

Polymer/surfaktant systémy pro enkapsulaci aktivních látek

Bc. Dita Krhovská

Diplomová práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Dita Krhová
Osobní číslo: T18720
Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Technologie tuků, detergentů a kosmetiky
Forma studia: kombinovaná

Téma práce: Polymer/surfaktant systémy pro enkapsulaci aktivních látek

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

1. Inkorporace aktivních látek do vhodných nosičů (enkapsulace do micel, lipozomů, mikročástic?).
2. Polymer/surfaktant interakce.
3. Aktivní látky vhodné pro enkapsulaci (esenciální oleje, vitamíny?).

Praktická část:

1. Studium agregačního chování vybraných surfaktantů.
2. Příprava systémů polymer/surfaktant s obsahem aktivních látek.
3. Charakterizace připravených systémů (tenziometrie, viskozimetrie, velikost částic,?).
4. Diskuze dosažených výsledků a závěry.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] LAKKIS, J. M. *Encapsulation and Controlled Release technologies in Food Systems*, UK, John Wiley & Sons, Inc., 2016, ISBN 9781118733523.

[2] KRONBERG, B. *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers (str. 197)*, UK, John Wiley & Sons, Inc., 2016, ISBN 978-1-119-96124-6.

[3] THORMAR, H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, UK, John Wiley & Sons, Inc., 2011, ISBN 978-0-470-74178-8.

[3] MYERS, D. *Surfactant Science and Technology*. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2006, ISBN 978-0-471-68024-6.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

2. ledna 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2019

Ve Zlíně dne 12. března 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 8.5.2019



.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo.

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Teoretická část diplomové práce se zabývá systémy, které jsou vhodné pro enkapsulaci aktivních látek. Jedná se především o micely, liposomy a polymerní micely. Dále jsou charakterizovány vybrané polymerní nosiče a aktivní látky aplikovatelné pro enkapsulaci.

V rámci experimentální části byly připraveny polymerní vzorky na bázi chitosan/zein/surfaktant s obsahem aktivních látek tokoferol anebo thymol. Následně byly u těchto systémů sledovány fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je povrchové napětí, velikost částic, zeta potenciál a v neposlední řadě byl stanoven enkapsulační účinek v závislosti na různém zastoupení polymerů ve směsi.

Klíčová slova: enkapsulace, chitosan, polymer, surfaktant, thymol, tokoferol, zein.

ABSTRACT

The theoretical part of the thesis deals with systems that are suitable for encapsulation of active substances, especially micelles, liposomes and polymeric micelles. Selected polymeric carriers and active substances applicable for encapsulation were characterized.

In the experimental part polymer samples based on chitosan/zein/surfactant with tocopherol and/or thymol were prepared. Their physico-chemical properties were monitored, such as surface tension, zeta potential, and particle size. Moreover, the encapsulation efficiency was determined with regard to various ratios of polymers in the mixture.

Keywords: encapsulation, chitosan, polymer, surfactant, thymol, tocopherol, zein.

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí Ing. Janě Sedlaříkové, Ph.D., nejen za její skvělou pomoc a ochotu ve vedení diplomové práce, za její cenné rady a spolupráci při vypracování výsledků, ale také za čas a trpělivost, jenž mi věnovala během celé naší diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Krejčímu, CSc., za odborné konzultace a poskytnuté rady během experimentální části diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 FORMY NOSIČŮ PRO ENKAPSULACI AKTIVNÍCH LÁTEK	12
1.1 MICELY	12
1.1.1 Kritická micelární koncentrace	13
1.1.2 Agregační číslo a kritický agregační parametr.....	14
1.2 POLYMERNÍ MICELY	15
1.3 LIPOSOMY	16
1.3.1 Struktura a klasifikace liposomů	17
1.3.2 Příprava liposomů	18
2 POLYMERNÍ MATERIÁLY PRO PŘÍPRAVU NOSIČŮ	20
2.1 ZEIN	20
2.2 CHITOSAN	21
2.3 POLYETHYLENGLYKOL.....	24
2.4 SERICIN A FIBROIN.....	24
2.5 POLYASPARTÁT.....	25
2.6 POLYLAKTID	25
2.7 KOLAGEN	25
2.8 KYSELINA HYALURONOVÁ	25
3 AKTIVNÍ LÁTKY VHODNÉ PRO ENKAPSULACI	26
3.1 VITAMINY	26
3.1.1 Vitamin A.....	26
3.1.2 Vitamin B ₅	27
3.1.3 Vitamin C	27
3.1.4 Vitamin E	27
3.1.5 Vitamin F	29
3.1.6 Vitamin P	29
3.2 ESENCIÁLNÍ OLEJE.....	29
3.2.1 Tymiánový olej	31
3.2.2 Eukalyptový olej	31
3.2.3 Mentolový olej	32
3.2.4 Olej z čajovníku	32
3.2.5 Citrusové oleje	32
3.2.5.1 Bergamotový olej.....	33
3.2.5.2 Pomerančový olej	33
4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	34
II PRAKTICKÁ ČÁST	37
5 CÍLE PRÁCE	38
6 CHEMIKÁLIE, POUŽITÉ ZAŘÍZENÍ	39

6.1	CHEMIKÁLIE.....	39
6.2	POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	39
6.3	CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH AKTIVNÍCH LÁTEK	40
6.3.1	Thymol	40
6.3.2	Tokoferol.....	40
6.4	PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH A PRACOVNÍCH ROZTOKŮ	40
6.4.1	Příprava 0,5% zásobního roztoku chitosanu v 1% roztoku kyseliny octové	40
6.4.2	Příprava 0,5% zásobního roztoku zeinu v 75% roztoku ethanolu	41
6.4.3	Příprava roztoku tokoferolu/thymolu	41
6.4.4	Příprava roztoku Tween 20	41
6.4.5	Příprava pracovních roztoků polymerů s aktivními látkami	41
6.4.6	Příprava fosfátového pufru.....	42
6.5	STANOVENÍ KRITICKÉ MICELÁRNÍ KONCENTRACE TENZIDU	43
6.6	MĚŘENÍ ZETA POTENCIÁLU	44
6.7	MĚŘENÍ PH.....	44
6.8	MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC.....	44
6.9	SLEDOVÁNÍ STABILITY	44
6.10	MĚŘENÍ POVRCHOVÉHO NAPĚTÍ	45
6.11	STANOVENÍ ENKAPSULAČNÍHO ÚČINKU.....	45
6.12	STANOVENÍ UVOLNĚNÉ AKTIVNÍ LÁTKY	46
6.13	SEM ANALÝZA.....	47
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	48
7.1	STANOVENÍ KRITICKÉ MICELÁRNÍ KONCENTRACE TWEENU 20.....	48
7.2	ZETA POTENCIÁL	49
7.3	VELIKOST ČÁSTIC.....	53
7.4	STABILITA ČÁSTIC	57
7.5	POVRCHOVÉ NAPĚTÍ.....	63
7.6	STANOVENÍ ENKAPSULAČNÍHO ÚČINKU.....	65
7.7	STANOVENÍ UVOLNĚNÉ LÁTKY	67
7.8	SEM ANALÝZA.....	68
	ZÁVĚR	70
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	72
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	81
	SEZNAM OBRÁZKŮ	82
	SEZNAM TABULEK.....	84

ÚVOD

Pro docílení lepší vstřebatelnosti a prodloužení účinnosti aktivních látek je v posledních letech řešena problematika enkapsulace. V důsledku zabudování aktivních látek do vhodné matrice tak dojde k zabránění kontaktu se vzdušným kyslíkem, a tím i omezení jejich oxidace a degradace.

Enkapsulace aktivních látek je disciplína, která je předmětem studia mnoha vědeckých prací a má význam v mnoha praktických aplikacích. Například ve farmaceutickém průmyslu jsou běžně zkoumány procesy inkorporace různých léčivých látek a vitaminů do polymerních kapslí, v kosmetice pak jde především o zabudování hydratačních, vonných a antioxidačních aktivních složek.

Pro inkorporaci aktivních látek lze využít řadu postupů a typů nosičů. Příkladem mohou být různé nano/mikročástice, liposomy, micely atd. Účelem je efektivní obalení aktivní látky a tak vytvoření systému, který bude dostatečně stabilní a zajistí vhodné podmínky pro dopravení látky na místo určení. Výběr výrobního postupu se podílí na celkovém stavu a vlastnostech konečného produktu.

Důležité jsou i materiály používané pro výrobu těchto systémů. Pro lepší biodegradabilitu a vstřebatelnost v lidském těle jsou preferovány nosiče na bázi přírodních zdrojů.

V této práci byly připraveny a charakterizovány struktury na bázi zein-chitosan s obsahem tokoferolu nebo thymolu. Cílem bylo sledovat vliv různého složení nosičů a typů aktivních látek na fyzikální vlastnosti roztoků a stupeň enkapsulace, stejně jako stabilitu připravených vzorků.

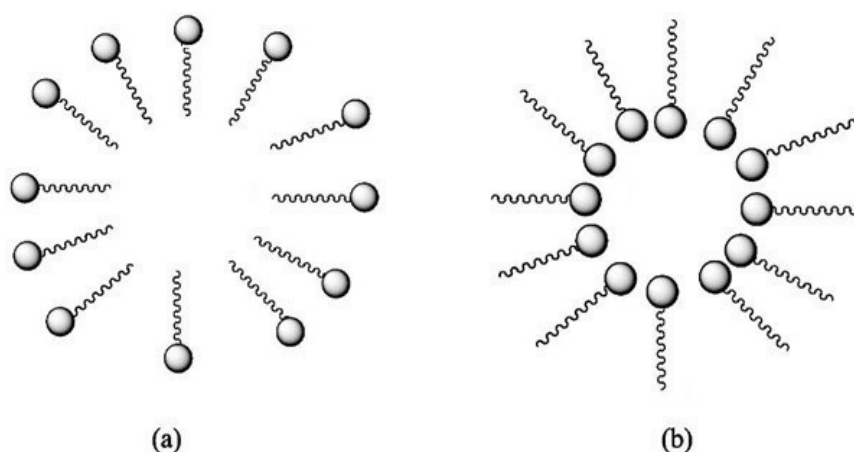
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FORMY NOSIČŮ PRO ENKAPSULACI AKTIVNÍCH LÁTEK

Enkapsulace je proces, při kterém dochází k začlenění aktivní látky, jak už ve formě kapalné, plynné nebo pevné do sekundárního, obalového materiálu. Konečnou formou jsou kapsle, které mohou být různého tvaru a rozměru v řádech od nanometrů až po milimetry. Z morfologického hlediska mohou vznikat kapsle typu jádro-obal (např. polymerní micely, liposomy) nebo se mohou vyskytovat ve formě tzv. matrix. Současné systémy na doručování aktivních látek musí splňovat řadu požadavků, měly by být dostatečně účinné, stabilní, bezpečné a netoxické pro prostředí, kde jsou aplikovány. Pro zapouzdření jsou důležité vlastnosti povlakového materiálu, které se podílejí na stabilitě kapsle, účinnosti zapouzdření a stupně ochrany inkorporované aktivní látky [1, s. 7–8]. Některé typy nosičů pro inkorporaci aktivních látek budou zmíněny v následujících kapitolách.

1.1 Micely

Micely jsou agregáty koloidních rozměrů tvořené sloučeninami amfifilního charakteru. Jedná se o povrchově aktivní látky, tzv. tenzidy, jejichž molekula je tvořena ze dvou částí a to hydrofilní, polární hlavičkou a hydrofobním, nepolárním řetězcem (Obr. 1). V polárním prostředí pak uhlovodíkové nepolární zbytky směřují do vnitřního prostoru, tzv. jádra micely, zatímco vnější obal micely je tvořen hydrofilními částmi molekul tenzidů. Naopak v nepolárních rozpouštědlech vznikají obrácené, inverzní micely, kdy v jádru jsou soustředěny polární skupiny a obal je tvořen nepolární částí směřující do prostředí [2], [3].

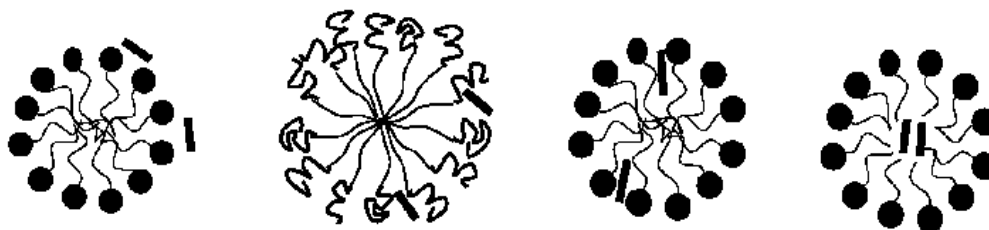


Obr. 1: Struktura a) klasické micely v polárním prostředí a b) inverzní micely v nepolárním prostředí [převzato a upraveno; 4].

Povrchově aktivní látky vykazují v systémech pro doručování aktivních látek celou řadu významných vlastností, jako je například dobrá stabilita, smáčivost nebo biodostupnost. Micelární asociativní koloidy vznikají většinou spontánně a jsou termodynamicky stabilní. Také z toho důvodu se řada výrobců farmaceutických a kosmetických produktů přiklání právě k výběru micelárních struktur. Jejich výroba je poměrně snadná, rychlá a levná [2].

Aktivní látky mohou být v micelách umístěny (Obr. 2):

- na povrchu micely,
- mezi hydrofilními částmi molekul tenzidu v micelle
- nebo ve střední části micely, v jádru [2].



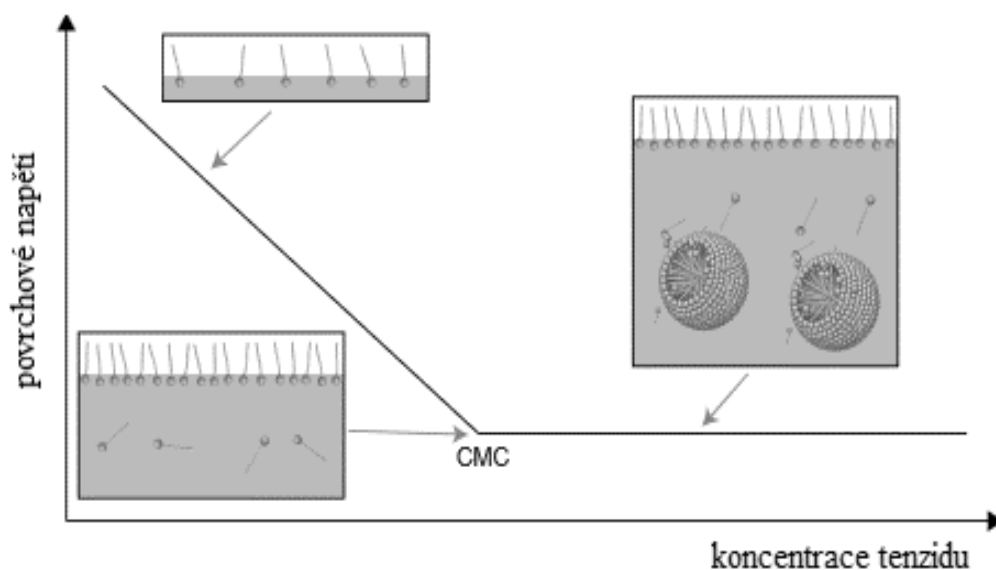
Obr. 2: Solubilizace v micelách v závislosti na hydrofobicitě aktivní látky [2].

1.1.1 Kritická micelární koncentrace

Povrchově aktivní látky mají tendenci se shlukovat do micelární struktury po dosažení tzv. kritické micelární koncentrace (z ang. critical micelle concentration, CMC). Tato hodnota je značně ovlivněna typem tenzidu a u většiny tenzidů dosahuje v řádech kolem 10^{-5} a 10^{-3} mol/l. Níže jsou uvedeny konkrétní případy, které ovlivňují CMC hodnotu:

- u ionogenních tenzidů s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce klesá CMC,
- přítomnost aromatických jader na uhlovodíkovém řetězci snižuje hodnotu CMC,
- hodnota CMC klesá za přítomnosti různých aditiv (příkladem může být ethanol, jehož přidáním lze snížit rozpustnost povrchově aktivní látky),
- za přítomnosti neionických tenzidů je CMC nižší než za použití ionických tenzidů,
- se zvyšujícím nábojem protiontu CMC klesá,
- s rostoucí teplotou se může CMC zvyšovat i snižovat, toto pravidlo závisí na typu tenzidu (např. u kationických tenzidů se CMC zpravidla zvyšuje, u neionických tenzidů se snižuje) [2], [5, s.187–189].

Při dosažení kritické micelární koncentrace dochází ke změně řady fyzikálních vlastností roztoku v závislosti na koncentraci povrchově aktivní látky. Příkladem jsou změny povrchového napětí, viskozity, osmotického tlaku nebo rozptylu světla. Měřením a následným vynesením dané charakteristiky do grafu v závislosti na koncentraci tenzidu lze stanovit CMC. Graf na Obr. 3 znázorňuje pokles povrchového napětí, k němuž dochází, pokud jsou v roztoku přítomny pouze samotné molekuly tenzidu. Naopak po dosažení CMC je patrné pozvolné ustálení hodnot povrchového napětí [6].



Obr. 3: Závislost povrchového napětí na koncentraci tenzidu [převzato a upraveno; 7].

1.1.2 Agregáčn  číslo a kritick  agregační parametr

Micela je sloţena z povrchově aktivních látek, jejichţ počet je definován tzv. agregačním číslem. Tato hodnota roste s délkou uhlovodíkového řetězce, ale klesá s velikostí polární skupiny. Výpočet agregačního čísla je závislý na ploše hydrofilní části a_0 , délce uhlovodíkového řetězce l_c a objemu hydrofobní části v .

Dle těchto hodnot lze vypočítat kritick  agregační parametr (z ang. critical packing parameter, CPP):

$$CPP = \frac{v}{a_0 \cdot l_c} \quad (1)$$

Micelární struktury mohou zaujímat různé tvary. Nejčastěji jde o kulovité, tzv. Hartleyovy micely. Při použití vyšší koncentrace tenzidu se tvoří micely válcovitého tvaru. S dalším zvyšováním koncentrace povrchově aktivní látky vznikají větší vícevrstvé agregáty, lamelární nebo tzv. McBainovy micely. Posledním typem jsou obrácené, inverzní micely, jejichž jádro je tvořeno polární skupinou, zatímco uhlovodíkové zbytky směřují ven do nepolárního prostředí. Tabulka 1 uvádí konkrétní typy micel, které vznikají při agregaci, v závislosti na hodnotě CPP [2], [5, s. 189–190], [8, s. 42].

Tab. 1: Typy micel dle hodnoty CPP [2], [8, s. 42].

Hodnota CPP	Typ micel
$< 1/3$	Sférické
$1/3 < CPP < 1/2$	Válcovité
$1/2 < CPP < 1$	Lamelární
$CPP > 1$	Inverzní

1.2 Polymerní micely

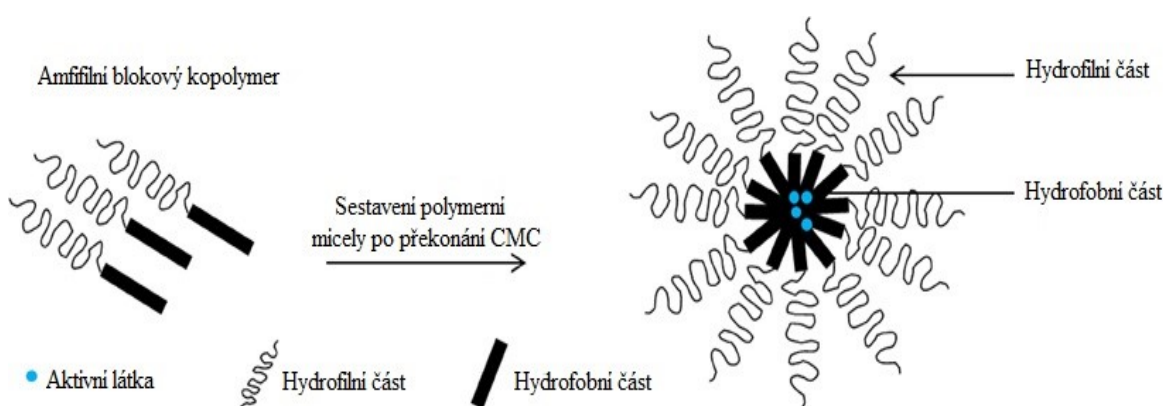
Polymerní micely jsou nanočástice, většinou o velikosti 10–100 nm, složené z amfifilních blokových kopolymerů. Tyto struktury jsou tvořeny vnější a vnitřní vrstvou (Obr. 4), přičemž vnější část je tvořena hydrofilními biokompatibilními polymery, jako je například polyethylenoxid (PEO). Do vnitřní části lze pak inkorporovat hydrofobní aktivní látky, např. léčiva nebo vitaminy. Nepolární molekuly budou adsorbovány na povrchu micely [9], [10].

Polymerní micely mohou, v závislosti na velikosti hydrofilní a hydrofobní části, nabývat různých tvarů, existují micely sférické, tyčinkovité, lamelární, tubulární. Polymerní micely vznikají podobně jako v případě klasických micel, až po překonání kritické micelární koncentrace. Při nízkých koncentracích jsou molekuly kopolymerů ve stavu unimerů, tzv. jednotlivých molekul kopolymerů. Při dosažení CMC se začínají formovat agregáty a aktivní látka se zabudovává do vnitřní části micel. Teplota, při které se začínají z unimerů vytvářet agregáty, se nazývá kritická micelární teplota (critical micelle temperature, CMT) [9], [10].

Příprava polymerních micel spočívá v rozpuštění kopolymerů a aktivní látky v daném rozpouštědle. Pro snadnější rozpustnost kopolymerů se používá metoda míchání a zahřívání nebo

ultrazvuková lázeň. Následuje odstranění rozpouštědla odpařením za účelem vytvoření tenkého kopolymerního filmu s aktivní látkou. Následně je provedena hydratace, kde k přípravnému filmu je přidána voda a vznikají polymerní micely [9], [11, s. 80].

Polymerní micely nacházejí široké uplatnění ve farmacii, a to například při léčbě rakovinných nádorů. Výhodou polymerních micel je jejich menší rozměr, což jim umožňuje delší dobu cirkulace v krvi a následné pozvolné uvolňování aktivní látky v místě určení. Po uvolnění léčiva je polymer z těla vyloučen. Oproti jiným nosičům jsou polymerní micely lépe rozpustné ve vodě, jsou stabilnější a vykazují delší účinek aktivní látky [10].



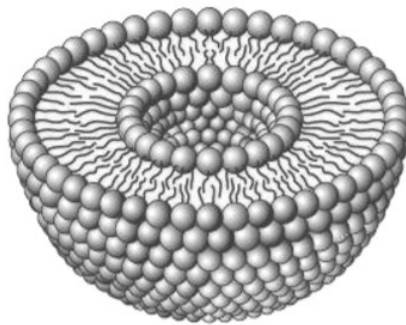
Obr. 4: Struktura polymerní micely [převzato a upraveno; 12].

1.3 Liposomy

Liposomy jsou malé vezikulární systémy, které jsou schopny dodávat aktivní látku na konkrétní místo v organismu. Nejčastěji se využívají jako nosiče léčiv ve farmacii nebo aktivních látek v kosmetice. V kosmetickém průmyslu se vezikulární systémy využívají převážně při výrobě mastí, krémů a opalovacích přípravků. Za enkapsulované aktivní složky se aplikují hydratační, zvláčňující či konzervační přísady. Výhodou krémů a mastí na bázi liposomů je dlouhodobý účinek aktivní látky v místě určení. Díky své malé velikosti dokáží penetrovat přes epidermální vrstvu až do spodní dermální vrstvy pokožky, kde je aktivní látka schopna obnovovat buňky, a tak regenerovat pleť. Dalšími aktivními látkami pro zabudování do liposomů jsou UV filtry. Výhodou těchto liposomálních struktur je lepší odolnost vůči vodě a delší ochranná funkce pokožky před slunečním zářením oproti běžným opalovacím přípravkům [13], [14].

1.3.1 Struktura a klasifikace liposomů

Liposomy jsou složeny z vodné vnitřní fáze a z jedné či více lipidových dvojvrstev, tzv. lamel (Obr. 5). Liposomová membrána je složena z různých typů amfifilních lipidů, nejčastěji fosfolipidů. Příkladem jsou glycerofosfolipidy (fosfatidylcholin známý jako lecitin, fosfatidylserin, atd.), sfingofosfolipidy nebo glykosfingolipidy a další. Součástí membrány mohou být proteiny či cholesterol. Hlavní funkcí cholesterolu je stabilizace lipidové dvojvrstvy a snižování permeability membrány [13].



Obr. 5: Struktura liposomu [13].

Liposomy jsou klasifikovány dle velikosti a počtu lamel na:

- malé unilamelární vezikuly (SUV), které mají průměr 25–100 nm a jsou tvořeny jednou vrstvou lipidů,
- velké unilamelární vezikuly (LUV), které mají průměr 100–1000 nm a jsou tvořeny také jednou vrstvou lipidů,
- multilamelární vezikuly (MLV) o velikosti 100 nm a více, které jsou často tvořeny více vrstvami lamel,
- oligolamelární vezikuly (OLV) o velikosti 100 až 1000 nm s více jak 5ti vrstvami lamel,
- multivezikulární vezikuly (MLV) o průměrné velikosti větší jak 1000 nm [13].

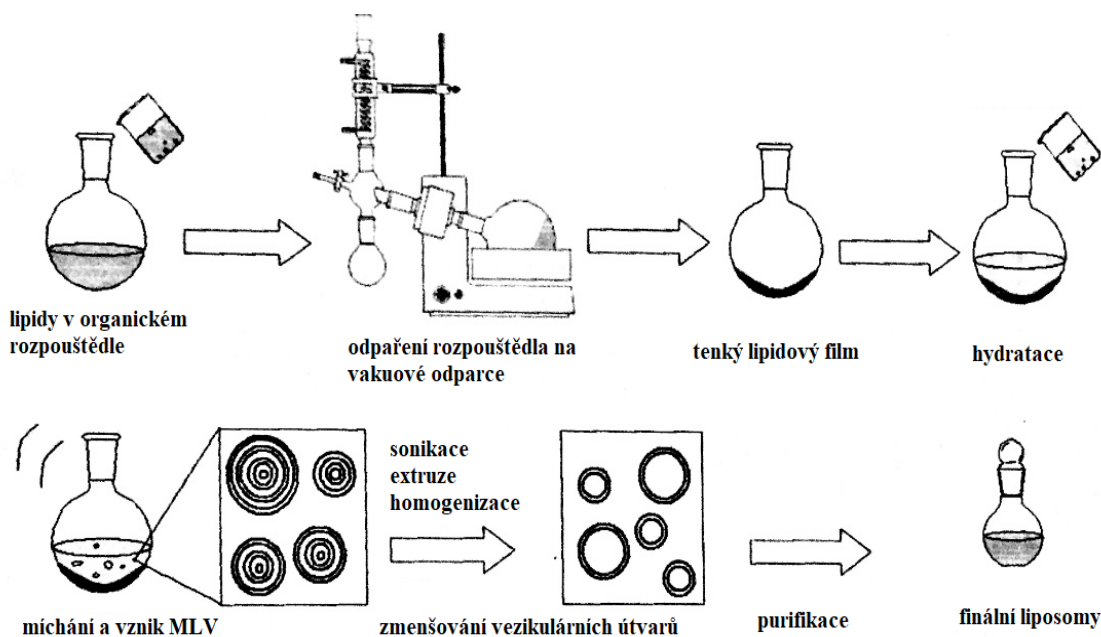
Povrchový náboj liposomů má význam pro prevenci agregace lipidových dvojvrstev, a tedy i pro stabilitu liposomového systému. Hodnotu povrchového náboje lze vyjádřit pomocí hodnoty zeta potenciálu. Soustava se považuje za elektrostaticky stabilní, pokud zeta potenciál dosahuje hodnot větších než +30 mV nebo menších než -30 mV.

Podle náboje můžeme liposomy rozdělit na:

- Liposomy anionické se záporným nábojem. V lipidové dvojvrstvě jsou nejčastěji obsaženy fosfolipidy typu: diacylglycerolfosfatidylglycerol nebo diacylglycerolfosfatidylserin.
- Liposomy kationické s kladným nábojem. V lipidové dvojvrstvě jsou nejčastěji obsaženy fosfolipidy typu: dimethyldioktadecylammonium chlorid/bromid.
- Liposomy neutrální. Lipidová dvojvrstva je složena např. z diacylglycerolfosfatidylglycerolu či diacylglycerolfosfatidylethanolaminu [14], [15].

1.3.2 Příprava liposomů

Liposomy lze připravit s využitím různých metod jako je například hydratace fosfolipidového filmu, lyofilizace, injekční metoda nebo extruze přes membránový filtr. Jedním z nejstarších způsobů výroby je hydratace fosfolipidového filmu za pomoci organických rozpouštědel. Prvním krokem je rozpuštění fosfolipidů v daném rozpouštědle. Následně je rozpouštědlo odpařováno za vzniku tenkého lipidového filmu, který je v dalším kroku podroben hydrataci. Principem je přimíchání vodné fáze, vodného pufru, ke vzniklému lipidovému filmu. Po důkladném promíchání se vodná část zapouzdří do vnitřní části vezikul a začnou se tvořit multilamelní vezikuly (Obr. 6).



Obr. 6: Tvorba tenkého lipidového filmu a následná úprava vezikulárních útvarů [převzato a upraveno; 16].

Rychlejší a snadnějším postupem je injekční metoda, jejímž principem je vstřikování rozpouštědla do vodné fáze. Metoda spočívá v rozpuštění lipidu v organické fázi, nejčastěji v ethanolu nebo etheru. Následně je lipidový roztok za intenzivního míchání vstříknut do vodného roztoku.

Pro přípravu menších unilamelárních vezikul (SUV) je často využívána metoda sonikace, která se provádí ve vodní lázni nebo za použití sonikačních sond, jejichž hrot je ponořen do liposomové disperze. Z důvodu prevence přehřívání liposomové disperze je nutno ji během procesu sonikace chladit. Nevýhodou této metody je nízký obsah aktivní látky a tendence k degradaci.

Další z metod je vysokotlaká homogenizace, nazývaná jako French press proces. Při tomto procesu procházejí multilamelární vezikuly extruzí přes French press extrudéry. Výsledkem jsou unilamelární či oligolamelární vezikuly. Nevýhodou této metody je malé množství enkapsulované aktivní látky.

Další metodou přípravy vezikul menších rozměrů je metoda membránové extruze, která spočívá v protlačení daného systému přes membránu o dané poréznosti. Nejčastěji se aplikují polykarbonátové membrány [13], [14], [16], [17].

2 POLYMERNÍ MATERIÁLY PRO PŘÍPRAVU NOSIČŮ

Řada systémů pro doručování aktivních látek je na bázi různých přírodních nebo syntetických polymerních materiálů. Nejčastěji jsou aplikovány polysacharidy (gumy, škroby, celulóza, chitosan), proteiny (želatina, kasein, zein) nebo lipidy. Ze syntetických polymerů jsou běžné akryláty, polyvinylalkohol nebo polyvinylpyrrolidon. Při výběru vhodného nosného materiálu je třeba zvážit faktory, jako jsou biokompatibilita, stabilita, viskozita, mechanické vlastnosti. Vhodný nosič musí být kompatibilní s aktivní látkou, aby byla zajištěna stabilita během přípravy, skladování i podávání. V dalším textu jsou charakterizovány některé typy polymerů s potenciálem využití pro přípravu nosičů aktivních látek [18, s. 10–11].

2.1 Zein

Zein je přírodní polymer, vyskytující se v kukuřičném lepku. Ve struktuře zeinu je obsažen vysoký podíl nepolárních aminokyselin a nízký počet bazických a kyselých aminokyselin. Z nepolárních aminokyselin se zde vyskytuje prolin (10 %), leucin (20 %), alanin (10 %) a kyselina glutamová (21–26 %). Zein lze zařadit do skupiny rostlinných proteinů, z toho důvodu je strukturálně podobný molekule proteinu. Jedná se o šroubovicové uspořádání, které je tvořeno 9ti opakujícími se jednotkami a je stabilizováno vodíkovými vazbami. Zein se může vyskytovat ve formě α - , β - , γ - , δ -zeinu, přičemž v kukuřici je nejčastěji zastoupena α -forma. Díky této převážně hydrofobní struktuře zein není rozpustný ve vodě, ale v alkoholu. Zein se získává jako vedlejší produkt při zpracování kukuřičného zrna mletím za mokra. Největší podíl (až 75 %) se nachází v endospermu zrna, malé množství se dále vyskytuje klíčku a otrubách. Výsledný výtěžek závisí na délce sušení kukuřičných zrn. Pro produkt je typická jeho nažloutlá barva, což je způsobeno barvivy xantofyly a karotenoidy.

Zein je možno získat několika způsoby:

- ze sušeného mletého kukuřičného zrna,
- z kukuřičné lepkové mouky
- nebo ze sušených kukuřičných výpalků [19, s. 173, s. 204–214], [20], [21].

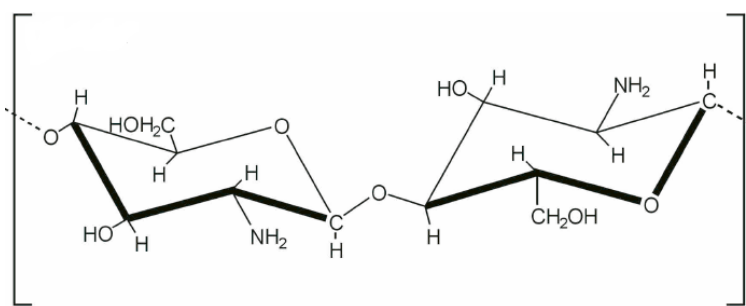
Zein je využíván v různých oblastech průmyslu. V potravinářství jsou zeinové filmy aplikovány jako obalové materiály pro prodloužení trvanlivosti a bezpečnosti potravin. Je vhodnou alternativou za pryskyřice vyskytující se ve žvýkačkách. Výhodou zeinových filmů jsou jejich mechanické vlastnosti, jsou charakterizovány vysokou pevností a pružností. Dalším přínosem je jeho dobrá antibakteriální aktivita, je odolný vůči růstu širokého spektra bakterií.

Díky hydrofobním vlastnostem je využíván při výrobě plastů, lepidel a při nejrůznějších povrchových úpravách. Například v papírenském průmyslu je aplikován na povrchové úpravy papírů pro zvýšení odolnosti proti mastnotě. Je vhodnou surovinou do nátěrů pro prevenci koroze. V oděvním průmyslu je vhodným komponentem při výrobě kabátů a klobouků. Aplikací zeinu do plastových produktů je docíleno lepší biologického rozkladu. Nové studie týkající se zeinu jsou zaměřeny využití ve farmaceutickém průmyslu. Vědci se domnívají, že zein by mohl mít potenciální využití při transportu a uvolňování léčiva v lidském organismu. Výhodou zeinových kapslí je jejich biokompatibilita. V těle se snadno rozkládá, a tak se podílí na vývoji kostí a tkání [19, s. 173, s. 204–214], [20], [21], [22].

2.2 Chitosan

Chitosan je přírodní polymer, který je získáván z chitinu. První poznatky o chitinu jsou datovány do roku 1811, kdy byl identifikován v buňkách hub. Poté byl chitin pojmenován podle řeckého slova „khiton“, tj. obálka. Chitosan byl poprvé identifikován v roce 1859 v kutikulách hmyzu, následně byl jeho obsah potvrzen i v mořských produktech. Během let se zájem o studium chitosanu značně zvýšil a v současné době tento polymer již nachází uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích [23].

Chitosan je získáván alkalickou N-deacetylací z chitinu. Z chemického hlediska se jedná o (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan (Obr. 7). Ve struktuře chitosanu se nacházejí tři reaktivní centra. Prvním z nich je primární aminokyselina, která se snadno váže s ionty kovů, dále je tu primární a sekundární hydroxyskupina. Primární hydroxyskupina má tendenci vázat aktivní složky, jako jsou léčiva, v kosmetice mají význam např. vitaminy nebo hydratační složky. Po navázání je tato hydroxyskupina odpovědná za dodání aktivní látky na místo určení [24, s. 56–57].



Obr. 7: Chemická struktura chitosanu [25].

Volně v přírodě se chitosan vyskytuje v houbách rodu *Aspergillus* a *Mucor*. Výhodou je nízká toxicita, dobrá biologická odbouratelnost, dostupnost a nízké náklady na výrobu. V současnosti je chitosan často předmětem výzkumu, týkajícího se nosičů léčivých a jiných aktivních látek na bázi gelů a membránových filmů. Ve farmaceutickém průmyslu se využívá díky jeho hemostatickým účinkům, jsou z něj vyráběny obinadla či obvazy, které dokáží spolehlivě zastavit krvácení. Také bylo prokázáno, že chitosan je schopen napomáhat snižování hladiny cholesterolu. V lidském organismu dokáže absorbovat tuky, a tak se využívá do potravinových doplňků k hubnutí. Význam má i v dekorativní kosmetice, kde bylo prokázáno, že pudry, stíny a další sypké produkty s přídavkem chitosanu vykazovaly dobrou stabilitu vůči teplému počasí a potu. Chitosan má pozitivní vliv na hydrataci pokožky, zvyšuje její vláčnost a měkkost. Z dalších aplikací lze zmínit potravinářský průmysl, kde je v kombinaci s různými aktivními látkami využívám pro výrobu obalových materiálů. Uplatnění má i v zemědělství, kde se využívá do postřiků vůči škůdcům nebo pro urychlení klíčení a růstu rostlin. Vybrané aplikace a význam chitosanu jsou uvedeny v Tabulce 2 [24, s. 56], [26], [27, s. 14–17, s. 21].

Tab. 2: Využití chitosanu [27, s. 10].

Oblast využití	Možnosti aplikací	Funkce chitosanu
Kosmetický průmysl	Laky na nehty, make-up, krémy na obličej, krémy ruce a tělo, pasty na zuby, koupelová kosmetika, výroba membránových filmů	Hydratace pokožky, udržení vlhkosti, změkčení pokožky, transport aktivních látek
Medicína	Bandáže, vatové tampony, výroba membránových filmů	Inhibice nádorového bujení, zubní plak, hojení popálenin, transport léčiv
Potravinářský průmysl	Konzervant, stabilizátor (barv), krmivová přísada	Prodloužení trvanlivosti, regulátor viskozity
Další využití v průmyslu	Zemědělský průmysl, papírenský průmysl, úprava vody	Ochranné povlaky rostlin, řízené uvolňování pesticidů, povrchová úprava papíru a fotografických papírů, čištění a filtrace vod, flokulace/koagulace bílkovin, barviv, aminokyselin

Pro nosiče aktivních látek mohou sloužit různé typy chitosanových nano či mikročástic. Při jejich přípravě lze využít některé z následujících technologických postupů:

- **Zesíťování emulze v/o:** principem metody je příprava chitosanu rozpuštěného v olejové fázi v přítomnosti surfaktantu jako stabilizátoru. Emulze je následně zesíťována, používá se například glutaraldehyd. Vzniklé mikročástice se dále vhodnou metodou separují.
- **Koacervace:** při této metodě je chitosanový roztok vstřikován do alkalického roztoku (např. hydroxidu sodného) za vzniku malých kapiček. Připravené částice jsou dále separovány filtrací nebo centrifugací.

- Iontová gelace: při tomto postupu je chitosan rozpuštěn v kyselině octové. Takto připravený kladně nabitý roztok je následně přidáván k roztoku tripolyfosfátu za vzniku komplexu chitosan-tripolyfosfát, což vede ke vzniku sférických nanočástic.
- Termická metoda: chitosan je rozpuštěn v kyselině octové a následně je k roztoku přidáno zesíťovací činidlo (např. glutaraldehyd). Vzniklá gelovitá forma je protlačována přes filtr o požadované poréznosti. Po filtraci následuje promytí hydroxidem sodným a sušení při teplotě 40°C.
- Metoda odpaření rozpouštědla: do roztoku chitosanu v kyselině octové je rozptýlena aktivní látka. Následně je přidáno zesíťovací činidlo. Následuje proces aerosolozace, kterým je odstraněno rozpouštědlo a vznikají požadované nanočástice [23].

2.3 Polyethylenglykol

Ve farmaceutickém průmyslu je často prováděna tzv. PEGylace, která spočívá v navázání polyethylenglykolu (PEG) na liposomovou strukturu, v jejímž jádře je zakomponována aktivní látka. Výhodou této struktury je jeho dobrá rozpustnost v organismu, netoxičnost, výborné chemicko-fyzikální vlastnosti a dobrá biologická rozložitelnost. Zapouzdřená látka je stabilnější a méně náchylná vůči vnějším vlivům. Další výhodou takto připravených liposomů je velká enkapsulační kapacita. Liposomy s PEG jsou potenciálními transportéry aktivních látek pro uplatnění jak ve farmaceutickém, tak v kosmetickém průmyslu [28].

2.4 Sericin a fibroin

Sericin a fibroin lze zařadit mezi další potenciální nosiče aktivních látek. Tyto proteiny jsou produkovány bourcem morušovým a někdy bývají označovány jako „hedvábné proteiny“. Z chemického hlediska jsou složeny převážně z aminokyselin, jako je například kyselina asparagová, serin, theronin nebo kyselina glutamová. Vyznačují se dobrými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, odolávají oxidaci, jsou antimikrobiální a UV rezistentní. V kosmetice se hojně využívají jako membránové filmy, které jsou vhodnými nosiči aktivních látek. Konkrétně je můžeme najít v denních i nočních krémech, v různých typech mastí, v pleťových vodách na obličej, v nehtové či vlasové kosmetice. Sericin a fibroin zajišťují zvláčnění pokožky, dodávají jí hebkost a působí jako prevence proti tvorbě vrásek. Ve vlasové kosmetice se podílejí na ochraně vlasového vlákna vůči vnějším radikálům [29], [30].

2.5 Polyaspartát

Polyaspartát sodný je biopolymer na bázi kyseliny L-asparagové, který patří do skupiny významných polyamino kyselin. Je snadno odbouratelný, proto se používá jako náhrada polymerů syntetizovaných z ropy, například polyakrylátu nebo polyakrylamidu. Polyaspartát je získáván ze živočišných zdrojů, jako jsou ústřicové skořápky. V kosmetice bývá aplikován do zubních past nebo do vlasové kosmetiky. Široké využití má v biomedicíně, kde slouží jako nosný systém pro léčiva [31].

2.6 Polylaktid

Polylaktid (PLA) je polymer skládající se z vysokého podílu kyseliny mléčné, která je běžně získávána z kukuřice, z brambor nebo z cukrové třtiny. Mikrokapsle nebo mikročástice na bázi PLA jsou hojně využívány ve farmacii, kde slouží k řízenému uvolňování různých léčiv, jako například antibiotik, inzulínu, nebo hormonů. V chirurgii je tento polymer využíván ve formě polylaktidových vláken, které jsou aplikovány při šití ran. Výhodou polylaktidových stehů je jednoduchá vstřebatelnost a rozložitelnost v těle. Také slouží pro ošetření zlomenin, jako výplně do kostních defektů. Materiály na bázi PLA jsou biokompatibilní a netoxické [31].

2.7 Kolagen

Tento ve vodě nerozpustný protein je dalším biomateriálem, který je vhodný pro dodávání léčiva na místo určení. Pokud je kolagen zesíťován v 5% až 10% vodném roztoku vytváří transparentní hydrogel, který je vhodný do kontaktních čoček [31].

2.8 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je přírodní látka obsažená v mezibuněčné tkáni obratlovců. Je získávána z extracelulárních polysacharidů různých bakterií. Nejčastěji je využívána v biomedicíně v oční chirurgii, kde je aplikována při operaci šedého zákalu za účelem ochrany rohovkové oční tkáně. V plastické chirurgii je vhodnou surovinou pro zahojení ran po operacích. Nejenže by mohla být využívána jako nosič aktivních látek, ale také je vhodnou aktivní látkou. Například v kosmetice je aplikována do pleťových krémů za účelem tvorby a regenerace tkáně [31].

3 AKTIVNÍ LÁTKY VHODNÉ PRO ENKAPSULACI

Výběr vhodné aktivní látky, jež má být enkapsulována, je klíčový pro zajištění požadované funkčnosti během aplikace. Tato kapitola je věnována konkrétním typům aktivních látek využívaných zejména v kosmetice.

3.1 Vitaminy

Vitaminy jsou nízkomolekulární látky, působící jako katalyzátory biochemických reakcí a podílející se na správném fungování organismu. Jelikož lidský organismus není schopen produkovat dostatek vitaminů, tak je nucen je získávat z potravy. Tělo dokáže přijímat vitaminy ve formě provitaminů, které v organismu upraví na potřebnou formu. Příkladem je provitamin A, označovaný jako β -karoten, který je v játrech enzymaticky štěpen na vitamin A. Vitaminy se člení do dvou skupin, rozpustné ve vodě a rozpustné v tucích. Mezi vitaminy rozpustné v tucích se řadí vitamin A (retinol), D (kalciferol), E (tokoferol), K (fylochinon). Mezi vitaminy rozpustné ve vodě řadíme například vitamin B (např. B₂-riboflavin) a C (kyselina askorbová). Pokud tělo nepřijímá dostatek vitaminů, dochází k avitaminóze. Naopak, v případě přebytku vitaminů, dochází k hypervitaminóze. Zmíněné poruchy mohou zapříčinit špatnou funkci organismu, ale také závažná onemocnění. Řada vitaminů se vyznačuje výbornými antioxidačními vlastnostmi, například vitaminy A, B₅, C, E nebo P [32, s. 157], [33, s. 10–11].

3.1.1 Vitamin A

Vitamin A má nejen antioxidační, ale i vyživující vlastnosti. Na pleti napomáhá redukovat projevy stárnutí, jako jsou jemné linky, hlubší vrásky či nedokonalosti. Tuto aktivní látku lze nalézt především v krémech a pleťových sérech s anti-aging efektem. Nedostatek vitaminu A způsobuje suchost a následně deskvamaci pokožky. Krémy s obsahem vitaminu A také napomáhají léčbě akné a obecně optimalizují přirozenou funkci kožních buněk. Ve vlasové kosmetice tento vitamin působí jako prevence tvorby lupů, suchosti a lámavosti vlasů. Dále je součástí zrakového pigmentu rhodopsinu v sítnici oka, a proto je vitamin A důležitý pro správné fungování zraku. V případě nedostatku tohoto vitaminu může dojít k vadě zraku, šerosleposti [18, s. 13–14], [32, s. 157–158], [33, s. 24].

3.1.2 Vitamin B₅

Vitamin B₅, známý jako kyselina pantothenová, je řazen do skupiny tzv. B-komplexů, sloužících jako prekurzor koenzymu A. Ten se podílí na mnoha metabolických procesech v lidském organismu. Nejbohatšími zdroji vitaminu B₅ jsou vejce, mléčné výrobky nebo játra. V kosmetice je známý jako panthenol, je přidáván do krémů a mastí. Snadno proniká do pokožky, má výborné hydratační vlastnosti a působí preventivně proti stárnutí pleti. Panthenol je vhodnou přísadou vlasové kosmetiky. V šampónech a kondicionérech se podílí na zklidnění pokožky hlavy, má regenerační účinky, a tak napomáhá redukovat tvorbu lupů. Běžně bývá součástí léčivých přípravků, kde je aplikován do krémů určených k léčbě strií, ran a spálenin [32, s. 160], [34, s. 43].

3.1.3 Vitamin C

Vitamin C, známý jako kyselina askorbová, má řadu významných biologických, farmaceutických a dermatologických funkcí. Podporuje imunitní systém, proto je aplikován ve farmacii do léčiv a potravinových doplňků. Nevýhodou je jeho špatná stabilita vůči vlhkosti, světlu a teple, díky čemuž dochází k jeho snadnému rozkladu na biologicky neaktivní sloučeniny. Proto je v kosmetice jeho využití omezeno a bývá nahrazován jinými vitaminy, jako je například vitamin E. Ke zvýšení stability vitaminu C může sloužit enkapsulace do vhodné matrice. Studie uvádí, že enkapsulace by mohla napomoci transportu vitaminu C přes vrstvu *stratum corneum* a usnadnit penetraci do spodních vrstev kůže, zejména dermis, kde se může následně podílet na aktivní tvorbě kolagenu [18, s. 14–15], [32, s. 161–162].

3.1.4 Vitamin E

Vitamin E neboli tokoferol, je znám jako významný antioxidant aplikovaný v oblastech zdravotnictví a kosmetiky. Může obsahovat nasycený nebo nenasycený postranní řetězec a může se vyskytovat v různých formách, jako jsou α -, β -, γ -, δ -tokoferol a tokotrienol. Nejsilnějším a nejvíce zastoupeným antioxidantem v lidském organismu je α -tokoferol. Vitamin E je získáván převážně ze semenatých rostlin, popřípadě z rostlinných olejů. Významným zdrojem α -tokoferolu jsou také obilné klíčky, slunečnicový, sójový nebo řepkový olej. Lze jej získat i z živočišných zdrojů, jako jsou vejce, játra nebo králíčí a vepřové maso [33, s. 55–56], [36]. Kromě dobrých antioxidačních vlastností má také protizánětlivé účinky, podporuje správnou funkci imunitního systému, působí jako prevence vůči různým chorobám a nemocem. Vitamin E se chová jako antioxidační činidlo, které chrání lidské buňky v organismu proti

nebezpečným volným radikálům. Nedostatek vitamínu E má za následek kardiovaskulární, arteriosklerózní onemocnění, nebo i onemocnění nervového systému, proto je podáván jako doplněk pacientům s Parkinsonovou chorobou. U dětí nedostatek vitamínu E ovlivňuje zkrácení životnosti erytrocytů, což má za následek vyvolání anémie, chudokrevnosti [33, s. 61–62], [37, s. 89–92].

Tabulka 3 shrnuje doporučená množství vitamínu E v závislosti na věku.

Tab. 3: Doporučené množství vitamínu E v mg na den [36].

Věk	Množství tokoferolu [mg/den]
0–6 měsíců	4–6
7–12 měsíců	5–7,5
1–3 roky	6–9
4–8 roků	7–10,4
9–13 roků	11–16,4
14 a více roků	15–22,4
V období těhotenství	15–22,4
V období kojení	19–28,4

Nadměrná konzumace vitamínu E může způsobovat:

- gastrointestinální potíže,
- oslabení organismu,
- bolesti hlavy,
- nevolnosti,
- průjem,
- krvácení do tkání [33, s. 56–64], [37, s. 89–93].

Z kosmetického hlediska napomáhá vitamin E regeneraci buněk a zpomaluje jejich stárnutí. Udržuje vlhkost v pokožce, má výborné antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Snižuje poškození kůže způsobené UV zářením (ultrafialovým zářením). Nejčastěji je aplikován do krémů, mastí, opalovacích prostředků nebo do vyživujících balzámů na rty [35, s. 4–5].

3.1.5 Vitamin F

Vitamin F vykazuje nejen výborné antioxidační vlastnosti, ale je také vhodným zahušťovadlem do kosmetických výrobků. Bylo prokázáno, že přípravky s vitaminem F mají výborné hojící účinky na akné, regulují tvorbu nových buněk a vykazují bělicí efekt pro odstranění pigmentových skvrn [18, s. 19].

3.1.6 Vitamin P

Vitamin P (rutin) je vhodným doplňkem stravy, zlepšuje pružnost cévních stěn a je podáván při léčbě křečových žil. V kosmetice je aplikován jako změkčovadlo a antioxidant. Vzhledem ke špatné fyzikální a chemické stabilitě je ovšem jeho použití omezeno [18, s. 18–19].

3.2 Esenciální oleje

Esenciální oleje jsou vysoce těkavé přírodní aromatické látky. Vyznačují se dobrou rozpustností v alkoholu či etheru a nerozpustností ve vodě. V potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu se objevuje široká škála těchto olejů, které jsou aplikovány z důvodu jejich antimikrobiálních, antioxidačních a insekticidních vlastností. V kosmetice jsou často součástí tzv. anti-aging produktů. Esenciální oleje jsou získávány z rostlin, konkrétně z jejich rostlinných buněk [38]. Ze slupek plodů jsou převážně získávány citrusové esenciální oleje. Z okvětních lístků se extrahují oleje, jako jsou levandule, jasmín, růže. Bazalkový a rozmarýnový olej je získáván z listů. Dalšími zdroji může být dřevo (např. z cedru), kořeny, bobule, pryskyřice. Většina esenciálních olejů jsou bezbarvé, výjimkou je modře zbarvený esenciální olej z hřebíčku a heřmánku. Jasně modré zbarvení je dáno organickou sloučeninou azulenem [39, s. 14–15].

Z chemického hlediska jsou esenciální oleje tvořeny těkavými sloučeninami, jako jsou alkoholy, estery, uhlovodíky, aldehydy, ketony, fenoly, terpeny a další, díky nimž lze charakterizovat květinový, citrusový či dřevitý tón. Některé běžně se vyskytující aktivní látky v esenciálních olejích jsou shrnuty v Tabulce 4. Zisk a výtěžek závisí na složení esenciálních olejů, typu, genetice a zralosti rostliny, dále na lokalitě výskytu [38].

Tab. 4: Těkavé sloučeniny v esenciálních olejích [38].

Skupina		Charakteristický zástupce
Monoterpeny	Deriváty alkoholu	Geraniol
	Ketony	Menthol
	Aldehydy	Citronellol
	Estery	Cedryl acetate
	Fenoly	Thymol
Neterpenové sloučeniny		Eugenol, safrol
Seskviterpeny		Bergamoten

Esenciální oleje se nejčastěji získávají metodou destilace, kdy je přehřátá pára vháněna do rostlinného materiálu. Pára zapříčiní těkavost nově vzniklých vonných složek, které se následně sbíhají v kondenzační nádobě. Destilací se získává například levandulový, šalvějový nebo heřmánkový olej. Další metodou je proces lisování, který je nejčastěji využíván při získávání citrusových vonných tónů (z citronů, grepů, pomerančů nebo bergamotu). Lisováním je olej uvolněn z plodů až po poškození jejich slupek. Příkladem jsou limonen, citral či nerol [40, s. 78–79], [41, s. 18–19].

Další metodou je extrakce za pomoci rozpouštědel. Obvykle se tak získávají květinové esenciální oleje. Principem metody je namáčení okvětních lístků do chemického rozpouštědla, například do oxidu uhličitého. Při extrakci je dosaženo vysoce koncentrovaných olejů s označením absoluty [39, s. 18–19].

Esenciální oleje by měly být uchovávány tak, aby bylo zabráněno vystavení UV záření, které by mohlo znehodnotit produkt. Proto je vhodné esenciální olej uchovávat ve tmavých lahvích na tmavém místě. Důležitá je také teplota skladování, která by neměla překročit 10°C. Při vyšších teplotách může docházet k oxidaci oleje a tím k zásadnímu snížení jeho trvanlivosti. Nejnižší trvanlivost vykazují citrusové oleje a tea tree olej [39, s. 20–21].

V další části textu jsou charakterizovány vybrané typy esenciálních olejů.

3.2.1 Tymiánový olej

Tymiánový olej, *Thymus vulgaris*, je získáván z byliny tymiánu, což je malý keřík s drobnými šedozelenými lístky a květy. Vhodné klimatické podmínky pro tuto rostlinu se nacházejí v oblasti Středomoří. Získáván je nejčastěji metodou destilace za pomoci předem přehřáté páry. Charakteristický je jeho intenzivní dřevitý, kouřový odér. Ten je bohatý na sloučeniny thymol nebo linalool. Thymol je fenolická látka obsažena nejčastěji v tymiánu, také je získávána z máty peprné. Tymián s vysokým obsahem thymolu je označován jako červený tymián. Tento typ oleje je toxický a způsobuje podráždění kůže. Naopak tymián s vyšším obsahem linaloolu je netoxický, nedráždivý a je šetrný k pokožce. Získaný olej je velmi koncentrovaný, proto je doporučováno jej před aplikací naředit a podávat v menším množství. Olej by neměly používat těhotné ženy a děti.

Tymián se vyznačuje dobrými antiseptickými, antifungálními, baktericidními a dezinfekčními vlastnostmi. Je poměrně šetrný ke sliznicím, a proto je podáván při respiračních onemocněních plic, napomáhá vykašlávání hlenu a zmírňuje kašel. Dále se vyznačuje zklidňujícími účinky na trávicí trakt. V kosmetických produktech se s ním můžeme setkat v ústních vodách a pleťových krémech. Stimuluje chronickou únavu, proto je aplikován do koupelí, masážních olejů a aromalamp. V potravinářství potlačuje zvýšení chuti k jídlu [39, s. 168–169], [42, s. 154–155], [43, s. 300–301].

3.2.2 Eukalyptový olej

Eukalyptový olej je získáván z listů blahovičnicku australského (*Eucalyptus globulus*), nejčastěji metodou parní destilace. Je charakteristický svou pronikavou vůní s osvěžujícími a uvolňujícími účinky. Je netoxický, nedráždivý a vykazuje antiseptické a protivirové vlastnosti. Tento esenciální olej by neměl být užíván vnitřně, jelikož může způsobovat trávicí potíže. Při zevní aplikaci tyto účinky nebyly prokázány. Napomáhá při pocitu ucpaných dutin a podporuje vykašlávání, proto má také pozitivní účinky u osob trpících astmatickými záchvaty. Bývá obsažen v repelentních přípravcích na odpuzování hmyzu. V kosmetice je aplikován do deodorantů, k potlačení nepříjemného oděru [39, s. 154–155], [41, s. 35–36], [43, s. 339–341].

3.2.3 Mentolový olej

Mentolový olej je získáván z rostliny máty *Mentha piperita*. Základní složkou je menthol, což je bílá krystalická látka s výrazným oděrem. Tento typ oleje se vyznačuje dobrými antioxidačními a antimikrobiálními vlastnostmi. Je podáván při onemocněních trávicího traktu, křečích, bolestech svalů, nachlazení či migrénách. Přidává se do nosních sprejů, zubních past či krémů, kde má chladicí a uklidňující efekt. Přidává se také do koupelí, v nichž působí jako chladivá a osvěžující přísada. Dále je vhodnou vonnou složkou v parfémeh [41, s. 45–46], [42, s. 138].

3.2.4 Olej z čajovníku

Olej z čajovníku, známý také jako tea tree olej, je získáván ze stromu *Melaleuca alternifolia* pocházejícího z Austrálie. Je netoxický a nedráždivý. Díky bakteriocidním účinkům je využíván na léčbu akné a pleť a obecně napomáhá při léčbě infekcí a zánětů. Široké zastoupení má i v kosmetice. Je vhodnou složkou šamponů, které jsou schopny eliminovat tvorbu lupů. V podobě krémů je aplikován za účelem léčby dermatomykóz způsobených plísněmi. Také má regenerační účinky, urychluje hojení ran a jizev. Z toho důvodu je vhodným komponentem do krémů s omlazujícím účinkem a schopností redukci vrásek. Jako masážní olej a koupelový olej podporuje imunitu, posiluje energii a mysl. Je podáván při respiračních onemocněních a problémech s vykašláváním. Jeho nevýhodou je kratší trvanlivost (přibližně 6 měsíců) [39, s. 138–139], [41, s. 55–56], [43, s. 362–364].

3.2.5 Citrusové oleje

Citrusové oleje jsou získávány z plodů, listů, květů či kůry stromů. Mezi významné zástupce patří bergamotový olej, limetkový olej, olej z pomerančovníku či citrusů. Hlavními složkami jsou limonen, geraniol a terpinolen. Pro získání oleje se využívá technologie destilace, příkladem je destilace pomerančové a citrusové kůry. Výsledkem je olej s intenzivní hořko sladkou vůní. Tyto oleje nacházejí uplatnění v parfémeh, kde bývají jednou ze základních aromatických složek [44, s. 80–81], [45, s. 99–101]. V kosmetice jsou aplikovány do krémů za účelem rozjasnění a oživení pleť. Jsou vhodné i na mastnou a akné pleť [43, s. 322–323].

3.2.5.1 *Bergamotový olej*

Bergamot neboli *Citrus bergamia* je ovoce se zelenožlutými plody podobnými limetce. Získává se z plodů lisováním. Vyznačuje se dobrými analgetickými, antidepresivními a antiseptickými vlastnostmi. Je vhodný při léčení infekcí močových cest. Přidává se do koupelí pro zmírnění stresu, má uklidňující účinky. V kosmetice je aplikován do krémů a mastí určených pro aknézní pleť [43, s. 316–318].

3.2.5.2 *Pomerančový olej*

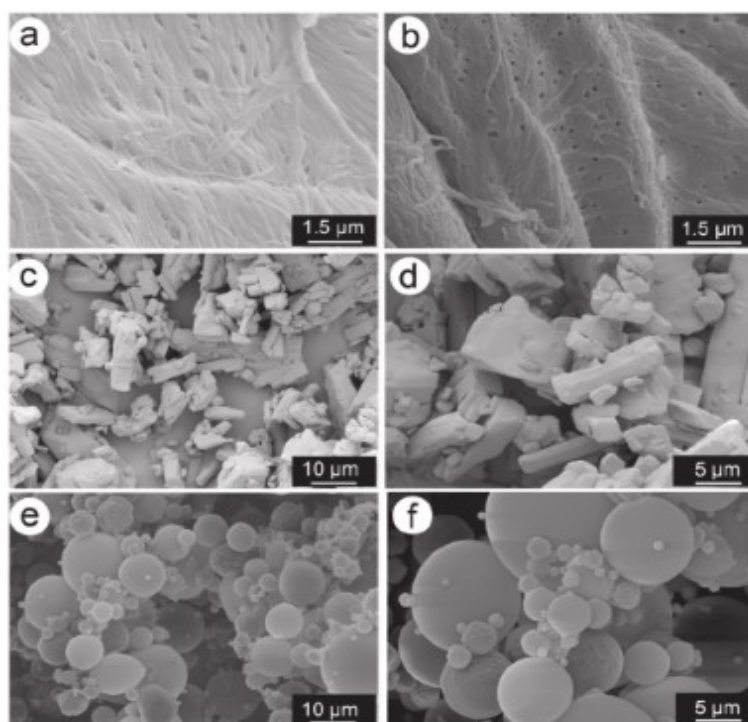
Tento typ oleje se získává z pomerančovníku hořkého, ale častěji pak z pomerančovníku sladkého, který je charakterizován výrazným sladkým odérem. Často je kombinován s dalšími citrusovými nebo kořenitými tóny. Pomerančový olej má antidepresivní, antiseptické nebo protizánětlivé účinky [43, s. 318–319].

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Z literární studie je patrné, že v posledních letech došlo k výraznému pokroku v oblasti týkající se enkapsulace aktivních látek do různých typů nosičů. Cílem procesu enkapsulace je zlepšení stability aktivní látky a případně prodloužení jejího uvolňování na místo určení. Metoda enkapsulace se hojně využívá v potravinářském, farmaceutickém nebo nověji i v kosmetickém průmyslu. V oblasti farmacie jsou enkapsulovány zejména léčivé substance. V potravinářském průmyslu je enkapsulace využívána pro maskování nepříjemného oděru a chutě, dále pak za účelem začlenění vitaminů, minerálů a příchutě do potravinového produktu. V oblasti kosmetiky jde například o enkapsulaci vonných látek se záměrem eliminovat nepříjemný oděr. Dále jsou enkapsulovány antioxidační, hydratační složky a jiné aktivní látky. Při enkapsulaci aktivní látky do kosmetického produktu je důležité sledovat různé faktory, jako jsou fyzikálně-chemické vlastnosti produktu, pH přípravku, složení přípravku a další [46], [47].

Současné studie související s danou problematikou se zabývají různými typy aktivních látek.

Ve studii z roku 2017 [48], byly připraveny a charakterizovány částice chitosanu obsahující účinnou látku flurbiprofen. Pro přípravu částic byla použita metoda sprejového sušení bez přítomnosti síťovacího činidla. Výsledné sférické částice byly analyzovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (Obr. 8). Připravené komplexy vykazovaly dostatečnou stabilitu a enkapsulační účinek (73,3 %).



Obr. 8: Skenovací elektronová mikroskopie, a), b) chitosan, c), d) flurbiprofen, e), f) chitosan-flurbiprofen [48].

Kombinace zeinu a chitosanu byla předmětem studie autorů Park a kol. [49], v níž byly připraveny zein-chitosanové nanočástice s enkapsulovaným retinolem. Bylo prokázáno, že významnými faktory ovlivňujícími výsledné vlastnosti nanočástic jsou koncentrace a molekulová hmotnost chitosanu, stejně jako poměr jednotlivých polymerů.

Směs zeinu a chitosanu byla také s úspěchem využita pro enkapsulaci epigallokatechin galátu, což je přírodní látka ze skupiny katechinů obsažená v zeleném čaji [50]. Výsledné elektrostaticky stabilní částice by mohly být aplikovány jako potravinové doplňky nebo pro výrobu ochranných filmů.

Wang a kol. [51] se zabýval enkapsulací β -karotenu do komplexu na bázi zein-karboxymethylchitosan-polyfenol z čaje, za účelem využití v potravinářských produktech. Bylo zjištěno, že docházelo k řízenému uvolňování β -karotenu do simulovaného prostředí gastrointestinální tekutiny, a že připravený komplex vykazuje dostatečnou stabilitu

Zeinové nanočástice s obsahem protinádorového léku doxorubicinu zakomponované do chitosanového gelu byly předmětem studie Arunkumar a kol. [52] Výhodou připraveného systému je tekutá konzistence, která umožňuje při aplikaci zaujmout přesný tvar dutiny, která vzniká po odstranění tumoru. Při fyziologické teplotě pak tento aplikovaný sol přechází v gel.

Následně dochází k řízenému uvolňování chemoterapeutického léčiva doxorubicinu a usmrcení zbytkových rakovinotvorných buněk.

Nosič na bázi zeinu a oligochitosanu byl využit i ve studii [53] pro inkorporaci karotenoidního pigmentu astaxantinu. Účinnost enkapsulace byla studována v prostředí alkoholu, jablečného a rýžového octa. Připravený systém prokázal zvýšenou stabilitu při skladování a rezistenci proti UV záření.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

- připravit jednotlivé roztoky s různým zastoupením polymerních složek a aktivními látkami,
- následně charakterizovat jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a enkapsulační účinek,
- diskutovat výsledky, kterých bylo v experimentální části dosaženo.

6 CHEMIKÁLIE, POUŽITÉ ZAŘÍZENÍ

6.1 Chemikálie

- Zein (TCI Europe nv)
- Chitosan, střední molekulová hmotnost, stupeň deacetylace 87 % (SIGMA-ALDRICH)
- Tokoferol 98% (FICHEMA)
- Thymol (SIGMA-ALDRICH)
- Tween 20 (SIGMA-ALDRICH)
- Kyselina octová ledová ($C_2H_4O_2$), (IPLUB)
- Absolutní ethanol (PENTA)
- n-Hexan (VWR CHEMICALS)
- Chlorid sodný (NaCl), (IPLUB)
- Chlorid draselný (KCl), (IPLUB)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4) SIGMA-ALDRICH
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) SIGMA-ALDRICH
- Kyselina chlorovodíková (HCl), (PENTA)

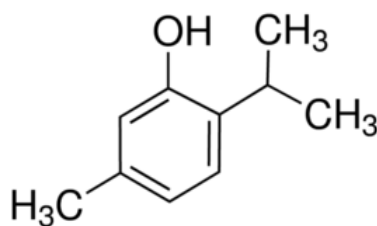
6.2 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy (Santorius Basic)
- Magnetické míchadlo (Heidolph: MR Hei Standard)
- Bateriový pH metr CPH 51 s kombinovanou elektrodou HC 103
- Sušárna HS61 A
- Tenziometr Easy Dyne Krüss K20
- Detektor intenzity rozptylu světla ZETASIZER Nano Series ZS 90
- Spektrofotometr photoLab 6600 UV-VIS
- Odstředivka ROTANTA 460 R
- Rotační vakuová odparka Heidolph: Hei-VAP Precision
- Skenovacího elektronového mikroskopu Vege 3
- Mikropipeta Eppendorf reaserch plus
- Zkumavky, vialky, kyvety, reagenční lahve, běžné laboratorní sklo

6.3 Charakteristika použitých aktivních látek

6.3.1 Thymol

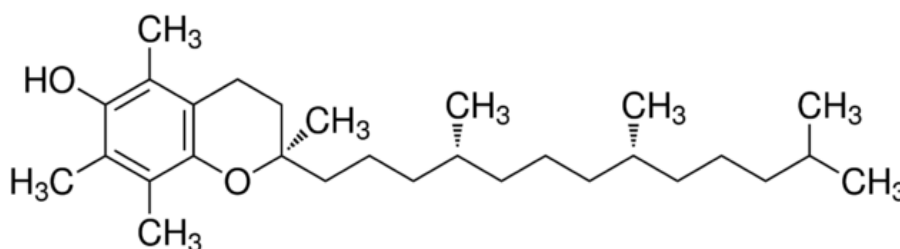
Thymol je bezbarvá krystalická látka. Nevýhodou je jeho špatná rozpustnost ve vodě, naopak velmi snadno je rozpustný v acetonu nebo 96% lihu a mírně rozpustný v glycerolu. Jeho molární hmotnost je 150,22 M, teplota tání je 48 až 52°C a teplota varu 232°C. Chemickou strukturu thymolu zobrazuje Obr. 9 [54], [55].



Obr. 9: Chemická struktura thymolu [55].

6.3.2 Tokoferol

Tokoferol je čirá mírně nažloutlá kapalina. Vykazuje se špatnou rozpustností ve vodě. Naopak se dobře rozpouští v acetonu nebo v 96% lihu. Jeho molární hmotnost je 472,75 M. Teplota varu je 200 až 220°C. Chemickou strukturu tokoferolu zobrazuje Obr. 10 [54], [56].



Obr. 10: Chemická struktura tokoferolu [56].

6.4 Příprava zásobních a pracovních roztoků

6.4.1 Příprava 0,5% zásobního roztoku chitosanu v 1% roztoku kyseliny octové

Bylo připraveno 100 ml roztoku navážením příslušného množství chitosanu (s přesností na 0,0001 g) a smícháním s 1% roztokem kyseliny octové. Roztok byl umístěn do ultrazvukové lázně (30 minut, teplota 40°C), a poté byl míchán na magnetickém míchadle do rozpuštění (přibližně 4 hodiny).

6.4.2 Příprava 0,5% zásobního roztoku zeinu v 75% roztoku ethanolu

Příslušné množství zeinu bylo naváženo s přesností na 0,0001 g, smícháno se 75% ethanolem, převedeno do 100ml odměrné baňky a doplněno po rysku.

6.4.3 Příprava roztoku tokoferolu/thymolu

Byl připraven 10% roztok tokoferolu/thymolu navážením 0,5 g tokoferolu/thymolu s přesností na 0,0001 g, rozpuštěním v absolutním ethanolu, převedením do 5ml odměrné baňky a doplněním po rysku.

Za účelem sledování vlivu rostoucí koncentrace aktivní látky na fyzikální charakteristiky systému byly připraveny ještě vzorky s přídavkem 0,1 a 1%ního roztoku tokoferolu. Postup byl analogický jen s tím rozdílem, že navážky činily 0,005 a 0,05 g.

6.4.4 Příprava roztoku Tween 20

Pro přípravu 5% a 10%ního roztoku bylo naváženo 0,25 a 0,5 g tenzidu Tweenu 20. Navážka byla rozpuštěna v 75% ethanolu, následně převedena do 5ml odměrné baňky a doplněna po rysku.

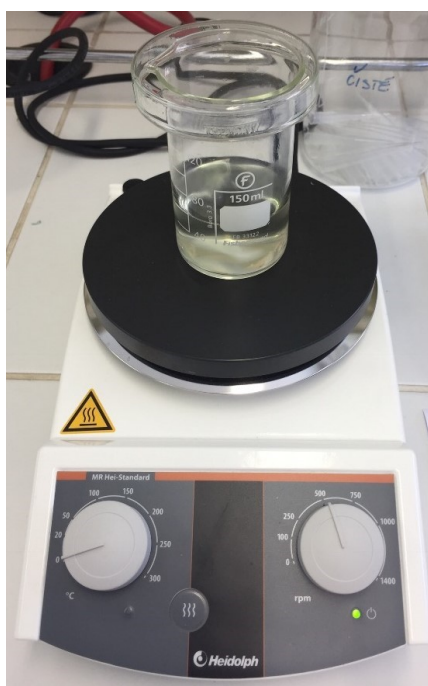
6.4.5 Příprava pracovních roztoků polymerů s aktivními látkami

Do příslušného množství 0,5%ního zásobního roztoku zeinu (dle daného poměru) byl za kontinuálního míchání při 500 rpm automatickou pipetou přidán roztok aktivní látky (tokoferol nebo thymol), který byl následně míchán po dobu 60 minut. Po uplynutí dané doby byl do směsi z byrety postupně přikapáván roztok chitosanu v 1% kyselině octové (po dobu 60 minut za stálého míchání při 500 rpm). Následně byl přidán roztok Tweenu 20 a míchání pokračovalo dalších 60 minut (500 rpm). Roztok zeinu s aktivní látkou byl čirý nažloutlý, po přidání chitosanu a Tweenu 20 se směs zakalila a získala mléčné zbarvení (Obr. 11). Přídavky jednotlivých složek a koncentrace roztoků jsou uvedeny v Tabulce 5.

Podobně byly připraveny kontrolní vzorky bez přídavku aktivních látek a Tweenu 20. Směs polymerů zeinu a chitosanu v daných poměrech byla míchána při laboratorní teplotě na magnetickém míchadle po dobu 4 hodin při otáčkách 500 rpm.

Tab. 5: Přidavky jednotlivých složek pro přípravu pracovních roztoků.

Poměr zein:chitosan	Chitosan ve směsi [%hm.]	Přídavek aktivní látky (roztok 0,1/1/10 %hm.) [ml]	Přídavek Tween 20 (roztok 5/10 %hm.) [ml]
1:0	0	0,25	2,5
10:1	4	0,25	2,5
7:1	6	0,25	2,5
5:1	8	0,25	2,5
1:1	31	0,25	2,5



a)



b)

Obr. 11: Příprava pracovního roztoku, a) roztok zeinu s přidavkem tokoferolu, b) konečný roztok po přidavku chitosanu a surfaktantu Tween 20 [vlastní zdroj].

6.4.6 Příprava fosfátového pufru

Pro přípravu fosfátového pufru bylo naváženo 8 g chloridu sodného, 0,2 g chloridu draselného, 1,44 g hydrogenfosforečnanu sodného a 0,24 g dyhydrogenfosforečnanu draselného.

Sypká směs byla rozpuštěna v 800 ml destilované vody. Vše bylo mícháno do úplného rozpuštění na magnetickém míchadle. Po rozpuštění bylo nastaveno pH roztoku na hodnotu pH 7,4 pomocí kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl převeden do 1 litru odměrné baňky a byl doplněn destilovanou vodou po rysku, poté byl rozlit do reagenčních lahví o objemu 50 ml a sterilizován v autoklávu (121°C, 20 minut).

6.5 Stanovení kritické micelární koncentrace tenzidu

Kritická micelární koncentrace Tweenu 20 byla stanovena tenziometrickou metodou pomocí Wilhelmyho destičky. Byl připraven 0,01 M zásobní roztok do 100ml odměrné baňky, navážením příslušného množství Tweenu 20 (dle rovnice 2), následným rozpuštěním v destilované vodě a doplněním po rysku.

$$m = c \cdot V \cdot M \quad (2)$$

Kde:

- m hmotnost Tween 20 [g]
- c koncentrace Tween 20 [0,01 mol/l]
- V objem 0,01 M Tween 20 [25 ml]
- M molární hmotnost Tween 20 [1227,54 g/mol]

Ze zásobního roztoku byly připraveny pracovní roztoky odpipetováním příslušného množství (dle rovnice 3) do 100ml odměrných baněk a doplněním po rysku destilovanou vodou. Koncentrace pracovních roztoků byly v rozmezí od 0,01 mmol/l do 0,5 mmol/l.

$$\begin{aligned} c_1 \cdot V_1 &= c_2 \cdot V_2 \\ 0,01 \cdot V_1 &= 0,01 \cdot 10^{-3} \cdot 100 \\ V_1 &= 0,1 \text{ ml} \end{aligned} \quad (3)$$

Kde:

- c_1 koncentrace pracovního roztoku Tween 20 [mol/l]
- V_1 objem pracovního roztoku [ml]
- c_2 koncentrace zásobního roztoku [mmol/l]
- V_2 objem zásobního roztoku [ml]

Takto připravené pracovní roztoky byl převedeny do skleněné misky tenziometru pro měření povrchového napětí. Wilhelmyho destička byla vyžihána a následně zavěšena do tenziometru Krüss K20. Bylo provedeno měření povrchového napětí při teplotě 25°C.

6.6 Měření zeta potenciálu

Z připravených pracovních roztoků (kapitola 6.4.5) bylo odebráno 6 μl do malé kádinky a doplněno 3 ml destilované vody, která byla předem dvakrát filtrována přes injekční filtr o velikosti pórů 0,2 μm . Po promíchání byl roztok převeden do kyvety pro ZETASIZER pomocí injekční stříkačky. Následně bylo provedeno měření pomocí ZETASIZER Nano Series ZS 90. Měření zeta potenciálu probíhalo při teplotě 25°C ve třech opakováních. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí modelu dle Smoluchowskiho.

6.7 Měření pH

U jednotlivých polymerních roztoků bylo měřeno pH pomocí bateriového pH metru s kombinovanou pH elektrodou.

6.8 Měření velikosti částic

Z připravených pracovních roztoků (kapitola 6.4.5) bylo odebráno 0,5 ml do kádinky a doplněno 1 ml destilované vody, která byla předem filtrována přes injekční filtr o velikosti pórů 0,2 μm . Do příslušné kyvety bylo pomocí injekční stříkačky převeden naředěný vzorek. Měření bylo provedeno pomocí přístroje ZETASIZER nano series ZS 90 metodou laserové difrakce při teplotě 25°C ve třech opakováních.

6.9 Sledování stability

U vybraných vzorků polymerních roztoků s přidavkem tokoferolu a thymolu v poměrech 10:1, 7:1, 1:1, 1:0 (připravených dle postupu v kapitole 6.4.5) byla provedena stabilitní studie. Kromě vizuálního hodnocení stavu vzorků byl změřen zeta potenciál a velikost částic za pomocí přístroje ZETASIZER nano series ZS 90 (postup totožný jako v 6.6 a 6.8), a to v den přípravy, po 2 dnech, po 7 dnech a po 2 měsících.

6.10 Měření povrchového napětí

Měření povrchového napětí probíhalo při teplotě 25°C. tenziometrickou metodou pomocí Wilhelmyho destičky. Připravené pracovní roztoky polymerů s aktivními látkami byly převedeny do skleněné misky, která byla vložena do přístroje tenziometru Krüss K20 (Obr. 12). Výsledné hodnoty jsou průměrem ze dvou opakování.



Obr. 12: Tenziometr pro měření povrchového napětí [vlastní zdroj].

6.11 Stanovení enkapsulačního účinku

Po přípravě pracovních polymerních roztoků byly tyto rozlity do 15 ml zkumavek, které byly následně vloženy do odstředivky ROTANTA 460 R. Odstředění probíhalo po dobu 30 minut a 9000 rpm. Po odstředění byla kapalná vrstva slita do odpařovací baňky a umístěna na odparku Heidolph: Hei-VAP Precision (Obr. 13). Odpaření probíhalo po dobu cca 15 minut,

při otáčkách 55 rpm a teplotě max. 60°C. Vzorek po odpaření byl protřepán s hexanem v děličce v poměru 1:1. Pro rozdělení vrstev byla horní čirá vrstva odebrána a byla měřena absorbance na spektrofotometru photoLab 6600 UV-VIS při příslušné vlnové délce (248 nm pro tokoferol, 274 nm pro thymol).

Z naměřených hodnot absorbance byly vypočítány koncentrace volné aktivní látky s použitím rovnic lineární regrese z příslušné kalibrace pro danou aktivní látku (viz Obr. 36 a 37). Enkapsulační účinek (EE, %) byl vypočítán jako rozdíl mezi celkovým původním množstvím a množstvím volné aktivní látky dle rovnice (4).

$$EE (\%) = \frac{\text{původní množství aktivní látky} - \text{množství volné aktivní látky}}{\text{původní množství aktivní látky}} \cdot 100 \quad (4)$$



a)

b)

Obr. 13: a) Odstředěná vrstva před odpařením, b) mléčně bílý vzorek po odpaření [vlastní zdroj].

6.12 Stanovení uvolněné aktivní látky

Ke stanovení byly použity vzorky připravené dle postupu v kapitole 6.4.5. Po odstředění byla usazená spodní vrstva zvážena a umístěna do reagenční láhve s 50 ml fosfátového pufru a Tweenem 20 (0,4%hm.). Ta byla následně vložena do sušárny o teplotě 37°C. V určitých časových intervalech byly odebírány vzorky (2 ml), které byly lyofilizovány po dobu 24 hodin. Po lyofilizaci byl vzniklý prášek smíchán s příslušným podílem hexanu. Po vytřepání byla čirá fáze převedena do kyvety a následně byla měřena absorbance na spektrofotometru

photoLab 6600 UV-VIS při příslušné vlnové délce (248 nm pro tokoferol, 274 nm pro thymol). Množství aktivní látky bylo po zohlednění původní předpokládané koncentrace ve směsi vyjádřeno v mg/100 ml.

6.13 SEM analýza

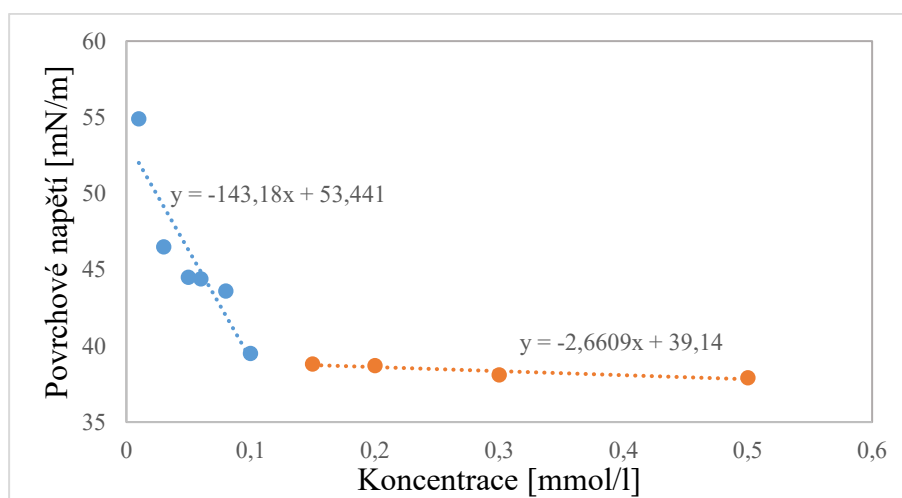
Skenovací elektronová mikroskopie byla provedena na Akademii věd ČR, Ústavu pro hydrodynamiku s využitím skenovacího elektronového mikroskopu Vege 3 s vysokým rozlišením (Tescam, ČR). Před samotnou analýzou byly polymerní roztoky odlity na sterilní Petriho misky o průměru 9 cm, které byly následně umístěny do sušárny při 35°C (na cca 24 hodin).

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Stanovení kritické micelární koncentrace Tweenu 20

Kritická micelární koncentrace (CMC) patří mezi významné charakteristiky tenzidů, které mají zásadní dopad na jejich aplikace. Je známo, že čím je tato hodnota nižší, tím dříve daný tenzid začne tvořit agregáty, micely. Pomocí metody Wilhelmyho destičky byly změřeny hodnoty povrchového napětí, které byly vyneseny do grafu proti koncentraci roztoků Tweenu 20 (Obr. 14).

Pomocí průsečíků směrnic získaných ze dvou částí grafu byla stanovena kritická micelární koncentrace (0,102 mmol/l). Námí získaná hodnota je o něco vyšší v porovnání s daty dostupnými v literatuře. Například v práci Kim a kol. [57], kde bylo CMC měřeno stejnou metodou a při teplotě 22°C, bylo dosaženo výsledku 0,0804 mmol/l. Ještě nižší hodnoty CMC byla naměřena metodou solubilizace barviv, a to 0,042 mmol/l [58]. Je ovšem známo, že hodnoty měřené různými metodami se mohou více lišit. Dalším důvodem odlišných výsledků může být rozdílná čistota studovaných tenzidů.



Obr. 14: Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu Tween 20.

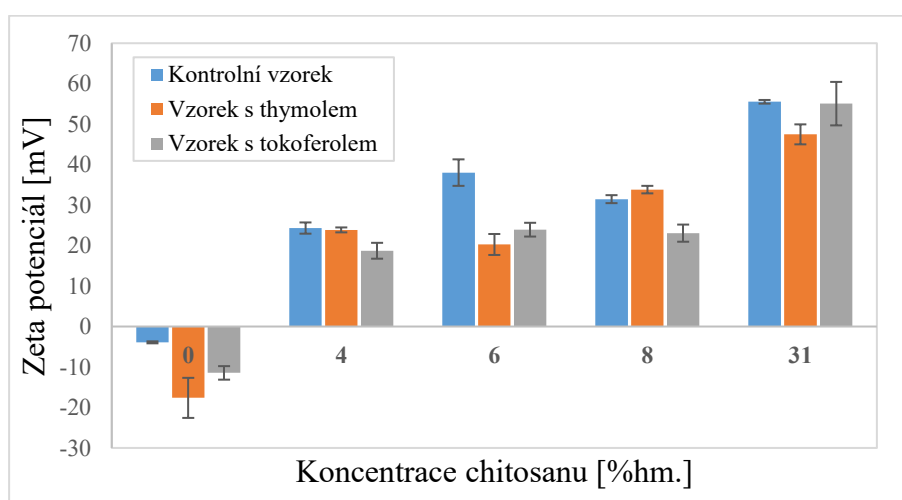
Množství tenzidu v námi připravených vzorcích odpovídalo zhruba 0,2 až 0,4 mmol/l, tedy koncentrace převyšovala hodnotu CMC. Jak je patrné u Obr. 24, zvyšující se množství Tweenu 20 neměly zásadní vliv na velikost částic. Pouze u vzorku 1:1 byl vidět větší rozdíl v naměřené velikosti částic, kdy s přidavkem 5%ního roztoku Tweenu 20 bylo dosaženo hodnoty 2677 nm a s vyšší koncentrací tenzidu průměrná velikost vzrostla na 3261 nm, tedy o téměř

18 %. Lze tedy konstatovat, že zvyšování koncentrace tenzidu v tomto případě již nemá význam.

7.2 Zeta potenciál

Je známo, že každá částice je na povrchu obklopena vrstvou nábojů, tzv. elektrickou dvojvrstvou, která je tvořena vnější a vnitřní částí. Vnitřní neboli Sternovu vrstvu tvoří silně navázané ionty, zatímco vnější, difúzní vrstva je tvořena volněji navázanými ionty. Uvnitř difúzní vrstvy se nachází hranice nazývaná jako rovina skluzu. Pokud dojde k pohybu částic, navázané ionty se začnou pohybovat společně s částicí. Potenciál, existující na této hranici, je charakterizován jako zeta potenciál. Hodnota zeta potenciálu rozhoduje o vlivu elektrostatických sil na stabilitu dané soustavy. Pokud jsou hodnoty zeta potenciálu větší než ± 30 mV je daný systém považován za elektrostaticky stabilní [59, s. 15].

Následující graf na Obr. 15 znázorňuje naměřené hodnoty zeta potenciálu pro vzorky bez a s obsahem aktivních látek, tokoferolu anebo thymolu. Je zřejmé, že zvyšováním koncentrace chitosanu ve směsi, došlo k nárůstu zeta potenciálu. Tento trend bylo možno očekávat, vzhledem k tomu, že zeta potenciál samotného 0,5%ního roztoku chitosanu v 1% kyselině octové se pohybuje v poměrně vysokých kladných hodnotách ($44,7 \pm 2,3$ mV). Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u směsi zein:chitosan v poměru 1:1 (tedy s nejvyšším obsahem chitosanu 31 %hm.), a to 47,5mV až 55,5 mV. V tomto případě lze tedy předpokládat, že elektrostatické odpuzování mezi jednotlivými částicemi bude mít značný podíl na stabilizaci soustavy.



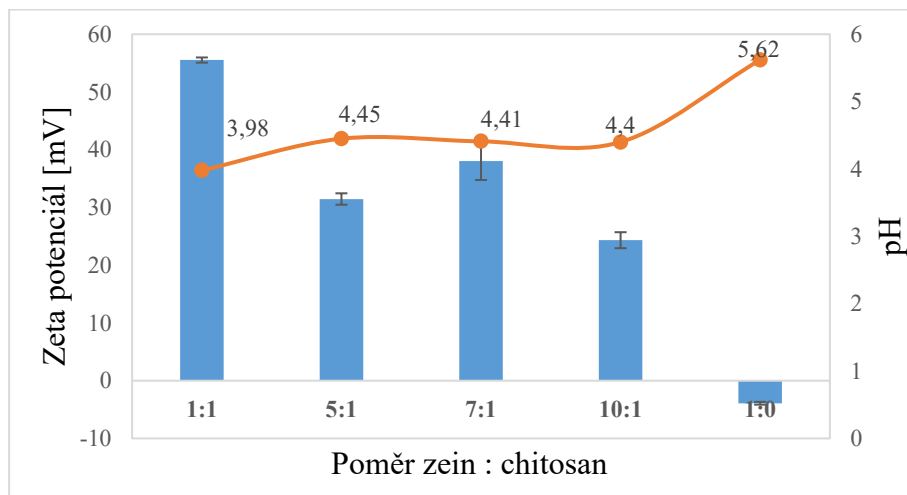
Obr. 15: Hodnoty zeta potenciálu v závislosti na koncentraci chitosanu ve směsi.

Vliv chitosanu na vlastnosti zeinových částic popisuje také studie [49], v níž se autoři zabývali enkapsulací retinolu. Zeta potenciál částic se zvýšil z -30 mV do $+24$ mV po inkorporaci chitosanu. V případě poměru zein:chitosan 10:1 autoři naměřili povrchový náboj okolo 20 mV, což odpovídá námi získaným hodnotám ($18,7$ mV pro částice s tokoferolem a $23,9$ mV pro vzorky s thymolem). Podobný trend byl popsán i ve studii Luo a kol. [60], která se zabývala přípravou a charakterizací podobných systémů, na bázi chitosanu, zeinu a tokoferolu. Během měření zeta potenciálu bylo zjištěno, že vlivem přídavku chitosanu došlo k posunu povrchového náboje do kladných hodnot (od $-22,8$ mV až do $+40,9$ mV), což bylo srovnatelné s námi získanými výsledky.

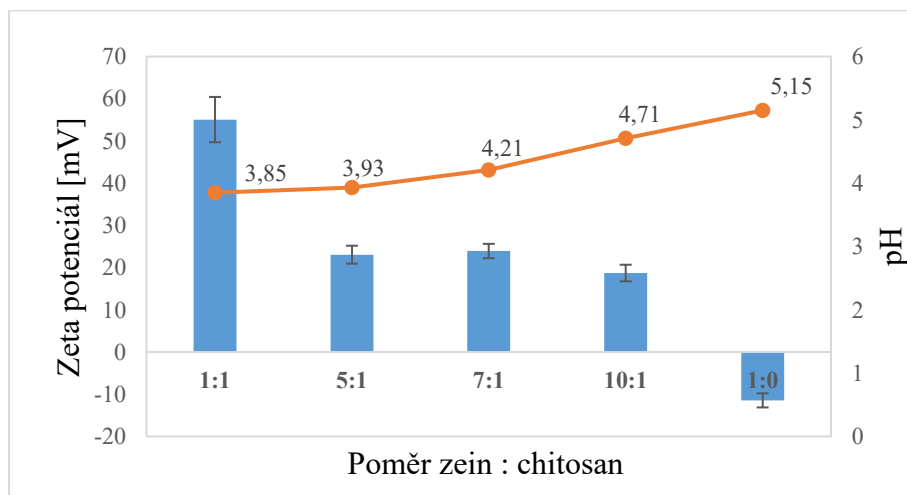
Z Obr. 15 je patrné, že s obsahem aktivních látek došlo k poklesu náboje, největší rozdíl hodnot lze pozorovat u vzorku bez obsahu chitosanu, a to až téměř 78 %. Při měření zeta potenciálu samotného roztoku tokoferolu a thymolu byly zjištěny hodnoty $-40,2$ mV a $-15,0$ mV (při pH roztoku s tokoferolem $5,82$ a s thymolem $6,25$). U směsí s rostoucí koncentrací chitosanu je rozdíl již méně patrný. Pravděpodobně tedy došlo k efektivnímu obalení zeinových částic s inkorporovanými aktivními látkami chitosanem.

Obr. 16, 17 a 18 znázorňují hodnoty zeta potenciálu v závislosti na poměru jednotlivých polymerů ve směsi, v souvislosti s pH hodnotami polymerních roztoků. Klesající zastoupení chitosanu ve směsi logicky vyústilo ve vyšší hodnoty pH, vzhledem k tomu, že chitosan byl rozpuštěn v 1%ní kyselině octové. Nejnižší hodnoty pH měly tedy vzorky se zastoupením polymerů v poměru zein:chitosan 1:1 (od $3,81$ do $3,98$), bez ohledu na to, zda šlo o kontrolní vzorek nebo směs s obsahem tokoferolu/thymolu. Hodnoty pH u vzorků bez přítomnosti chitosanu se pohybovaly v rozmezí od $5,15$ do $5,62$.

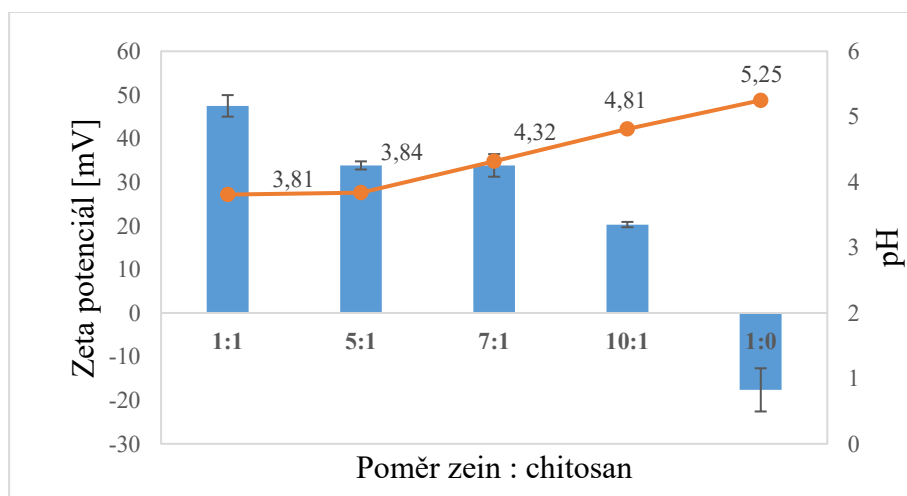
Studie Pascoli a kol. [61] uvádí měření zeta potenciálu roztoků zeinu a arabské gumy. Samotný 5%ní roztok zeinu vykazoval náboj o něco vyšší (přibližně $6,5$) než byla námi získaná hodnota.



Obr. 16: Hodnoty zeta potenciálu a pH pro kontrolní vzorek.



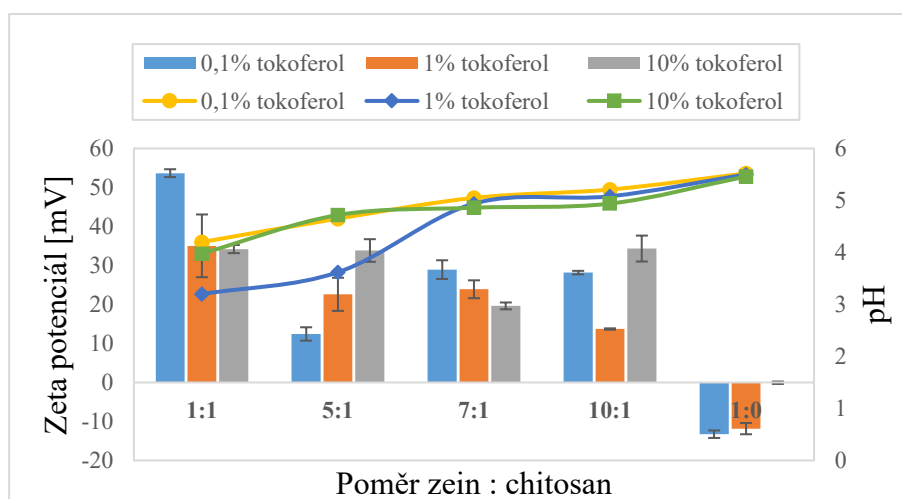
Obr. 17: Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek s obsahem tokoferolu.



Obr. 18: Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek s obsahem thymolu.

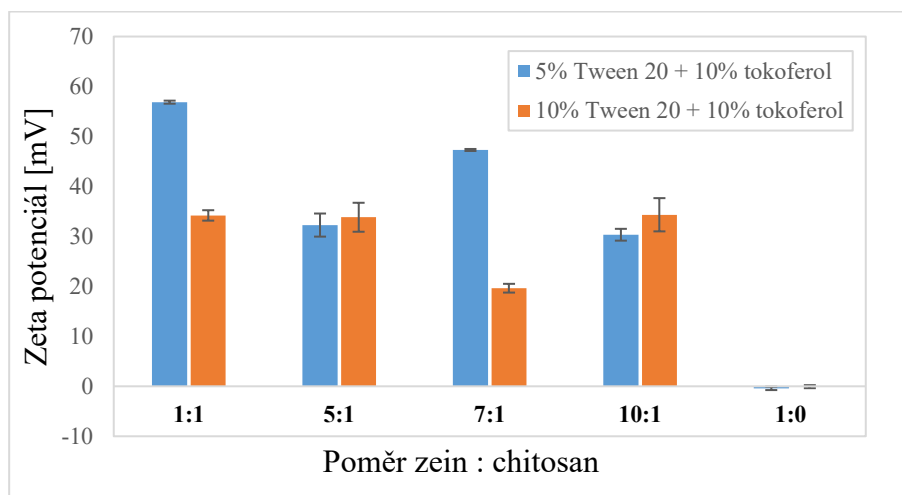
V rámci měření byl také sledován vliv různé koncentrace (0,1%, 1% a 10% roztok) tokoferolu na zeta potenciál. Z Obr. 19 nelze pozorovat zcela jednoznačný trend v závislosti náboje částic na rostoucí koncentraci aktivní látky. U vzorků 1:0 a 5:1 docházelo k nárůstu zeta potenciálu. Podobných výsledků bylo dosaženo ve studii Teixeira a kol. [62], kdy se hodnoty zeta potenciálu zvýšily z $-17,68$ mV na $-12,01$ mV. Zvýšení hodnot zeta potenciálu bylo také sledováno autory studie [60] u vzorků na bázi zein/chitosan komplex s tokoferolem, což vedlo k předpokladu, že došlo k elektrostatickým interakcím mezi zeinovým polymerem a aktivní látkou. Naopak u vzorků se zastoupením polymerů 7:1 a 1:1 byl zaznamenán pokles náboje částic, což by znamenalo nedostatečné obalení částic chitosanem.

Hodnoty pH roztoků byly srovnatelné s ohledem na různé zastoupení aktivní látky, pouze v případě směsí 1:1 a 5:1 byly zaznamenány významněji nižší pH hodnoty v přítomnosti 1%ního roztoku tokoferolu.



Obr. 19: Vliv přidavku chitosanu a jednotlivých koncentrací tokoferolu na zeta potenciál.

Dále byl sledován vliv různé koncentrace tenzidu Tween 20 na hodnotu zeta potenciálu. Graf na Obr. 20 znázorňuje zásadní snížení zeta potenciálu s rostoucí koncentrací Tweenu 20 ve směsi u vzorků 1:1 a 7:1, u zbylých polymerních byly hodnoty zeta potenciálu v podstatě srovnatelné. Z výsledků lze tedy odvodit, že nižší koncentrace tenzidu měla příznivější efekt na náboj částic, a tedy i na stabilizaci systému.



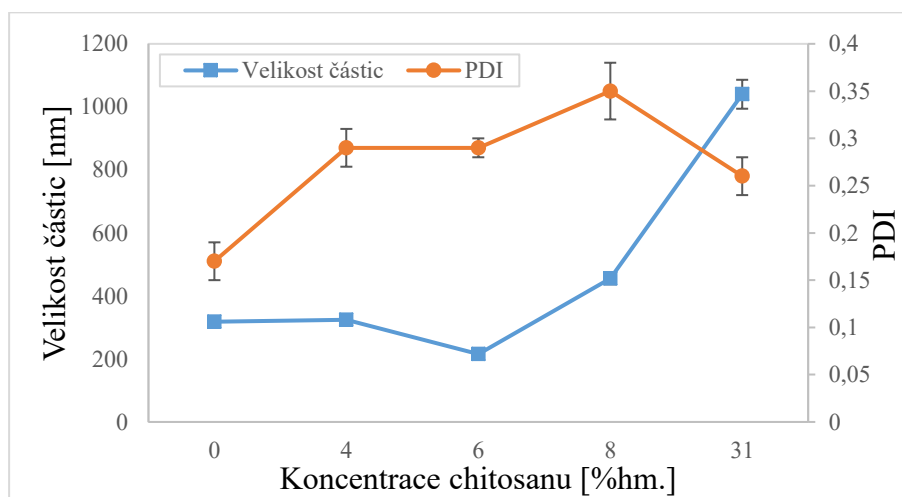
Obr. 20: Vliv množství tenzidu na zeta potenciál.

7.3 Velikost částic

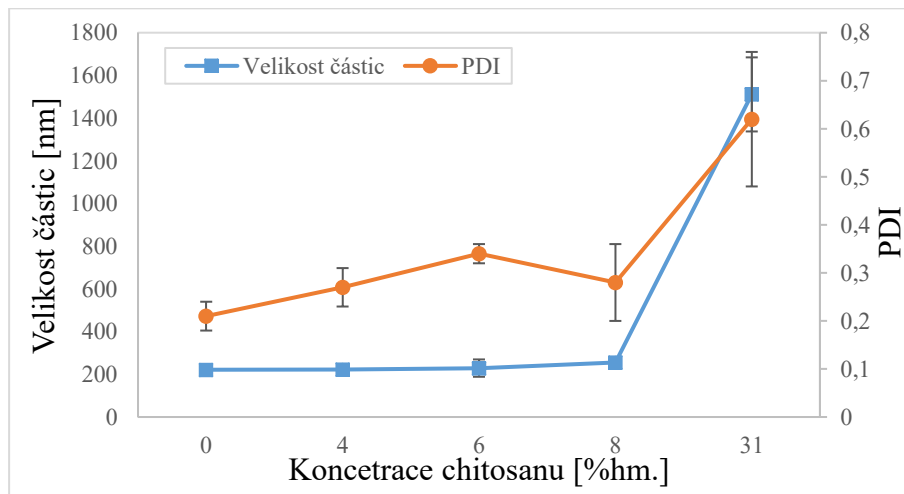
Velikost částic je důležitým parametrem pro charakterizaci polymerních roztoků. Vliv různého složení připravených roztoků a obsahu aktivních látek na velikost částic a index polydispersity byl sledován pomocí metody dynamického rozptylu světla.

Na Obr. 21, 22 a 23 jsou znázorněny výsledky měření velikost částic a indexu polydispersity pro různé vzorky a aktivní látky. Ve všech případech docházelo ke zvyšování průměrné velikosti částic s rostoucí koncentrací chitosanu ve směsi, i když v případě nižších koncentrací ve směsích s aktivními látkami tento nárůst nebyl až tak markantní. Nejvýznamnější nárůst byl pozorován u vzorku s poměrem zein:chitosan 1:1, v němž byl chitosan zastoupen v množství více jak 30 %hm. Velikost částic u vzorků bez aktivních látek se pohybovala v rozsahu 318 nm až 1040 nm (Obr. 21). Nepatrně vyšší rozsah velikostí byl zaznamenán u směsi s obsahem thymolu, kdy byly sledovány částice od 221 nm do 1511 nm (Obr. 22). Ovšem při srovnání těchto dvou typů vzorků lze konstatovat, že směs s thymolem obsahuje ve většině případů menší částice. Největší částice byly zaznamenány u vzorků obsahujících tokoferol, kdy v případě rovnocenného zastoupení obou polymerů byly naměřeny částice větší než 5000 nm (Obr. 23). Podobný trend, tedy nárůst velikosti částic se zvyšujícím se obsahem chitosanu byl zaznamenán v práci Park a kol. [49], která se zabývala enkapsulací retinolu do zeinových částic pokrytých chitosanem. U vzorků připravených v poměrech zein:chitosan 10:0,5 a 10:1 došlo k nárůstu velikosti částic z 834 nm na 1196 nm.

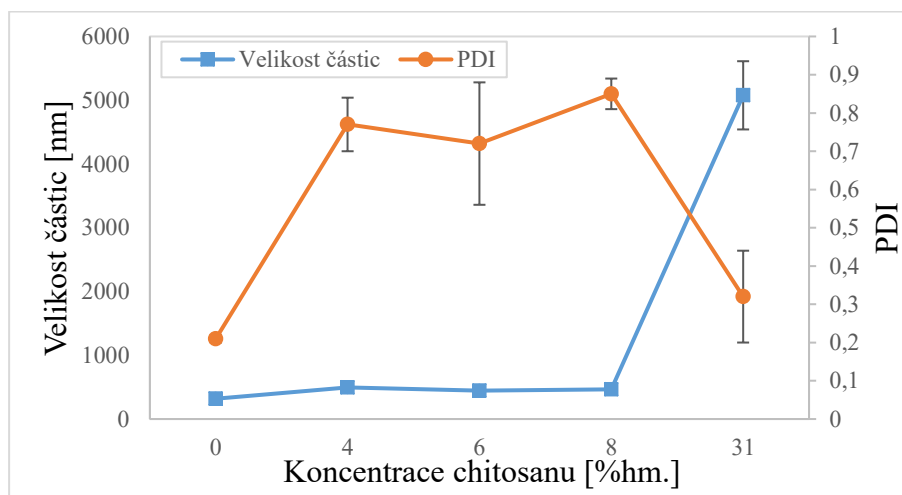
Ke snížení velikosti částic s vyšším zastoupením zeinu ve směsi s chitosanem a tokoferolem došlo i v další studii [60], ovšem toto bylo potvrzeno do určité koncentrace zeinu ve vzorku. Při překročení 20 mg/ml došlo k opětovnému nárůstu velikosti částic, zřejmě jako důsledek tvorby větších komplexů.



Obr. 21: Graf závislosti velikosti částic na zvyšující se koncentraci chitosanu u kontrolních vzorků bez aktivní látky.



Obr. 22: Graf závislosti velikosti částic na zvyšující se koncentraci chitosanu u vzorků s thymolem.

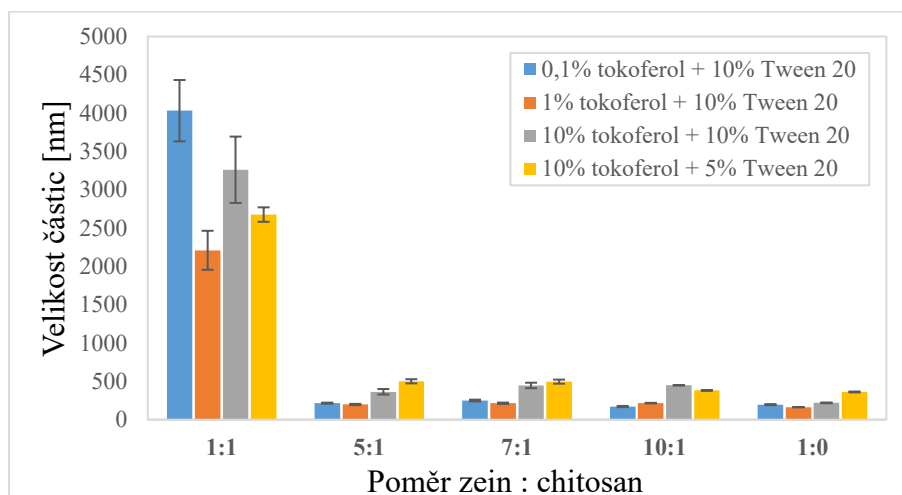


Obr. 23: Graf závislosti velikosti částic na zvyšující se koncentraci chitosanu u vzorků s tokoferolem.

Dalším významným parametrem, který vypovídá o homogenitě disperzí, je index polydisperzity (PDI). Hodnoty indexu PDI vykazovaly s rostoucí koncentrací chitosanu stoupající trend, pouze s výjimkou nejvyššího testovaného množství chitosanu, kdy došlo k poklesu (u kontrolního vzorku a směsi s tokoferolem). U kontrolních vzorků se pohybovaly hodnoty PDI v rozmezí 0,17 až 0,35 (Obr. 21), což znamená, že připravené částice vykazovaly poměrně úzkou distribuci. Vyšší indexy polydisperzity byly zaznamenány u směsi obsahujících aktivní látky, a to od 0,21 až 0,85 (Obr. 22 a 23).

Vliv různého množství aktivní látky, resp. surfaktantu na velikost částic byl sledován srovnáním vzorků s přísadkou 0,1; 1 a 10%ního roztoku tokoferolu a 5 a 10%ního roztoku Tweenu 20 k daným poměrům polymerů zeinu a chitosanu (viz Obr. 24). Co se týká vlivu množství tokoferolu, většinou docházelo k nárůstu velikosti částic, s výjimkou směsi 1:1, kdy byly největší částice (okolo 4000 nm) naměřeny právě v případě 0,1%ního přísadku tokoferolu.

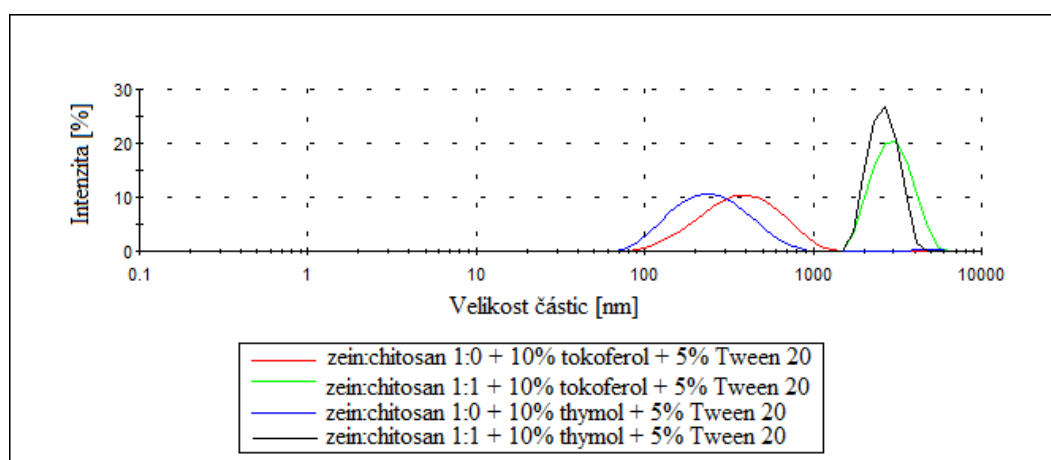
Po srovnání 5% a 10%ního Tweenu 20 byly zjištěny různé trendy v závislosti na poměru obou polymerů. Nárůst velikosti částic byl sledován u vzorků 5:1, 7:1 a 1:0, zatímco u zbývajících dvou vzorků došlo k poklesu velikosti částic. Podobně, jako v případě měření zeta potenciálu, lze ovšem konstatovat, že zvyšování koncentrace surfaktantu nemá zásadnější pozitivní význam pro připravené systémy.



Obr. 24: Závislost velikosti částic na koncentraci aktivní látky a surfaktantu Tween 20.

Nejednotných výsledků bylo dosaženo i v různých studiích. Například Sukmawati a kol. [63] znamenali příznivý stabilizační efekt tenzidu, když došlo ke zmenšení částic při zvyšující se koncentraci surfaktantu, a to z 5581 na 112 nm s koncentrací Tweenu 80 od 0 do 0,5 obj.%. Na druhou stranu, byl sledován i opačný trend, tedy zvyšování částic s rostoucí koncentrací tenzidu od 0 do 0,03 %, a to v práci Asasutjarit a kol. [64]. Zjevně zde hraje roli více faktorů jak koncentrace daného tenzidu, tak charakter materiálů tvořících základ systému, stejně jako povaha aktivní látky.

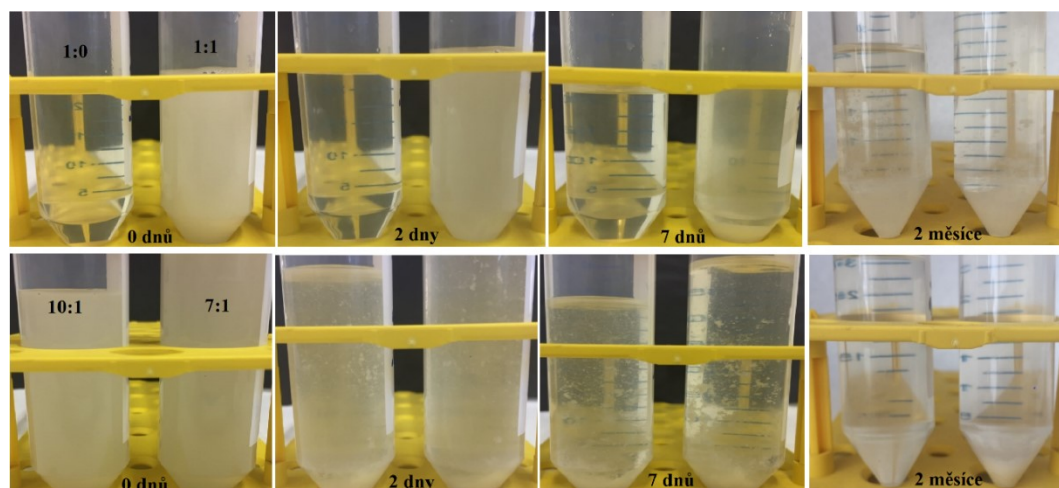
Na Obr 25. lze pozorovat srovnání distribučních křivek velikostí částic měřených u vzorků v poměru 1:1, 1:0 a s přidavkem aktivních látek. Je patrné, že s vyšším zastoupením chitosanu byly přítomné větší částice, ale bylo dosaženo užší distribuce.



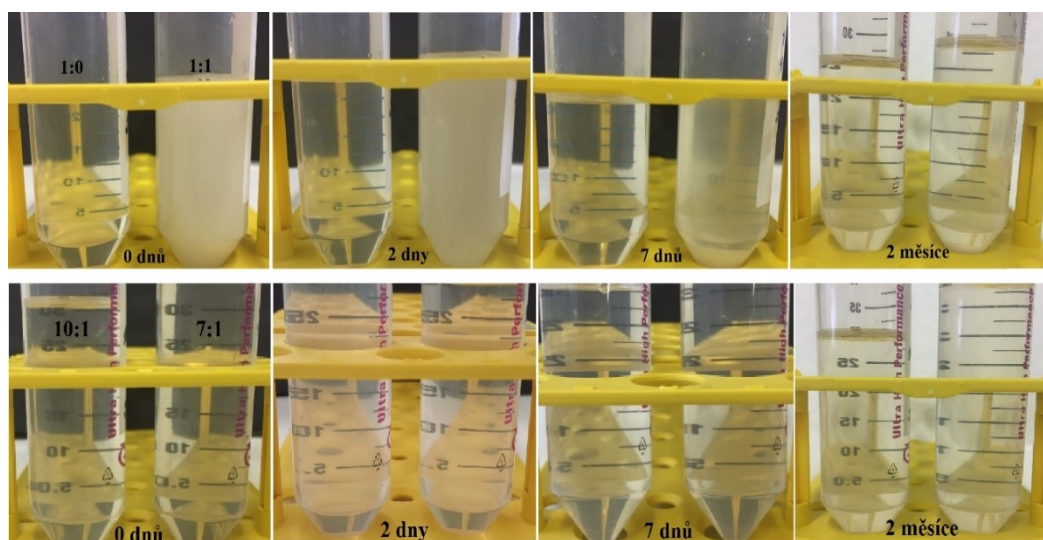
Obr. 25: Srovnání distribučních křivek polymerních roztoků u poměrů zein:chitosan 1:1 a 1:0.

7.4 Stabilita částic

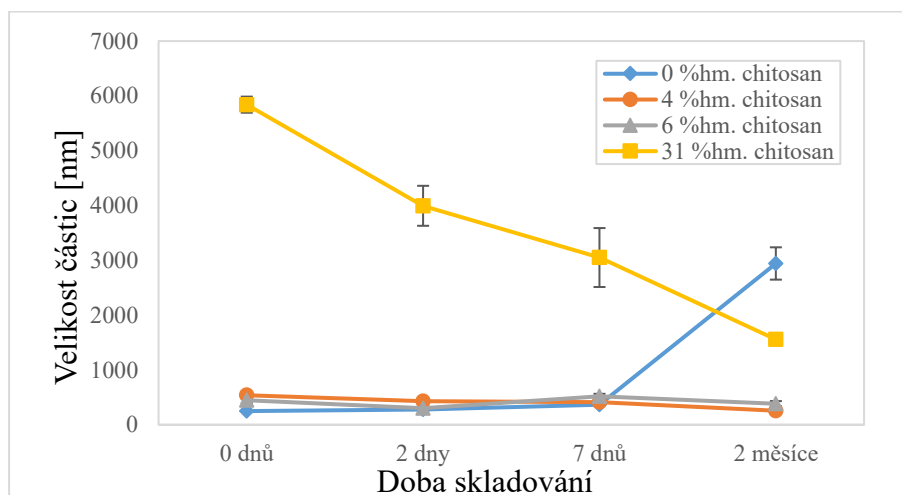
Stabilita vybraných připravených polymerních roztoků s přidavkem tokoferolu a thymolu byla analyzována prostřednictvím vizuálního hodnocení, dále pak byla měřena průměrná velikost částic a zeta potenciál. Uvedené parametry byly sledovány v den přípravy roztoků, pak po dvou, sedmi dnech a po dvou měsících skladování vzorků při 25°C. Vizuální hodnocení potvrdilo, že u směsí 10:1 a 7:1 s přidavkem tokoferolu byla zaznamenána tvorba agregátů již po dvou dnech skladování (Obr. 26). U vzorku s rovnocenným zastoupením polymerů ve směsi se po sedmi dnech začala projevovat sedimentace částic. Po dvou měsících byl již rozpad fází (sedimentace) sledován u všech vzorků. Na druhou stranu, vzorky obsahující thymol prokázaly vyšší stabilitu, kdy u většiny vzorků ani po dvou měsících nebyla patrná agregace částic. Pouze u vzorku v poměru 1:1 byla po sedmi dnech sledována změna roztoku v podobě tvorby usazeniny ve spodní části (Obr. 27). Vzorky s obsahem thymolu byly průhledné s výjimkou směsi obsahující chitosan a zein v poměru 1:1. Na druhou stranu, vzorky s tokoferolem byly mléčné s nažloutlým nádechem, kromě směsi neobsahující chitosan. Toto zjištění je v souladu s měřením velikosti částic, kdy u směsí s obsahem thymolu byly monitorovány menší částice (graf na Obr. 28 a 29). Tento fakt lze vysvětlit tak, že přítomná aktivní látka (v tomto případě thymol) slouží v daném systému jako stabilizační činidlo a také brání koalescenci a zvětšování částic [65]. Co se týká zastoupení polymerů ve směsi, jako optimální se jeví vzorky 10:1 a 7:1 (koncentrace chitosanu 4 a 6 %hm.), jelikož vyšší množství vedlo spíše k horší stabilitě v rámci sledované doby skladování.



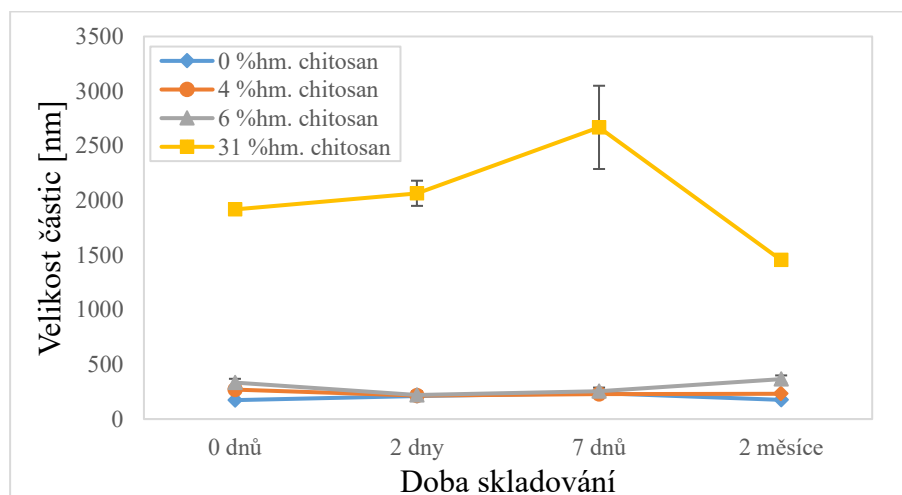
Obr. 26: Sledování stability polymerních roztoků s přidavkem tokoferolu.



Obr. 27: Sledování stability polymerních roztoků s přidavkem thymolu.



Obr. 28: Závislost velikosti částic na době skladování polymerních roztoků s tokoferolem.



Obr. 29: Závislost velikosti částic na době skladování polymerních roztoků s thymolem.

Z Tabulky 6 vyplývá, že hodnoty distribuce velikostí částic u systémů s tokoferolem byla poměrně široká, jak napovídají hodnoty PDI. Na druhou stranu, hodnoty PDI vzorků s obsahem thymolu se pohybovaly většinou v rozmezí 0,2 až 0,3, pouze v případě směsi 1:1 byl zaznamenán vyšší index polydisperzity, a to okolo 0,4 až 0,5 (Tab. 7).

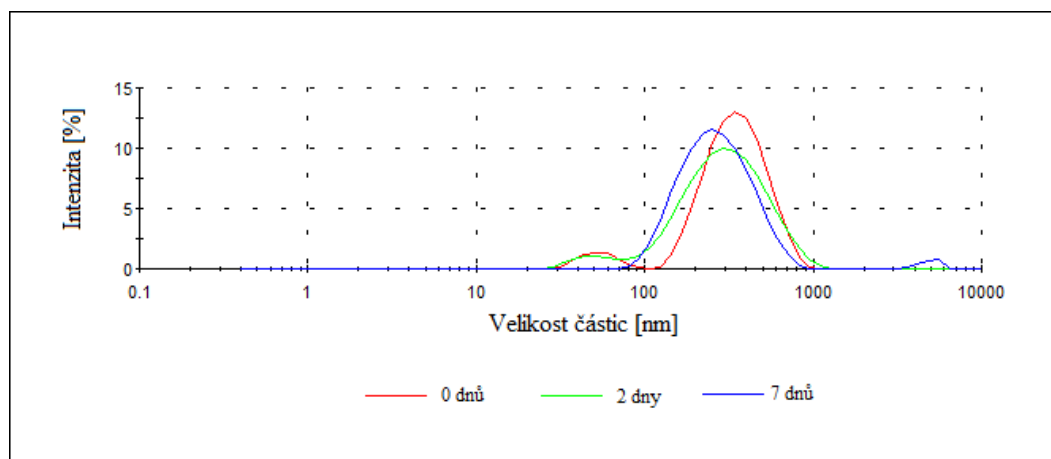
Tab. 6: Naměřené průměrné hodnoty PDI pro 10% tokoferol a 5% Tween 20.

Poměr zein:chitosan	0 dnů [nm]	2 dny [nm]	7 dnů [nm]	2 měsíce [nm]
1:1	0,40 ± 0,11	0,64 ± 0,07	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,00
1:0	0,27 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,68 ± 0,55
10:1	0,81 ± 0,05	0,74 ± 0,07	0,62 ± 0,03	0,48 ± 0,02
7:1	0,82 ± 0,11	0,61 ± 0,16	0,44 ± 0,04	0,63 ± 0,04

Tab. 7: Naměřené průměrné hodnoty PDI pro 10% thymol a 5% Tween 20.

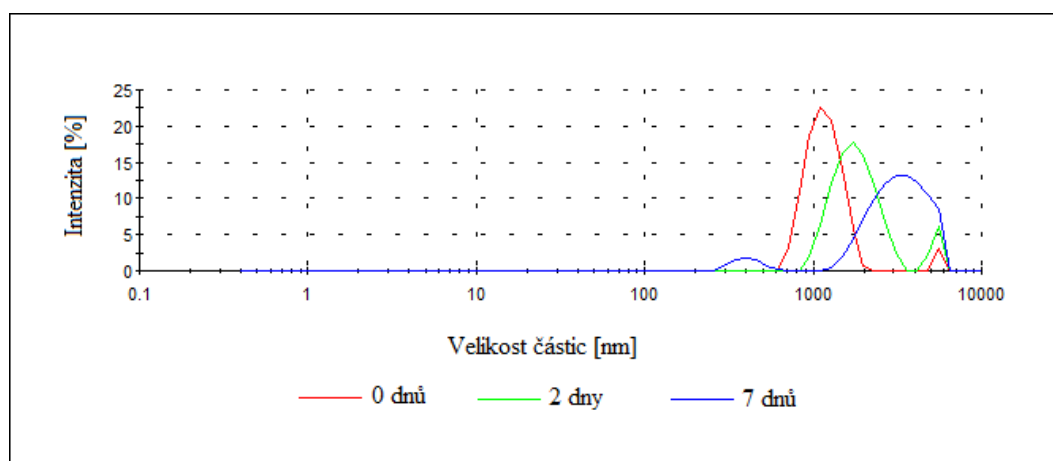
Poměr zein:chitosan	0 dnů [nm]	2 dny [nm]	7 dnů [nm]	2 měsíce [nm]
1:1	0,48 ± 0,02	0,44 ± 0,10	0,38 ± 0,06	0,41 ± 0,08
1:0	0,21 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,29 ± 0,01
10:1	0,32 ± 0,01	0,35 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,26 ± 0,02
7:1	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,26 ± 0,01

Na Obr. 30 lze pozorovat srovnání distribučních křivek velikostí částic vzorku 10:1 s přidavkem thymolu. Z charakteru křivek je patrné zastoupení dvou populací částic, přičemž po týdnu skladování menší částice zanikají a objevuje se nový malý pík v oblasti větších částic. Přesto lze tvrdit, že v rámci 7 dní nedochází k zásadním změnám v charakteru systému.

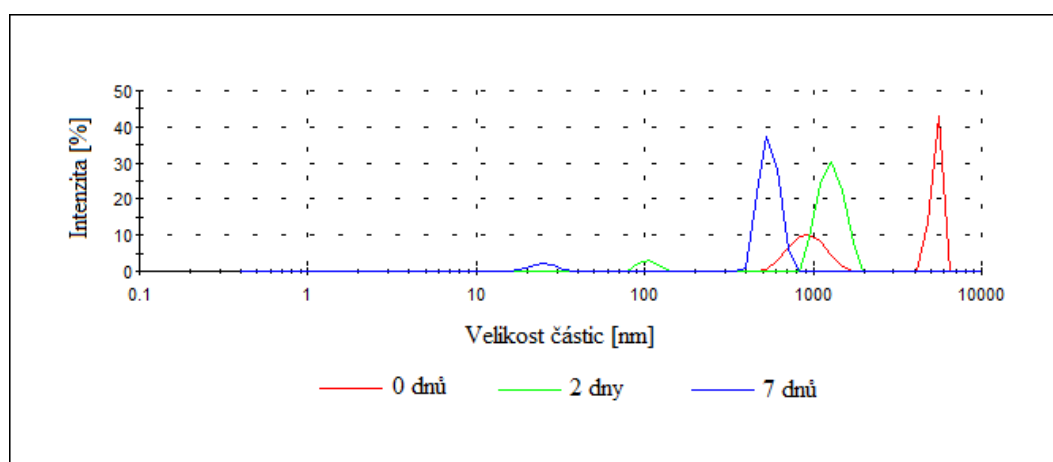


Obr. 30: Distribuční křivky velikosti částic vzorku zein:chitosan 10:1 s thymolem.

Na Obr. 31 jsou znázorněny distribuční křivky velikosti částic pro vzorek 1:1 s přídavkem thymolu. V porovnání s předchozím obrázkem lze pozorovat větší rozdíly v naměřených velikostech částic, stejně jako v jejich distribuci. Větší odlišnosti ve velikostech částic jsou patrné i u vzorku 1:1 s obsahem tokoferolu (Obr. 32). Lze tedy konstatovat, že podíl polymerů ve směsi ovlivňuje výslednou stabilitu systémů.

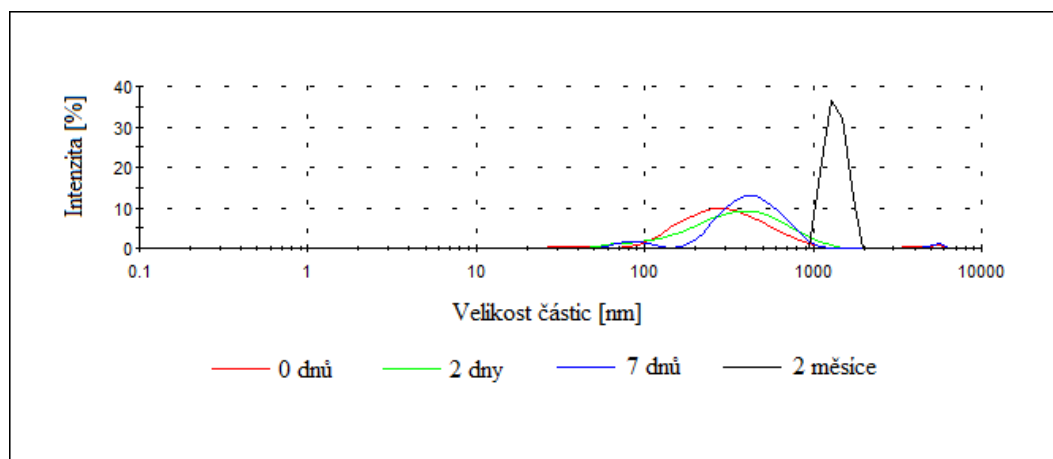


Obr. 31: Distribuční křivky velikosti částic vzorku zein:chitosan 1:1 s thymolem.

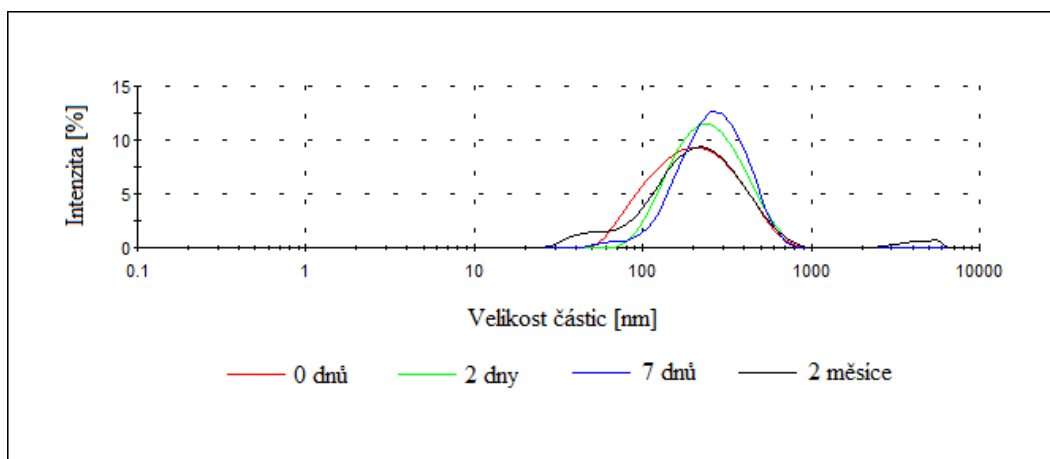


Obr. 32: Distribuční křivky velikosti částic vzorku zein:chitosan 1:1 s tokoferolem.

Na následujících obrázcích 33 a 34 lze vidět srovnání distribučních křivek polymerních roztoků bez přídavku chitosanu s aktivními látkami tokoferol anebo thymol. U směsi s přídavkem tokoferolu lze po dvou měsících skladování pozorovat posun k větší velikosti částic s užší distribucí. V případě thymolu (Obr. 34) nebyly ani po dvou měsících pozorovány zásadní změny v charakteru distribučních křivek. Tento fakt potvrzuje dříve zmíněné tvrzení o možném stabilizačním účinku thymolu v daném systému.



Obr. 33: Distribuční křivky pro polymerní roztoky 1:0 s přidavkem tokoferolu.



Obr. 34: Distribuční křivky pro polymerní roztoky 1:0 s přidavkem thymolu

V rámci stabilitní studie byly měřeny i hodnoty zeta potenciálu na částicích. Nejvyšší náboj byl opět naměřen u vzorků 1:1, které obsahovaly největší zastoupení chitosanu. Během sledované doby skladování docházelo ke změnám hodnot zeta potenciálu, a to v závislosti na poměru obou polymerů ve směsi. V případě tokoferolu byly nejmenší výkyvy zeta potenciálu zaznamenány u směsi 7:1 (viz Tabulka 8). Naopak u směsi s thymolem (viz Tabulka 9) se stejným zastoupením polymerů byl sledován značný pokles hodnot, přičemž rozdíl hodnot měřených v den přípravy roztoků a po dvou měsících činil až 93 %. Bylo tedy prokázáno, že použitá aktivní látka má zásadní vliv na náboj částic, resp. na stabilitu.

Tab. 8: Naměřené průměrné hodnoty zeta potenciálu pro 10% tokoferol a 5% Tween 20.

Poměr zein:chitosan	0 dnů [mV]	2 dny [mV]	7 dnů [mV]	2 měsíce [mV]
1:1	58,87 ± 0,68	36,63 ± 5,47	41,63 ± 6,88	33,30 ± 5,47
1:0	10,30 ± 0,89	3,55 ± 0,61	8,14 ± 0,60	-18,53 ± 0,15
10:1	20,10 ± 1,57	25,07 ± 1,50	30,47 ± 6,22	20,00 ± 3,46
7:1	22,73 ± 2,15	29,90 ± 4,26	23,80 ± 3,57	35,30 ± 7,93

Tab. 9: Naměřené průměrné hodnoty zeta potenciálu pro 10% thymol a 5% Tween 20.

Poměr zein:chitosan	0 dnů [mV]	2 dny [mV]	7 dnů [mV]	2 měsíce [mV]
1:1	56,23 ± 0,67	52,33 ± 3,07	47,40 ± 3,86	36,30 ± 5,39
1:0	0,42 ± 0,08	8,90 ± 0,30	0,68 ± 0,12	8,80 ± 0,21
10:1	36,90 ± 3,41	48,60 ± 1,30	17,00 ± 4,39	6,95 ± 1,14
7:1	42,77 ± 1,56	31,50 ± 8,45	27,40 ± 2,61	4,25 ± 1,32

7.5 Povrchové napětí

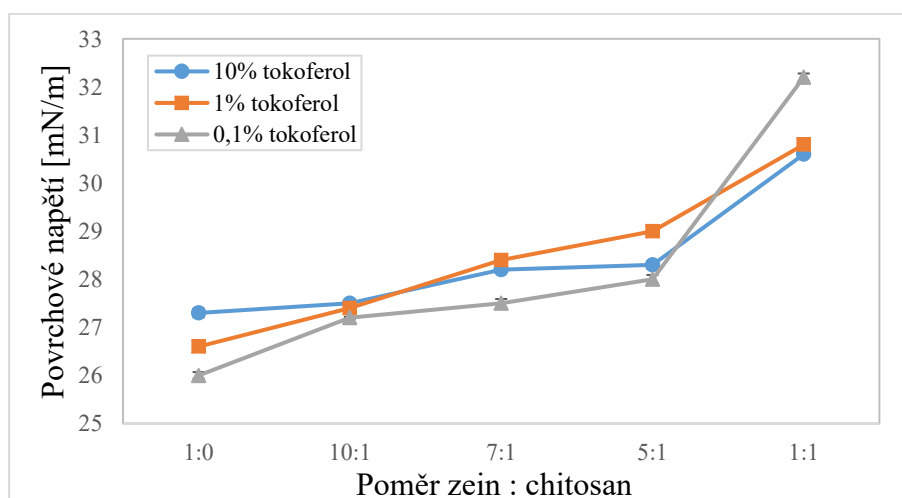
Povrchové napětí je významnou charakteristikou systémů s obsahem různých surfaktantů, jelikož vypovídá o jejich povrchové aktivitě [66, s. 72–73].

V Tabulce 10 jsou zaznamenány hodnoty povrchového napětí u kontrolních vzorků a směsí s přidávkem 10% tokoferolu/thymolu. Nejnižších hodnot povrchového napětí (26,1 mN/m až 26,9 mN/m) bylo dosaženo u vzorků bez obsahu chitosanu. S jeho rostoucí koncentrací ve směsi docházelo k mírnému zvyšování povrchového napětí (30,0 mN/m až 31,2 mN/m pro vzorek 1:1). Narůstající trend hodnot povrchového napětí se zvyšující se koncentrací chitosanu byl pozorován i v práci Torres-Ginger a kol. [67], kde rozdíl hodnot činil téměř 30 % při srovnání samotného zeinu a komplexu zein/chitosan v poměru 9:1.

Tab. 10: Naměřené hodnoty povrchového napětí pro jednotlivé polymerní roztoky.

Poměr zein:chitosan	Kontrolní vzorek [mN/m]	Roztok s přísadkem tokoferolu [mN/m]	Roztok s přísadkem thymolu [mN/m]
1:0	26,9 ± 0,08	26,1 ± 0,09	26,2 ± 0,08
10:1	28,5 ± 0,04	27,5 ± 0,08	27,0 ± 0,02
7:1	29,1 ± 0,07	28,2 ± 0,01	27,5 ± 0,08
5:1	29,8 ± 0,06	28,3 ± 0,08	28,2 ± 0,04
1:1	31,2 ± 0,03	30,6 ± 0,06	30,0 ± 0,01

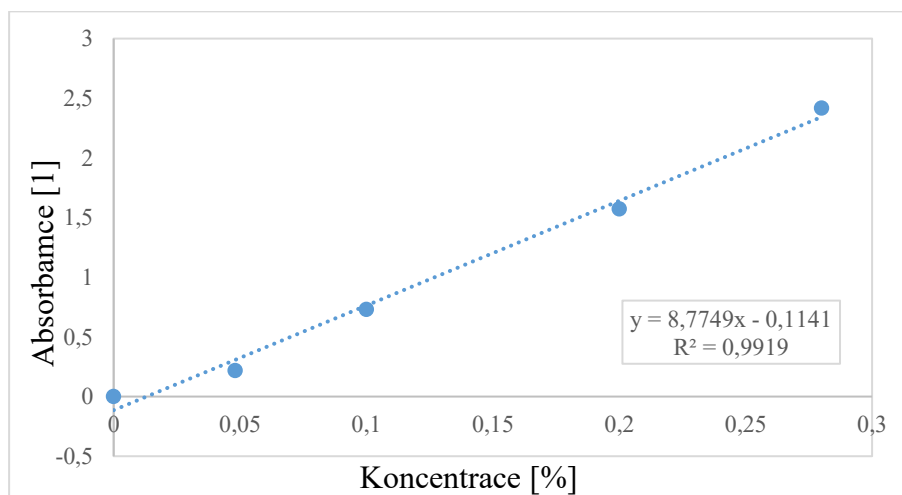
Dále byly sledovány změny povrchového napětí v souvislosti s obsahem aktivní látky (Obr. 35). Z grafu vyplývá, že rostoucí koncentrace tokoferolu měly různý vliv na povrchovou aktivitu směsi. Ve vzorcích s nižším obsahem chitosanu hodnoty mírně rostly, naopak ve směsi s obsahem zein:chitosan v poměru 1:1 docházelo k poklesu hodnot povrchového napětí (z 32,2 mN/m na 30,6 mN/m). Kolísání hodnot povrchového napětí bylo zaznamenáno i ve studii Teixeira a kol. [62], která se zabývala enkapsulací tokoferolu do nanoemulzí na bázi triacylglycerolů. U přísadku 3% tokoferolu došlo k mírnému nárůstu z 22,1 mN/m na 22,3 mN/m, poté byl sledován pokles hodnot povrchového napětí s nárůstem tokoferolu ve směsi, a to na 20,1 mN/m.



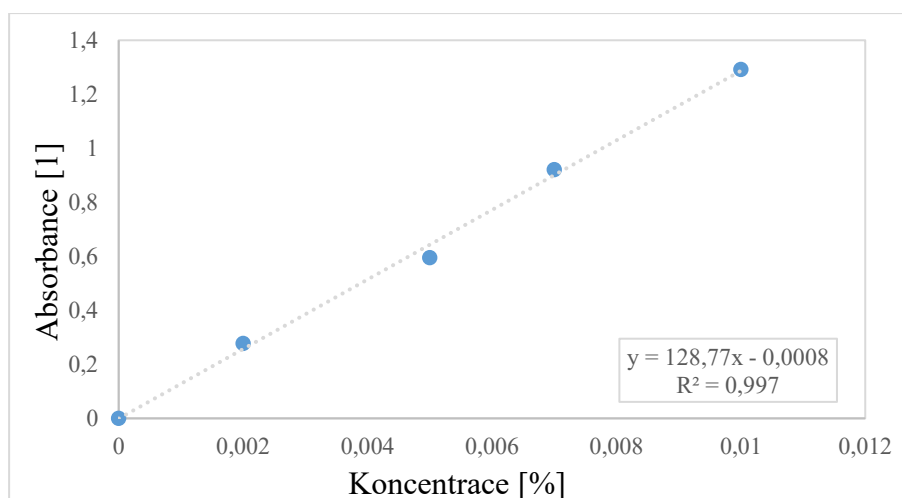
Obr. 35: Vliv aktivní látky na povrchové napětí polymerních roztoků.

7.6 Stanovení enkapsulačního účinku

Enkapsulační účinek byl sledován pomocí UV-VIS analýzy. Kalibrační přímky pro obě použité aktivní látky včetně rovnic lineární regrese jsou zobrazeny na Obr. 36 a 37.



Obr. 36: Kalibrační přímka pro tokoferol (měřeno při 248 nm).

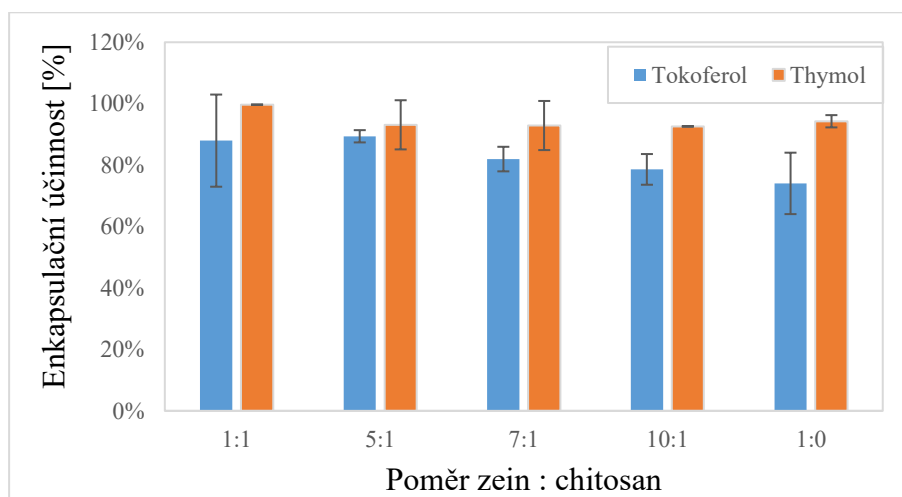


Obr. 37: Kalibrační přímka pro thymol (měřeno při 274 nm).

Enkapsulační účinek v závislosti na poměru obou polymerů byl sledován pomocí stanovení obsahu volné aktivní látky (prostřednictvím UV-VIS) a následného odečtení od původního množství. Z grafu (Obr. 38) je patrné, že bylo dosaženo poměrně vysokých hodnot enkapsulovaného množství. V případě tokoferolu byl nejvyšší stupeň enkapsulace (89,39 %) sledován u vzorku se zastoupením polymerů zein:chitosan 5:1. V porovnání se samotným zeinem činil rozdíl 15,34 %. U vzorků s obsahem thymolu bylo nejvyšší enkapsulované množství zaznamenáno u systému s rovnocenným zastoupením polymerů (1:1), a to více než 99 %. U obou aplikovaných aktivních látek, chitosan napomohl zvýšení účinnosti enkapsulace. Podobně,

v práci [68] byl sledován pozitivní vliv přídavku druhého polymeru (karboxymethyl chitosanu) na enkapsulační účinnost zeinových částic s obsahem vitamínu D₃. V tomto případě bylo dosaženo zvýšení stupně enkapsulace z 52 % (samotné zeinové částice) na 71,5 % (v kombinaci s karboxymethyl chitosanem). Odlišných závěrů bylo dosaženo ve studii Luo a kol. [60], kde nebyl pozorován žádný zásadní vliv přídavku chitosanu do směsi na bázi zeinu a tokoferolu. Důvodem může být skutečnost, že k významné enkapsulaci tokoferolu do zeinových částic došlo již před přidáním chitosanu.

Ovšem, z našich výsledků je také patrné, že při dalším zvyšování koncentrace chitosanu již nedochází k nárůstu enkapsulačního účinku. Hodnoty naopak klesají z 89,39 % na 78,61 % v případě tokoferolu (viz směsi v pořadí 10:1, 7:1 a 5:1). U roztoků s thymolem byl také pozorován, i když ne tak zásadní, pokles, a to z 93,12 % na 92,60 %. Ve studii Park a kol. [49] došli k podobným závěrům, kdy enkapsulační účinek vzrostl u zeinových částic s obsahem retinolu modifikovaných pomocí chitosanu. Tento stav byl vysvětlen pomocí elektrostatických interakcí mezi oběma polymery, které vedly k vytvoření pevnějšího obalu na povrchu zeinových částic a tím i nárůstu enkapsulační aktivity. Při dalším zvyšování podílu chitosanu ve směsi naopak enkapsulační účinek zásadně poklesl. Je možné, že vyšší koncentrace chitosanu mohou způsobit nadměrný nárůst viskozity a následně pokles enkapsulace, jak bylo potvrzeno i v jiných studiích [49]

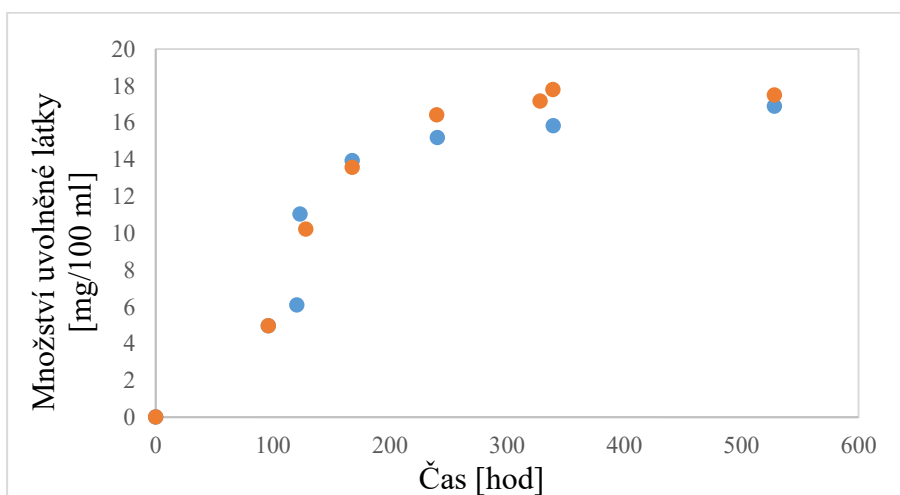


Obr. 38: Enkapsulační účinek polymerních roztoků s přídavkem tokoferolu a thymolu.

7.7 Stanovení uvolněné látky

S ohledem na stanovenou enkapsulační účinnost byl vybrán vzorek 1:1 s obsahem thymolu pro stanovení kinetiky uvolňování aktivní látky. Měření bylo prováděno v prostředí PBS pufru s přidavkem Tweenu 20 (0,4 %hm.) pro zajištění lepší rozpustnosti. Odebrané vzorky byly lyofilizovány a po následném vytřepání do hexanu byla stanovena absorbance, která byla následně přepočtena na množství uvolněné látky. Na Obr. 39 je znázorněna závislost množství uvolněného thymolu v mg/100 ml na čase (jelikož nebyly ve všech případech zachovány stejné časy odběrů, nebyl počítán průměr, ale jsou zde uvedeny dvě křivky). Z grafu je patrné, že během prvních cca 72 hodin bylo množství uvolněného thymolu zanedbatelné (během této doby byly naměřeny téměř nulové absorbance). K postupnému nárůstu hodnot k limitní hranici docházelo během dalších zhruba 10 dní. Ustálení bylo zaznamenáno po cca 300 dnech, a to okolo hodnoty 17 mg/100 ml, což odpovídá asi 40 % z původního množství thymolu. Další práce by se měla zaměřit na rozšíření testování kinetiky uvolňování, optimalizaci podmínek, média apod.

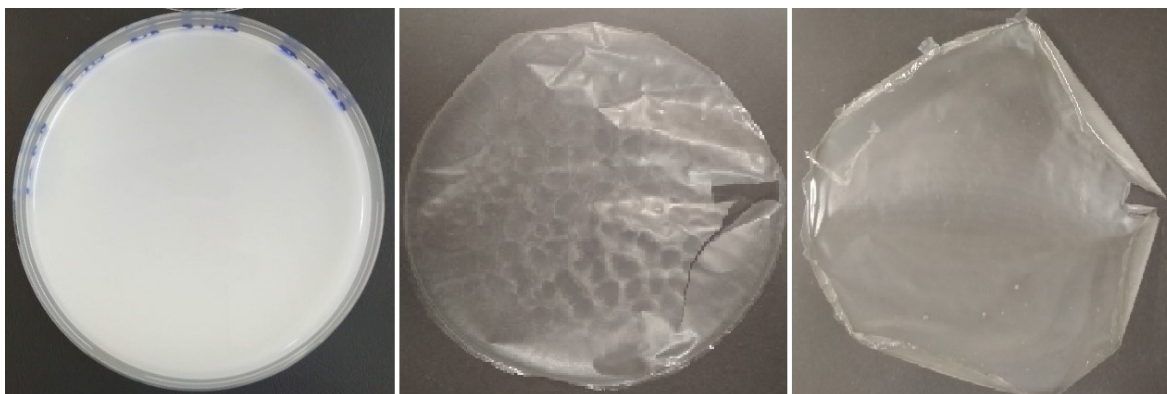
Luo a kol. [60] se zabývali vlivem množství zeinu v systému chitosan-zein-tokoferol na kinetiku uvolňování. Bylo zjištěno, že v tomto případě snížení zastoupení zeinu vedlo ke snížení tzv. burst efektu, tedy rychlého uvolnění aktivní látky při počátečním kontaktu s médiem. Dalším sledovaným parametrem byl vliv enkapsulovaného vitamínu, kdy při jeho zvyšující se koncentraci ve směsi byl proces uvolňování zpomalen.



Obr. 39: Množství uvolněné aktivní látky na čase.

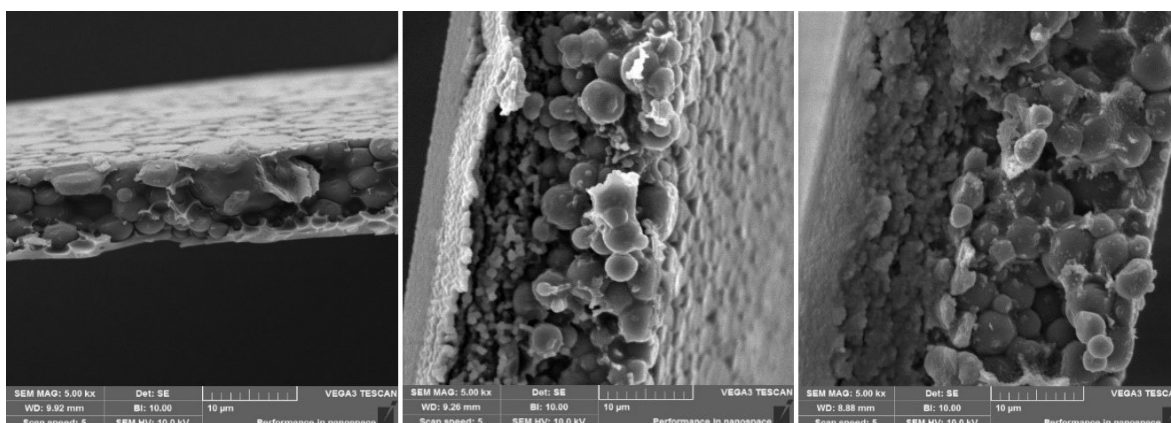
7.8 SEM analýza

Pro doplnění studie o připravených polymerních systémech s obsahem aktivních látek byla provedena mikrostrukturální analýza pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Polymerní roztoky byly předem odlity na Petriho misky a vysušeny. Charakter vysušených filmů byl zásadně závislý na koncentraci chitosanu ve směsi, kdy se projevíly dobré filmotvorné vlastnosti tohoto polymeru. Naopak, v případě nízké nebo nulové koncentrace chitosanu byly připravené filmy velmi křehké a nebylo je možno celé sejmut z Petriho misky. Roztoky po odlití byly mléčné (Obr. 40A), filmy po vysušení byly téměř průsvitné se světle nažloutlým nádechem. Film s obsahem aktivní látky vykazuje nehomogenní strukturu s patrnými bílými shluky, které vznikly při procesu sušení (Obr. 40B). Kontrolní vzorek bez přítomné aktivní látky byl homogenní (Obr. 40C).



Obr. 40: Polymerní roztok 1:1 s obsahem tokoferolu a) po odlití na misku a b) po vysušení, c) kontrolní vzorek bez aktivní látky po vysušení.

Na Obr. 41 je znázorněn příčný řez vzorku 7:1 s obsahem thymolu a tokoferolu. Je zde patrná kombinovaná struktura tvořená sférickými částicemi zeinu a membránovým uspořádáním chitosanového polymer, které vypovídá o jeho filmotvorné schopnosti a potenciálu tvorby obalových materiálů. Byla zaznamenána nejednotná distribuce částic, jejichž velikost se u tohoto vzorku pohybovala v rozmezí 500 nm až cca 3 μm u vzorku s tokoferolem (Obr. 41B) a 2 až 5 μm v případě thymolu (Obr. 41C). Tyto výsledky nejsou v souladu s měřením velikosti částic. Důvodem může být zásadnější změna struktury způsobená vysušením roztoku do formy filmu. Vlivem inkorporace aktivních látek došlo ke zvýšení tloušťky filmu.



a)

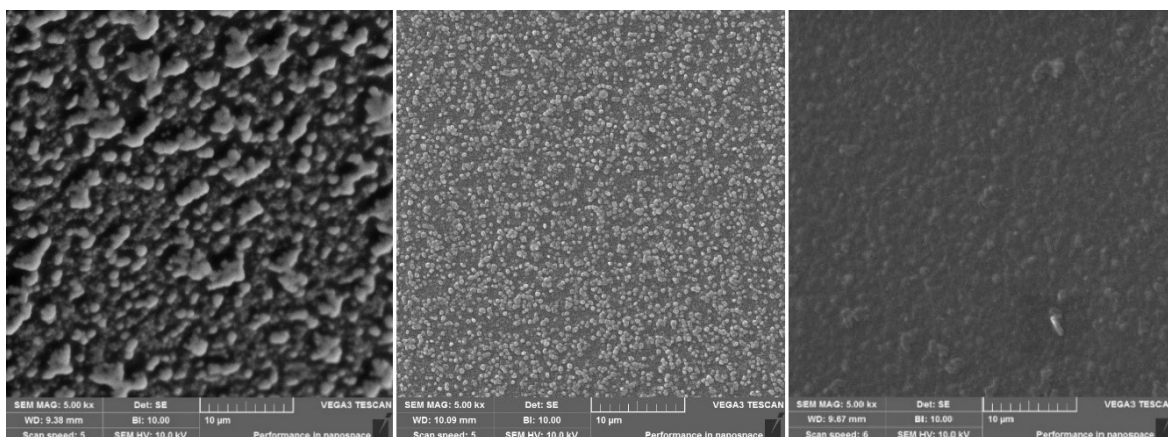
b)

c)

Obr. 41: Mikrostruktura polymerních filmů, a) kontrolní vzorek 7:1; b) vzorek 7:1 + tokoferol; c) vzorek 7:1 + thymol.

Na Obr. 42 je srovnání snímků povrchů vzorků s různým zastoupením obou polymerů s obsahem tokoferolu. Jak lze vidět, se zvyšující se koncentrací chitosanu (tj. od 4 až 31 %hm.) se stává struktura polymerního filmu homogenní. Naopak vyšší koncentrace zeinu (Obr. 42A) způsobuje tvorbu světlých částic o průměrné velikosti 1 μm , které vytváří nestejnorodou polymerní strukturu.

Pozitivní vliv chitosanu na morfologické vlastnosti byl zaznamenán i v práci [60]. SEM analýza chitosan/zeinového komplexu s obsahem tokoferolu prokázala více homogenní strukturu s užší distribucí velikosti částic, které byly v porovnání se systémem obsahujícím pouze zein a tokoferol menších rozměrů (okolo 500 nm).



a)

b)

c)

Obr. 42: Mikrostruktura polymerních filmů, a) vzorek 10:1 + tokoferol; b) vzorek 5:1 + tokoferol; c) vzorek 1:1 + tokoferol.

ZÁVĚR

Podstatou této diplomové práce bylo studium polymerních zein-chitosanových roztoků se zabudovanou aktivní látkou (tokoferol nebo thymol), stabilizovaných prostřednictvím surfaktantu Tween 20.

Vliv různých poměrů polymerů v nosiči a inkorporace aktivních látek na fyzikálně-chemické vlastnosti připravených systémů byl sledován pomocí měření zeta potenciálu, velikosti částic, povrchového napětí a pH. Dále byla studována enkapsulační účinnost a obsah uvolněné aktivní látky pomocí UV-VIS.

Ze získaných dat plynou následující závěry:

- Měřením zeta potenciálu bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací chitosanu docházelo k nárůstu hodnot, tedy ke zvýšení náboje. Nejvyšší hodnoty byly tedy pozorovány u polymerních roztoků zein:chitosan 1:1, a to 55,07 mV (polymerní roztok s tokoferolem) a 47,48 mV (polymerní roztok s thymolem). Tyto systémy lze považovat za dostatečně elektrostaticky stabilní. Naopak, nejnižší hodnoty byly zaznamenány u vzorků 1:0 s tokoferolem (-11,46 mV) a thymolem (-17,63 mV).
- Při měření velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla byly sledovány větší částice u vzorků s přídavkem tokoferolu, což se potvrdilo i vizuálním hodnocením. Nevýhodou těchto roztoků byla horší stabilita během skladování, kdy již po dvou dnech byla sledována agregace. Thymol prokázal v tomto případě vyšší stabilizační efekt, jelikož pouze u směsi 1:1 byl pozorován rozpad fázi (sedimentace). U všech vzorků ovšem docházelo ke zvyšování velikosti částic v přítomnosti většího podílu chitosanu ve směsi. Nejvíce markantní nárůst byl pozorován u systémů s poměrem zein:chitosan 1:1.
- Tenziometrickým měřením bylo zjištěno, že přídavek chitosanu má vliv na rostoucí povrchové napětí roztoku. Dále bylo zjištěno, že rostoucí koncentrace aktivní látky (tokoferolu) ovlivňuje povrchové napětí polymerních roztoků, a to v závislosti na typu vzorku, resp. zastoupení obou polymerů ve směsi.
- Na základě měření enkapsulačního účinku lze konstatovat, že lepších výsledků bylo dosaženo s aktivní látkou thymol, kdy se hodnoty pohybovaly, v závislosti na poměru chitosanu a zeinu ve směsi, v rozmezí od 92,60 % do 99,68 %.

V případě tokoferolu byl enkapsulační účinek o něco nižší, výsledné hodnoty byly v rozsahu 74,05 % do 89,39 %.

- Dále byla, ve vybraném vzorku s thymolem, sledována kinetika uvolňování do prostředí fosfátového pufru. K ustálení množství uvolněného thymolu došlo zhruba po 300 dnech, přičemž množství odpovídalo 40 % původně přidaného thymolu do směsi.

Závěrem lze shrnout, že došlo k úspěšnému zaenkapsulování aktivních látek do zein-chitosanových systémů, a to jak u polymerních roztoků s přídavkem tokoferolu, tak u roztoků s thymolem. Byl ovšem prokázán zásadní vliv použitých aktivních látek i složení polymerní matrice. Zejména studii uvolňování bude muset být věnována pozornost v rámci další práce. Vzhledem k bezpečnosti a biokompatibilitě výchozích materiálů by připravené komplexy mohly být využívány v kosmetickém nebo farmaceutickém průmyslu za účelem cíleného transportu aktivních látek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MIKULCOVÁ, Veronika. *Dispersion systems as carriers of active substances* [online]. 2017 [cit. 2019-05-03]. ISSN 978-80-7454-699-0. Dostupné z: https://pdfs.semanticscholar.org/dee0/8deee166a737ca4a4b3945db8478677a0bb9.pdf?_ga=2.159207738.1070213463.1556882977-1160244306.1549467147.
- [2] RANGEL-YAGUI, Carlote O., Adalberto PESSOA-Jra a Leoberto Costa TAVARES. *Micellar solubilization of drugs* [online]. 2005 [cit. 2018-08-06]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/7635700_Micellar_solubilization_of_drugs.
- [3] MYERS, Drew. *Surfactant science and technology*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: J. Wiley, c2006. ISBN 0471680249.
- [4] Metal Oxide Nanoparticles Part 2 (Nanotechnology). *What-when-how* [online]. [cit. 2019-02-07]. Dostupné z: <http://what-when-how.com/nanoscience-and-nanotechnology/metal-oxide-nanoparticles-part-2-nanotechnology>.
- [5] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Copyright Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2018-23-9]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-pdf/ob-sah.html.
- [6] MULLEROVÁ, Martina, Marek ŠVÁB a Manuela MOREIRA DOS SANTO. *Měření kritických micelárních koncentrací tenzidů ve vodných roztocích* [online]. Chem. Listy, 2007, vol. 101, No. 6, s. 509–514. [cit. 2018-08-02]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_06_509-514.pdf.
- [7] *Tenside & Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC)* [online]. [cit. 2018-09-23]. Dostupné z: <http://www.dataphysics.de/startseite/grenzflaechen-verstehen/grundlagen/tenside-und-kritische-mizellbildungskonzentration-cmc/>.
- [8] ZANA, R. a Jiding XIA. *Gemini surfactants, synthesis, interfacial and solution-phase behavior, and applications*. New York: Marcel Dekker 2004. ISBN0-8247-4705-4, s. 42.

- [9] ZHANG, Yifei, Yixian HUANG a Song LI. *Polymeric Micelles: Nanocarriers for Cancer-Targeted Drug Delivery*. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2014, **15**(4), 862-871 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1208/s12249-014-0113-z. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-014-0113-z>.
- [10] WAKASKAR, R. Rajesh. *Polymeric Micelles for Drug Delivery* [online]. 2017 [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <http://www.ijddr.in/drug-development/polymeric-micelles-for-drug-delivery.pdf>.
- [11] SATCHI-FAINARO, Ronit a R. DUNCAN. *Polymer therapeutics II: polymers as drugs, conjugates, and gene delivery systems*. New York: Springer, c2006. ISBN 978-3-540-29211-1.
- [12] JHAVERI, Aditi M. a Vladimir P. TORCHILIN. *Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA*. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2014, **5** [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.3389/fphar.2014.00077. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2014.00077/full>.
- [13] NOVÁKOVÁ, Kateřina; *Modelové biologické membrány: jejich charakterizace a využití* [online]. 2015, 166-175 [cit. 2018-08-01]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_03_166-175.pdf.
- [14] TIWARI, Reva, Vaseem A. ANSARI, Satyaprakash SINGH, Md. KHALID a Juber AKHTAR. *LIPOSOMES: THE NOVEL APPROACH IN COSMACEUTICALS* [online]. [cit. 2018-09-23]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/277718349_LIPOSOMES_THE_NOVEL_APPROACH_IN_COSMACEUTICALS.
- [15] HARRINGTON, Kevin J., Konstantinos N. SYRIGOS a Richard G. VILE. *Liposomally targeted cytotoxic drugs for the treatment of cancer*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2002, **54**(12), 1573-1600 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1211/0022357002243. ISSN 00223573. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1211/0022357002243>.

- [16] ARAJO LOPES, Svía Caldeira de, Cristiane dos SANTOS GIUBERTI, Talita Guieiro RIBEIRO, Digo dos SANTOS FERREIRA, Elaine AMARAL LEITE a Mnica CRISTINA. *Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs*. RANGEL, Letcia, ed. *Cancer Treatment-Conventional and Innovative Approaches* [online]. InTech, 2013, 2013-05-09 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.5772/55290. ISBN 978-953-51-1098-9. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/cancer-treatment-conventional-and-innovative-approaches/liposomes-as-carriers-of-anticancer-drugs>.
- [17] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN a kol. *Liposome: classification, preparation, and applications*. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, **8**(1) [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276X. Dostupné z: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>.
- [18] CASANOVA, Francisca a Lúcia SANTOS. *Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review*. *Journal of Microencapsulation* [online]. 2015, **33**(1), 1-17 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.3109/02652048.2015.1115900. ISSN 0265-2048. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02652048.2015.1115900>.
- [19] EDITORS a MAYA J. JOHN AND SABU THOMAS. *Natural Polymers: Composites*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 9781849734028.
- [20] SHUKLA, Rishi a Munir CHERYAN. *Zein: the industrial protein from corn*. *Industrial Crops and Products* [online]. 2001, **13**(3), 171-192 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/S0926-6690(00)00064-9. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669000000649>.
- [21] ANDERSON, Timothy J. a Buddhi P. LAMSAL, *Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications: A Review* [online]. 159-173 [cit. 2018-11-12]. Dostupné z: https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.google.is/&httpsredir=1&article=1033&context=fshn_ag_pubs.
- [22] *Zein-A Corn Compound With Diverse Valuable Uses* [online]. [cit. 2019-02-07]. Dostupné z: <https://agresearchmag.ars.usda.gov/ar/archive/2008/nov/corn1108.pdf>.

- [23] KUBELKOVÁ, Klára, Simona FRYDRYCHOVÁ a Jaroslav PEJCHAL. *CHITOSAN-PROTOTYPE POLYMER NANOPARTICLES WITH TRANSPORT CAPACITY*. *Military Medical Science Letters* [online]. 2018, **87**(2), 82-91 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.31482/mmsl.2018.014. ISSN 03727025. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/325375790_CHITOSAN_-_PROTOTYPOVE_POLYMERNI_NANOCASTICE_S_TRANSPORTNI_KAPACITOU.
- [24] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. *Chitosan a jeho farmaceutické aplikace*. *Chemické listy* [online]. 2009, 56-65 [cit. 2018-10-16]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_56-65.pdf.
- [25] Chitosan chemical structure. *ResearchGate* [online]. [cit. 2018-10-16]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chitosan-chemical-structure_fig2_263324738.
- [26] AHMED, Shakeel a Saiqa IKRAM. *Chitosan: derivatives, composites and applications*. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2017. ISBN 9781119364801. [online]. [cit. 2018-10-16]. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=HEozDwAAQBAJ&pg=PT345&dq=chitosan&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwivo_PmwJbiAhUEbFAKHwLwCrAQ6AEIOjAD#v=onepage&q=chitosan&f=false
- [27] GOOSEN, Mattheus F. A. *Applications of Chitin and Chitosan*. Lancaster, PA: Technomic Pub., c1997. ISBN 1566764491.
- [28] HUBOVÁ, J., M. VACULOVIČOVÁ a R. KIZEK. *Lipozomální transportéry* [online]. [cit. 2018-11-21]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0114/pdf/01-liposomalni-transportery.pdf.
- [29] SCHLOSSMAN, M.L. 2002 *The chemistry and manufacture of cosmetics: Volume III – Ingredients*: [book one and two]. 3. Vyd. Carol Stream: Allured, 1123 s. ISBN 0-931710-77-4.
- [30] MONDAL, M., K. TRIVEDI a S. NIRMAL KUMAR. *The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn., - a review* [online]. 2007, [cit. 2018-08-22]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/267974556_The_silk_proteins_sericin_and_fibroin_in_silkworm_Bombyx_mori_Linn_-_A_review.
- [31] Nurhan ONAR. *Usage Of Biopolymers In Medical Applications* [online]. 2004, [cit. 2019-02-07]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/260745246_Usage_Of_Biopolymers_In_Medical_Applications.

- [32] STREBLOVÁ, Eva. *Souhrnné texty z chemie pro přípravu k přijímacím zkouškám: (přírodovědné obory, lékařství)*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 8024601532.
- [33] HLÚBIK, Pavol a Libuše OPLTOVÁ. *Vitaminy*. Praha: Grada, 2004. ISBN 8024703734.
- [34] KREJČÍ, JIŘÍ. *Kosmetika a kosmetologie*. [online]. Zlín: FAKULTA TECHNOLOGICKÁ UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ [cit. 2018-10-04]. Dostupné z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/Services/Downloader.ashx?id=520&disposition=inline>.
- [35] *Vitamins in cosmetics* [online]. [cit. 2018-09-04]. Dostupné z: http://www.dermaviduals.com/cms/upload/Publikationen_english/mBF-01-11-Vitamine-engl.pdf.
- [36] RIZVI, Saliha, Syed T. RAZA, Faizal AHMAD, Absar AHMAD, Shania ABBAS a Farzana MAHDI. *The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases* [online]. [cit. 2018-09-04]. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997530/>.
- [37] AGERBO, Pia a Hanne F. ANDERSEN. *Vitaminy a minerály pro zdravý život*. Praha: Grada, 1997. ISBN 8071694894; s. 89-93.
- [38] DHIFI, Wissal, Sana BELLILI, Sabrine JAZI, Nada BAHLOUL a Wissem MNIF. *Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review*. *Medicines* [online]. 2016, 3(4) [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.3390/medicines3040025. ISSN 2305-6320. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2305-6320/3/4/25>.
- [39] HARDING, Jennie. *Esenciální oleje od A do Z: všechno, co o nich potřebujete vědět*. Přeložil Eva FUKOVÁ. V Praze: Metafora, 2016. ISBN 9788073595029.
- [40] KREJČÍ, Jiří. *Kosmetické přípravky a prostředky* [online]. [cit. 2018-10-15]. Dostupné z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/EntityDisplayTab.aspx?id=24>.
- [41] DODT, Colleen K. *Éterické a esenciální léčivé oleje: návody a pokyny k výrobě vlastních směsí a olejčků*. Hodkovičky [Praha]: Pragma, 2008. ISBN 9788073491154.
- [42] GERMANN, Gudrun a Peter GERMANN. *Rostliny pro aromaterapii: 90 vonných rostlin, jejich znaky a způsob využití*. Praha: Grada, 2013. ISBN 9788024746722.
- [43] FARRER-HALLS, Gill. *Aromaterapie od A do Z: podrobný průvodce světem esenciálních olejů*. V Praze: Metafora, 2007. ISBN 9788073590864.

- [44] SVÍTEK, Marek. *Pěstujeme citrusy v našich podmínkách*. Praha: Grada, 2006. Česká zahrada. ISBN 8024714132.
- [45] MUKHOPADHYAY, Asim Kumar. *Industrial chemical cresols and downstream derivatives*. New York: Marcel Dekker, c2005. ISBN 9780824759544.
- [46] BAJEROVÁ M., DVOŘÁČKOVÁ K., GAJZIOK J., MASTEIKOVÁ R. a RABIŠKOVÁ M. *Metody přípravy mikročástic ve farmaceutické technologii* [online]. [cit. 2019-02-13]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/272415433_Metody_pripravy_mikrocastic_ve_farmaceuticke_tehnologii.
- [47] VRBKOVÁ, Eva, Eliška VYSKOČILOVÁ a Libor ČERVENÝ. *ENKAPSULACE AROMATICKÝCH LÁTEK DO SFÉRICKÝCH SILIKÁTOVÝCH ČÁSTIC* [online]. [cit. 2019-02-13]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_01_7-13.pdf.
- [48] AKYÜZ, Lalehan, Fatih DUMAN a Murat KAYA. *Encapsulation of Flurbiprofen by Chitosan Using a Spray-Drying Method with In Vitro Drug Releasing and Molecular Docking*. *The Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2017, **14**(1), 34-39 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.4274/tjps.95867. ISSN 1304530X. Dostupné z: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_15530/34-39.pdf.
- [49] PARK, Chan-Eun, Dong-June PARK a Bum-Keun KIM. *Effects of a chitosan coating on properties of retinol-encapsulated zein nanoparticles*. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2015, **24**(5), 1725-1733 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1007/s10068-015-0224-7. ISSN 1226-7708. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10068-015-0224-7>.
- [50] LIANG, Jin, Hua YAN, Xiulan WANG, Yibin ZHOU, Xueling GAO, Pradeep PULIGUNDLA a Xiaochun WAN. *Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems*. *Food Chemistry* [online]. 2017, **231**, 19-24 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.106. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617303072>.

- [51] WANG, Mei, Yuying FU, Guowen CHEN, Yugang SHI, Xiaomeng LI, Hao ZHANG a Yali SHEN. *Fabrication and characterization of carboxymethyl chitosan and tea polyphenols coating on zein nanoparticles to encapsulate β -carotene by anti-solvent precipitation method*. *Food Hydrocolloids* [online]. 2018, **77**, 577-587 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.10.036. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X17309359>.
- [52] ARUNKUMAR, P., S. INDULEKHA, S. VIJAYALAKSHMI a R. SRIVASTAVA. *In vitro comparative studies of Zein nanoparticles and composite Chitosan thermogels based injectable formulation of Doxorubicin*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2017, **40**, 116-124 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1016/j.jddst.2017.05.015. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224717300709>.
- [53] JIANG, Gui-Li a Ming-Jun ZHU. *Preparation of astaxanthin-encapsulated complex with zein and oligochitosan and its application in food processing*. *LWT* [online]. 2019, **106**, 179-185 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.02.055. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643819301513>.
- [54] *Český lékopis* [online]. Praha: Grada Publishing, 1997 [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <http://www.lekopis.cz/>.
- [55] *SIGMA-ALDRICH: Thymol* [online]. [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t0501?lang=en@ion=CZ>.
- [56] *SIGMA-ALDRICH: Tocopherol* [online]. [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t3634?lang=en@ion=CZ>.
- [57] KIM, Chunhee a You-Lo HSIEH. *Wetting and absorbency of nonionic surfactant solutions on cotton fabrics*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2001, **187-188**, 385-397 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/S0927-7757(01)00653-7. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775701006537>.

- [58] PATIST, A., S. S. BHAGWAT, K. W. PENFIELD, P. AIKENS a D. O. SHAH. *On the measurement of critical micelle concentrations of pure and technical-grade nonionic surfactants. Journal of Surfactants and Detergents* [online]. 2000, **3**(1), 53-58 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1007/s11743-000-0113-4. ISSN 1097-3958. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11743-000-0113-4>.
- [59] *Malvern Instrumental* [online]. [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/zetasizer_nanozs_manual.pdf.
- [60] LUO, Yangchao, Boce ZHANG, Monica WHENT, Liangli (Lucy) YU a Qin WANG. *Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2011, **85**(2), 145-152 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.02.020. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776511000981>.
- [61] PASCOLI, Mônica, Renata DE LIMA a Leonardo F. FRACETO. *Zein Nanoparticles and Strategies to Improve Colloidal Stability: A Mini-Review. Frontiers in Chemistry* [online]. 2018, **6** [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.3389/fchem.2018.00006. ISSN 2296-2646. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2018.00006/full>.
- [62] TEIXEIRA, M.C., P. SEVERINO, T. ANDREANI, P. BOONME, A. SANTINI, A.M. SILVA a E.B. SOUTO. D- α -tocopherol nanoemulsions: Size properties, rheological behavior, surface tension, osmolarity and cytotoxicity. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. 2017, **25**(2), 231-235 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.jsps.2016.06.004. ISSN 13190164. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319016416300627>.
- [63] SUKMAWATI, Anita, Wahyu UTAMIL, Ratna YULIANIL, Muhammad DA'IL a Akhmad NAFARIN. *Effect of tween 80 on nanoparticle preparation of modified chitosan for targeted delivery of combination doxorubicin and curcumin analogue* [online]. [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/311/1/012024>.

- [64] ASASUTJARIT, R., C. SORRACHAITAWATWONG, N. TIPCHUWONG a S. POUTHAI. *Effect of formulation compositions on particle size and zeta potential of diclofenac sodium-loaded chitosan nanoparticles* [online]. 2013. [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <https://waset.org/publications/16674/effect-of-formulation-compositions-on-particle-size-and-zeta-potential-of-diclofenac-sodium-loaded-chitosan-nanoparticles>.
- [65] DA ROSA, Cleonice Gonçalves, Matheus Vinicius DE OLIVEIRA BRISOLA MACIEL, Sabrina Matos DE CARVALHO a kol. *Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, **481**, 337-344 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.05.019. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777571530008X>.
- [66] BENEŠ, Jiří, Daniel JIRÁK a František VÍTEK. *Základy lékařské fyziky*. 4. vydání. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 9788024626451.
- [67] TORRES-GINER, Sergio, María José OCIO a José María LAGARON. *Novel antimicrobial ultrathin structures of zein/chitosan blends obtained by electrospinning. Carbohydrate Polymers* [online]. 2009, **77**(2), 261-266 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.12.035. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861709000083>.
- [68] LUO, Yangchao, Zi TENG a Qin WANG. *Development of Zein Nanoparticles Coated with Carboxymethyl Chitosan for Encapsulation and Controlled Release of Vitamin D3. Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, **60**(3), 836-843 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1021/jf204194z. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf20>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CMC	Kritická micelární koncentrace
CMT	Kritická micelární teplota.
CPP	Kritický agregační parametr.
EE	Enkapsulační účinek.
LUV	Velké unilamelární vezikuly.
MLV	Multilamelární vezikuly.
OLV	Oligolamelární vezikuly.
PBS	Fosfátový pufr.
PDI	Polydisperzní index.
PEG	Polyethylenglykol.
PEO	Polyethylenoxid.
PLA	Polyaktid.
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie.
SUV	Malé unilamelární vezikuly.
UV	Ultrafialové záření.
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
v/o	Emulze voda v oleji.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Struktura a) klasické micely v polárním prostředí a b) inverzní micely v nepolárním prostředí [převzato a upraveno; 4].</i>	12
<i>Obr. 2: Solubilizace v micelách v závislosti na hydrofobicitě aktivní látky [2].</i>	13
<i>Obr. 3: Závislost povrchového napětí na koncentraci tenzidu [převzato a upraveno; 7].</i>	14
<i>Obr. 4: Struktura polymerní micely [převzato a upraveno; 12].</i>	16
<i>Obr. 5: Struktura liposomu [13].</i>	17
<i>Obr. 6: Tvorba tenkého lipidového filmu a následná úprava vezikulárních útvarů [převzato a upraveno; 16].</i>	18
<i>Obr. 7: Chemická struktura chitosanu [25].</i>	21
<i>Obr. 8: Skenovací elektronová mikroskopie, a), b) chitosan, c), d) flurbiprofen, e), f) chitosan-flurbiprofen [48].</i>	35
<i>Obr. 9: Chemická struktura thymolu [55].</i>	40
<i>Obr. 10: Chemická struktura tokoferolu [56].</i>	40
<i>Obr. 11: Příprava pracovního roztoku, a) roztok zeinu s přidavkem tokoferolu, b) konečný roztok po přidavku chitosanu a surfaktantu Tween 20 [vlastní zdroj].</i>	42
<i>Obr. 12: Tenziometr pro měření povrchového napětí [vlastní zdroj].</i>	45
<i>Obr. 13: a) Odstředěná vrstva před odpařením, b) mléčně bílý vzorek po odpaření [vlastní zdroj].</i>	46
<i>Obr. 14: Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu Tween 20.</i>	48
<i>Obr. 15: Hodnoty zeta potenciálu v závislosti na koncentraci chitosanu ve směsi.</i>	49
<i>Obr. 16: Hodnoty zeta potenciálu a pH pro kontrolní vzorek.</i>	51
<i>Obr. 17: Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek s obsahem tokoferolu.</i>	51
<i>Obr. 18: Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek s obsahem thymolu.</i>	51
<i>Obr. 19: Vliv přidavku chitosanu a jednotlivých koncentrací tokoferolu na zeta potenciál.</i>	52
<i>Obr. 20: Vliv množství tenzidu na zeta potenciál.</i>	53
<i>Obr. 21: Graf závislosti velikosti částic na zvyšující se koncentraci chitosanu u kontrolních vzorků bez aktivní látky.</i>	54
<i>Obr. 22: Graf závislosti velikosti částic na zvyšující se koncentraci chitosanu u vzorků s thymolem.</i>	54

<i>Obr. 23: Graf závislosti velikosti částic na zvyšující se koncentraci chitosanu u vzorků s tokoferolem.</i>	<i>55</i>
<i>Obr. 24: Závislost velikosti částic na koncentraci aktivní látky a surfaktantu Tween 20. ..</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 25: Srovnání distribučních křivek polymerních roztoků u poměrů zein:chitosan 1:1 a 1:0.</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 26: Sledování stability polymerních roztoků s přidavkem tokoferolu.</i>	<i>58</i>
<i>Obr. 27: Sledování stability polymerních roztoků s přidavkem thymolu.</i>	<i>58</i>
<i>Obr. 28: Závislost velikosti částic na době skladování polymerních roztoků s tokoferolem.</i>	<i>59</i>
<i>Obr. 29: Závislost velikosti částic na době skladování polymerních roztoků s thymolem.</i>	<i>59</i>
<i>Obr. 30: Distribuční křivky velikosti částic vzorku zein:chitosan 10:1 s thymolem.</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 31: Distribuční křivky velikosti částic vzorku zein:chitosan 1:1 s thymolem.</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 32: Distribuční křivky velikosti částic vzorku zein:chitosan 1:1 s tokoferolem.</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 33: Distribuční křivky pro polymerní roztoky 1:0 s přidavkem tokoferolu.</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 34: Distribuční křivky pro polymerní roztoky 1:0 s přidavkem thymolu.</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 35: Vliv aktivní látky na povrchové napětí polymerních roztoků.</i>	<i>64</i>
<i>Obr. 36: Kalibrační přímka pro tokoferol (měřeno při 248 nm).</i>	<i>65</i>
<i>Obr. 37: Kalibrační přímka pro thymol (měřeno při 274 nm).</i>	<i>65</i>
<i>Obr. 38: Enkapsulační účinek polymerních roztoků s přidavkem tokoferolu a thymolu.</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 39: Množství uvolněné aktivní látky na čase.</i>	<i>67</i>
<i>Obr. 40: Polymerní roztok 1:1 s obsahem tokoferolu a) po odlití na misku a b) po vysušení, c) kontrolní vzorek bez aktivní látky po vysušení.</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 41: Mikrostruktura polymerních filmů, a) kontrolní vzorek 7:1; b) vzorek 7:1 + tokoferol; c) vzorek 7:1 + thymol.</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 42: Mikrostruktura polymerních filmů, a) vzorek 10:1 + tokoferol; b) vzorek 5:1 + tokoferol; c) vzorek 1:1 + tokoferol.</i>	<i>69</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Typy micel dle hodnoty CPP [2], [8, s. 42].</i>	15
<i>Tab. 2: Využití chitosanu [27, s. 10].</i>	23
<i>Tab. 3: Doporučené množství vitamínu E v mg na den [36].</i>	28
<i>Tab. 4: Těkavé sloučeniny v esenciálních olejích [38].</i>	30
<i>Tab. 5: Přidávky jednotlivých složek pro přípravu pracovních roztoků.</i>	42
<i>Tab. 6: Naměřené průměrné hodnoty PDI pro 10% tokoferol a 5% Tween 20.</i>	60
<i>Tab. 7: Naměřené průměrné hodnoty PDI pro 10% thymol a 5% Tween 20.</i>	60
<i>Tab. 8: Naměřené průměrné hodnoty zeta potenciálu pro 10% tokoferol a 5% Tween 20.</i>	63
<i>Tab. 9: Naměřené průměrné hodnoty zeta potenciálu pro 10% thymol a 5% Tween 20.</i>	63
<i>Tab. 10: Naměřené hodnoty povrchového napětí pro jednotlivé polymerní roztoky.</i>	64