


Fyzikálně chemické a biologické vlastnosti (nano)částic pro kosmetické aplikace

Dita Moricová

Bakalářská práce
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Dita Moricová**
Osobní číslo: **T17947**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Fyzikálně chemické a biologické vlastnosti (nano)částic pro kosmetické aplikace**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

Vypracujte literární rešerši na zadané téma. Věnujte se především nanočásticím používaným jako sunscreensy v kosmetických přípravcích (ZnO, TiO₂, MBBT). Uveďte metody vhodné pro charakterizaci nanočástic a jejich možných interakcí s biologickými systémy.

II. Praktická část

V praktické části studujte částice TiO₂ (rutil, anatas, jejich směs) s různou velikostí a vybrané komerčně dostupné UV filtry. Proveďte jejich základní charakterizaci a sledujte chování těchto částic v prostředí s různou iontovou silou a různým pH. Výsledky práce zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

Forma zpracování bakalářské práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích
2. Chaudhry, Q., et al. Opinion of the Scientific Committee on Consumer safety (SCCS) – Revision of the opinion on the safety of the use of titanium dioxide, nano form, in cosmetic products. *Regulatory toxicology and pharmacology*. 2015, 73 (2), 669-670
3. Katz, L. M., Dewan, K., Bronaugh, R. L.: Nanotechnology in cosmetics. *Food and Chemical Toxicology*. 2015, 85, 127-137
4. Lu, P. J., Huang, S. C., Chen, Y. P., et al. Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. *Journal of food and drug analysis*. 2015, 23 (3), 587-594

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 20. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Bakalářská práce se věnuje nanočásticím, jejich charakterizaci a využití jako UV filtrů v kosmetice. Během aplikace kosmetických přípravků s nanočásticemi na ochranu proti UV záření, dochází k jejich přímému kontaktu s lidským organismem. Cílem práce tak bylo lépe porozumět chování používaných nano UV filtrů v simulovaných biologických podmínkách. Pro práci byly zvoleny nanočástice TiO_2 a bisoctrizolu, které byly analyzovány ve fyziologických roztocích a simulovaných tělních tekutinách, s různým složením, iontovou silou a hodnotou pH. Pomocí měření rozptylu světla byla pozorována aglomerace nanočástic obou UV filtrů v různých médiích, která závisela na typu částice, ale především na typu a složení jednotlivých médií. Dále byl analyzován i zeta potenciál a fotostabilita zmíněných UV filtrů.

Klíčová slova: nanočástice, oxid titaničitý, bisoctrizol, aglomerace

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with nanoparticles, their characterisation and use as UV filters in cosmetics. During their applications, sunscreens containing these nanoparticles come into direct contact with human body. With the aim for better understanding of behaviour of commonly used nano UV filters under biological conditions, TiO_2 and bisoctrizole nanoparticles were analysed in physiological and simulated body fluids, with different composition, ion strength and pH values. Based on light scattering measurement, the agglomeration of particles in contact with the fluids was observed, depending on type of particles, but mainly on the type and composition of the dispersion media. Furthermore, zeta potential and photostability of TiO_2 and bisoctrizole nanoparticles were analysed as well.

Keywords: nanoparticles, titanium dioxide, bioctrizole, agglomeration

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc., za veškerou její pomoc, ochotu, trpělivost, cenné rady a připomínky i čas, který mé práci věnovala. Další poděkování patří Ing. Janě Pavlačkové, PhD., za pomoc během testování fotostability, paním laborantkám a vědeckým pracovníkům Centra polymerních systémů ve Zlíně, za pomoc s experimentální částí práce a v neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině, která mi studium umožnila a podporovala mě po jeho celou dobu.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 NANOČÁSTICE	11
1.1 SPECIFICKÉ VLASTNOSTI NANOČÁSTIC	11
1.1.1 Velikost nanočástic	11
1.1.2 Stabilita nanočástic	13
1.2 TOXICITA NANOČÁSTIC	14
1.2.1 Mechanismus toxicity nanočástic	14
1.2.2 Průnik nanočástic do organismu	15
1.3 NANOČÁSTICE V KOSMETICE	16
2 NANOČÁSTICE JAKO UV FILTRY	18
2.1 UV ZÁŘENÍ	18
2.1.1 Vliv UV záření na kůži	18
2.2 UV FILTRY	19
2.2.1 Chemické (organické) UV filtry	19
2.2.2 Minerální (anorganické) UV filtry	19
2.2.3 Organické nerozpustné pigmenty	19
2.3 NANOČÁSTICE JAKO UV FILTRY	20
2.3.1 Oxid titaničitý v běžné a nano formě	20
2.3.2 Bisotrizol	21
3 CÍL PRÁCE	24
II PRAKTICKÁ ČÁST	25
4 MATERIÁLY A METODY	26
4.1 POUŽITÉ VZORKY UV FILTRŮ	26
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	26
4.2.1 Použitá disperzní média	26
4.2.2 Použitá chemikálie	26
4.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	27
4.4 PŘÍPRAVA DISPERZNÍCH MEDIÍ	28
4.5 STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC	29
4.5.1 Příprava základní disperze UV filtrů pro analýzu	29
4.5.2 Příprava vzorků pro měření	30
4.5.3 Stanovení velikosti částic metodou DLS	30
4.5.4 Stanovení velikosti částic metodou laserové difrakce	31
4.6 MĚŘENÍ ZETA POTENCIÁLU	32
4.6.1 Příprava disperze UV filtrů pro měření zeta potenciálu	32
4.6.2 Stanovení zeta potenciálu	32

4.7	ANALÝZA FOTOSTABILITY UV FILTRŮ	33
4.7.1	Příprava disperze pro měření fotostability UV filtrů.....	33
4.7.2	Stanovení fotostability UV filtrů.....	33
4.8	STANOVENÍ MORFOLOGIE ČÁSTIC POMOCÍ MIKROSKOPIE	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
5.1	CHARAKTERIZACE TiO ₂	35
5.1.1	SEM.....	35
5.1.2	Stanovení velikosti částic v Di – H ₂ O	36
5.1.3	Stanovení velikosti a stability částic ve fyziologických médiích.....	37
5.1.4	Stanovení velikosti částic v simulovaných gastrointestinálních tekutinách.....	41
5.1.5	Zeta potenciál	47
5.1.6	Fotostabilita.....	48
5.2	CHARAKTERIZACE BISOCTRIZOLU	49
5.2.1	SEM.....	49
5.2.2	Stanovení velikosti částic v Di – H ₂ O	50
5.2.3	Stanovení velikosti částic ve fyziologických médiích.....	54
5.2.4	Stanovení velikosti částic v simulovaných gastrointestinálních tekutinách.....	57
5.2.5	Pozorování aglomerátů simulovaných gastrointestinálních tekutinách.....	61
5.2.6	Zeta potenciál	63
5.2.7	Fotostabilita.....	64
	ZÁVĚR	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	73
	SEZNAM OBRÁZKŮ	75
	SEZNAM TABULEK	77

ÚVOD

Přírodní nanočástice jsou nedílnou součástí organismů i přírody, mohou vznikat například při fotochemických reakcích nebo sopečných erupcích. Lidé se je naučili využívat již před 4500 lety, kdy např. používali přírodní azbestová nanovlákna k vyztužení keramiky [1]. Nanočástice, i když jistě nevědomě, používali rovněž staří Římané při výrobě skla a keramiky. V posledních desetiletích se však do popředí zájmu mnoha oborů dostaly synteticky vyrobené nanočástice, které se využívají pro jejich specifické vlastnosti [2]. Výjimkou není ani kosmetický průmysl a nanočástice se tak staly nedílnou součástí mnoha kosmetických přípravků, v nichž je jejich kontakt s lidským tělem nevyhnutelný. Z tohoto důvodu jsou vyžadovány informace o jejich fyzikálně chemických a biologických vlastnostech, včetně toxicity a chování za fyziologických podmínek. Cílem této práce je proto charakterizace některých základních vlastností nanočástic komerčně používaných v kosmetických formulacích, včetně jejich praktického stanovení, a to především se zaměřením na nanočástice používané v přípravcích na ochranu kůže před nepříznivými účinky UV záření.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NANOČÁSTICE

Předpona „nano“ značí mocninu 10^{-9} . V případě nanočástic se vztahuje k jedné ze základních jednotek soustavy SI, délce, a představuje tak jednu miliardtinu metru. Definice nanočástic se obvykle vztahuje k jednotlivým materiálům a oblastem jejich použití, proto je jedinou vyčerpávající definicí, která by zahrnovala všechny nanomateriály obtížné formulovat [3]. Obecně jsou v literatuře za nanočástice označovány částice alespoň s jedním vnějším rozměrem od 1 do 100 nm [1], což je platné i pro nanočástice používané v kosmetice [4].

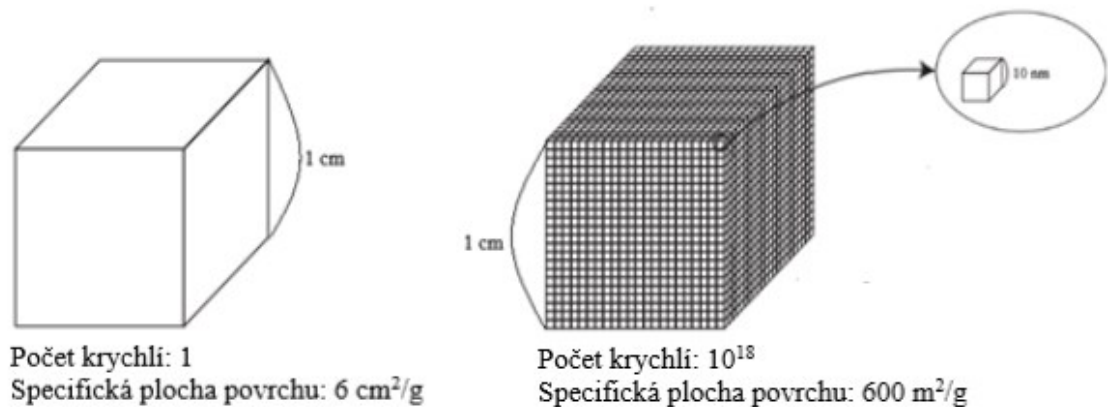
Látky a chemické materiály složené z nanočástic jsou označovány jako nanomateriály. Doporučení Evropské komise 2011/696/EU definuje nanomateriál následovně „*Nanomateriálem se rozumí přírodní materiál, materiál vzniklý jako vedlejší produkt nebo materiál vyrobený obsahující částice v nesusloučeném stavu nebo jako agregát či aglomerát, ve kterém je u 50 % nebo více částic ve velikostním rozdělení jeden nebo více vnějších rozměrů v rozmezí velikosti 1–100 nm*“ [5].

1.1 Specifické vlastnosti nanočástic

Charakteristickým rysem nanočástic je, že nejsou pouhou zmenšeninou svých makro forem, ale mají zcela specifické a odlišné vlastnosti [3].

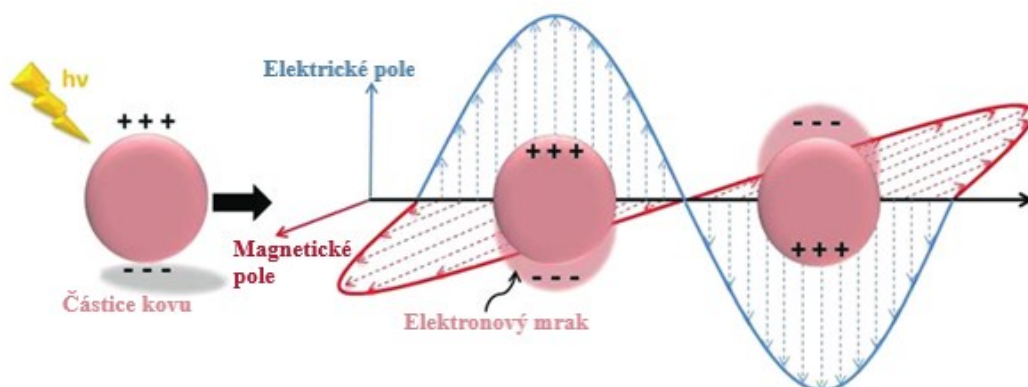
1.1.1 Velikost nanočástic

Samotná velikost nanočástic je jejich zásadním parametrem. Se zmenšujícími se rozměry dochází ke zvyšování specifického povrchu částic (plocha povrchu pevné látky, vztažená na jednotku hmotnosti) a tím se zásadně mění poměr plochy povrchu k objemu částice. Důsledkem této skutečnosti je přítomnost většího procenta atomů a molekul na povrchu nanočástice, které vzhledem ke své větší aktivitě vedou ke snadnějším vazebným interakcím s okolím a způsobují tak například vyšší reakční rychlost chemických reakcí [6].



Obrázek 1 Nárůst specifické plochy povrchu se zmenšenou velikostí při zachování stejného celkového objemu, upraveno podle [3]

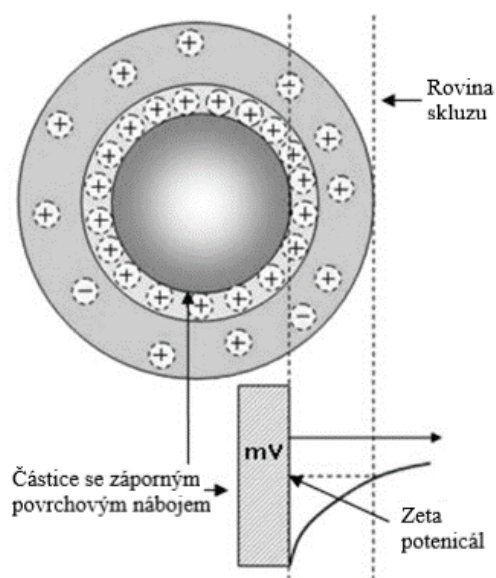
V závislosti na velikosti dochází také ke změně optických vlastností nanočástic, jako je například schopnost odrazu, či absorpce světla [7]. V případě zlatých nanočástic velikosti 15 nm se uvádí, že k maximální absorpci světla dochází při vlnové délce 525 nm, zatímco u nanočástic velikosti 45 nm při hodnotě vlnové délky 575 nm [3]. U kovových nanočástic je do tohoto jevu zapojena tzv. povrchová plasmonová rezonance. Když je kovová částice vystavena světlu, indukuje elektromagnetické pole světla kolektivní koherentní oscilaci volných elektronů kovu (elektrony pásma vodivosti). Tato elektronová oscilace kolem povrchu částice způsobuje vytvoření indukovaného dipólu. Na jedné straně kovové nanočástice se vytvoří záporný náboj, zatímco na druhé kladný, což vede ke koherentní oscilaci těchto elektronů ve směru elektrického pole světla. Ke zvýšené absorpci dochází, pokud je frekvence elektromagnetického záření světla shodná s frekvencí plasmonové rezonance [8], [9].



Obrázek 2 Schéma povrchové plasmonové rezonance částice kovu, upraveno podle [9]

1.1.2 Stabilita nanočástic

Nanočástice se v kosmetických aplikacích často vyskytují ve formě suspenzí, které mohou podléhat různým formám nestability, jako je aglomerace. U suspenzí s částicemi o velikosti do 1 μm má na aglomeraci podstatný vliv Brownův pohyb. Díky němu dochází k neustálým srážkám mezi částicemi, což spolu s působením přitažlivých Van der Waalsových sil může vést ke vzniku podstatně větších částic. Na tyto sekundárně vzniklé částice pak významně působí gravitace, která přispívá k jejich dalšímu usazování (sedimentaci). Tomuto nežádoucímu jevu se dá zabránit např. zavedením náboje na povrch částice [10]. Povrch nabité nanočástice tak obklopí pevně vázaná tenká vrstva iontů opačného náboje a vytvoří tzv. Sternovu vrstvu. Tu obklopí další vrstva volněji asociovaných iontů, které jsou ale stále vázané k povrchu částice a následují ji při pohybu. Tyto vrstvy vytvoří tzv. elektrickou dvojrstvu, která je ohraničena rovinou skluzu, za kterou ionty již částici nenásledují [11], [12].



Obrázek 3 Schéma elektrické dvojrstvy částice v kapalině, upraveno podle [11]

Potenciálový rozdíl mezi vrstvou protiiontů na povrchu částice a kompaktní, difúzní částí elektrické dvojrstvy se označuje jako zeta, případně elektrokinetický potenciál. Jeho jednotkou jsou milivolty [mV] a závisí na pH a iontové síle disperzní fáze, ve které se nanočástice pohybují. Dobře jde tento jev vidět na příkladu nanočástice v prostředí s negativním zeta potenciálem. Po přidání zásady dojde k zvýšení záporného náboje částice. Naopak po přidání kyseliny dojde k neutralizaci záporného náboje, a při jejím dostatečném přídavku až k vytvoření náboje kladného. Jinými slovy u nanočástice vystavené alkalickému

prostředí dosahuje zeta potenciál záporných hodnot, zatímco v kyselém prostředí kladných [13]. Hodnota pH, při které jsou náboje v rovnováze se nazývá izoelektrický bod. Obecně jsou suspenze se zeta potenciálem v intervalu od +30 mV do -30 mV považovány za nestabilní, protože odpuzování nanočástic při těchto hodnotách není dostatečné [10]. Zeta potenciál je tedy důležitou veličinou, která slouží k hodnocení a stability disperzních soustav a jeho znalost může rovněž pomoci např. při jejich formulaci a výrobě.

Stabilizaci systému nanočástice-kapalina lze také dosáhnout pomocí zavedení sterické bariéry. Při sterické stabilizaci se adsorpcí molekul (často jsou to povrchově aktivní látky nebo polymery současně rozpustné v disperzním prostředí) na povrchu nanočástic zvýší osmotické odpudivé síly, které zvyšují stabilitu nano systémů [11].

1.2 Toxicita nanočástic

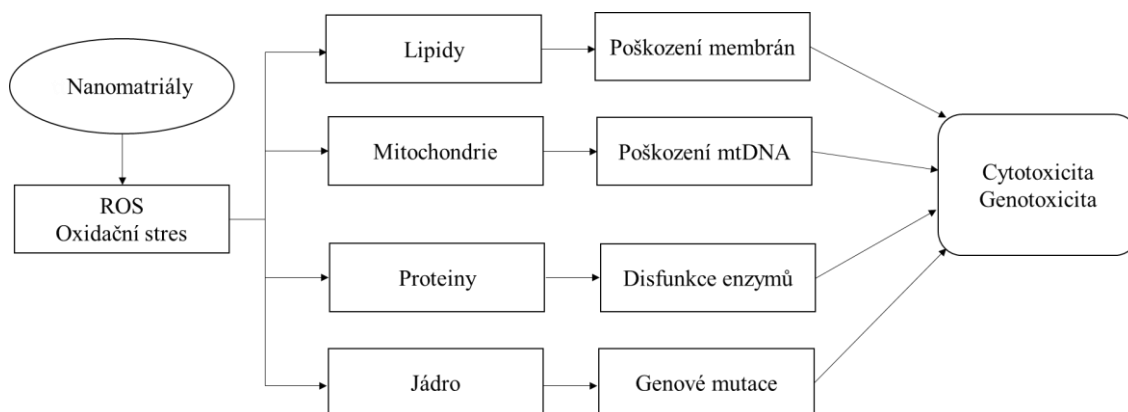
Ačkoli jedinečné vlastnosti nanomateriálů vyústily v exponenciální nárůst jejich použití, informace o jejich toxicitě stále nejsou dostatečné. Základní překážkou na tomto poli výzkumu je velké množství druhů nanočástic a široká variabilita jejich vlastností. Mnoho synteticky připravených nanomateriálů obsažených v komerčních produktech je součástí našeho každodenního života. Například nanočástice oxidu titaničitého jsou jedny z nejčastěji používaných nanočástic a setkáváme se s nimi nejen v kosmetických přípravcích, ale i jako s přísadou v potravinářském průmyslu. V těchto i jiných aplikacích dochází k přímému styku nanočástic s organismem, a jejich možnému průniku do něj. Proto je důležité porozumět interakcím nanočástic s biologickými systémy a předcházet tak možnému nebezpečí [14]. Je ale třeba také zmínit, že každý nanomateriál před svým použitím musí projít testy a být schválen. Řada nanomateriálů se jeví jako netoxických, a další mají dokonce pozitivní účinek na zdraví [1].

1.2.1 Mechanismus toxicity nanočástic

Rozmanitost nanočástic a jejich vlastností je příčinou různých mechanismů jejich toxicity. Nevratné poškození buněk organismů může být u některých druhů nanočástic způsobeno jejich elektrostatickým nábojem, nebo poškozením buněčných organel při penetraci nanočástice do buňky [1]. Převládajícím mechanismem nanotoxicity je však nadměrná tvorba reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS) [14].

Vznik ROS v organismu je součástí přirozeného biologického procesu v buňkách, který se děje v mitochondriích při syntéze ATP redukcí molekul kyslíku na vodu. Malé procento

kyslíku se během tohoto procesu nezredukuje zcela, což má za následek vznik superoxidových a následně i dalších radikálů s obsahem kyslíku (např. hydroxylových radikálů a singletového kyslíku) a hydrogen peroxidu. ROS mají v organismech pozitivní fyziologický vliv na buněčné signální systémy. Nadprodukce ROS způsobená nanočásticemi, ať už přímo, nebo nepřímo ovšem vyvolává oxidační stres, jehož výsledkem je neschopnost buňky udržovat normální fyziologické funkce. Defekt této buněčné funkce způsobuje oxidativní modifikace proteinů, iniciaci peroxidace lipidů, porušení řetězců DNA, modifikaci nukleových kyselin, modulaci genové exprese aktivací redoxně-senzitivních transkripčních faktorů a modulaci zánětlivých odpovědí prostřednictvím signální transdukce, což vede ke genotoxickým účinkům a buněčné smrti [14].



Obrázek 4 Vlivy ROS na buňku, upraveno podle [14]

1.2.2 Průnik nanočástic do organismu

Malé rozměry umožňují nanočásticím procházet buněčnými membránami a dalšími biologickými bariérami, což vede k jejich snadnějšímu vstřebávání do živých organismů, kde mohou způsobit buněčnou disfunkci. Nanočástic mohou do organismu pronikat různými cestami, a to vdechnutím, požitím nebo průnikem přes kůži [15][16].

Průnik dýchací soustavou

Inhalace je jedním z hlavních možných vstupů nanočástic do organismu. Malé nanočástice mohou překonat ochranný systém lidského těla ve formě bronchiálního epitelu a mukociliárního systému plic. V závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, koncentraci a velikosti mohou v takovémto případě vyvolat různá onemocnění, například astma nebo plicní emfyzém. Nanočástice, které se do těla dostanou vdechnutím, mohou dále pronikat do krevního řečiště a odtud do dalších míst lidského těla, včetně jater a ledvin [16]. Na základě *in vivo* studií, lze však tuto migraci nanočástic označit jako málo

pravděpodobnou, kdy naprostá většina škodlivých účinků po inhalaci nanočástic byla pozorována v dýchacích cestách použitých zvířat [16].

Průnik gastrointestinálním traktem

Požítí potravin, vody, či balzámu na rty s nanočásticemi ale také vykašlaného plicního hlenu kontaminovaného nanočásticemi vede k přítomnosti nanočástic v gastrointestinálním traktu (GIT). Vstupní branou pro nanočástice může být i tzv. kontakt z ruky do úst (po aplikaci krému s nanočásticemi na ruce). Pokud dojde k překonání ochranné funkce epitelových tkání GIT a hlenu v žaludku, nanočástice mohou proniknout až do žaludečních a dalších sousedních tkání, což může mít značné negativní účinky. Literatura například uvádí, že oxidační stres vyvolaný požitím nano TiO_2 může vést k poškození membrán buněk žláz trávicí soustavy [15].

Průnik kůží

Hojný výskyt nanočástic v přípravcích určených pro dermální aplikaci jako jsou léky, krémy a obecně kosmetické přípravky, činí z kůže časté vstupní místo nanočástic do lidského organismu. Transport nanočástic do hlubších vrstev kůže může probíhat přes přímou absorpci z korneocytů, vlasovými folikuly, nebo poškozenou kůží. Přímé potenciální negativní účinky zahrnují podráždění kůže a alergii. Závažnost těchto projevů závisí na množství proniklých nanočástic, jejich fyzikálně-chemické vlastnostech, době expozice a jejich velikosti. Zatímco nanočástice o velikosti 4 nm a méně jsou schopny proniknout do neporušené kůže, k absorpci větších částic dochází pouze přes porušenou kožní bariéru a prostup částice větší než 45 nm kožní cestou vůbec neprobíhá [15].

1.3 Nanočástice v kosmetice

Zákazníci dnes od svých kosmetických přípravků (KP) očekávají efektivní péči s vysokým účinkem. Kosmetický průmysl se tak stále snaží přicházet s inovacemi, které by tyto požadavky naplnily. Jednou z cest je i použití nanomateriálů, jež často vykazují žádané vlastnosti a mnohdy jsou díky unikátním vlastnostem nanočástic účinnější než makroskopické formy stejného materiálu [17].

Vzhledem k potenciálnímu zdravotnímu riziku spojenému s toxicitou nanočástic a také kvůli transparentnosti trhu je nutné uvést obsah nanočástic na etiketě KP. Požadavky na označování (notifikaci) nanočástic v KP v EU upravuje článek 19 Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích, kde je řečeno, že všechny

obsažené přísady ve formě nanomateriálu musí být jasně uvedeny na seznamu přísad a za názvy těchto přísad musí být uvedeno slovo "nano" v závorkách [4]. Tímto způsobem jsou spotřebitelé informováni o složení přípravku a mohou se kvalifikovaně rozhodnout, zda jej zakoupí.

Evropská komise od července roku 2017 také zveřejňuje katalog nanomateriálů používaných v KP v EU. Katalog je pravidelně aktualizován a verze ze dne 31. 12. 2018 obsahuje 29 nanomateriálů: 3 pigmenty, 4 UV filtry a 22 nanomateriálů s jinou funkcí v KP. Fakticky je zde uvedeno 27 nanomateriálů, TiO_2 a ZnO jsou zde zařazeny dvakrát, jednou jako pigmenty a podruhé jako UV filtry. Katalog má pouze informativní funkci a není výslovně seznamem autorizovaných nanomateriálů [18].

Z výše uvedených informací vyplývá, že v KP se za různým účelem používá celá řada nanomateriálů. Vzhledem k náplni praktické části práce je dále rozebrána pouze jejich role ve formě UV filtrů.

2 NANOČÁSTICE JAKO UV FILTRY

2.1 UV záření

Sluneční záření, které dopadá na zemský povrch je tvořeno širokým spektrem vlnových délek. Kolem 50 % je tvořeno viditelným zářením, 45 % infračerveným zářením a 5 % tvoří ultrafialové záření. V lidské kůži způsobuje právě poslední jmenovaná část slunečního záření biologické a metabolické reakce mnohem snadněji než jiné komponenty slunečního světla. Jako ultrafialové záření je označováno elektromagnetické záření o vlnové délce mezi 100 a 400 nm. Důležitým zdrojem těchto paprsků je slunce, ale emitují je například i xenonové a rtuťové výbojky, které se využívají k léčebným účelům, či dezinfekci místností. Běžně je oblast UV záření dělena do tří oblastí: UVC (100–290 nm), UVB (290–320 nm) a UVA (320–400 nm). V některé literatuře je však možné setkat se i s podrobnějším dělením UVA oblasti na UVA-2 (320–340 nm) a UVA-1 (340–400 nm) [16], [19], [20].

2.1.1 Vliv UV záření na kůži

UVC záření je absorbováno ozónovou vrstvou atmosféry, a tak mají z hlediska vlivu UV záření na lidský organismus bezprostřední význam hlavně UVA a UVB paprsky. Ty jsou schopné pronikat několik desetin milimetru do kůže, v závislosti na jejich vlnové délce. UVA část spektra prostupuje hlouběji do *dermis* a je zodpovědná za destrukci kolagenu a elastinu, čímž se podílí na předčasném stárnutí kůže. Tvorbou radikálů nepřímo přispívá k poškození DNA buněk pokožky, které může vést až k nádorovému onemocnění kůže. I UVB záření se podílí na vzniku kožních nádorů. Už od roku 1992 Světová zdravotnická organizace klasifikovala UVA i UVB záření jako lidské karcinogeny. UVB paprsky sice nepronikají tak hluboko do škáry, ale mají vyšší energii než paprsky UVA a z převážné části zodpovídají za vyvolání erytému [19]. Je však důležité zmínit i prospěšné efekty UV záření; například přeměna 7-dehydrocholesterolu na provitamin D₃ a jeho následná termální izomerace na aktivní formu je vyvolána zářením o vlnové délce 320 nm. Podstatnými faktory ovlivňující vliv UV záření na kůži jsou také doba a frekvence expozice a fototyp jedince. Například k produkci dostatečného množství vitamínu D postačí vystavit se slunečnímu záření po dobu několika desítek minut týdně. Ochrana kůže před nadměrnou expozicí UV zářením, je tedy nezbytná [16][19].

2.2 UV filtry

UV filtry jsou aktivními složkami přípravků na ochranu pokožky před nepříznivými účinky UV záření. V Evropské unii je podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích „*filtrem ultrafialového záření látka, která je výhradně nebo převážně určena k ochraně kůže před určitým ultrafialovým zářením prostřednictvím absorpce, odrazu nebo rozptýlení tohoto záření*“ [4]. Na základě mechanismu působení lze UV filtry rozdělit do tří skupin: UV filtry chemické (organické), UV filtry minerální (anorganické) a organické nerozpustné pigmenty [19]. Posledně zmiňované bývají často řazeny pod chemické UV filtry. Vzhledem k jejich vlastnostem a mechanismu působení, je však vhodné jejich vyčlenění do samostatné skupiny, jak je tomu například v citované literatuře.

2.2.1 Chemické (organické) UV filtry

Chemické UV filtry fungují na principu absorpce UV záření. Pohlčená energie je přeměněna na teplo, nebo předána do chemických vazeb UV filtru, čímž dochází ke změně struktury jeho molekuly. Tento proces paradoxně často vede k jejich nestabilitě na světle, poklesu schopnosti absorpce, či nárůstu fotoalergizujících vlastností. K získání ochranného efektu je také nutná aplikace UV filtru 20 až 30 minut před vlastní sluneční expozicí, ochranný účinek organických UV filtrů se totiž projevuje až po vstřebání do pokožky. U některých typů sloučenin např. benzofenonů, však může dojít ke vstřebání až do krevního oběhu, kde mohou způsobit změnu hladiny pohlavních hormonů. Chemické UV filtry jsou také málokdy účinné v celém spektru UVA i UVB záření [19][21].

2.2.2 Minerální (anorganické) UV filtry

Minerální UV filtry jsou obecně oxidy kovů, které odrážejí a rozptylují UV záření. Často jsou také označovány jako fyzikální blokátory. Na rozdíl od organických UV filtrů nebyl u čistých anorganických UV filtrů zaznamenán alergenní potenciál. Vyznačující se také vysokou tepelnou- a fotostabilitou a působí v širokém spektru UVA i UVB záření. Kůži chrání ihned po nanesení a dosažená účinnost fotoprotekce závisí na velikosti a rozptýlení částic UV filtru [19]. Povolnými minerálními UV filtry v EU jsou TiO_2 a ZnO [4].

2.2.3 Organické nerozpustné pigmenty

Organické nerozpustné pigmenty tvoří novou skupinu UV filtrů. Při ochraně kůže využívají všechny tři typy mechanismů absorpci, rozptyl i odraz UV záření. Fungují tedy jako

chemický filtr i fyzikální blokátor. Zajišťují širokou fotoprotekci před UVB i UVA částí záření a bývají fotostabilní. V komerčních přípravcích na ochranu kůže proti UV záření se lze zatím setkat s pouze jednou látkou z této skupiny; bisoctrizolem [19]. Vzhledem k žádoucím vlastnostem se však jedná o perspektivní typ UV filtrů.

2.3 Nanočástice jako UV filtry

Díky velkému poměru specifické plochy povrchu k objemu částice má široká škála nanočástic schopnost absorbovat a rozptylovat UV záření [20]. Nanomateriály tak našly uplatnění v kosmetickém průmyslu jako UV filtry. Využití některých již dříve používaných UV filtrů v jejich nanoformě vede k rozšíření oblasti UV spektra, ve kterém poskytují ochranu proti UV paprskům [22]. Použitím nano UV filtru namísto makro formy stejné látky je také možné eliminovat některé její nepříznivé vlastnosti, například tvorbu bílého filmu po nanesení u TiO_2 [23]. Přípravky na ochranu kůže proti UV záření jsou tak pro zákazníka atraktivnější a více je používá. Aplikace nano UV filtrů má však také svá rizika, a to možnou snadnější penetraci nanočástic do organismu nebo potenciální fotokatalytickou aktivitu [19]. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 v příloze VI jako UV filtry povoluje použití 4 nano UV filtrů: TiO_2 , ZnO , Methylen bis-Benzotriazolyl Tetra methylbutylphenol a tris-Biphenzyl Triazin [4].



Obrázek 5 Rozdílný vzhled po aplikaci přípravku s nanočásticemi ZnO (levá část obličeje) a přípravku s ne-nano ZnO částicemi (pravá část obličeje), bráno z pohledu čtenáře, upraveno podle [23]

2.3.1 Oxid titaničitý v běžné a nano formě

Oxid titaničitý se v přírodě vyskytuje ve třech různých formách, které se od sebe liší krystalickou strukturou [16]. Jako UV filtry se používají pouze dvě z nich, a to anatas a

rutil [22]. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 stanovuje maximální povolenou koncentraci TiO_2 v KP na 25 % (w/w) [4]. Nevýhodou přípravků s TiO_2 je zanechání bílého neprůhledné filmu na pokožce po jejich aplikaci. Neprůhlednost je způsobena vysokou hodnotou indexu lomu, kvůli kterému dochází k rozptylu viditelného světla. Tato vlastnost je u přípravků na ochranu proti slunečnímu záření ze spotřebitelského hlediska značně nežádoucí. Tento problém řeší použití nano formy. Zmenšením velikosti částic TiO_2 do nano oblasti, nedosahují částice dostatečné velikosti potřebné pro optimální rozptyl viditelného záření, paprsky viditelného světla jsou propouštěny a nanočástice se tak lidskému oku jeví jako průhledné. Nano rozměry výrazně zvyšují množství povrchových molekul částic TiO_2 , a tímto získaná vysoká specifická plocha povrchu spolu s malou velikostí částice má pak za následek pohlcení většího množství UVB záření, ale snižuje schopnost absorpce nano TiO_2 v UVA oblasti. Proto je žádoucí kombinovat nano TiO_2 s jiným UV filtrem, který tuto část spektra pokrývá. Další nežádoucí vlastností nanočástic TiO_2 je také jejich zvýšená fotokatalytická aktivita [16]. Vzhledem k potenciálním rizikům, které s sebou přináší použití nanomateriálů Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 rovněž oproti TiO_2 v makro formě uvádí další požadavky na nano TiO_2 . Pokud je TiO_2 v KP ve formě nanočástic, jeho čistota musí být ≥ 99 %. Dále je povoleno jeho použití pouze ve formě rutilu, nebo rutilu s nejvýše 5 % anatasu. Nanočástice TiO_2 musí být rovněž v konečném složení KP fotostabilní. Zvýšenou fotokatalytickou aktivitu je možno částečně eliminovat vhodnou úpravou povrchu nanočástice, ale i zde zmíněné Nařízení uvádí omezení. K úpravám mohou být použity jen některé materiály, jako například silikon, glycerin nebo dimetikon a fotokatalytická aktivita musí být ≤ 10 % ve srovnání s odpovídajícím neobaleným referenčním materiálem. Nano TiO_2 by také mělo vykazovat krystalickou strukturu s fyzickým vzhledem kulovitého, jehličkovitého nebo kopinatého tvaru. Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 by střední velikost částic, na základě velikostního rozdělení částic měla být větší, nebo rovna 30 nm, poměr stran by měl být od 1 do 4,5 a povrchová plocha daná objemem by měla dosahovat hodnot $\leq 460 \text{ m}^2/\text{cm}^3$. Nano TiO_2 se také vůbec nesmí používat v aplikacích, při kterých hrozí jejich vdechnutí spotřebitelem [4].

2.3.2 Bisotrizol

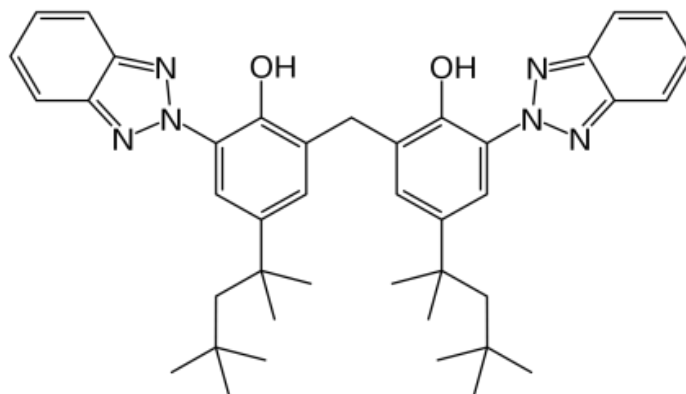
Tento nedávno schválený UV filtr, známý také pod chemickým názvem Methylen bis-Benzotriazolyl Tetra methylbutylphenol, či zkratkou MBBT, patří mezi organické nerozpustné pigmenty. Po aplikaci na kůži vytváří ochranný film, který rozptyluje, odráží

a absorbuje UVA i UVB záření [19]. V KP je jeho maximální povolená koncentrace 10 % (w/w) [4]. Výrobu nanočástic MBBT mletím je z technologických důvodů nutné provádět v deionizované vodě. Nano UV filtr je komerčně dostupný ve formě disperze, a ne prášku, jak je tomu v případě nano TiO₂. Typické složení komerčně dostupné disperze pro přímé použití v KP je uvedeno v Tabulce 1. Bisotrizol se dá také bez větších problémů kombinovat s jinými UV filtry. Ať už ke zlepšení jejich stability, či účinnosti. Často je z těchto důvodů párován s avobenzonem [22]. Použití nano formy bisotrizolu v KP je dále omezeno Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009, kde se uvádí, že minimální čistota použitého nanomateriálu musí být alespoň 98,5 % a podíl izomeru 2,2'-metylenbis[6-(2Hbenzotriazol-2-yl)-4-(isooktyl)fenolu] nesmí překročit 1,5 %. Dále by rozpustnost nano MBBT ve vodě při teplotě 25 °C neměla přesáhnout 5 ng/l a rozdělovací koeficient voda-oktanol by měl při stejné teplotě dosahovat hodnoty 12,7. Nanočástice bisotrizolu, by také měly být bez obalu [4].

Tabulka 1 Typické složení disperze UV filtru nano MBBT, upraveno podle [24]

Název ingredience	Hmotnostní zlomek [%]	Funkce v disperzi
MBBT	46,0–55,0	UV filtr
Destilovaná voda	40,0–42,0	Vehikulum
Decylglukosid	6,0–10,0	Dispergační činidlo
Propylenglykol	0,2–0,6	Smáčedlo
Xantanová guma	0,1–0,5	Stabilizátor, brání sedimentaci částic

Vzhledem k fenolické struktuře přítomné bisotrizolu, se nabízí otázka možné interakce s endokrinními receptory. Ta je oproti několika dalším aktivním látkám na ochranu proti slunečnímu záření u MBBT značně nepravděpodobná, vzhledem k značné velikosti molekuly. Změna hladiny pohlavních hormonů vlivem bisotrizolu nebyla dosud prokázána [22]. Ve studiích *in vivo* nebyly zjištěny také žádné alergizující vlastnosti této látky na lidskou kůži. Kontaktní dermatitidu může u citlivých jedinců způsobit obsah xantanové gumy nikoliv MBBT [22].



Obrázek 6 Chemická struktura molekuly bisoctrizolu, upraveno podle [24]

3 CÍL PRÁCE

V teoretické části bakalářské práce bylo cílem vypracovat literární rešerši na téma nanočástice, jejich vlastnosti a využití jako UV filtrů v kosmetických přípravcích. Praktická část práce pak měla za cíl charakterizovat vhodnou metodikou vlastností konkrétních nanomateriálů používaných k těmto účelům a tyto výsledky vhodně vyhodnotit a diskutovat. Konkrétně byly v práci studovány nanočástice oxidu titaničitého a bisoctrizolu, které jsou legislativou povoleny pro užití v kosmetických přípravcích určených na ochranu proti UV záření.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Použité vzorky UV filtrů

Tabulka 2 Přehled použitých UV filtrů

Název	Materiál	Distributor/výrobce	Forma
Anatas	Oxid titaničitý	Sigma-Aldrich	Prášková
PARSOL® Max	Bisoctrizol	DSM	Disperze
Tinosorb® M	Bisoctrirol	BASF	Disperze

4.2 Použité chemikálie a roztoky

4.2.1 Použitá disperzní média

- Demineralizovaná voda (Di – H₂O)
- Fosfátem pufovaný fyziologický roztok – PBS
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) bez séra
- DMEM s 10% telecím sérem
- Simulované sliny
- Simulovaná žaludeční tekutina (SGF)
- Simulovaná žaludeční tekutina s pepsinem
- Simulovaná střevní tekutina (SIF)
- Simulovaná střevní tekutina s pankreatinem

4.2.2 Použité chemikálie

Všechny chemikálie, pokud u nich není napsáno jinak byly zakoupeny u Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, nebo Penta Ing. Petr Švec, Česká republika.

- Dusičnan sodný (NaNO₃)
- Uhličitan draselný (K₂CO₃)
- Chlorid sodný (NaCl)
- Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃)

- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)
- 1M kyselina chlorovodíková (HCl)
- 1M hydroxid sodný (NaOH)
- 0,2M hydroxid sodný
- Glycerol
- Pankreatin (Sigma Aldrich)
- Pepsin (Sigma Aldrich)

4.3 Použité přístroje, zařízení a pomůcky

- Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Ltd., UK)
- Laserový analyzátor velikosti částic Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Ltd. UK)
- Kyveta typ DTS1070 (Malvern Instruments, Ltd, UK)
- Analytické váhy AS 220.R2 (RADWAG, Polsko)
- Sonikátor UP400S (Hielscher, Německo)
- Solární simulátor SunTray Suntest CPS+ (Agilent Technologies, USA)
- Spektrofotometer UV-VIS Cary 100 (Agilent Technologies, USA)
- PMMA destička (HELIOSCREEN, Francie)
- Optický mikroskop (Olympus IX51, Japonsko)
- Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)
- Přenosný pH metr CPH 51 (Eleca, Česká republika)
- Elektronový mikroskop Phenom Pro (ThermoFisher Scientific, USA)
- Injekční stříkačky Omnifix 0,01–1 ml (BRAUN, Německo)
- Běžné laboratorní pomůcky a plasty

4.4 Příprava disperzních medií

Pro bakalářskou práci byly jako disperzní média použity jednak připravené simulované tělní tekutiny a roztoky s adjustovaným pH a jednak komerčně dostupná disperzní média používaná pro biologické testy, a to PBS, DMEM bez séra a DMEM s 10% telecím sérem.

Příprava roztoků s adjustovaným pH

Pro stanovení závislosti hodnot zeta potenciálu na pH bylo připraveno celkem deset roztoků s hodnotami pH v intervalu 1 až 10, které byly použity jako disperzní média. Při přípravě těchto roztoků bylo vždy 100 ml demineralizované vody adjustováno přidavkem 1M HCl a 1M NaOH až na požadovanou hodnotu pH, která byla kontrolována pH metrem.

Příprava simulovaných tělních tekutin

V rámci experimentu byly připraveny i některé simulované tělní tekutiny. Jak již bylo zmíněno, gastrointestinální trakt je jednou z možných bran průniku nanočástic do lidského organismu. Proto byly připraveny simulované tekutiny, kterým mohou být nanočástice touto cestou vystaveny: sliny, žaludeční tekutina bez a s přítomností pepsinu a střevní tekutina bez a s pankreatinem. Složení jednotlivých simulovaných tělních tekutin spolu s příslušným množstvím jednotlivých složek je uvedeno v Tabulce 3. Samotná příprava spočívala v navážení, nebo napipetování příslušných množství daných surovin, a jejich následném rozpuštění a doplnění Di – H₂O na objem 1 l. Poté byla pH metrem ověřena hodnota pH připravených tělních tekutin. Pokud neodpovídala požadované hodnotě (Tabulka 3), bylo pH na tuto hodnotu upraveno přidavkem 1M NaOH nebo 1M HCl.

Tabulka 3 Složení simulovaných tělních tekutin

Simulovaná tělní tekutina	Složení	pH
Sliny	0,03 g NaNO ₃ 0,02 g K ₂ CO ₃ 0,50 g NaCl 4,20 g NaHCO ₃ Di – H ₂ O doplnit na objem 1 l	6,8
Žaludeční tekutina	2,00 g NaCl 80 ml 1M HCl Di – H ₂ O doplnit na objem 1 l	1,2
Žaludeční tekutina s pepsinem	2,00 g NaCl 80 ml 1M HCl 3,20 g pepsinu Di – H ₂ O doplnit na objem 1 l	1,2
Střevní tekutina	6,8 g KH ₂ PO ₄ 77 ml 0,2M NaOH Di – H ₂ O doplnit na objem 1 l	6,8
Střevní tekutina s pankreatinem	6,8 g KH ₂ PO ₄ 77 ml 0,2M NaOH 10 g pankreatinu Di – H ₂ O doplnit na objem 1 l	6,8

4.5 Stanovení velikosti částic

4.5.1 Příprava základní disperze UV filtrů pro analýzu

Navážením 0,05 g jednotlivých UV filtrů a jejich dispergací v 10 ml demineralizované vody byly připraveny základní disperze těchto vzorků. Pro další analýzu bylo nutné základní disperze důkladně homogenizovat, aby se co nejvíce omezil vliv možné aglomerace částic způsobené skladováním. Vzniklé disperze byly proto sonikovány pomocí sonikátoru UP400S za konstantního chlazení v ledové lázni. Zatímco základní disperze obsahující kapalné vzorky PARSOL® Max a Tinosorb® M byly sonikovány 2 minuty, disperze obsahující vzorek TiO₂ anatas byla sonikována po dobu 30 minut. Důvodem byla prášková konzistence tohoto vzorku. Všechny základní disperze byly sonikovány při maximální

amplitudě. Tato homogenizace základních disperzí byla prováděna před jejich každým použitím.

4.5.2 Příprava vzorků pro měření

Stanovení velikosti částic UV filtrů v různých disperzních médiích ať už metodou dynamického rozptylu světla (DLS), či Laserové difrakce (LD), probíhalo ve zředěné disperzi obsahující vždy 1 ml určitého disperzního média a 20 μ l základní disperze daného UV filtru. Tato zředěná disperze byla připravena pipetováním daných objemů automatickou pipetou s následnou homogenizací. Velikost částic byla měřena ihned po přípravě každé disperze a pro stanovení závislosti velikosti částic na čase dále v definovaných časových intervalech (20, 40, 60, 80, 100 minut) po přípravě.

4.5.3 Stanovení velikosti částic metodou DLS

Pro měření velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla (DLS) je základní podmínkou již zmíněný Brownův pohyb, tedy náhodný neustálý pohyb částic v kapalném nebo plynném médiu [25]. Ten způsobuje časově závislé fluktuace v intenzitě rozptýleného světla částicemi a vyhodnocením těchto fluktuací lze získat průměrnou velikost částic. Principem měření je sledování rozdílné polohy částic (způsobené Brownovým pohybem), což mění jednotlivé vzdálenosti, které musí urazit koherentní světlo laseru (díky kterému dochází k interferenci) k detektoru. Nevýhodou DLS je možné zahrnutí solvatačního obalu nebo naadsorbované vrstvy na povrchu nanočástice do její velikosti. Tento jev vede k odlišnosti mezi výsledky získanými z DLS a výsledky z jiných metod např. elektronové mikroskopie. Měřením se primárně získává průměr nanočástice jako tzv. z-average, neboli intenzitní, průměrná velikost částic vážená podle páté mocniny průměru částice, což vede k nadhodnocení velikosti velkých částic v poměru k částicím malým. Kromě velikosti lze pomocí DLS získat i tzv. index polydisperzity (PDI), ten je mírou šířky distribuce a nabývá hodnot od 0 do 1 (PDI 0 by dosahoval zcela monodisperzní systém). Výhodou této metody je rychlost a jednoduchost samotného měření, kvůli kterému je tato technika hojně využívána [20].

Použitá metodika

Pro charakterizaci velikosti nanočástic v různých disperzních médiích byl využit Zetasizer Nano ZS90. Dávkování jednotlivých připravených disperzí do kyvet probíhalo pomocí automatické pipety. Pro měření byly zadány hodnoty indexu lomu částic: 2,74 a indexu lomu

disperzního média: 1,330. Následně byl každý vzorek analyzován přístrojem po tři měřicí cykly při teplotě 25 °C v různých médiích. Z naměřených dat pak byla stanovena průměrná hodnota z-average v nm, PDI a směrodatná odchylka měření.

4.5.4 Stanovení velikosti částic metodou laserové difrakce

Rozsah měření velikosti pomocí DLS se typicky pohybuje mezi 1 nm až 6 μm . Využitím této metody tak není možné detekovat větší částice potenciálně se vyskytující v polydisperzních systémech. Pro měření velikosti částic větších slouží laserová difrakce (LD). Princip metody a postup měření je popsán normou ISO 13321. Moderní přístroje využívající tuto metodu jsou již schopné měřit velikost částic od 10 nm do 3500 μm (Malvern 3000). Tento široký rozsah umožňuje kombinace klasické laserové difrakce, která umožňuje analyzovat velikost částic větší než 400 nm a měření intenzity rozptylu, pomocí které je měřena velikost menších částic. Moderní přístroje jsou schopné výsledky získané těmito dvěma mechanismy spojit do jednoho, který se obvykle vyjadřuje jako objemově vážený průměr velikosti částic D [4;3]. Klasická laserová difrakce není schopna detekovat částice menší než 400 nm, protože úhly, při kterých dochází k difrakci záření, jsou příliš velké. Intenzita difraktovaného záření je tak v porovnání s intenzitou difraktovaného záření způsobenou velkými částicemi velmi malá a částice s malými rozměry se stávají pro přístroj neviditelné [20]. Nicméně pokrok v optickém technickém vybavení nových přístrojů spolu s využitím moderních výpočetních postupů rozšířily možnosti využití této techniky i pro měření částic se submikronovou velikostí.

Použitá metodika

Měření probíhalo v laserovém analyzátoru velikosti částic Mastersizer 3000 (rozsah měření velikosti 10 nm až 3500 μm) tzv. mokrou cestou a jeho postup byl následovný. Do dispergační automatizované jednotky Hydro, naplněné demineralizovanou vodou, byla Pasteurovo pipetou aplikována připravená disperze pro měření velikosti v takovém množství, aby obskurace vždy dosahovala doporučené hodnoty $\sim 10\%$. Rovnoměrné rozptýlení vzorku a homogenita disperze při analýze byly zajišťovány míchadlem a ultrazvukem, které tvořily součást automatizované jednotky. Regulátor otáček byl pro měření nastaven na 2220 otáček za minutu a jednotka byla temperována na 25 °C. Pro měření byly zadány hodnoty indexu lomu částic: 2,741 a indexu lomu disperzního média: 1,330. Měření bylo získán průměr částic v jednotlivých disperzích mediích vztažený

na jejich objem D [4;3]. Každá disperze byla analyzována třikrát a z jednotlivých výsledků byl následně stanoven průměr a směrodatná odchylka.

4.6 Měření zeta potenciálu

4.6.1 Příprava disperze UV filtrů pro měření zeta potenciálu

Na přípravu disperze k měření zeta potenciálu při různém pH byla použita základní disperze UV filtrů. Pro měření zeta potenciálu bylo 15 μl této základní disperze dispergováno v 4 ml disperzního prostředí, které bylo v tom to případě tvořeno roztoky s různě adjustovanou hodnotou pH. Pro každý vzorek UV filtru tak bylo připraveno 10 roztoků s pH 1–10.

4.6.2 Stanovení zeta potenciálu

Stabilita a tendence nanočástic k aglomeraci (tím pádem změně velikosti) jsou důležitými faktory, které ovlivňují jejich využití. Nejjednodušší metodou, jak zjistit tyto vlastnosti, je nanočástice v dané aplikaci použít a analyzovat případné změny v čase. Avšak nevýhodou tohoto postupu je značná časová náročnost. Měření zeta potenciálu, proto umožňuje předpovědět tyto vlastnosti nanočástic v různých podmínkách, již v den jejich přípravy. Zeta potenciál byl definován již v kapitole 1.1.2 jako potenciálový rozdíl mezi vrstvou protiiontů na povrchu částice a kompaktní, difúzní částí elektrické dvojvrstvy. Je analyzován nepřímo, měřením difúzní konstanty částic v elektrickém poli, která je označována jako tzv. elektroforetická mobilita (EM). Částice s velkým nábojem se v elektrickém poli pohybují rychle, zatímco částice s malým nábojem pomalu. Směr tohoto pohybu závisí na náboji, kladně nabitě částice se pohybují ke katodě, a záporně nabitě částice se pohybují k anodě. Moderní měřicí přístroje analyzují EM pomocí tzv. Laserové Dopplerovské velocimetrie. Tato metoda využívá Dopplerův efekt (změnu frekvence vlnění, ke které dochází při interakci vln s pohybujícím se objektem). Pokud se tedy ozáří vzorek obsahující nanočástice pohybující se v elektrickém poli, dojde při interakci tohoto záření s pohybující se částicí ke změně frekvence záření. Z této změny je možno vypočítat rychlost pohybu nanočástic. EM je pak rovna podílu této rychlosti a intenzitě elektrického pole aplikovaného při měření. Zeta potenciál je pak většinou stanoven pomocí Helmholtz Smoluchowski rovnice [20].

Použitá metodika

Stanovení ζ potenciálu bylo provedeno pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS90. Jednotlivé disperze UV filtrů s různým pH připravené pro měření zeta potenciálu byly injekční stříkačkou dávkovány do speciální kyvety typu DTS1070 a vloženy k vyhodnocení do přístroje. Každý vzorek byl analyzován třikrát a následně byl z naměřených hodnot stanoven průměr. Při měření byla udržována konstantní teplota 25 °C.

4.7 Analýza fotostability UV filtrů

4.7.1 Příprava disperze pro měření fotostability UV filtrů

K měření fotostability vzorků nano UV filtrů, byla připravena 5% disperze každého filtru v glycerolu. Vždy 0,5 g UV filtru tak bylo v 10 ml odměrné baňce doplněno glycerolem na objem 10 ml. Pro vytvoření homogenních vzorků byly tyto disperze dále homogenizovány na míchadle Vortex po dobu 10 minut.

4.7.2 Stanovení fotostability UV filtrů

Důležitým faktorem při hodnocení účinnosti UV filtrů je jejich fotostabilita, tedy zachování fotoprotekčních vlastností po vystavení UV záření. Nízká fotostabilita UV filtrů nemusí vést jen ke snížení ochrany proti UV záření, ale i jiným nepříznivým dějům jako je například tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) [26]. V rámci bakalářské práce byla pro její stanovení využita metoda *in vitro*. Ta je založena na měření změny propustnosti UV záření skrz tenký film UV filtru na zdrsněném transparentním podkladu destičky z PMMA (polymetylmetakrylátu) před a po expozici regulované dávce UV záření z definovaného zdroje po definovaný čas [27].

Použitá metodika

Jako substrát byla použita polymetylmetakrylátová destička, na kterou byla pomocí injekční stříkačky nanесena připravená disperze daného UV filtru v takovém množství, aby se hmotnost disperze UV filtru na destičce pohybovala ~ 0,027 g. Disperze byla na destičce důkladně rozetřena, čímž byl na jejím povrchu vytvořen rovnoměrný tenký film. Takto připravená destička byla vždy ponechána 15 minut ve tmě a následně u ní byla na 10 různých místech změřena transmitance pomocí Spektrofotometru UV-VIS Cary 100 v rozmezí vlnových délek od 290 do 400 nm. Poté se destička vystavila v solárním simulátoru SunTray Suntest CPS+ UV záření. Pro jednotlivé vzorky byly připraveny vždy tři destičky a každá

byla v simulátoru ponechána jinou definovanou dobu 15, 30 a 55 minut. Po vyjmutí ze simulátoru byly destičky vloženy na 15 minut do tmy a opět u nich byla změřena transmitance ve stejném rozmezí. Hodnoty transmitance byly zprůměrovány, přepočteny na absorbanci a graficky znázorněny v závislosti na vlnové délce.

4.8 Stanovení morfologie částic pomocí mikroskopie

Vzhled a morfologie studovaných nanočástic byly stanoveny pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Ta vytváří obraz zkoumaného vzorku na základě skenování jeho povrchu urychleným paprskem elektronů. Mezi tímto primárním paprskem a atomy povrchu vzorku dochází k interakcím, při nichž jsou z povrchu vzorku emitovány takzvané sekundární (zpětně odražené) elektrony, které generují signály. Tyto signály jsou vyhodnoceny detektorem a následně vzniká obraz vzorku. Využitím SEM lze získat informace jak o morfologii, tak i velikosti vzorku. Vzorky nanočástic mají obvykle formu prášků nebo suspenzí, které jsou pro stanovení často ředěny. Předchází se tak hromadění částic, které by u polydisperzních systémů vedly k možnému překrytí menších částic těmi většími [28].

Použitá metodika

Pro charakterizaci vzorků byl použit skenovací elektronový mikroskop Phenom Pro od společnosti ThermoFisher Scientific. Vzorky byly zobrazovány bez předešlého pokovení pomocí zpětně odražených elektronů. Bylo použito urychlovací napětí 15 kV a vzorky byly zobrazovány při zvětšení 4000× nebo 10000×. Mikroskopické pozorování bylo provedeno vědeckými pracovníky CPS.

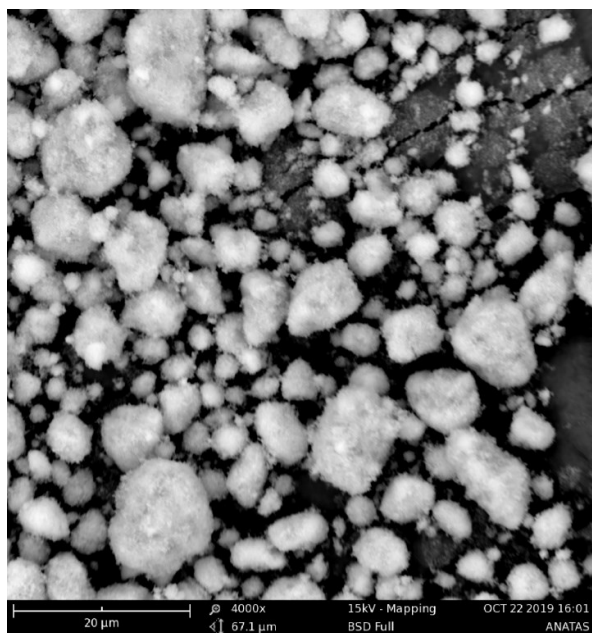
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace TiO₂

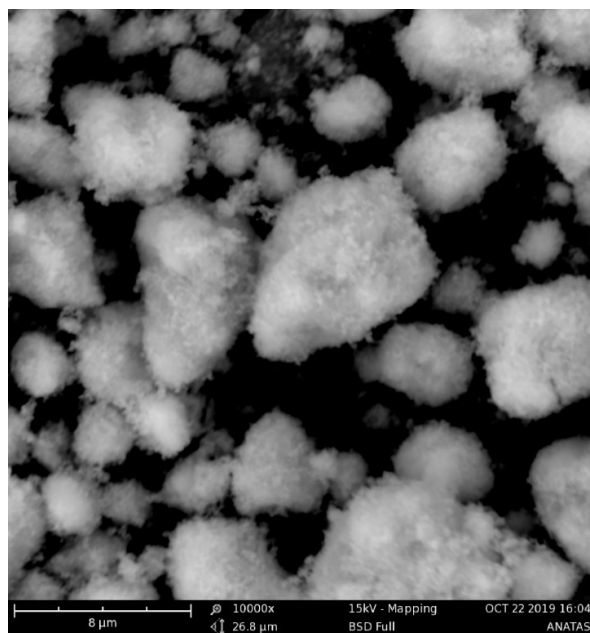
Jak již bylo uvedeno v teoretické části práce, TiO₂ se v přípravcích na ochranu proti UV záření může vyskytovat ve dvou modifikacích anatas a rutil. Pokud je však ve formě nano, je dle Nařízení EP a Rady 1223/2009 povoleno použití pouze ve formě rutilu, nebo rutilu s nejvýše 5 % anatasu [4]. Předmětem této části práce je charakterizace vlastností vzorku nanočástic anatasu a navazuje tak na diplomovou práci Simony Dronzekové [29], která se zabývala analýzou TiO₂ ve formě samotného rutilu a směsi rutilu s anatasem. Snahou je za využití obdobných metod a přístrojů doplnění informací k problematice chování nanočástic TiO₂ využívaných v KP jako fyzikálních UV filtrů.

5.1.1 SEM

Mikroskopické snímky vzorku TiO₂ anatas získané za použití SEM podávají informace o morfologii studovaného vzorku. Je na nich dobře patrná přítomnost struktur (částic i aglomerátů) o různé velikosti s relativně širokou distribucí. Částice se zdají být kulovitěho, nepravidelného tvaru s nerovným, na pohled drsným povrchem.



Obrázek 7 SEM snímek vzorku anatas, zvětšení 4000×



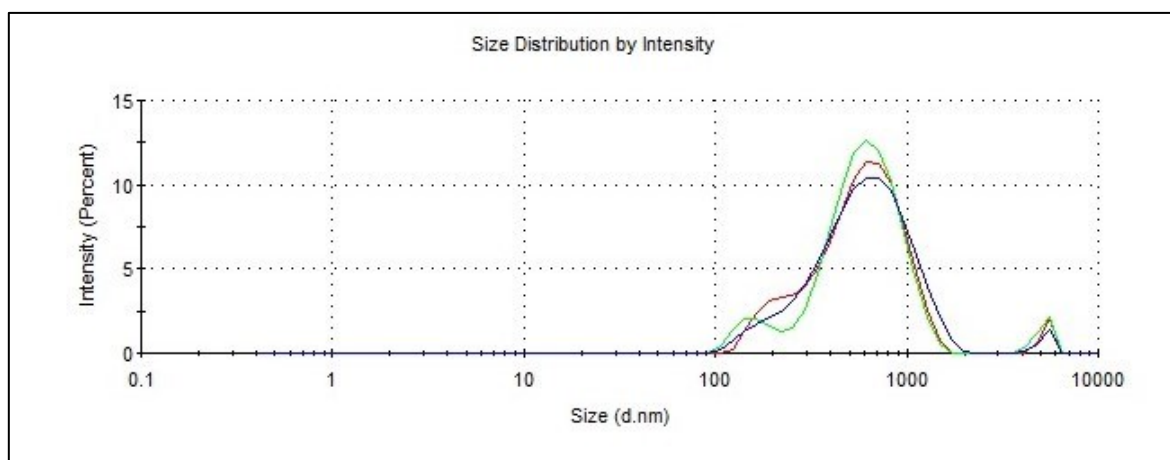
Obrázek 8 SEM snímek vzorku anatas, zvětšení 10000×

5.1.2 Stanovení velikosti částic v Di – H₂O

Velikost částic vzorku anatas byla nejprve analyzována metodou DLS v demineralizované vodě, tedy v disperzním prostředí s neadjustovaným pH a bez přítomnosti solí. Velikost částic, vyjádřená jako z-average, byla za těchto podmínek určena na 553 ± 7 nm a průměrná hodnota PDI byla stanovena jako $0,33 \pm 0,02$. Hodnota PDI poukazuje na polydisperzitu systému, je tedy zřejmé, že vzorek obsahoval částice o různých velikostech. Distribuční křivky (Obrázek 9) tuto skutečnost potvrzují a lze na nich pozorovat, že velikost některých částic dosahovala až mikronové oblasti a pohybovala se na hranici limitu detekce použitého přístroje. Lze tedy konstatovat, že i po 30 minutové sonikaci, nedošlo k rozbití všech aglomerátů vzniklých skladováním. Cornier a spol. ve své práci uvádí [20], že polydisperzita snižuje fyzikální stabilitu systémů, protože se v nich výrazněji projevují procesy jako separace fází, nebo Oswaldovo zrání.

Tabulka 4 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO₂ anatas dispergovaný v Di – H₂O s neadjustovaným pH

Vzorek	Z-average [nm]	PDI
Anatas	562	0,35
	546	0,33
	550	0,30
Průměr	553	0,33
SD	7	0,02



Obrázek 9 Distribuční křivky velikosti částic vzorku TiO₂ anatas dispergovaném v Di – H₂O

5.1.3 Stanovení velikosti a stability částic ve fyziologických médiích

V rámci této části bakalářské práce byla analyzována velikost a stabilita částic TiO_2 metodu DLS v různých fyziologických roztocích, které se běžně používají při *in vitro* a *in vivo* testování nanomateriálů, konkrétně se jednalo o fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS), médium pro kultivaci buněk DMEM bez séra a DMEM s 10% telecím sérem. Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic se mohou zásadně lišit v závislosti na složení daného média. Pro komplexní posouzení chování nanočástic v *in vitro* a *in vivo* studiích, je proto důležité zvážit vliv samotných fyziologických roztoků na tyto vlastnosti jako např. velikost a získat tak ucelený obraz při testování.

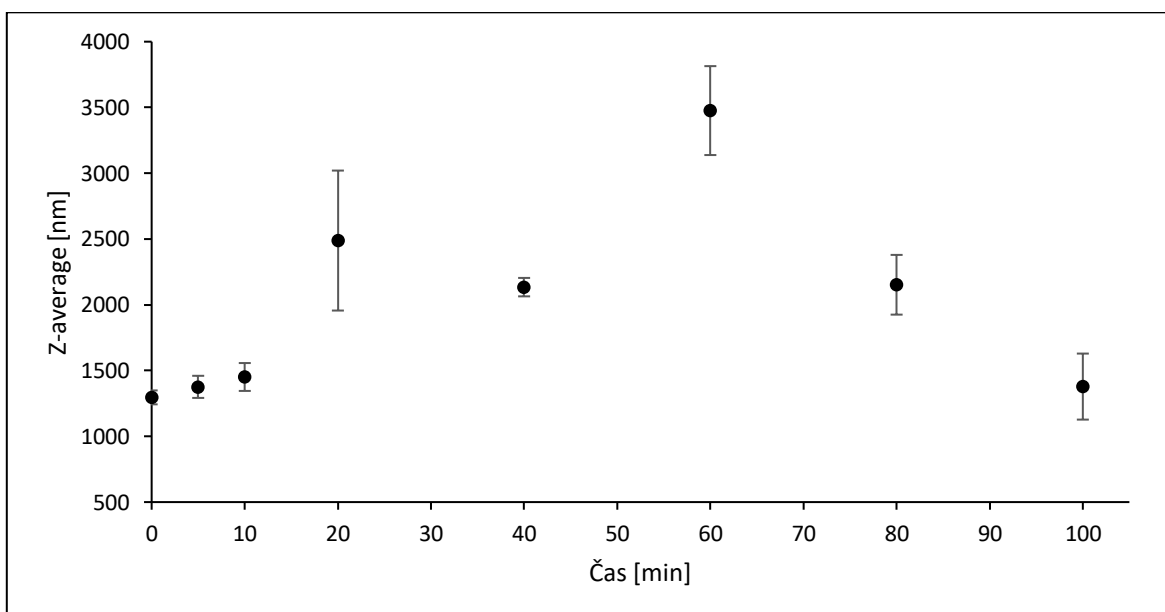
PBS

Okamžitě po dispergování TiO_2 anatas v PBS byl naměřen z-average 1296 ± 53 nm. Velikost částic dále rostla s dobou, která od smíchání uplynula. Nejvyšší hodnota z-average byla stanovena po 60 minutách a to 3476 ± 227 nm, velikost částic se poté až do konce měření opět zmenšovala. Vysvětlením těchto výsledků je sedimentace velkých aglomerátů ke dnu kyvety, kde Zetasizer Nano ZS 90 nebyl schopen změřit jejich velikost a analyzovány tak byly pouze menší částice. V porovnání s chováním částic v $\text{Di} - \text{H}_2\text{O}$ lze konstatovat, že iontová síla způsobená přítomností solí v PBS měla za následek aglomeraci částic anatasu. PDI dosahovalo v PBS nižších hodnot v porovnání s $\text{Di} - \text{H}_2\text{O}$, avšak výsledky můžou být značně ovlivněna zmíněnou sedimentací částic.

Tyto výsledky jsou v souladu se studií o vhodné dispergaci částic pro toxikologické testování, kterou provedl Sager a kolektiv [30]. Autoři konstatují, že tvorba aglomerátů nanočástic v PBS jako disperzním médiu snižuje přesnost odhadu množství nanomateriálu, které je schopné proniknout do testovacího systému. To má za následek nesprávnou interpretaci výsledků měření toxicity nanočástic a z těchto důvodů nedoporučují samostatné PBS jako médium pro přípravu disperzí nanočástic při toxikologickém testování. Avšak vhodně upravené PBS (s obsahem proteinů a dipalmitoyl fosfatidylcholinu) poskytovalo uspokojivé výsledky.

Tabulka 5 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO₂ anatas dispergovaný v PBS

Čas [min]	Z-average [nm]		PDI	
	Průměr	SD	Průměr	SD
0	1296	53	0,09	0,08
5	1376	84	0,27	0,06
10	1451	106	0,20	0,09
20	2488	532	0,13	0,06
40	2134	338	0,13	0,11
60	3476	227	0,27	0,05
80	2152	251	0,31	0,05
100	1378	52	0,20	0,03



Obrázek 10 Závislost velikosti částic vzorku TiO₂ anatas dispergovaných v PBS na čase

DMEM bez séra

Chování nanočástic anatasu dispergovaného v DMEM bez séra v čase vykazovalo obdobný trend jako chování v PBS. Průměrná hodnota velikosti částic se v čase měnila a nejvyšší hodnoty dosáhla po 5 minutách od smíchání a to 2421 ± 92 nm. Lze tedy říct, že v DMEM bez séra opět došlo k aglomeraci nanočástic v důsledku iontových sil média.

Tabulka 6 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO₂ anatas dispergovaný v DMEM bez séra

Čas [min]	Z-average [nm]		PDI	
	Průměr	SD	Průměr	SD
0	1517	49	0,22	0,05
5	2421	92	0,25	0,02
10	1374	69	0,21	0,04
20	2155	90	0,11	0,07
30	1359	70	0,21	0,03
40	1436	22	0,11	0,05
60	1843	29	0,15	0,06

DMEM s 10% telecím sérem

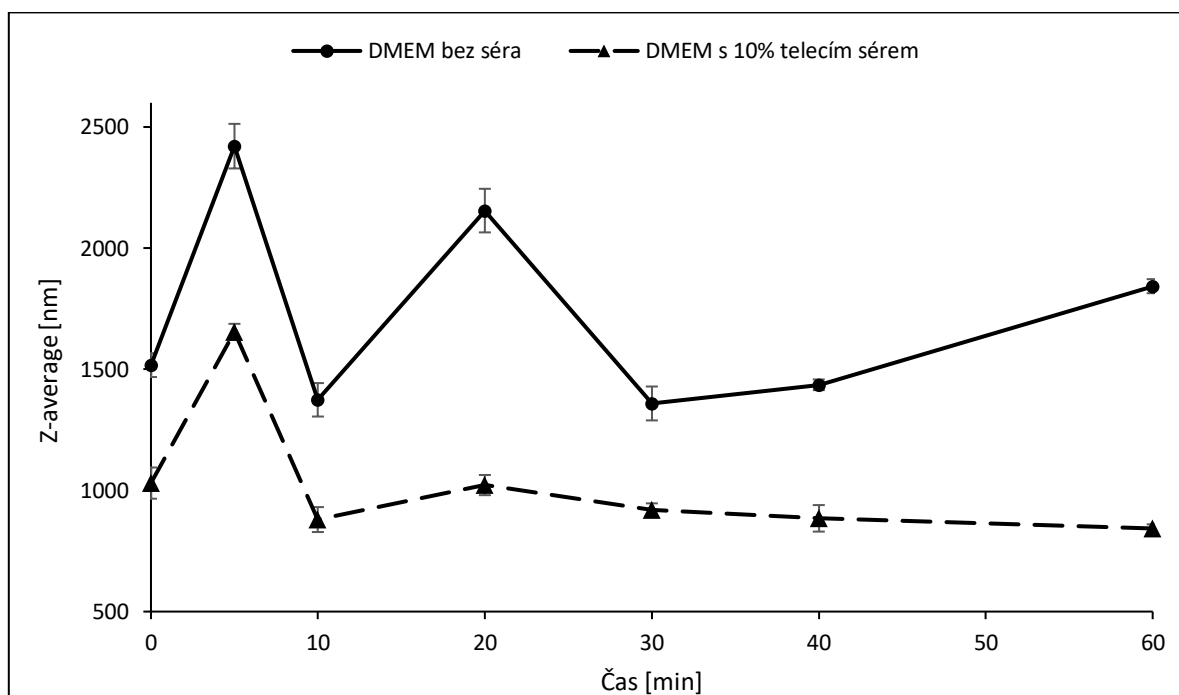
Posledním fyziologickým roztokem, ve kterém proběhla analýza velikosti částic anatasu bylo DMEM s 10% telecím sérem. Chování nanočástic se však v tomto médiu značně odlišovalo od předchozích případů, přestože opět došlo k jejich aglomeraci. Maximální hodnoty velikosti dosáhly aglomerované částice stejně jako u DMEM bez séra po 5 minutách od smíchání s médiem, ale po poklesu na velikost 880 ± 52 nm v čase 10 minut zůstala velikost částic až dokonce měření konstantní. Rozdíl je možné pozorovat na grafickém znázornění závislosti velikosti částic/aglomerátů na čase v obou médiích (Obrázek 11). V prostředí DMEM s 10% telecím sérem také výrazně vzrostly hodnoty PDI. Tento jev může být vysvětlen vznikem menších aglomerátů, tedy jejich pomalejší sedimentací a lepší detekovatelnosti pro přístroj. Tyto výsledky vedou k závěru, že přítomnost 10% telecího séra zásadně ovlivňuje chování nanočástic v roztoku.

Vlivu telecího séra na velikost a stabilitu nanočástic TiO₂ v různých kultivačních médiích se věnují i Zhaoxia a kolektiv [31]. Ve své práci sledovali mimo jiné vliv koncentrace telecího séra (0,5-10 %) v DMEM na agregaci nanočástic TiO₂. Prokázali, že už od 1% koncentrace

funguje telecí sérum jako účinný stabilizátor disperzí a brání tak aglomeraci a sedimentaci částic. Děje se tak díky obsahu specifických proteinů v séru, které tvoří tzv. proteinovou korunu (podrobněji je rozebrána v kapitole 5.2.3)

Tabulka 7 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO₂ anatas dispergovaný v DMEM s 10% telecím sérem

Čas [min]	Z-average [nm]		PDI	
	Průměr	SD	Průměr	SD
0	1030	65	0,34	0,04
5	1655	33	0,46	0,06
10	880	52	0,72	0,17
20	1022	42	0,49	0,01
30	919	27	0,58	0,05
40	885	55	0,54	0,26
60	843	17	0,59	0,17



Obrázek 11 Závislost velikosti částic vzorku TiO₂ anatas dispergovaných v DMEM bez séra a v DMEM s 10% telecím sérem na čase

5.1.4 Stanovení velikosti částic v simulovaných gastrointestinálních tekutinách

Dalšími typy médií, které byly použity pro dispergaci TiO_2 ve formě anatas byly simulované gastrointestinální tekutiny. Cílem této studie bylo napodobit podmínky, kterým mohou být nanočástice v organismu vystaveny po jejich požití. U KP může taková situace nastat například při aplikaci balzámu na rty s nano UV filtrem. Chování nanočástic anatasu bylo postupně pozorováno za využití metody DLS v simulovaných slinách, střevní tekutině bez a s pankreatinem a v žaludeční tekutině bez a s přítomností pepsinu.

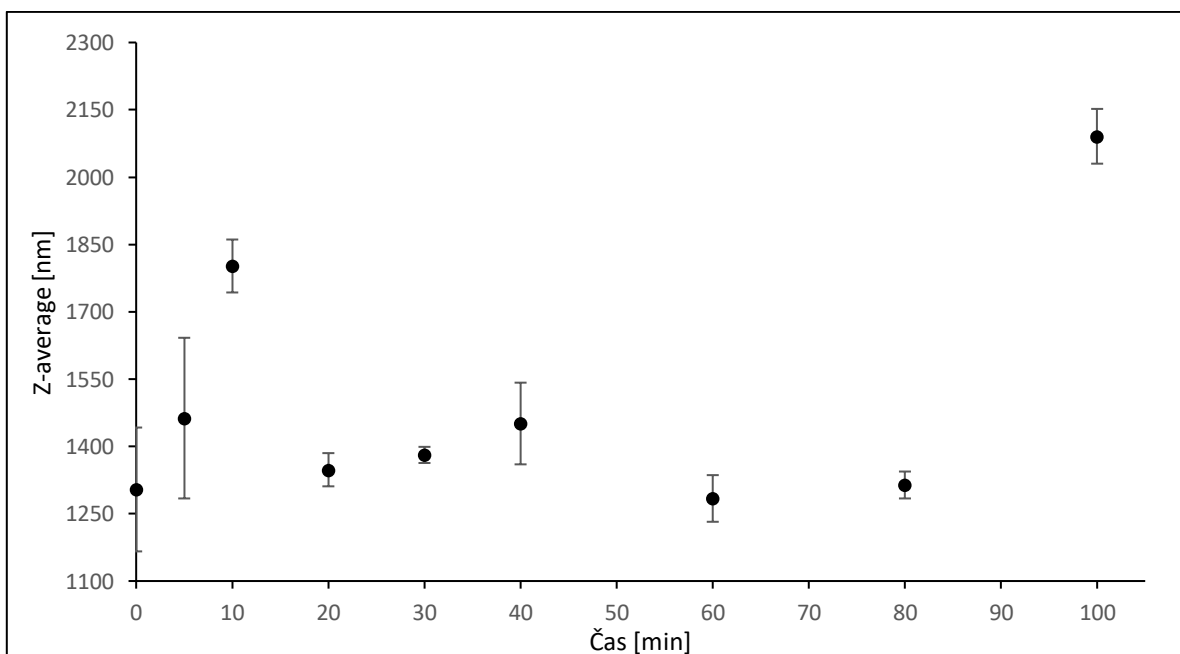
Simulované sliny

V prostředí simulovaných slin s pH 6,8 došlo opět k aglomeraci částic. Velikost částic rostla a po 10 minutách od smíchání dosahovala 1802 ± 59 nm. Po 20 minutách měření nastal pokles velikosti a další významná změna velikosti nebyla zaznamenána až do 100 minut kdy vzrostla na 2091 ± 61 nm.

Pozorováním nanočástic v simulovaných gastrických tekutinách se věnoval i Sohal a kolektiv [32]. Jako vzorek TiO_2 pro svou analýzu zvolili anatas v nanoformě pro potravinářské použití. Výsledky této práce nepodávají informace přímo o velikosti částic ve sledovaných časech, ale autoři sledují statisticky významné změny koncentrace určitého rozsahu velikostí nanočástic. Zatímco z-average průměruje velikost všech detekovaných částic přítomných ve vzorku a sleduje tak velikost částic jako celku, měření koncentrace různých rozsahů velikosti umožňuje bližší náhled na chování částic o určité velikosti. V simulovaných slinách byly částice TiO_2 pozorovány v čase ihned po smíchání a poté po 60 minutách. Po srovnání výsledků z těchto dvou časů autoři došli k závěru, že u částic TiO_2 v simulovaných slinách nezaznamenali žádnou výraznou změnu koncentrace ani v jednom rozsahu zkoumaných velikostí nanočástic. V tomto ohledu je studie přestavená v této bakalářské práci podrobnější a poskytuje informace o dynamice změn pozorovaných i během šedesátiminutového časového intervalu. Pokud by byly diskutovány velikosti částic TiO_2 zaznamenané v bakalářské práci pouze v časech 0 a 60 min., byly by zcela v souladu s výsledky zmiňované publikace. Avšak z výsledků je zřejmé, že k tvorbě aglomerátů dochází především v krátkých časech po smíchání. Lze však spekulovat, že tyto aglomeráty se mohou rozpadat a může dojít k ustavení rovnovážného stavu mezi a aglomerovanými a neaglomerovanými částicemi.

Tabulka 8 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO₂ anatas dispergovaný v simulovaných slinách

Čas [min]	Z-average [nm]		PDI	
	Průměr	SD	Průměr	SD
0	1304	138	0,20	0,05
5	1463	179	0,29	0,05
10	1802	59	0,25	0,04
20	1348	37	0,14	0,07
30	1381	18	0,22	0,06
40	1451	91	0,22	0,01
60	1284	52	0,26	0,04
80	1314	30	0,21	0,02
100	2091	61	0,28	0,03



Obrázek 12 Závislost velikosti částic vzorku TiO₂ anatas dispergovaných v simulovaných slinách na čase

Simulovaná střevní tekutina (SIF)

Další analyzování velikosti proběhlo v simulované střevní tekutině opět s pH 6,8. I v tomto případě byla pozorována aglomerace částic, avšak o něco menší, než simulovaných slinách.

Tyto výsledky zdůrazňují, že pH systému je pouze jednou z mnoha složek ovlivňujících stabilitu systému.

V práci Sohal a kol., zmíněné v případě chování TiO_2 v simulovaných slinách, bylo sledováno rovněž chování nanočástic TiO_2 i simulované střevní tekutině [32]. V tomto systému byla sledována velikost částic ihned po přidání TiO_2 do simulované střevní tekutiny a následně až po 8 hodinách. Po srovnání výsledků z těchto časů, byly zaznamenány koncentrační změny ve velikosti částic. Po 8 hodinách byl pozorován 40% nárůst koncentrace nanočástic v rozsahu velikosti 150–250 nm a 200% nárůst v rozsahu velikostí 500–1000 nm.

Tabulka 9 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO_2 anatás dispergovaný v SIF

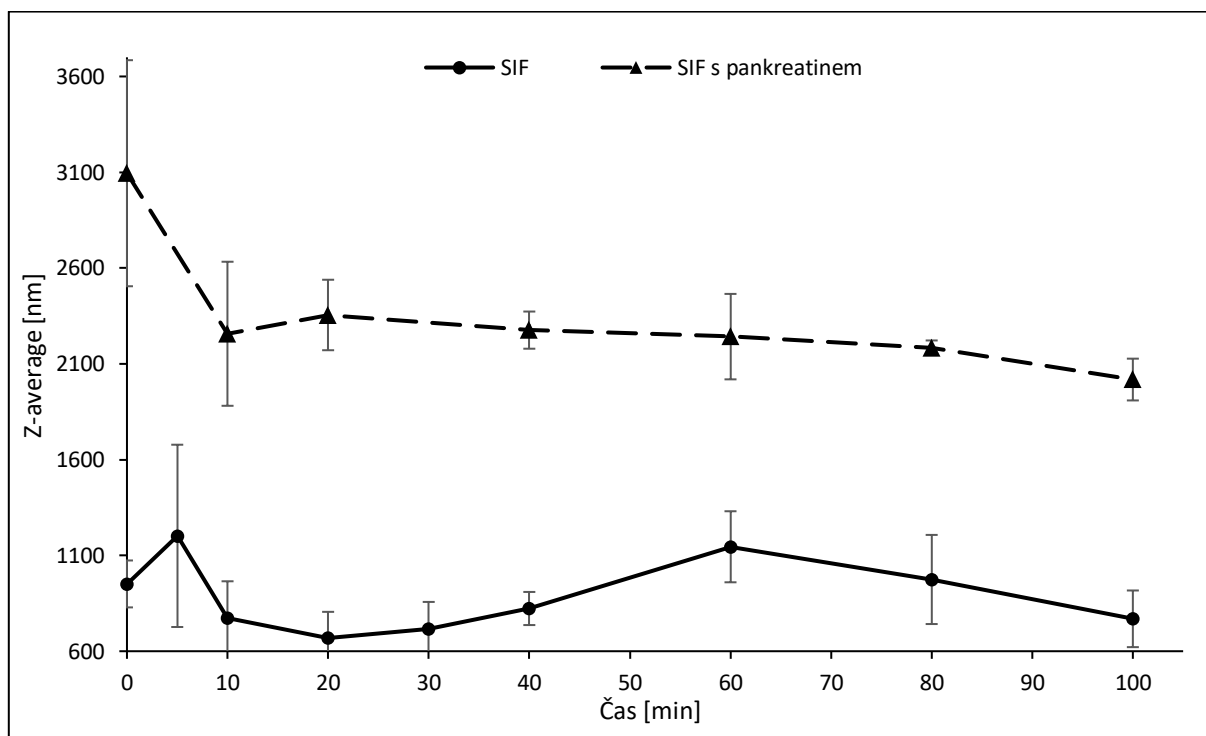
Čas [min]	Z-average [nm]		PDI	
	Průměr	SD	Průměr	SD
0	951	123	0,34	0,03
5	1202	476	0,33	0,03
10	773	192	0,34	0,06
20	669	137	0,24	0,01
30	718	140	0,22	0,04
40	823	86	0,27	0,02
60	1145	185	0,38	0,04
80	975	233	0,15	0,08
100	769	148	0,19	0,02

SIF s pankreatinem

Při vystavení vzorku anatasu simulované střevní tekutině s pankreatinem došlo oproti SIF bez pankreatinu k velkému nárůstu velikosti částic, kdy ihned po smíchání aglomerovaly na 3095 ± 590 nm, přestože pH systému bylo adjustováno na 6,8. Další průběh závislosti prezentované na Obrázku 13 pak naznačuje, že velikost aglomerátů se dále již výrazně neměnila a kolísání velikostí částic oproti systému bez pankreatinu bylo v průběhu času menší. Z-average se až do konce měření pohyboval kolem 2000 nm. Z výsledků měření tedy vyplývá, že přidávkem pankreatinu k SIF vedlo k větší aglomeraci částic anatasu.

Tabulka 10 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO₂ anatas dispergovaný v SIF s pankreatinem

Čas [min]	Z-average [nm]		PDI	
	Průměr	SD	Průměr	SD
0	3095	590	0,26	0,02
10	2257	376	0,19	0,09
20	2355	184	0,25	0,05
40	2276	97	0,34	0,01
60	2242	223	0,28	0,03
80	2184	38	0,30	0,06
100	2018	109	0,26	0,02



Obrázek 13 Závislost velikosti částic vzorku TiO₂ anatas dispergovaných v SIF a v SIF s pankreatinem na čase

Simulovaná gastrická tekutina (SGF)

Chování částic TiO₂ anatas se v disperzním prostředí tvořeném simulovanou žaludeční tekutinou zásadně lišilo od jejich chování v ostatních simulovaných tělních tekutinách.

Velikost částic ihned po smíchání činila pouze 241 ± 9 nm a nejvyšší velikost částic byla zaznamenána po 20 minutách měření 478 ± 17 nm. Velikost částic TiO_2 anatas v SGF tedy po celou dobu měření nepřesáhla velikost stanovenou v Di – H_2O , a byla v některých případech dokonce menší. Zdá se tedy, že nízké pH 1,2 simulované žaludeční tekutiny se na aglomeraci částic významně neprojevovalo.

Sodal a kolektiv ve své studii analyzovali nanočástice TiO_2 i v simulované žaludeční tekutině [32]. Tentokrát byl vzorek TiO_2 analyzován ihned po smíchání se simulovanou tekutinou, po 2 hodinách a nakonec po 8 hodinách. Autoři dospěli k výsledkům, že koncentrace nanočástic s velikostí v rozsahu 120–140 nm se po 2 hodinách snížila o 82 % a částice s tímto rozpětím velikostí po 8 hodinách nebyly v SGF vůbec detekovány.

Tabulka 11 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO_2 anatas dispergovaný v SGF

Čas [min]	Z-average [nm]		PDI	
	Průměr	SD	Průměr	SD
0	241	9	0,34	0,01
5	288	3	0,36	0,05
10	338	9	0,43	0,01
20	478	17	0,61	0,05
30	363	10	0,44	0,02
40	387	4	0,45	0,02
60	431	14	0,55	0,01
80	485	7	0,50	0,01
100	435	12	0,50	0,01

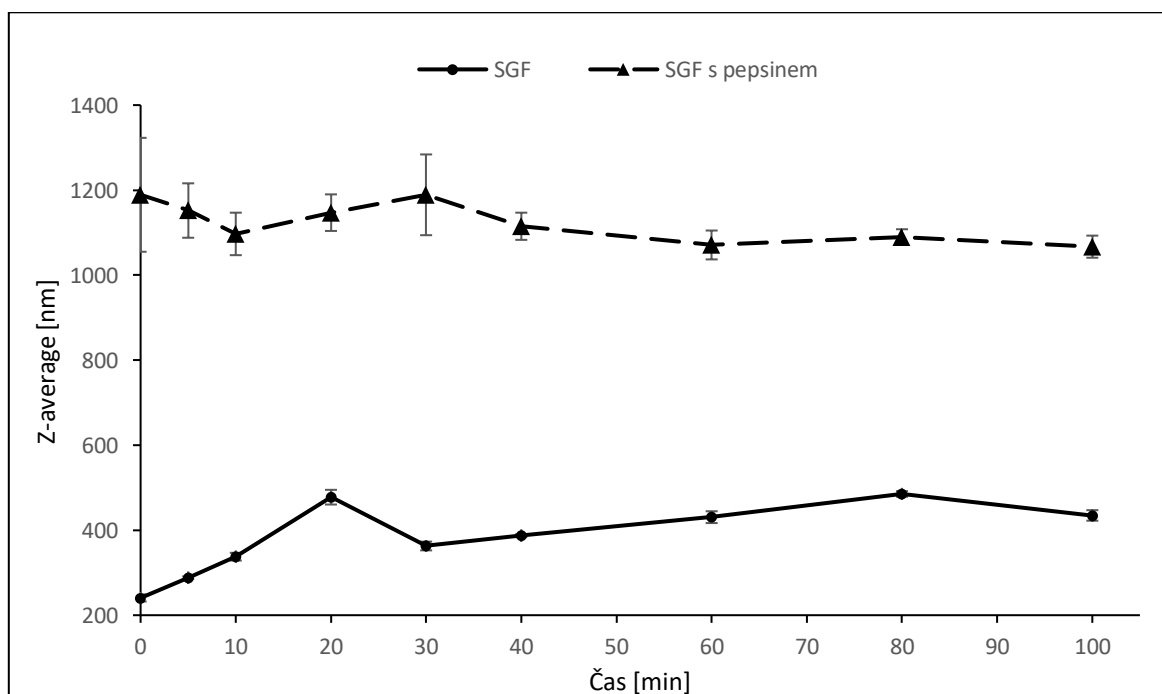
SGF s pepsinem

SGF s pepsinem byla poslední simulovanou tělní tekutinou, ve které byl vzorek anatasu analyzován. Podobně jako u SIF s pankreatinem došlo přidáním pepsinu k SGF k výraznému zvětšení velikosti částic v roztoku, i přes adjustaci pH na stejnou hodnotu jako v simulované žaludeční tekutině bez pepsinu (pH=1,2). Velikost částic byla po celých 100 minut měření obdobná a pohybovala se ~ 1100 nm. V obou simulovaných tekutinách, jak SIF, tak SGF, bylo po přidavku příslušného enzymu možné pozorovat značnou aglomeraci TiO_2 částic, zatímco přidavek telecího séra k DMEM měl opačný účinek. Z těchto výsledků lze říct,

že přítomnost proteinů v médiu může aglomeraci, jak podporovat, tak ji bránit v závislosti na charakteru proteinu a celkovém složení disperzního média.

Tabulka 12 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO_2 anatás dispergovaný v SGF s pankreatinem

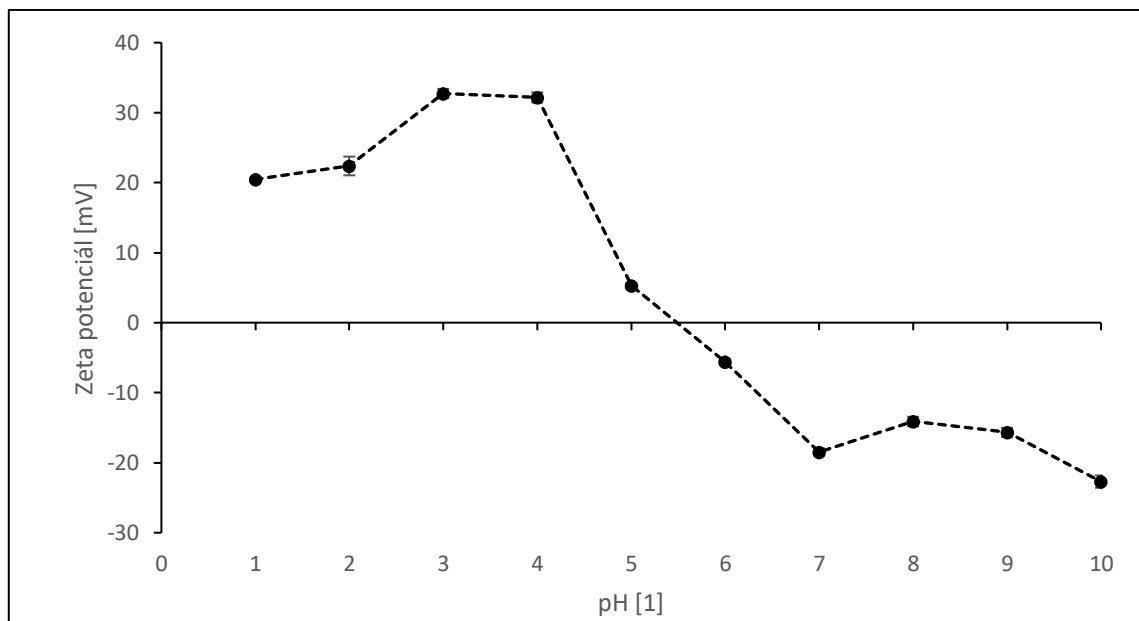
Čas [min]	Z-average [nm]		PDI	
	Průměr	SD	Průměr	SD
0	1189	134	0,16	0,12
5	1152	64	0,11	0,03
10	1097	50	0,17	0,05
20	1147	43	0,19	0,01
30	1189	95	0,18	0,05
40	1115	32	0,20	0,02
60	1071	34	0,15	0,03
80	1090	18	0,21	0,03
100	1067	26	0,20	0,0



Obrázek 14 Závislost velikosti částic vzorku TiO_2 anatás dispergovaných v SGF a v SGF s pepsinem

5.1.5 Zeta potenciál

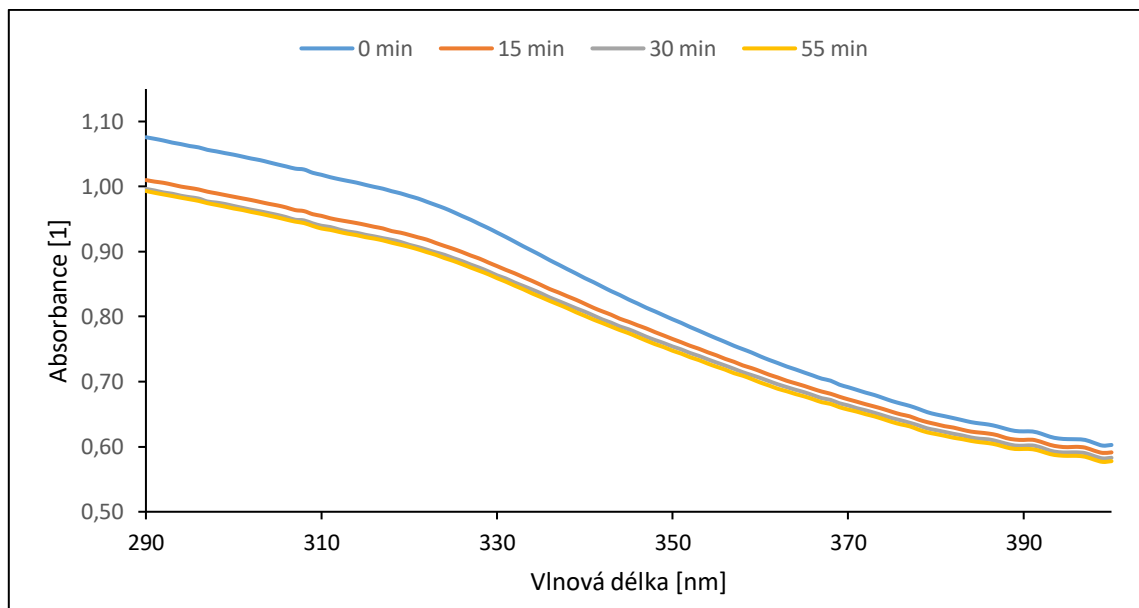
Dalším analyzovaným parametrem byl zeta potenciál, který se považuje za důležitý parametr, pomocí kterého lze hodnotit stabilitu disperzí. Systém je považován za stabilní, pokud je absolutní hodnota zeta potenciálu větší nebo rovna 30 mV. Tato podmínka byla splněna pouze u disperzí TiO_2 v prostředí s pH 3 a 4. Aglomerace nanočástic anatasu v blízkosti fyziologického pH je tedy velmi pravděpodobná, protože je zde zeta potenciál blízký nule, což značí absenci elektrostatického odpuzování mezi sousedními stejně nabitými částicemi, které pak snadno aglomerují. Pomocí měření zeta potenciálu je také možné určit izoelektrický bod, který byl u vzorku anatasu stanoven na $\sim 5,6$. I tato informace má důležitou roli v stabilitě nanočástic. Jiang, Oberdörster a Biswas se ve své studii [33] věnují charakterizaci nanočástic pro toxikologické testy a dochází k závěru, že zeta potenciál musí mít buď vysokou absolutní hodnotu, nebo pH roztoku musí být ve vzdálenosti 2 jednotky od izoelektrického bodu, pokud má být elektrostatická stabilizace za využití povrchového náboje účinná. Pokud se totiž pH disperzního prostředí přiblíží k izoelektrickému bodu, odpudivá síla částic je oslabena v důsledku nízkého povrchového náboje, dochází k aglomeraci částic a hodnota z-average se zvyšuje. Tímto lze vysvětlit rozdílné chování anatasu v simulovaných tělních tekutinách. Zatímco v simulovaných slinách a simulované střevní tekutině s pH 6,8 došlo k aglomeraci projevující se růstem z-average. V simulované žaludeční tekutině s pH 1,2 byla hodnota z-average částic anatasu dokonce menší než jeho primární hodnota v demineralizované vodě. Je také důležité zmínit, že hodnota izoelektrického bodu TiO_2 je v literatuře uváděna v poměrně širokém rozpětí od 2 do 8, 9. Tento rozptyl může být způsoben zejména nedostatečnou povrchovou čistotou částic TiO_2 a může být jedním z důvodů odlišného chování různých vzorků TiO_2 po vystavení stejným podmínkám [34]. Dalším důvodem může být i skutečnost, že v literatuře je studován TiO_2 , který se vyskytuje v různých formách (anatas, rutil, brookit). Ty se pak mohou chovat v prostředí s různým pH odlišně.



Obrázek 15 Závislost velikosti zeta potenciálu disperze vzorku TiO_2 anatase na pH

5.1.6 Fotostabilita

Fotostabilita je důležitou charakteristikou UV filtrů. Absorbance disperzí TiO_2 zaznamenaná po různé době ozáření je uvedena na Obrázku 16. Po expozici simulovanému slunečnímu záření se vzorek TiO_2 anatase projevil jako relativně fotostabilní. Největší změna ve schopnosti absorbovat UV paprsky nastala po expozici záření trvající 15 minut. Po této době došlo u vzorku k viditelnému poklesu schopnosti pohlcovat UV záření, které je nejvíce patrné v oblasti vlnových délek 290 až 350 nm. Zvýšení doby expozice na 30 a následně 55 minut dále tuto schopnost již výrazně nezhoršilo. Z výsledků testování je taky patrné, že je vzorek TiO_2 anatase účinnější v oblasti UVB záření (290-320 nm) oproti UVA (320-400 nm). I když jsou fyzikální filtry obecně považovány za účinné v celém rozsahu spektra UV záření, pro získání účinnější širokospektrální ochrany kůže by proto byla potřebná jeho kombinace s jiným UV filtrem.



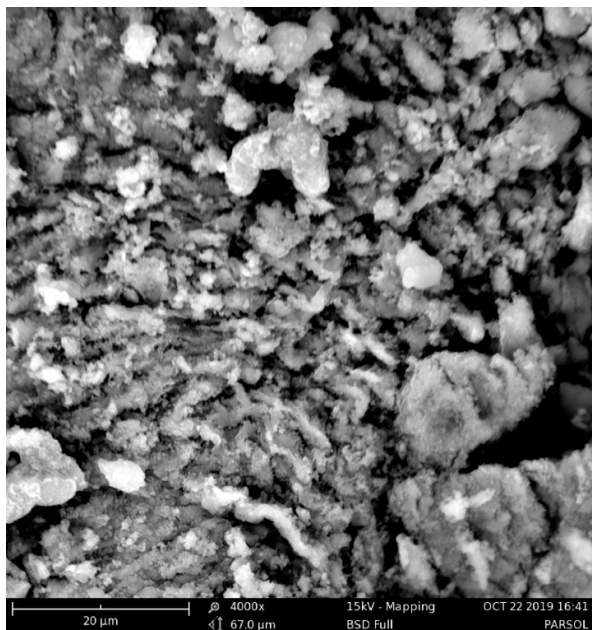
Obrázek 16 Závislost absorbance vzorku TiO_2 anatase na vlnové délce záření po různé době expozice UV záření

5.2 Charakterizace bisoctrizolu

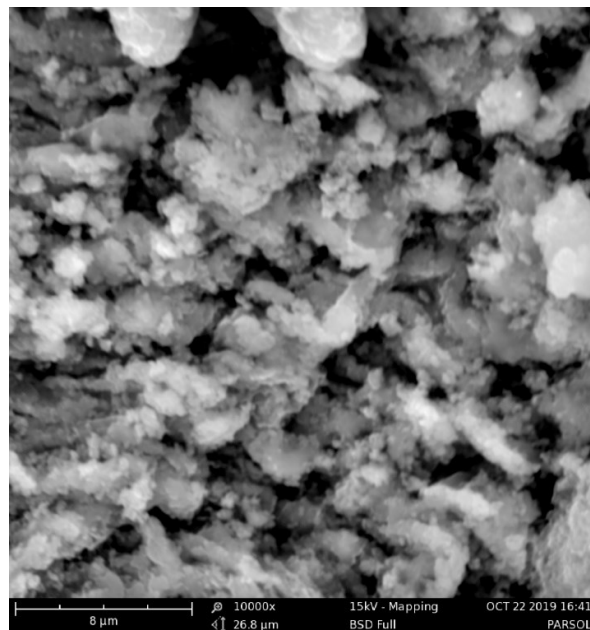
Dalším dílčím cílem praktické části práce bylo studium chování chemického nano UV filtru bisoctrizolu, který patří do perspektivní skupiny organických nerozpustných pigmentů. V nano formě je tento UV filtr dostupný pouze v podobě „ready to use“ disperze, jejíž složení je uvedeno v Tabulce 1 (procentuální složení se může mírně lišit v závislosti na výrobní šarži). V rámci bakalářské práce byla tato nano formulace zkoumána ve vzorcích od dvou různých dodavatelů DSM a BASF. DSM ve svém portfoliu nabízí nano MBBT pod názvem PARSOL® Max a BASF pod označením Tinosorb® M. Účelem analýzy tak nebyla jen charakterizace jednotlivých vzorků, ale také jejich vzájemné porovnání.

5.2.1 SEM

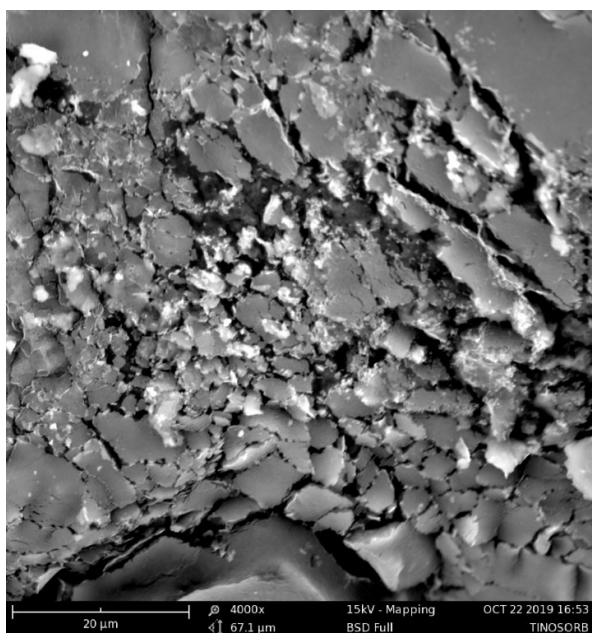
Na mikroskopických snímcích získaných pomocí skenovací mikroskopie lze pozorovat odlišnou strukturu obou vzorků. Rozdílná morfologie tak může být z jedním z důvodů rozdílného chování PARSOLU® Max a Tinosorbu® M, přestože mají obdobné složení. Vzhled částic na výsledných snímcích mohl být také ovlivněn přítomností xantanové gumy ve formulaci obou vzorků.



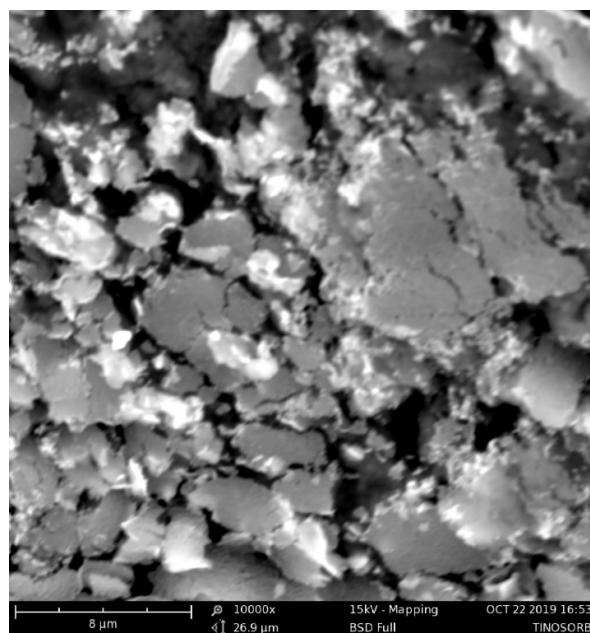
Obrázek 17 SEM snímek vzorku PARSOL® Max, zvětšení 4000×



Obrázek 18 SEM snímek vzorku PARSOL® Max, zvětšení 10000×



Obrázek 19 SEM snímek vzorku Tinosorb® M, zvětšení 4000×



Obrázek 20 SEM snímek vzorku Tinosorb® M, zvětšení 10000×

5.2.2 Stanovení velikosti částic v Di – H₂O

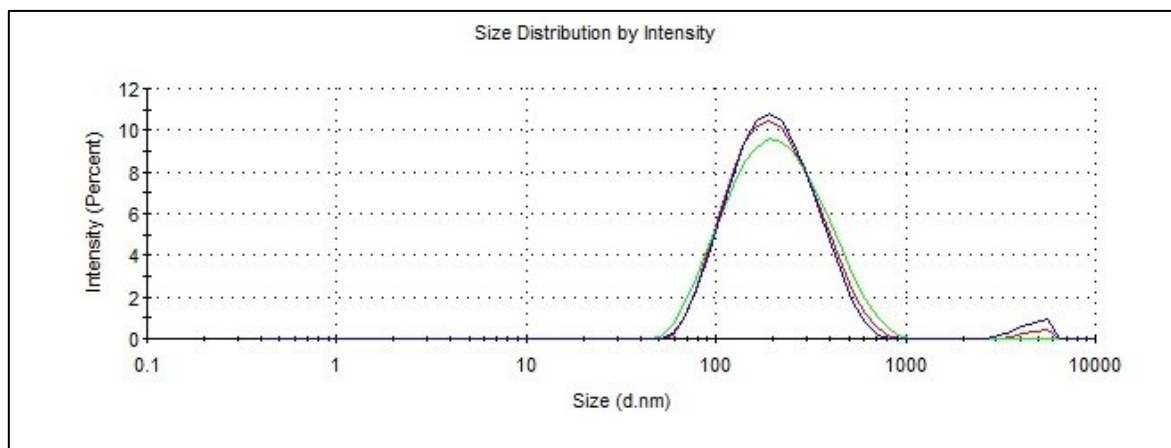
Metoda DLS

Nejprve byla určena primární velikost částic vzorků PARSOL® Max a Tinosorb® M v disperzním prostředí demineralizované vody (Tabulka 13). Obdobně jako u vzorku TiO₂ anatas byla velikost částic stanovena metodou DLS za použití přístroje Zetasizer Nano ZS90.

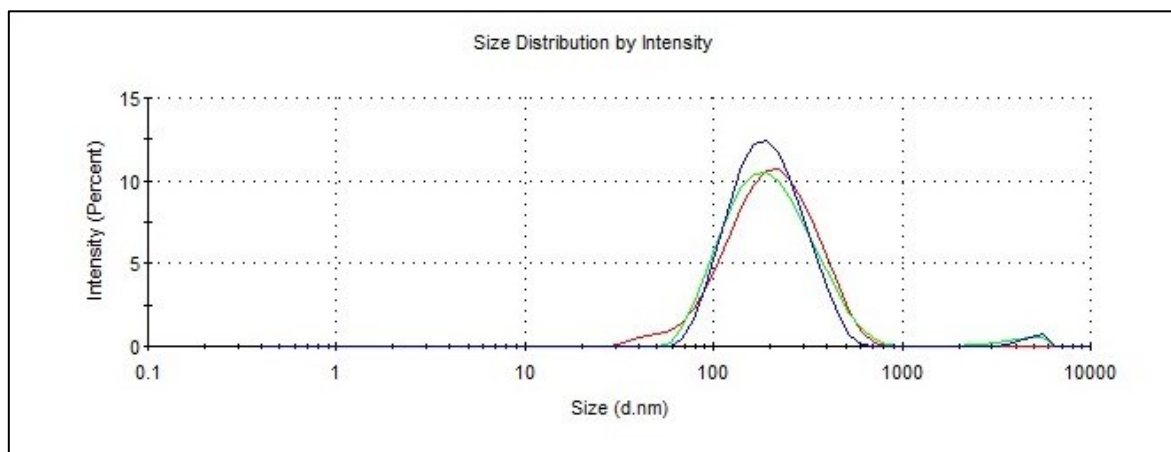
Získané hodnoty velikosti částic vyjádřené jako z-average se u obou vzorků výrazně nelišily. Zatímco průměrná velikost částic vzorku PARSOL® Max byla $180,4 \pm 0,3$ nm, průměrná velikost částic vzorku Tinosorb® M dosahovala $176,1 \pm 0,5$ nm. Hodnoty PDI obou disperzí naznačovaly polydisperzitu obou systémů, avšak nepoukazovaly na žádný markantní rozdíl mezi oběma vzorky. Distribuční křivky uvedené na Obrázcích 21 a 22 potvrzují rovněž polydisperzitu obou vzorků, a lze na nich rovněž vidět, že obě měřené disperze obsahují částice s velikostí spadající do mikronové oblasti a svou velikostí jsou na hranici detekce použitého přístroje.

Tabulka 13 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorky bisoctrizolu PARSOL® Max a Tinosorb® M dispergovaných v Di – H₂O s neadjustovaným pH. Metoda DLS.

Vzorek	Z-average [nm]	PDI
PARSOL® Max	180,2	0,228
	180,4	0,232
	180,7	0,254
Průměr	180,4	0,238
SD	0,3	0,014
Tinosorb® M	176,1	0,243
	176,6	0,240
	175,7	0,222
Průměr	176,1	0,235
SD	0,5	0,011



Obrázek 21 Distribuční křivky velikosti částic bisoctrizolu vzorku PARSOL® Max dispergovaném v Di – H₂O



Obrázek 22 Distribuční křivky velikosti částic bisoctrizolu vzorku Tinosorb® M dispergovaném v Di – H₂O

Metoda laserové difrakce

Při dispergaci vzorků PARSOL® Max a Tinosorb® M ve fyziologických médiích a simulovaných tělních tekutinách došlo k okamžité aglomeraci částic a vzniku aglomerátů, jejichž velikost přesahovala mez detekce přístroje Zetasizer Nano ZS90 využívajícího metodu DLS. Pro spolehlivé stanovení velikosti částic v těchto aglomerovaných vzorcích byl proto místo něj použit Mastersizer 3000, který měří velikost částic pomocí laserové difrakce a je vhodný pro analýzu částic v širokém rozmezí velikostí, od jednotek nanometrů až do stovek mikronů. Pro porovnání chování nanočástic obou vzorků bisoctrizolu v různých médiích, musela být nejprve znovu určena velikost částic PARSOLU® Max a Tinosorbu® M v disperzním prostředí tvořeném Di–H₂O, avšak pomocí

Mastersizeru 3000. Na základě analýzy velikosti částic bylo zjištěno, že průměrná velikost částic D [4;3] PARSOLU® Max činila $192 \pm 7 \mu\text{m}$ a Tinosorbu® M $170 \pm 18 \mu\text{m}$. Mezi hodnotami získanými Zetasizerem Nano ZS90 a Mastersizer 3000 je už na první pohled rozdíl, ale obě techniky vedou ke správným výsledkům, které vycházejí z jejich rozdílné povahy a principu měření. Je důležité zohlednit fakt, že Mastersizer 3000 měří objemově vážený průměr velikosti částic (D [4;3]) v širokém rozsahu velikostí. Obsahuje-li tedy disperze částice jak malých, tak velkých rozměrů, větší částice zabírají značně větší část objemu vzorku. Citlivost na přítomnost částic velkých rozměrů je tedy vysoká, zatímco částice malých rozměrů mohou být snadno zanedbány. Hodnota z-average, měřená pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS90, pak vyjadřuje intenzitně vážený průměr velikosti částic, avšak mez detekce této techniky leží v oblasti $\sim 5 \mu\text{m}$, větší částice nejsou tímto přístrojem detekovány a jejich velikost tedy „nepřispívá“ k celkové stanovené velikosti částic v disperzi.

Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele, ve svém stanovisku o Methylen bis-Benzotriazolyl Tetra methylbutylphenolu (bisotrizolu) v nano formě [24], prezentoval stanovení velikosti částic tohoto UV filtru za využití metodiky validované studií Herzoga a kol. [35]. Primární velikost částic byla v této práci určena v 2% disperzi nano MBBT v dioxanu. V souladu se studií Herzoga a kol. byla použita metoda FOQELS (kvazielastického rozptylu světla s optickými vlákny), která je založena na měření fluktuací intenzity zpětně rozptýleného světla disperze částic, avšak s úhlem rozptylu 180° . Toto experimentální nastavení umožňuje měření při vysokých koncentracích částic ($> 1\%$) a je vhodné pro analýzu velikosti částic v rozmezí 10 až 500 nm. Velikost částic Tinosorbu® M v dioxanu byla ve stanovisku uvedena jako střední hodnota distribuce velikosti částic vážená objemem $d(0.5)$, jejíž hodnota byla $150 \pm 9 \text{ nm}$. Výsledky zmíněné ve stanovisku se výrazně neodlišují od výsledků prezentovaných v rámci bakalářské práce získaných metodou DLS (Tabulka 13) a pozorovaný rozdíl může být způsoben hned několika faktory. Prvním je použití jiného disperzního prostředí; je třeba předpokládat, že částice nano MBBT se mohou v disperzním prostředí tvořeném dioxanem chovat jinak než v prostředí demineralizované vody. Druhým je využití techniky FOQELS, která je schopna analyzovat velikost částic pouze do 500 nm. Konečně třetím faktorem je uvedení velikosti částic formou mediánu, místo celkového průměru objemově vážené velikosti částic, který je použit v této bakalářské práci. Posledním faktorem, kterým je možné rozdílné výsledky zdůvodnit, je použití jiné koncentrace nano formy bisotrizolu v obou pracích.

Tabulka 14 Průměrné hodnoty velikosti částic spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorky bisoctrizolu PARSOL® Max a Tinosorb® M dispergovaných v Di – H₂O s neadjustovaným pH. Metoda laserové difrakce.

Vzorek	D [4;3] [μm]
PARSOL® Max	193
	184
	197
Průměr	192
SD	7
Tinosorb® M	178
	150
	183
Průměr	170
SD	18

5.2.3 Stanovení velikosti částic ve fyziologických médiích

Jak již bylo zmíněno, analýza velikosti částic obou vzorků bisoctrizolu byla vzhledem k velké aglomeraci ve všech fyziologických tekutinách provedena pomocí Mastersizeru 3000. Při měření je automatické jednotka přístroje naplněna demineralizovanou vodou a zároveň dochází k neustálému míchání vzorku míchadlem, jehož funkce spočívá v dopravení disperze do měřicí cely. Z těchto důvodů (míchání brání aglomeraci) nebylo chování vzorků studováno v závislosti na čase, ale pouze ihned po smíchání vzorků s jednotlivými fyziologickými médii.

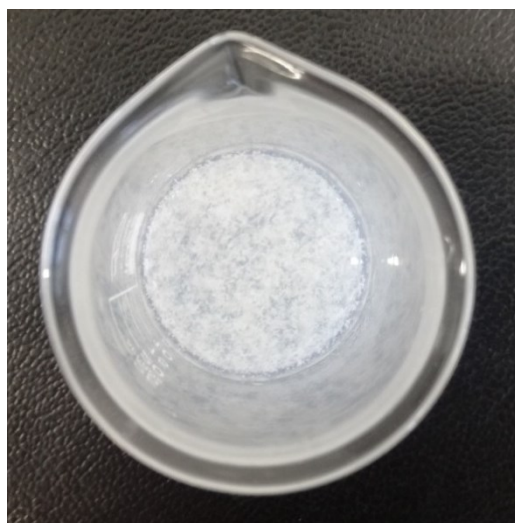
Ihned po vystavení obou vzorků nano MBBT disperznímu prostředí, které bylo tvořeno PBS došlo k velké aglomeraci částic. Přestože vizuálním pozorováním vzorků (Obrázek 23 a 24) se aglomeráty PARSOLU® Max zdály větší než Tinosorbu® M, jejich průměrná velikost částic, stanovená laserovou difrakcí jako D [4;3] 799±215 μm, byla menší než průměrná velikost částic Tinosorbu® M 1380±50 μm. I v růstovém médiu (DMEM) bez séra došlo výrazné aglomeraci vzorků. Vizuálně se opět zdála větší v případě PARSOLU® Max (Obrázek 25 a 26), avšak naměřené hodnoty průměrů velikosti částic 1050±145 μm

u PARSOLU® Max a $1260 \pm 44 \mu\text{m}$ u Tinosorbu® M neprokázaly mezi velikostmi částic obou vzorků v DMEM bez séra větší rozdíl. Na základě vizuálního pozorování lze říci, že i přes podobnou, či menší velikost částic PARSOLU® Max oproti částicím Tinosorbu® M, byl vzhled disperzí značně rozdílný. Nesoulad mezi vizuálním pozorováním a výsledky z instrumentálního měření mohl být způsoben metodikou užívanou při difrakčním měření, které probíhá za kontinuálního míchání disperze. V případě PARSOLU se sice jeho částice shlukují do větších aglomerátů, lze však spekulovat, že jsou v nich vázány slabšími silami silami/interakcemi a při mechanickém namáhání v Mastersizeru dochází k jejich rozpadu. V DMEM s přidáním 10% telecím sérem, podobně jak u vzorku TiO_2 anatas, sice došlo i v případě PARSOLU® Max a Tinosorbu® M k tvorbě aglomerátů, které však byly, oproti DMEM bez séra, zřetelně menší. U PARSOLU® Max byla naměřená hodnota $D [4;3] 570 \pm 65 \mu\text{m}$ a změna byla možná vidět i vizuálně (Obrázek 27), kdy se disperze při vizuálním pozorování zdála více homogenní. V případě vzorku Tinosorb® M byl vliv séra na velikost ještě markantnější, průměrná velikost částic byla $12,5 \pm 1,0 \mu\text{m}$, tedy dokonce menší než v demineralizované vodě.

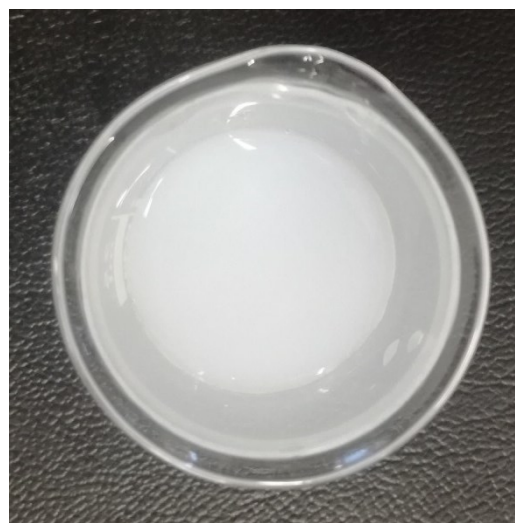
Vzhledem k výše popsaným pozorováním lze předpokládat, že v médiu se sérem došlo k adsorpci sérových proteinů na povrch nanočástic, čímž byla vytvořena již zmíněná proteinová korona. Tvorba proteinové korony je složitý proces a závisí na mnoha faktorech, mezi které patří nejen složení, velikost, tvaru a povrchové vlastnosti nanočástic, ale i doba expozice, typ média, poměr množství nanočástic k množství proteinů, typ proteinů a přítomnosti iontů v médiu. Vzhledem ke složitosti a specifitě je charakterizace proteinové korony v různých médiích, či *in vivo* systémech značně komplikovaná. Je však důležité si uvědomit, že proteinová korona může mít pozitivní účinky, kdy afinita nanočástic k proteinům může kompenzovat destabilizační síly, způsobené vysokou iontovou silou a napomáhat tak ke stabilizaci systémů [36]. Avšak může mít i negativní účinky, kdy adsorpcí proteinů na povrch nanočástice může dojít k jejich konformační změně, která může vést k patologickým dějům v organismu [37]. Z výsledků je patrné, že proteinová korona má na chování částic nano formy bisoctrizolu velký vliv, a studium těchto interakcí by zasluhovalo více pozornosti.

Tabulka 15 Průměrné hodnoty objemově vážené velikosti částic D [4;3] spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorky bisoctrizolu PARSOL® Max a Tinosorb® M dispergovaných ve fyziologických médiích

Disperzní prostředí	PARSOL® Max		Tinosorb® M	
	D [4;3] [μm]		D [4;3] [μm]	
	Průměr	SD	Průměr	SD
PBS	799	215	1380	50
DMEM bez séra	1050	145	1260	44
DMEM se sérem	570	65	12,5	1,0



Obrázek 23 PARSOL® Max dispergovaný v PBS



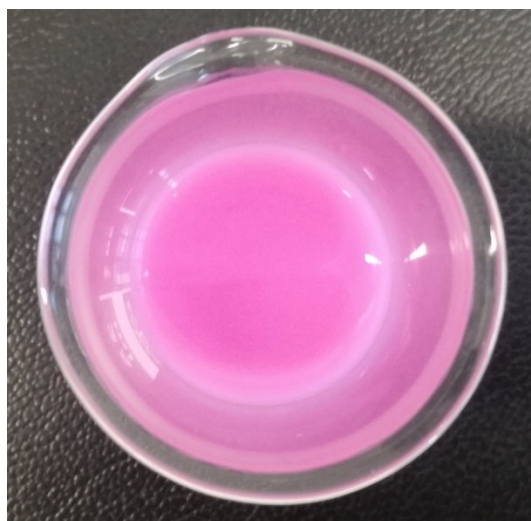
Obrázek 24 Tinosorb® M dispergovaný v PBS



Obrázek 25 PARSOL® Max dispergovaný v DMEM bez séra



Obrázek 26 Tinosorb® M dispergovaný v DMEM bez séra



Obrázek 27 PARSOL® Max dispergovaný v DMEM s 10% telecím sérem



Obrázek 28 Tinosorb® M dispergovaný v DMEM s 10% telecím sérem

5.2.4 Stanovení velikosti částic v simulovaných gastrointestinálních tekutinách

Ze stejných důvodů jako u fyziologických médií byla pro charakterizaci velikosti částic bisoctrizolu v simulovaných gastrointestinálních tekutinách zvolena metoda laserové difrakce (Tabulka 16).

První simulovanou gastrointestinální tekutinou, ve které bylo sledováno chování částic obou vzorků nano MBBT, byly simulované sliny (pH=6,9). Ihned po smíchání simulovaných slin jak s PARSOLEM® Max, tak s Tinosorbem® M poukázovaly naměřená hodnoty velikosti $D [4;3]$ na vznik aglomerátů. Průměrná hodnota $D [4;3]$ PARSOLU® Max byla $989 \pm 188 \mu\text{m}$ a průměrná hodnota $D [4;3]$ Tinosorbu® M byla $739 \pm 140 \mu\text{m}$.

V prostředí simulované střevní tekutiny s pH 6,8 došlo také k aglomeraci částic. Aglomeráty PARSOLU® Max dosahovaly průměrná velikosti částic $D [4;3] 850 \pm 138 \mu\text{m}$. Jejich velikost tak byla srovnatelná s aglomeráty stejného vzorku v disperzním prostředí simulovaných slin. Částice vzorku Tinosorb® M však oproti aglomerátům vzniklým v simulovaných slinách dosahovaly po kontaktu se SIF výrazně menších hodnot $D [4;3]$, a to $363 \pm 93 \mu\text{m}$. Mezi vzorky mohl být pozorován rozdíl i vizuálně (Obrázek 29 a 31), kdy u PARSOLU® Max byly pouhým okem vidět bílé aglomeráty.

Zatímco přítomnost pankreatinu v SIF u vzorku TiO_2 aglomeraci částic podpořila, u obou vzorků bisoctrizolu způsobil přidavek tohoto enzymu opačný jev. Naměřená hodnota $D [4;3]$ PARSOLU® Max klesla v SIF s pankreatinem na $239 \pm 16 \mu\text{m}$ a u vzorku Tinosorb® M dokonce $182 \pm 9 \mu\text{m}$, tedy na podobnou velikost, jakou měl Tinosorb® M v $\text{Di} - \text{H}_2\text{O}$. V případě PARSOLU® Max dispergovaném v SIF s pankreatinem došlo i k vizuální změně, aglomeráty již nebyly viditelné okem (Obrázek 29).

V disperzním prostředí simulované žaludeční tekutiny s pH 1,2 u obou vzorků nano-filtrů došlo k tvorbě největších aglomerátů, avšak ve srovnání s chováním v SIF se oba vzorky chovaly velmi podobně (Obrázek 30, 32). Průměrná velikost částic PARSOLU® Max byla $1130 \pm 51 \mu\text{m}$ a průměrná velikost částic Tinosorbu® M dosahovala $1190 \pm 17 \mu\text{m}$. Při dispergování částic obou vzorků v SGF s pepsinem se stejným pH jako bez pepsinu opět došlo k poklesu velikosti aglomerátů a to na $663 \pm 45 \mu\text{m}$ u PARSOLU® Max a $686 \pm 64 \mu\text{m}$ v případě Tinosorbu® M. Disperze PARSOLU® Max v SGF s pepsinem opět byla vizuálně odlišná od disperze stejného vzorku v SGF bez pepsinu. Na základě těchto výsledků lze tedy konstatovat, že enzymy u obou vzorků sloužily ve zkoumaných simulovaných tělních tekutinách jako dispergační činidla a opět se zde uplatnila jejich funkce při tvorbě ochranné proteinové korony.

Srovnání průměrných velikostí částic/aglomerátů $D [4;3]$ obou filtrů je přehledně uvedeno na Obrázku 33.

Tabulka 16 Průměrné hodnoty objemově vážené velikosti částic D [4;3] spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorky bisoctrizolu PARSOL® Max a Tinosorb® M dispergovaných v simulovaných gastrointestinálních tekutinách

Disperzní prostředí	PARSOL® Max		Tinosorb® M	
	D [4;3] [μm]		D [4;3] [μm]	
	Průměr	SD	Průměr	SD
Simulované sliny	989	188	739	140
SIF	850	138	363	93
SIF s pankreatinem	239	16	182	9
SGF	1130	51	1190	17
SGF s pepsinem	663	45	686	64



Obrázek 29 PARSOL® Max dispergovaný v SIF (vlevo) a v SIF s pankreatinem (vpravo)



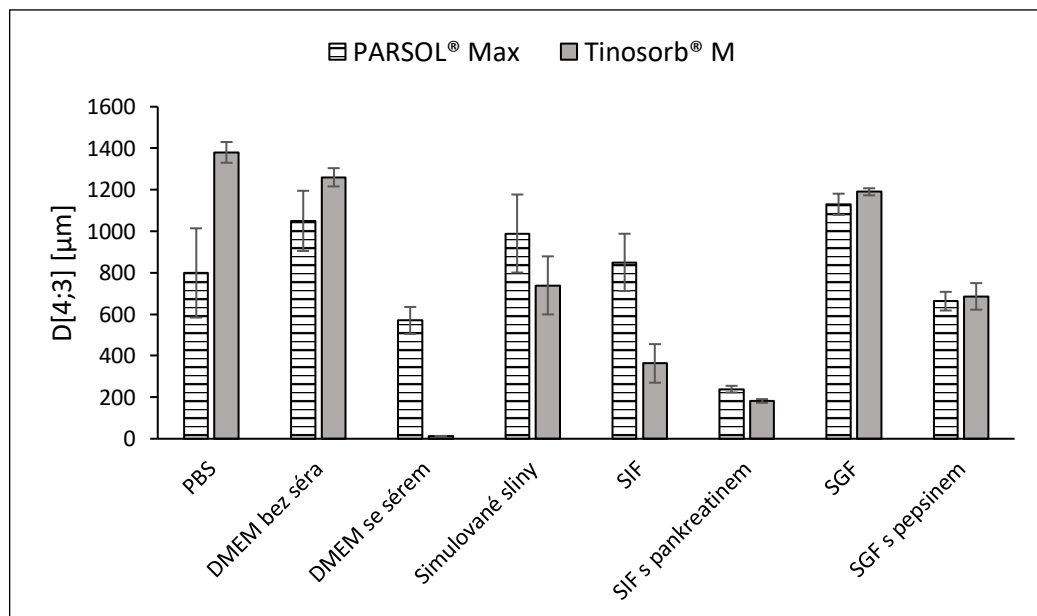
Obrázek 30 PARSOL® Max dispergovaný v SGF (vlevo) a v SGF s pesinem (vpravo)



Obrázek 31 Tinosorb® M dispergovaný v SIF (vlevo) a v SIF s pankreatinem (vpravo)



Obrázek 32 Tinosorb® M dispergovaný v SGF (vlevo) a v SGF s pesinem (vpravo)

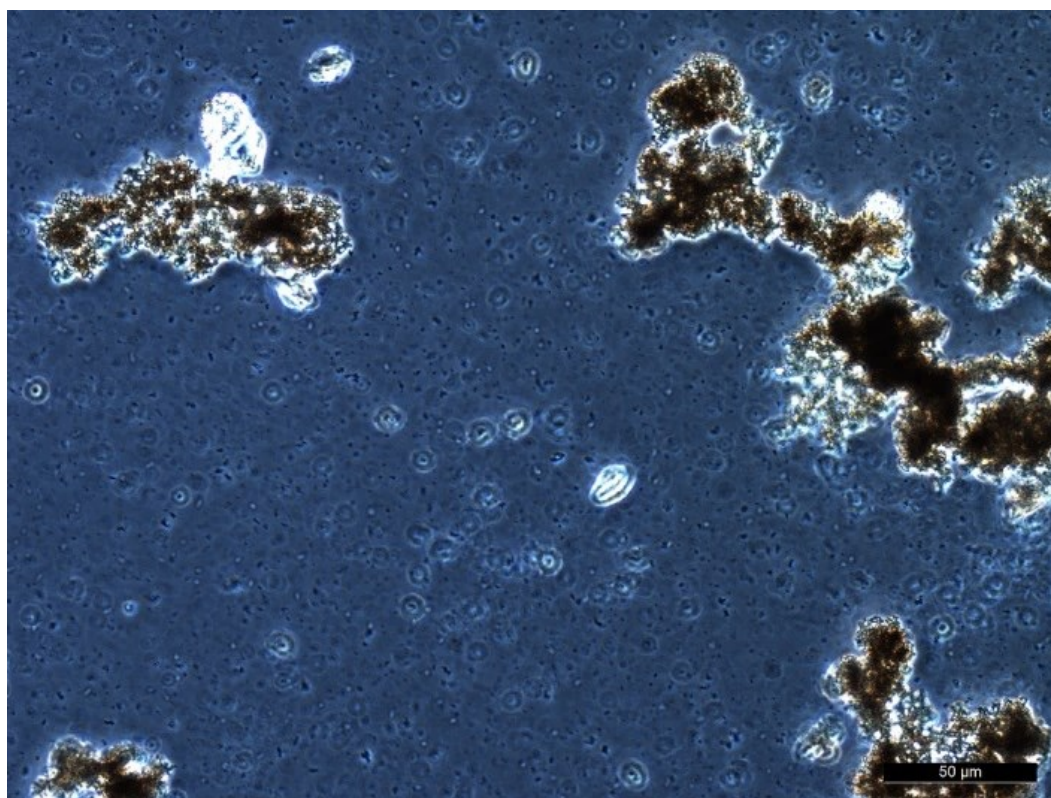


Obrázek 33 Srovnání průměrných velikostí částic/aglomerátů D [4;3] ve studovaných disperzních médiích

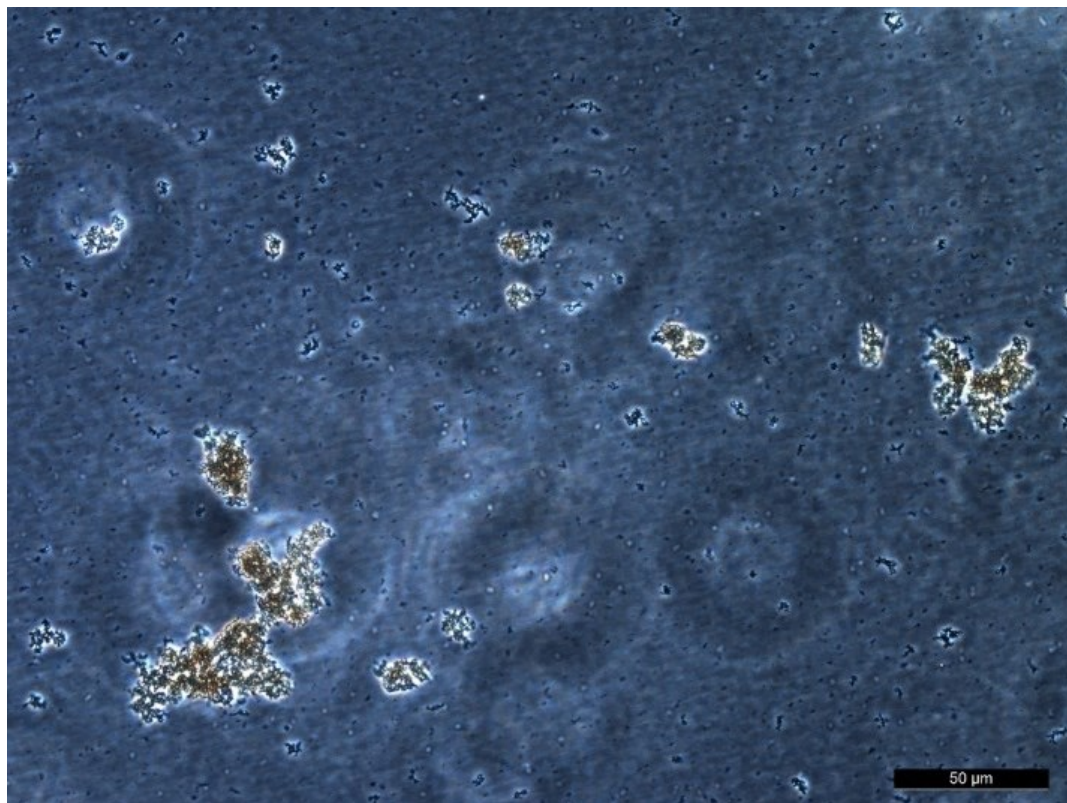
5.2.5 Pozorování aglomerátů simulovaných gastrointestinálních tekutinách

Aglomeráty PARSOLU® Max byly v prostředí simulovaných slin, SIF a SGF sledovány i optickým mikroskopem (Obrázky 34–36). Z mikroskopických snímků je zřejmé, že aglomeráty měly ve všech těchto simulovaných tekutinách podobný, nepravidelný tvar, a lišily se pouze velikostí.

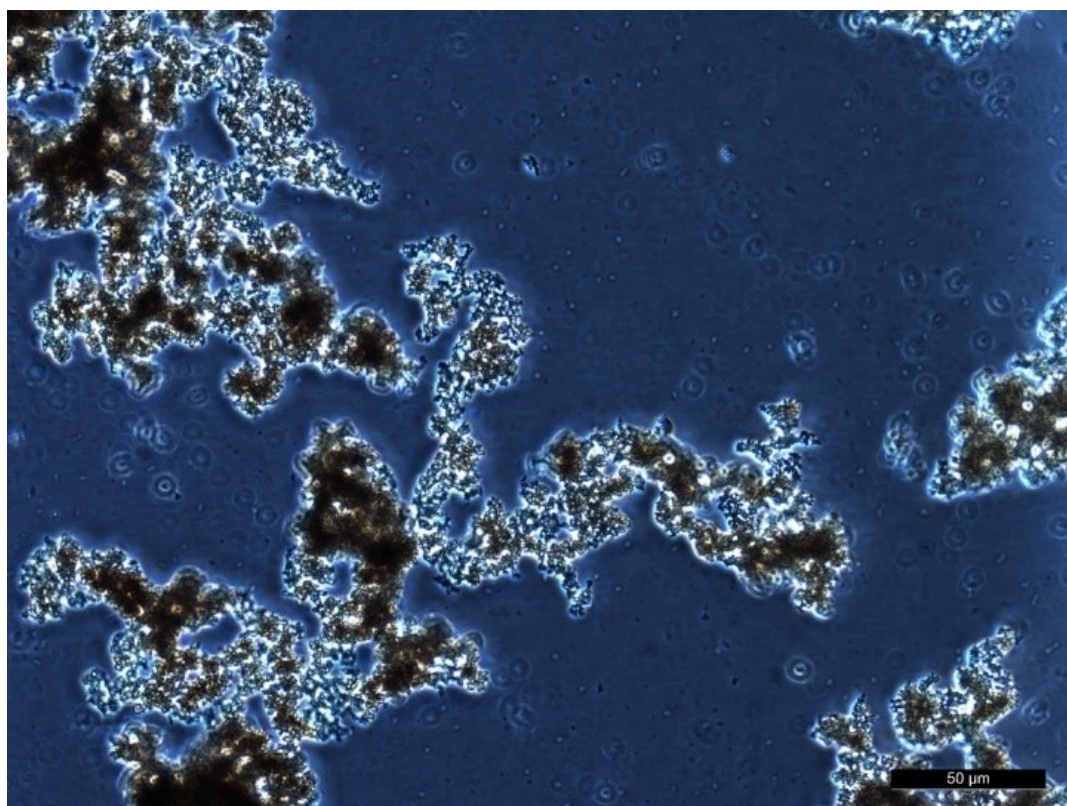
V souvislosti s pozorovanou aglomerací je třeba poznamenat, že bisoctrisol představuje komplexní formulaci, která obsahuje nejen vlastní aktivní látku MBBT v mikronizovaném stavu, ale i další složky (viz Tabulka 1). Z hlediska vlastností celého UV filtru je zde zajímavá především přítomnost xantanové gumy. Tento biopolymer, polysacharid ve formulaci významně ovlivňuje chování bisoctrizolu, jelikož zde funguje jako ochranný koloid, který vytvoří na povrchu částice adsorpční vrstvu zamezující jejich agregaci. Poskytuje tedy MBBT částicím tzv. sterickou stabilizaci



Obrázek 34 Aglomeráty PARSOLU® Max disperzním prostředí simulovaných slin



Obrázek 35 Aglomeráty PARSOLU® Max disperzním prostředí SIF



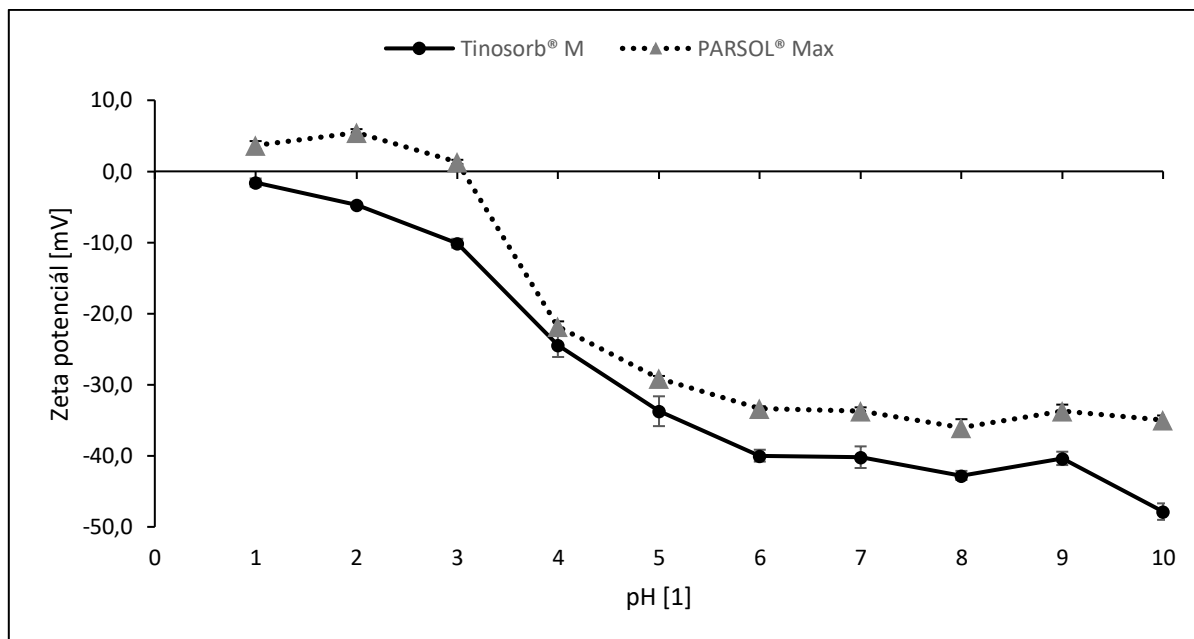
Obrázek 36 Aglomeráty PARSOLU® Max disperzním prostředí SGF

5.2.6 Zeta potenciál

Dalším parametrem, kterým byly popsány vlastnosti obou vzorků, byl zeta potenciál stanovený ve vodném dispersním prostředí s různým pH. Hranice stability disperzí (zeta potenciál nižší než -30 mV) byla u vzorku PARSOLU® Max dosažena v prostředí s pH 6–10 a u vzorku Tinosorbu® M v prostředí s pH 5–10. Oba vzorky by tedy, teoreticky, v blízkosti fyziologického pH měly tvořit stabilní disperze. Výsledky charakterizace vzorků nano MBBT v gastrointestinálních tekutinách však potvrzují, že elektrostatická stabilizace je pouze jednou z mnoha složek přispívajících ke stabilitě disperzí. Přestože simulované sliny a SIF byly adjustovány na hodnotu pH 6,8, došlo ve zmíněných tekutinách k značné aglomeraci částic jak PARSOLU® Max, tak Tinosorbu® M. V případě SGF s pH 1,2 však byla aglomerace částic výraznější, toto chování pravděpodobně souvisí s hodnotou pH 1,2, při které je zeta potenciál obou vzorků blízký nule a dochází tak k oslabení odpudivých sil mezi částicemi.

Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele se v již zmíněném stanovisku zabývá i analýzou zeta potenciálu[24]. Hodnota zeta potenciálu Tinosorbu® M byla stanovena metodou elektroakustické spektroskopie a při fyziologickém pH byla určena na -25 mV. Tedy výrazně méně než hodnota $-40,2$ mV, která byla stanovena v rámci bakalářské práce, avšak tento rozdíl mohl být způsoben jak využitím jiných metod, tak částečně charakterizací jiné šarže. Vědecký výbor však i zmíněnou nižší hodnotu označil ve svém dokumentu jako výhodnou pro stabilitu disperze.

Srovnání závislosti zeta potenciálu vs pH pro samotnou xantanovou gumu s výsledky v bakalářské práci ukazuje, že právě přítomnost xantanové gumy je parametrem, který hodnotu zeta potenciálů řídí. Autoři práce [38] stanovili hodnotu zeta potenciálu při fyziologickém pH pomocí stejné metody, která je použita v této bakalářské práci na -60 mV, což je hodnota nižší než ~ 40 mV stanovených pro bisotrizol. Pozorovaný rozdíl lze potom logicky přičíst vlivu ostatních složek přítomných ve formulaci.



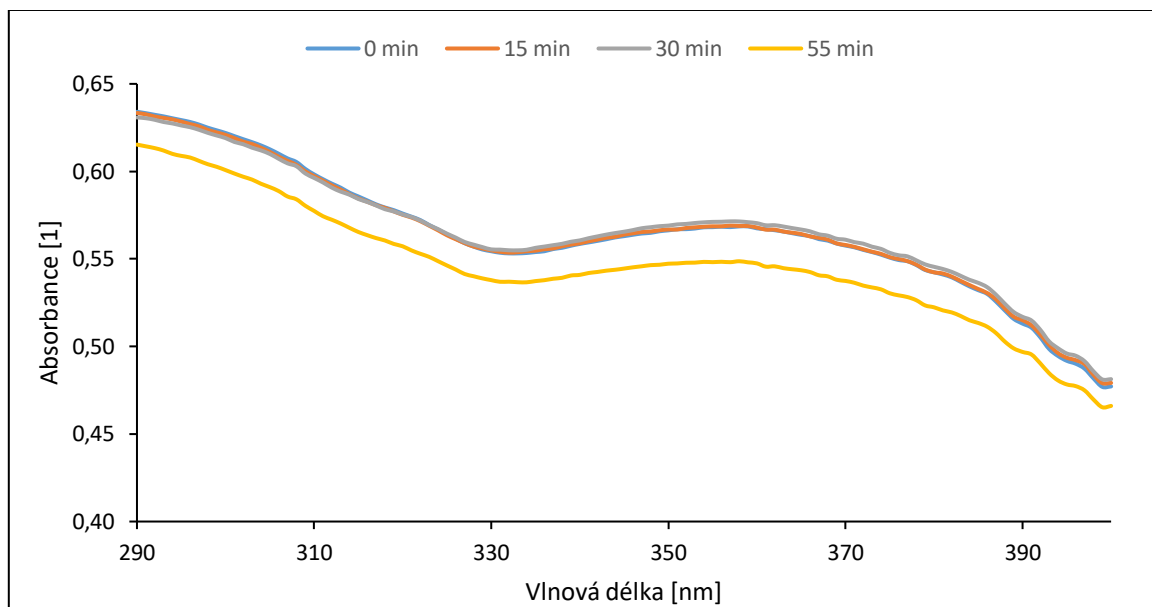
Obrázek 37 Závislost velikosti zeta potenciálu disperze vzorků bisoctrizolu PARSOL® Max a Tinosorb® M na pH

5.2.7 Fotostabilita

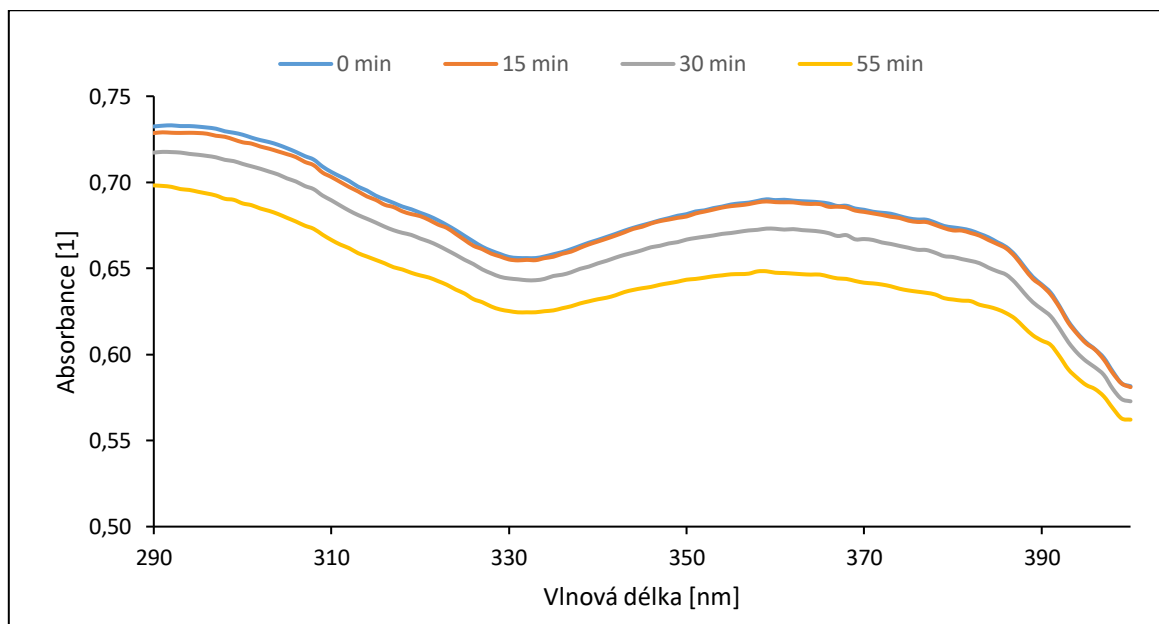
Přestože byly vzorky PARSOL® Max a Tinosorb® M obdobného složení, jejich chování po ozáření bylo odlišné. Tinosorb® M se projevil jako více fotostabilní a u vzorku vystavenému simulovanému slunečnímu záření po dobu 15 a 30 minut, nedošlo téměř k žádné změně schopnosti absorbovat UV záření v porovnání s neozářeným vzorkem. K poklesu schopnosti pohlcovat UV paprsky došlo až po 55 minutové expozici záření (Obrázek 38). PARSOL® Max v porovnání s Tinosorbem® M vykazoval menší fotostabilitu (Obrázek 39). Znatelný úbytek v množství absorbovaného záření byl viditelný již po 30 minutovém ozáření a k dalšímu poklesu došlo i po 55 minutách. Při přípravě vzorků pro stanovení fotostability se nepodařilo jak u PARSOLU® Max, tak Tinosorbu® M vytvořit jejich zcela homogenní disperzi v glycerolu. Přesnou koncentraci studovaných částic v konečné disperzi tedy nebylo možné přesně určit, což znesnadňuje porovnání účinnosti studovaných vzorků. Lze však konstatovat, že oba UV filtry poskytují ochranu jak před UVB, tak i UVA zářením.

Bližší posouzení výsledků ukazuje, že na absorpčních křivkách lze u obou vzorků pozorovat dvě plochá maxima. První, více zřetelné u vzorku PARSOL® Max, se nachází při ~ 295 nm a druhé při ~ 360 nm. Obdobné výsledky publikovali i autoři Herzog a kol. v již zmiňované studii [35], kde navíc zjistili, že se poloha těchto maxim mění v závislosti na velikosti částic MBBT ve vzorku a na fyzikální formě připraveného vzorku (zda se jedná o roztok,

či disperzi). Vědecký výbor ve svém prohlášení tyto spektrální změny zdůvodňuje elektronovými interakcemi chromoforů v částicích. První maximum pohybující se ~ 305 nm (v BP stanoveno ~ 295 nm) vzniká lokálním přechodem elektronů uvnitř benzotriazolové skupiny, zatímco maximum nacházející se ~350 nm (v BP stanoveno ~ 360 nm) souvisí s přechodem $\pi-\pi^*$ mezi vazebným a antivazebným molekulárním orbitalem [24].



Obrázek 38 Závislost absorbance vzorku bisoctrizolu Tinosorb® M na vlnové délce záření po různé době expozice UV záření



Obrázek 39 Závislost absorbance vzorku bisoctrizolu PARSOL® Max na vlnové délce záření po různé době expozice UV záření

ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byly popsány základní fyzikálně chemické a biologické vlastnosti nanočástic a jejich využití v přípravcích na ochranu kůže proti UV záření.

Hlavním cílem bakalářské práce pak byla praktická charakterizace vlastností třech vzorků nano UV filtrů: TiO₂ anatas, PARSOL® Max a Tinosorb® M (oba bisoctrizol) v disperzních prostředích, se kterými mohou přijít do kontaktu buď při *in vitro* a *in vivo* testování, nebo při kontaktu s lidským organismem.

Ihned po kontaktu s fyziologickými médii PBS a DMEM bez séra, došlo u všech vzorků k aglomeraci částic, a to vlivem stínění jejich povrchového náboje, které je vyvoláno přítomností solí v obou médiích. Tento jev může zásadně ovlivnit dispergaci částic pro toxikologické testování a tím snížit vypovídací schopnost získaných toxikologických výsledků. Jako možné řešení se ukázalo přidání telecího séra, kdy v disperzním prostředí DMEM s 10% telecím sérem došlo ke stabilizaci částic, a to zřejmě vytvořením proteinové korony, která nanočástice stericky stabilizovala, a tím bránila jejich aglomeraci.

V simulovaných gastrointestinálních tekutinách se chování různých vzorků nano UV filtrů lišilo více. Důvodem bylo jednak rozdílné složení simulovaných tekutin co do přítomnosti solí, ale také rozdílný průběh závislosti zeta potenciálu na pH. Hodnota zeta potenciálu nanočástic TiO₂ anatas v oblasti fyziologického pH ležela v blízkosti -20 mV a při pH 1,2 (SGF) v blízkosti +20 mV. Vzorky PARSOLU® Max a Tinosorbu® M dosahovaly při fyziologickém pH stabilních hodnot zeta potenciálu -40 mV, a naopak při pH 1,2 byla hodnota zeta potenciálu blízká nule, což je oblast, ve které lze předpokládat výskyt nestabilních disperzí. To se projevilo i na velikosti částic/aglomerátů v jednotlivých tekutinách. Rozdílné chování bylo pozorováno i v médiích po přidání enzymům (SIF a SGF). Částice vzorku TiO₂ anatas v prostředí s enzymy aglomerovaly ve srovnání s prostředím bez enzymů více, avšak vzorky PARSOLU® Max a Tinosorbu® M aglomerovaly v prostředí s enzymy srovnatelně, či dokonce méně, což lze pravděpodobně přičíst přítomnosti proteinové korony.

Přestože PARSOL® Max a Tinosorb® M představují vzorky s obdobnou formulací, je důležité zmínit, že jejich chování ve fyziologických a simulovaných tělních tekutinách se od sebe lišilo. Nejvíce byl tento rozdíl patrný z vizuálního pozorování, kdy byl PARSOL® Max v disperzních prostředích bez proteinů optickým pozorováním vyhodnocen jako nehomogenní, zatímco Tinosorb® M tuto vlastnost nevykazoval. Jako zásadní se pro

chování vzorků PARSOL® Max a Tinosorb® M ukázala přítomnost xantanové gumy v jejich formulaci a afinita k tvorbě ochranné proteinové korony.

Výsledky bakalářské práce mohou v praxi sloužit jako podklad pro provádění testů biokompatibility a pro lepší pochopení chování částicových UV filtrů v kontaktu se simulovanými tělními tekutinami a médii.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] JEEVANANDAM, Jaison, Ahmed BARHOUM, Yen S CHAN, Alain DUFRESNE a Michael K DANQUAH. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2018, 9, s. 1051-1066. DOI: 10.3762/bjnano.9.98. ISSN 2190-4286. Dostupné z: <https://www.beilstein-journals.org/bjnano/articles/9/98>
- [2] KHEZRI, Khadijeh, Majid SAEEDI a Solmaz MALEKI DIZAJ. Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018, 106, s. 1499. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.084. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218328713>
- [3] Nanoparticle technology handbook. Editor Masuo HOSOKAWA. Amsterdam: Elsevier, 2007, s. s. 5-9. ISBN 978-0-444-53122-3.
- [4] Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1223/2009 Sb. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=CShttps://eur-lex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=CS>
- [5] Doporučení Evropské komise 2011/696/EU. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:CS:PDF>
- [6] EMR/ESR/EPR spectroscopy for characterization of nanomaterials. Editor Ashutosh Kumar SHUKLA. New Delhi: Springer (India), 2017, s. 58. *Advanced structured materials*. ISBN 978-81-322-3653-5.
- [7] ZHANG. *Physical Fundamentals of Nanomaterials*. Elsevier, 2018, s. 291. DOI: 10.1016/C2012-0-02139-4. ISBN 9780124104174
- [8] HUANG, Xiaohua a Mostafa A. EL-SAYED. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*. 2010, 1(1), s. 14-15. DOI: 10.1016/j.jare.2010.02.002. ISSN 20901232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123210000056>

- [9] PEIRIS, Sunari, John MCMURTRIE a Huai-Yong ZHU. Metal nanoparticle photocatalysts: emerging processes for green organic synthesis. *Catalysis Science & Technology*. 2016, 6(2), s. 322. DOI: 10.1039/C5CY02048D. ISSN 2044-4753. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5CY02048D>
- [10] MALVERN INSTRUMENTS LTD. Stabilita suzpenzí a disperzí – Proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité? *Chemagazín*. 2011, vol. 21, issue 4, s. 14. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_4_cl3.pdf
- [11] SELVAMANI, Vijayakumar. Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*. Elsevier, 2019, s. 436-440. DOI: 10.1016/B978-0-12-814031-4.00015-5. ISBN 9780128140314. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128140314000155>
- [12] Kvítek Libor. *Metody studia koloidních soustav*. Studijní materiály UPOL, 2006, s. 20. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf>
- [13] BIRDI, K. S. *Surface and Colloid Chemistry*. CRC Press, 2009, s. 156. DOI: 10.1201/b10154. ISBN 9780429142437.
- [14] FU, Peter P., Qingsu XIA, Huey-Min HWANG, Paresh C. RAY a Hongtao YU. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014, 22(1), s. 64-67. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.01.005. ISSN 10219498. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949814000064>
- [15] VLASTOU, Elena, Maria GAZOULI, Agapi PLOUSSI, Kalliopi PLATONI a Efstathios P. EFSTATHOPOULOS. Nanoparticles: nanotoxicity aspects. *Journal of Physics: Conference Series*. 2017, 931, s. 1-3. DOI: 10.1088/1742-6596/931/1/012020. ISSN 1742-6588. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/931/1/012020>
- [16] DOLEZ, Patricia I. *Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues*. Nanoengineering. Elsevier, 2015, s. 42-382. DOI: 10.1016/B978-0-444-62747-6.00001-4. ISBN 9780444627476. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444627476000014>

- [17] NISKA, Karolina, Ewelina ZIELINSKA, Marek Witold RADOMSKI a Iwona INKIELEWICZ-STEPNIAK. Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2018, 295, s. 39-40. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.06.018. ISSN 00092797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279716306299>
- [18] Catalogue of nanomaterials in cosmetic products placed on the market. Version 2: 31.12.2018. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/38284>
- [19] Miletín, M. Prostředky na ochranu pokožky proti škodlivým vlivům UV záření. *Solen*, 2011, 7(1), s. 34-38. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2011/01/09.pdf>
- [20] CORNIER, Jean, Cornelia M. KECK a Marcel VAN DE VOORDE, ed. *Nanocosmetics*. Cham: Springer International Publishing, 2019, s. 35-196. DOI: 10.1007/978-3-030-16573-4. ISBN 978-3-030-16572-7.
- [21] KLIMOVÁ, Zuzana, Jarmila HOJEROVÁ a Silvia PAŽOUREKOVÁ. Current problems in the use of organic UV filters to protect skin from excessive sun exposure. *Acta Chimica Slovaca*. 2013, 6(1), s. 82-84. DOI: 10.2478/acs-2013-0014. ISSN 1337-978X. Dostupné z: <http://content.sciendo.com/view/journals/acs/6/1/article-p82.xml>
- [22] YADAV, Hemant K.S., Susmitha KASINA a Abhay RAIZADAY. Sunscreens. *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*. Elsevier, 2016, 2016, s. 206-210. DOI: 10.1016/B978-0-323-42868-2.00009-7. ISBN 9780323428682. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323428682000097>
- [23] HULL, Matthew a Diana BOWMAN, ed., 2018. *Nanotechnology Environmental Health and Safety 3rd Edition: Risks, Regulation, and Management*. 2018, s. 392. Elsevier. ISBN 9780128135884.
- [24] SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on 2,2'-methylene-bis-(6(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol), SCCS/1546/15, 25 March 2015, revision of 25 June 2015, corrigendum of 19 January 2018, s. s. 9-20.
- [25] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 minutes*. Dostupné z: www.malvern.co.uk

- [26] HOJEROVÁ, J., A. MEDOVČÍKOVÁ a M. MIKULA. Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, 408(1-2), 27-28. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.01.040. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517311000718>
- [27] ISO 24443:2012. Dostupné z: <https://www.iso.org/standard/46522.html>
- [28] VLADÁR, András E. a Vasile-Dan HODOROABA. Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. *Characterization of Nanoparticles*. Elsevier, 2020 s. 7-10. DOI: 10.1016/B978-0-12-814182-3.00002-X. ISBN 9780128141823. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012814182300002X>
- [29] Dronzeková, Simona. Interakce nanočástic se simulovanými tělními tekutinami. 2018. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/42411/dronzekov%3a1_2018_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [30] SAGER, Tina M., Dale W. PORTER, Victor A. ROBINSON, William G. LINDSLEY, Diane E. SCHWEGLER-BERRY a Vincent CASTRANOVA. Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. *Nanotoxicology*. 2009, 1(2), s. 127-128. DOI: 10.1080/17435390701381596. ISSN 1743-5390. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390701381596>
- [31] JI, Zhaoxia, Xue JIN, Saji GEORGE, et al. Dispersion and Stability Optimization of TiO₂ Nanoparticles in Cell Culture Media. *Environmental Science & Technology*. 2010, 44(19), s. 1-6. DOI: 10.1021/es100417s. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es100417s>
- [32] SOHAL, Ikjot Singh, Young Kwan CHO, Kevin S. O'FALLON, Peter GAINES, Philip DEMOKRITOU a Dhimiter BELLO. Dissolution Behavior and Biodurability of Ingested Engineered Nanomaterials in the Gastrointestinal Environment. *ACS Nano*. 2018, 12(8), s. 8116-8120. DOI: 10.1021/acsnano.8b02978. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/dodi/10.1021/acsnano.8b02978>

- [33] JIANG, Jingkun, Günter OBERDÖRSTER a Pratim BISWAS. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*. 2009, 11(1), s. 84-87. DOI: 10.1007/s11051-008-9446-4. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-008-9446-4>
- [34] ALLOUNI, Zouhir E., Mihaela R. CIMPAN, Paul J. HØL, Tore SKODVIN a Nils R. GJERDET. Agglomeration and sedimentation of TiO₂ nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009, 68(1), s. 84. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.09.014. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776508003482>
- [35] HERZOG, Bernd, Katja QUASS, Erika SCHMIDT, Stefan MÜLLER a Helmut LUTHER. Physical properties of organic particulate UV absorbers used in sunscreens. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, 276(2), s. 355-358. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.04.009. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979704003704>
- [36] BARBERO, Francesco, Lorenzo RUSSO, Michele VITALI, et al. Formation of the Protein Corona: The Interface between Nanoparticles and the Immune System. *Seminars in Immunology*. 2017, 34, s. 52-54. DOI: 10.1016/j.smim.2017.10.001. ISSN 10445323. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532317300428>
- [37] NEL, Andre E., Lutz MÄDLER, Darrell VELEGOL, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*. 2009, 8(7), s. 546. DOI: 10.1038/nmat2442. ISSN 1476-1122. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nmat2442>
- [38] WANG, Chang-Sheng, Giovanniantonio NATALE, Nick VIRGILIO a Marie-Claude HEUZEY. Synergistic gelation of gelatin B with xanthan gum. *Food Hydrocolloids* [online]. 2016, 60, s. 375-377. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.03.043. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X16301369>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

X_M	X molární roztok
ATP	Adenosintrifosfát
CPS	Centrum polymerních systémů ve Zlíně
Di – H ₂ O	Demineralizovaná voda
DLS	Dynamický rozptyl světla
DMEM	Dubelcco's modified eagle medium
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EM	Elektroforetická mobilita
EU	Evropská unie
FOQELS	Kvazielastický rozptyl světla optickými vlákny
g	gram
GIT	Gastrointestinálním trakt
HCl	Kyselina chlorovodíková
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
K ₂ CO ₃	Uhličitan draselný
KH ₂ PO ₄	Dihydrogenfosforečnan draselný
KP	Kosmetický přípravek
λ	Vlnová délka
kV	kilovolt
l	litr
LD	Laserové difrakce
MBBT	Bisocetrizol
μ l	mikrolitr
μ m	mikrometr
ml	mililitr

mV	milivolt
NaCl	Chlorid sodný
NaNO ₃	Dusičnan sodný
NaOH	Hydroxid sodný
ng/l	nanogram na 1 litr
nm	nanometr
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PDI	Index polydisperzity
PMMA	Polymethylmetakrylát
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktivních formy kyslíku)
SD	Směrodatnými odchylka stanovení
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SGF	Simulovaná žaludeční tekutina
SIF	Simulovaná střevní tekutina
Soustava SI	Mezinárodní systém jednotek
TiO ₂	Oxid titaničitý
UK	Velká Británie
USA	Spojené státy americké
UV	Ultrafialové záření
UV filtr	Filtr ultrafialového záření
UVA	Ultrafialová záření A
UVB	Ultrafialová záření B
UVC	Ultrafialová záření C
w/w	Koncentrace vyjádřená v hmotnostních procentech
ZnO	Oxid zinečnatý

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1</i> Nárůst specifické plochy povrchu se zmenšenou velikostí při zachování stejného celkového objemu	12
<i>Obrázek 2</i> Schéma povrchové plasmonové rezonance částice kovu	12
<i>Obrázek 3</i> Schéma elektrické dvojvrstvy částice v kapalině.....	13
<i>Obrázek 4</i> Vlivy ROS na buňku.....	15
<i>Obrázek 5</i> Rozdílný vzhled po aplikaci přípravku s nanočásticemi ZnO (levá část obličeje) a přípravku s ne-nano ZnO částicemi (pravá část obličeje), bráno z pohledu čtenáře	20
<i>Obrázek 6</i> Chemická struktura molekuly bisoctrizolu, upraveno podle	23
<i>Obrázek 7</i> SEM snímek vzorku anatas, zvětšení 4000×	35
<i>Obrázek 8</i> SEM snímek vzorku anatas, zvětšení 10000×.....	35
<i>Obrázek 9</i> Distribuční křivky velikosti částic vzorku TiO ₂ anatas dispergovaném v Di – H ₂ O	36
<i>Obrázek 10</i> Závislost velikosti částic vzorku TiO ₂ anatas dispergovaných v PBS na čase. 38	
<i>Obrázek 11</i> Závislost velikosti částic vzorku TiO ₂ anatas dispergovaných v DMEM bez séra a v DMEM s 10% telecím sérem na čase	40
<i>Obrázek 12</i> Závislost velikosti částic vzorku TiO ₂ anatas dispergovaných v simulovaných slinách na čase	42
<i>Obrázek 13</i> Závislost velikosti částic vzorku TiO ₂ anatas dispergovaných v SIF a v SIF s pankreatinem na čase	44
<i>Obrázek 14</i> Závislost velikosti částic vzorku TiO ₂ anatas dispergovaných v SGF a v SGF s pepsinem.....	46
<i>Obrázek 15</i> Závislost velikosti zeta potenciálu disperze vzorku TiO ₂ anatas na pH.....	48
<i>Obrázek 16</i> Závislost absorpance vzorku TiO ₂ anatas na vlnové délce záření po různé době expozice UV záření.....	49
<i>Obrázek 17</i> SEM snímek vzorku PARSOL® Max, zvětšení 4000×.....	50
<i>Obrázek 18</i> SEM snímek vzorku PARSOL® Max, zvětšení 10000×.....	50
<i>Obrázek 19</i> SEM snímek vzorku Tinosorb® M, zvětšení 4000×.....	50
<i>Obrázek 20</i> SEM snímek vzorku Tinosorb® M, zvětšení 10000×.....	50
<i>Obrázek 21</i> Distribuční křivky velikosti částic bisoctrizolu vzorku PARSOL® Max dispergovaném v Di – H ₂ O	52
<i>Obrázek 22</i> Distribuční křivky velikosti částic bisoctrizolu vzorku Tinosorb® M dispergovaném v Di – H ₂ O	52
<i>Obrázek 23</i> PARSOL® Max dispergovaný v PBS	56
<i>Obrázek 24</i> Tinosorb® M dispergovaný v PBS.....	56
<i>Obrázek 25</i> PARSOL® Max dispergovaný v DMEM bez séra.....	57
<i>Obrázek 26</i> Tinosorb® M dispergovaný v DMEM bez séra	57

<i>Obrázek 27 PARSOL® Max dispergovaný v DMEM s 10% telecím sérem.....</i>	<i>57</i>
<i>Obrázek 28 Tinosorb® M dispergovaný v DMEM s 10% telecím sérem</i>	<i>57</i>
<i>Obrázek 29 PARSOL® Max dispergovaný v SIF (vlevo) a v SIF s pankreatinem (vpravo)</i>	<i>60</i>
<i>Obrázek 30 PARSOL® Max dispergovaný v SGF (vlevo) a v SGF s pesinem (vpravo).....</i>	<i>60</i>
<i>Obrázek 31 Tinosorb® M dispergovaný v SIF (vlevo) a v SIF s pankreatinem (vpravo)...</i>	<i>60</i>
<i>Obrázek 32 Tinosorb® M dispergovaný v SGF (vlevo) a v SGF s pesinem (vpravo)</i>	<i>60</i>
<i>Obrázek 33 Srovnání průměrných velikostí částic/aglomerátů D [4;3] ve studovaných disperzních médiích.....</i>	<i>60</i>
<i>Obrázek 34 Aglomeráty PARSOLU® Max disperzním prostředí simulovaných slin</i>	<i>61</i>
<i>Obrázek 35 Aglomeráty PARSOLU® Max disperzním prostředí SIF</i>	<i>62</i>
<i>Obrázek 36 Aglomeráty PARSOLU® Max disperzním prostředí SGF.....</i>	<i>62</i>
<i>Obrázek 37 Závislost velikosti zeta potenciálu disperze vzorků bisoctrizolu PARSOL® Max a Tinosorb® M na pH</i>	<i>64</i>
<i>Obrázek 38 Závislost absorbance vzorku bisoctrizolu Tinosorb® M na vlnové délce záření po různé době expozice UV záření</i>	<i>65</i>
<i>Obrázek 39 Závislost absorbance vzorku bisoctrizolu PARSOL® Max na vlnové délce záření po různé době expozice UV záření</i>	<i>65</i>

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Typické složení disperze UV filtru nano MBBT.....	22
Tabulka 2 Přehled použitých UV filtrů	26
Tabulka 3 Složení simulovaných tělních tekutin	29
Tabulka 4 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO ₂ anatas dispergovaný v Di – H ₂ O s neadjustovaným pH..	36
Tabulka 5 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO ₂ anatas dispergovaný v PBS.....	38
Tabulka 6 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO ₂ anatas dispergovaný v DMEM bez séra	39
Tabulka 7 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO ₂ anatas dispergovaný v DMEM s 10% telecím sérem.....	40
Tabulka 8 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO ₂ anatas dispergovaný v simulovaných slinách	42
Tabulka 9 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO ₂ anatas dispergovaný v SIF	43
Tabulka 10 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO ₂ anatas dispergovaný v SIF s pankreatinem	44
Tabulka 11 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO ₂ anatas dispergovaný v SGF	45
Tabulka 12 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorek TiO ₂ anatas dispergovaný v SGF s pankreatinem	46
Tabulka 13 Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorky bisoctrizolu PARSOL® Max a Tinosorb® M dispergovaných v Di – H ₂ O s neadjustovaným pH. Metoda DLS.	51
Tabulka 14 Průměrné hodnoty velikosti částic spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorky bisoctrizolu PARSOL® Max a Tinosorb® M dispergovaných v Di – H ₂ O s neadjustovaným pH. Metoda laserové difrakce.	54
Tabulka 15 Průměrné hodnoty objemově vážené velikosti částic D [4;3] spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorky bisoctrizolu PARSOL® Max a Tinosorb® M dispergovaných ve fyziologických médiích.....	56
Tabulka 16 Průměrné hodnoty objemově vážené velikosti částic D [4;3] spolu se směrodatnými odchylkami stanovení (SD) pro vzorky bisoctrizolu PARSOL® Max a Tinosorb® M dispergovaných v simulovaných gastrointestinálních tekutinách	59