 2013; 15: 674–83.
34. Chang RK, Raw A, Lionberger R, Yu LX. Generic development of topical dermatologic products: formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products. *AAPS J* 2013; 15: 41–52.
35. Chen H, Chang X, Du D, Li J, Xu H, Yang X. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. *Int J Pharm* 2006; 315: 52–58.
36. Chen X, He H, Wang G, Yang B, Ren W, Ma L *et al.* Stereospecific determination of cis- and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: Application to pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr* 2007; 21: 257–265.
37. Chouhan P, Saini TR. D-optimal Design and Development of Microemulsion Based Transungual Drug Delivery Formulation of Ciclopirox Olamine for Treatment of Onychomycosis. *Indian J Pharm Sci*

- 2016; 78: 498–511.
38. Cichewicz A, Pacleb C, Connors A, Hass MA, Lopes LB. Cutaneous delivery of alfa-tocopherol and lipoic acid using microemulsions: Influence of composition and charge. *J Pharm Pharmacol* 2013; 65: 817–826.
 39. Cosco D, Paolino D, Maiuolo J, Marzio L Di, Carafa M, Ventura CA *et al.* Ultradeformable liposomes as multidrug carrier of resveratrol and 5-fluorouracil for their topical delivery. *Int J Pharm* 2015; 489: 1–10.
 40. Cottart CH, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, Beaudeau JL. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: 7–16.
 41. Dalmora M., Dalmora S., Oliveira A. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. *Int J Pharm* 2001; 222: 45–55.
 42. Date AA, Nagarsenker MS. Design and Evaluation of Microemulsions for Improved Parenteral Delivery of Propofol. *AAPS PharmSciTech* 2008; 9: 138–145.
 43. Delmas D, Aires V, Limagne E, Dutartre P, Mazué F, Ghiringhelli F *et al.* Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215: 48–59.
 44. Detoni CB, Souto GD, Da Silva ALM, Pohlmann AR, Guterres SS. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. In: *Photochemistry and Photobiology*. 2012, pp 913–921.
 45. Djekic L, Primorac M. The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *Int J Pharm* 2008; 352: 231–239.
 46. Du FY, Xiao XH, Li GK. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of trans-resveratrol from *Rhizma Polygoni Cuspidati*. *J Chromatogr A* 2007; 1140: 56–62.
 47. Elnaggar Y, Talaat S, Bahey-El-Din M, Abdallah O. Novel lecithin-integrated liquid crystalline nanogels for enhanced cutaneous targeting of terconazole: development, in vitro and in vivo studies. *Int J Nanomedicine* 2016; Volume 11: 5531–5547.
 48. Fanun M. Microemulsions as delivery systems. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2012; 17: 306–313.
 49. Fluhr JW, Darlenski R, Angelova-Fischer I, Tsankov N, Basketter D. Skin irritation and sensitization: Mechanisms and new approaches for risk assessment. 1. Skin irritation. *Skin Pharmacol Physiol* 2008; 21:

124–135.

50. Fouad SA, Basalious EB, El-Nabarawi MA, Tayel SA. Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: In vitro/in vivo evaluation. *Int J Pharm* 2013; 453: 569–578.
51. Francioso A, Boffi A, Villani C, Manzi L, D’Erme M, Macone A *et al.* Isolation and Identification of 2,4,6-Trihydroxyphenanthrene as a Byproduct of trans -Resveratrol Photochemical Isomerization and Electrocyclization. *J Org Chem* 2014; 79: 9381–9384.
52. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L *et al.* Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 837042.
53. Golla S, Neely BJ, Whitebay E, Madihally S, Robinson RL, Gasem KAM. Virtual Design of Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Chem Biol Drug Des* 2012; 79: 478–487.
54. Hao J, Gao Y, Zhao J, Zhang J, Li Q, Zhao Z *et al.* Preparation and optimization of resveratrol nanosuspensions by antisolvent precipitation using Box-Behnken design. *AAPS PharmSciTech* 2015; 16: 118–28.
55. Harwansh RK, Mukherjee PK, Bahadur S, Biswas R. Enhanced permeability of ferulic acid loaded nanoemulsion based gel through skin against UVA mediated oxidative stress. *Life Sci* 2015; 141: 202–211.
56. Hassan PA, Rana S, Verma G. Making sense of brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. *Langmuir* 2015; 31: 3–12.
57. Hassan SMA, Saeed AK, Mehdi AH. Histopathologic effect of Xylene and Ultraviolet Type B exposure on mouse skin. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2015; 4: 997–1004.
58. He C-X, He Z-G, Gao J-Q. Microemulsions as drug delivery systems to improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Expert Opin Drug Deliv* 2010; 7: 445–460.
59. Hegde, R.R., Verma, A., Ghosh A. Microemulsion: New Insights into the Ocular Drug Delivery. *ISRN Pharm* 2013.
60. Heuschkel S, Goebel A, Neubert RHH. Microemulsions - Modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97: 603–631.
61. Hong JY, Kim JK, Song YK, Park JS, Kim CK. A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral

- absorption. *J Control Release* 2006; 110: 332–338.
62. Hu L, Jia Y, Niu F, Jia Z, Yang X, Jiao K. Preparation and Enhancement of Oral Bioavailability of Curcumin Using Microemulsions Vehicle. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 7137–7141.
 63. Hua L, Weisan P, Jiayu L, Ying Z. Preparation, Evaluation, and NMR Characterization of Vinpocetine Microemulsion for Transdermal Delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2004; 30: 657–666.
 64. Hwang S-J, Won Kyung Cho, Kim M-S, Kim, Park J, Cha K-H *et al.* Optimized formulation of solid self-microemulsifying sirolimus delivery systems. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 1673.
 65. Yang W, Li H, Pan T, Cui Y, Li X, Gao J *et al.* Improved oral bioavailability of poorly water-soluble glimepiride by utilizing microemulsion technique. *Int J Nanomedicine* 2016; Volume 11: 3777–3788.
 66. Yuan JS, Ansari M, Samaan M, Acosta EJ. Linker-based lecithin microemulsions for transdermal delivery of lidocaine. *Int J Pharm* 2008; 349: 130–143.
 67. Yutani R, Kikuchi T, Teraoka R, Kitagawa S. Efficient delivery and distribution in skin of chlorogenic acid and resveratrol induced by microemulsion using sucrose laurate. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2014; 62: 274–80.
 68. Yutani R, Komori Y, Takeuchi A, Teraoka R, Kitagawa S. Prominent efficiency in skin delivery of resveratrol by novel sucrose oleate microemulsion. *J Pharm Pharmacol* 2016; 68: 46–55.
 69. Yutani R, Morita S, Teraoka R, Kitagawa S. Distribution of Polyphenols and a Surfactant Component in Skin during Aerosol OT Microemulsion-Enhanced Intradermal Delivery. *Chem Pharm Bull* 2012; 60: 989–994.
 70. Jepps OG, Dancik Y, Anissimov YG, Roberts MS. Modeling the human skin barrier – Towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 152–168.
 71. Ji M, Li Q, Ji H, Lou H. Investigation of the distribution and season regularity of resveratrol in *Vitis amurensis* via HPLC–DAD–MS/MS. *Food Chem* 2014; 142: 61–65.
 72. Juan ME, Maijó M, Planas JM. Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 51: 391–398.
 73. Juškaitė V, Ramanauskienė K, Briedis V. Design and Formulation of Optimized Microemulsions for Dermal Delivery of Resveratrol. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2015; 2015: 1–10.

74. Juškaitė V, Ramanauskienė K, Briedis V. Testing of resveratrol microemulsion photostability and protective effect against UV induced oxidative stress. *Acta Pharm* 2017; 67: 247–256.
75. Kale SN, Deore SL. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. *Syst Rev Pharm* 2016; 8: 39–47.
76. Karande P, Mitragotri S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochim Biophys Acta – Biomembr* 2009; 1788: 2362–2373.
77. Karasulu HY. Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity. *Expert Opin Drug Deliv* 2008; 5: 119–135.
78. Kežutytė T. Riebalų rūgščių ir terpenų poveikio tolnoftato skvarbai į žmogaus odą iš dermatologinių sistemų tyrimas in vitro. 2011.
79. Kežutytė T, Drevinskas T, Maruška A, Rimdeika R, Briedis V. Study of tolnoftate release from fatty acids containing ointment and penetration into human skin ex vivo. *Acta Pol Pharm - Drug Res* 2011; 68: 965–973.
80. Khan NR, Harun MS, Nawaz A, Harjoh N, Wong TW. Nanocarriers and their Actions to Improve Skin Permeability and Transdermal Drug Delivery. *Curr Pharm Des* 2015; 21: 2848–2868.
81. Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci* 2006; 123–126: 369–385.
82. Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54.
83. Kreilgaard M, Pedersen EJ, Jaroszewski JW. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *J Control Release* 2000; 69: 421–433.
84. Kumar A, Kushwaha V, Sharma PK. Pharmaceutical microemulsion: Formulation, characterization and drug deliveries across skin. *Int J Drug Dev Res* 2014; 6: 1–21.
85. Kumar N. D-optimal experimental approach for designing topical microemulsion of itraconazole: Characterization and evaluation of antifungal efficacy against a standardized Tinea pedis infection model in Wistar rats. *Eur J Pharm Sci* 2015; 67: 97–112.
86. Kumar R, Kumar S, Sinha VR. Evaluation and Optimization of Water in Oil Microemulsion Using Ternary Phase Diagram and Central Composite Design. *J Dispers Sci Technol* 2015; 37: 166–172.
87. Lasa A, Schweiger M, Kotzbeck P, Churrua I, Simón E, Zechner R *et al.* Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase. *J Nutr Biochem* 2012; 23: 379–384.

88. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45: 89–121.
89. L  mery E, Brian  on S, Chevalier Y, Bordes C, Oddos T, Gohier A *et al.* Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2015; 469: 166–179.
90. Li CC, Abrahamson M, Kapoor Y, Chauhan A. Timolol transport from microemulsions trapped in HEMA gels. *J Colloid Interface Sci* 2007; 315: 297–306.
91. Liu L, Xie H, Chen X, Shi W, Xiao X, Lei D *et al.* Differential response of normal human epidermal keratinocytes and HaCaT cells to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Clin Exp Dermatol* 2012; 37: 772–780.
92. Lohani A, Verma A, Joshi H, Yadav N, Karki N. Nanotechnology-Based Cosmeceuticals. *ISRN Dermatol* 2014; 2014: 1–14.
93. Lopes LB. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics* 2014; 6: 52–77.
94. Lopes LB, Lopes JLC, Oliveira DCR, Thomazini JA, Garcia MTJ, Fantini MCA *et al.* Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: Characterization and study of in vitro and in vivo delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 63: 146–155.
95. López-Hernández J, Paseiro-Losada P, Sanches-Silva AT, Lage-Yusty MA. Study of the changes of trans-resveratrol caused by ultraviolet light and determination of trans- and cis-resveratrol in Spanish white wines. *Eur Food Res Technol* 2007; 225: 789–796.
96. Lu Z, Cheng B, Hu Y, Zhang Y, Zou G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. *Food Chem* 2009; 113: 17–20.
97. Ma H, Yu M, Tan F, Li N. Improved percutaneous delivery of azelaic acid employing microemulsion as nanocarrier: formulation optimization, in vitro and in vivo evaluation. *RSC Adv* 2015; 5: 28985–28995.
98. El Maghraby GM, Arafa MF, Osman M a. Microemulsion for simultaneous transdermal delivery of benzocaine and indomethacin: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Dev Ind Pharm* 2014; 40: 1637–44.
99. Marjukka Suhonen T, A. Bouwstra J, Urtti A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J Control Release* 1999; 59: 149–161.
100. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 2012; 8: 1719.
101. McDermott MM, Leeuwenburgh C, Guralnik JM, Tian L, Sufit R, Zhao L *et al.* Effect of Resveratrol on Walking Performance in Older

- People With Peripheral Artery Disease. *JAMA Cardiol* 2017; 60611: 1–6.
102. Mohammed D, Matts PJ, Hadgraft J, Lane ME. In Vitro–In Vivo Correlation in Skin Permeation. *Pharm Res* 2014; 31: 394–400.
 103. Montenegro L, Lai F, Offerta A, Sarpietro MG, Micicche L, Maccioni AM *et al.* From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. *J Drug Deliv Sci Technol* 2016; 32: 100–112.
 104. Muzaffar F, Singh UK, Chauhan L. Review on microemulsion as futuristic drug delivery. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013; 5: 39–53.
 105. Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: Overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci Technol Today* 2000; 3: 318–326.
 106. Nguyen C, Savouret J-F, Widerak M, Corvol M-T, Rannou F. Resveratrol, Potential Therapeutic Interest in Joint Disorders: A Critical Narrative Review. *Nutrients* 2017; 9: 45.
 107. Norlén L, Plasencia I, Bagatolli L. Stratum corneum lipid organization as observed by atomic force, confocal and two-photon excitation fluorescence microscopy. *Int J Cosmet Sci* 2008; 30: 391–411.
 108. Nour V, Trandafir I, Muntean C. Ultraviolet irradiation of trans-resveratrol and HPLC determination of trans-resveratrol and cis-resveratrol in romanian red wines. *J Chromatogr Sci* 2012; 50: 920–927.
 109. Okur NÜ, Özdemir Dİ, Kahyaoğlu ŞG, Şenyiğit ZA, Aşıkoğlu M, Genç L *et al.* Assessment of aprotinin loaded microemulsion formulations for parenteral drug delivery: Preparation, characterization, in vitro release and cytotoxicity studies. *Curr Drug Deliv* 2015; 12: 668–679.
 110. Orallo F. Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Curr Med Chem* 2006; 13: 87–98.
 111. Pagliara A, Reist M, Geinoz S, Carrupt PA, Testa B. Evaluation and prediction of drug permeation. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 1339–1357.
 112. Pappinen S, Pryazhnikov E, Khiroug L, Ericson MB, Yliperttula M, Urtti A. Organotypic cell cultures and two-photon imaging: Tools for in vitro and in vivo assessment of percutaneous drug delivery and skin toxicity. *J Control Release* 2012; 161: 656–667.
 113. Park K, Lee JH. Protective effects of resveratrol on UVB-irradiated HaCaT cells through attenuation of the caspase pathway. *Oncol Rep* 2008; 19: 413–417.

114. Patel HK, Barot BS, Parejiya PB, Shelat PK, Shukla A. Topical delivery of clobetasol propionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: Ex vivo permeation and skin irritation studies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2013; 102: 86–94.
115. Patel MR, Patel RB, Parikh JR, Solanki AB, Patel BG. Effect of Formulation Components on the In Vitro Permeation of Microemulsion Drug Delivery System of Fluconazole. *AAPS PharmSciTech* 2009; 10: 1266–1275.
116. Pathan I, Setty C. Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems. *Trop J Pharm Res* 2009; 8: 173–179.
117. Paulo L, Domingues F, Queiroz JA, Gallardo E. Development and validation of an analytical method for the determination of trans- and cis-resveratrol in wine: analysis of its contents in 186 Portuguese red wines. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 2157–2168.
118. Pegi A, Julijana K, Slavko P, Janez Š, Marjeta Š. The effect of lipophilicity of spin-labeled compounds on their distribution in solid lipid nanoparticle dispersions studied by electron paramagnetic resonance. *J Pharm Sci* 2003; 92: 58–66.
119. Pentek T, Newenhouse E, O'Brien B, Chauhan A. Development of a Topical Resveratrol Formulation for Commercial Applications Using Dendrimer Nanotechnology. *Molecules* 2017; 22: 137.
120. Pereira-Lachataignerais J, Pons R, Panizza P, Courbin L, Rouch J, Lopez O. Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method. *Chem Phys Lipids* 2006; 140: 88–97.
121. Politis SN, Colombo P, Colombo G, Rekkas DM. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Dev Ind Pharm* 2017; 9045: 1–36.
122. Polonini HC, Bastos C de A, Oliveira MAL de, Silva CGA da, Collins CH, Brandão MAF *et al.* In vitro drug release and ex vivo percutaneous absorption of resveratrol cream using HPLC with zirconized silica stationary phase. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2014; 947–948: 23–31.
123. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1261–1268.
124. Reuter J, Merfort I, Schempp CM. Botanicals in Dermatology. *Am J Clin Dermatol* 2010; 11: 1.
125. Rhee YS, Choi JG, Park ES, Chi SC. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. *Int J Pharm* 2001; 228: 161–170.
126. Roberts M, Mohammed Y, Pastore M, Namjoshi S, Yousef S, Alinaghi A *et al.* Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *J*

- Control Release 2017; 247: 86–105.
127. Robinson K, Mock C, Liang D. Pre-formulation studies of resveratrol. *Drug Dev Ind Pharm* 2015; 41: 1464–1469.
 128. Saeed AK, Salmo N. Epidermal growth factor receptor expression in mice skin upon ultraviolet B exposure - Seborrheic Keratosis as a coincidental and unique finding. *Adv Biomed Res* 2012; 1: 59.
 129. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res - Rev Mutat Res* 2008; 658: 68–94.
 130. Salimi A, Zadeh BSM, Moghimipour E. Preparation and characterization of cyanocobalamin (Vit B12) microemulsion properties and structure for topical and transdermal application. *Iran J Basic Med Sci* 2013; 16: 865–872.
 131. Santos P, Watkinson AC, Hadgraft J, Lane ME. Application of microemulsions in dermal and transdermal drug delivery. *Skin Pharmacol Physiol* 2008; 21: 246–259.
 132. Sapino S, Carlotti ME, Caron G, Ugazio E, Cavalli R. In silico design, photostability and biological properties of the complex resveratrol/hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2009; 63: 171–180.
 133. Sarhan O, Ibrahim MM, Mahdy M. Microemulsions as antidiabetic drug delivery systems. *Int J Pharm Sci Res* 2012; 2012: 4442–4456.
 134. Sasivimolphon P, Lipipun V, Ritthidej G, Chitphet K, Yoshida Y, Daikoku T *et al.* Microemulsion-Based Oxyresveratrol for Topical Treatment of Herpes Simplex Virus (HSV) Infection: Physicochemical Properties and Efficacy in Cutaneous HSV-1 Infection in Mice. *AAPS PharmSciTech* 2012; 13: 1266–1275.
 135. Scalia S, Trotta V, Iannuccelli V, Bianchi A. Enhancement of in vivo human skin penetration of resveratrol by chitosan-coated lipid micro-particles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015; 135: 42–49.
 136. Schwarz JC, Klang V, Hoppel M, Mahrhauser D, Valenta C. Natural microemulsions: Formulation design and skin interaction. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 81: 557–562.
 137. Sha R, Wu Y, Cai C, Mao J, Liu S, Wang W. Preparation of a Nanoscale Garlic Oil Microemulsion and Its Antioxidant Activity. *Nanosci Nanotechnol Lett* 2017; 9: 123–133.
 138. Shafiq-un-Nabi S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ali J, Baboota S, Ahuja A *et al.* Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: A technical note. *AAPS PharmSciTech* 2007; 8: 12–17.

139. Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. 2007; 66: 227–243.
140. Shah RM, Malherbe F, Eldridge D, Palombo EA, Harding IH. Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique. *J Colloid Interface Sci* 2014; 428: 286–294.
141. Shah V, Sharma M, Pandya R, Parikh RK, Bharatiya B, Shukla A *et al*. Quality by Design approach for an in situ gelling microemulsion of Lorazepam via intranasal route. *Mater Sci Eng C* 2017; 75: 1231–1241.
142. Shakeel F, Ramadan W, Faisal M, Rizwan M, Faiyazuddin M, Mustafa G *et al*. Transdermal and Topical Delivery of Anti-inflammatory Agents Using Nanoemulsion/Microemulsion: An Updated Review. *Curr Nanosci* 2010; 6: 184–198.
143. Shi G, Rao L, Yu H, Xiang H, Yang H, Ji R. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *Int J Pharm* 2008; 349: 83–93.
144. Shrotriya SN, Ranpise NS, Vidhate B V. Skin targeting of resveratrol utilizing solid lipid nanoparticle-engrossed gel for chemically induced irritant contact dermatitis. *Drug Deliv Transl Res* 2016.
145. Silva P, Bonifácio B, Ramos M, Negri K, Maria Bauab T, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine* 2013; 9: 1-15.
146. Singh CK, Liu X, Ahmad N. Resveratrol, in its natural combination in whole grape, for health promotion and disease management. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1348: 150–160.
147. Singh D, Mital N, Kaur G. Topical drug delivery systems: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2016; 26: 213–228.
148. Singh G, Pai RS. Trans-resveratrol self-nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced bioavailability potential: optimization, pharmacokinetics and in situ single pass intestinal perfusion (SPIP) studies. *Drug Deliv* 2015; 22: 522–530.
149. Singh V, Bushettii SS, Appala Raju S, Ahmad R, Singh M, Bisht A. Microemulsions as promising delivery systems: A Review. *Indian J Pharm Educ Res* 2011; 45: 392–401.
150. Sinico C, Pireddu R, Pini E, Valenti D, Caddeo C, Fadda AM *et al*. Enhancing Topical Delivery of Resveratrol through a Nanosizing Approach. *Planta Med* 2016.
151. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*

- 2016; 8: 409–427.
152. Subbaramaiah K, Michaluart P, Chung WJ, Tanabe T, Telang N, Dannenberg AJ. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 889: 214–223.
 153. Talegaonkar S, Azeem A, Ahmad F, Khar R, Pathan S, Khan Z. Microemulsions: A Novel Approach to Enhanced Drug Delivery. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2008; 2: 238–257.
 154. Tarr BD, Yalkowsky SH. Enhanced Intestinal Absorption of Cyclosporine in Rats Through the Reduction of Emulsion Droplet Size. *Pharm Res* 1989; 6: 40–43.
 155. Teskač K, Kristl J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int J Pharm* 2010; 390: 61–69.
 156. Thakkar PJ, Madan P, Lin S. Transdermal delivery of diclofenac using water-in-oil microemulsion: formulation and mechanistic approach of drug skin permeation. *Pharm Dev Technol* 2014; 19: 373–384.
 157. Trommer H, Neubert RHH. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19: 106–121.
 158. Uchechi O, Ogbonna JDN, Attama AA. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. In: *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. InTech, 2014, pp 193–235.
 159. Varache-Lembège M, Teguo PW, Richard T, Monti JP, Deffieux G, Vercauteren J *et al*. Structure-activity relationships of polyhydroxystilbene derivatives extracted from vitis vinifera cell culture as inhibitors of human platelet aggregation. *Med Chem Res* 2000; 10.
 160. Vilar-Pereira G, Carneiro VC, Mata-Santos H, Vicentino ARR, Ramos IP, Giarola NLL *et al*. Resveratrol Reverses Functional Chagas Heart Disease in Mice. *PLOS Pathog* 2016; 12: 1-19.
 161. Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP *et al*. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 495–504.
 162. Vitale N, Kisslinger A, Paladino S, Procaccini C, Matarese G, Pierantoni GM *et al*. Resveratrol Couples Apoptosis with Autophagy in UVB-Irradiated HaCaT Cells. *PLoS One* 2013; 8: 1-13.
 163. Walle T, Hsieh F, Delegge MH, Oatis JE, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab isposition* 2004; 32: 1377–1382.
 164. Walters RM, Mao G, Gunn ET, Hornby S. Cleansing Formulations That Respect Skin Barrier Integrity. *Dermatol Res Pract* 2012; 2012: 1–9.

165. Wu X, Guy RH. Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics. *J Drug Deliv Sci Technol* 2009; 19: 371–384.
166. Zhu W, Guo C, Yu A, Gao Y, Cao F, Zhai G. Microemulsion-based hydrogel formulation of penciclovir for topical delivery. *Int J Pharm* 2009; 378: 152–158.
167. Zillich OV., Schweiggert-Weisz U, Hasenkopf K, Eisner P, Kerscher M. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *Int J Cosmet Sci* 2013; 35: 491–501.
168. Žilius M. Dermatologinių puskiečių formų su propolio produktais modeliavimas, optimizavimas ir biofarmacinis vertinimas. 2014.
169. Žilius M, Ramanauskiene K, Briedis V. Release of propolis phenolic acids from semisolid formulations and their penetration into the human skin in vitro. *Evidence-based Complement Altern Med* 2013; 2013: 1–7
170. Žilius M, Ramanauskienė K, Juškaitė V, Briedis V. Formulation of Propolis Phenolic Acids Containing Microemulsions and Their Biopharmaceutical Characterization. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2016; 2016: 1–7.

DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Straipsniai leidiniuose, referuojamuose duomenų bazėje „Clarivate Analytics Web of Science“ ir turinčiuose citavimo rodiklį:

1. Vaida Juškaitė, Kristina Ramanauskienė, Vitalis Briedis. Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM. 2015, p. 1–10.
2. Vaida Juškaitė, Kristina Ramanauskienė, Vitalis Briedis. Testing of resveratrol microemulsion photostability and protective effect against UV induced oxidative stress. Acta pharmaceutica. 2017, vol. 67, no. 2, p. 247–256.

Konferencijų tezės:

1. Vaida Juškaitė, Kristina Ramanauskienė, Vitalis Briedis. Optimization and stability studies of microemulsion with resveratrol. PBP World Meeting – 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. 2016 m., balandžio mėn. 4–7 d., Glazgas, Škotija.
2. Vaida Juškaitė, Kristina Ramanauskienė, Vitalis Briedis. Fractional compositions fluctuations of microemulsions containing resveratrol. Baltic. Bled. Balaton. Bosphorus: 6th BBBB Conference on pharmaceutical sciences “Strategies to improve the quality and performance of modern drug delivery systems”. 2015 m., rugsėjo mėn. 10–12 d., Helsinkis, Suomija.
3. Vaida Juškaitė, Modestas Žilius, Kristina Ramanauskienė, Vitalis Briedis. Optimization of microemulsion composition applying experimental planning. “1st European Conference on Pharmaceutics Drug Delivery”. 2015 m., balandžio mėn. 13–14 d., Reimsas, Prancūzija.
4. Vaida Juškaitė, Kristina Ramanauskienė, Vitalis Briedis. Penetration of resveratrol into human skin ex vivo (II). Skin Forum 14th Annual Meeting “Percutaneous penetration – measurement, modulation and modelling”. 2014 m. rugsėjo mėn. 4–5 d., Praha, Čekija.
5. Vaida Juškaitė, Kristina Ramanauskienė, Vitalis Briedis. Penetration of resveratrol into human skin ex vivo (I). The 4th international conference on pharmaceutical sciences and pharmacy practice dedicated to the 75th anniversary of Lithuanian Pharmacopoeia. 2013 m., lapkričio mėn. 23 d., Kaunas, Lietuva.

Research Article

Design and Formulation of Optimized Microemulsions for Dermal Delivery of Resveratrol

Vaida Juškaitė, Kristina Ramanauskienė, and Vitalis Briedis

Department of Clinical Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, Eivenių Street 4, 50161 Kaunas, Lithuania

Correspondence should be addressed to Vaida Juškaitė; vaida.juskaite@ismuni.lt

Received 30 April 2015; Revised 12 July 2015; Accepted 13 August 2015

Academic Editor: Nianping Feng

Copyright © 2015 Vaida Juškaitė et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The objective of this study was to formulate optimal formulations of microemulsions (MEs) and evaluate their feasibility for delivery of resveratrol into human skin *ex vivo*. Oil-in-water MEs were formulated using surfactant (S) PEG-8 caprylic/capric glycerides and cosurfactant (CoS) polyglyceryl-6-isostearate. Ethyl oleate was used as an oily phase. MEs were formulated using 5:1, 6:1, and 7:1 surfactant and cosurfactant (S:CoS) weight ratios. Pseudoternary phase diagrams were constructed and optimal compositions of MEs were obtained using Design Expert software. Mean droplet size for optimized ME formulations was determined to be 68.54 ± 1.18 nm, 66.08 ± 0.16 nm, and 66.66 ± 0.56 nm for systems with S:CoS weight ratios 5:1, 6:1, and 7:1, respectively. Resveratrol loading resulted in mean droplet size increase. The distribution of droplet size between fractions changed during storage of formulated MEs. Results demonstrated the increase of number of droplets and relative surface area when S:CoS weight ratios were 6:1 and 7:1 and the decrease when S:CoS weight ratio was 5:1. The highest penetration of resveratrol into the skin *ex vivo* was determined from ME with S:CoS weight ratio 5:1. It was demonstrated that all MEs were similar in their ability to deliver resveratrol into the skin *ex vivo*.

1. Introduction

Skin is a universal barrier protecting living organism from harmful outer factors that are considered as one of the main causes for pathology development. There are numerous skin diseases like erythema and skin cancer or common skin aging that are considered to be caused mainly by UV radiation [1]; thus local delivery of protective agents into the outer layers of the skin could be considered as one of possible solutions. Microemulsions (MEs) are considered as promising drug delivery systems due to their easy formulation, thermodynamic stability, and ability to facilitate delivery of lipophilic and hydrophilic drugs into the skin [2, 3]. MEs consist of aqueous and oily phases, and the disperse system is stabilized by surfactant and cosurfactant components. The composition and the quantities of the MEs components, as well as the included active substances, affect MEs droplets size and its distribution and viscosity that in turn can influence the penetration of the drug into the skin. Surfactant and cosurfactant can act as drug penetration enhancers

disrupting the lipids of stratum corneum [3]. It is well established that high concentrations of surfactants can cause skin irritations; accordingly adequate choice of surfactants is a challenge in MEs formulation, and therefore possible effects of qualitative and quantitative composition of surface active components in MEs have to be evaluated, extending their effects on the characteristics of disperse system. PEG-8 caprylic/capric glycerides are nonionic surface active agents and were chosen for stabilization of MEs because of low toxicity and low potential to induce skin irritation [2, 4]. Polyglyceryl-6-isostearate was chosen as cosurfactant in MEs formulation consequently allowing reduction of surfactant amount. The choice of oily phase in MEs is significantly influenced by the lipophilicity of the drug. The lipophilic drug should demonstrate sufficient solubility in the oily phase and is more efficiently delivered into the skin by oil-in-water (O/W) type MEs [5].

Resveratrol was used as a model active substance considering its physiochemical characteristics and possible application in prevention of skin pathology development.

Resveratrol is a natural polyphenolic compound, which has demonstrated high antioxidant activity, and can reduce UV causing skin ageing [6, 7]. However the available scientific data show that penetration of polyphenols into the skin is limited due to their poor solubility [8]. Similar solubility problems are intrinsic for resveratrol, and therefore innovative solutions have to be applied with the aim of improving its penetration into skin. For this reason, it is necessary to improve permeation of resveratrol into the skin. Some trials have been performed to formulate MEs and apply them to achieve improved penetration of resveratrol into the skin, and increased penetration has been demonstrated, especially into the dermis [8, 9]. However, further research in the area of possible applications of MEs for drug delivery into the skin is considered relevant as additional data could support better understanding of processes involved in formation of MEs and mechanisms resulting in changes in skin penetration by drug substances.

The aim of this study was to assess possibility of designing optimized formulations of MEs and to evaluate their feasibility for incorporation and dermal delivery of resveratrol into the human skin *ex vivo*. Traditionally MEs development requires extensive testing of numerous experimental formulations. This challenge was attempted to be solved by applying pseudoternary phase diagrams and D-optimal design model (Design Expert software, version 6.0.8; Stat-Ease, Inc., MN, USA) thus minimizing the number of experiments, resources, and time necessary for formulation of optimal MEs.

2. Materials and Methods

2.1. Materials. Analytical grade transresveratrol was purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Resveratrol was procured from Naturex (Avignon, France). PEG-8 caprylic/capric glycerides (Labrasol) and polyglyceryl-6-isostearate (Pluril isostearique) were obtained from Gattefosse (Saint-Priest, France) and used as a surfactant and a cosurfactant, respectively. Ethyl oleate, isopropyl palmitate, isopropyl myristate, oleic acid, and olive oil were used as an oily phase in ME and were purchased from Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Germany) and Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Ultrapure water was used as an aqueous phase and was produced using a water purification system Millipore Simplicity (Bedford, USA). Chromatographic grade acetonitrile and acetic acid were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany).

2.2. Quantitative Determination of Transresveratrol. HPLC method for quantitative determination of transresveratrol was developed and validated using Agilent 1260 Infinity Capillary LC (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) with diode array detector. Separation was performed on Zorbax C18 column (150 × 0.5 mm, 5 µm) using water and acetonitrile (75:25, v/v) with 0.5% acetic acid as mobile phase under isocratic conditions. The applied flow rate was 10 µL/min. The temperature of the column was maintained

TABLE 1: Quantitative ranges of components in formulated microemulsions.

ME components	Function	Amount, %
Water	Aqueous phase	35–45
Ethyl oleate	Oily phase	5–15
PEG-8 caprylic/capric glycerides and polyglyceryl-6-isostearate	Surfactant and cosurfactant	45–60

at 25°C. Determination of resveratrol was performed at 306 nm wavelength. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.038 µg/mL and 0.125 µg/mL, respectively. The linear range of transresveratrol quantification was established from 0.125 µg/mL to 31.590 µg/mL. The coefficient of determination (R^2) was 1.000.

2.3. Determination of Resveratrol Solubility. An excessive amount of resveratrol was added to 10 g of ethyl oleate, isopropyl palmitate, isopropyl myristate, oleic acid, olive oil (oily phase), or PEG-8 caprylic/capric glycerides (surfactant), and saturated solutions were produced by mixing in shaking incubator (GFL, Germany) for 72 hours at 37 ± 1°C. Undissolved fraction of resveratrol was separated by centrifugation at 6000 rpm for 10 minutes using Eppendorf Centrifuge 5810R (Hamburg, Germany) [4]. Quantity of dissolved resveratrol was determined by HPLC after dilution with ethanol. Resveratrol solubility determination was performed in triplicate.

2.4. Pseudoternary Phase Diagram Construction and Optimization. Quantitative ratio of components for oil-in-water (O/W) type MEs was set referring to available scientific data [2, 5, 10]. The suitability of amounts of surfactant, cosurfactant, oily, and aqueous phases for formulation of oil-in-water (O/W) type MEs was confirmed by initial experimental testing, and ranges of quantities are presented in Table 1.

Stability of formulated MEs was evaluated visually at room temperature, and pseudoternary phase diagrams were constructed. The compositions of MEs for optimization were generated by applying D-optimal design model [11, 12], and 14 experimental formulations were produced for compositions containing surfactant and cosurfactant in 5:1, 6:1, and 7:1 ratios. Optimization of experimental MEs was performed setting three criteria as important: (a) MEs droplet size in range from 1 nm to 100 nm; (b) single peak distribution of droplet size; (c) minimum deviation from the mean of the droplet size value.

2.5. Formulation of Microemulsions. MEs were formulated using oil titration method at room temperature. Mixtures of surfactant and cosurfactant at different ratios were added to water and mixed by magnetic stirrer IKAMAG C-MAG HS7 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Germany) at 1250 rpm for 10 minutes resulting in opalescent liquid. Oily phase was added by drops under stirring till clear and fluid formulations were

obtained. All prepared MEs were stored 24 hours at room temperature for equilibration [13].

2.5.1. Formulation of Microemulsions Containing Resveratrol. Incorporation of resveratrol into MEs was performed by dissolving resveratrol in oily phase and surfactant, as described under Section 2.3 (solubility study of resveratrol in oils and surfactant). Resveratrol containing surfactant and cosurfactant were mixed in different ratios adding calculated amount of water. Then oily phase containing dissolved resveratrol was added by drops, and optimized composition MEs with resveratrol were formulated (MEs-RES). Target content of resveratrol in MEs was set to be 2%. Predominant quantity of resveratrol was incorporated into MEs with surfactant.

2.6. Physical Characterization of Microemulsions. Quality of MEs was evaluated by evaluating droplet size, viscosity, pH, conductivity, and oil-in-water (O/W) type. Mean value of droplet size and polydispersity index (PDI) of formulated MEs were measured applying dynamic light scattering technique, using Zetasizer Nano ZS particle size analyzer (Malvern, UK). Measurements were performed at 25°C temperature.

Viscosity was determined using Vibro-Viscometer SV-10 (I&D Company, Limited, Japan), and pH was measured at room temperature, using pH-meter 766 (Knick, Germany).

Microstructure of the system (water-in-oil or oil-in-water) was determined using lipophilic (Sudan I) and hydrophilic (Methylene blue) dyes. Type of microemulsion was confirmed performing conductivity determination at room temperature using conductivity meter (Cond 3110 SET 1, Germany).

2.7. Thermodynamic Stability Studies of Microemulsions. Thermodynamic stability studies were applied to evaluate MEs physical stability. The formulations were centrifuged at 3500 rpm for 30 min and homogeneity of the MEs was evaluated. Heating-cooling and freeze-thaw cycles [14] were applied to evaluate MEs thermodynamic stability. MEs were stored at 4°C, 20°C, 32°C, and 45°C for not less than 48 hours in heating-cooling cycle, and at -21°C, 4°C, and 25°C for not less than 48 hours at each temperature regimen in freeze-thaw cycle. Homogeneity of the MEs was evaluated after storage of each of the temperature regimens in both heating-cooling and freeze-thaw cycles.

2.8. Ex Vivo Resveratrol Skin Permeation Studies. Caucasian woman (age range 25–40 years) abdominal skin was obtained from the Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Hospital of Lithuanian University of Health Science, Kauno Klinikos. The studies of transdermal permeation were performed in accordance with the permission of Kaunas regional Biomedical Research Ethics Committee. The skin was kept at -20°C for less than 6 months before use in the study. Skin permeation *ex vivo* studies ($n = 6$) were performed using Bronaugh type flow-through diffusion cells with full thickness human skin. Diffusional area in the cell was 0.64 cm². The cells were equilibrated for 12 hours using thermostated

TABLE 2: The solubility of transresveratrol in oils and surfactant ($n = 3$).

Phase type	Excipient	Solubility (mg/g)
Oily	Isopropyl myristate	0.49 ± 0.05
	Isopropyl palmitate	0.41 ± 0.04
	Ethyl oleate	0.42 ± 0.07
	Oleic acid	0.07 ± 0.01
	Olive oil	0.20 ± 0.01
Surfactant	PEG-8 caprylic/capric glycerides	83.85 ± 7.66

circulating water bath Grant GD120 (Grant Instruments Ltd., UK) at 37°C temperature. Peristaltic pump (Masterflex L/S) with a multichannel pump head (Cole-Parmer Instrument Co., USA) was used to circulate acceptor phase, consisting of 0.9% NaCl to create physiological tonicity and 0.005% NaN₃ to prevent microbial growth. Infinite dose of resveratrol in solvents or MEs (200 mg) was applied on the outer surface of the skin. Resveratrol containing media was removed after 24 h, and skin surface was washed twice with 500 µL 96% ethanol and 3 times with 0.9% NaCl. Epidermis was peeled off from dermis after application of preheated metal surface (approx. 60°C) for 1–2 seconds on epidermis side [15–17]. Extraction of resveratrol from epidermis and dermis was performed using methanol (HPLC grade) under sonication.

2.9. Statistical Analysis. MEs optimization was performed using experiment planning software Design-Expert 6.0.8, D-optimal design model. Statistical analysis of experimental data was performed using SPSS software (version 19.0) and Microsoft Office Excel 2013. One way ANOVA (Turkey's Honestly Significant Difference criteria) was used for statistical analysis. Spearman's rank coefficient was used for correlation analysis. Statistically significant difference was determinate when value of $P < 0.05$.

3. Results and Discussion

The evaluation of solubility of transresveratrol revealed significantly higher solubility in surfactant if compared to oily phases used in ME formulation (Table 2). Results demonstrated that solubility of resveratrol in surfactant was 83.85 ± 7.66 mg/g, while determined solubility of resveratrol in tested oily phases showed that it has not exceeded 0.5 mg/g thus being up to 160-fold lower if compared to PEG-8 caprylic/capric glycerides. No statistically significant difference ($P > 0.05$) was determined for solubility of resveratrol in ethyl oleate (0.42 ± 0.07 mg/g), isopropyl palmitate (0.41 ± 0.04 mg/g), and isopropyl myristate (0.49 ± 0.05 mg/g).

Ethyl oleate was chosen as an oily phase for formulation of MEs as available data demonstrate maximum efficiency of PEG-8 caprylic/capric glycerides solubilizing capacity of ethyl oleate instead of isopropyl myristate [18].

With the reference to applied approaches for formulation of MEs the S:CoS weight ratios 1:1, 2:1, 3:1, 5:1, 6:1, and 7:1 were chosen and used in 40, 50, 60, and 70% in MEs [8, 19]. Stable MEs were formed using S:CoS weight ratios 1:1, 2:1,

TABLE 3: Compositions of MEs with S:CoS 5:1, generated by D-optimal design model and measured responses.

Number	Components of MEs %			Mean droplet size, nm	Standard deviation, nm	Number of peaks
	S:CoS 5:1	Water	Oil			
1	52.5	37.5	10.0	70.50	54.98	1
2	50.0	45.0	5.0	49.14	72.82	1
3	45.0	45.0	10.0	50.29	81.27	2
4	60.0	35.0	5.0	86.98	50.90	1
5	50.0	35.0	15.0	79.16	63.49	1
6	45.0	40.0	15.0	74.22	88.06	2
7	55.0	40.0	5.0	61.16	50.83	1
8	48.8	42.5	8.8	67.80	71.23	1
9	48.8	38.8	12.5	57.36	66.28	1
10	55.0	35.0	10.0	79.45	46.94	1
11	60.0	35.0	5.0	84.45	63.02	1
12	50.0	35.0	15.0	81.31	68.77	1
13	50.0	45.0	5.0	51.09	92.49	1
14	45.0	45.0	10.0	50.60	79.10	2

TABLE 4: Compositions of MEs with S:CoS 6:1, generated by D-optimal design model and measured responses.

Number	Components of MEs %			Mean droplet size, nm	Standard deviation, nm	Number of peaks
	S:CoS 6:1	Water	Oil			
1	60.0	35.0	5.0	78.08	46.55	1
2	46.0	39.0	15.0	76.16	77.73	2
3	50.0	45.0	5.0	48.78	55.01	1
4	50.0	35.0	15.0	79.51	64.93	1
5	46.0	45.0	9.0	48.54	80.31	1
6	52.7	39.9	7.4	60.47	51.16	1
7	55.0	35.0	10.0	75.89	46.95	1
8	48.2	40.9	10.9	59.65	67.01	1
9	50.2	37.4	12.4	69.01	61.74	1
10	50.2	42.4	7.4	55.36	58.29	1
11	50.0	45.0	5.0	48.51	54.26	1
12	46.0	39.0	15.0	75.17	83.72	2
13	60.0	35.0	5.0	77.51	47.03	1
14	46.0	45.0	9.0	48.74	77.03	1

and 3:1 when the total quantity of surface active agents was 60% and higher. High concentrations of surface active agents in MEs are recognized to represent main risk factor for skin irritation and thus should be avoided in formulation of products for topical application [3, 18, 20]. These S:CoS weight ratios were not chosen for further testing because of insufficient stability of MEs at concentrations of surface active agents lower than 60%. Separation of phases in MEs was observed when the applied S:CoS (weight ratios 5:1, 6:1, and 7:1) quantity was 40%, thus it was decided to increase gradually the quantity of surface active agents till formation of stable MEs. Formulations of MEs retained stability when S:CoS weight ratio was 5:1, and concentration of S:CoS was higher than 45% content. Phase separation in MEs was observed after 24 h when S:CoS weight ratio was 6:1 or 7:1 (aqueous phase 40%, oily phase 15%). Increase of S:CoS content to 46% resulted in formation of stable MEs.

The design of experiment was applied to define the minimum number of experimental compositions of O/W type MEs in the defined region of pseudoternary phase diagram. The input of limit values for MEs forming components (Table 1) produced 14 experimental formulations for compositions containing S:CoS in 5:1, 6:1, and 7:1 weight ratios (Tables 3, 4, and 5).

The gray area in Figure 1 represents range where 14 software generated compositions of MEs were located and formation of stable MEs was expected.

Formulated MEs were evaluated regarding mean droplet size, single peak distribution of droplet size, and minimum deviation from the mean of droplet size value (Tables 3, 4, and 5). Measurements of MEs' droplet size of 14 experimental formulations demonstrated that droplet size mean value was in the range 49.14–86.98 nm, when S:CoS weight ratio was 5:1. Smaller mean values of droplet size were determined for

TABLE 5: Compositions of MEs with S : CoS 7 : 1, generated by D-optimal design model and measured responses.

Number	Components of MEs %			Mean droplet size, nm	Standard deviation, nm	Number of peaks
	S : CoS 7 : 1	Water	Oil			
1	60.0	35.0	5.0	76.12	45.56	1
2	46.0	39.0	15.0	77.69	77.72	2
3	50.0	45.0	5.0	47.68	51.93	1
4	50.0	35.0	15.0	79.94	64.64	1
5	46.0	45.0	9.0	47.67	71.18	1
6	52.7	39.9	7.4	59.00	50.04	1
7	55.0	35.0	10.0	74.88	45.91	1
8	48.2	40.9	10.9	58.89	65.12	1
9	50.2	37.4	12.4	68.01	56.20	1
10	50.2	42.4	7.4	54.07	55.33	1
11	50.0	45.0	5.0	47.75	51.11	1
12	46.0	39.0	15.0	77.19	80.39	2
13	60.0	35.0	5.0	75.79	43.84	1
14	46.0	45.0	9.0	47.95	74.35	1

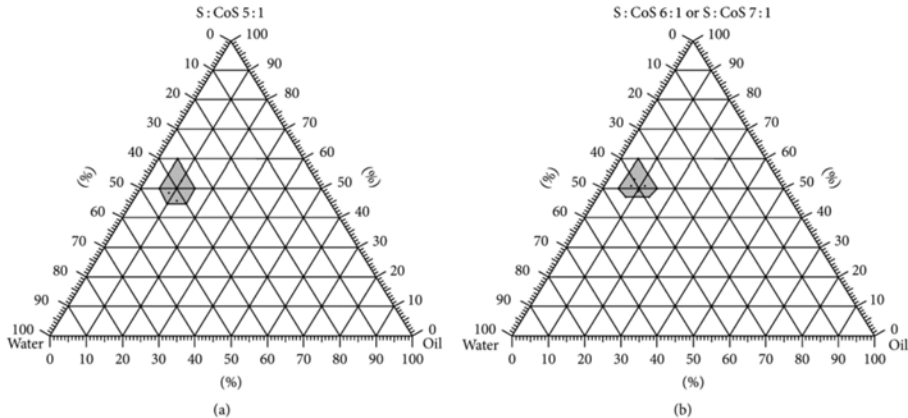


FIGURE 1: Pseudoternary phase diagrams of ranges of stable MEs when PEG-8 caprylic/capric glycerides and polyglyceryl-6-isostearate are used at ratios 5 : 1 (a), 6 : 1, and 7 : 1 (b).

MEs containing S : CoS in ratio 6 : 1 (48.51–79.51 nm), and for MEs containing S : CoS in ratio 7 : 1 (47.67–79.94 nm). This supports assignment of produced disperse systems to MEs [20]. Characterization of formulated MEs was performed by evaluating homogeneity of the disperse phase in the systems. Presence of two-peak droplet distribution pattern was determined in certain formulations of experimental MEs with S : CoS weight ratio 5 : 1. The PDI values of MEs with single peak distribution of droplet size were relatively low (0.248–0.379), indicating the homogeneity of disperse phase in MEs formulations [14].

Thermodynamic stability studies demonstrated satisfactory stability of experimental formulations as all prepared

MEs remained transparent, no creaming, cracking, precipitation, or phase separation has been observed, and consequently were included in optimization program.

Suitability and significance of mathematical model were confirmed by statistical parameters (R^2 , adjusted R^2 , predicted R^2 , standard deviation, and predicted residual error sum of squares), and optimization of formulations was performed applying desirability function. Desirability of parameter ranged from 0 to 1, with values verging towards 1 representing the most desired.

All optimal compositions of MEs, used for further investigations, are demonstrated in Figure 2. The highest desirability value of 0.91 was identified for single optimal

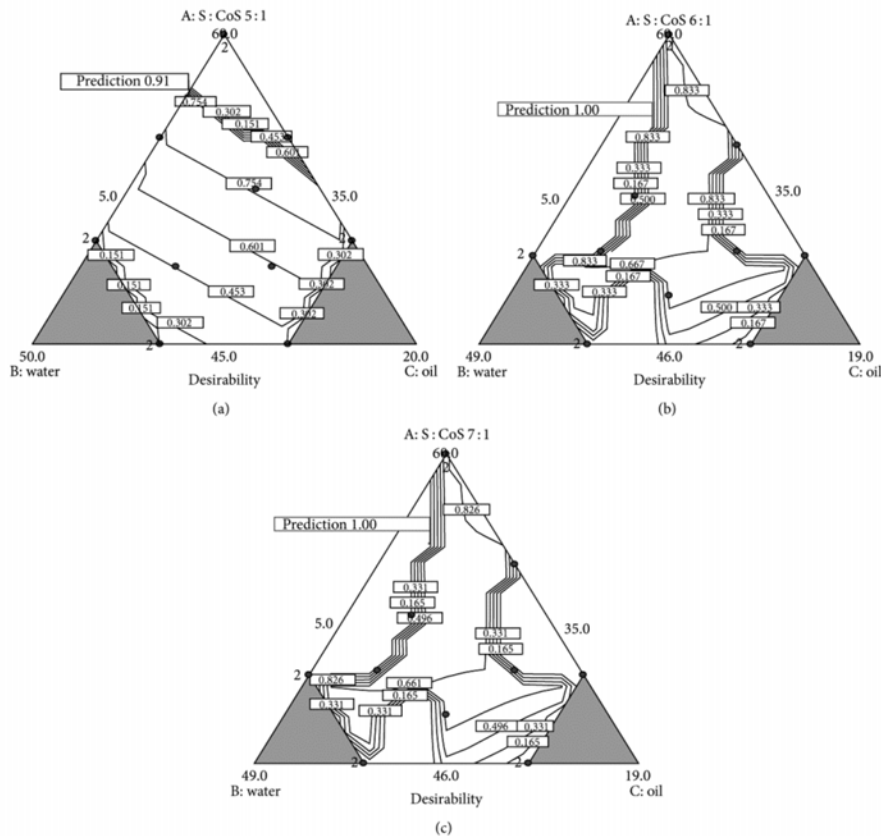


FIGURE 2: Areas of optimal composition of MEs with highest desirability parameter for compositions with ratios of PEG-8 caprylic/capric glycerides and polyglyceryl-6-isostearate, 5:1 (a), 6:1 (b), and 7:1 (c).

composition of MEs with S:CoS weight ratio 5:1, and this composition was accepted for further testing (Figure 2(a)). Five and seven optimal compositions with desirability value of 1 were produced for MEs with S:CoS ratios 6:1 and 7:1, respectively. Therefore one optimal composition for MEs with S:CoS ratios 6:1 and 7:1 was selected considering the ability to incorporate high quantity of oily phase as an additional factor ensuring high loading of resveratrol (Figures 2(b) and 2(c)). Selected optimal compositions of MEs are presented in Table 6.

The concept of the model was confirmed by formulating and evaluating optimized MEs with predefined quantitative composition. The O/W type of optimized MEs was confirmed by using lipophilic (Sudan I) and hydrophilic (Methylene blue) dyes. Comparison of theoretically designed characteristics and results of determination of droplet characteristics in formulated MEs is presented in Table 7.

TABLE 6: Optimal compositions of microemulsions (OPT-MEs) with different S:CoS weight ratios.

Sample	S:CoS amount, %	Water amount, %	Oil amount, %
OPT-ME 5:1	57	38	5
OPT-ME 6:1	55,5	37,9	6,6
OPT-ME 7:1	56	37,6	6,4

The determined mean droplet size and standard deviation were smaller for OPT-ME 5:1 if compared to designed values by 5.7% and 7.04%, respectively. For OPT-ME 6:1 and OPT-ME 7:1 determined droplet size was, respectively, 1.3% and 2.97% higher when compared to theoretical model. Standard deviations for mean droplet size of designed and determined values for OPT-ME 6:1 differed by 1.2% and for

TABLE 7: Comparison of characteristics of MEs ($n = 3$).

Sample	Mean droplet size, nm		Standard deviation, nm		Number of peaks
	Designed value	Determined value	Designed value	Determined value	
OPT-ME 5:1	72.66	68.54 $\pm$ 1.18	57.33	53.29 $\pm$ 6.09	1
OPT-ME 6:1	65.24	66.08 $\pm$ 0.16	45.43	44.87 $\pm$ 2.26	1
OPT-ME 7:1	64.68	66.66 $\pm$ 0.56	43.62	43.73 $\pm$ 2.28	1

TABLE 8: Characteristics of optimized (OPT-MEs) and resveratrol containing MEs (MEs-RES).

	OPT-ME 5:1	ME 5:1 2% RES	OPT-ME 6:1	ME 6:1 2% RES	OPT-ME 7:1	ME 7:1 2% RES
pH	7.01 $\pm$ 0.06	6.95 $\pm$ 0.01	7.15 $\pm$ 0.04	6.94 $\pm$ 0.01	7.11 $\pm$ 0.01	6.96 $\pm$ 0.01
Conductivity, μ S/cm	95.55 $\pm$ 0.07	93.50 $\pm$ 0.14	84.45 $\pm$ 0.07	83.85 $\pm$ 0.35	74.45 $\pm$ 0.07	72.95 $\pm$ 0.07
Viscosity, mPa-s	62.80 $\pm$ 0.14	67.30 $\pm$ 1.27	53.95 $\pm$ 0.92	61.65 $\pm$ 1.48	54.35 $\pm$ 1.77	59.35 $\pm$ 1.48
Particle size, nm	68.54 $\pm$ 1.18	116.83 $\pm$ 0.23	66.08 $\pm$ 0.16	105.6 $\pm$ 0.30	66.66 $\pm$ 0.56	108.63 $\pm$ 0.68

Measurements made in triplicate ($n = 3$).

OPT-ME 7:1 differed by 0.25%, and could be considered as insignificant. The results indicated suitability of applied theoretical approach for modelling of MEs; consequently the same approach and compositions of MEs were used for formulation of MEs containing a model active substance resveratrol. Resveratrol was dissolved in surfactant and oily phase, thus minimizing possible redistribution of resveratrol between phases of MEs and achieving high incorporated quantities. Resveratrol was incorporated in optimized MEs with S:CoS weight ratios 5:1 (ME-RES 5:1), 6:1 (ME-RES 6:1), and 7:1 (ME-RES 7:1). Physical characterization of MEs was performed to detect possible effects of resveratrol inclusion into disperse phase of MEs (Table 8). Conductivity, viscosity, and pH measurements were performed 24 hours after formulating MEs. Determined average conductivity for all tested MEs was close to 100 μ S/cm, confirming that formulated MEs were of O/W type [11, 21, 22].

The viscosity of OPT-ME formulations varied between 53.95 and 62.80 Pa-s, and these were similar to the published data for same type of MEs [20, 21]. The inclusion of resveratrol into formulations of optimal MEs caused increase of disperse system viscosity.

The pH of all formulated optimized MEs varied between 7.01 and 7.15. MEs-RES were compared with OPT-MEs and it was determined that pH value of MEs-RES is lower but still was in physiologically acceptable range [23].

Characterization and stability evaluation of MEs were performed by measuring droplet size distribution 24 hours, 48 hours, and 1 week after formulation. MEs-RES remained transparent; no signs of phase separation, cracking, or creaming were identified. The increase of mean value of droplet size was 41.3% for ME-RES 5:1, 37.4% for ME-RES 6:1, and 38.6% for ME-RES 7:1 when compared to OPT-MEs, and it could be related to incorporation of resveratrol. PEG-8 caprylic/capric glycerides demonstrated relatively high solubility of resveratrol (Table 2). Therefore the increase of droplet size could be associated with a predominant location of resveratrol in the interfacial film and so affecting the function of surfactants in MEs.

Droplet size measurements in resveratrol containing MEs revealed existence of two-peak droplet distribution in ME-RES 6:1 and ME-RES 7:1 24 and 48 hours after formulation. No droplets in bigger size range, represented by smaller peak, were determined after 1 week. The changes in the disperse phase characteristics were studied by evaluating alterations of the droplet size fractional composition in MEs. Droplet fractional distribution according to light scattering intensity and droplet number is presented in Figure 3.

Droplet size in ME-RES 5:1 varied between 21.04 and 458.70 nm 24 hours after formulation, and similar droplet size distribution profile was determined after 48 hours. Droplet size changes were observed in 1 week after formulation of MEs as fractions of droplets with diameter less than 21.04 nm and bigger than 531.20 nm have been no longer determined (Figure 3(a)). The dominating fraction amount of the droplets remained the same; however, minor redistribution of dispersion phase between fractions was identified as determined by intensity measurements. Interfacial surface area change was considered as the potential indicator for stability of disperse system; consequently relative values were calculated for 1 g of MEs. Measurements performed at 24-hour point and after 1 week of storage of MEs at room temperature and comparing the number of droplets per 1 g and their relative surface area revealed decrease by 24.3% and 8.4%, respectively, indicating the increasing internal stability of the disperse system. Droplet size measurements in ME-RES 6:1 and ME-RES 7:1 after 24 and 48 hours demonstrated the presence of two-peak distribution of droplets when evaluating the system by intensity. Evaluation of the system by number of droplets showed no droplets in the range above 255 nm thus confirming small number of droplets existing in that size range. Peak ranges of droplet sizes when evaluated by intensity were from 24.36 nm to 458.70 nm, and from 4145 nm to 5560 nm, showing wide gap between sizes of present droplets. Similar droplet distribution profile was determined after 48 hours demonstrating presence of the second peak in bigger diameter droplet range for both ME-RES 6:1 and ME-RES 7:1. The second peak was not

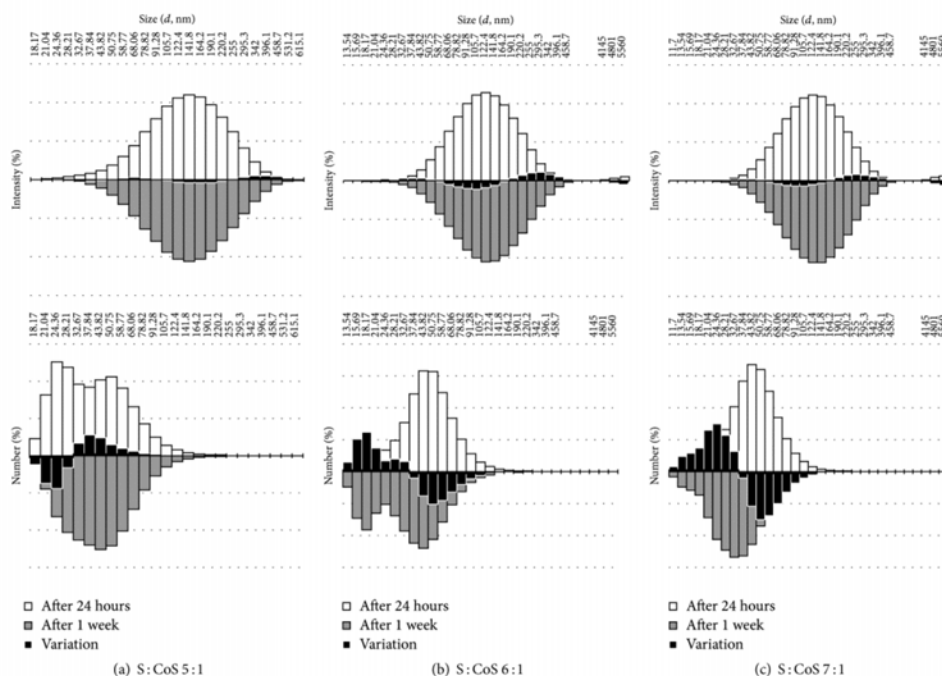


FIGURE 3: Changes in droplet size distribution in MEs during storage.

determined after 1 week, as redistribution of droplets between fractions occurred that resulted in appearance of smaller diameter droplet fraction (Figures 3(b) and 3(c)). The total droplet number increased by 54.6% and relative surface area in the disperse system increased by 23.8% in ME-RES 6:1 when data from 24 hours and 1 week measurements were compared. Similar changes were determined in ME-RES 7:1 disperse system: the total droplet number and relative surface area increased by 72.8% and 30.5%, respectively.

Stability of formulated MEs was evaluated by measuring droplet fraction distribution after 24 hours and 1 week after formulation. The decrease of droplet number for ME-RES 5:1 in the droplet size range 18.17–30.44 nm was observed to reach 36.49% when data of 1 week stability evaluation was compared to 24-hour stability testing results. Conversely, the droplet number in the size range 30.44–54.76 nm increased by 17.9% after same time interval. Opposite tendencies were determined for ME-RES 6:1, and ME-RES 7:1, as number of droplets in the droplet range from 40.83 to 73.44 nm decreased by 29.29% and by 41.8%, respectively, when 1-week data were compared to 24-hour testing results. Similar increase of droplet number in fine fractions of ME-RES 6:1 and ME-RES 7:1 was determined. The number of droplets increased by 67% in fractions from 14.62 nm to 30 nm for

ME-RES 6:1, and for ME-RES 7:1 the number of droplets increased by 78.17% in fractions from 16.93 nm to 30.44 nm when results of 1 week were compared to those of 24 hours. The changes in the fractional composition of MEs demonstrated liability of the formulated disperse systems to acquire most favorable physical stability status and changes in composition of interfacial film after incorporation of resveratrol appropriately affecting packing pattern of surfactants at the interface.

The penetration of resveratrol into the human skin *ex vivo* was determined to evaluate presumptive formulation effects on the bioavailability of active ingredient. The results of determination of resveratrol penetration into skin layers after application of formulated MEs and control samples for 24 hours are presented in Figure 4.

Results demonstrated that highest penetration of resveratrol into the skin *ex vivo* ($1.96 \pm 0.41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) was determined when ME with S:CoS weight ratio of 5:1 was applied. The amount of resveratrol in the skin after application of ME-RES 6:1 was $1.62 \pm 0.27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, and only $1.31 \pm 0.27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of resveratrol in the skin accumulated after application of ME-RES 7:1. No statistically significant ($P > 0.05$) effect of S:CoS weight ratios in MEs on penetration of resveratrol into epidermis was established comparing penetration of resveratrol

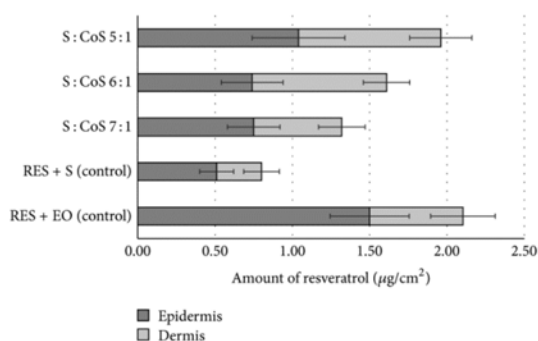


FIGURE 4: Cumulative amount of resveratrol in epidermis and dermis after application of formulations for 24 hours.

from MEs, when S:CoS weight ratios were 5:1, 6:1, and 7:1. Statistically significant ($P < 0.05$) difference was established between penetration of resveratrol into dermis from ME with S:CoS weight ratio 5:1, and MEs with S:CoS weight ratios 6:1 or 7:1. Results established the existing statistically significant ($P < 0.05$) inverse correlation ($r = -1$) between S:CoS weight ratios and resveratrol penetration into the skin. This correlation revealed that increases of S:CoS weight ratio in MEs resulted in decreased penetration of resveratrol into the skin. Correlation between droplet size and resveratrol penetration into the skin was not established. Delivery of resveratrol by applying formulated MEs resulted in efficient migration of resveratrol through epidermis into the deeper dermis, and the pattern of distribution of active component in the skin layers *ex vivo* differed from those observed after application of resveratrol in PEG-8 caprylic/capric glycerides or ethyl oleate used as control. When MEs were used for resveratrol delivery to the skin, distribution ratio of resveratrol in epidermis and dermis ranged from 0.9 to 1.3 thus indicating relatively higher quantities of resveratrol in hydrophilic dermis.

The penetration of resveratrol into the skin *ex vivo* from PEG-8 caprylic/capric glycerides (S) and ethyl oleate (EO) was determined to evaluate possible penetration modifying effects of the excipients. The amount of resveratrol in the skin was $2.1 \pm 0.36 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ with ethyl oleate containing 0.031% resveratrol (RES + EO) and $0.8 \pm 0.20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ when surfactant with 5.2% resveratrol (RES + S) was applied for 24 hours. The application of resveratrol dissolved in ethyl oleate resulted in predominant accumulation of active substance in epidermis and limited diffusion to dermis. Distribution ratio of resveratrol between epidermis and dermis was 2.5 when ethyl oleate was used as carrier, indicating that up to 70% of applied resveratrol dose remained in epidermis. Therefore ethyl oleate should not be considered as efficient carrier for resveratrol. Ability of ethyl oleate to disturb and fluidize lipid structures in stratum corneum and lipophilicity of resveratrol ($\log P = 3.1$) can be used to explain penetration and accumulation of resveratrol in epidermis [24]. Similar distribution pattern but lower quantities of resveratrol in

skin layers were determined after application of PEG-8 caprylic/capric glycerides.

The results demonstrated ability of formulated MEs to alleviate penetration of resveratrol into the deeper layers of the skin without developing high concentration gradient between epidermis and dermis, and these findings support the suitability of MEs for enhancing the delivery of resveratrol to the dermis [8, 9]. MEs formulated using PEG-8 caprylic/capric glycerides and polyglyceryl-6-isostearate could be used for targeted delivery of lipophilic active substances into dermis.

4. Conclusions

MEs represent a spontaneously forming disperse system, and the characteristics of disperse phase are affected by the nature and ratio of the components. Attempts to formulate MEs with designed droplet characteristics present a development challenge as multiple interactions of system components have to be taken into consideration. Design of experiment approach was applied for reducing the number of experimental formulations and modeling of optimal compositions of MEs with predefined quality characteristics. Validity of the model was verified by formulation MEs and their characterization. Attempts to incorporate resveratrol into optimal MEs resulted in increase of mean droplet size up to 41.3% thus demonstrating possible effects of active ingredients on disperse system characteristics if they have predisposition to accumulate in the interfacial film. Redistribution of droplet size within fractions was determined while analyzing the processes of droplet size increase, thus indicating possible changes in the interfacial film components' packing pattern. Increasing penetration of resveratrol into the skin *ex vivo* was related to the increasing amount of cosurfactant polyglyceryl-6-isostearate. Effect of droplet size on permeability of resveratrol was not evaluated as formulation of MEs with different droplet size required to make changes MEs composition.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgment

The authors are thankful for financial support provided by science foundation of Lithuanian University of Health Sciences.

References

- [1] G. J. Fisher, Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang, and J. J. Voorhees, "Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light," *The New England Journal of Medicine*, vol. 337, no. 20, pp. 1419–1428, 1997.
- [2] M. J. Lawrence and G. D. Rees, "Microemulsion-based media as novel drug delivery systems," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 45, no. 1, pp. 89–121, 2000.
- [3] M. Kreilgaard, "Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, supplement 1, pp. S77–S98, 2002.
- [4] G. Singh and R. S. Pai, "Trans-resveratrol self-nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced bioavailability potential: optimization, pharmacokinetics and in situ single pass intestinal perfusion (SPIP) studies," *Drug Delivery*, vol. 22, no. 4, pp. 522–530, 2015.
- [5] S. Talegaonkar, A. Azeem, F. J. Ahmad, R. K. Khar, S. A. Pathan, and Z. I. Khan, "Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery," *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, vol. 2, no. 3, pp. 238–257, 2008.
- [6] R. A. Baxter, "Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation," *Journal of Cosmetic Dermatology*, vol. 7, no. 1, pp. 2–7, 2008.
- [7] M. Ndiaye, C. Philippe, H. Mukhtar, and N. Ahmad, "The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 508, no. 2, pp. 164–170, 2011.
- [8] R. Yutani, T. Kikuchi, R. Teraoka, and S. Kitagawa, "Efficient delivery and distribution in skin of chlorogenic acid and resveratrol induced by microemulsion using sucrose laurate," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 62, no. 3, pp. 274–280, 2014.
- [9] R. Yutani, S.-Y. Morita, R. Teraoka, and S. Kitagawa, "Distribution of polyphenols and a surfactant component in skin during aerosol OT microemulsion-enhanced intradermal delivery," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 60, no. 8, pp. 989–994, 2012.
- [10] R. G. Alany, I. G. Tucker, N. M. Davies, and T. Rades, "Characterizing colloidal structures of pseudoternary phase diagrams formed by oil/water/amphiphile systems," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 27, no. 1, pp. 31–38, 2001.
- [11] B. S. Barot, P. B. Parejiya, H. K. Patel, M. C. Gohel, and P. K. Shelat, "Microemulsion-based gel of terbinafine for the treatment of onychomycosis: optimization of formulation using D-optimal design," *AAPS PharmSciTech*, vol. 13, no. 1, pp. 184–192, 2012.
- [12] S. Furlanetto, M. Cirri, G. Piepel, N. Mennini, and P. Mura, "Mixture experiment methods in the development and optimization of microemulsion formulations," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 55, no. 4, pp. 610–617, 2011.
- [13] P. Boonme, K. Krauel, A. Graf, T. Rades, and V. B. Junyaprasert, "Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij 97:1-butanol," *AAPS PharmSciTech*, vol. 7, no. 2, article E45, 2006.
- [14] P. J. Thakkar, P. Madan, and S. Lin, "Transdermal delivery of diclofenac using water-in-oil microemulsion: formulation and mechanistic approach of drug skin permeation," *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 19, no. 3, pp. 373–384, 2014.
- [15] M. Žilijus, K. Ramanauskienė, and V. Briedis, "Release of propolis phenolic acids from semisolid formulations and their penetration into the human skin *in vitro*," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 958717, 7 pages, 2013.
- [16] T. Kezutyte, O. Kornysova, A. Maruska, and V. Briedis, "Assay of tolinafate in human skin samples after *in vitro* penetration studies using high performance liquid chromatography," *Acta Poloniae Pharmaceutica*, vol. 67, no. 4, pp. 327–334, 2010.
- [17] T. Kezutyte, T. Drevinskas, A. Maruska, R. Rimdeika, and V. Briedis, "Study of tolinafate release from fatty acids containing ointment and penetration into human skin *ex vivo*," *Acta Poloniae Pharmaceutica—Drug Research*, vol. 68, no. 6, pp. 965–973, 2011.
- [18] L. Djekic and M. Primorac, "The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 352, no. 1–2, pp. 231–239, 2008.
- [19] G. Kantarci, I. Özgüney, H. Y. Karasulu, S. Arzik, and T. Güneri, "Comparison of different water/oil microemulsions containing diclofenac sodium: preparation, characterization, release rate, and skin irritation studies," *AAPS PharmSciTech*, vol. 8, no. 4, article E91, 2007.
- [20] P. Sasivimolphan, V. Lipipun, G. Ritthidej et al., "Microemulsion-based oxyresveratrol for topical treatment of herpes simplex virus (HSV) infection: physicochemical properties and efficacy in cutaneous HSV-1 infection in mice," *AAPS PharmSciTech*, vol. 13, no. 4, pp. 1266–1275, 2012.
- [21] M. R. Patel, R. B. Patel, J. R. Parikh, A. B. Solanki, and B. G. Patel, "Effect of formulation components on the *in vitro* permeation of microemulsion drug delivery system of fluconazole," *AAPS PharmSciTech*, vol. 10, no. 3, pp. 917–923, 2009.
- [22] A. Salimi, B. S. M. Zadeh, and E. Moghimipour, "Preparation and characterization of cyanocobalamin (Vit B12) microemulsion properties and structure for topical and transdermal application," *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 16, no. 7, pp. 865–872, 2013.
- [23] S. M. Ali and G. Yosipovitch, "Skin pH: from basic science to basic skin care," *Acta Dermato Venereologica*, vol. 93, no. 3, pp. 261–267, 2013.
- [24] T. M. Suhonen, J. A. Bouwstra, and A. Urtti, "Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations," *Journal of Controlled Release*, vol. 59, no. 2, pp. 149–161, 1999.

Testing of resveratrol microemulsion photostability and protective effect against UV induced oxidative stress

VAIDA JUŠKAITE*
KRISTINA RAMANAUSKIENĖ
VITALIS BRIEDIS

Lithuanian University of Health
Sciences, Department of Clinical
Pharmacy, 50161 Kaunas, Lithuania

Resveratrol is well known for its antioxidant activity and susceptibility to ultraviolet radiation. Development of formulations providing improved stability and relevant drug delivery of resveratrol is still a challenging task. The aim of this study was to determine protective characteristics of formulated microemulsions by evaluating photoisomerization of resveratrol and to investigate the effects of resveratrol on human keratinocyte cells under oxidative stress caused by ultraviolet radiation. Incorporation of resveratrol into microemulsions resulted in increased photostability of active compounds and the results demonstrated that photodegradation of resveratrol was significantly delayed. Results of biopharmaceutical evaluation *in vitro* demonstrated that up to 60 % of resveratrol was released from microemulsions within 6 hours under a constant release rate profile. *In vivo* biological testing confirmed the ability of resveratrol to protect cells from oxidative stress and to increase cell viability. It was concluded that microemulsions might be considered in the development of UV light sensitive compounds.

Accepted February 26, 2017
Published online May 4, 2017

Keywords: microemulsion, resveratrol, photostability, Ha-CaT cells, UVB, oxidative stress

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene, RES) is a naturally occurring polyphenolic compound, which protects cells from oxidative stress (1). Due to its high antioxidant activity, resveratrol is considered to have a high potential to be applied in therapy and prophylaxis. Interest in this phytoalexin has increased over recent years and its protective effects in treatment of skin diseases, such as skin aging or skin cancer, have been confirmed (2). Research data demonstrated a high superoxide, hydroxyl, and other radical scavenging ability of resveratrol and its ability to suppress production of reactive oxygen species (ROS) (3).

Resveratrol ability to penetrate into skin is limited, thus the development of efficient carriers is a possible approach to reaching appropriate active compound concentrations in skin layers. Besides, the delivery system should guarantee adequate stability of resveratrol

* Correspondence; e-mail: vaida.juskaite@lsmuni.lt

since high compound photosensitivity to visible light and UV radiation has been determined. UV radiation and temperature induce rapid transformation of *trans*-resveratrol into the *cis*-isomeric form, resulting in decreased biological activity (4). The *trans*-isoform of resveratrol should be protected until its delivery to the site of action in skin tissues.

Physically and chemically stable nanoformulations are thought to provide active substances with efficient protection from external factors. Application of nanostructured formulations could help overcome the poor solubility of resveratrol and its limited penetration into the skin (5, 6). Microemulsions (MEs) are known for their ability to incorporate high amounts of lipophilic and hydrophilic active compounds and provide a skin penetration enhancing effect (7). Ease of formulation and thermodynamic stability are other important advantages of MEs that make them superior to other colloidal systems, e.g. nanoparticles, niosomes or liposomes (8). Consequently, it is useful to apply ME for incorporation of photolabile compounds (e.g. resveratrol) and suitability of the ME carrier has to be confirmed by stability testing and biopharmaceutical characterization of the formulation.

The aim of this study was to evaluate the ability of formulated MEs to protect resveratrol from photoisomerization and to assess their quality after UVB exposure. Also, ME irritation potential was evaluated by testing on a human keratinocyte (HaCaT) cell line. Non-toxic concentrations of MEs were determined by evaluating cell viability. Protective and antioxidant effects of resveratrol on human skin cells under normal conditions and under oxidative stress, caused by UVB radiation, were investigated.

EXPERIMENTAL

Materials

Analytical grade *trans*-resveratrol and chromatography grade acetonitrile and acetic acid were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany). Resveratrol was supplied by Naturex (France). MEs were formulated using PEG-8 caprylic/capric glycerides as surfactants and polyglyceryl-6-isostearate as cosurfactants, both supplied by Gattefosse (France). Ethyl oleate was used as an oily phase in MEs and was purchased from Alfa Aesar GmbH & Co KG (Germany). Ultrapure water was produced using a water purification system Millipore Simplicity™ (USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and 96 % ethanol were used as solvents for resveratrol and were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany) and AB Vilniaus degtinė (Lithuania), respectively. Polyethylene glycol (PEG 400) was purchased from Carl Roth GmbH+Co KG (Germany). Trypsin, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin/streptomycin solution, fetal bovine serum (FBS), Hank's balanced salt solution (HBSS), and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Life technologies (USA).

Quantitative determination of *trans*-resveratrol

Resveratrol was determined in all tested samples by validated high-performance liquid chromatography (HPLC) using an Agilent 1260 Infinity capillary LC system (Agilent Technologies Inc., USA) with a diode array detector. The Zorbax C18 column (150 × 0.5 mm, 5 μm) was used for separation of *trans*- and *cis*-resveratrol. Separation was performed

under isocratic conditions using a 0.5 % aqueous solution of acetic acid (solvents A) and acetonitrile (solvent B) in a ratio 75:25 (V/V) as mobile phase. Eluent flow rate was 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. UV detection was performed at a 306 nm wavelength. Column temperature was maintained at 25 °C.

Formulation of microemulsions

Composition of MEs was chosen considering our previous results of composition optimization, characterization, stability and skin penetration studies, and contained 57 % of the surfactant and co-surfactant mixture, 38 % of aqueous phase, and 5 % of oily phase (9). Skin penetration studies demonstrated that highest quantities of resveratrol in the skin were determined when 2 % resveratrol ME (ME-RES) with surfactant and co-surfactant mass ratio 5:1 was applied. Physical properties of ME-RES were defined by evaluating droplet size distribution and the mean particle size.

MEs with and without RES were formulated using the oil titration method at room temperature. A mixture of surfactant and co-surfactant (5:1, *m/m*) was added to water under mixing at 1250 rpm for 10 minutes using a magnetic stirrer IKAMAG® C-MAG HS7 (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Germany). Ethyl oleate was added dropwise to the mixture under vigorous stirring until transparent and a clear formulation was obtained. ME-RES was formulated by dissolving RES in the oily phase and surfactant to produce a 2 % concentration of active substance in the finished product (9). ME and ME-RES formation was confirmed visually. MEs were allowed to equilibrate for 24 hours keeping formulations at ambient temperature.

Characterization of microemulsions

The physical quality of MEs was evaluated by determining the mean droplet size and polydispersity index (PDI) of MEs using a Zetasizer Nano ZS particle size analyzer (UK). PDI was measured to characterize the droplet size distribution. All formulations were analyzed at 25 °C 24 h after their production and measurements were performed in triplicate.

Evaluation of resveratrol photostability

Photostability studies were performed to determine the effect of UVB on the *trans*-RES to *cis*-RES transformation. Transformation process was evaluated by comparing RES photostability in a 2 % ME-RES and 2 % ethanolic resveratrol solution (RES-control). Stability of formulated MEs was evaluated by irradiating ME without resveratrol (ME-control). Irradiation of samples was performed in Petri dishes placed at a 20 cm distance from a MRL-58 Multiple-Ray UV lamp (Ultra-Violet Products Ltd, UK) and were exposed to the light source < 1 mW cm^{-2} for 4 hours under ambient conditions (4, 10). Irradiance was determined using a UVX radiometer (Ultra-Violet Products Ltd, UK). Aliquots were taken from 2 % ME-RES and RES-control at 15, 30, 60, 120, and 240 min, diluted with ethanol, and *trans*- and *cis*-RES were determined by HPLC. Physical stability of ME-RES and ME-control was evaluated by measuring the droplet size and PDI applying the dynamic light scattering technique after UVB irradiation for 120 and 240 min.

In vitro release studies

RES release from MEs was studied by measuring diffusion from a dialysis bag (5). ME-RES samples (1.00 ± 0.02 g) were placed into the pre-swelled dialysis bag (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany). The ends of the bag were fixed with clamps and immersed into 500 mL of dialysis medium. A mixture of purified water and PEG 400 (50:50, m/m) was used as acceptor medium and was stirred using a hotplate magnetic stirrer IKA-MAG® C-MAG HS7 (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Germany). Medium temperature was kept at 32 ± 0.1 °C. Sink conditions were maintained throughout release studies. 1 mL of acceptor medium was removed at time points of 0.5, 1, 2, 4, 6 hours and replaced by the same volume of fresh dissolution medium. Withdrawn samples were filtered through 0.20 µm nylon membrane filters and analyzed by the HPLC method.

Cell lines and cell culture

The immortalized human keratinocyte cell line, HaCaT cells, was obtained from Cell Lines Service GmbH (Germany). The cells were seeded and grown in culture flasks with DMEM containing 10 % fetal bovine serum (FBS) and 100 U mL⁻¹ penicillin and 100 µg mL⁻¹ streptomycin. HaCaT cells were cultured at 37 °C under humidified conditions with 5 % CO₂. The cells were sub-cultured after reaching about 80 % confluence and the medium was changed two or three times per week.

Measurement of cell viability

Cell viability was assessed by the MTT method (11). The cells were seeded into 96-well plates at a density of 20,000 cells/well and incubated for 24 h. After incubation, cells were treated with different sample solutions: a) ME without added resveratrol (ME-control), b) ME-RES, and c) solution of resveratrol in DMSO (RES-control). All the prepared samples were diluted using Hank's balanced salt solution (HBSS). After 24 h of treatment with the preparations, DMEM medium was removed and cells were washed twice with HBSS (100 µL/well). After washing, 180 µL/well HBSS and 20 µL/well MTT (final concentration, 5 mg/mL) dye were added to each well, and cells were incubated for 2 h at 37 °C under humidified conditions with 5 % CO₂. After that, the dye was removed and DMSO (100 µL/well) was added in order to dissolve the purple crystals of formazan formed. The plate with solvent was kept in the dark for 15 min. Absorption was measured spectrophotometrically at 550 nm and 620 nm wavelengths using a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiscan FC, USA). Results of cellular viability were expressed as the percentage of untreated control cells. All experiments were repeated three times at least.

Effect of formulations on cell damage caused by UVB

Different doses of UVB irradiation (10, 25, 50, 75 and 100 mJ cm⁻²) were used to cause cell damage and to evaluate the protective effect of tested formulations (ME-control, ME-RES, RES-control). The cells were seeded into 96-well plates (20,000 cells/well) and incubated for 24 h. After incubation, HaCaT cells were treated with different doses of UVB irradiation to determine the dose-cell viability relationship. Later on, the possible protective effect of tested formulations on the irradiated cells was assessed by testing cell viability

after UVB irradiation. Tested formulations were added to the HaCaT cells cultivated in 96-well plates 2 h prior to UVB irradiation (12). Before UVB exposure, the medium was removed and cells were washed once with HBSS. The cells were irradiated with UVB using a UV lamp (UVP, MRL-58 Multiple-Ray Lamp, USA) after HBSS thin layer addition. Irradiation dose was calculated using a UVX Radiometer (UVP, USA). HBSS was removed after irradiation. Fresh medium was added to each well and cells were incubated for 24 h. Cell viability was determined by the MTT method as described above. Untreated cells and UVB irradiated cells without test formulations added were used as controls.

Statistical analysis

All tests were repeated three times at least. The results were expressed as means $\pm$ SD. Statistically significant difference was determined when $p < 0.05$. Student's *t*-test was used to evaluate significant differences in test results. Statistical analysis of experimental data was performed using the Microsoft Office Excel and 2013 SPSS software (version 19.0).

RESULTS AND DISCUSSION

Published research data demonstrated limited stability of RES under irradiation with UV light, which could cause photodegradation of RES (13). Microemulsions (MEs) were formulated to provide a protective effect on RES and minimize possible isomerization. In order to evaluate the protective effect of formulated ME on the photostability of RES under UVB exposure, the stability of *trans*-RES in RES-ME and ethanolic solution of RES (RES-control) was tested. The concentration of *trans*-RES in tested formulations was 2 %.

Concentration of *trans*-RES decreased both in ME and in ethanolic solution under UVB exposure (Fig. 1). Results of photodegradation studies showed a decrease of *trans*-RES

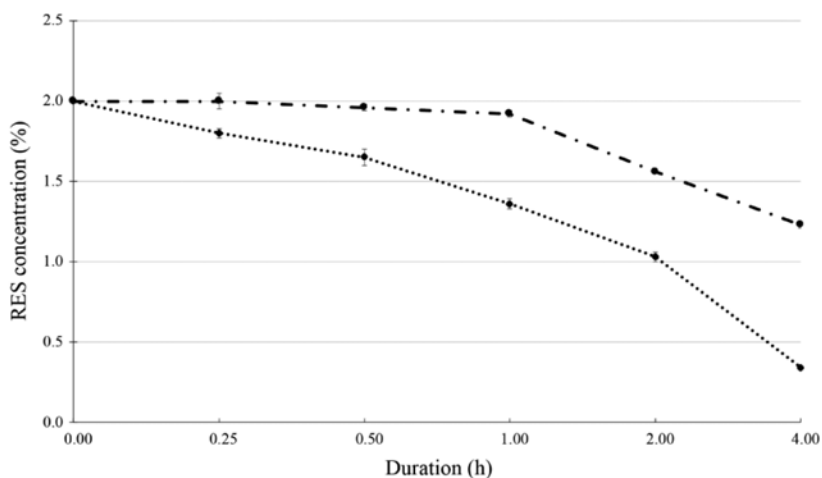


Fig. 1. Stability of 2 % *trans*-resveratrol in microemulsion (—●—) and ethanolic solution (---●---) under UV irradiation.

by 83.7 % in ethanolic solution in 4 h. *Trans*-RES concentration decreased by 39.1 % after 4 h of UVB exposure when ME-RES formulation was irradiated. The results demonstrated that inclusion of RES in ME decreased photoisomerization of RES while concentration of *trans*-RES was approx. 3.2 fold higher. ME provided efficient protection to RES for 1 h under UVB irradiation. Concentration of *trans*-RES in RES-control was gradually decreasing over all the 4 h of exposure to UVB. Decrease of *trans*-RES was determined in samples collected at 2-h and 4-h time points. The results demonstrated the ability of MEs to provide increased physical stability of RES under UVB irradiation compared to ethanolic solution. These results could be related to physicochemical characteristics of the active substance since lipophilic RES predominantly accumulated in droplets' interfacial layer and was less accessible to UVB radiation. Similar observations were reported when application of nanostructured formulations (nanocapsules, nanospheres, liposomes, nanostructured lipid carriers) decreased RES photodegradation significantly (4, 10).

The effect of UVB irradiation on ME particle size characteristics was evaluated by measuring the mean droplet size and PDI before and after UVB exposure. Smaller droplets of ME-control were determined compared to droplet size when ME contained RES (Table I). The increase in droplet size could be due to incorporation of RES as a fraction of surfactant and co-surfactant should participate in solubilization of RES molecules. Decreased availability of surfactant and co-surfactant molecules resulted in a decrease of interfacial film surface area and a proportional increase in droplet size. However, the size of ME-RES was in an acceptable ME droplet size range. Similar effects of active substances on droplet size were reported previously when active substances were incorporated into colloidal systems, e.g. microemulsions (14), liposomes (10), nanosuspensions (15). The possibility of RES accumulation in the interfacial layer of nanostructure systems has been discussed earlier (6). Incorporation of RES into MEs did not affect PDI values of the system compared to ME-control and the narrow droplet size distribution indicated homogeneity of formulations.

The results demonstrated increased mean droplet size with increasing exposure to UVB. Mean droplet size in ME-RES was 1.7 fold bigger compared to the mean droplet size in ME-control before UVB irradiation (0 h). After 4 h of UVB exposure, the mean droplet size increased by 37.2 % in ME-RES and by 65.41 % in ME-control compared to the mean droplet size before UVB irradiation. This indicates that UV irradiation can induce changes in the chemical composition of the interfacial film and lower the surface activity of possibly formed compounds. The presence of RES in the ME interfacial film increases its resistance against the damaging UV effect. Study results demonstrated a decrease in PDI of ME-control (from 0.286 to 0.242) and a single peak droplet size distribution pattern. Expo-

Table I. Characteristics of MEs-RES and MEs before and after UVB irradiation

Duration of UVB irradiation (h)	ME-RES		ME-control	
	Droplet size (nm)	PDI	Droplet size (nm)	PDI
0	112.5 ± 1.3	0.263 ± 0.008	66.3 ± 0.2	0.286 ± 0.005
2	132.4 ± 2.6	0.301 ± 0.024	–	–
4	154.4 ± 2.0	0.316 ± 0.041	109.7 ± 0.7	0.242 ± 0.008

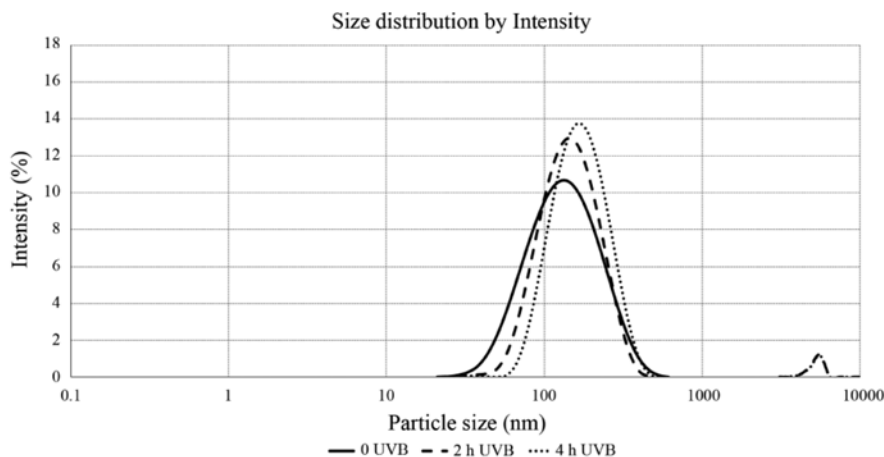


Fig. 2. Effect of UVB irradiation on droplet size distribution in ME-RES.

sure of MEs to UVB resulted in increased PDI and a two-peak droplet size distribution in ME-RES, indicating the appearance of bigger droplets (Fig. 2).

Droplet size distribution was investigated to evaluate the physical stability of the carrier before and after UVB exposure. Study results demonstrated that 24 h after formulation the droplet size in ME-RES ranged from 28.21 to 531.2 nm. Changes of ME-RES droplet size were observed after 2 and 4 h of UVB irradiation. After 2 h of UVB exposure, droplet sizes were in the ranges of 28.21–396.1 nm and 4145–5560 nm. Droplet size measurements demonstrated the formation of bigger droplets (32.67–458.7 nm and 4145–5560 nm) after 4 h of UVB radiation, but the droplet mean size of the second peak did not change. The results of intensity measurements demonstrated that the predominating particle fraction in the main peak remained the same as before UV irradiation (Fig. 2); however, the appearance of a bigger particle peak was identified. The second peak indicates formation of bigger particles, which could represent the products of possible coalescence of ME droplets or their agglomeration. The applied photon correlation spectroscopy method did not allow reliable differentiation of droplets and agglomerates. However, the applied method confirmed the presence of bigger particles and pointed to the destabilizing effect of UV irradiation on the MEs formulations tested. Evaluation of ME components' individual susceptibility to UV light could provide information for a better understanding of processes that potentially induce changes in MEs. Stabilization of MEs against the UV effect could be achieved either by including antioxidants or by using surfactants possessing antioxidant properties for interfacial film formation (16).

The ability of the formulated system to release active substances is considered to be an important criterion in product characterization and quality evaluation studies. Determination of the RES release profile provided additional understanding of the distribution of RES in ME. RES is considered to have limited solubility in water and it required a modified acceptor medium compared to water-soluble drugs. As regards solubility characteristics, PEG 400 was added to acceptor medium to maintain sink conditions throughout the testing pro-

cedure. Results of biopharmaceutical evaluation revealed that RES was released at a constant speed and the total amount of released RES reached 60.73 % after 6 h. However, the delay of RES appearance in acceptor medium in the initial phase of the experiment could be attributed to the limited diffusion process across the semipermeable membrane and release of RES from ME droplets (5). Results of RES release evaluation demonstrated a constant release rate over the 6 h of testing. A zero order kinetic model was used to describe release kinetics of the drug from the formulated system ($R^2 = 0.992$). Results of drug release studies confirmed the suitability of the carrier to incorporate and release RES, and ME-RES formulation was considered acceptable for further biological testing.

Effects of ME excipients in their formulation on manifestation of RES biological activity should be confirmed by biological testing on appropriate cell models. Biological evaluation of the produced formulations was done applying the human keratinocyte (HaCaT) cellular model. Different concentrations of ME-control were used to evaluate its potential cytotoxicity. No statistically significant difference was established ($p > 0.05$) between the viability of control group cells (untreated cells) and the viability of cells exposed to ME-control at concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2 %. Exposure of keratinocytes to 0.25 % or higher concentrations of ME-control resulted in a statistically significant difference ($p < 0.05$) of cell viability compared to the control since the viability of keratinocytes was less than 90 %. Considering these results, the 0.15 % concentration of ME was chosen for further studies.

Protective effects of formulated systems against oxidative stress damage were evaluated using UVB as inducer of ROS generation. UVB is a major factor in the development of skin diseases, particularly skin cancer (3, 12). The viability of UVB affected HaCaT cells was evaluated using the MTT method. Five different UVB doses (10, 25, 50, 75, and 100 mJ cm⁻²) were applied to evaluate the effects of UVB irradiation on cell viability (Fig. 3). Study results demonstrated that UVB exposure caused a statistically significant ($p < 0.05$) decrease of cell viability. Viability evaluation showed that cell viability depends on the UVB dose, since its increase resulted in decreased numbers of viable cells. The results in Figure 3 show a two-fold decrease of HaCaT viable cells after exposure to a 50 mJ cm⁻² dose compared to non-irradiated cells. Maximum decrease (75.32 %) was observed after 100 mJ cm⁻² UVB exposure.

Results of the experiment indicated decreased cell survival after UVB irradiation, thus different formulations were tested to evaluate their protective potential for HaCaT cells. Keratinocytes were pretreated with tested formulations (ME-control, ME-RES, RES-control) for 2 hours prior irradiation with UVB and the protective effect of RES was evaluated. RES concentration in cell containing wells was 131 μM.

Study results demonstrated that treatment of cells with ME-control and following UVB irradiation had no effect on the viability of cells in the tested irradiation range from 10 mJ cm⁻² to 100 mJ cm⁻² compared to UVB irradiated cells (Fig. 3). Pretreatment of cells with RES, applied in ME (ME-RES) and in solution (RES-control) before UVB exposure, resulted in increased HaCaT cell viability. No statistically significant difference was established ($p > 0.05$) between the viability of cells subjected to UVB (UVB-control) and RES pretreated cells when radiation doses of 10 and 25 mJ cm⁻² were applied. Increased RES photoprotection was identified at higher doses of UVB (> 50 mJ cm⁻²) and cell viability differed significantly ($p < 0.05$) compared to UVB irradiated control cells. Protective effect of ME-RES was determined when keratinocytes were irradiated with UVB doses ranging

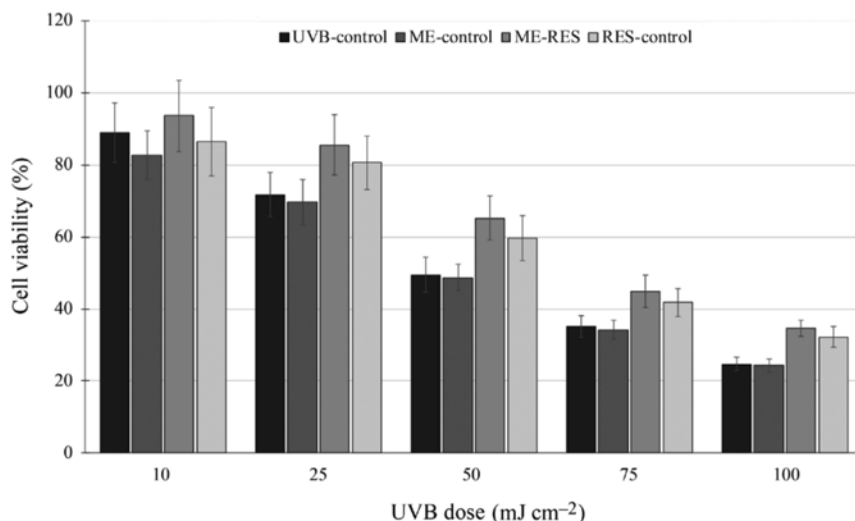


Fig. 3. Effect of the presence of resveratrol in applied formulations and of UVB dose on HaCaT cell viability.

from 50 to 100 mJ cm⁻² cell and cell viability increased by 27.8–40.1 % compared to UVB-control. A similar protective effect on cell viability was established when results obtained after ME-RES application were compared to ME-control. Application of RES in ME resulted in higher cell viability than RES-control even though differences were not statistically significant in the UVB irradiation ranges tested. The above findings provide a rationale for using MEs in the delivery of RES considering increased RES stability in ME and delayed release pattern.

These studies also confirmed the photoprotective effect of RES and its ability to reduce UVB radiation caused cell death. Protective effects of RES on stressed keratinocytes could be associated with its antioxidant activity. Epidermis has a specific binding site for RES, thus topical application of RES is considered an effective approach in prevention and treatment of skin diseases (1). The results of this study demonstrate the ability of formulated ME to function as an efficient RES delivery system for transporting it into epidermal cells, and thus confirms the significant protective effect of RES against oxidative stress.

CONCLUSIONS

MEs are spontaneously forming disperse systems and were formulated as potential carriers for delivery of RES into the skin. Physical stability, drug release and biological studies were performed to determine the suitability of the formulated nanocarrier system. The results demonstrated that MEs could protect RES from photoisomerization and ensure the stability of RES for up to 1 hour under UVB irradiation. Drug release testing revealed diffusion and gradual release of RES from ME. The effects of RES on skin cells confirmed the potential use of this antioxidant as a protective agent to reduce ROS generation and enhance

cell viability when the cells were subjected to oxidative stress. All these findings indicate that the formulated ME-RES could be considered a drug delivery system for RES topical application although the increase in droplet size of MEs under UV radiation was determined.

REFERENCES

1. M. Ndiaye, C. Philippe, H. Mukhtar and N. Ahmad, The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: Promise, prospects, and challenges, *Arch. Biochem. Biophys.* **508** (2011) 164–170; DOI: 10.1016/j.abb.2010.12.030.
2. R. A. Baxter, Anti-aging properties of resveratrol: Review and report of a potent new antioxidant skin care formulation, *J. Cosmetic Dermatol.* **2008**, 2–7; DOI: 10.1111/j.1473-2165.2008.00354.x.
3. S. S. Leonard, C. Xia, B. H. Jiang, B. Stinefelt, H. Klandorf, G. K. Harris and X. Shi, Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309** (2003) 1017–1026; DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.08.105.
4. C. B. Detoni, G. D. Souto, A. L. M. Da Silva, A. R. Pohlmann and S. S. Guterres, Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures, *Photoc. Photobiol.* **2012**, 913–921; DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01147.x.
5. K. Teskač and J. Kristl, The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol, *Int. J. Pharm.* **390** (2009) 61–69; DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.011.
6. C. Caddeo, M. Manconi, A. M. Fadda, F. Lai, S. Lampis, O. Diez-Sales and C. Sinico, Nanocarriers for antioxidant resveratrol: Formulation approach, vesicle self-assembly and stability evaluation, *Coll. Surf. B. Biointerfaces* **111** (2013) 327–332; DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.06.016.
7. H. Y. Karasulu, Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity, *Expert Opin. Drug Deliv.* **5** (2008) 119–135; DOI: 10.1517/17425247.5.1.119.
8. T. Wan, T. Xu, J. Pan, M. Qin, W. Pan, G. Zhang, Z. Wu, C. Wu and Y. Xu, Microemulsion based gel for topical dermal delivery of pseudolaric acid B: In vitro and in vivo evaluation, *Int. J. Pharm.* **493** (2015) 111–120; DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.07.058.
9. V. Juškaitė, K. Ramanauskienė and V. Briedis, Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol, *eCAM* **2015**, 1–10; DOI: 10.1155/2015/540916.
10. S. Sapino, M. E. Carlotti, G. Caron, E. Ugazio and R. Cavalli, In silico design, photostability and biological properties of the complex resveratrol/hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **63** (2009) 171–180; DOI: 10.1007/s10847-008-9504-7.
11. K. Ramanauskienė, A. Stelmakienė and D. Majiene, Assessment of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Hydrogels: Quality and Bioactivity in Skin Cells, *eCAM* **2015**, 1–7; DOI: 10.1155/2015/635975.
12. N. Vitale, A. Kisslinger, S. Paladino, C. Procaccini, G. Matarese, G. M. Pierantoni, F. P. Mancini and D. Tramontano, Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells, *PLoS One* **8** (2013) e80728; DOI: 10.1371/journal.pone.0080728.
13. A. Francioso, A. Boffi, C. Villani, L. Manzi, M. D'Erme, A. Macone and L. Mosca, Isolation and identification of 2,4,6-trihydroxyphenanthrene as a byproduct of *trans*-resveratrol photochemical isomerization and electrocyclization, *J. Org. Chem.* **79** (2014) 9381–9384; DOI: 10.1021/jo501405m.
14. P. Sasivimolphan, V. Lipipun, G. Ritthidej, K. Chitphet, Y. Yoshida, T. Daikoku, B. Sritularak, K. Likhitwitayawuid, P. Pramyothin, M. Hattori and K. Shiraki, Microemulsion-based oxyresveratrol for topical treatment of herpes simplex virus (HSV) infection: Physicochemical properties and efficacy in cutaneous HSV-1 infection in mice, *AAPS PharmSciTech.* **13** (2012) 1266–1275; DOI: 10.1208/s12249-012-9828-x.
15. J. Hao, Y. Gao, J. Zhao, J. Zhang, Q. Li, Z. Zhao and Y. Liu, Preparation and optimization of resveratrol nanosuspensions by antisolvent precipitation using Box-Behnken design, *AAPS PharmSciTech.* **16** (2015) 118–128; DOI: 10.1208/s12249-014-0211-y.
16. H. Chen and Q. Zhong, Thermal and UV stability of β -carotene dissolved in peppermint oil microemulsified by sunflower lecithin and Tween 20 blend, *Food Chem.* **174** (2015) 630–636; DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.116.

SUMMARY

INTRODUCTION

Microemulsions are the modern formulations of drugs used to achieve the following characteristics: a better solubility of pharmaceutical substances, more intensive and enhanced release from the topical, transdermal, parenteral systems, penetration into/through biological barriers, and bioavailability. These dispersive systems are currently of great scientific interest to the researchers because of their ability to incorporate a relatively high amount of pharmaceutical substances with different physicochemical properties as well as to maintain their stability [145]. A small droplet size of disperse phase and thermodynamic stability are the main characteristics of microemulsions, and there are no special conditions for manufacturing technology [11]. Considering these advantages, microemulsions are attractive drug dosage form, which are designed to achieve targeted delivery of active substances.

The main aim of the development of pharmaceutical preparations is the effective delivery of pharmaceutical substances to targeted site of action in order to achieve high therapeutical efficacy and prevent adverse reactions [142]. In terms of modern pharmaceuticals, the human skin is one of the most accessible sites for delivery of pharmaceutical substances to the body. The use of dermatological carriers is based on the following benefits: (i) possibility of delivery to the systemic circulation bypassing the digestive tract, thus avoiding first pass metabolism in the liver, (ii) possibility of purposeful and controlled delivery of pharmaceutical substances to the site of action, (iii) rapid effect of active substances, and a possibility of removing of carrier from the skin to prevent adverse reaction, (iv) method is convenient and painless to use [78, 116, 123]. However, there are several essential problems of pharmaceutical substance delivery to the body - penetration of pharmaceutical substances is limited by the natural skin barrier properties that are influenced by the *stratum corneum* and the physicochemical characteristics of these compounds [34, 142].

There are a few pharmaceutical substances that have optimal physicochemical characteristics: low molecular mass, a suitable lipophilicity, low melting-point temperature – all of them necessary for good penetration of active substances to tissues [80, 158]. Therefore, carriers play a particular role in the delivery of pharmaceutical substances to the skin. The micro- and nano-structured carriers are promising drug delivery systems due to their ability to increase the solubility and stability of biologically active

compounds, modify the barrier properties of the *stratum corneum*, and ensure targeted delivery of these substances into the skin and bioavailability [92, 126, 142]. Studies of the design of innovative carriers and practical application are very important for the development of pharmaceutical products that comply the modern requirements of quality, therefore, modelling of microemulsions is a relevant trend for scientific and applied studies in pharmacy.

Resveratrol was selected as a model active substance because of its biological activity and physicochemical characteristics. This compound has demonstrated antibacterial, antifungal, antiviral, anticancer properties as well as high antioxidant activity, therefore it may be used as an effective preventive measure for the maintenance of skin functions and treatment of skin pathologies [122, 124, 146]. Scientific studies have proven the ability of resveratrol to inactivate reactive oxygen compounds, thus it is regarded as an effective prevention against UV damage [119, 162]. However, resveratrol is unstable in exposure to light and its lipophilicity limit the possibilities of practical application. Due to lipophilicity, resveratrol penetration into the deeper layers of the skin is limited by hydrophilicity, thus resveratrol accumulates in the surface layers of the skin [1]. In order to achieve the effective dermal resveratrol delivery and its biological activity, microemulsions were selected as a suitable measure to solve the problems of instability and lipophilicity of active substance.

The modelling of microemulsions containing resveratrol were studied, and the evaluation of quality and stability of produced carriers was performed. Microemulsion ability to release active substances and their suitability for resveratrol delivery into the skin are the most important criteria to evaluate topical microemulsions. The results of biopharmaceutical studies allowed us to evaluate the suitability of microemulsions and determine the distribution of an active substance in the skin layers that is important for effective skin prevention against possible damage, and treatment of skin pathologies. The studies performed on biological models allowed us to assess the suitability of microemulsions for topical application. Additionally, the results of biopharmaceutical and biological studies enable to predict the bioavailability of the formulated microemulsions containing resveratrol, and that is important for effective quality control of the product and purposeful practical application.

The aim of the study. To formulate optimal and stable microemulsions, to apply them as carriers for resveratrol delivery into the skin and to evaluate their quality using physicochemical, biopharmaceutical and biological studies.

The objectives of the study:

1. To model microemulsions using an experimental planning and to perform optimization of obtained formulations according to the selected critical parameters of the quality.
2. To evaluate the quality of optimal composition of microemulsions and to investigate their stability.
3. To apply selected stable microemulsions for incorporation of an active substance and to evaluate the quality and stability of formulated systems.
4. To investigate kinetics of resveratrol release from microemulsions and to evaluate its penetration into the skin *ex vivo*.
5. To evaluate the irritating effect of microemulsions containing resveratrol on the experimental animals skin *in vivo*.

Scientific novelty. Stable and optimal microemulsions containing resveratrol were modelled combining the excipients of microemulsions and their suitability was evaluated by biopharmaceutical and biological studies. Also, the influence of components forming microemulsions on resveratrol release was confirmed by biopharmaceutical studies. The penetration of resveratrol into the undamaged human skin using the modelled microstructured carriers was evaluated for the first time. The distribution of this model active substance in the skin layers was determined, and the evaluation of the influence of modelled microemulsions with different amount of excipients on these processes was performed.

The methodology of the high performance liquid chromatography was developed and validated for qualitative and quantitative analysis of resveratrol in the human skin and experimental microemulsions.

The safety and suitability of the application of the modelled microemulsions containing resveratrol on the skin are based on *in vivo* animal testing.

Practical and theoretical significance. Experimental planning was used to formulate microemulsions, and that allowed significantly decrease the number of experiments and purposefully to develop the modelled microemulsions. The suitability of the chosen method was evaluated by practically performing optimisation of compositions of the modelled microemulsions.

Stable and optimal microemulsions were modelled and applied for resveratrol incorporation. The influence of resveratrol concentration on the the quality and stability of optimal microemulsions was proven by the studies.

The methodology of the high performance liquid chromatography allowed to separate trans-resveratrol from its isomerisation product and this fact is important for the evaluation of the quality of modelled microemulsions containing resveratrol.

The results of skin penetration studies confirmed that lipophilicity of active substance had the effect on the penetration into skin and distribution of resveratrol between the epidermis and dermis. Using the microemulsions as the effective carrier system, a better penetration of resveratrol into dermis was determined. The results of *in vitro* and *ex vivo* biopharmaceutical studies are significant for the evaluation of the quality of the modelled microemulsions containing resveratrol and the development of purposeful nano- and micro-structured carriers.

In vivo animal testing determined that relatively high concentrations of surface active substances did not cause the skin irritation. The studies with biological objects and obtained results are significant for the evaluation of the application of microemulsions containing resveratrol on the skin.

MATERIALS AND METHODS

Analysis of resveratrol: Resveratrol was determined in all tested samples by validated high-performance liquid chromatography (HPLC). This method was used in the qualitative and quantitative evaluation of active substances in the biopharmaceutical studies *in vitro* and *ex vivo* [73].

Pseudoternary phase diagram construction and optimization: The design of experiment was applied to construct pseudoternary phase diagrams of oil-in-water (O/W) type MEs. The compositions of MEs for optimization were generated by applying D-optimal design model. Optimization of experimental MEs was performed setting three criteria as important: (a) MEs droplet size ranged from 1 nm to 100 nm; (b) single peak distribution of droplet size; (c) minimum deviation from the mean of the droplet size value [73]. According these criteria, optimal compositions of MEs (OPT-MEs) were formulated.

Formulation of microemulsions. MEs with and without resveratrol were formulated using the oil titration method at room temperature [73, 156]. MEs containing resveratrol (MEs-RES) were formulated by dissolving resveratrol in the oily phase and surfactant to produce a calculated concentration of active substance in the finished product. Resveratrol containing surfactant and cosurfactant were mixed in different ratios adding calculated of water. Then oily phase added by drops and MEs-RES were formulated. The formation of MEs and MEs-RES was confirmed visually. All MEs were allowed to equilibrate for 24 hours keeping formulations at ambient temperature. Predominant quantity of resveratrol was incorporated into MEs with surfactant.

Characterization of microemulsions. Physical quality of MEs was assessed by evaluating droplet size, polydispersity index (PDI), viscosity,

pH, conductivity, and oil-in-water (O/W) type. Mean value of droplet size and PDI were measured applying dynamic light scattering technique, using Zetasizer Nano ZS particle size analyser (Malvern, UK), viscosity was determined using Vibro-Viscometer SV-10 (I&D Company, Limited, Japan), and pH was measured using pH-meter 766 (Knick, Germany). Type of microemulsions was confirmed performing conductivity determination at room temperature using conductivity meter (Cond 3110 SET 1, Germany). Homogeneity of MEs was evaluated using centrifugation at 3500 rpm for 30 min.

Thermodynamic stability of MEs was evaluated using heating-cooling and freeze-thaw cycles [139, 156]. MEs were stored at 4°C, 20°C, 32°C, and 45°C for not less than 48 hours in heating-cooling cycle, and -21°C, 4°C, and 25°C for not less than 48 hours at each temperature regimen in freeze-thaw cycle. Homogeneity of the MEs was evaluated after storage of each of temperature regimens in both cycles.

Stability studies of microemulsions. MEs were stored (i) at 15–25°C temperature protected from light; (ii) at 15–25°C temperature under light; (iii) long term ($T 25 \pm 2^\circ\text{C}$ / RH $60 \pm 5\%$); and (iv) accelerated ($T 40 \pm 2^\circ\text{C}$ / RH $75 \pm 5\%$) storage conditions for 6 months. Long term and accelerated stability studies of MEs were performed using climatic shelf Binder KBF (Binder GmbH, Germany). Stability of MEs was assessed measuring droplet size, PDI and concentration of resveratrol after 1, 2, 4, 7, 14 days and 1, 3, 6 months after formulation.

***In vitro* release studies of resveratrol from microemulsions.** Resveratrol release from MEs-RES ($n=3$) was studied by measuring diffusion from a dialysis bag. MEs-RES samples (1.00 ± 0.02 g) were placed into the pre-swelled dialysis bag (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany). A mixture of purified water and PEG 400 (50:50, m/m) was used as acceptor medium and was stirred using a hotplate magnetic stirrer IKAMAG® C-MAG HS7 (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Germany). Medium temperature was kept at $32 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Samples from acceptor medium were removed at time points of 0.5, 1, 2, 4, 6 hours and replaced by the same volume of fresh dissolution medium. Samples were analysed by the HPLC method.

***Ex vivo* skin permeation studies of resveratrol.** Caucasian women's abdominal skin (age range: 25–40 years) was obtained from the Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Hospital of Lithuanian University of Health Sciences, Kauno Klinikos. The skin was stored at -20°C for less than 6 months before use in the study. The studies of transdermal permeation were performed in accordance with the permission of Kaunas regional Biomedical Research Ethics Committee. Skin permeation *ex vivo* studies ($n=6$) were performed using Bronaugh type flow-through diffusion cells

with full-thickness undamaged human skin. Diffusional area in the cell was 0.64 cm^2 . The experiment was conducted according to the methods published in scientific publications [79, 169].

Evaluation of resveratrol photostability. Photostability studies were performed to determine the effect of UVB on the trans-resveratrol to cis-resveratrol transformation. Samples (2% ME-RES S:CoS 5:1, 2% ethanolic resveratrol solution and OPT-ME S:CoS 5:1) were exposed to the light source $<1 \text{ mW cm}^{-2}$ for 4 hours using MRL-58 Multiple-Ray UV lamp (Ultra-Violet Products Ltd, UK) [44, 132]. Aliquots were taken from 2% ME-RES and RES-control at 15, 30, 60, 120, and 240 min, diluted with ethanol, and trans- and cis-resveratrol were determined by HPLC. Physical stability of 2% ME-RES S:CoS 5:1 and OPT-ME S:CoS 5:1 was evaluated by measuring the droplet size and PDI applying the dynamic light scattering technique after UVB irradiation for 120 and 240 min [74].

***In vivo* skin irritation examination.** Balb/c mice (25–30 g) were used in this experiment ($n=20$, males) [57, 128]. *In vivo* studies were performed in accordance with the permission of State Food and Veterinary Service (Lithuania). Different formulations were used in this experiment: a) OPT-ME S:CoS 5:1; b) 2% ME-RES S:CoS 5:1 and c) resveratrol dissolved in surfactant (RES-control). The experiment was performed as described in scientific publications [47, 94]. Histological analysis of mice skin was performed using an OLYMPUS BX 40F4 microscope supplied with the XC30 digital camera (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Statistical methods. MEs optimization was performed using experiment planning software Design-Expert 6.0.8, D-optimal design model. Statistical analysis of experimental data was performed using SPSS software (version 19.0) and Microsoft Office Excel 2013. One Way ANOVA method with Tukey HSD (Honestly Significant Difference) criterion or Repeated Measures ANOVA were used for statistical analysis. Means, standard deviations, Spearman's correlation coefficient were calculated. Statistically significant difference was determined when value of $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Formulation and optimization of experimental microemulsions

MEs were formulated using PEG-8 caprylic/capric glycerides and polyglyceryl-6-isostearate as surfactant and cosurfactant, respectively. Ethyl oleate was chosen as an oily phase for formulation of MEs as available data demonstrate maximum efficiency of PEG-8 caprylic/capric glycerides solubilizing capacity of ethyl oleate instead of isopropyl myristate [45].

The design of experiment was applied to define the minimum number of experimental compositions of O/W type MEs in the defined region of pseudoternary phase diagram. The input of limit values for MEs forming components (Table 3.2.1) produced 14 experimental formulations for compositions containing S:CoS in 5:1, 6:1, and 7:1 weight ratios (n=42). Formulated MEs were evaluated regarding mean droplet size, single peak distribution of droplet size, and minimum deviation from the mean of droplet size value (Supplementary material, Tables 2, 3, and 4). For more information, see manuscript “Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol”.

Optimization of MEs formulations were performed applying D-optimal design model. Designed optimal compositions of MEs (OPT-MEs) with different S:CoS weight ratios are demonstrated in Table 1.

Table 1. *Optimal compositions of microemulsions with different S:CoS weight ratios*

Name of samples	S:CoS weight ratios	Amount of components, %		
		S:CoS	Water	Oil
OPT-ME 5:1	5:1	57	38	5
OPT-ME 6:1	6:1	55.5	37.9	6.6
OPT-ME 7:1	7:1	56	37.6	6.4

OPT-MEs were formulated and droplet size, droplet size distribution, and standard deviation from the mean of the droplet size were evaluated. Study results demonstrated that theoretically designed characteristics had no significant difference if compared to determined values of OPT-MEs characteristics. For more information, see manuscript “Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol”.

Study results indicated suitability of applied theoretical approach for modelling of MEs and all formulated OPT-MEs (S:CoS 5:1, 6:1, and 7:1) were used for further investigations.

Quality evaluation of optimal microemulsions

Thermodynamic stability studies. The results of OPT-MEs thermodynamic stability studies demonstrated that all prepared formulations were transparent, no signs of phase separation, cracking or creaming in OPT-MEs were determined.

Determination of physical characteristics. Droplet size, PDI, conductivity, viscosity and pH of OPT-MEs were determined (Table 3.3.1.1). Droplet size of OPT-ME 5:1, OPT-ME 6:1 and OPT-ME 7:1 were 68.54 ± 1.18 nm, 66.08 ± 0.16 nm, and 66.66 ± 0.56 nm, respectively. PDI values of formulated OPT-MEs were relatively low (0.274–0.288) and single peak distribution of droplet size was determined, thus indicating homogeneity of disperse phase. O/W type of OPT-MEs was confirmed by conductivity measurements (74.45 – 95.55 $\mu\text{S}/\text{cm}$) [18, 115, 134]. The viscosity of all tested OPT-MEs varied between 53.95 – 62.80 mPa•s, and these results were similar to the published data for the same type of MEs [115, 134]. The pH of OPT-MEs were in physiologically acceptable range [6, 107]. Characteristics of OPT-MEs confirmed that formulated systems met the requirements for O/W type MEs.

Stability studies. Study results demonstrated that storage conditions affected the quality of OPT-MEs. According to research data [69], formulated MEs are stable during the storage period of the long-term stability study. The study results demonstrated that all OPT-MEs (S:CoS 5:1, 6:1, and 7:1) remained stable during 6 months stability testing period when formulations were stored protecting from light and long-term stability conditions (Figs. 3.3.2.1–3.3.2.3). Significant changes of OPT-MEs droplets size were determined when samples were stored in accelerated stability conditions and exposed to light (Figs. 3.3.2.1–3.3.2.3). Study results demonstrated the highest increase of droplet size and decrease of PDI when OPT-MEs were stored under light. Droplet size of OPT-MEs increased by 28.4–55.2%, depending on S:CoS weight ratio, after 6-months stability studies. The increase of droplet size could be related to the changes of MEs forming components, which are destabilised by external stress factors (high temperature and light).

Formulation and quality evaluation of microemulsions containing resveratrol

Optimal compositions of MEs with different S:CoS weight ratios were used for resveratrol incorporation. Resveratrol was dissolved in surfactant and oily phase, thus minimizing possible redistribution of resveratrol between phases of MEs and achieving high incorporated quantities. According to resveratrol solubility and scientific research data, 1%, 2%, 3% and 4% microemulsions containing resveratrol (MEs-RES) with S:CoS weight ratios 5:1 (ME-RES 5:1), 6:1 (ME-RES 6:1) and 7:1 (ME-RES 7:1) were formulated (n=12). Stability of MEs-RES was evaluated visually. The study results showed that 4% MEs-RES (S:CoS 5:1, 6:1 and 7:1) were cloudy,

confirming instability of formulated systems. Transparency of 1%, 2% and 3% MEs-RES with different S:CoS weight ratios was observed after 24 hours' equilibration, and all these formulations were used for further investigation.

Thermodynamic stability studies. The results of MEs-RES thermodynamic stability studies demonstrated that all prepared formulations were transparent, no signs of phase separation, cracking or creaming in MEs were determined.

Determination of physical characteristics. Physical characterization of MEs-RES was performed to detect possible effects of resveratrol inclusion into disperse phase of OPT-MEs (Table 3.4.1.1). Study results demonstrated that resveratrol incorporation into OPT-MEs increased droplet size. The results of statistical analysis showed a statistically significant ($P < 0.05$) direct correlation ($r = 0.844$) between the incorporated amount of resveratrol and the mean droplet size. The study results demonstrated that increasing concentration of resveratrol increased droplet size of MEs-RES and it could be related to a large incorporated amount of resveratrol, which is distributed between the surfactant and cosurfactant molecules, which are forming interfacial surface of MEs droplets [28, 44, 134]. The similar effects for droplet size increase is described in scientific publications when active substances were incorporated into disperse systems [54, 132, 134]. The droplet size of 1%, 2% and 3% MEs-RES with different S:CoS weight ratios were smaller than 200 nm, confirming that formulated system met the droplet size requirements for MEs [134]. Droplet size measurements of 1% and 2% ME-RES 5:1 demonstrated single peak distribution of droplet. When 3% resveratrol was incorporated into OPT-ME 5:1 the presence of two-peak droplet distribution pattern was determined (Fig. 3.4.1.1). The droplet size measurements of 1%, 2% and 3% MEs-RES revealed existence of two-peak droplet distribution in ME-RES 6:1 and ME-RES 7:1 24 hours after formulation (Figs. 3.4.1.2, 3.4.1.3). However, PDI values of formulated MEs-RES were relatively low (0.227–0.274) thus indicating homogeneity of disperse phase. Determined average conductivity for all tested MEs-RES was close to 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, confirming that formulated MEs-RES maintained O/W type [18, 115, 134]. The inclusion of resveratrol into OPT-MEs caused an increase of disperse system viscosity (Table 3.4.1.1). The pH of MEs-RES was in physiologically acceptable range (6.47–7.18) [6, 107].

Stability studies. Droplet size, PDI and resveratrol concentration were evaluated when MEs-RES were stored at different storage conditions for 6 months. The study results demonstrated that 1% and 2% MEs-RES (S:CoS 5:1, 6:1 and 7:1) remained stable during 6-months stability testing period

when formulations were stored protecting from light and long-term stability conditions. The droplet size of all formulations increased until 5.7% after 6-month stability studies (Figs. 3.4.2.1.1–3.4.2.1.3). The study revealed that the percentage droplet size increase of OPT-MEs and MEs-RES was similar, confirming that amount of resveratrol incorporated into MEs had no effect on the relative droplet size changes. The study results demonstrated that ME-RES storage conditions affected the quality of formulated systems. The droplet size of MEs-RES statistically significantly increased when all formulations were stored in accelerated stability conditions (Figs. 3.4.2.1.1–3.4.2.1.3). The droplet size of 1% MEs-RES and 2% MEs-RES increased 7.1–12.8%, and 15.4–18.3%, respectively, depending on S:CoS weight ratio. The study results showed instability of all 3% MEs-RES when formulations were stored in accelerated storage conditions. The study results demonstrated PDI decrease, thus indicating redistribution of droplet size within fractions. Significant changes of droplet size were not observed when MEs-RES were stored unprotected from light, however resveratrol concentration statistically significant decreased after 6-months stability test (Fig. 3.4.2.2.1). The concentration of resveratrol decreased by 78.0–82.0% and 57.5–65.5% in 1% and 2% MEs-RES, respectively, when data of 24 hours was compared to 6-months stability results. The increase of droplet size and decrease of RES concentration could be related to the changes of MEs forming components, which are destabilised by high temperature, and photosensitivity of resveratrol, respectively. Changes of resveratrol concentration were not determined when MEs-RES were stored in other storage conditions. The results of our study demonstrated higher resveratrol stability in 2% MEs-RES (S:CoS 5:1, 6:1 and 7:1) when compared to 1% MEs-RES (S:CoS 5:1, 6:1 and 7:1). Incorporation of maximum resveratrol amount into OPT-MEs was desirable to formulate stable MEs-RES, therefore 2% MEs-RES (S:CoS 5:1, 6:1 and 7:1) were selected for further biopharmaceutical tests.

Biopharmaceutical evaluation of microemulsion containing resveratrol

In vitro release studies. The results of resveratrol release from 2% MEs-RES (S:CoS 5:1, 6:1 and 7:1) evaluation demonstrated a constant release rate over the 6 hours testing (Fig. 3.5.1.1). The highest amount of resveratrol ($60.73 \pm 4.58\%$) was released from 2% ME-RES 5:1 during 6 hours test. Study results showed that released amount of resveratrol from 2% ME-RES 6:1 and 2% ME-RES 7:1 were $39.81 \pm 2.08\%$ and $41.81 \pm 1.99\%$, respectively. Statistically significant difference was not established between amount of resveratrol released from 2% ME-RES 6:1 and 2% ME-RES 7:1.

However statistically significant difference was determined between released amount of resveratrol from 2% ME-RES 5:1 and 2% ME-RES 6:1 or 2% ME-RES 7:1. Different released amount of resveratrol could be associated with the homogeneity of disperse system. The droplet size measurements of formulated system revealed existence of two-peak droplet distribution in ME-RES 6:1 and ME-RES 7:1. Single peak droplet size distribution was observed when 2% ME-RES 5:1 were evaluated, thus confirming better homogeneity of disperse system. A zero order kinetic model was used to describe release kinetics of the drug from the formulated systems ($R^2=0.992$). Results of drug release studies confirmed the suitability of the carrier to incorporate and release resveratrol, and 2% ME-RES (S:CoS 5:1, 6:1 and 7:1) formulations were considered acceptable for further *ex vivo* testing.

Penetration of resveratrol into the human skin ex vivo. *Ex vivo* penetration studies were performed to evaluate MEs influence of resveratrol delivery into the skin. Resveratrol penetration from PEG-8 caprylic/capric glycerides and ethyl oleate were used as control. The results of *ex vivo* studies of the skin penetration showed that resveratrol demonstrated lipophilic properties and mostly accumulated in epidermis. Meanwhile, when 2% MEs-RES (S:CoS 5:1, 6:1 and 7:1) were applied on the skin, better resveratrol penetration into deeper layers of the skin was determined and these findings support the suitability of MEs for enhancing the delivery of resveratrol into dermis [67, 68]. For more information, see manuscript “Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol”.

Biopharmaceutical study results showed that 2% MEs-RES 5:1 released the highest amount of resveratrol and demonstrated better resveratrol penetration into the human skin *ex vivo*, therefore this formulation was selected for further investigations.

Evaluation of resveratrol photostability

Protective effect of the formulated ME-RES 5:1 on the photostability of resveratrol under UVB exposure and stability of *trans*-resveratrol in MEs and ethanolic solution of resveratrol (RES-control) were evaluated. The concentration of *trans*-resveratrol in tested formulations was 2%. The results of photodegradation studies demonstrated a decrease of *trans*-resveratrol concentration by 83.7% and 39.1% in ethanolic solution and ME-RES 5:1, respectively after 4 hours testing. The results of the study confirmed that inclusion of resveratrol in MEs decreased photoisomerization of active substance.

The effect of UVB irradiation on MEs (OPT-ME 5:1 and ME-RES 5:1) droplet size characteristics was evaluated by measuring the mean droplet size and PDI before and after UVB exposure. For more information, see manuscript “Testing of resveratrol microemulsion photostability and protective effect against UV induced oxidative stress”.

Biological evaluation of experimental formulations

In vivo skin irritation assays. Different formulations (OPT-ME 5:1, 2% ME-RES 5:1, and surfactant solution with resveratrol) were used to evaluate a possible effect of skin irritation. The study results demonstrated that the skin of mice remained unchanged after 24, 48 and 72 hours test. Erythema or skin dryness were not observed.

Histological evaluation of the skin samples showed that experimental formulation did not cause skin irritation and had no influence on epidermis changes of mice skin (Fig. 3.7.1). The epidermal thickness of control mice was $21.3 \pm 3.4 \mu\text{m}$ (Fig. 3.7.1, A). When mice skin were treated with OPT-ME 5:1 and 2% RES-ME 5:1, epidermal thickness was $23.9 \pm 4.3 \mu\text{m}$ and $21.9 \pm 3.9 \mu\text{m}$, respectively (Fig. 3.7.1, B, C). The highest epidermal thickness of mice skin ($28.0 \pm 6.1 \mu\text{m}$) was determined when mice were treated with surfactant solution with resveratrol (Fig. 3.7.1, D). No statistically significant ($P > 0.05$) difference was established between epidermal thickness of control mice skin and epidermal thickness of mice skin treated by experimental formulations. *In vivo* study results did not demonstrate irritation effects when MEs, containing relatively high concentrations of surface active substances, were applied on the skin, therefore formulated ME-RES are safe for topical application.

CONCLUSIONS

1. The compositions of experimental microemulsions were formulated by using experimental planning. Optimisation of experimental microemulsions was performed setting three criteria as important: (i) the range of microemulsions droplet size 1 nm to 100 nm; (ii) single peak distribution of droplet size; (iii) minimum deviation from the mean of the droplet size value. The conformity between the properties of produced and formulated microemulsions has proven the correctness of the theoretical model and the choice of critical quality parameters.
2. Formulated microemulsions were thermodynamically stable and their droplet size average was in range of 66.08–68.54 nm, polydispersity index 0.274–0.288, pH value 7.01–7.11, electrical conductivity 74.45–95.55 $\mu\text{S}/\text{cm}$ and viscosity 53.95–62.80 $\text{mPa}\cdot\text{s}$, and thus confirmed that the formulated microemulsions complied the quality requirements for this dispersion system and are suitable for use on the skin. The significance of average droplet size and polydispersity index was confirmed by evaluating stability of microemulsions affected by temperature and light exposure, because these factors destabilize the components of microemulsions.
3. The effect of resveratrol concentration on the changes in physical and chemical properties of optimal microemulsions was investigated and evaluated. Incorporation of resveratrol into optimal microemulsions demonstrated statistically significant increase in the average droplet size, which depended on the amount of resveratrol in microemulsions. Relatively good solubility of resveratrol into the surface active substances demonstrated its distribution in the interphase layer of disperse system explaining the changes in droplet size of microemulsions.
4. Formulated microemulsions containing resveratrol remained stable for 6 months keeping them at 15–25°C temperature, protecting them from light and at long-term stability testing conditions. The average droplet size increased by 7.1–18.3% and polydispersity index decreased by 7.2–15.0%, depending on surfactant and cosurfactant weight ratios and concentration of resveratrol, when microemulsions containing resveratrol were stored in accelerated stability testing conditions due to sensitivity of components of microemulsions to temperature. Isomerisation of resveratrol was determined when disperse system was only affected by direct light.
5. The active role of the carrier in the process of release of the active substance has been confirmed. Different resveratrol release kinetics from microemulsions was caused by the weight ratio of the surfactant and cosurfactant, droplet size distribution in the formulated system and its

homogeneity. *In vitro* study results demonstrated that resveratrol was released more intensively from a 2% resveratrol microemulsion when surfactant and cosurfactant weight ratio was 5:1 and the disperse system was homogeneous.

6. The suitability of microemulsion as the carrier for improving resveratrol penetration into deeper layers of the skin has been proven by *ex vivo* testing. The results of penetration studies into the human skin *ex vivo* showed that microemulsions containing resveratrol improved resveratrol penetration into dermis by 0.9 to 1.3 times, therefore it can provide local protective effects.
7. Photostability study results have confirmed that the formulated microemulsions increased resveratrol's resistance to UVB radiation, and resveratrol stabilised microemulsion components, which are sensitive to UVB radiation. The study results demonstrated that the concentration of trans-resveratrol in formulated microemulsions containing resveratrol remained 3.2 times higher than in ethanolic solution and the average droplet size of microemulsions containing resveratrol was 1.7 times less if compared to optimal microemulsions.
8. The results of *in vivo* animal testing have confirmed that relatively high amounts of surface active substances used in microemulsion formulation did not irritate the animal skin and did not influence the changes of epidermis. The study results demonstrated that formulated microemulsions containing resveratrol were sufficiently safe for topical application.

PRIEDAI

1 lentelė. Mikroemulsijų sudėtys, sugeneruotos naudojant D-optimalų dizaino modelį, ir jų dalelių dydis

Eil. Nr.	Sudėtis, proc.			Dalelių dydis, nm			
	S/KoS	Vanduo	Aliejus	S/KoS 4:1	S/KoS 5:1	S/KoS 6:1	S/KoS 7:1
1	52,5	37,5	10,0	73,27	70,50	65,46	65,50
2	50,0	45,0	5,0	53,04	49,14	46,6	47,83
3	45,0	45,0	10,0	54,02	50,29	51,58	53,75
4	60,0	35,0	5,0	82,23	86,98	70,49	71,55
5	50,0	35,0	15,0	91,67	79,16	129,10	149,50
6	45,0	40,0	15,0	91,03	74,22	–	–
7	55,0	40,0	5,0	63,94	61,16	56,69	60,41
8	48,8	42,5	8,8	60,86	67,80	51,28	55,30
9	48,8	38,8	12,5	72,09	57,36	117,50	106,70
10	55,0	35,0	10,0	84,08	79,45	78,63	75,63
11	60,0	35,0	5,0	83,54	84,45	78,18	77,44
12	50,0	35,0	15,0	86,93	81,31	141,00	161,00
13	50,0	45,0	5,0	53,52	51,09	49,85	48,40
14	45,0	45,0	10,0	54,54	50,60	56,56	67,51

2 lentelė. Mikroemulsijų sudėtys (S/KoS 5:1), sugeneruotos naudojant D-optimalų dizaino modelį, ir gautas atsakas

Eil. Nr.	ME komponentai, proc.			VDD, nm	Standartinis nuokrypis, nm	Smailių skaičius
	S/KoS 5:1	Vanduo	Aliejus			
1	52,5	37,5	10,0	70,50	54,98	1
2	50,0	45,0	5,0	49,14	72,82	1
3	45,0	45,0	10,0	50,29	81,27	2
4	60,0	35,0	5,0	86,98	50,90	1
5	50,0	35,0	15,0	79,16	63,49	1
6	45,0	40,0	15,0	74,22	88,06	2
7	55,0	40,0	5,0	61,16	50,83	1
8	48,8	42,5	8,8	67,80	71,23	1
9	48,8	38,8	12,5	57,36	66,28	1
10	55,0	35,0	10,0	79,45	46,94	1
11	60,0	35,0	5,0	84,45	63,02	1
12	50,0	35,0	15,0	81,31	68,77	1
13	50,0	45,0	5,0	51,09	92,49	1
14	45,0	45,0	10,0	50,60	79,10	2

3 lentelė. Mikroemulsijų sudėtys (S/KoS 6:1), sugeneruotos naudojant D-optimalų dizaino modelį, ir gautas atsakas

Eil. Nr.	ME komponentai, proc.			VDD, nm	Standartinis nuokrypis, nm	Smailių skaičius
	S/KoS 6:1	Vanduo	Aliejus			
1	60,0	35,0	5,0	78,08	46,55	1
2	46,0	39,0	15,0	76,16	77,73	2
3	50,0	45,0	5,0	48,78	55,01	1
4	50,0	35,0	15,0	79,51	64,93	1
5	46,0	45,0	9,0	48,54	80,31	1
6	52,7	39,9	7,4	60,47	51,16	1
7	55,0	35,0	10,0	75,89	46,95	1
8	48,2	40,9	10,9	59,65	67,01	1
9	50,2	37,4	12,4	69,01	61,74	1
10	50,2	42,4	7,4	55,36	58,29	1
11	50,0	45,0	5,0	48,51	54,26	1
12	46,0	39,0	15,0	75,17	83,72	2
13	60,0	35,0	5,0	77,51	47,03	1
14	46,0	45,0	9,0	48,74	77,03	1

4 lentelė. Mikroemulsijų sudėtys (S/KoS 7:1), sugeneruotos naudojant D-optimalų dizaino modelį, ir gautas atsakas

Eil. Nr.	ME komponentai, proc.			VDD, nm	Standartinis nuokrypis, nm	Smailių skaičius
	S/KoS 7:1	Vanduo	Aliejus			
1	60,0	35,0	5,0	76,12	45,56	1
2	46,0	39,0	15,0	77,69	77,72	2
3	50,0	45,0	5,0	47,68	51,93	1
4	50,0	35,0	15,0	79,94	64,64	1
5	46,0	45,0	9,0	47,67	71,18	1
6	52,7	39,9	7,4	59,00	50,04	1
7	55,0	35,0	10,0	74,88	45,91	1
8	48,2	40,9	10,9	58,89	65,12	1
9	50,2	37,4	12,4	68,01	56,20	1
10	50,2	42,4	7,4	54,07	55,33	1
11	50,0	45,0	5,0	47,75	51,11	1
12	46,0	39,0	15,0	77,19	80,39	2
13	60,0	35,0	5,0	75,79	43,84	1
14	46,0	45,0	9,0	47,95	74,35	1



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT 44307 Kaunas, tel. (+370) 37 32 68 89; el.paštas: kaunorbtek@ismuni.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2016-07-14 Nr. BE-2-41

Biomedicininio tyrimo pavadinimas:	"Biologiškai aktyvių medžiagų skvarbos į (pro) biologines membranas vertinimas"
Protokolo Nr.:	BTP-1
Data:	2016-06-16
Versija:	1
Asmens informavimo forma	Var. 2, 2016-07-13
Pagrindinis tyrėjas:	Prof. Vitalis Briedis
Biomedicininio tyrimo vieta:	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Įstaigos pavadinimas:	A. Mickevičiaus g. 9, Kaunas
Adresas:	Klinikinės farmacijos katedra Sukilėlių per. 13, Kaunas

Išvada:

Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto posėdžio, įvykusio **2016 m. liepos mėn. 8 d.** (protokolo Nr. BE-10-10) sprendimu pritarta biomedicininio tyrimo vykdymui.

Mokslinio eksperimento vykdytojai įsipareigoja: (1) nedelsiant informuoti Kauno Regioninį biomedicininio Tyrimų Etikos komitetą apie visus nenumatytus atvejus, susijusius su studijos vykdymu, (2) iki sausio 15 dienos – pateikti metinį studijos vykdymo apibendrinimą bei, (3) per mėnesį po studijos užbaigimo, pateikti galutinį pranešimą apie eksperimentą.

Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1.	Prof. Romaldas Mačiulaitis	Klinikinė farmakologija	taip
2.	Prof. Edgaras Stankevičius	Fiziologija, farmakologija	taip
3.	Doc. Eimantas Peičius	Filosofija	ne
4.	Dr. Ramunė Kasperavičienė	Kalbotyra	taip
5.	Med. dr. Jonas Andriuskevičius	Chirurgija	taip
6.	Agnė Krušinskaitė	Teisė	taip
7.	Prof. Skaidrius Miliauskas	Pulmonologija, vidaus ligos	ne
8.	Med. dr. Rokas Bagdonas	Chirurgija	ne
9.	Eglė Vaižgelienė	Visuomenės sveikata	ne

Kauno regioninis biomedicininio tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininio tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Kauno RBTEK pirmininką pavaduojantis ekspertas

Prof. Edgaras Stankevičius



A. Grigonis
L. SMU Veterinarijos
akademijos kancleris
Henrikas Žilinskas

VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA

2016 GAUTA
01 mėn. 06 d.
VAK-1
Nr.

LEIDIMAS ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROCEDŪRŲ PROJEKTĄ

2015-12-31 Nr. G2-37

Vilnius

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. specialusis leidimas, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2015-12-23 išvada Nr. 18 „Dėl leidimo atlikti bandymus su gyvūnais“,

leidžiama

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijai,

(tūkio subjekto (-ų), kuriam (-iems) išduotas leidimas atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą)

Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, 302536989,

(adresas (-ai), kodas (-ai) Juridinių asmenų registre)

atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą

„Resveratolio mikroemulsijų priešuždegiminio ir pažeidų skatinančio poveikio vertinimas *in vivo*“.

(bandymo su gyvūnais procedūrų projekto pavadinimas, vadovas, naudojami gyvūnai)

projekto vadovas Aidas Grigonis, naudojant 170 pelių,

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijoje, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas.

(bandymo su gyvūnais procedūrų projekto atlikimo vietos pavadinimas, adresas)

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą galioja iki 2019 m. balandžio 7 d.

Direktorius pavaduotojas,
pavaduojantis direktorių



Vidmantas Paulauskas

CURRICULUM VITAE

Name Vaida
Surname JUŠKAITĖ
Address: Sukilėlių pr. 13, Kaunas
E-mail: Vaida.juskaite@lsmuni.lt

Education

Until 2005 Batniava Lower Secondary School, Kaunas region,
Lithuania
2005–2007 Raudondvaris Gymnasium, Kaunas region, Lithuania
2007–2012 Kaunas University of Medicine, Faculty of Pharmacy,
Master's degree of Pharmacy, Lithuania

Qualification

Since 2012 Professional qualification of pharmacist

Work experience

2012 07–2012 09 UAB “Gintarinė Vaistinė”, community pharmacist
2012 10–2013 08 UAB “Staugaitienės Vaistinė”, community pharmacist
2012 09–2013 09 Lithuanian University of Health Sciences, Department
of Clinical Pharmacy, laboratory assistant
Since 2013/07 Lithuanian University of Health Sciences, Department
of Clinical Pharmacy, junior researcher
Since 2013/09 Lithuanian University of Health Sciences, Department
of Clinical Pharmacy, assistant

PADĖKA

Dėkoju disertacinio darbo vadovui prof. Vitaliui Briedžiui ir visam Klinikinės farmacijos katedros kolektyvui už visapusišką pagalbą ir suteiktą materialinę bazę.

Dėkoju Dr. L. Kriaučeliūno smulkiųjų gyvūnų klinikos darbuotojams doc. Aidui Grigoniui, dr. Marijai Ivaškienei, Linai Babickaitei ir Andriui Kavaliauskui už bendradarbiavimą atliekant mokslinius tyrimus su eksperimentiniais gyvūnais.

Dėkoju Histologijos ir embriologijos katedros vedėjai prof. Angelijai Valančiūtei ir jos kolektyvui už suteiktą materialinę bazę, pagalbą ir vertingus patarimus atliekant histologinius tyrimus.

Dėkoju Vaistų technologijos ir socialinės farmacijos katedros profesorei Daivai Majienei už suteiktas žinias ir vertingus patarimus atliekant mokslinius tyrimus su ląstelių kultūromis.

Dėkoju prof. Vilmantei Borutaitei ir visam Neuromokslų instituto Biochemijos laboratorijos kolektyvui už suteiktą galimybę atlikti mokslinius tyrimus su ląstelių kultūromis.

Dėkoju LSMU Mokslo fondui ir Atviram LSMU fondui už suteiktą finansinę paramą.