

Transdermální absorpce z emulzí s enkapsulovanými složkami esenciálních olejů

Kateřina Mochťáková

Bakalářská práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Mochťáková**
Osobní číslo: **T19041**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Transdermální absorpce z emulzí s enkapsulovanými složkami esenciálních olejů**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Zpracujete literární rešerši na zadané téma.
2. Věnujte se kosmetickým emulzím, zejména emulzím stabilizovaným částicemi (Pickeringovy emulze) s obsahem složek esenciálních olejů.
3. Představte rovněž metodu stanovení transdermální absorpce ve vztahu ke studovaným systémům.

II. Praktická část

1. V praktické části připravte emulze stabilizované částicemi nanokrystalické celulózy s obsahem limonenu a cinnamaldehydu.
2. Připravené vzorky charakterizujte vhodnými fyzikálně-chemickými metodami.
3. Proveďte test transdermální absorpce připravených emulzí s využitím Franzových difuzních komůrek a srovnajte transdermální absorpci z obou systémů.
4. Výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Marto, Joana; Ascenso, Andreia; Simoes, Sandra; et al. Pickering emulsions: challenges and opportunities in topical delivery. EXPERT OPINION ON DRUG DELIVERY (2016), 13, 8, 1093 – 1107
- [2] Frelichowska, J. et al. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. International Journal of Pharmaceutics (2009), 371, 56-63
- [3] Hiranphinyophat, Suphatra; Otaka, Akihisa; Asaumi, Yuta; et al. Particle-stabilized oil-in-water emulsions as a platform for topical lipophilic drug delivery. COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES (2021), 197, Article Number: 111423
- [4] Mikulcova, Veronika; Bordes, Romain; Kasparkova, Vera. On the preparation and antibacterial activity of emulsions stabilized with nanocellulose particles. FOOD HYDROCOLLOIDS 2016, 780-792, 61

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

Datum zadání bakalářské práce: **25. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

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 užit 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, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

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

Práce se zabývá přípravou Pickeringových emulzí s obsahem složek esenciálních olejů, jejich charakterizací a následným hodnocením transdermální absorpce. Teoretická část je věnována faktorům ovlivňujícím transdermální absorpci, možným cestám průniku formulací aplikovaných na kůži a metodám testování transdermální absorpce. Popsány jsou rovněž esenciální oleje zejména z hlediska jejich funkce jako urychlovačů absorpce. V neposlední řadě je pozornost věnována přípravě a možnému využití Pickeringových emulzí. Praktická část práce se věnuje přípravě Pickeringových emulzí stabilizovaných nanokrystalickou celulózą se dvěma složkami esenciálních olejů: cinnamaldehydem a limonenem. Připravené formulace jsou charakterizovány fyzikálně-chemickými metodami a je hodnocena jejich stabilita v čase. V poslední části práce jsou formulace podrobeny *in vitro* testu transdermální absorpce.

Klíčová slova: transdermální absorpce, Pickeringovy emulze, doručování léčiv, akcelerátory penetrace, esenciální oleje

ABSTRACT

This thesis describes the process of preparation of the Pickering emulsions that contain components of essential oils. These emulsions are further characterised and evaluated for their potential for transdermal absorption. The theoretical part characterises the factors with the influence on the transdermal absorption, potential ways in which the formulations may penetrate the skin upon application and methods suitable for measuring the transdermal absorption. The potential of essential oils to act as accelerators of the absorption process is also introduced. Lastly, this part delineates the process of preparation as well as potential applications of the Pickering emulsions. The research part introduces the preparation process of the Pickering emulsions stabilised by the nanocrystalline cellulose with two essential oil components: cinnamaldehyde and limonene. Formulations that are produced are described and characterised using physical–chemical methods and their stability over time is evaluated as well. In the final section of this thesis the formulations are tested in the *in vitro* test of transdermal absorption.

Keywords: transdermal absorption, Pickering emulsion, drug delivery, penetration enhancers, essential oils

V prvé řadě bych velmi ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc., za odborné vedení, cenné rady, neutuchající ochotu, vstřícnost a trpělivost po celou dobu vedení. Dále také paní laborantce a pracovníkům Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. V neposlední řadě chci poděkovat také své milované rodině, za podporu po celou dobu studia.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 KŮŽE	11
2 TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE	13
2.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCI.....	14
2.2 MOŽNÉ CESTY TRANSDERMÁLNÍHO PRŮNIKU LÁTEK PO JEJICH TOPICKÉ APLIKACI	14
2.3 METODY TESTOVÁNÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE	15
2.4 LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCI (ENHANCERY).....	19
3 ESENCIÁLNÍ OLEJE	22
3.1 ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA.....	23
3.3 VLIV EO A JEJICH SLOŽEK NA ZVÝŠENÍ PROPUSTNOSTI KŮŽE	24
3.3.1 Cinnamaldehyd (3-phenyl-2-propenal).....	25
3.3.2 Limonen (1,8-p-menthadien)	26
4 EMULZE	28
4.1 KLASIFIKACE EMULZÍ.....	28
4.3 STABILITA EMULZÍ	30
5 EMULZE STABILIZOVANÉ PEVNÝMI ČÁSTICEMI – PICKERINGOVY EMULZE	31
5.1 PRINCIP STABILIZACE	32
5.1.1 Typy částic využívaných pro stabilizaci	32
5.1.2 Využití Pickeringových emulzí.....	33
6 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	36
7 CÍL PRÁCE	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
8 MATERIÁLY A METODIKA	41
8.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	41
8.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	42
8.3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	42
8.4 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE CNC DISPERZE.....	42
8.4.1 Stanovení sušiny.....	42
8.4.2 Stanovení velikosti částic CNC disperze	43
8.5 PŘÍPRAVA EMULZÍ	43
8.5.1 Preformulační studie:	44
8.6 CHARAKTERIZACE EMULZÍ	45

8.6.1	Stanovení velikosti emulzních kapek	45
8.6.2	Vizuální pozorování	46
8.6.3	Sledování stability – fázové studie.....	46
8.7.1	Příprava biologického materiálu	47
8.7.2	Kontrola integrity kůže	47
9	VÝSLEDKY A DISKUZE:.....	51
9.1	DISPERSE CNC – VLASTNOSTI A CHARAKTERIZACE	51
9.1.1	Morfologie CNC	51
9.1.2	Velikost částic a index polydisperzity CNC disperze	51
9.1.3	Stanovení hmotnostního obsahu CNC v zásobní disperzi	52
9.2	ÚVODNÍ FORMULAČNÍ STUDIE	52
9.3	FORMULAČNÍ STUDIE	54
9.3.1	Charakterizace a vlastnosti emulzí.....	54
9.4	FÁZOVÉ STUDIE A STABILITA EMULZÍ	61
9.4.1	Emulze s obsahem CIN.....	61
9.4.2	Emulze s obsahem LIM	66
9.5	TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE	70
9.5.1	Vyhodnocení integrity kožních vzorků.....	70
9.5.2	Vyhodnocení testu transdermální absorpce pomocí HPLC	71
	ZÁVĚR	74
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	76
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	83
	SEZNAM OBRÁZKŮ	84
	SEZNAM TABULEK.....	86

ÚVOD

Kůže je největším orgánem lidského těla a představuje důmyslný systém ochrany organismu před vnějšími vlivy. Už po staletí jsou na pokožku denně aplikovány látky, ať už za kosmetickým nebo léčebným účelem. Řada topicky aplikovaných sloučenin či léčiv se však absorbuje obtížně nebo k jejich absorpci vůbec nedochází. Za tuto skutečnost je zodpovědná jak bariérová funkce kůže, tak i povaha sloučenin z hlediska velikosti molekuly, polaritý nebo struktury, jež neumožňují prostup do kůže.

Zatímco pro kosmetické aplikace je žádoucí setrvání formulací na povrchu pokožky, pro farmaceutické aplikace je cílem průnik léčiv do hlubších vrstev kůže, popřípadě až do krevního řečiště transdermální cestou. V poslední době si metoda transdermálního podání léčiv získala pozornost pro výhody, které nabízí oproti perorálnímu nebo injekčnímu podání, jako je neinvazivnost metody, schopnost poskytnout prodloužené a kontrolované podání a minimalizace metabolismu prvního průchodu. [1]

Pro usnadnění překonání bariérového charakteru kůže mohou být do formulací přidávány látky akcelerující penetraci zvané enhancery. Mezi tyto látky lze řadit také esenciální oleje a jejich složky, které představují přírodní alternativu oproti doposud nejčastěji využívaným syntetickým enhancerům. Mimoto mohou přinášet i další benefity, jako je například antioxidační, antivirová nebo antibakteriální aktivita. Esenciální oleje však vykazují vysokou těkavost, je proto vhodné provádět jejich enkapsulaci například do Pickeringových emulzí. Jedná se o typ emulzí stabilizovaných pevnými částicemi, jež jsou vhodným systémem pro topické aplikace zejména díky absenci surfaktantů. Ty jsou běžně přítomny v klasických emulzních systémech a často se jedná o látky s dráždivými účinky na kůži. Také z hlediska obnovitelnosti a biodegradability organických stabilizačních částic, jako je například nanokrystalická celulóza, představují Pickeringovy emulze zajímavé systémy pro budoucí průmyslové aplikace. Tato práce se proto zaměřuje na přípravu a popis Pickeringových emulzí se složkami esenciálních olejů a jejich *in vitro* testováním na transdermální absorpci.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KŮŽE

Kůže je největším orgánem lidského těla a její hlavní funkcí je ochránit vnitřní prostředí před negativními vnějšími vlivy, ať už se jedná o vlivy fyzikální (například UV záření), působení chemických látek nebo prostup patogenů.

V tomto ohledu hraje klíčovou roli kyselý kožní film utvářený především:

- kyselinou mléčnou,
- volnými aminokyselinami z potu,
- volnými mastnými kyselinami z mazu,
- kyselinou urokanovou společně s kyselinou pyrrolidonkarboxylovou jako produkty keratinizace rohové vrstvy. [2], [3], [4]

Kůže se mimo jiné podílí i na metabolismu, imunitě a termoregulaci.

Nezanedbatelné postavení má rovněž bariérová funkce ve vztahu k hospodaření s obsaženou vodou. Správně fungující kůže tak zabraňuje transepidermálním ztrátám vody.

Při sledování stavby kůže rozeznáváme tři základní vrstvy (Obrázek 1):

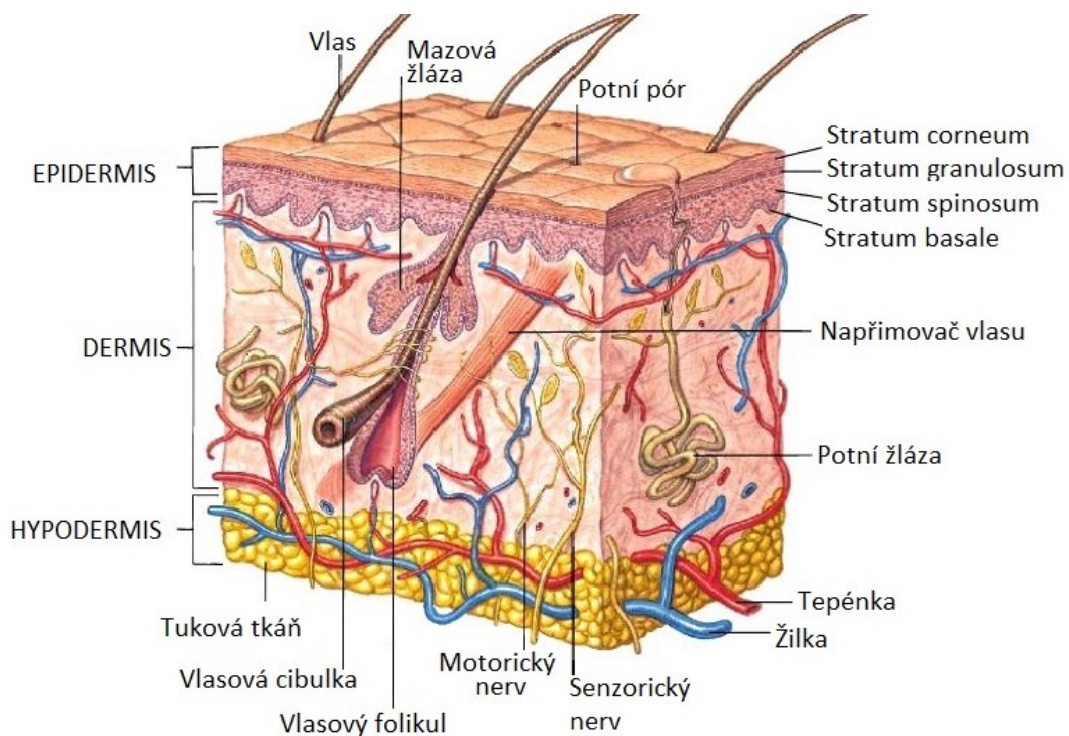
1) ***Epidermis* (pokožka)** je nejsvrchnější vrstvou kůže, která se dále dělí na 5 dalších vrstev:

- a) ***Stratum basale***: je nejhlubší částí *epidermis* oddělená od *dermis* bazální membránou, vrstva neustále aktivně produkuje keratinocyty, které jsou zodpovědné za produkci keratinu a utváření bariéry pro přestup vody sekrecí lipidů. Obsahuje také melanocyty produkující pigment melanin zabraňující poškození vlivem dopadajícího UV záření.
- b) *Stratum spinosum*
- c) *Stratum granulosum*
- d) *Stratum lucidum*
- e) ***Stratum corneum (SC)***, jež je nejsvrchnější částí pokožky, se skládá z 20 - 30 buněčných vrstev, je tvořena keratinem a rohovitými šupinami odumřelých keratinocytů (anukleátové dlaždicové buňky). Zajišťuje bariérovou funkci. [4]

2) **Dermis (škára)** je spojena s *epidermis* na úrovni bazální membrány a skládá se ze dvou vrstev pojivové tkáně bez jasného ohraničení.

Horní papilární vrstva je tenčí a je tvořena volnou pojivovou tkání. Je bohatě protkána cévami a senzoryckými nervovými zakončeními. Hlubší retikulární vrstva je hlavní částí *dermis* a přiléhá na podkoží. Oproti vrstvě papilární je silnější a je utvářena hustou pojivovou tkání. Asi 70 % suché hmoty *dermis* je tvořeno kolagenními vlákny převážně z kolagenu typu I a III, které propůjčují kůži pevnost. Další asi 5 % suché hmoty *dermis* tvoří elastická vlákna z elastinu a elastických mikrofibril zajišťující pružnost kůže.

3) **Subcutis (podkožní vazivo)** je nejhlubší vrstva kůže, složená zejména z lipocytů uspořádaných do tukových lalůček oddělených vazivovými přepážkami. [3]



Obrázek 1: Stavba kůže, upraveno podle: [47]

Hlavní funkce kůže jako bariérového orgánu tak představuje překážku pro průnik aktivních látek z formulací přípravků užívaných pro topické aplikace, ať už se jedná o využití pro kosmetický nebo farmaceutický průmysl.

2 TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE

Transdermální aplikační systémy představují neinvazivní způsob efektivního podávání léčiv pacientům. K jejich výhodám lze řadit:

- prodloužený terapeutický účinek,
- snížení nežádoucích vedlejších účinků,
- snadné používání,
- lepší snášenlivost pacienty (jsou neinvazivní).

Vývoj transdermálních formulací je však primárně znesnadňován nízkou propustností kůže. Pro možné překonání tohoto bariérového efektu byla syntetizována řada látek jako potenciálních urychlovačů penetrace pro transdermální podávání léčiv, takzvaných enhancerů. [5] Lze ale také využít látky přírodního původu, které se rovněž chovají jako urychlovače transdermální absorpce, jako jsou například esenciální oleje (EO).

Ačkoliv byly u mnoha chemických látek prokázány akcelerační účinky na penetraci látek do kůže, ať už do lidské nebo zvířecí, ideální akceleranty se stále nedaří nalézt. [6]

Některé z požadovaných ideálních charakteristik pro takové látky jsou uvedeny v následujících bodech:

- neměly by být toxické, dráždivé ani alergenní,
- měly by pracovat rychle a jejich činnost a doba trvání účinku by měla být předvídatelná a reprodukovatelná,
- neměly by mít žádnou farmakologickou aktivitu (tj. neměly by se vázat na receptorová místa),
- měly by působit pouze jednosměrně (tj. měly by pouze urychlovat průnik terapeutických látek do těla přes kůži, ale zároveň neumožňovat ztrátu endogenních látek ven z těla),
- jejich vliv na bariérové vlastnosti pokožky by měl být reverzibilní s plnou návratností k normálu,
- měly by být kompatibilní s ostatními látkami formulací, především s látkou terapeutického účinku,
- a v neposlední řadě by měly být přijatelné pro pacienty z hlediska haptiky. [6]

2.1 Faktory ovlivňující transdermální absorpci

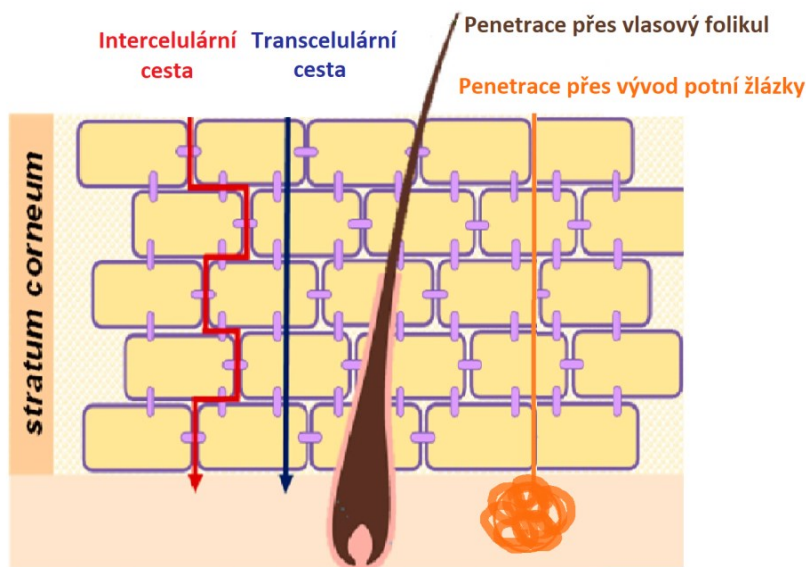
Na absorpci látek kůží má vliv mnoho faktorů, jako jsou například: původ a typ kůže (zdali se jedná o kůži lidskou, nebo zvířecí), fyzikálně-chemické vlastnosti testované látky (jako je molekulová hmotnost, polarita) a celá formulace přípravku. Nelze opomenout ani vliv možného ošetření kůže před aplikací a další faktory prostředí.

Ke studiu transdermálního průniku látek se využívají modely *in vitro* i *in vivo*, přičemž testování *in vivo* na lidské kůži je pro hodnocení průniku látek nejprůkaznější. Problém však představuje dostupnost lidské kůže. Proto se velmi často využívají modely zvířecí kůže (prasat, potkanů, morčat, myší i primátů). Je u nich ale potřeba brát v úvahu to, že svou anatomickou stavbou zcela neodpovídají kůži lidské (rozdíl v tloušťce a stavbě SC). [7]

2.2 Možné cesty transdermálního průniku látek po jejich topické aplikaci

Existuje několik možných cest pro transepidermální penetraci aktivních sloučenin (Obrázek 2):

- transcelulární cesta – průnik přes buňky korneocytů a keratinocytů,
- intercelulární cesta – penetrace mezibuněčnými prostory ve SC,
- penetrace přes vlasový folikul,
- penetrace přes mazové žlázy,
- penetrace přes vývod potních žlázek. [7], [8]



Obrázek 2: Cesty prostupu přes kůži, upraveno podle: [48]

Přičemž převážná část látek prochází cestou intercelulární, méně pak prochází cestou transcelulární. Cesta prostupu přes vlasový folikul a vývody mazových a potních žláz má spíše marginální význam. [8]

2.3 Metody testování transdermální absorpce

Hodnocení transdermální absorpce molekul je klíčové pro posouzení kvality a účinnosti nově vyvinutých formulací pro topické podání léčiv nebo jiných aktivních látek.

U studií percutánní absorpce je nezbytné, aby byly zvolené testovací metody standardizované a reprodukovatelné. Zároveň musí být zabezpečeno monitorování celistvosti kůže zajišťující relevanci a platnost získaných dat. [9]

Reprodukovatelnost dat sledované absorpce látek lidskou kůží je rovněž nutná pro předpověď systémového rizika plynoucího z dermální expozice chemikáliím obsaženým v kosmetických přípravcích, agrochemikáliím nebo i nebezpečným látkám na pracovišti.

In vitro a *in vivo* modely poskytují důležité nástroje pro:

- testování řady lékových formulací,
- hodnocení účinnosti látek zvyšující prostupnost do kůže,
- sledování mechanismu účinku nosných systémů,
- odhad úrovně transportu molekul kůží. [9]

Metody *in vitro* umožňují přesnou kontrolu experimentálních proměnných pomocí jednoduchých protokolů. Nemohou však plně reprodukovat složitost biologických systémů. Proto se doporučuje ověřovat výsledky výzkumů i metodou *in vivo*. I přesto jsou metody *in vitro* základním nástrojem pro vývoj a testování formulací stejně jako prostředkem pro predikaci dermálního vstřebávání a kožního metabolismu. [10]

Při využití *in vitro* systémů je při posuzování dermální absorpce nutno vzít v úvahu následující parametry:

- typ buněčného systému,
- původ kůže,
- viabilita,
- přípravu vzorků,
- složení receptorové tekutiny,
- způsob výpočtu a interpretace výsledků. [9]

Mezi používané *in vitro* postupy testování patří například metoda retence kůže, stripování páskou, avšak nejpoužívanější je metoda difuzních komůrek Franzova typu. [10]

Technika stripování páskou se používá pro hodnocení průniku léčiv do SC. Zahrnuje sekvenční odstranění buněčných vrstev SC pomocí proužků lepicí pásky a jejich následné vyhodnocení.

Testovaná formulace se aplikuje na kůži a nechá se vstřebat. Před samotným provedením experimentu je nutno z povrchu kůže odstranit případné nevstřebané zbytky. Následně je pomocí tlaku aplikována první páska tak, aby se zajistila její přilnavost ke kůži. Po odstranění první pásky je společně s ní odstraněna jak část SC, tak i zbytky formulace. Proto se obvykle neanalyzuje ale vyhazuje se. [10]

Další pásky jsou postupně přikládány na místa kůže, kde byla aplikována sledovaná formulace. Tak je zajištěno přibližně stejné množství odstraněných buněk ze SC v každém kroku. Ze získaných proužků lepicí pásky se provede vhodným rozpouštědlem extrakce testované látky (například léčiva). Vzorky se odstředí a testovaná látka se izoluje ze supernatantu. Následně je provedena kvantitativní analýza. [10]

Jelikož se jedná o metodu neinvazivního charakteru, lze ji provádět *in vivo* na lidských dobrovolnících pro dermatofarmakokinetické studie za účelem hodnocení biologické dostupnosti léčiv z topických přípravků jako jsou krémy, masti nebo hydrogely. [10]

Franzovy difúzní komůrky:

Difúzní komůrky (Obrázek 3) jsou nejpoužívanějším experimentálním zařízením k posouzení uvolňování léčiv z topických systémů a jejich pronikání kůží.

Difúzní komůrky by měly být zhotoveny z inertních neadsorbujících materiálů. V praxi se nejčastěji setkáváme s komůrkami ze skla. Aparaturu lze rozdělit na dvě základní části a to donorovou (horní část) a receptorovou (spodní část). Polopropustnou bariéru mezi těmito dvěma částmi tvoří vzorek modelové kůže, který se umísťuje pokožkou směrem vzhůru.

Pro tyto účely se nejčastěji využívá kůže z prasečích uší, a to zejména z důvodu její vysoké podobnosti s kůží lidskou, ať už z hlediska anatomie (tloušťka SC a epidermis, struktura folikulů, cévní a kolagenní uspořádání v rámci epidermis), tak i z hlediska složení s podobným zastoupením ceramidů a glykosfingolipidů. Nejprůkaznější výsledky poskytují samozřejmě vzorky lidské kůže, například získané při plastických operacích, těch je však jen velmi omezené množství.

Podle toho, jak je modelová membrána v systému umístěna rozlišujeme komůrky vertikální a horizontální. Převážná většina studií preferuje vertikální uspořádání. [8] , [9]

Pro testování se přesně určené množství testované látky aplikuje na definovanou plochu pokožky ($0,2 - 5 \text{ cm}^2$) ve dvou možných dávkách. Pokud je potřeba co možná nejlépe simulovat reálné používání, aplikuje se takzvaná *finite* (konečná) dávka. Zde se na kůži použije přiměřené množství formulace potřebné k jejímu pokrytí (asi $1-5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$). Zároveň se dodatečně neaplikují žádná okluziva, která by zabraňovala odpařování formulace, ke kterému při reálném užívání může docházet. Druhou možností je aplikace takzvané *infinite* (nekonečné) dávky. Kde je testovaná formulace nanášena na povrch kůže v nadbytku (obvykle větší množství než $10 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$) a zároveň je aplikováno i okluzivum za účelem minimalizace možného odpaření testovaného vzorku. [8]

Celý systém může být konstruován ve statickém nebo průtokovém uspořádání. Takovým jednoduchým vertikálním statickým uspořádáním je i Franzova difúzní komůrka. U tohoto typu uspořádání musí být receptorová kapalina neustále míchána a pravidelně manuálně odebírána k analýze. Ve vertikálním průtokovém uspořádání je receptorová

kapalina kontinuálně odebírána činností peristaltické pumpy. Průtokový typ je vhodnější pro sledování metabolismu látek v kůži. [8]

Receptorová kapalina umístěná ve spodní části aparatury (receptorová část) musí vykazovat specifické vlastnosti, jako je rozpustnost pro testovanou látku a neschopnost vyvolávat destruktivní změny kožní membrány. V závislosti na hydrofilním nebo hydrofobním charakteru testované látky se volí vhodná receptorová kapalina. Pro hydrofilní vzorky je možné použít například fyziologický roztok. Při testování látek lipofilního charakteru se k roztokům solí přidávají ještě například organická rozpouštědla, která nevyvolávají poškození kožní membrány (EtOH: H₂O 1:1, 6% PEG), sérový albumin, nebo povrchově aktivní látky.[8]

V systému je spodní strana kožní membrány v neustálém kontaktu s receptorovou kapalinou, což může po delším čase kontaktu vyvolávat nechtěné bobtnání vedoucí ke zvýšené propustnosti kůže.

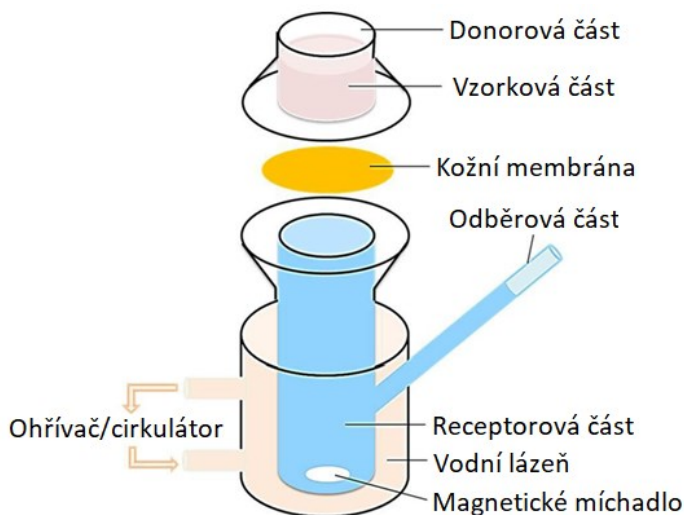
Další z proměnných, kterou je nutno korigovat je teplota testu. Ta by měla být na povrchu kožní membrány udržována v rozmezí 31–33 °C. Dalším faktorem, který je potřeba sledovat je vlhkost prostředí. Optimálně by měla být hodnota okolní vlhkosti v rozmezí od 30 do 70 %. Standardní doba provedení základního absorpčního testování chemických látek je stanovená na 24 hodin. Doba testování by měla simulovat předpokládanou dobu použití při reálné aplikaci spotřebitelem. [8]

Aby byla získaná data statisticky významná, doporučuje se v rámci jednoho měření provést test na minimálně 6 vzorcích kůže odebraných z téhož místa na těle od třech individuálních dárců. Tato podmínka však nebývá často splněna. [8]

Testovaná látka se po ukončení pokusu může nacházet jak ve všech vrstvách kůže, tak i v receptorové kapalině, zbytková množství látky mohou být i na povrchu pokožky. V závislosti na požadavcích daného experimentu a charakteru testované látky se provádí následná analýza. Jaké množství se po ukončení experimentu nachází ve SC a dalších vrstvách kůže, je zjištěno technikou stripování. Analýza zbývajících vrstev kůže i receptorové kapaliny probíhá většinou za použití HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie).

Způsob interpretace výsledků závisí na charakteru testu a na záměru se kterým byl proveden. Absorbované množství testované látky je možné vyjádřit jako procenta látky identifikované v dané vrstvě nebo receptorové kapalině z celkové aplikované dávky. Další možností je

vyjádření poměru absorbované látky ku dávce aplikované za jednotku času. V situaci, kdy je aplikována takzvaná nekonečná dávka, je pro danou látku možné stanovit konstantu propustnosti. [8]



Obrázek 3: Franzova difúzní komůrka, upraveno podle: [49]

2.4 Látky ovlivňující transdermální absorpci (enhancerů)

Jedním z dlouhodobých přístupů pro zlepšení transdermálního dodání léčiv nebo dalších účinných látek je využití tzv. zesilovačů penetrace (nebo také sorpčních promotorů, akceleratorů, enhancerů). Ty pronikají do kůže, kde interagují s jejími složkami tak, aby reverzibilně snížily její bariérovou funkci, čímž se usnadní průnik aktivní látky do kůže. [6] Literatura popisuje několik typů látek fungujících jako akceleratorů penetrace. Jedním z prvních používaných a zároveň nejlépe prozkoumaných je dimethylsulfoxid (DMSO). Dimethylsulfoxid je silným aprotickým rozpouštědlem bez barvy a zápachu. Často se užívá v mnoha oblastech farmaceutických aplikací jako „univerzální“ rozpouštědlo. Je to účinný promotor penetrace jak hydrofilních, tak i lipofilních látek a bylo prokázáno, že podporuje pronikání antibiotik, antivirových látek i steroidů. [6]

Ačkoliv je DMSO velmi dobrým enhancerem penetrace, jeho používání s sebou přináší úskalí v podobě nežádoucích vedlejších reakcí, které vyvolává na kůži. Účinek DMSO jako enhanceru je závislý na jeho koncentraci ve formulaci, standardně se používá obsah vyšší než 60 % v kombinaci s ko-rozpouštědly. Nicméně při těchto relativně velkých koncentracích může DMSO vyvolávat erytém, kontaktní kopřivku, pálení a svědění pokožky nebo denaturovat některé proteiny. [6]

Proto byly vyvinuty deriváty DMSO, které tyto nežádoucí projevy nevyvolávaly. Předmětem zkoumání se stala chemicky příbuzná analoga s akcelerační aktivitou, jako je například dimethylacetamid, dimethylformamid nebo decylmethylsulfoxid. [6]

Azon (laurocapram) byl vůbec první cíleně navrženou molekulou za účelem podpory transdermální absorpce. Díky absenci aprotické sulfoxidové skupiny nevyvolává výše zmíněné nežádoucí účinky přítomné u formulací s obsahem DMSO. Má velmi nízkou toxicitu, nevyvolává iritační účinky a je účinný již při velmi nízkých koncentracích. Podporuje vstup hydrofilních i lipofilních látek a je tak vhodným akcelerantem penetrace řady léčiv. Mechanismem účinku je pravděpodobně jeho interakce s lipidovými doménami ve SC. [6]

Také řada pyrrolidonů a strukturně příbuzných sloučenin byla zkoumána pro možné aplikace jako zesilovače průniku permeantů do kůže. Z této skupiny se nejvíce pozornosti soustřeďovalo na N-methyl-2-pyrrolidon a 2-pyrrolidon. Pyrrolidony byly použity jako promotory penetrace pro řadu molekul včetně hydrofilního mannitolu, 5-fluoruracilu a sulfaguanidinu a lipofilního hydrokortisonu a progesteronu. U hydrofilních molekul byla pozorována účinnost průniku značně vyšší než pro molekuly lipofilního charakteru. Z hlediska mechanismu působení se pyrrolidony dobře rozdělují do SC. Mohou vyvolávat změny rozpouštědlové povahy v membránách tkání. Mají schopnost vytvářet rezervoáry v kožních membránách a umožňovat tak postupné uvolňování léčiv nebo jiných aktivních látek ze SC. Ovšem kvůli přítomným nežádoucím účinkům je jejich klinické používání prozatím zamítnuto. [6]

Perkutánní absorpce léčiv byla zvýšená i v přítomnosti široké škály mastných kyselin s dlouhým řetězcem, z nichž nejvyužívanější byla kyselina olejová. Mastné kyseliny byly použity pro transdermální dodávání progesteronu, estradiolu, 5-fluoruracilu, kyseliny salicylové nebo acykloviru. Mohou tedy zvyšovat průchod jak lipofilních, tak hydrofilních látek. Účinek kyseliny olejové jako enhanceru je založený na interakci s lipidovými doménami ve SC a jejich modifikaci. [6]

Alkoholy, glykoly a mastné alkoholy jsou běžně užívané látky pro transdermální formulace. Například ethanol rychle proniká do kůže a využívá se pro náplastové aplikační formy. Účinek je koncentračně závislý a je třeba vybrat správný poměr. Při vysokých koncentracích ethanolu může již docházet k dehydrataci biologických membrán, což může mít za následek klesající tendenci toku látek do tkáně. [6]

Ethanol může působit několika mechanismy. Jedním z aktivit je zvýšení rozpustnosti léčivé látky ve vehikulu. Dále může při pronikání do SC měnit vlastnosti rozpustnosti tkáně a zlepšovat tak rozdělování léčiva do membrány. Dalším z možných mechanismů je modifikace termodynamické aktivity léčiva ve formulaci v důsledku rychlé penetrace ethanolu nebo jeho ztráty odpařováním z donorové fáze. Při *in vivo* testování na lidské kůži vykazoval příznivé akcelerační účinky penetrace pro systém s obsahem estradiolu. [6]

Také mastné alkoholy mohou mít aktivitu zvyšující penetraci, a to zejména v kombinaci s ko-rozpouštědlem polyethylenglykolem. Nejmarkantnějších účinků dosahoval dekanol.

Polyethylenglycol je široce využívaným vehikulem pro zesílení penetrace a vykazuje synergický účinek ve spojení s mastnými kyselinami, například s kyselinou olejovou. Je ale využíván i jako samotný enhancer ve formulacích, v takovém případě má ale pouze mírný účinek. Mechanismus účinku PEG je pravděpodobně podobný jako u výše popsaného ethanolu. [6]

Povrchově aktivní látky jsou součástí mnoha kosmetických, terapeutických a agrochemických přípravků. Do formulací se obvykle přidávají s cílem rozpuštění aktivních látek lipofilního charakteru. U většiny z nich byl ale prokázán i účinek zvyšující průchod materiálu přes biologické membrány. [6]

V neposlední řadě lze zmínit také účinek esenciálních olejů jako enhancerů transdermální penetrace, a to zejména v nich obsažených terpenů a terpenoidů. Několik druhů EO (eukalyptový, merlíkový, ylang-ylang) vykazovalo vysokou aktivitu jako zesilovače penetrace modelového hydrofilního léčiva 5-fluoruracilu do lidské kůže. I u kosmeticky významného α -bisabololu byla zaznamenána mírná akcelerační aktivita. Obecně se ale míra aktivity vždy odvíjí od charakteru použitého léčiva nebo aktivní látky, jejíž průnik do kůže chceme podpořit. [6]

3 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Esenciální oleje (EO) lze charakterizovat jako těkavé komplexní přírodní chemické sloučeniny s typickým silným oděrem. Jsou rozpustné v organických rozpouštědlech a lipidech. Ve většině případů mají nižší hustotu než voda.

Dnes je známo přes 3000 esenciálních olejů, z nichž je komerčně významných přibližně 300, jež jsou využívány v kosmetice, parfémce, agronomii, farmacii a potravinářství. [11]

Vznikají především jako produkty sekundárního metabolismu rostlin, avšak některé složky esenciálních olejů mohou být i degradačními produkty primárních metabolitů, zejména lipidů. Sekundární metabolity je možné klasifikovat jako:

- terpenoidy,
- šikimáty,
- polyketidy,
- alkaloidy.

Nejvýznamnější skupinou jsou šikimáty, jako produkty šikimátové dráhy a terpenoidy jako produkty mevalonové dráhy. [11], [12], [13]

Esenciální oleje jsou značně komplexní přírodní směsi, které mohou obsahovat 20-60 rozdílných složek v různých koncentracích. Charakteristické vlastnosti oleje jsou zcela výhradně utvářeny 2-3 složkami v majoritním zastoupení. [11]

Chemický profil (zastoupení jednotlivých molekul i jejich stereoizomerie) daného esenciálního oleje je ovlivňován několika faktory, jako je místo pěstování, kvalita půdy, klima, část rostliny, doba sklizně a také způsob izolace esenciálního oleje z matečné rostliny. [11]

Nejčastějšími způsoby získávání EO jsou metody nízkotlaké nebo vysokotlaké destilace horkou vodou, nebo vodní parou. Dále je možné jmenovat superkritickou fluidní extrakci oxidem uhličitým, lisování, nebo extrakci organickými rozpouštědly. [11]

V přírodě hrají EO pro zdrojové rostliny významnou roli. Rostliny je produkují jako svoji ochranu před bakteriemi, viry, houbami a mohou také odpuzovat hmyz nebo býložravce před jejich poškozením.

Některé části rostlin naopak produkují sekundární metabolity s příjemnou vůní jako lákadlo pro opylovače tak, aby podpořily rozptýl pylů nebo semen. [11] Díky EO mohou dokonce rostliny mezi sebou na jisté úrovni komunikovat. [12]

Právě pro své antibakteriální, antivirové, antimykotické, anxiolytické, insekticidní, anti karcinogenní a antioxidační účinky jsou dnes EO předmětem zájmu mnoha studií pro případné využití v různých průmyslových odvětvích. [13]

3.1 Antibakteriální aktivita

Je známo široké spektrum esenciálních olejů s antibakteriálními vlastnostmi, ty plynou především z charakteru obsažených složek jako jsou:

- fenoly,
- izopreny (seskviterpeny, monoterpeny),
- příbuzné alkoholy a uhlovodíky.

Lipofilní profil uhlovodíkové kostry a hydrofilní charakter funkčních skupin v EO jsou hlavními nositeli antimikrobiální aktivity. [13] Antibakteriální působení lze vysvětlit několika mechanismy účinku EO na bakteriální buňky. Tyto účinky zahrnují:

- degradaci buněčné stěny,
- poškození cytoplazmatické membrány,
- koagulaci membránových proteinů,

to vše zapříčiní zvýšenou permeabilitu vedoucí k úniku obsahu buňky, snížení protonové hybné síly a snížení intracelulárního ATP. [14]

Obecně lze říct, že gram negativní bakterie jsou odolnější vůči působení esenciálních olejů než bakterie gram pozitivní. Vyplývá to z odlišnosti stavby jejich buněčné stěny.

Grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu tvořenou z cirka 90 % peptidoglykanu, což umožňuje snadný prostup hydrofobním molekulám dovnitř buněk, které tak mohou působit nejen na buněčnou stěnu ale i uvnitř cytoplazmy. [14]

Gramnegativní bakterie mají komplexnější stavbu a mimo vrstvu peptidoglykanu je přítomna ještě i vnější membrána tvořená lipopolysacharidy. [14] Prokázanou antibakteriální aktivitu se širším spektrem působení vykazují například esenciální oleje získané z tymiánu, rozmarýnu, tea tree nebo kassie.

Dalšími EO s významnou antimikrobiální aktivitou, které jsou účinnější vůči gram pozitivním bakteriím a specifickým mikrobiálním kmenům, jsou oleje získané z levandule, máty peprné, citronu, cedrového dřeva, jedle ojíňené, kadidla, oregana, skořice nebo citronové trávy. [15] Důvodem proč dále studovat možné využití esenciálních olejů jako látek s antibakteriální aktivitou je stále se zvyšující rezistence některých bakteriálních kmenů vůči antibiotikům. [14]

3.2 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivitu vykazují sloučeniny esenciálních olejů, které jsou strukturně založené na fenolu. Jako sloučeniny s nejvyšší antioxidační aktivitou se uvádí tymol jako složka tymiánového oleje, karvakrol jako složka oreganového oleje a eugenol jako složka hřebíčkového oleje. [16]

Jejich antioxidační aktivita spočívá v:

- prevenci iniciace řetězce,
- terminaci peroxidů,
- zhášení tvorby singletového kyslíku,
- vázání katalyticky působících iontů přechodných kovů,
- nebo se chovají jako lapače volných radikálů.

Tyto složky by tak mohly být využívány jako přírodní antioxidanty do potravinových systémů nebo kosmetických formulací. [16]

3.3 Vliv EO a jejich složek na zvýšení propustnosti kůže

EO a jejich těkavé složky mohou penetrovat do kůže a zároveň také zvyšovat průnik různých látek, zejména léčiv, z topických formulací až do spodních vrstev kůže pomocí různých mechanismů účinku. Tyto mechanismy jsou stručně popsány v následujících bodech: [7]

- první z mechanismů je založený na narušení vysoce uspořádané mezibuněčné lipidové struktury mezi korneocyty ve *SC*. Díky tomu se tato vrstva stane propustnou,
- druhý mechanismus je založen na interakci s intercelulární doménou proteinu, která vede k jejím konformačním změnám,

- u třetího mechanismu dochází vlivem rozpouštědel ke změnám vlastností *SC* a tím i ke změnám v distribuci léčiva,
- další z mechanismů využívá působení enhanceru na desmosomální spoje mezi korneocyty nebo jeho vlivu na metabolickou aktivitu kůže. [7]

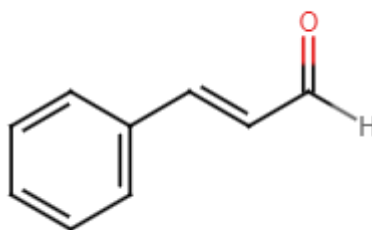
Výhodou aplikací EO a jejich složek jako akcelerantů penetrace je skutečnost, že se po aplikaci na kůži rychle metabolizují, nehromadí se v organismu a rychle se vylučují. Tyto látky účinně usnadňují permeaci léčiv hydrofilní a lipofilní povahy při současném zachování nízké cytotoxicity ve srovnání s většinou syntetických zesilovačů penetrace. Všechny tyto aspekty jsou předpokladem pro jejich bezpečné využití ve formulacích. [7] Esenciální oleje a jejich složky se ukázaly jako účinné při zlepšení permeace léčiv, jako jsou ibuprofen, aminofylin, kyselina p-aminobenzoová, piroxikama, estradiol, ketokonazol, diklofenak sodný, nitredipid nebo karvedilol. [7]

V praktické části využívám ve formulacích složky EO limonen a cinnamaldehyd, proto zde uvádím podrobněji informace o jejich vlastnostech.

3.3.1 Cinnamaldehyd (3-phenyl-2-propenal)

Cinnamaldehyd (Obrázek 4) je hlavní složkou kasiového oleje (circa 90 %) a oleje z kůry skořicovníku (circa 70 %). V menších množstvích se nachází i v mnoha dalších esenciálních olejích. V přírodě se v převážné většině vyskytuje jako *trans* izomer. *Trans*-cinnamaldehyd je nažloutlá kapalina s charakteristickou kořeněnou vůní připomínající skořici. [18]

Jako α,β -nenasycený aldehyd podléhá mnoha reakcím, jako je například hydrogenace na kyselinu skořicovou, dihydrocinnam aldehyd a dihydrocinnam alkohol. Kyselina skořicová je pak produktem autooxidace. [18] V průmyslovém měřítku se cinnamaldehyd připravuje téměř výhradně alkalickou kondenzací benzaldehydu a acetaldehydu. [18]



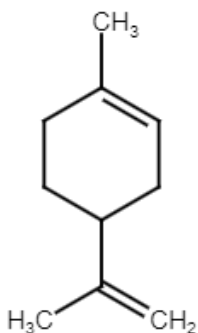
Obrázek 4: Cinnamaldehyd

3.3.2 Limonen (1,8-p-menthadien)

Oba izomery (+)-limonen, (-)-limonen stejně jako i racemát se hojně vyskytují v mnoha esenciálních olejích. Izomer (+)-limonen je přítomen v olejích získaných z kůry citrusů, kde se nachází ve více než 90% koncentraci. Izomer (-)-limonen se nachází v nízkých koncentracích v olejích z rostlin rodu máty a jehličnanů. [18]

Limonen (Obrázek 5) je bezbarvá kapalina s citronovou vůní. Je to reaktivní sloučenina, jejíž oxidací často vzniká více než jeden produkt. Dehydrogenace limonenu vede k p-cymenu. Hydrohalogenací s následnou hydrolýzou lze limonen převést na cyklické terpenové alkoholy. Selektivního přidávání nitrosylchloridu na endocyklickou dvojnou vazbu (+)-limonenu se využívá při výrobě (-)-karvonu. [18] Ve velkém množství se získává (+)-limonen jako vedlejší produkt při výrobě pomerančové šťávy. Ve velmi malých množstvích se izoluje (-)-limonen z esenciálních olejů.

Limoneny se používají jako vonné látky pro parfemaci výrobků pro domácnost, jako výchozí složky pro přípravu syntetických esenciálních olejů ale i jako ingredience do kosmetických a farmaceutických formulací. [18]



Obrázek 5: Limonen

Pro cinnamaldehyd i limonen bylo potvrzeno, že mohou fungovat jako akceleranty permeace.

Mechanismy působení účinných složek odvozených z esenciálních olejů, jako jsou právě mnou používané cinnamaldehyd a limonene, jsou založeny především na změně struktury SC bariéry a interakci s mezibuněčnými lipidy SC, čímž umožňují zvýšení difuzivity léčiv.[7]

Chování limonenu jako enhanceru bylo předmětem několika studií. Byl testován jeho vliv na prostupnost haloperidolu (antipsychotikum) přes ženskou kůži břicha ve srovnání

s oxygenovaným linaloleem a cineolem v kombinaci s propylenglykolem. Studie ukázala, že linalol a cineol vykazovaly pouze mírné zlepšení permeace a prodlouženou dobu prodlevy, zatímco limonen zlepšil permeabilitu haloperidolu 26,5krát a zkrátil dobu zpoždění transportu přes kůži. [19]

V další studii je sledován účinek limonenu na zvýšení prostupnosti kurkuminu v mikroemulzi do kůže a je porovnán s 1,8-cineolem a α -terpineolem. Jako model byla použita neonatální prasečí kůže. Rychlost permeace kurkuminu ve studované mikroemulzi s obsahem limonenu byla 30krát vyšší než u mikroemulze obsahující 1,8-cineol a 44krát vyšší než v případě α -terpineolu. [7]

Také testy prostupnosti účinné látky, 2 % nikapridin hydrochloridu v hydroxylpropylcelulóзовém gelu, prokázaly účinek přídatku 4 % limonenu do formulace jako enhanceru permeace po aplikaci na lidskou kůži. Limonen zlepšil biologickou dostupnost a penetraci léčiva 2,62krát a poskytl prodlouženou ustálenou koncentraci nikapridin hydrochloridu v kůži ve srovnání s referencí. [20]

Následující studie také sledovala vliv přídatku terpenů do formulace obsahující antimikrobiální látku sulfadiazin stříbrný na krustu vzniklou na lidské kůži v důsledku popálenin třetího stupně. Tato studie potvrdila účinek zakomponovaného limonenu jako látky významně zvyšující permeaci antimikrobiotika a to až 9krát oproti referenci. Hlavním mechanismem, jakým limonen zvyšoval prostupnost sulfadiazinu bylo jeho rozdělení do krusty. [21]

Cinnamaldehyd byl testován jako látka zvyšující prostupnost kůže pro léčivou látku ibuprofen. Formulace s obsahem ibuprofenu a cinnamaldehydu byla aplikována na kůži břicha potkanů. Ve srovnání s referencí byla propustnost kůže po aplikaci formulace s cinnamaldehydem 1,13krát vyšší. [22]

4 EMULZE

Emulze patří v dnešní době mezi systémy, které jsou často využívány v řadě odvětví, zejména však v kosmetickém, potravinářském a farmaceutickém průmyslu. [23] Lze je charakterizovat jako heterogenní disperzní systémy a jsou připravovány dispergací dvou kapalin, u nichž musí být splněna podmínka vzájemné nemísitelnosti, nebo jen omezené mísitelnosti. V emulzích je tedy jedna kapalina přítomna ve formě kapiček mikroskopické nebo ultramikroskopické velikosti dispergovaných v prostředí kapaliny druhé (disperzní prostředí). [23], [24] Velikost, jakou budou mít kapky, je závislá na způsobu přípravy emulzí, zejména na stupni homogenizace, ale také na charakteru vstupních surovin tvořících disperzní částice i disperzní prostředí. Stabilita takových systémů je pak zajištěna přidávkem emulgátorů. [23], [24]

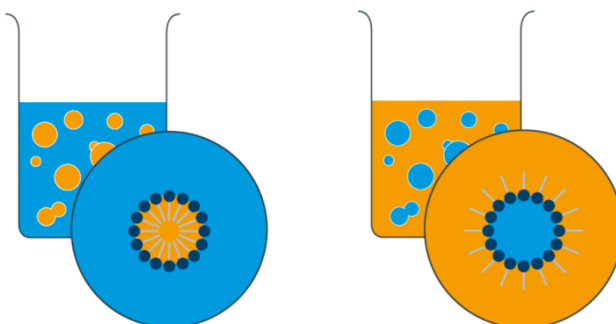
4.1 Klasifikace emulzí

Emulze mohou být klasifikovány dle:

- polaritu disperzního podílu a prostředí,
- koncentraci disperzního podílu,
- velikosti dispergovaných částic.

Podle polaritu disperzního podílu a prostředí se rozlišují (Obrázek 6):

- **emulze přímé**, nebo také prvního druhu: jedná se o emulze, kde je disperzní prostředí tvořeno polárnější kapalinou. V praxi se ale častěji setkáváme s označováním těchto emulzí jako o/v (olej ve vodě),
- **emulze obrácené**, nebo také druhého druhu: zde je tvořeno disperzní prostředí nepolární kapalinou. Tyto jsou pak označovány jako v/o (voda v oleji). [23], [24]

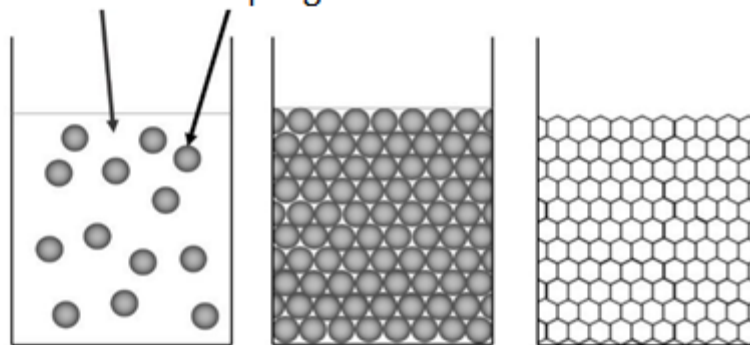


Obrázek 6: Emulze O/V a V/O, upraveno podle: [50]

Rozdělení emulzí dle koncentrace disperzního podílu (Obrázek 7) je následující:

- **emulze zředěné:** zde tvoří dispergovaná fáze maximálně 2 % celkového objemu. Kapičky, představující dispergovanou fázi, se svým průměrem blíží koloidním rozměrům (10^{-7} m). Částice velmi zředěných emulzí se pohybují tepelným Brownovým pohybem a vykazují viskozitní chování jako Newtonovské kapaliny,
- **emulze koncentrované:** dispergovaná fáze může v monodisperzním systému zaujímat až 74 % z objemu. Nedochozí zde ještě k deformaci kapiček a ty si tak zachovávají kulovitý tvar. Více koncentrované emulze se vyznačují viskoelastickým chováním,
- **emulze vysoce koncentrované, nebo také gelovité:** zde jsou kapky uloženy v tak těsné blízkosti, že dochází k jejich vzájemné deformaci. Zaujímají tvar mnohostěnně separovaných tenkým filmem. [23], [24]

Kontinuální fáze Dispergovaná fáze



Obrázek 7: Emulze dle koncentrace: zředěná, koncentrovaná, vysoce koncentrovaná, upraveno podle: [51]

Dle velikosti dispergovaných částic dělíme emulze na:

- **makroemulze:** částice tvořící emulzi se pohybují ve velikostech od 100 do 1000 nm, přičemž rozsah rozměrů částic se odvíjí od způsobu přípravy. Jedná se o emulze se značnou termodynamickou nestabilitou. Opticky se jeví jako mléčně zakalené,
- **mikroemulze:** rozměr částic se pohybuje od 10 do 100 nm. Jsou termodynamicky stabilní. Opticky se jeví jako čiré disperze,
- **nanoemulze:** velikosti částic se pohybují od 50 do 200 nm. Opticky se jeví jako průhledné. [24]

Speciálními typy jsou emulze složené (dvojité): tyto emulze jsou nejčastěji připravovány systémem dvoustupňové emulgace s využitím dvou druhů emulgátorů (hydrofobního a hydrofilního charakteru). Emulze v/o/v, kde olejové kapičky emulze, v kontinuální vodné fázi, obsahují ještě rozptýlené drobné kapičky vody. Nebo emulze o/v/o, kde vodné kapičky emulze, v kontinuální olejové fázi, obsahují navíc rozptýlené drobnější kapičky oleje. [23], [24]

4.2 Příprava emulzí

K tvorbě emulzí ze dvou kapalných složek může v malé míře docházet i spontánně jejich prostým smícháním, za předpokladu, že je mezi oběma fázemi dostatečně malé mezipovrchové napětí.

Pro přípravu stabilních emulzí je však nejčastěji zapotřebí použití mechanické dispergace obou fází. K tomu se využívá řady technik a zařízení, jakými jsou například protřepávání a promíchávání o vysoké intenzitě, vibrační mechanismus s využitím míchadel, využití koloidních mlýnů, nebo sonikace (dispergace pomocí ultrazvukových vln).

Důležitou složkou, která se tvorby emulzí účastní je látka, která snižuje mezifázové napětí a stabilizuje kapičky dispergované fáze v disperzním prostředí (vazbou na mezifázové rozhraní). Takovou látku označujeme jako emulgátor.

Emulgátorem mohou být látky:

- vykazující povrchovou aktivitu (tenzidy),
- koloidy o vysoké molekulové hmotnosti – hydrofilní (želatina, pektin, škrob),
- jemné nerozpustné materiály práškového charakteru, které mají schopnost částečného smáčení obou fází (uhelný prach, saze, sulfid olovnatý, oxid železitý, hlinitokřemičitany, nebo alkalické sírany Fe, Ni, Cu). [24], [25]

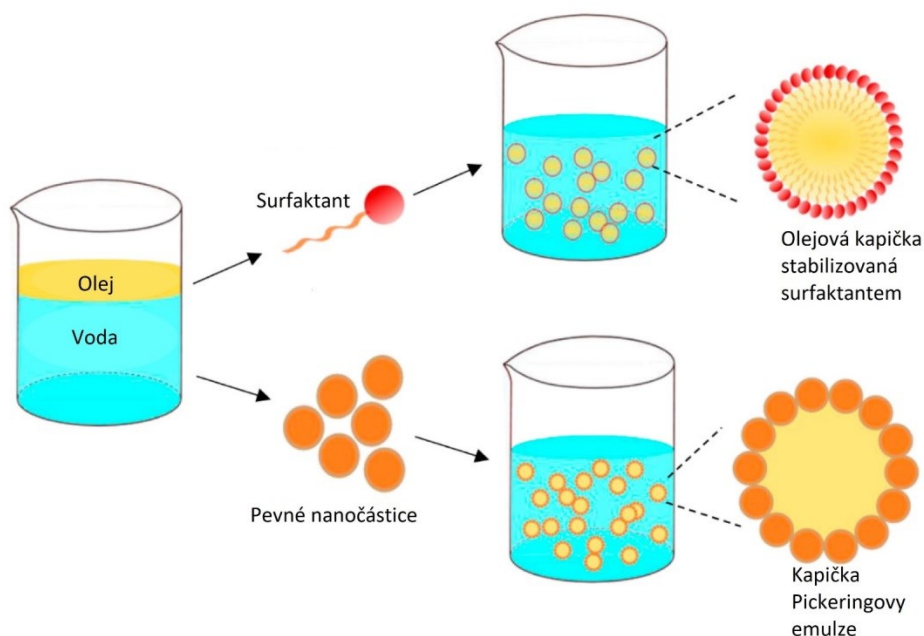
4.3 Stabilita emulzí

Velmi podstatnou charakteristikou pro další aplikace připravených emulzí je jejich stabilita v čase. Na stabilitu emulze lze nahlížet z hlediska termodynamického nebo kinetického. Přičemž termodynamická stabilita je ukazatelem náchylnosti systému k jeho rozpadu. Kinetická stabilita je vyjádřením rychlosti rozpadu systému na fáze. Pro praxi je využíváno sledování kinetické nestability vedoucí k procesům: krémování, sedimentace, flokulace, koalescence, Ostwaldova zrání, nebo i fázové inverze. [23]

5 EMULZE STABILIZOVANÉ PEVNÝMI ČÁSTICEMI – PICKERINGOVY EMULZE

V posledních letech si čím dál více pozornosti získávají emulze stabilizované pevnými částicemi tzv. Pickeringovy emulze (Obrázek 8). A to zejména díky svým speciálním vlastnostem, jako je dobrá stabilita a snadná příprava. [26]

Na rozdíl od klasických emulzí, kde je ke stabilizaci na rozhraní olej-voda využíváno povrchově aktivních látek amfifilního charakteru, k přípravě Pickeringových emulzí se používají pevné částice mikro nebo nano rozměrů. Ty mají schopnost adsorbovat se na fázová rozhraní a udržovat tak kapičky dispergované fáze rozptýlené ve fázi kontinuální. Ty tak zůstávají stabilní po dostatečně dlouhou dobu. [26]



Obrázek 8: Pickeringovy emulze vs. klasické, upraveno podle: [52]

Ve srovnání s emulzemi stabilizovanými PAL vykazují emulze stabilizované pevnými částicemi četné výhody, jako je:

- vyšší stabilita (zejména vůči koalescenci),
- nižší toxicita umožňující aplikace *in vivo* (oproti klasickým emulzím, které mohou vyvolat hemolytické reakce, nebo se chovat cytotoxicky),
- snížená iritabilita kůže,
- dle typu zvolené částice také: vodivost, poréznost nebo zvýšená citlivost,

- kontrola uvolňování léčiv z formulací. [26], [27], [28], [29]

5.1 Princip stabilizace

Stabilizace kapiček emulze pevnými částicemi je umožněna jejich schopností smáčet obě přítomné fáze. Duální smáčivost vede ke spontánní akumulaci částic na rozhraní oleje a vody. Přičemž kapalina, jež smáčí částici ve větší míře, vytváří disperzní prostředí a kapalina, jež smáčí částici v menší míře tvoří disperzní podíl. [30]

Stanovení typu emulze vychází z míry smáčivosti rozhraní, jež je kvantifikována kontaktním úhlem mezi částicí a rozhraním. Pokud je kontaktní úhel větší než 90° jedná se o emulzi typu V/O. Naopak když je kontaktní úhel menší než 90° jde o emulzi O/V. Pokud mají částice příliš veliké nebo příliš malé kontaktní úhly, dochází ke vzniku nestabilních emulzí. [30]

Stabilizace Pickeringových emulzí vůči koalescenci je zajištěna sterickou zábranou vytvořenou částicemi, přičemž klíčovou vlastností je tato robustní, ale pružná koloidní vrstva na rozhraní kapalina–kapalina. [30]

Efektivita stabilizace emulzí pomocí pevných částic závisí na:

- velikosti částic,
- tvaru částic,
- koncentraci částic,
- smáčivosti (kontaktním úhlu),
- adhezní energii částice,
- interakci mezi částicemi.

Do formulací Pickeringových emulzí se nejčastěji volí částice větší, než 1 nm, jež vykazují dobrou stabilitu proti koalescenci i Ostwaldovu zrání. [30]

5.1.1 Typy částic využívaných pro stabilizaci

Pro systém se žádanou morfologií (typ emulze O/V, V/O), stabilitou, nebo aplikací je nutné zvolit vhodný typ a tvar pevných částic. [27]

Velká část výzkumů zabývajících se objasněním mechanismů vzniku a stabilizace emulzních systémů byla provedena s anorganickými částicemi. Ty jako modelové

stabilizátory Pickeringových emulzí vykazují značné výhody, a to zejména v široké škále komerčně dostupných částic. [30]

Dostupné částice mají přesně definovanou velikost a možnost povrchových úprav vazbou funkčních skupin nebo chemickou modifikací měnící hydrofobicitu povrchu částic. Mezi úspěšně a široce využívané anorganické stabilizující částice jsou používány např. oxid křemičitý, oxid titaničitý, uhličitan vápenatý, saze, magnetické nanočástice, jíly nebo hydroxyapatit. [27], [30]

Jako vhodné částice organického původu byly pro výzkumy využívány zein, škrob, chitosan, cyklodextrin, sójové nebo syrovátkové proteiny, celulóza nebo i bakteriální částice. Biologické částice a částice potravinářské kvality se při formulaci Pickeringových emulzí používají stále častěji, a to zejména kvůli poptávce trhu, kde roste zájem spotřebitelů o přírodní produkty. Jejich vynikající biokompatibilita, biodegradabilita a obnovitelnost z hlediska zdrojů, představují atraktivní atributy pro potenciální využití v oblastech kosmetiky, potravinářství a farmacie. [27], [30]

V mé práci používám při formulaci emulzí pevné částice nanokrystalické celulózy, které vykazují ve studiích lepší termomechanické chování, biokompatibilitu, biologickou rozložitelnost, nižší hustotu a v neposlední řadě také nižší cenu, ve srovnání s jinými typy stabilizačních částic. [31]

Celulózové nanočástice mají přirozeně hydrofilní charakter. Povrchovými úpravami lze dosáhnout i hydrofobního charakteru povrchu částic, které jsou rovněž účinnými stabilizátory emulzí. Úpravou polaritu povrchu je možné docílit zlepšení penetrace kůží pro topické aplikace. Nanočástice mohou navíc na pokožce tvořit okluzivní film a prodlužovat tak dobu retence, čímž vzrůstá množství aktivních látek penetrovaných kůží. [30], [31]

5.1.2 Využití Pickeringových emulzí

Pickeringovy emulze mají potenciál pro využití v potravinářských technologiích, tkáňovém inženýrství, kosmetickém a ropném průmyslu, nebo ve farmacii jako topické formy aplikace léčiv. [26], [29] V následující části práce jsou uvedeny některé praktické příklady, kde jsou využity emulze stabilizované částicemi.

Esenciální oleje

Řada esenciálních olejů má zajímavé vlastnosti zejména z hlediska jejich antibakteriální a antioxidační aktivity. Využití jejich plného potenciálu však limitují vlastnosti vycházející

z jejich chemické struktury jako je vysoká těkavost, hydrofobnost, fotosenzitivita, velká náchylnost k oxidaci, často velmi intenzivní aroma a výrazná chuť, nízká rozpustnost a náchylnost k degradaci. [32]

V systémech s obsahem esenciálních olejů, které nejsou chráněny vůči vnějším podmínkám, tak může docházet k rozkladu EO dříve, než začne jejich antibakteriální působení. Proto je snahou EO ve formulacích stabilizovat. Slibnou strategií pro stabilizaci EO je jejich začlenění do Pickeringových emulzí s nanočásticemi a tvorba koloidního systému s vynikající stabilitou a snadnou aplikací. [32]

Enkapsulace esenciálních olejů do PE brání rovněž jejich negativní interakci s ostatními látkami přítomnými v receptuře, které by mohly pozměňovat jejich senzoričké vlastnosti. To je nežádoucím jevem zejména při aplikacích v potravinářském průmyslu, kde je snaha využívat EO jako součást přírodních stabilizačních a konzervačních systémů. V některých případech dokonce inkorporace EO do PE pozitivně ovlivňuje jejich antibakteriální aktivitu.[31]

Léčiva

Lokální podávání léčiv představuje výhodu při minimalizaci jejich nežádoucích vedlejších účinků. Několik studií se proto zaměřilo na tvorbu emulzních systémů na bázi PE s obsahem modelového léčiva, u nichž byla potvrzena schopnost podporovat řízené a trvalé uvolňování obsažené léčivé látky do kůže. [30]

Například Frelichowska et al. provedli *in vivo* testování absorpce modelové léčivé látky pokožkou, a porovnali její chování po začlenění do tří systémů: Pickeringových emulzí (stabilizované částicemi oxidu křemičitého), klasických emulzí na bázi PAL a roztoku v oleji na bázi triacylglycerolů. Test byl proveden na prasečí kůži ve Franzových difúzních komůrkách s all-trans retinolem, jako modelovým lipofilním léčivem. [29] Výsledek studie prokázal, že Retinol byl absorbován do kůže 5krát rychleji z obou emulzních systémů ve srovnání s roztokem triacylglycerolu. Při porovnání klasické emulze s Pickeringovou byl významný rozdíl v distribuci retinolu mezi vrstvy kůže, kde z klasické emulze docházelo ke snadné difuzi přes SC až do viabilních vrstev *epidermis* a *dermis*, zatímco u PE se retinol akumuloval především ve SC. [29]

Pickeringovy emulze by se tedy mohly využívat jako systémy k dodání léčiv, především do SC, nebo v systémech, kde je výhodnější postupné uvolňování léčiva do hlubších vrstev kůže, právě z jeho zadržného množství ve SC. [29]

Kosmetické přípravky

Několik studií se také zabývalo možnostmi využití Pickeringových emulzí v kosmetické oblasti. Zde se v poslední době objevuje snaha nahradit běžné povrchově aktivní látky jako stabilizátory klasických emulzí, zejména kvůli jejich iritačním vlastnostem. [33]

Pevné anorganické nanočástice oxidu titaničitého a oxidu zinečnatého, sloužící jako UV filtry v opalovacích krémech, mohou být s výhodou současně využity i jako stabilizační částice takového emulzního přípravku. V práci Bordes et al. bylo publikováno, že takto připravené systémy si zachovávaly stabilitu a při porovnání s opalovacím přípravkem na bázi PAL vykazovaly srovnatelný fotoprotektivní účinek. [33]

Zapouzdření lipofilních aktivních látek do PE může představovat cestu pro jejich efektivnější využití v kosmetických formulacích. Například Wei et al. ve své studii enkapsulovali tokoferylacetát (syntetická forma vitamínu E) do PE, což zvýšilo jeho účinek jako antioxidační přísady v kosmetických prostředcích. [34]

V současné době je na trhu jen velmi málo přípravků využívající Pickeringovy emulze. Jako příklad lze uvést český patent 2DERM bariérový krém určený k použití především na suchou a poškozenou kůži vlivem dermatitidy, atopických ekzémů nebo jiných onemocnění. Lze však očekávat, že ruku v ruce s postupujícím výzkumem PE bude narůstat i zájem kosmetických a farmaceutických firem formulovat takové komerčně dostupné emulzní přípravky.

6 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Po delší době od svého objevení si Pickeringovy emulze opět získávají pozornost vědců jako emulzní systémy, které vykazují oproti klasickým emulzím (stabilizovaným PAL) řadu výhod. Mezi tyto výhody patří zejména již výše zmíněná stabilita, snadnost přípravy, nízká cena, dobrá biokompatibilita a snížená iritabilita při aplikaci na kůži. Dvě posledně jmenované charakteristiky jsou pak důležité pro jejich následné praktické aplikace. [26]

O to, že by PE mohly hrát v budoucnu důležitou úlohu ve formulacích s využitím pro řadu odvětví se zasloužila řada výzkumných skupin. Například Frelichowska et al. v roce 2008 publikovali studii [29] zabývající se možností lokálního podávání lipofilních léčiv z PE. Předmětem studie byla příprava tří formulací (emulze stabilizovaná PAL, PE se stabilizačními částicemi oxidu křemičitého a roztok triacylglycerolu) s obsahem modelového lipofilního léčiva a jejich následné srovnání z hlediska prostupu kůží. Modelové léčivo z obou emulzních systémů prostupovalo do kůže 5krát rychleji ve srovnání s prostým roztokem léčiva v triacylglycerolu, přičemž modelové léčivo se při aplikaci ze systému PE akumulovalo hlavně ve SC. Výzkumníci zde tedy nastínili možnost budoucího využití těchto formulací a zároveň udali směr i pro další studie. [29]

V posledních letech roste také zájem o PE na bázi organických částic. V několika publikacích byly testovány a charakterizovány PE stabilizované CNC částicemi. Popularita používání CNC je připisována jejich vlastnostem, jako je velikost v řádu nanometrů, vysoký aspektní poměr, velký modul pružnosti, snadná modifikace, amfifilní charakter, biodegradabilita, nízká toxicita, biokompatibilita a v neposlední řadě také nízká cena a obnovitelnost výchozí suroviny. [35]

Například Aw et al. [36] využili ve své studii pro formulaci PE částice CNC. S vizí využít kurkumin, jako bioaktivní doplněk stravy, byl navržen experiment pro zvýšení jeho biologické dostupnosti a zlepšení ochrany proti rychlé degradaci prostřednictvím enkapsulace do PE. Ve studii byl sledován vliv různých koncentrací CNC na fyzikálně-chemické vlastnosti PE, jejich enkapsulační aktivita a vliv na stabilitu kurkuminu při skladování. Bylo zjištěno, že pomocí CNC lze připravit PE stabilní po dobu alespoň jednoho měsíce, přičemž stabilita byla silně závislá na přídavku NaCl, který snižoval elektrostatické repulze. Všechny emulze, nezávisle na koncentraci CNC, vykazovaly po dobu jednoho měsíce neměnný hydrodynamický průměr. Enkapsulační účinnost dosahovala u všech připravených PE vysokých hodnot (přes 97 %). Při skladování za nepřístupu světla byla

pozorována dobrá stabilita kurkuminu s poločasem 98,74 dní, což odráží téměř 20násobné zlepšení ve srovnání a jinými existujícími PE systémy. Závěry z této studie poukazují na potenciál využití PE jako bezpečného aplikačního systému pro citlivé lipofilní bioaktivní látky. [36]

Dalšími bioaktivními látkami, náchylnými k degradaci nebo těkání, jsou EO. I pro ně je vhodnou ochrannou strategií zapouzdření do PE. EO se přidávají do formulací například pro charakteristické vlastnosti, jako jsou antibakteriální, antioxidační, nebo antivirotická aktivita, a mohou účinkovat i jako akcelerátory transdermální penetrace. [32]

YU et al. [37] vyvinuli účinný antibakteriální systém PE s obsahem hřebíčkového EO, kde byly pro stabilizaci použity krystaly CNC modifikované sodnými ionty. Byly studovány faktory ovlivňující tvorbu a stabilitu emulzí a na závěr byla hodnocena jejich antibakteriální účinnost proti *E. coli* a *S. aureus*. Výsledky ukázaly, že PE stabilizované CNC vykazovaly malou velikost kapiček a drsný povrch. Zároveň si zachovávaly dobrou stabilitu při vysokých hodnotách pH i koncentracích solí, a to díky sterické bariéře a elektrostatickému odpuzování CNC na rozhraní kapek emulze. Zhodnocení antimikrobiální účinnosti PE s enkapsulovanými hřebíčkovým EO proběhlo v porovnání s volným hřebíčkovým EO a s klasickou emulzí hřebíčkového oleje. Výsledky ukázaly, že PE vykazovaly vyšší antimikrobiální aktivitu, při ekvivalentní koncentraci hřebíčkového oleje, ve srovnání jak volným hřebíčkovým EO, tak s klasickou emulzí. Antimikrobiální účinnost formulace s CNC stabilizovanými PE je přičítána jejich drsné povrchové struktuře, která zabezpečovala zvýšenou adhezi emulzních kapek k bakteriální membráně. Tento výzkum tak poskytl nové poznatky pro antibakteriální aplikace PE s enkapsulovanými EO jak v potravinářství, tak i dalších průmyslových odvětvích. [37]

EO a jejich těkavé složky byly identifikovány jako slibná skupina látek pro použití jako klinicky přijatelné akcelerátory penetrace. Studie prokázaly, že jsou úspěšné při transdermálním dodávání řady různých léčiv. [38] Jiang et al. zkoumali schopnost olejů (skořicového, hřebíčkového, děhelového, koprničkového, terpentýnového a šáchorového) podporovat pronikání léčiva ibuprofenu kůží ve srovnání s kontrolní látkou azonem.

Studie hodnotila penetraci ibuprofenu přes kůži potkana na Franzových difuzních komůrkách. Hodnocena byla také toxicita EO pro kožní buňky. Formulace byly připraveny s 3% zastoupením EO. Vzorky byly po aplikaci na kůži odebírány z receptorové kapaliny v čase (po 8, 10, 22, 24, 26, 28, 32, 36 a 48 h) a následně analyzovány na obsah ibuprofenu pomocí HPLC. Bylo zjištěno, že ve srovnání s azonem mají zkoumané EO výrazně vyšší

účinek na zvýšení penetrace s výhodou současně nižší kožní toxicity. EO prokázaly potenciál reverzibilně překonat bariéru SC a mohly by tak být využívány ve farmaceutických formulacích pro zlepšení prostupu léčiv kůží. [38]

Z přibývajících množství publikovaných studií zabývajících se formulací Pickeringových emulzí, i jejich využitím v kombinaci s EO, je patrné, že se jedná o diskutované a perspektivní systémy. Do budoucna je možné očekávat jejich začlenění do průmyslových aplikací různých odvětví.

7 CÍL PRÁCE

V první části bylo cílem práce vypracovat literární rešerši se zaměřením na kosmetické emulze pro různé oblasti využití. Důraz byl kladen zejména na popis emulzí stabilizovaných pevnými částicemi, Pickeringovy emulze. Dále se práce soustředí na Pickeringovy emulze s obsahem esenciálních olejů a jejich potenciální působení jako urychlovačů (enhancerů) transdermální absorpce. Ve vztahu ke studovaným systémům jsou rovněž představeny možné metody, kterými lze transdermální absorpci hodnotit.

Cílem praktické části práce byla příprava emulzí stabilizovaných pevnými částicemi nanokrystalické celulózy s obsahem složek esenciálních olejů, cinnamaldehydu a limonenu. Připravené vzorky byly charakterizovány vhodnými fyzikálně-chemickými metodami a byla sledována jejich stabilita v čase. Dále byla testována transdermální absorpce vzorků *in vitro* s využitím Franzových difuzních komůrek a byla porovnána pro oba sledované systémy.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 MATERIÁLY A METODIKA

Následující část obsahuje popis metodiky a použité přístroje, pomůcky, chemikálie a roztoky, včetně použitého biologického materiálu.

8.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (Kern),
- Automatické pipety (Eppendorf),
- Vortex V-1 plus (Biosan),
- Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern),
- Ultrazvukový homogenizér UP400St (Hielscher),
- Laserová difrakce Mastersizer 3000 (Malvern),
- Běžné laboratorní sklo a plasty,
- Exsikátor,
- Skalpel,
- Holicí strojek (Gillette),
- Stanice MPA5 + Tewameter TM 300 (Courage + Khazaka),
- Optický mikroskop (Olympus),
- Ponorný ohřívací cirkulátor s lázní Corio CD (Julabo),
- Systém pro detekci transdermální difuze, Franzovy difuzní komůrky (SES GmbH Analysessysteme),
- Kapalinový chromatograf sestávající z částí:
 - Pumpa Waters 600E (Waters),
 - Dávkovací ventil se smyčkou 20 μ l (Rheodyne),
 - Vakuový odplyňovač mobilní fáze (Watrex),
 - UV 200 DeltaChrom detektor pro HPLC (Watrex),
 - Chromatografická kolona X-select CSH C18 (Waters),
- Přenosný pH metr CPH 51 (Elteca).

8.2 Chemikálie a roztoky

- Chlorid vápenatý bezvodý (Penta),
- Trans-Cinnamaldehyde (Sigma Aldrich),
- (R)-(+)-Limonene (Sigma Aldrich),
- Demineralizovaná voda,
- Kyselina fosforečná (Penta),
- Acetonitrile, HPLC gradient grade (Chem-Lab),
- Methanol, HPLC gradient (Chem-Lab),
- Vodný roztok celulózových nanokrystalů (CelluloseLab),
- Receptorová kapalina:
 - Brij® 98- Polyoxyethylen (20) oleyl ether (Sigma Aldrich),
 - Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Biosera),
 - Gentamicin sulfát (Sigma Aldrich),
- Kofein anhydrát (Fichema).

8.3 Biologický materiál

- Prasečí ucho.

8.4 Příprava a charakterizace CNC disperze

Pro přípravu zásobní disperze CNC byl použit komerčně dostupný vodný roztok celulózových nanokrystalů (CelluloseLab). Ten byl naředěn v poměru 1:1 s DEMI vodou do zásobní lahve (100 g vodného roztoku 12,2 % CNC + 100 g DEMI H₂O). Směs byla poté ponechána k ultrazvukové homogenizaci v ledové lázni při amplitudě 60 % po dobu 30 minut.

8.4.1 Stanovení sušiny

Pro stanovení hmotnostního obsahu CNC v připravené zásobní disperzi byl použit postup stanovení sušiny. 1 ml zásobní disperze byl odebrán do suché předem zvažené váženky. Váženka s odebraným vzorkem byla poté otevřená umístěna do sušárny a sušena při 105 °C

do konstantní hmotnosti. Průběžná i finální kontrola hmotnosti probíhala vždy po vychladnutí váženky se vzorkem v exsikátoru. Z rozdílu hmotností vzorku s obsahem vody a bez obsahu vody byl stanoven hmotnostní obsah CNC v zásobní disperzi.

8.4.2 Stanovení velikosti částic CNC disperze

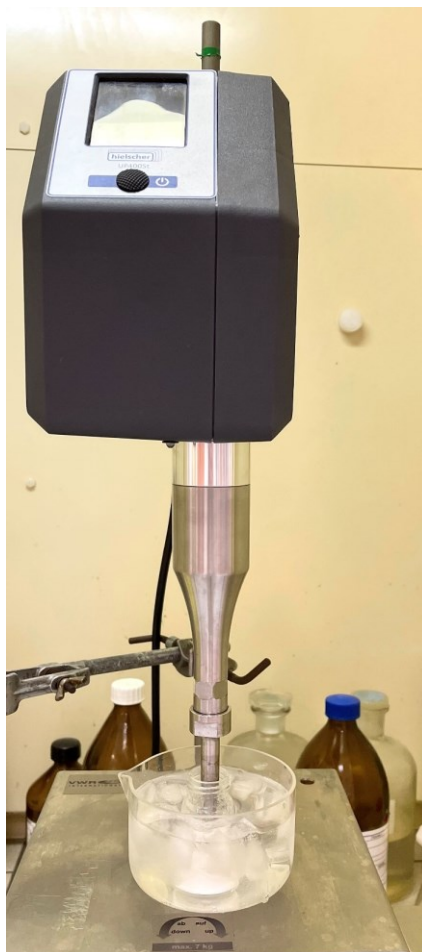
Pro vyhodnocení velikosti disperzních částic a určení jejich distribuce bylo využito metody dynamického rozptylu světla (DLS). Jedná se o techniku vhodnou pro sledování velikosti částic spadajících do submikronové oblasti. Soubor částic je ozářen monochromatickým zdrojem světla a je sledována fluktuace intenzity rozptýleného záření. Rozptyl světla a jeho fluktuace jsou způsobeny interferenčním zesilováním a zeslabováním na nestacionárních částicích pohybujících se Brownovým pohybem. Intenzita rozptýleného záření, naměřená detektorem, kolísá s časem, přičemž částice větších rozměrů se pohybují pomaleji a vykazují tak i pomalejší fluktuace rozptýleného záření. Z rychlostních změn jsou získány údaje o velikosti a distribuci částic. Hodnota velikosti částic získaná z měření je vyjádřena jako z-průměr velikosti (z-average), což je intenzitně vážený střední hydrodynamický průměr velikosti částic. Dalším parametrem získaným měřeními DLS je index polydisperzity (PDI). Hodnota PDI dosahující 0 odkazuje na monodisperzní charakter systému, naopak hodnoty PDI blíží se k 1 ukazují na zastoupení vícero velikostních frakcí. [39], [40]

Pro samotné měření velikosti částic byl neprodleně po přípravě zásobní disperze napipetován do kyvety 1 ml DEMI vody a 15 μ l připravené disperze CNC. Měření bylo provedeno pomocí přístroje Zetasizeru Nano ZS90, při zadaných parametrech indexu lomu celulóзовých částic a disperzního média (DEMI voda), teplotě 25 °C, pH 6 a třech opakováních. Z provedeného měření byly následně získány průměrné hodnoty z-average a PDI.

8.5 Příprava emulzí

Metodika přípravy PE byla nastavena podle publikace Mikulcová et al. [31] Pro přípravu Pickeringových emulzí bylo využito pevných částic nanokrystalické celulózy připravené postupem uvedeným v části 8.4. Olejovou fází tvořil vždy jeden ze dvou typů složek EO, cinnamaldehyd nebo limonen. Emulze byly připraveny jako typ O/V se zvolenými poměry olejové fáze ku vodné fázi 10/90 a 20/80. PE byly rovněž připravované s různými koncentracemi CNC (0,3; 0,5; 0,7; 1 hm%) ve vodné fázi. Emulgační proces a následná stabilita emulzí byla ještě podpořena přidávkem 3 mM CaCl₂.

Olejevá fáze (tvořená limonenem nebo cinnamaldehydem) a jednotlivé složky vodné fáze sestávající se z příslušné navážky zásobní disperze CNC částic doplněné vodou byly po navážení smíchány a byl k nim přidán roztok chloridu vápenatého. Směs byla pre-emulgována pomocí vortexu po dobu 1 minuty. Následně byla ultrazvukovým homogenizátorem UP400St provedena emulgace v ledové lázni při amplitudě 60 % po dobu 2,5 minuty (Obrázek 9).



Obrázek 9: Ultrazvuková homogenizace emulze s chlazením

8.5.1 Preformulační studie:

V rámci této studie byly připraveny formulace PE typu O/V s následujícím složením, vždy s olejovou fází tvořenou limonenem nebo cinnamaldehydem:

Tabulka 1: Složení emulzí s olejovou fází tvořenou limonenem, nebo cinnamaldehydem

Poměr O/V	Obsah CNC (%)		
10/90	0,5	0,7	1
20/80	0,5	0,7	1

8.5.2 Formulační studie:

Finální formulace byly připraveny v následujícím složení:

- PE typu O/V s olejovou složkou tvořenou cinnamaldehydem v poměrech O/V 10/90 a 20/80
- Obdobně byly připraveny emulze s olejovou složkou tvořenou limonenem v poměrech O/V 10/90 a 20/80.

Tabulka 2: Složení emulzí s obsahem olejové složky limonen, nebo cinnamaldehyd

Poměr O/V	Obsah CNC (%)				Koncentrace CaCl ₂ (mM)
10/90	0,3	0,5	0,7	1	6
20/80	0,3	0,5	0,7	1	6

8.6 Charakterizace emulzí

8.6.1 Stanovení velikosti emulzních kapek

Ke stanovení velikosti částic a distribuce velikosti částic lze použít techniku laserové difrakce. Na tomto principu pracuje i analyzátor velikosti částic Mastersizer 3000. Laserový paprsek prochází vzorkem dispergovaných částic a jsou měřeny úhlové změny intenzity rozptýleného světla. Na velkých částicích dochází k rozptylu světla pod malými úhly, kdežto malé částice rozptylují světlo pod velkými úhly, vzhledem k laserovému paprsku. Získaná data o intenzitě úhlového rozptylu jsou analyzována pro výpočet velikosti částic, jež vytvořily daný rozptylový obrazec. Velikost částic je vyjádřena jako objemově vážený průměr značený D [4;3]. Tato technika umožňuje měřit částice o velikosti od 10 nm do 3,5 mm. [41]

Velikost emulzních kapek byla stanovována ihned po přípravě PE pomocí přístroje Mastersizer 3000. Automatizovaná dispergační jednotka Hydro byla naplněna DEMI vodou a do ní byl následně dávkován vzorek připravené emulze až do požadovaných hodnot obskurace (2-20 %). Měření probíhalo při nastavených parametrech indexu lomu disperzního prostředí a disperzních částic, při teplotě 25 °C a při otáčkách 2200 rpm vždy ve třech opakováních. Ze třech opakování byla následně vyhodnocena průměrná hodnota

velikosti částic jako objemově vážený průměr $D [4;3]$ a směrodatná odchylka. Směrodatná odchylka byla určena podle Deana a Dixona pro malý počet paralelních stanovení.

8.6.2 Vizuální pozorování

Ihned po přípravě PE byl vizuálně zhodnocen jejich vzhled z hlediska barvy, homogenity nebo případného pozorovaného množství nezaemulgované olejové fáze.

8.6.3 Sledování stability – fázové studie

Stabilita emulzí byla sledována v čase (7 a 13 dní po přípravě) a vyhodnocena pomocí vizuálního pozorování a měřením změn ve velikostech emulzních kapek s využitím techniky laserové difrakce. Pozorované změny v homogenitě emulzí byly vyhodnoceny jako index krémování pro emulze s olejovou složkou limonenu a index sedimentace pro PE s olejovou složkou limonen.

Index krémování byl vypočten podle Rovnice 1:

$$CI = \frac{h_{krém}}{h_{celková}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

Kde:

$h_{krém}$ je výška krémové vrstvy (cm),

$h_{celková}$ je celková výška (cm).

Index sedimentace byl vypočten podle Rovnice 2:

$$SI = \frac{h_{sediment}}{h_{celková}} \cdot 100 \% \quad (2)$$

Kde:

$h_{sediment}$ je výška sedimentační vrstvy (cm),

$h_{celková}$ je celková výška (cm).

Po celou dobu sledování stability byly vzorky emulzí uchovávány v chladničce.

8.7 Stanovení transdermální penetrace

Testování bylo provedeno podle modifikovaného postupu OECD 428: Absorpce pokožkou: metoda *in vitro*. [42]

8.7.1 Příprava biologického materiálu

Jako modelová kůže byla použita kůže vnitřní strany ucha prasete. Prasečí ucho bylo uchováváno při teplotách -20 °C a těsně před použitím bylo ponecháno k pozvolnému rozmražení v chladničce. Rozmražené ucho bylo poté na vnitřní straně zbaveno chlupů. Následně byla kůže vnitřní strany ucha opatrně oddělena od chrupavky pomocí skalpelu tak, aby nedošlo k jejímu porušení. Oddělená kůže byla nařezána na vzorky vhodných rozměrů $2 \times 2\text{ cm}$ (Obrázek 10).



Obrázek 10: Vzorky nařezané kůže vnitřní strany prasečího ucha

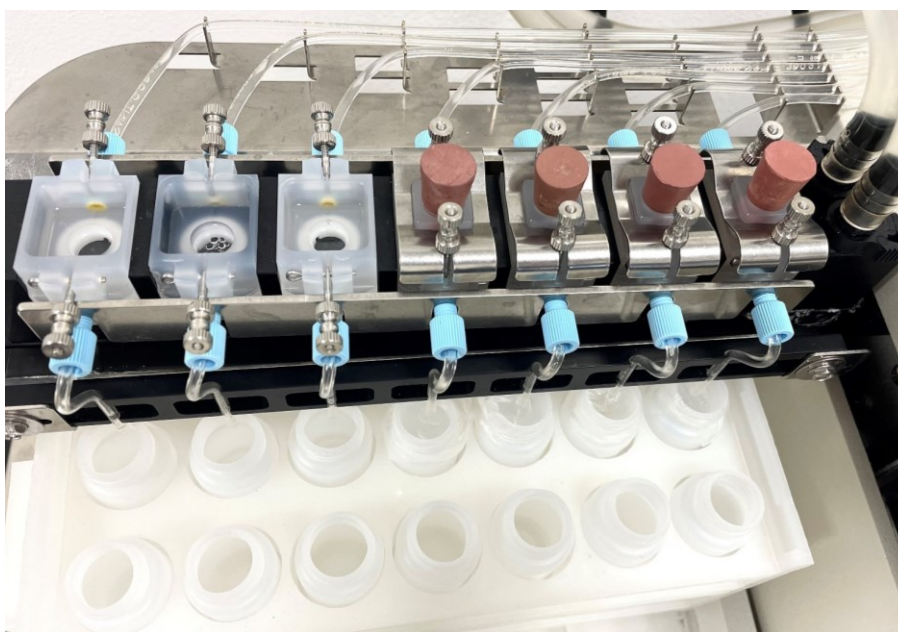
8.7.2 Kontrola integrity kůže

Integrita kožních vzorků byla hodnocena pomocí měření transepidermální ztráty vody (TEWL). Sonda Tewameter™ 300 byla přiložena na vzorek kůže a byl proveden odečet ztráty vody v $\text{g/h}\cdot\text{m}^2$. K následnému použití byly vybrány ty vzorky, u kterých hodnota TEWL nepřekračovala $15\text{ g/h}\cdot\text{m}^2$, což zaručovalo integritu kožních vzorků, která zaručila reprodukovatelnost výsledků propustnosti kůže.

8.7.3 Provedení testu transdermální absorpce na Franzových difuzních komůrkách

Emulze vybrané pro finální testování transdermální absorpce (1 % CNC, O/V 10/90, olejová fáze limonen nebo cinnamaldehyd) byly před aplikací krátce homogenizovány pomocí ultrazvuku po dobu půl minuty v ledové lázni při amplitudě 60 %. Tak byla zajištěna homogenita aplikovaných PE.

Experiment probíhal na aparatuře Franzových difuzních komůrek (Obrázek 11) s termoregulační lázní zajišťující stabilní teplotu 32 °C a se systémem pro konstantní průtok receptorové kapaliny po celou dobu probíhajícího experimentu. Složení receptorové kapaliny představoval fosfátem pufrovaný fyziologický roztok s obsahem 1,5 % neionického tenzidu Brij® 98 a 0,05 % gentamycin sulfátu. Kožní vzorky byly umístěny do aparatury pokožkou směrem nahoru. Přitom bylo dbáno na to, aby spodní část kůže byla v dokonalém kontaktu s receptorovou kapalinou. Takto byla ponechána kůže ke kondicionaci po dobu 30 minut. Po uplynutí kondicionační doby bylo na kůži rovnoměrně nanášeno 60 µl připravené PE společně s 60 µl 1% roztoku kofeinu jako modelového léčiva. Komůrka byla následně překryta pryžovou zátkou. Pro PE s limonenem i cinnamaldehydem byly provedeny dvě paralelní stanovení. Doba trvání experimentu byla stanovena na 24 hodin. K hodnocení transdermální absorpce byly v tomto případě využity pouze vzorky odebrané z receptorové kapaliny.



Obrázek 11: Aparatura, Franzovy difuzní komůrky

8.8 Analýza vzorků receptorové kapaliny s využitím HPLC

Odebrané vzorky receptorové kapaliny byly analyzovány na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu sestaveném z pumpy Waters 600E s chromatografickou kolonou X-Select CSH C18 a detekce byla prováděna pomocí UV-VIS detektoru UV200 DeltaChrom. Signály byly vyhodnoceny softwarem Clarity. Analýza byla prováděna při teplotě místnosti (25 °C) a průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 0,8 ml/min. Vzorky byly dávkovány pomocí nástřikového ventilu se smyčkou o objemu 20 µl. Každý vzorek byl analyzován třikrát. Vyhodnocení bylo provedeno odečtem hodnot retenčních časů a ploch elučních píků.

8.8.1 Stanovení množství cinnamaldehydu a kofeinu ve vzorku receptorové kapaliny

Vlnová délka, při které byla provedena měření, byla nastavena podle absorpčního maxima cinnamaldehydu λ_{\max} 281 nm. [31] Analýza kofeinu probíhala současně při ponechání stejné vlnové délky s využitím jejich blízké hodnoty absorpčních maxim. Ta pro kofein činí λ_{\max} 274 nm. [43]

Tabulka 3: Parametry metody HPLC pro analýzu cinnamaldehydu a kofeinu

Analyzovaná látka	λ stanovení (nm)	Mobilní fáze
Cinnamaldehyd	281	Acetonitril : 0,1% kyselina fosforečná, 48:52
Kofein	281	Acetonitril : 0,1% kyselina fosforečná, 48:52

Pro stanovení koncentrace cinnamaldehydu a kofeinu v receptorové kapalině byla použita metoda kalibrační přímky. Byly připraveny kalibrační roztoky cinnamaldehydu a kofeinu v koncentracích uvedených v Tabulce č. 4. Tyto roztoky byly analyzovány a z ploch jejich elučních píků byla sestavena závislost plochy na koncentraci. Tato závislost byla proložena lineární regresí a byla vyhodnocena rovnice přímky. Do rovnice přímky byla následně dosazena průměrná hodnota plochy píku analyzované látky a byla vypočtena její koncentrace.

Tabulka 4: Koncentrace kalibračních standardů pro cinnamaldehyd a kofein

Látka	Koncentrace (mg/ml)					
Cinnamaldehyd	0,005	0,010	0,020	0,030	0,040	0,050
Kofein	0,010	0,015	0,020	0,025	0,030	0,050

8.8.2 Stanovení množství limonenu a kofeinu ve vzorku receptorové kapaliny

Stanovení limonenu bylo provedeno v mobilní fázi, jejíž složení je uvedeno v Tabulce 5 a při vlnové délce absorpčního maxima pro limonen λ_{\max} 205 nm [31]. Kofein by stanoven za odlišných podmínek, jak v rámci mobilní fáze, tak i vlnové délky (λ_{\max} 274 nm).

Tabulka 5: Parametry metody HPLC pro analýzu limonenu a kofeinu

Analyzovaná látka	λ stanovení (nm)	Mobilní fáze
Limonen	205	Metanol: DEMI H ₂ O, 90:10
Kofein	274	Metanol: DEMI H ₂ O, 30:70

Pro vyhodnocení množství kofeinu ve vzorku receptorové kapaliny byl použita metoda kalibrační přímky podle postupu uvedeném v bodě 8.8.2.

Tabulka 6: Koncentrace kalibračních standardů pro kofein

Látka	Koncentrace (mg/ml)				
Kofein	0,01	0,015	0,02	0,03	0,04

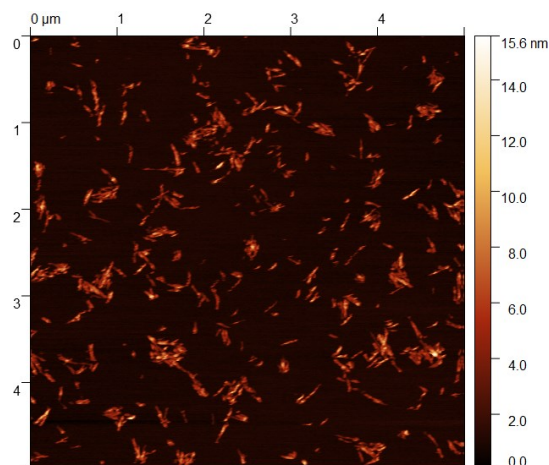
9 VÝSLEDKY A DISKUZE:

Následující část obsahuje představení naměřených výsledků a jejich diskusi.

9.1 Disperse CNC – vlastnosti a charakterizace

9.1.1 Morfologie CNC

Na Obrázku 12 je zobrazena morfologie částic CNC získaná metodou mikroskopie atomárních sil (AFM). Mikroskopický snímek potvrdil přítomnost protáhlých, tyčinkovitých koloidních částic s délkou od 50 do 450 nm a šířkou 10 – 15 nm. Tyto částice jsou dále použity pro přípravu Pickeringových emulzí.



Obrázek 12: Vzhled částic disperse CNC pořízený pomocí AFM. Zdroj: Laboratoř Biomateriálů UTB.

9.1.2 Velikost částic a index polydisperzity CNC disperze

Z údajů získaných z měření na Zetasizeru Nano ZS90 byl vyhodnocen střední hydrodynamický průměr velikosti částic připravené zásobní disperze CNC jako (52 ± 13) nm. Hodnota polydisperzního indexu byla stanovena jako $(0,3 \pm 0,2)$, což ukazuje na přítomnost více velikostních frakcí částic v připravené disperzi. Poměrně velká variabilita ve výsledcích z DLS je způsobena silně anizotropním tvarem CNC.

Tabulka 7: Hodnoty Z-average a PDI pro zásobní disperzi CNC

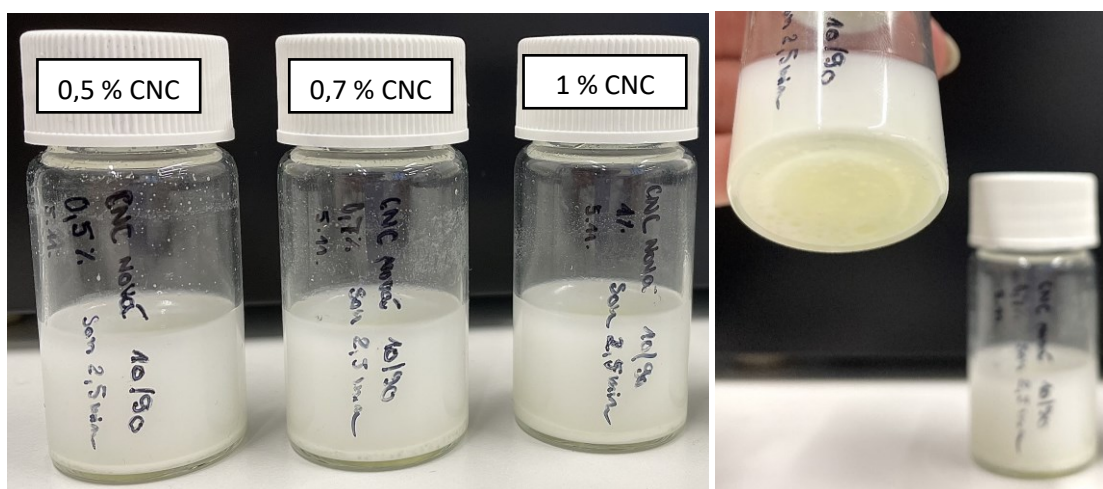
Měření	Z-average [nm]	PDI
1	64	0,2
2	42	0,6
3	50	0,2
Průměr	52	0,3
SD	13	0,2

9.1.3 Stanovení hmotnostního obsahu CNC v zásobní disperzi

Metodou stanovení sušiny byl z rozdílu hmotností vzorku s obsahem vody a bez obsahu vody vyhodnocen hmotnostní obsah CNC v zásobní disperzi jako 8 hm%. Tato hodnota byla dále využita pro výpočet navážek CNC disperze potřebných pro přípravu emulzí.

9.2 Úvodní formulační studie

Pro úvodní nastavení formulace byla připravena řada PE s hmotnostním obsahem stabilizačních částic 0,5; 0,7 a 1 % CNC. Olejovou fází tvořil limonen nebo cinnamaldehyd, který byl vzhledem k vodné fázi v poměru O/V 10/90. Pro dosažení dobrých emulgačních vlastností se do emulzí s obsahem stabilizačních částic CNC přidává chlorid vápenatý. Podle publikace Mikulcová et al. [31] byly připraveny emulze s obsahem 3 mM CaCl₂. Všechny připravené emulze ovšem vykazovaly velmi nízkou stabilitu. Např. u emulzí s obsahem cinnamaldehydu byl brzy po přípravě (15 minut) pozorován sediment u všech hmotnostních obsahů CNC. Po čtyřech dnech pak bylo pozorováno i oddělení fází, kdy byly na dně vialky s PE patrné větší olejové kapky uvolněné z emulze (Obrázek 13)



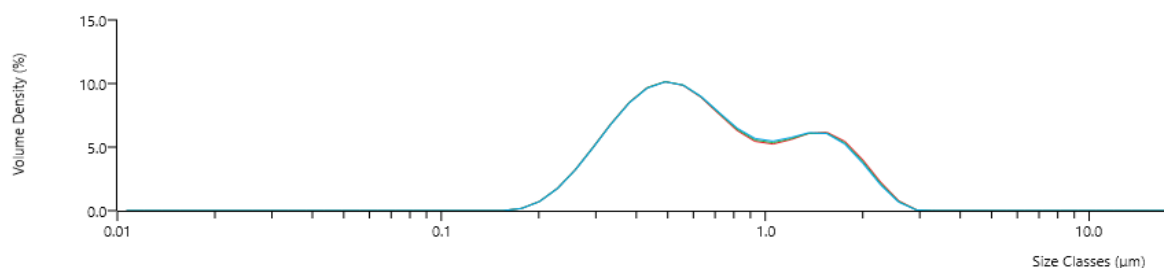
Obrázek 13: Vlevo: vzhled emulzí s cinnamaldehydem stabilizovaných CNC po 4 dnech od přípravy, vpravo: detail pozorovaných uvolněných olejových kapek.

Přesto byla i u těchto nestabilních emulzí provedena základní charakterizace, stanovení velikosti emulzních kapek, laserovou difrací ihned po přípravě a po 4 dnech skladování při teplotě 4 °C. Velikost kapek byla vyjádřena jako objemově vážený průměr D [4;3] (Tabulka č. 8). Z údajů v tabulce je patrné, že pro všechny hmotnostní obsahy CNC

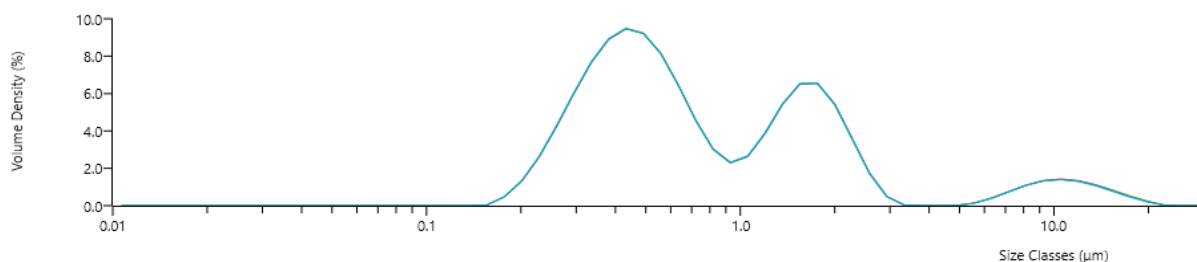
docházelo během skladování k nárůstu velikosti emulzních kapek, což ukazuje na probíhající proces koalescence/aglomerace v emulzích.

Tabulka 8: Objemově vážený průměr emulzních kapek pro PE s obsahem cinnamaldehydu, ihned po přípravě a po 4 dnech skladování

Dny	Poměr O/V	CNC (%)	D [4;3] (μm)	SD
0	10/90	0,5	0,819	0,012
		0,7	0,824	0,004
		1	0,869	0,003
4	10/90	0,5	3,8	1,1
		0,7	3,7	0,4
		1	2,07	0,03



Obrázek 14: Distribuční křivka velikosti kapek PE s obsahem cinnamaldehydu stabilizovaná 0,7 % CNC, ihned po přípravě



Obrázek 15: Distribuční křivka velikosti kapek PE s obsahem cinnamaldehydu stabilizovaná 0,7 % CNC, 4 dny po přípravě

Při srovnání distribučních křivek velikosti emulzních kapek, u PE s hmotnostním obsahem 0,7 % CNC a olejovou fází tvořenou cinnamaldehydem, ihned po přípravě (Obrázek 14) a po 4 dnech skladování (Obrázek 15) bylo možné pozorovat po 4 dnech od přípravy tvorbu frakce větších částic ~10 μm, což opět ukazuje na procesy značí nestabilitu připravené emulze.

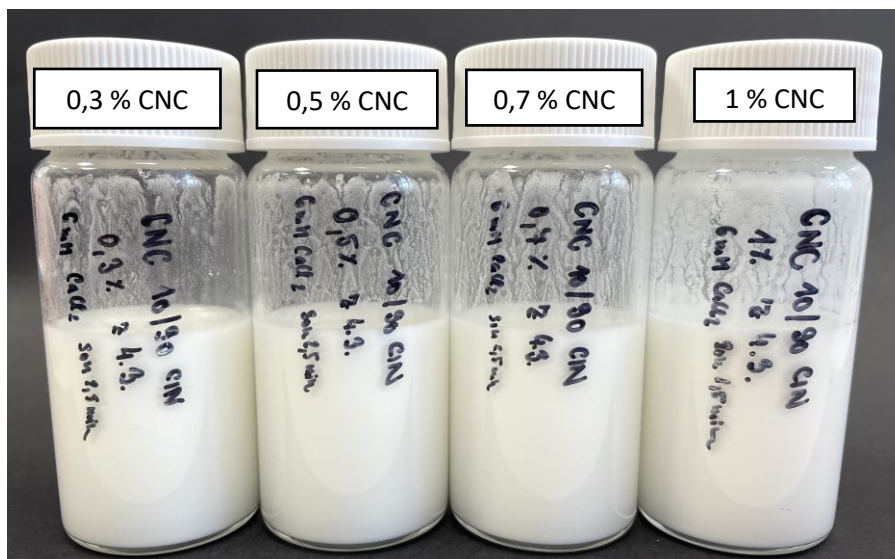
9.3 Formulační studie

Běžně voleným poměrem olejové ku vodné fázi pro tvorbu stabilních emulzí je poměr 20/80. V tomto poměru byla připravena řada formulací s obsahem CNC (0,3; 0,5; 0,7 a 1 %) ve vodné fázi a olejovou složku tvořenou cinnamaldehydem nebo limonenem. Ve snaze nalézt kompromis mezi omezením dráždivých účinků, které esenciální oleje vykazují, a zachováním jejich funkce jako urychlovačů transdermální absorpce, bylo zvoleno řešení v podobě omezení celkového množství EO ve formulaci. Proto byly připraveny také PE typu O/V s poměrem olejové fázi ku vodné 10/90. V případě této bakalářské práce byly pro stabilizaci PE použity částice CNC od jiného dodavatele (CelluloseLab), než částice použité Mikulcovou et al. [31], kde dosáhli přidavkem 3mM CaCl₂ dostatečně stabilních emulzí. Byl proto proveden test zvýšení stability PE navýšením obsahu CaCl₂ na jeho celkovou koncentraci v emulzi 6 mM. Tím došlo k výraznému zvýšení stability emulzí. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto pro další použití připravovat formulace ve složení uvedeném v části 8.5.2 v Tabulce 2. Emulze byly ihned po přípravě vizuálně hodnoceny a velikost emulzních kapek byla stanovena laserovou difrakcí.

9.3.1 Charakterizace a vlastností emulzí

9.3.1.1 *Emulze s olejovou fází tvořenou cinnamaldehydem*

Ihned po přípravě vzorků s oběma poměry O/V 10/90 i 20/80 nebyly ve vzhledu emulzí pozorovány větší rozdíly (Obrázek 16) a v obou případech byly připraveny homogenní, mléčně bílé až lehce nažloutlé emulze (vlivem přirozené barvy cinnamaldehydu). Při srovnání vlivu obsahu CNC byl největší rozdíl pozorován u emulzí s 0,3 % obsahem CNC, kde se u vzorků s poměrem 10/90 vyskytovala na povrchu malá nezaemulgovaná kapka olejové fáze, která se u emulze 20/80 zvětšila. Tak nízký obsah CNC částic (0,3 %) už pravděpodobně není dostačující pro enkapsulaci veškeré olejové fáze v emulzi, což se projevilo především u emulzí s vyšším obsahem oleje. Chování těchto emulzí hodnocené pomocí vizuálního pozorování je shrnuto v Tabulkách 9 a 10.



Obrázek 16: Vzhled PE, poměr O/V 10/90 s obsahem cinnamaldehydu, ihned po přípravě. Vzhled emulzí s poměrem 20/80 byl identický

Tabulka 9: Popis vizuálního pozorování PE s obsahem cinnamaldehydu, O/V 10/90

CNC (%)	Vzhled emulze O/V 10/90
0,3	• malá nezaemulgovaná kapka oleje na povrchu, emulze homogenní
0,5	• malá nezaemulgovaná kapička oleje na povrchu, emulze homogenní
0,7	• drobná nezaemulgovaná kapička oleje na povrchu, emulze homogenní
1	• drobná nezaemulgovaná kapička oleje na povrchu, emulze homogenní

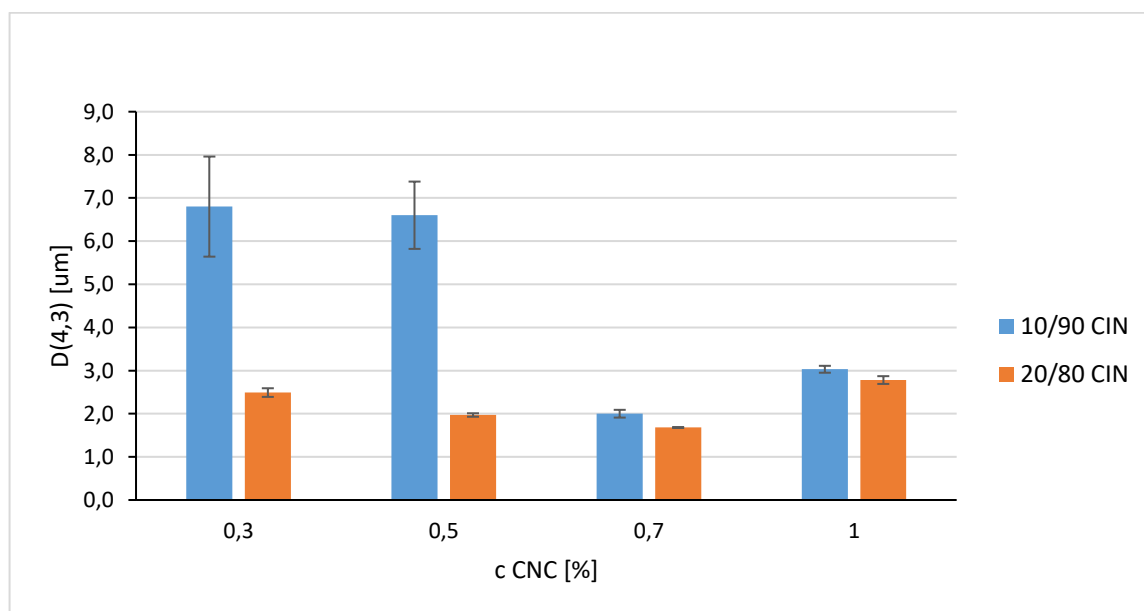
Tabulka 10: Popis vizuálního pozorování PE s obsahem cinnamaldehydu, O/V 20/80

CNC (%)	Vzhled emulze O/V 20/80
0,3	•• velká nezaemulgovaná kapka OF na povrchu, emulze homogenní
0,5	• malá nezaemulgovaná kapička OF na povrchu, emulze homogenní
0,7	• malá nezaemulgovaná kapička OF na povrchu, emulze homogenní
1	• malá nezaemulgovaná kapička OF na povrchu, emulze homogenní

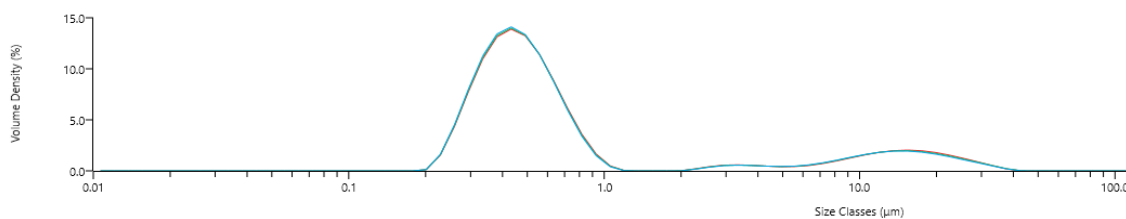
Tabulka 11: Objemově vážený průměr částic pro PE poměr O/V 10/90 a 20/80, s obsahem cinnamaldehydu, ihned po přípravě

Dny	Poměr O/V	CNC (%)	D [4;3] (μm)	SD
0	10/90	0,3	6,8	1,2
		0,5	6,6	0,7
		0,7	2,0	0,1
		1	3,0	0,1
	20/80	0,3	2,5	0,1
		0,5	2,0	0,4
		0,7	1,7	0,1
		1	2,8	0,1

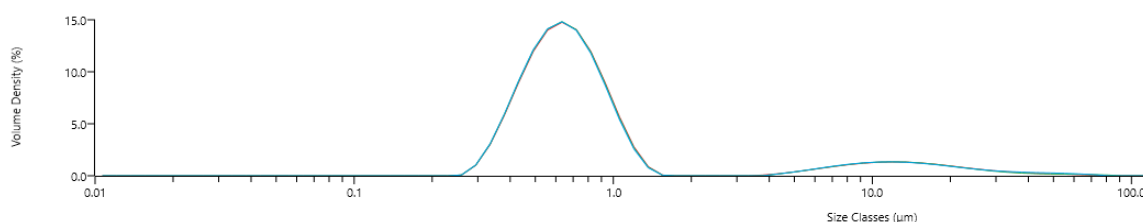
Emulze s oběma poměry O/V a 0,7% obsahem CNC vykazovaly nejmenší velikost emulzních kapek. Pro O/V10/90 byl objemově vážený průměr ($2,00 \pm 0,09$) μm a pro 20/80 činil ($1,68 \pm 0,01$) μm. Naopak největší velikost kapek byla změřena u vzorku s poměrem O/V 10/90 a obsahem 0,3 % CNC, kde byla hodnota D [4;3] ($6,8 \pm 1,2$) μm a u poměru 20/80 s obsahem CNC 1 % s hodnotou ($2,78 \pm 0,09$) μm. Obecně lze konstatovat, že emulze s poměrem O/V 20/80 obsahovaly menší kapky než emulze v poměru 10/90, což je patrné i z Obrázku 17.



Obrázek 17: Velikost emulzních kapek ihned po přípravě vzorků s různými koncentracemi CNC. Srovnání poměrů 10/90 a 20/80, olejová fáze CIN



Obrázek 18: Distribuční křivka velikosti emulzních kapek PE, poměr 10/90, s obsahem CIN, stabilizovaná 1 % CNC, ihned po přípravě

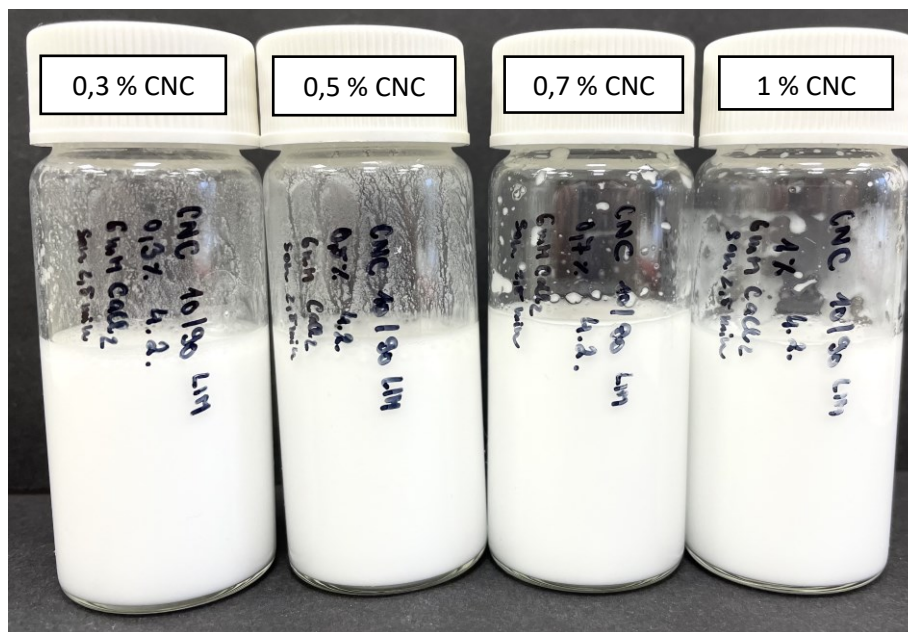


Obrázek 19: Distribuční křivka velikosti kapek PE, poměr 20/80, s obsahem CIN, stabilizovaná 1 % CNC, ihned po přípravě

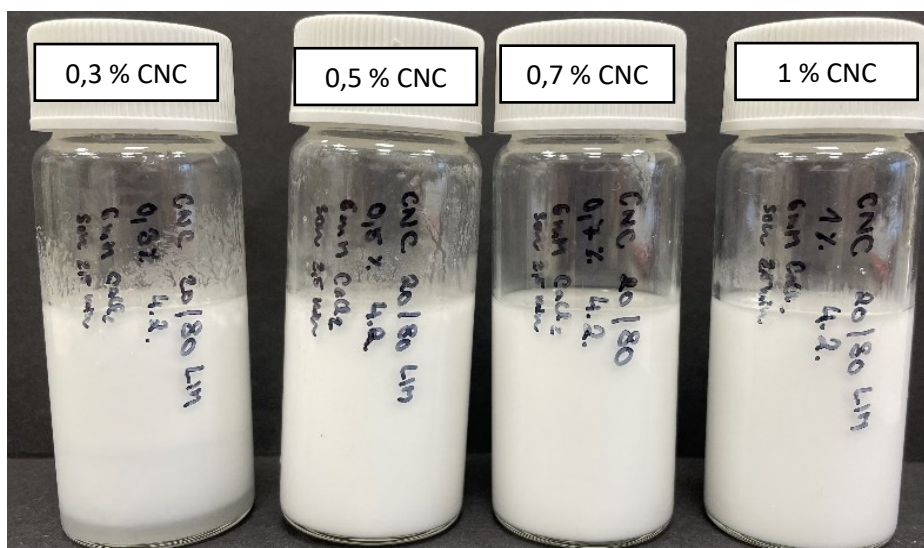
Při srovnání distribučních křivek emulzí stabilizovaných 1 % CNC s poměrem O/V 10/90 a 20/80 nebyly pozorovány větší rozdíly (Obrázek 18 a 19). Oba systémy vykazovaly bimodální tvar, kde se kromě hlavní populace částic vyskytoval i menší fragment větších částic s velikostí $\sim 10 \mu\text{m}$.

9.3.1.2 Emulze s olejovou fází tvořenou limonenem

Oba poměry O/V 10/90 i 20/80 dávaly mléčně emulze. Všechny emulze vykazovaly homogenitu, s výjimkou emulze s nejnižším použitým obsahem CNC 0,3 %, kde u emulze s poměrem 20/80 došlo ihned po přípravě k viditelnému krémování. U tohoto vzorku byla rovněž pozorována velká nezaemulgovaná kapka oleje na povrchu. Nízký obsah CNC, podobně jako u emulzí s CIN, neposkytuje dostatek stabilizačních částic pro enkapsulaci veškerého oleje. Obecně bylo na povrchu emulzí méně nezaemulgovaného oleje u emulze O/V 10/90, tato skutečnost vychází z nižšího zastoupení OF. Vzhled emulzí je představen na Obrázcích 20 a 21, popis jejich chování pak v Tabulkách 12 a 13.



Obrázek 20: Vzhled PE poměr O/V 10/90 s obsahem limonenu, ihned po přípravě



Obrázek 21: Vzhled PE poměr O/V 20/80 s obsahem limonenu, ihned po přípravě

Tabulka 12: Vizuální pozorování PE s obsahem limonenu O/V 10/90

CNC (%)	Vzhled emulze O/V 10/90
0,3	• malá nezaemulgovaná kapička OF na povrchu, emulze homogenní
0,5	• drobná nezaemulgovaná kapička OF na povrchu, emulze homogenní
0,7	emulze homogenní
1	emulze homogenní

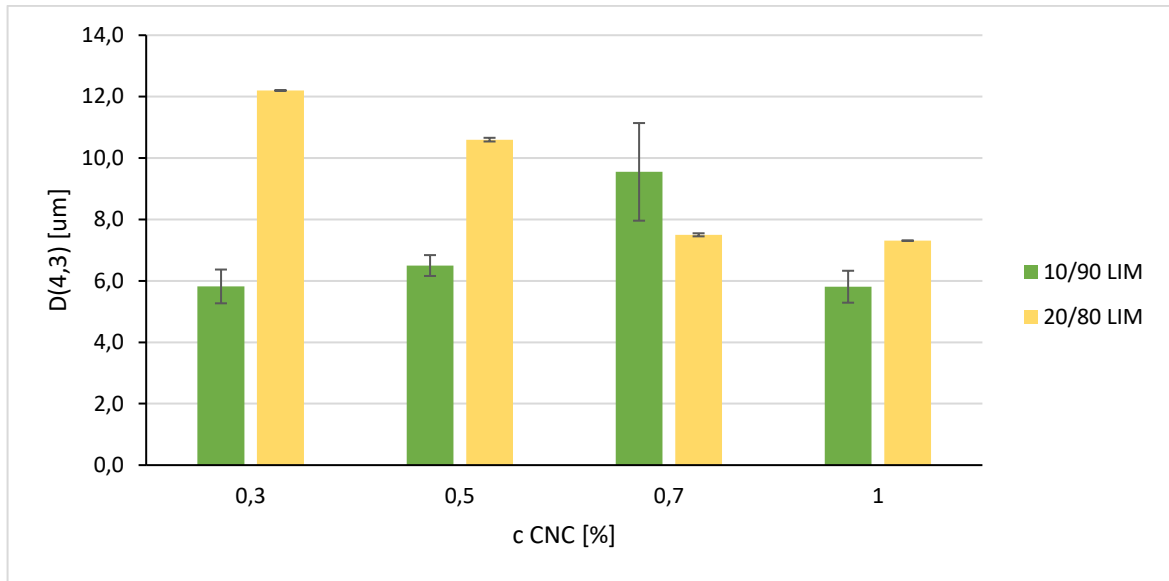
Tabulka 13: Vizuální pozorování PE s obsahem limonenu O/V 20/80

CNC (%)	Vzhled emulze O/V 20/80
0,3	•• velké nezaemulgované kapičky OF na povrchu, oddělení vrstev (krémování)
0,5	• malá nezaemulgovaná kapička OF na povrchu, emulze homogenní
0,7	• malá nezaemulgovaná kapička OF na povrchu, emulze homogenní
1	• drobná nezaemulgovaná kapička OF na povrchu, emulze homogenní

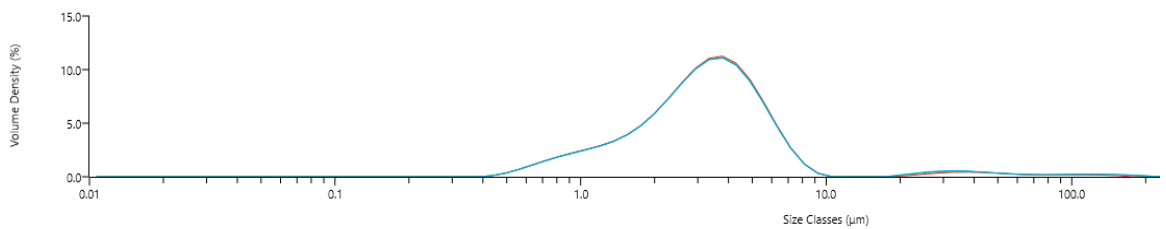
Tabulka 14: Objemově vážený průměr kapek PE poměr O/V 10/90 a 20/80, s obsahem limonenu, ihned po přípravě

Dny	Poměr O/V	CNC (%)	D [4;3] (μm)	SD
0	10/90	0,3	5,8	0,5
		0,5	6,5	0,3
		0,7	9,5	1,6
		1	5,7	0,5
	20/80	0,3	12,2	0,0
		0,5	10,6	0,1
		0,7	7,5	0,1
		1	7,3	0,0

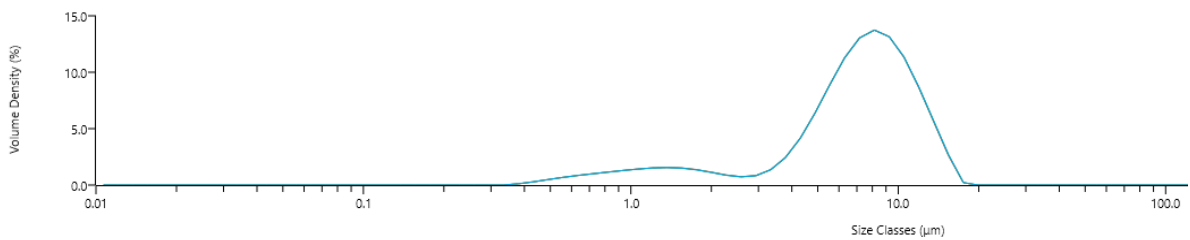
U vzorků připravených s oběma poměry O/V vykazovaly nejmenší velikost emulzních kapek emulze s 1 % obsahem CNC. Pro O/V 10/90 byl objemově vážený průměr $(5,7 \pm 0,5)$ μm a pro O/V 20/80 činil $(7,31 \pm 0,01)$ μm. Naopak největší velikost emulzních kapek byla změřena u emulzí s poměrem O/V 10/90 s 0,7 % CNC $(9,5 \pm 1,6)$ μm a u poměru 20/80 s obsahem CNC 0,3 % $(12,20 \pm 0,00)$ μm. Emulze s poměrem O/V 20/80 tedy obsahovaly větší kapky než emulze s O/V 10/90, což je patrné i z Obrázku 22. Toto chování emulzí s LIM se liší od vzorků, ve kterých byl olejovou fází CIN; zde naopak emulze s O/V obsahovaly kapky menší (Obrázek 17).



Obrázek 22: Velikost emulzních kapek emulzí s LIM ihned po přípravě stanovená pro emulze s různou koncentrací CNC, srovnání poměrů O/V 10/90 a 20/80

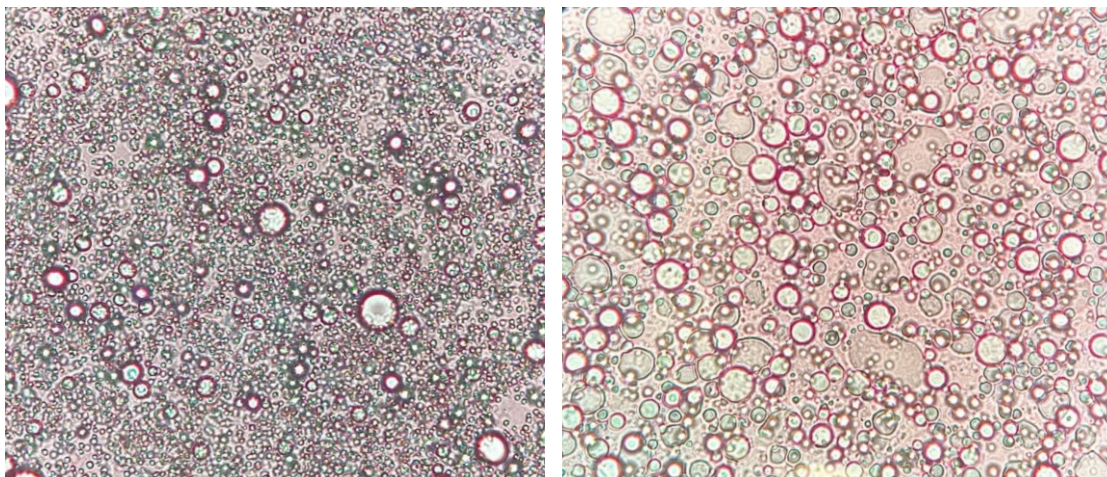


Obrázek 23: Distribuční křivka velikosti částic PE, poměr 10/90, s obsahem LIM, stabilizovaná 1 % CNC, ihned po přípravě



Obrázek 24: Distribuční křivka velikosti částic PE, poměr 20/80, s obsahem LIM, stabilizovaná 1 % CNC, ihned po přípravě

U distribučních křivek emulzí stabilizovaných 1 % CNC s poměrem O/V 10/90 a 20/80 lze pozorovat posun velikosti emulzních kapek u emulzí s O/V 20/80 k větším velikostem v porovnání s poměrem 10/90 (Obrázky 23 a 24).



Obrázek 25: Vzhled emulzních kapek PE 10/90, obsah CNC 1 %, vlevo: s obsahem CIN, vpravo: s obsahem LIM, snímky z optického mikroskopu při zvětšení 1000×

Vzhled emulzních kapek zobrazený optickým mikroskopem (Obrázek 25) potvrzuje zjištění získaná z dat měření laserové difrakce (Tabulka 11), kde emulze s obsahem CIN dávaly obecně výrazně menší emulzní kapky, než emulze s obsahem LIM. Tento vztah mezi složením olejové fáze a velikostí emulzních kapek je dobře ilustrován také na Obrázcích 17 a 22, ze kterých lze pozorovat, že emulze s obsahem CIN a poměrem O/V 10/90 obsahují větší kapky ve srovnání s emulzemi O/V 20/80. U emulzí s obsahem LIM je tomu naopak. To je zapříčiněno rozdílnou polaritou použitých olejů.

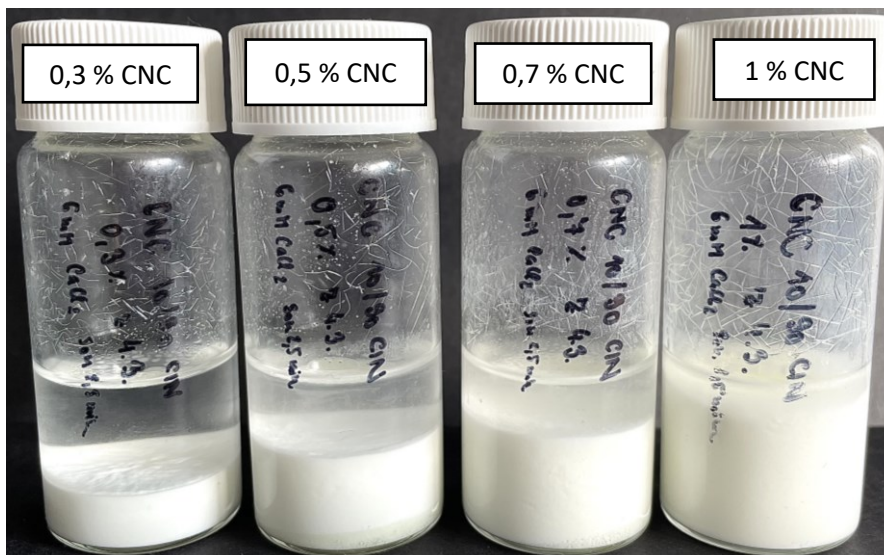
9.4 Fázové studie a stabilita emulzí

Stabilita připravených emulzí v čase byla hodnocena jak pomocí jejich fázového chování, tak měření změn ve velikosti emulzních kapek. Po dobu sledování stability byly emulze uchovávány při teplotě 4 °C v chladničce.

9.4.1 Emulze s obsahem CIN

Po 7 dnech od přípravy byla pozorována u emulzí připravených s oběma poměry O/V (10/90 i 20/80) ztráta homogenity, která se projevila oddělením sedimentační vrstvy pro emulze s obsahem CNC 0,3; 0,5 a 0,7 %. Emulze s obsahem CNC 1 % si však stále zachovávaly homogenní charakter. Vizuální pozorování vzorků je popsáno v Tabulkách 15 a 16. Vzhled emulzí po 13 dnech se příliš nelišil, oproti předchozímu pozorování docházelo jen k mírnému nárůstu sedimentační vrstvy, jak je patrné z Tabulky 17 shrnující stabilitu pomocí sedimentačního indexu. Po 13 dnech také došlo k oddělení sedimentační vrstvy i u emulzí s obsahem CNC 1 %, které byly do této doby homogenní. Tento stav je dobře patrný

z Obrázku 26, kde je již u všech emulzí s různou koncentrací CNC patrný sediment. Pro emulze s O/V 20/80 nebyl vzhled nijak signifikantně odlišný, pouze byla přítomna o něco větší sedimentační vrstva, jako je uvedeno také v Tabulce 17.



Obrázek 26: Vzhled PE, poměr O/V 10/90 s obsahem CIN, po 13 dnech od přípravy Pro emulze O/V 20/80 byl vzhled téměř identický

Tabulka 15: Vizuální pozorování PE s obsahem CIN, O/V 10/90 a 20/80, 7 dní po přípravě

Dny	Poměr O/V	CNC (%)	Vzhled emulzí
7	10/90	0,3	• velké množství malých kapiček OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		0,5	• drobné kapičky OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		0,7	• malé množství drobných kapiček OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		1	• emulze stále homogenní
	20/80	0,3	• velké množství malých kapiček OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		0,5	• drobné kapičky OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		0,7	• malé množství drobných kapiček OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		1	• emulze stále homogenní

Tabulka 16: Vizuální pozorování PE s obsahem CIN, O/V 10/90 a 20/80, 13 dní po přípravě

Dny	Poměr O/V	CNC (%)	Vzhled emulzí
13	10/90	0,3	•• velké množství malých kapiček OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		0,5	• drobné kapičky OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		0,7	• malé množství drobných kapiček OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		1	• malé množství drobných kapiček OF na spodu, oddělení sedimentační vrstvy
	20/80	0,3	•• velké množství malých kapiček OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		0,5	• drobné kapičky OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		0,7	• malé množství drobných kapiček OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy
		1	• malé množství drobných kapiček OF na dně vialky, oddělení sedimentační vrstvy

Tabulka 17: Stabilita emulzí vyjádřená pomocí indexu sedimentace SI (%)

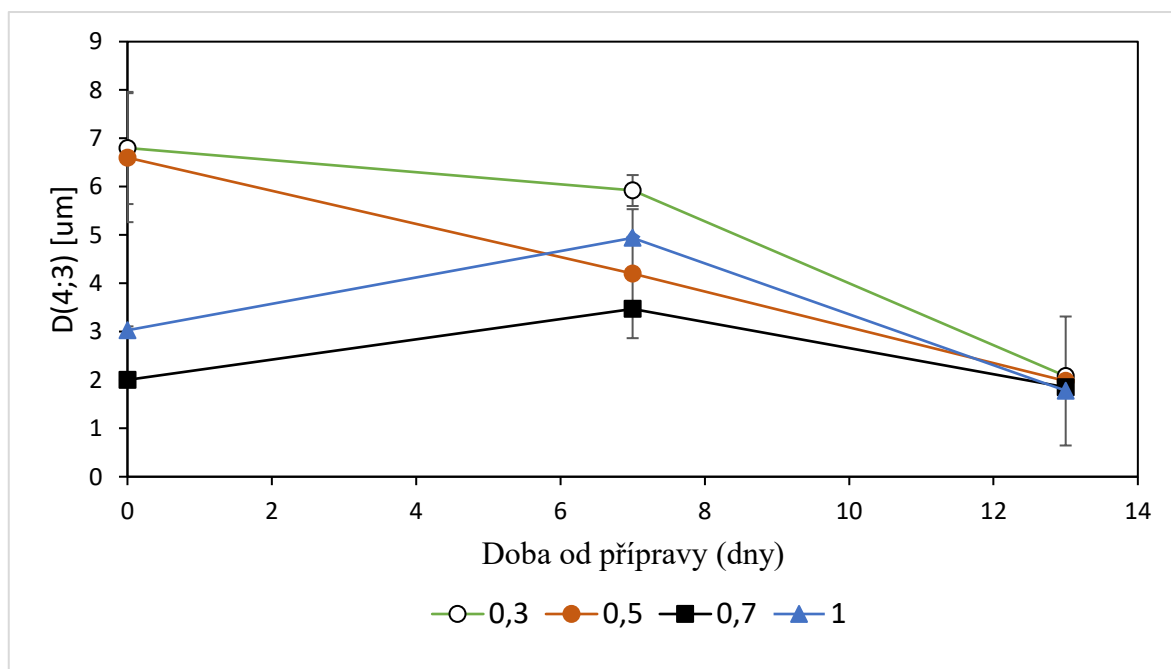
Dny	Poměr O/V 10/90		Poměr O/V 20/80	
	CNC (%)	SI (%)	CNC (%)	SI (%)
7	0,3	35	0,3	39
	0,5	52	0,5	54
	0,7	64	0,7	67
	1	100	1,0	100
13	0,3	32	0,3	39
	0,5	56	0,5	54
	0,7	64	0,7	64
	1	88	1,0	75

Změny ve velikosti emulzních kapek po 7 a 13 dnech od přípravy jsou zaznamenány v Tabulce 18. Obrázky 27 a 28 pak shrnují změny ve velikosti emulzních kapek od okamžiku jejich přípravy, až do 13 dne, kdy byla sledována stabilita. Z Obrázku 27, který ilustruje chování vzorku O/V 10/90 je patrné, že u emulzí s koncentrací CNC 0,3 a 0,5 % došlo po 7 dnech k poklesu velikosti emulzních kapek, který se po 13 dnech ještě zvětšil. Pro emulze o koncentraci CNC 0,7 a 1 % je po 7 dnech pozorován nejprve nárůst ve velikosti kapek a po 13 dnech je pozorován ve velikosti emulzních kapek další pokles. U vzorků s poměrem O/V 20/80 došlo u emulzí s koncentrací CNC 0,3; 0,5 a 0,7 % po 7 dnech k nárůstu velikosti emulzních kapek, to značí nízkou agregátní stabilitu emulzí, která se projeví tvorbou agregátů. Zatímco u emulze s 1 % CNC dochází po 7 dnech k poklesu velikosti emulzních

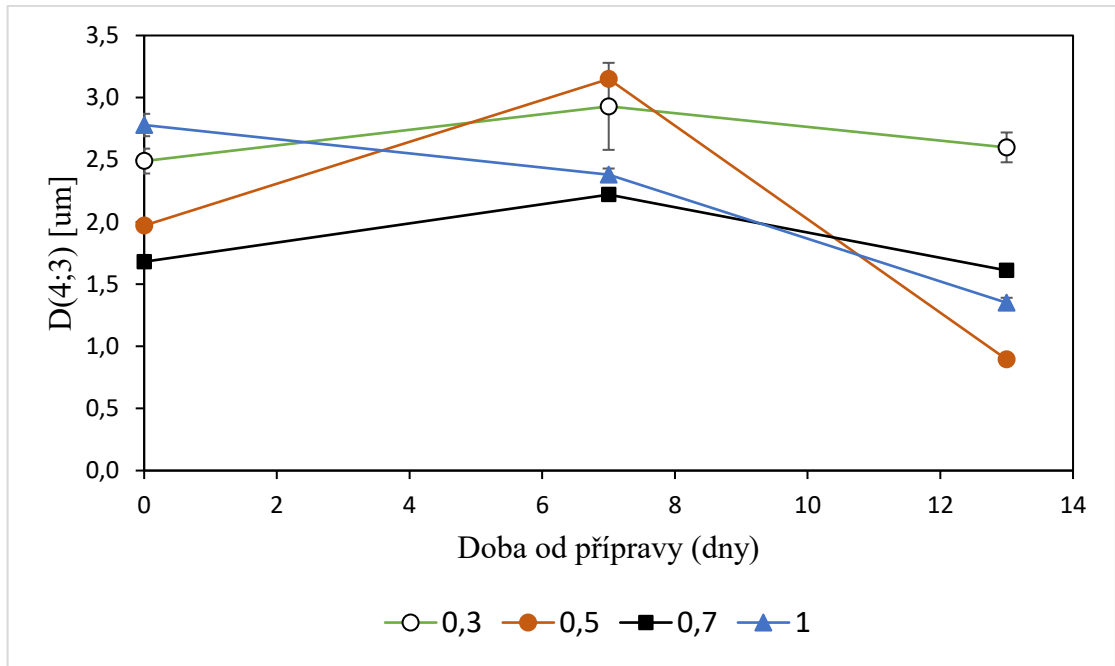
kapek. Po 13 dnech byl u všech emulzí bez ohledu na koncentraci CNC zaznamenán pokles ve velikosti částic (Obrázek 28).

Tabulka 18: Objemově vážený průměr emulzních kapek pro PE poměr 10/90 a 20/80, s obsahem CIN, sledování v čase 7 a 13 dní od přípravy

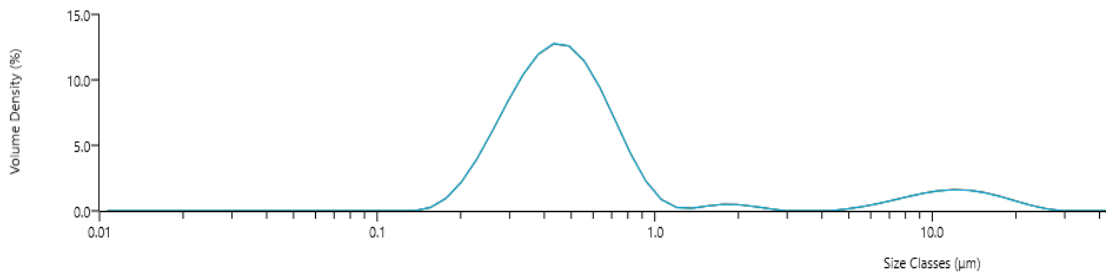
Dny	Poměr O/V	CNC (%)	D [4;3] (μm)	SD
7	10/90	0,3	5,92	0,32
		0,5	4,22	0,04
		0,7	3,47	0,1
		1	4,94	0,02
	20/80	0,3	2,93	0,035
		0,5	3,15	0,02
		0,7	2,22	0,01
		1	2,38	0,05
13	10/90	0,3	2,1	0,01
		0,5	2,0	0,05
		0,7	1,9	0,07
		1	1,8	0,01
	20/80	0,3	2,60	0,12
		0,5	0,89	0,00
		0,7	1,61	0,02
		1	1,35	0,04



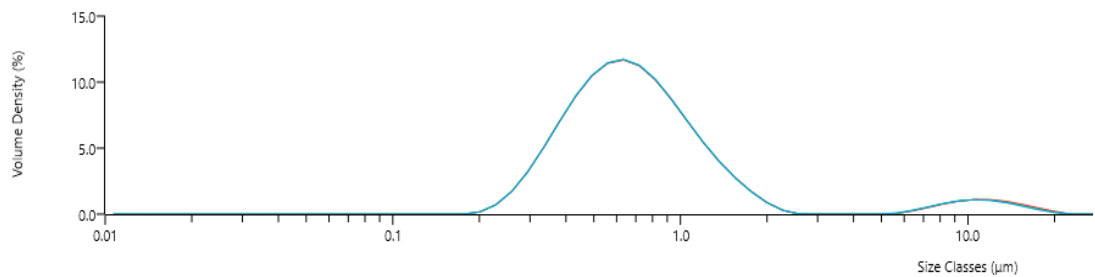
Obrázek 27: Velikost emulzních kapek 0, 7 a 13 dní po přípravě, pro různé koncentrace CNC, pro PE O/V 10/90, olej CIN



Obrázek 28: Velikost emulzních kapek 0, 7 a 13 dní po přípravě, pro různé koncentrace CNC, pro PE O/V 20/80 olej CIN



Obrázek 29: Distribuční křivka velikosti částic PE, poměr 10/90, s obsahem CIN, stabilizovaná 1 % CNC, 13 dní po přípravě

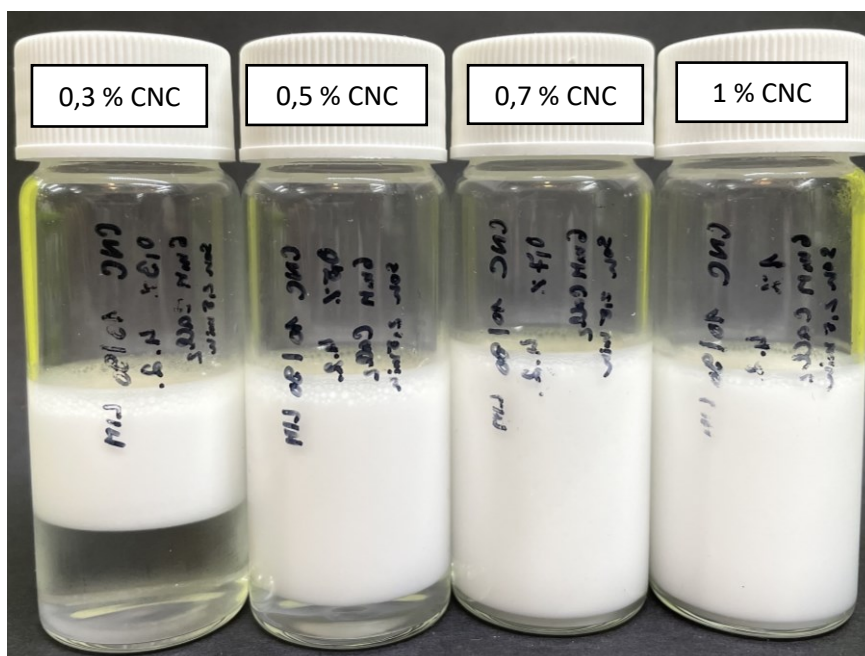


Obrázek 30: Distribuční křivka velikosti částic PE, poměr 20/80, s obsahem CIN, stabilizovaná 1 % CNC, 13 dní po přípravě

Při srovnání distribučních křivek emulzí stabilizovaných 1 % CNC je u emulzí s poměrem O/V 10/90 (Obrázek 29) patrné, že hlavní populace částic vykazuje menší velikosti ve srovnání s emulzí v poměru O/V 20/80 (Obrázek 30). Oba systémy měly jak ihned po přípravě (Obrázek 18 a 19), tak i po 13 dnech skladování bimodální tvar distribuce, kde byl kromě populace stále přítomen i menší fragment větších částic s velikostí $\sim 10 \mu\text{m}$ (Obrázek 29 a 30).

9.4.2 Emulze s obsahem LIM

Jako příklad vzhledu emulzí s LIM po 13 dnech od přípravy je uveden Obrázek 31 pro poměr O/V 10/90, kde byl pozorován vznik krémovací vrstvy u emulzí s obsahem CNC 0,3; 0,5 a 0,7 %, zatímco emulze s obsahem CNC 1 % zůstávaly homogenní. U emulzí s poměrem 20/80 byl vzhled velmi podobný s rozdílem oddělení krémovací vrstvy a ztráty homogenity i u emulzí s obsahem 1 % CNC. Vizuální pozorování, emulzí s oběma poměry O/V po 7 a 13 dnech od přípravy, je zaznamenáno v Tabulce 19 a 20. Nejlepší stabilitu, vyjádřenou pomocí indexu krémování (Tabulka 21), vykazovala emulze s poměrem O/V 10/90 a obsahem 1 % CNC. Toto vyhodnocení koresponduje také s vizuálním pozorováním.



Obrázek 31: Vzhled PE poměr O/V 10/90 s obsahem LIM, po 13 dnech od přípravy, vzhled emulzí 20/80 byl velmi podobný

Tabulka 19: Popis vizuálního pozorování PE s obsahem LIM, O/V 10/90 a 20/80, 7 dní po přípravě

Dny	Poměr O/V	CNC (%)	Vzhled emulzí
7	10/90	0,3	•• menší kapičky OF na povrchu, oddělení krémovací vrstvy
		0,5	• drobné kapičky OF na povrchu, oddělení krémovací vrstvy
		0,7	• malé množství drobných kapek OF na povrchu, emulze homogenní
		1	• emulze stále homogenní
	20/80	0,3	•• velké kapičky OF na povrchu, oddělení krémovací vrstvy
		0,5	• menší kapičky OF na povrchu, oddělení krémovací vrstvy
		0,7	• menší kapičky OF na povrchu, emulze stále homogenní
		1	• emulze stále homogenní

Tabulka 20: Vizuální pozorování PE s obsahem LIM, O/V 10/90 a 20/80, 13 dní po přípravě

Dny	Poměr O/V	CNC (%)	Vzhled emulzí
13	10/90	0,3	•• menší kapičky OF na povrchu, oddělení krémovací vrstvy
		0,5	• drobné kapičky OF na povrchu, oddělení krémovací vrstvy
		0,7	• drobné kapičky OF na povrchu, oddělení krémovací vrstvy
		1	• emulze stále homogenní
	20/80	0,3	•• velké kapičky OF na povrchu, oddělení krémovací vrstvy
		0,5	•• velké kapičky OF na povrchu, oddělení krémovací vrstvy
		0,7	• menší kapičky OF na povrchu, oddělení krémovací vrstvy
		1	• drobné kapičky OF na povrchu, oddělení krémovací vrstvy

Tabulka 21: Stabilita emulzí vyjádřená pomocí indexu krémování CI (%)

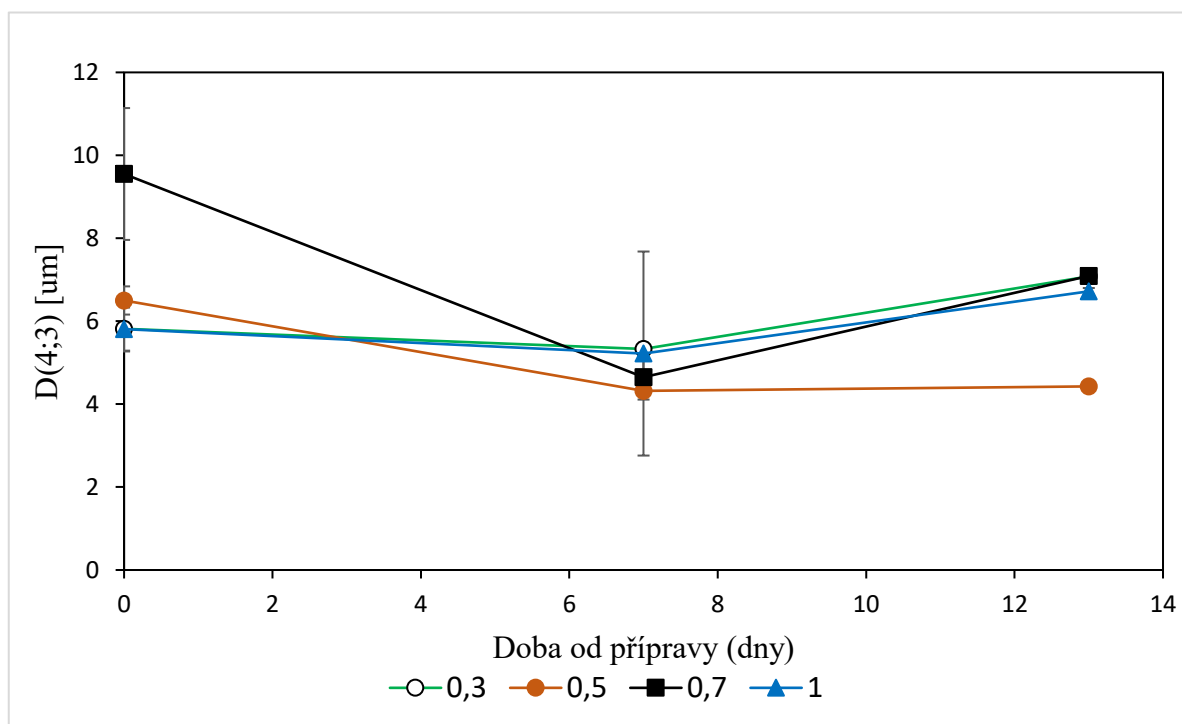
Dny	Poměr O/V 10/90		Poměr O/V 20/80	
	CNC (%)	CI (%)	CNC (%)	CI (%)
7	0,3	90	0,3	77
	0,5	98	0,5	90
	0,7	100	0,7	100
	1	100	1	100
13	0,3	59	0,3	77
	0,5	87	0,5	68
	0,7	97	0,7	84
	1	100	1	97

Naměřené změny ve velikosti emulzních kapek po 7 a 13 dnech jsou zaznamenány pro oba poměry O/V v Tabulce 22 a na Obrázku 32. Vztah mezi velikostí emulzních kapek v závislosti na době od přípravy je ilustrován také na Obrázcích 32 a 33. Kde je u emulzí v poměru O/V 10/90 pozorován 7 dní od přípravy pokles ve velikostech emulzních kapek u všech koncentrací CNC, avšak nejsignifikantněji se projevoval u 0,7% obsahu CNC. Po 13 dnech naopak došlo u všech koncentrací CNC k nárůstu ve velikostech emulzních kapek.

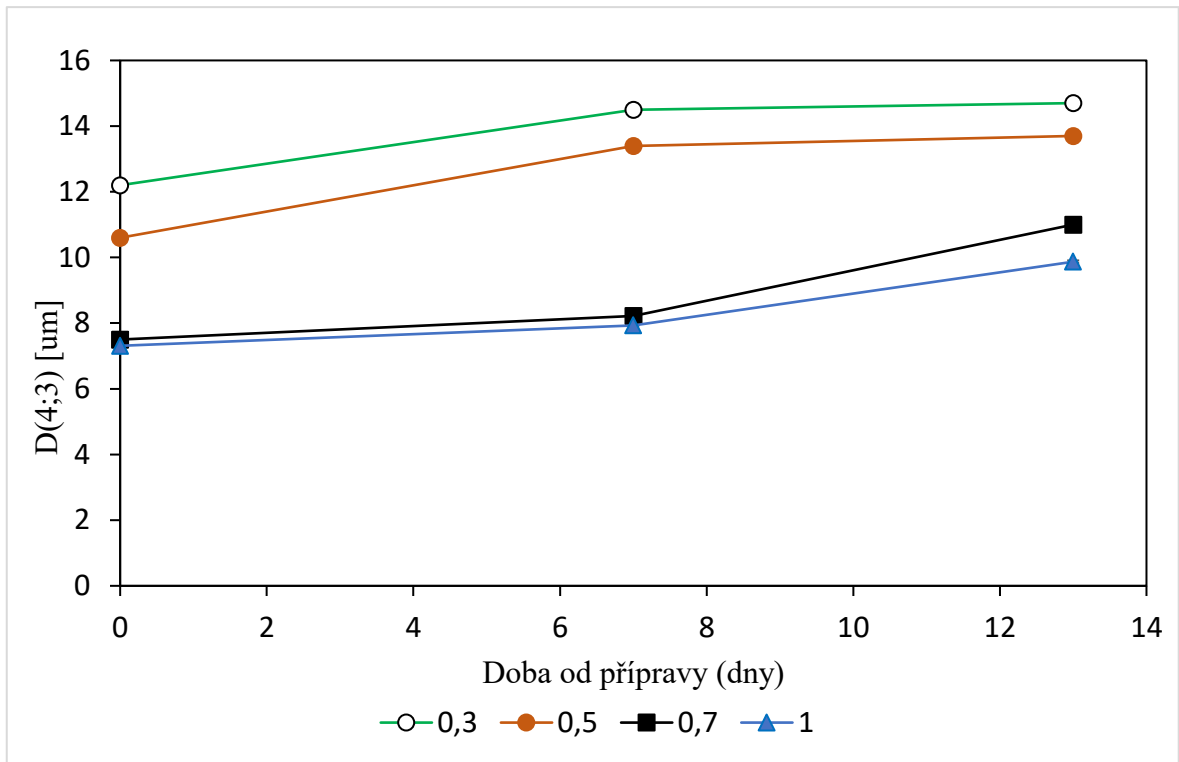
Celkově vykazovala největší stabilitu vůči změnám ve velikostech emulzních kapek emulze s 1% obsahem CNC. U emulzí připravených v poměru 20/80 docházelo po celou dobu sledování stability k nárůstu ve velikostech emulzních kapek.

Tabulka 22: Objemově vážený průměr částic pro PE poměr 10/90 a 20/80, s obsahem LIM, sledování v čase 7 a 13 dní od přípravy

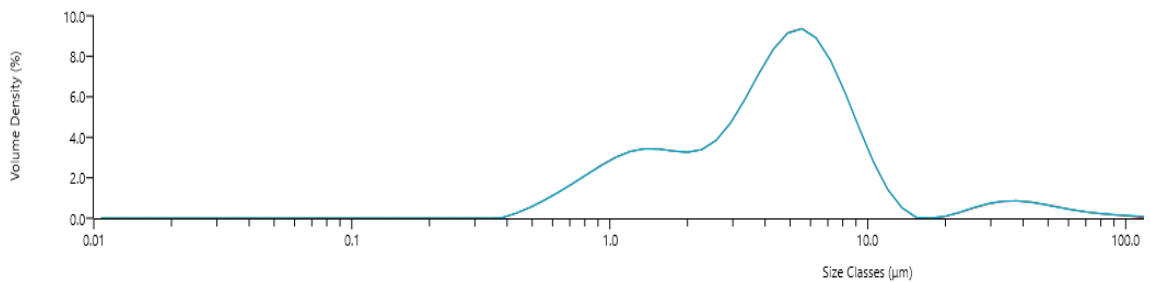
Dny	Poměr O/V	CNC (%)	D [4;3] (μm)	SD
7	10/90	0,3	5,3	0,00
		0,5	4,3	0,00
		0,7	4,7	0,54
		1	5,2	2,46
	20/80	0,3	14,5	0,00
		0,5	13,4	0,00
		0,7	8,2	0,06
13	10/90	0,3	7,1	0,07
		0,5	7,4	0,05
		0,7	7,1	0,04
		1	6,7	0,08
	20/80	0,3	14,7	0,00
		0,5	13,7	0,00
		0,7	11,0	0,00
		1	9,9	0,04



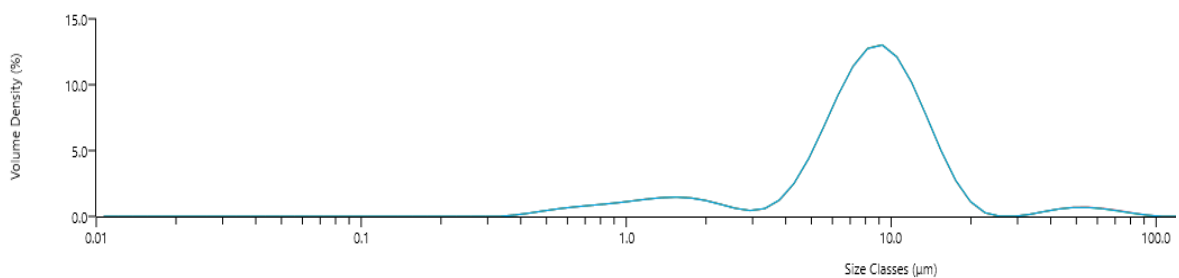
Obrázek 32: Velikost emulzních kapek 0, 7 a 13 dní po přípravě, pro různé koncentrace CNC, pro PE O/V 10/90, Olej LIM



Obrázek 33: Fázová studie, velikost emulzních kapek 0, 7 a 13 dní po přípravě, pro různé koncentrace CNC, pro PE O/V 20/80, Olej LIM



Obrázek 34: Distribuční křivka velikosti kapek PE, poměr O/V10/90, s obsahem LIM, stabilizovaná 1 % CNC, 13 dní po přípravě



Obrázek 35: Distribuční křivka velikosti kapek PE, poměr O/V 20/80, s obsahem LIM, stabilizovaná 1 % CNC, 13 dní po přípravě

Z distribučních křivek emulzí (Obrázek 34 a 35) stabilizovaných 1 % CNC je možno pozorovat patrné rozdíly mezi vzorkem s O/V 10/90, kde hlavní populace částic vykazuje menší velikosti, ve srovnání s emulzí v poměru O/V 20/80. U emulze v poměru 10/90 navíc docházelo k nárůstu bimodálního charakteru hlavní populace kapek a na křivce je rovněž viditelný frakce větších částic (nad 20 μm), přítomný i u emulze ihned po přípravě (Obrázek 23), který se po 13 dnech zvětšil. U emulze s poměrem O/V 20/80 došlo oproti původní distribuci uvedené na Obrázku 24 ke vzniku menší frakce větších částic s velikostí $\sim 60 \mu\text{m}$.

Emulze s obsahem CIN i LIM s poměrem O/V10/90 připravené s obsahem 1 % CNC vykazovaly po celou dobu skladování poměrně dobrou stabilitu a zároveň představovaly vhodný kompromis mezi sníženým množstvím EO dráždivého pro kůži, při zachování funkce enhanceru. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto pro následné testování transdermální absorpce použít právě tyto emulze.

9.5 Transdermální absorpce

Dle metodiky uvedené v bodě 8.7.3 byl proveden test transdermální absorpce vybraných PE stabilizovaných 1 % CNC a s olejovou fází LIM a CIN, ve dvou paralelních stanoveních. Pro tuto studii byla vybrána pouze analýza receptorové kapaliny, za účelem stanovení přítomnosti a koncentrace EO a modelového léčiva kofeinu, jež pronikly přes vzorek kůže.

9.5.1 Vyhodnocení integrity kožních vzorků

Celistvost kožních vzorků byla vyhodnocena pomocí stanovení ztráty vody přes epidermis (TEWL). U všech 4 kožních vzorků byly hodnoty TEWL nižší než $15 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, což představuje hraniční hodnotu pro vyhodnocení kůže jako neporušené. Všechny hodnoty dokonce spadaly do oblasti pod $9 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, kategorizované jako "velmi dobrý stav pokožky" (Tabulka 23). Z toho lze vyvodit, že kožní vzorky byly vhodné pro stanovení spolehlivých výsledků v testu transdermální absorpce.

Tabulka 23: Hodnoty TEWL pro kožní vzorky

Kožní vzorek	TEWL ($\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)
1	6,3
2	7,5
3	6,8
4	7,3

9.5.2 Vyhodnocení testu transdermální absorpce pomocí HPLC

Jednotlivé vzorky receptorové kapaliny získané z testu transdermální absorpce byly podrobeny HPLC analýze podle metodiky uvedené v bodě 8.8. Byla stanovena přítomnost a množství CIN z aplikovaných formulací, který prostoupil vzorkem kůže až do receptorové kapaliny. Zároveň byla v receptorové kapalině stanovena přítomnost a množství modelového léčiva, kofeinu.

9.5.2.1 PE s obsahem CIN

V Tabulce 24 jsou uvedeny hodnoty ploch píků pro dvě paralelní stanovení získané z HPLC analýzy receptorové kapaliny pro CIN, rovněž také určené koncentrace a procentuální množství analyzované látky. V Tabulce 25 jsou uvedeny hodnoty ploch píků odpovídající kofeinu (2 paralelní stanovení), stejně tak koncentrace a procentuální množství kofeinu v receptorové kapalině. Pro vlastní stanovení CIN na HPLC byly vzorky ředěny na polovinu původní koncentrace. Z HPLC analýzy byly rovněž určeny retenční časy pro CIN 8,65 min a pro kofein 3,57 min. Pro vyhodnocení koncentrací analyzovaných látek v receptorové kapalině byla použita metoda kalibrační přímky. Rovnice kalibračních přímek pro CIN a kofein jsou uvedeny v Tabulce 26.

Tabulka 24: Hodnoty ploch píků, koncentrace a procentuálního množství pro CIN z analýzy receptorové kapaliny

Měření	CIN 1			CIN 2		
	Plocha píku (mV.s)	Koncentrace (mg/ml)	Množství prošlé látky (%)	Plocha píku (mV.s)	Koncentrace (mg/ml)	Množství prošlé látky (%)
1	5488	0,052	9,95	6438	0,062	11,8
2	5465	0,052	9,90	6620	0,064	12,2
3	5419	0,051	9,81	6505	0,063	12,0
Průměr	5457	0,052	9,89	6521	0,063	12,0
SD	41	0,000	0,08	108	0,001	0,2

Tabulka 25: Hodnoty ploch píků, koncentrace a procentuálního množství pro kofein z analýzy receptorové kapaliny

Měření	Kofein 1			Kofein 2		
	Plocha píku (mV.s)	Koncentrace (mg/ml)	Množství prošlé látky (%)	Plocha píku (mV.s)	Koncentrace (mg/ml)	Množství prošlé látky (%)
1	1332	0,023	37,6	1147	0,020	32,2
2	1373	0,024	38,8	1151	0,020	32,3
3	1346	0,023	38,0	1190	0,021	33,5
Průměr	1350	0,023	38,1	1163	0,020	32,7
SD	16	0,000	0,7	25	0,000	0,7

Tabulka 26: Rovnice kalibračních přímek pro CIN a kofein

Analyzovaná látka	Rovnice kalibrační přímky	R ²
Cinnamaldehyd	$y = 192327x + 466,68$	0,9905
Kofein	$y = 56046x + 36,824$	0,9952

Aplikované množství PE O/V 10/90, stejně jako aplikované množství 1% roztoku kofeinu činilo 60 μ l. Z uvedených objemů/koncentrací bylo stanoveno výchozí množství analyzovaných látek v této dávce a s touto hodnotou bylo následně srovnáno množství analyzovaných látek penetrovaných až do receptorové kapaliny. Množství cinnamaldehydu, které prošlo úplnou a neporušenou kůží činilo 10 a 12 % z aplikované dávky (dvě stanovení z Tabulky 24). Zbytek aplikované látky byl pravděpodobně zachycen v jednotlivých vrstvách kůže nebo na jejím povrchu. Tyto části kožního vzorku však nebyly v rámci této studie analyzovány. Představené závěry jsou v dobré shodě s výsledky práce Vlachynská [44], kde z obdobného emulzního systému prošlo do receptorové kapaliny 7,4 % CIN; největší množství aplikované dávky zůstalo zachyceno v *dermis*.

Co se týká kofeinu, prošlé množství činilo 38 a 33 % z aplikované dávky (2 stanovení z Tabulky 25). V publikaci Pavlačková et al. [45] činilo množství kofeinu (roztok v PBS) prošlého kůží do receptorové kapaliny 29 ± 0 %. Zde však autoři použili jako receptorovou kapalinu pouze PBS o pH 7,4 bez surfaktantu. V našem případě receptorová kapalina, dle požadavků metody OECD, obsahovala Brij, z důvodu přítomnosti lipofilního CIN (LIM). Ve studii [46] autoři stanovili, že množství kofeinu prošlého za 24 h přes dva typy kožních vzorků činilo 5,54 a 11,82 % (receptorovou kapalinou byl rovněž PBS). Kofein zde byl aplikován z roztoku ethanolu a propylenglykolu. Ve srovnání s oběma studiemi proniklo do receptorové kapaliny vyšší množství kofeinu (v rámci naší studie) pravděpodobně díky

efektu esenciálního oleje jako enhanceru penetrace. Roli mohla hrát také přítomnost surfaktantu v receptorové kapalině.

9.5.2.2 PE s obsahem LIM

V receptorové kapalině analyzované pomocí HPLC nebyla přítomnost LIM detekována. To mohlo být zapříčiněno vysokou těkavostí, kterou limonen vykazuje, a tudíž mohlo během 24h trvání testu dojít k jeho odpaření. K odpaření mohlo docházet z nekryté receptorové části Franzových difuzních komůrek, nebo již z povrchu kožního vzorku. Tento jev by mohl být eliminován překrytím aplikovaných emulzí okluzní vrstvou zamezující vypařování. Dalším možným vysvětlením nepřítomnosti LIM v receptorové kapalině je jeho možné zachycení ve vrstvách nebo na povrchu kožního vzorku, které v rámci této studie práce nebyly zpracovávány. Kofein byl ve vzorku receptorové kapaliny pomocí HPLC detekován. Jeho retenční čas byl stanoven na 8,4 minut. Plochy píků ze dvou paralelních stanovení, stejně tak jako vypočtené koncentrace a procentuální množství, jsou zaznamenány v Tabulce 27. Koncentrace kofeinu v receptorové kapalině byla stanovena z rovnice kalibrační přímky uvedené v Tabulce 28. Při prvním stanovení bylo množství kofeinu v receptorové kapalině 25 % z aplikované dávky a při druhém stanovení 53 % (Tabulka 25). V průměru tedy procházelo ze systému PE s obsahem LIM větší množství kofeinu až do receptorové kapaliny ve srovnání se systémem s CIN. Dvě stanovení však poskytla značně rozdílné hodnoty.

Tabulka 27: Hodnoty ploch píků, koncentrace a procentuálního množství kofeinu z analýzy receptorové kapaliny

Měření	Kofein 1			Kofein 2		
	Plocha píku (mV.s)	Koncentrace (mg/ml)	Množství prošlé látky (%)	Plocha píku (mV.s)	Koncentrace (mg/ml)	Množství prošlé látky (%)
1	1077	0,016	25,5	2206	0,033	53,8
2	1027	0,015	24,2	2192	0,033	53,5
3	1074	0,016	25,4	2166	0,032	52,8
Průměr	1059	0,015	25,0	2188	0,033	53,4
SD	30	0,000	0,7	24	0,000	0,6

Tabulka 28: Rovnice kalibrační přímky kofeinu ze závislosti plochy píků standardů na jejich koncentraci

Analyzovaná látka	Rovnice kalibrační přímky	R ²
Kofein	$y = 64781x + 61,595$	0,9949

ZÁVĚR

Bakalářská práce je věnována přípravě Pickeringových emulzí s obsahem složek esenciálních olejů a jejich charakterizaci pomocí fyzikálně-chemických metod. Sleduje také jejich stabilitu v čase. Vybrané emulze byly taktéž testovány na transdermální absorpci *in vitro* s využitím modelu prasečí kůže na aparatuře Franzových difuzních komůrek. Pro analýzu obsahu stanovovaných látek byla zpracovávána pouze receptorová kapalina. Množství testovaných látek prošlých až do receptorové kapaliny bylo vyhodnoceno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Pickeringovy emulze typu O/V byly připraveny ve dvou poměrech 10/90 a 20/80. Olejovou fází tvořila vždy jedna ze dvou složek esenciálních olejů, cinnamaldehyd nebo limonen. Emulze byly taktéž připraveny s různým obsahem stabilizačních částic nanokrystalické celulózy, a to 0,3; 0,5; 0,7 a 1 %.

Připravené formulace byly ihned po přípravě hodnoceny jednak vizuálně tak i stanovením velikosti emulzních kapek pomocí laserové difrakce. Toto hodnocení proběhlo taktéž jako sledování stability po 7 a 13 dnech od přípravy.

Při charakterizaci emulzí ihned po přípravě bylo zaznamenáno, že velikost emulzních kapek je ovlivněna řadou proměnných, z nichž lze jmenovat vliv použitého oleje, poměru O/V a koncentrace CNC částic. Výsledky práce prokázaly, že PE s obsahem CIN dávaly obecně menší emulzní kapky ve srovnání s PE, jejichž olejovou složku tvořil LIM. Tento efekt lze přičíst vlivu rozdílné polaritě použitých olejů. Rovněž byl zaznamenán vliv koncentrace stabilizačních částic CNC, kde jejich vyšší koncentrace vedly k menší velikosti emulzních kapek. To je dáno dostatečným množstvím částic dostupných pro stabilizaci fázových rozhraní. Při sledování vlivu poměru O/V u emulzí s obsahem CIN byly menší velikosti emulzních kapek zaznamenány pro vzorky s poměrem 20/80 oproti poměru 10/90. U emulzí s obsahem LIM byla pozorována situace opačná, což lze opět přičíst vlivu rozdílné polaritě olejů.

PE s obsahem LIM vykazovaly lepší stabilitu v čase než emulze s obsahem CIN. Vliv na stabilitu měla rovněž koncentrace CNC, kde u emulzí s nižšími koncentracemi částic docházelo ke ztrátě homogenity již po 7 dnech od přípravy. Zatímco emulze s 1 % CNC si zachovávaly homogenitu.

Na základě dobré stability emulzí s obsahem CNC 1 % a poměrem O/V 10/90, který je vhodný vzhledem k minimalizaci množství dráždivého oleje při zachování funkce

akcelerantu kožní penetrace, byly tyto emulze použity v testu *in vitro* transdermální absorpce se současným přídatkem modelového léčiva kofeinu. Sledováno bylo množství olejů i kofeinu v receptorové kapalině.

Při analýze receptorové kapaliny po aplikaci emulze s obsahem CIN bylo jeho zjištěné množství 10 a 12 % (2 stanovení) z aplikované dávky. Návratnost kofeinu z aplikované dávky činila 38 a 33 % (2 stanovení). V receptorové kapalině po analýze emulzím s obsahem LIM nebyl stanoven žádný limonen. Nepřítomnost LIM v receptorové kapalině mohla být způsobena jeho zachycením v kožním vzorku nebo jeho vytěkáním, a to buď z povrchu kůže nebo z nekryté receptorové části shromažďující receptorovou kapalinu. Bylo však stanoveno množství kofeinu v receptorové kapalině, které činilo 25 a 53 % (2 stanovení) z aplikované dávky. V průměru tedy PE s obsahem LIM více usnadňovaly průchod kofeinu až do receptorové kapaliny než emulze s obsahem CIN.

Výsledky bakalářské práce ukazují, že Pickeringovy emulze mohou sloužit, mimo jiné, jako nosiče aktivních látek ovlivňujících vstup transdermální cestou, jak bylo ukázáno na emulzích s obsahem CIN (LIM) a modelovém léčivu, kofeinu. V následných studiích však bude potřeba podrobněji analyzovat nejen receptorovou kapalinu, ale i všechny kožní vrstvy pro získání kompletního obrazu účinnosti složek EO jako enhancerů vstupu kofeinu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] WASHINGTON C, WASHINGTON N. Drug delivery to the skin. In: *Physiological Pharmaceutics, Biological Barriers to drug absorption*. 1st Ed Ellis Horwood 1989:109-120
- [2] RIPPKE, F., V. SCHREINER a H-J. SCHWANITZ. The Acidic Milieu of the Horny Layer: New Findings on the Physiology and Pathophysiology of Skin pH. *American Journal of Clinical Dermatology* [online]. 2002, 3(4), 261-272 [cit. 2021-10-28]. ISSN 11750561. Dostupné z: doi:10.2165/00128071-200203040-00004
- [3] LAI-CHEONG, Joey E. a John A. MCGRATH. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine* [online]. 2021, 49(6), 337-342 [cit. 2021-10-28]. ISSN 13573039. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpmed.2021.03.00
- [4] YOUSEF H, ALHAJJ M, SHARMA S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. 2021 Nov 19. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 29262154.
- [5] CHEN, Yang, Peng QUAN, Xiaochang LIU, Manli WANG a Liang FANG. Novel chemical permeation enhancers for transdermal drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, 9(2), 51-64 [cit. 2021-11-21]. ISSN 18180876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajps.2014.01.001
- [6] WILLIAMS, Adrian C a Brian W BARRY. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2004, 56(5), 603-618 [cit. 2021-12-05]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2003.10.025
- [7] HERMAN, Anna a Andrzej P HERMAN. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2015, 67(4), 473-485 [cit. 2021-12-02]. ISSN 2042-7158. Dostupné z: doi:10.1111/jphp.12334
- [8] KOTINGOVÁ, L., BORSKÁ, L. a FIALA, Z. 2009. Transdermal Absorption Tests of Chemicals in vitro. *Chemické listy*. 103, 7 (srp. 2009).
- [9] BARTOSOVA, L. a J. BAJGAR. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2012, 19(27), 4671-4677 [cit. 2022-02-26]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986712803306358

- [10] RUELA, André Luís Morais, Aline Gravinez PERISSINATO, Mônica Esselin de Sousa LINO, Paula Silva MUDRIK a Gislaine Ribeiro PEREIRA. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2016, 52(3), 527-544 [cit. 2022-02-26]. ISSN 1984-8250. Dostupné z: doi:10.1590/s1984-82502016000300018
- [11] BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK a M. IDAOMAR. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, 46(2), 446-475 [cit. 2021-11-14]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- [12] GERHARD BUCHBAUER. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. 2010. ISBN 9781420063158. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&an=315235&scope=site>
- [13] BERGER, Ralf Günter, ed. *Flavours and Fragrances* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007 [cit. 2021-11-17]. ISBN 978-3-540-49338-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-49339-6
- [14] NAZZARO, Filomena, Florinda FRATIANNI, Laura DE MARTINO, Raffaele COPPOLA a Vincenzo DE FEO. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* [online]. 2013, 6(12), 1451-1474 [cit. 2021-11-17]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph6121451
- [15] ABERS, Mareshah, Sydney SCHROEDER, Linna GOELZ, Adrienne SULSER, Tiffany ST. ROSE, Keely PUCHALSKI a Jeffrey LANGLAND. Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. *BMC Complementary Medicine and Therapies* [online]. 2021, 21(1) [cit. 2021-11-20]. ISSN 2662-7671. Dostupné z: doi:10.1186/s12906-021-03285-3
- [16] TONGNUANCHAN, Phakawat a Soottawat BENJAKUL. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* [online]. 2014, 79(7), R1231-R1249 [cit. 2021-11-21]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.12492
- [17] HERMAN, Anna a Andrzej P HERMAN. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. *Journal of*

- Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2015, 67(4), 473-485 [cit. 2021-12-02]. ISSN 2042-7158. Dostupné z: doi:10.1111/jphp.12334
- [18] SURBURG, Horst a Johannes PANTEN, ed. *Common Fragrance and Flavor Materials* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2016 [cit. 2021-11-30]. ISBN 9783527693153. Dostupné z: doi:10.1002/9783527693153
- [19] FOX, Lizelle T., Minja GERBER, Jeanetta Du PLESSIS a Josias H. HAMMAN. Transdermal Drug Delivery Enhancement by Compounds of Natural Origin. *Molecules* [online]. 2011, 16(12), 10507-10540 [cit. 2021-12-04]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules161210507
- [20] KRISHNAIAH, Y.S.R., V SATYANARAYANA a P BHASKAR. Influence of limonene on the bioavailability of nicardipine hydrochloride from membrane-moderated transdermal therapeutic systems in human volunteers. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2002, 247(1-2), 91-102 [cit. 2021-12-04]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(02)00401-5
- [21] MOGHIMI, Hamid R., Behzad S. MAKHMALZADEH a Ali MANAFI. Enhancement effect of terpenes on silver sulphadiazine permeation through third-degree burn eschar. *Burns* [online]. 2009, 35(8), 1165-1170 [cit. 2021-12-04]. ISSN 03054179. Dostupné z: doi:10.1016/j.burns.2009.02.006
- [22] Li Y, Yao JH, Shu YT, Dong J, Gu W, Xu F, Chen J. [Comparative study of penetration-enhancing effect in vitro of cinnamon oil and cinnamaldehyde on ibuprofen]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2018 Sep;43(17):3493-3497. Chinese. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20180702.004. PMID: 30347917.
- [23] EGNER, Pavlína. *Kosmetické technologie*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Distanční text.
- [24] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN isbn80-7080-579-x.
- [25] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [26] GONZALEZ ORTIZ, Danae, Celine POCHAT-BOHATIER, Julien CAMBEDOUZOU, Mikhael BECHELANY a Philippe MIELE. *Current Trends in*

- Pickering Emulsions: Particle Morphology and Applications. *Engineering* [online]. 2020, 6(4), 468-482 [cit. 2022-01-31]. ISSN 20958099. Dostupné z: doi:10.1016/j.eng.2019.08.017
- [27] YANG, Yunqi, Zhiwei FANG, Xuan CHEN, Weiwang ZHANG, Yangmei XIE, Yinghui CHEN, Zhenguo LIU a Weien YUAN. An Overview of Pickering Emulsions: Solid-Particle Materials, Classification, Morphology, and Applications. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2017, 8 [cit. 2022-02-09]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2017.00287
- [28] CHEVALIER, Yves a Marie-Alexandrine BOLZINGER. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2013, 439, 23-34 [cit. 2022-02-09]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2013.02.054
- [29] FRELICHOWSKA, Justyna, Marie-Alexandrine BOLZINGER, Jocelyne PELLETIER, Jean-Pierre VALOUR a Yves CHEVALIER. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2009, 371(1-2), 56-63 [cit. 2022-02-09]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2008.12.017
- [30] MARTO, Joana, Andreia ASCENSO, Sandra SIMOES, António J. ALMEIDA a Helena M. RIBEIRO. Pickering emulsions: challenges and opportunities in topical delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2016, 13(8), 1093-1107 [cit. 2022-02-09]. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1080/17425247.2016.1182489
- [31] MIKULCOVÁ, Veronika, Romain BORDES a Věra KAŠPÁRKOVÁ. On the preparation and antibacterial activity of emulsions stabilized with nanocellulose particles. *Food Hydrocolloids* [online]. 2016, 61, 780-792 [cit. 2022-02-11]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2016.06.031
- [32] SOUZA, Alana Gabrieli de, Rafaela Reis FERREIRA, Elisa Silva Freire AGUILAR, Leonardo ZANATA a Derval dos Santos ROSA. Cinnamon Essential Oil Nanocellulose-Based Pickering Emulsions: Processing Parameters Effect on Their Formation, Stabilization, and Antimicrobial Activity. *Polysaccharides* [online]. 2021, 2(3), 608-625 [cit. 2022-02-16]. ISSN 2673-4176. Dostupné z: doi:10.3390/polysaccharides2030037

- [33] BORDES, Claire, Marie-Alexandrine BOLZINGER, Myriam EL ACHAK, Fabrice PIROT, Delphine ARQUIER, Géraldine AGUSTI a Yves CHEVALIER. Formulation of Pickering emulsions for the development of surfactant-free sunscreen creams. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2021, 43(4), 432-445 [cit. 2022-02-16]. ISSN 0142-5463. Dostupné z: doi:10.1111/ics.12709
- [34] WEI, Yun-shan, Zhi-cheng NIU, Feng-qi WANG, Kun FENG, Min-hua ZONG a Hong WU. A novel Pickering emulsion system as the carrier of tocopheryl acetate for its application in cosmetics. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2020, 109 [cit. 2022-02-16]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.110503
- [35] DAI, Hongjie, Jihong WU, Huan ZHANG, Yuan CHEN, Liang MA, Huihua HUANG, Yue HUANG a Yuhao ZHANG. Recent advances on cellulose nanocrystals for Pickering emulsions: Development and challenge. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2020, 102, 16-29 [cit. 2022-03-23]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2020.05.016
- [36] AW, Yuan Zhe, Hui Peng LIM, Liang Ee LOW, Charanjit Kaur SURJIT SINGH, Eng Seng CHAN a Beng Ti TEY. Cellulose nanocrystal (CNC)-stabilized Pickering emulsion for improved curcumin storage stability. *LWT* [online]. 2022, 159 [cit. 2022-04-03]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2022.113249
- [37] YU, Huaping, Guiting HUANG, Yueqin MA, Yang LIU, Xiaoying HUANG, Qin ZHENG, Pengfei YUE a Ming YANG. Cellulose nanocrystals based clove oil Pickering emulsion for enhanced antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, 170, 24-32 [cit. 2022-04-03]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.027
- [38] JIANG, Qiudong, Yeming WU, Hui ZHANG, Pei LIU, Junhong YAO, Peijun YAO, Jun CHEN a Jinao DUAN. Development of essential oils as skin permeation enhancers: penetration enhancement effect and mechanism of action. *Pharmaceutical Biology* [online]. 2017, 55(1), 1592-1600 [cit. 2022-04-04]. ISSN 1388-0209. Dostupné z: doi:10.1080/13880209.2017.1312464
- [39] ŠEVČÍKOVÁ, P., KAŠPÁRKOVÁ, V., KREJČÍ, J. a VLTAVSKÁ, P. 2014. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy*. 108, 5 (kvě. 2014), 479-482. *Chemical papers časopis pro průmysl chemický*. ISSN 0009-2770.

- [40] KVITEK, L., NOVOTNÝ, R. a PIKAL, P. 1998. Size Determination of Inorganic Particles by Dynamic Light Scattering. *Chemické listy* 92, 5 (čer. 1998). *Chemical papers : časopis pro průmysl chemický*. ISSN 0009-2770.
- [41] MALVERN PANALYTICAL, Příručka MS3000, HydroInsight Inter Spreads 09, Copyright: © 2021 Malvern Panalytical PN12678. Dostupná online: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/mastersizer-range/mastersizer-3000>
- [42] OECD (2004), *Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071087-en>.
- [43] BELAY, Abebe, Kassahun TURE, Mesfin REDI a Araya ASFAW. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chemistry* [online]. 2008, 108(1), 310-315 [cit. 2022-05-03]. ISSN 03088146. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.024](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.024)
- [44]] VLACHYNSKÁ, L. Stanovení transdermální absorpce kosmetických emulzí *in vitro*. Diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 2017. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/40743/vlachynsk%0c3%a1_2017_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [45] PAVLAČKOVÁ, Jana, Pavlína EGNER, Jana POLAŠKOVÁ, Jarmila HOJEROVÁ, Lucie PINĎÁKOVÁ, Pavel MOKREJŠ a Vendula VARAĎOVÁ. Transdermal absorption of active substances from cosmetic vehicles. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2019, 18(5), 1410-1415 [cit. 2022-05-18]. ISSN 1473-2130. Dostupné z: [doi:10.1111/jocd.12873](https://doi.org/10.1111/jocd.12873)
- [46] TRAUER, Sindy, Alexa PATZELT, Nina OTBERG, et al. Permeation of topically applied caffeine through human skin – a comparison of in vivo and in vitro data. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 2009, 68(2), 181-186 [cit. 2022-05-20]. ISSN 03065251. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03463.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03463.x)
- [47] KARUPPIAH RAMACHANDRAN, vignesh raja, Kui ZHANG, Nirvana MERATNIA a Paul HAVINGA. Towards Implantable Body Sensor Networks – Performance of MICS Band Radio Communication in Animal Tissue. *Proceedings of the 10th EAI International Conference on Body Area Networks* [online]. ICST,

- 2015, 2015, s. - [cit. 2022-03-09]. ISBN 978-1-63190-084-6. Dostupné z: doi:10.4108/eai.28-9-2015.2261413
- [48] PEREIRA, Rui, Sandra G. SILVA, Marina PINHEIRO, Salette REIS a M. Luísa do VALE. Current Status of Amino Acid-Based Permeation Enhancers in Transdermal Drug Delivery. *Membranes* [online]. 2021 [cit. 2022-03-08]. ISSN 2077-0375. Dostupné z: doi:10.3390/membranes11050343
- [49] BAO, Quanying, Jie SHEN, Rajan JOG, Carmen ZHANG, Bryan NEWMAN, Yan WANG, Stephanie CHOI a Diane J. BURGESS. In vitro release testing method development for ophthalmic ointments. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, s. 145-156 [cit. 2022-03-09]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.04.075
- [50] PINTO, Tiago C., Artur J. MARTINS, Lorenzo PASTRANA, Maria C. PEREIRA a Miguel A. CERQUEIRA. Oleogel-Based Systems for the Delivery of Bioactive Compounds in Foods. *Gels* [online]. 2021 [cit. 2022-03-09]. ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels7030086
- [51] KOLER, Amadeja, Mitja KOLAR, Karel JEŘÁBEK a Peter KRAJNC. Influence of Functional Group Concentration on Hypercrosslinking of Poly(vinylbenzyl chloride) PolyHIPEs: Upgrading Macroporosity with Nanoporosity. *Polymers* [online]. 2021 [cit. 2022-03-09]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13162721
- [52] BAINS, Upinder a Rajinder PAL. In-Situ Continuous Monitoring of the Viscosity of Surfactant-Stabilized and Nanoparticles-Stabilized Pickering Emulsions. *Applied Sciences* [online]. 2019, 9(19) [cit. 2022-03-08]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app9194044

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EO	Esenciální olej
SC	Stratum Corneum
PAL	Povrchově aktivní látky
PE	Pickeringovy emulze
DMSO	Dimethylsulfoxid
PEG	Polyethylenglycol
CNC	Nanokrystalická celulóza
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DEMI	Demineralizovaná voda
DLS	Dynamický rozptyl světla
PDI	Index polydisperzity
TEWL	Transepidermální ztráta vody
OF	Olejová fáze
VF	Vodná fáze
CI	Index krémování
SI	Index sedimentace
CIN	Cinnamaldehyd
LIM	Limonen

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Stavba kůže, upraveno podle: [47].....	12
Obrázek 2: Cesty prostupu přes kůži, upraveno podle: [48].....	15
Obrázek 3: Franzova difúzní komůrka, upraveno podle: [49].....	19
Obrázek 4: Cinnamaldehyd	25
Obrázek 5: Limonen	26
Obrázek 6: Emulze O/V a V/O, upraveno podle: [50]	28
Obrázek 7: Emulze dle koncentrace: zředěná, koncentrovaná, vysoce koncentrovaná, upraveno podle: [51].....	29
Obrázek 8: Pickeringovy emulze vs. klasické, upraveno podle: [52].....	31
Obrázek 9: Ultrazvuková homogenizace emulze s chlazením	44
Obrázek 10: Vzorčky nařezané kůže vnitřní strany prasečího ucha.....	47
Obrázek 11: Aparatura, Franzovy difuzní komůrky	48
Obrázek 12: Vzhled částic disperze CNC pořízený pomocí AFM. Zdroj: Laboratoř Biomateriálů UTB.....	51
Obrázek 13: Vlevo: vzhled emulzí s cinnamaldehydem stabilizovaných CNC po 4 dnech od přípravy, vpravo: detail pozorovaných uvolněných olejových kapek.	52
Obrázek 14: Distribuční křivka velikosti kapek PE s obsahem cinnamaldehydu stabilizovaná 0,7 % CNC, ihned po přípravě.....	53
Obrázek 15: Distribuční křivka velikosti kapek PE s obsahem cinnamaldehydu stabilizovaná 0,7 % CNC, 4 dny po přípravě.....	53
Obrázek 16: Vzhled PE, poměr O/V 10/90 s obsahem cinnamaldehydu, ihned po přípravě. Vzhled emulzí s poměrem 20/80 byl identický	55
Obrázek 17: Velikost emulzních kapek ihned po přípravě vzorků s různými koncentracemi CNC. Srovnání poměrů 10/90 a 20/80, olejová fáze CIN	56
Obrázek 18: Distribuční křivka velikosti emulzních kapek PE, poměr 10/90, s obsahem CIN, stabilizovaná 1 % CNC, ihned po přípravě.....	57
Obrázek 19: Distribuční křivka velikosti kapek PE, poměr 20/80, s obsahem CIN, stabilizovaná 1 % CNC, ihned po přípravě.....	57
Obrázek 20: Vzhled PE poměr O/V 10/90 s obsahem limonenu, ihned po přípravě	58
Obrázek 21: Vzhled PE poměr O/V 20/80 s obsahem limonenu, ihned po přípravě	58
Obrázek 22: Velikost emulzních kapek emulzí s LIM ihned po přípravě stanovená pro emulze s různou koncentrací CNC, srovnání poměrů O/V 10/90 a 20/80	60
Obrázek 23: Distribuční křivka velikosti částic PE, poměr 10/90, s obsahem LIM, stabilizovaná 1 % CNC, ihned po přípravě.....	60
Obrázek 24: Distribuční křivka velikosti částic PE, poměr 20/80, s obsahem LIM, stabilizovaná 1 % CNC, ihned po přípravě.....	60
Obrázek 25: Vzhled emulzních kapek PE 10/90, obsah CNC 1 %, vlevo: s obsahem CIN, vpravo: s obsahem LIM, snímky z optického mikroskopu při zvětšení 1000×.....	61

Obrázek 26: Vzhled PE, poměr O/V 10/90 s obsahem CIN, po 13 dnech od přípravy Pro emulze O/V 20/80 byl vzhled téměř identický	62
Obrázek 27: Velikost emulzních kapek 0, 7 a 13 dní po přípravě, pro různé koncentrace CNC, pro PE O/V 10/90, olej CIN	64
Obrázek 28: Velikost emulzních kapek 0, 7 a 13 dní po přípravě, pro různé koncentrace CNC, pro PE O/V 20/80 olej CIN	65
Obrázek 29: Distribuční křivka velikosti částic PE, poměr 10/90, s obsahem CIN, stabilizovaná 1 % CNC, 13 dní po přípravě	65
Obrázek 30: Distribuční křivka velikosti částic PE, poměr 20/80, s obsahem CIN, stabilizovaná 1 % CNC, 13 dní po přípravě	65
Obrázek 31: Vzhled PE poměr O/V 10/90 s obsahem LIM, po 13 dnech od přípravy, vzhled emulzí 20/80 byl velmi podobný	66
Obrázek 32: Velikost emulzních kapek 0, 7 a 13 dní po přípravě, pro různé koncentrace CNC, pro PE O/V 10/90, Olej LIM	68
Obrázek 33: Fázová studie, velikost emulzních kapek 0, 7 a 13 dní po přípravě, pro různé koncentrace CNC, pro PE O/V 20/80, Olej LIM.....	69
Obrázek 34: Distribuční křivka velikosti kapek PE, poměr O/V10/90, s obsahem LIM, stabilizovaná 1 % CNC, 13 dní po přípravě	69
Obrázek 35: Distribuční křivka velikosti kapek PE, poměr O/V 20/80, s obsahem LIM, stabilizovaná 1 % CNC, 13 dní po přípravě	69

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení emulzí s olejovou fází tvořenou limonenem, nebo cinnamaldehydem	44
Tabulka 2: Složení emulzí s obsahem olejové složky limonen, nebo cinnamaldehyd	45
Tabulka 3: Parametry metody HPLC pro analýzu cinnamaldehydu a kofeinu	49
Tabulka 4: Koncentrace kalibračních standardů pro cinnamaldehyd a kofein	49
Tabulka 5: Parametry metody HPLC pro analýzu limonenu a kofeinu	50
Tabulka 6: Koncentrace kalibračních standardů pro kofein	50
Tabulka 7: Hodnoty Z-average a PDI pro zásobní disperzi CNC	51
Tabulka 8: Objemově vážený průměr emulzních kapek pro PE s obsahem cinnamaldehydu, ihned po přípravě a po 4 dnech skladování	53
Tabulka 9: Popis vizuálního pozorování PE s obsahem cinnamaldehydu, O/V 10/90	55
Tabulka 10: Popis vizuálního pozorování PE s obsahem cinnamaldehydu, O/V 20/80	55
Tabulka 11: Objemově vážený průměr částic pro PE poměr O/V 10/90 a 20/80, s obsahem cinnamaldehydu, ihned po přípravě	56
Tabulka 12: Vizuální pozorování PE s obsahem limonenu O/V 10/90	58
Tabulka 13: Vizuální pozorování PE s obsahem limonenu O/V 20/80	59
Tabulka 14: Objemově vážený průměr kapek PE poměr O/V 10/90 a 20/80, s obsahem limonenu, ihned po přípravě	59
Tabulka 15: Vizuální pozorování PE s obsahem CIN, O/V 10/90 a 20/80, 7 dní po přípravě	62
Tabulka 16: Vizuální pozorování PE s obsahem CIN, O/V 10/90 a 20/80, 13 dní po přípravě	63
Tabulka 17: Stabilita emulzí vyjádřená pomocí indexu sedimentace SI (%)	63
Tabulka 18: Objemově vážený průměr emulzních kapek pro PE poměr 10/90 a 20/80, s obsahem CIN, sledování v čase 7 a 13 dní od přípravy	64
Tabulka 19: Popis vizuálního pozorování PE s obsahem LIM, O/V 10/90 a 20/80, 7 dní po přípravě	67
Tabulka 20: Vizuální pozorování PE s obsahem LIM, O/V 10/90 a 20/80, 13 dní po přípravě	67
Tabulka 21: Stabilita emulzí vyjádřená pomocí indexu krémování CI (%)	67
Tabulka 22: Objemově vážený průměr částic pro PE poměr 10/90 a 20/80, s obsahem LIM, sledování v čase 7 a 13 dní od přípravy	68
Tabulka 23: Hodnoty TEWL pro kožní vzorky	70
Tabulka 24: Hodnoty ploch píků, koncentrace a procentuálního množství pro CIN z analýzy receptorové kapaliny	71
Tabulka 25: Hodnoty ploch píků, koncentrace a procentuálního množství pro kofein z analýzy receptorové kapaliny	72
Tabulka 26: Rovnice kalibračních přímek pro CIN a kofein	72

Tabulka 27: Hodnoty ploch píků, koncentrace a procentuálního množství kofeinu z analýzy receptorové kapaliny.....	73
Tabulka 28: Rovnice kalibrační přímky kofeinu ze závislosti plochy píků standardů na jejich koncentraci.....	73