

# Lipidové nanočástice jako nosiče aktivních látek v kosmetice a farmacii

Bc. Barbora Andersová

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Andersová**  
Osobní číslo: **T22298**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Lipidové nanočástice jako nosiče aktivních látek v kosmetice a farmacii**

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část

Zpracujte literární rešerši na zadané téma.

Charakterizujte lipidové nanočástice a stručně popište jejich typy (tuhé lipidové nanočástice, nanostrukturované lipidové nosiče), složení, vlastnosti a metody přípravy.

Věnujte se rovněž bioaktivním látkám s antioxidačním účinkem, které jsou vhodné pro začlenění do těchto nanočástic.

### II. Praktická část

V praktické části práce navrhnete vhodné složení lipidové matrice a stabilizátoru pro přípravu lipidových částic a provedte formulační studii.

Vyberte vhodnou formulaci a připravte lipidové nanočástice s enkapsulovaným antioxidantem.

Vhodnými technikami stanovte fyzikálně-chemické charakteristiky připravených vzorků.

Sledujte vztah mezi složením a vlastnostmi studovaných formulací.

Získané výsledky zpracujte a formulujte závěry práce.

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] Duan, Y. T. et al.: A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. RSC ADVANCES (2020), 10 (45), 26777-26791.
- [2] Subroto, E., Andoyo, R., Indiarso, R.: Solid Lipid Nanoparticles: Review of the Current Research on Encapsulation and Delivery Systems for Active and Antioxidant Compounds. ANTIOXIDANTS (2023), 12, 633.
- [3] Cai L, et al.: Improving the biological activities of astaxanthin using targeted delivery systems. CRITICAL REVIEW IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION (2023), 13, 1-22.
- [4] Sakellari, G. I. Et al.: Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers of dual functionality at emulsion interfaces. Part I: Pickering stabilisation functionality, COLLOIDS AND SURFACES-A, 654, Article Number130135.

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

Datum zadání diplomové práce: **9. února 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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 diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky: Barbora Andersová

.....  
podpis studentky

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce pojednává o lipidových nanočásticích a jejich možnému využití jako nosičů aktivních látek v kosmetice a farmacii. Vzhledem k bariérové funkci kůže je dodávání aktivních látek transdermální cestou problematické. Lipidové nanočástice, díky svým rozměrům, dokáží kožní bariéru překonat a doručit aktivní látku na cílené místo. Praktická část diplomové práce se blíže zabývá přípravou nanostrukturovaných lipidových nosičů (NLC) s enkapsulovanou aktivní látkou. Nejprve byla provedena preformulační studie a následně byly homogenizační metodou „za horka“ připraveny NLC s enkapsulovanou aktivní látkou, kanabidiolem. U takto připravených systémů byla provedena fyzikálně-chemická charakterizace a stabilitní studie. Na závěr byly připravené NLC obsahující kanabidiol použity pro přípravu Pickeringových emulzí, v jejichž olejové fázi byl přítomen oleoresin obsahující antioxidant astaxanthin.

Klíčová slova: lipidové nanočástice, nanostrukturované lipidové nosiče, astaxanthin, kanabidiol, Pickeringovy emulze

## **ABSTRACT**

The thesis focuses on lipid nanoparticles and their application as carriers of active substances in cosmetics and pharmacy. Due to the barrier function of the skin, transdermal delivery of active ingredients is problematic. Because of their small size, lipid nanoparticles can penetrate the skin barrier and deliver the active ingredients to the targeted site. The experimental part of the thesis deals in more detail with nanostructured lipid carriers (NLCs) with encapsulated active substances. First, a preformulation study was conducted, and then NLCs with the encapsulated active ingredient – cannabidiol were prepared by the “hot homogenization” method. Physicochemical characterization and stability studies were carried out on the systems prepared in this way. Finally, the cannabidiol-containing NLCs were used to prepare Pickering emulsions containing oil phase, in which astaxanthin oleoresin was present.

Keywords: lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, astaxanthin, cannabidiol, Pickering emulsions

Ráda bych upřímně poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc., za příkladné odborné vedení, cenné rady a připomínky, ale i za ochotu, trpělivost, vstřícnost a čas, který mé diplomové práci věnovala. Dále mé poděkování patří panu Ing. Adamu Srnčovi, panu prof. Ing. Tomáši Sedláčkovi, Ph.D., paní Ing. Markétě Kadlečkové, Ph.D. a pracovníkům Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky za pomoc během praktické části diplomové práce. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	9
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>1 NOSIČE NA BÁZI LIPIDŮ .....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Lipozomy .....	11
1.1.2 Tuhé lipidové nanočástice .....	12
1.1.3 Nanostrukturované lipidové nosiče.....	13
1.1.4 Hybridní lipido-polymerní nanočástice.....	15
1.2 VLASTNOSTI NOSIČŮ NA BÁZI LIPIDŮ .....	15
1.3 SLOŽENÍ LIPIDOVÝCH NANOČÁSTIC SLN, NLC.....	17
1.3.1 Složení tuhých lipidových nanočástic .....	17
1.3.2 Složení nanostrukturovaných lipidových nosičů .....	18
<b>2 METODY PŘÍPRAVY LIPIDOVÝCH NANOČÁSTIC .....</b>	<b>19</b>
2.1 VYSOKOTLAKÁ HOMOGENIZACE .....	19
2.2 METODA MIKROEMULZE .....	20
2.3 SONIKACE .....	21
2.4 EMULGAČNÍ METODA ODPAŘOVÁNÍ ROZPOUŠTĚDLA.....	21
2.5 METODA VSTRÍKOVÁNÍ ROZPOUŠTĚDLA.....	22
2.6 METODA DVOJITÉ EMULZE TYPU VODA V OLEJI VE VODĚ (V/O/V).....	22
2.7 EXTRAKCE EMULZE SUPERKRITICKOU KAPALINOU.....	23
2.8 ELEKTROSPREJOVÁ METODA .....	23
2.9 METODA HYDRATACE TENKÉHO FILMU S NÁSLEDNOU SONIKACÍ .....	23
2.10 METODA FÁZOVÉ INVERZE .....	24
<b>3 BIOAKTIVNÍ LÁTKY S ANTIOXIDAČNÍM ÚČINKEM .....</b>	<b>25</b>
3.1 KAROTENOIDY .....	25
3.1.1 Astaxantin .....	27
3.2 KANABINOIDY.....	30
3.2.1 Kanabidiol.....	31
<b>4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>32</b>
<b>5 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>35</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>36</b>
<b>6 POUŽITÉ MATERIÁLY .....</b>	<b>37</b>
6.1 PŘÍSTROJE A PRACOVNÍ POMŮCKY.....	37
6.2 CHEMICKÉ LÁTKY .....	37
<b>7 METODIKA .....</b>	<b>39</b>
7.1 PŘÍPRAVA NLC A PREFORMULAČNÍ STUDIE .....	39

7.1.2	Metody přípravy NLC .....	39
7.1.3	Charakterizace NLC bez aktivních látek.....	41
7.2	PŘÍPRAVA NLC S AKTIVNÍMI LÁTKAMI .....	41
7.2.1	Dialýza .....	43
7.3	CHARAKTERIZACE NLC S AKTIVNÍMI LÁTKAMI.....	43
7.3.1	Velikost částic a její distribuce .....	43
7.3.2	ζ-potenciál .....	43
7.3.3	Stanovení teplotních vlastností .....	44
7.3.4	Stanovení enkapsulační účinnosti .....	46
7.3.5	Mikroskopie atomárních sil.....	47
7.3.6	Stanovení stability NLC disperzí .....	47
7.4	PŘÍPRAVA PICKERINGOVÝCH EMULZÍ.....	47
7.5	CHARAKTERIZACE PICKERINGOVÝCH EMULZÍ .....	48
7.5.1	Stanovení velikosti částic .....	48
7.5.2	Optická mikroskopie .....	49
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>50</b>
8.1	PREFORMULAČNÍ STUDIE – NLC BEZ AKTIVNÍ LÁTKY.....	50
8.1.1	Volba metody přípravy .....	50
8.1.2	Volba formulace.....	51
8.2	NLC S AKTIVNÍMI LÁTKAMI.....	60
8.2.1	Volba aktivní látky .....	60
8.2.2	Dialýza .....	64
8.2.3	Stanovení tepelných vlastností.....	65
8.2.4	Stanovení enkapsulační účinnosti .....	69
8.2.5	Mikroskopie atomárních sil.....	71
8.2.6	Stanovení stability .....	71
8.3	PICKERINGOVY EMULZE A JEJICH CHARAKTERIZACE.....	76
8.3.1	Velikost emulzních kapek PE .....	77
8.3.2	Optická mikroskopie .....	82
8.3.3	Vizuální pozorování .....	83
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>85</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>87</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>99</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>101</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>104</b>



## ÚVOD

Vzhledem k bariérové funkci kůže je průnik aktivních látek podaných topickou cestou velmi obtížný. Nanostrukturované lipidové nosiče (NLC, Nanostructured Lipid Carriers) mají velký potenciál fungovat jako systém pro jejich podávání, protože těmto aktivním látkám poskytují ochranu, vysokou dispergovatelnost, chemickou stabilitu a biologickou dostupnost. Méně kompaktní krystalická struktura NLC vytvořená lipidy s vysokým a nízkým bodem tání efektivní zachycení aktivních látek umožňuje a poskytuje jim ochranu před degradací [1].

Jednou z možných aktivních látek vhodných pro začlenění do NLC je např. astaxanthin (AST). AST je druh karotenoidu, který vykazuje silnější antioxidační aktivitu než vitamin E nebo  $\beta$ -karoten. Vykazuje rovněž mnoho cenných fyziologických funkcí, např. posílení imunitních reakcí, prevenci oxidačního stresu, kardiovaskulárních onemocnění nebo některých forem rakoviny. V současné době je však jeho využití omezené, vzhledem k jeho nízké biologické dostupnosti, špatné rozpustnosti ve vodě, vysokému bodu tání a nestabilitě za nepříznivých podmínek (např. kyselé prostředí, teplo, světlo, ionty přechodných kovů, singletový kyslík nebo volné radikály). Enkapsulací AST do vhodného nosiče lze tyto jeho nedostatky eliminovat [2].

Jako další vhodnou látku pro enkapsulaci do NLC lze uvést kanabidiol (CBD), který má terapeutický potenciál pro léčbu řady patologických stavů, včetně těch, u nichž převládá bolest. Začlenění CBD do vhodného nosiče může rovněž umožnit snadnější průchod CBD na cílené místo a jeho efektivnější využití [3].

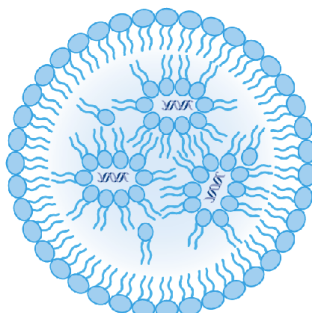
Značná pozornost ve výzkumu se v poslední době věnuje vývoji přípravků, které mohou obsahovat kombinaci více účinných látek se synergickým efektem a dodávat je v kontrolovaném množství na cílené místo. Pickeringovy emulze stabilizované lipidovými nanočásticemi jsou v tomto směru slibnými systémy, a to nejen díky vynikající stabilizační schopnosti prostřednictvím Pickeringova mechanismu, ale také pro svůj potenciál umožnit segregovanou koenkapsulaci aktivních látek v rámci „oddělených částí“ jejich mikrostruktury (kapiček emulze a samotných Pickeringových částic). Tyto systémy mohou potencionálně najít široké uplatnění v kosmetickém i farmaceutickém průmyslu jako nosiče více aktivních látek v rámci jednoho přípravku [4].

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 NOSIČE NA BÁZI LIPIDŮ

Nedávné pokroky v nanotechnologiích umožnily jak vývoj nových typů léčiv, tak i systémů pro jejich cílené dodání na potřebné místo v lidském těle. Vzhledem k bariérové funkci kůže, je průnik aktivní látky kůží velmi obtížný, a tudíž je jen málo aktivních látek účinných po jejich lokální aplikaci na kůži. Z tohoto důvodu byly tyto systémy široce zkoumány jako nosiče, aby zlepšily průnik aktivní látky kůží. Velká pozornost pak byla věnována zejména systémům založeným na biokompatibilních a biologicky odbouratelných složkách jako jsou lipidy. Byly vyvinuty různé typy nanonosičů, jako jsou např. liposomy, mikroemulze, pevné lipidové nanočástice a nanostrukturované lipidové nosiče [5].

Jako doručovací systém nabízejí nosiče na bázi lipidů mnoho výhod, včetně jednoduchosti formulace, biokompatibility, vysoké biologické dostupnosti, schopnosti nést velké užitečné zatížení a řady fyzikálně-chemických vlastností, které lze řídit za účelem modulace jejich biologických vlastností. Z těchto důvodů jsou nejběžněji využívanou třídou v nanomedicině [6].



Obrázek 1 Struktura lipidové nanočástice [6]

### 1.1 Typy lipidových nosičů

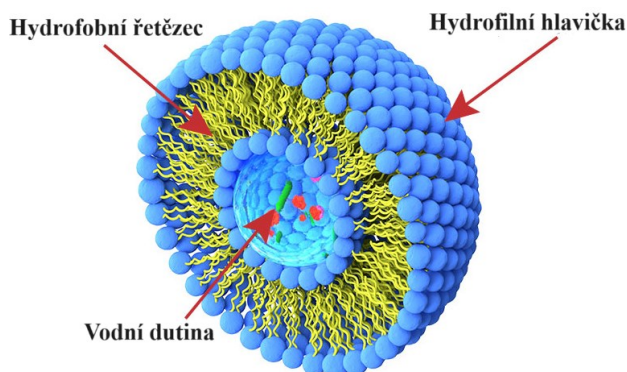
Lipidové nosiče pro podávání aktivních látek se obvykle klasifikují do čtyř skupin. Patří sem liposomy, pevné lipidové nanočástice (SLN), nanostrukturované lipidové nosiče (NLC) a hybridní lipido-polymerní nanočástice [7].

#### 1.1.1 Liposomy

Liposomy byly objeveny v roce 1965 a staly se jedním z nejrozšířenějších systémů pro podávání léčiv. Mají kulovitou strukturu a obvykle se skládají z amfipatické fosfolipidové dvojvrstvy a vnitřního vodného jádra (viz Obr. 2). Nanostruktura jádro-plášť umožňuje liposomům enkapsulaci hydrofobních i hydrofilních molekul. Obvykle jsou hydrofobní léčiva zapouzdřena v lipofilní dvojvrstvě obalu a hydrofilní léčiva jsou zachycena ve vodné

fázi jádra. Lipozomy lze připravit různými metodami, z nichž nejvýznamnější jsou zejména metody elektroformování, mikrofluidní metody, metoda hydratace tenkého filmu, injekční metoda nebo reverze fází atd [7], [8], [9].

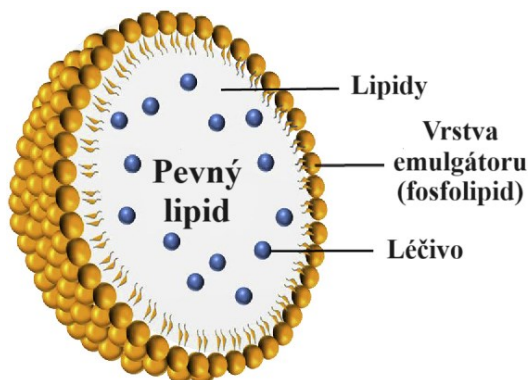
Vzhledem ke svým výhodným vlastnostem, jako jsou biokompatibilita, stabilita, vysoká enkapsulační účinnost, dobrá biologická dostupnost a relativně jednoduchá příprava jsou lipozomy široce používanými nosiči v nanomedicině [8].



Obrázek 2 Struktura lipozomu [10]

### 1.1.2 Tuhé lipidové nanočástice

Tuhé lipidové nanočástice (SLN, Solid Lipid Nanoparticles) byly vyvinuty na počátku 90. let 20. století jako alternativní nosič k emulzím, lipozomům a polymerním nanočásticím. SLN se vyrábějí nahrazením kapalného lipidů (oleje) v emulzi typu olej ve vodě (O/V) tuhými lipidem nebo směsí lipidů, které jsou tuhé při pokojové i při tělesné teplotě (viz Obr. 3). SLN mají průměrnou velikost 40 až 1000 nm a sférickou morfologii, kterou lze studovat pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a skenovací elektronové mikroskopie (SEM) [11], [12], [13].

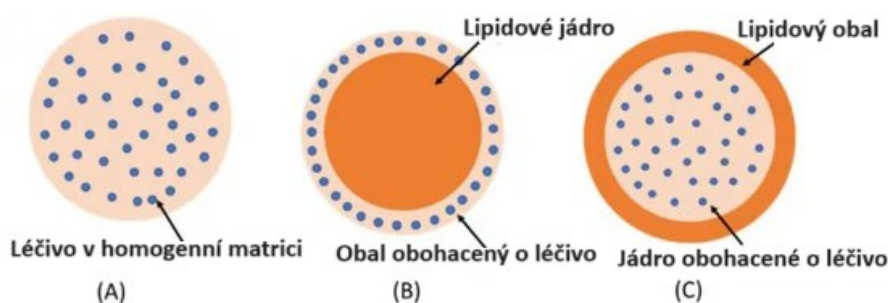


Obrázek 3 Struktura SLN upraveno podle [11]

V závislosti na způsobu výroby SLN lze popsat tři modely inkorporace aktivních látek (viz Obr. 4). Jedná se o [13]:

- model homogenní matrice (A),
- model jádro-obal (obal obohacený o léčivo) (B),
- model jádro-obal (jádro obohacené o léčivo) (C).

**Model homogenní matrice** se připravuje technikou homogenizace za studena bez použití povrchově aktivní látky rozpouštějící léčivo, které je dispergováno v celé lipidové matrici. Mezi lipidy a léčivem existuje silná interakce. Příprava **modelu jádro-obal (obal obohacený o léčivo)** probíhá technikou homogenizace za tepla, kdy tuhé lipidy mají vysokou teplotu tání a vysokou teplotu krystalizace, takže krystalizují rychleji než aktivní molekula, která je pak koncentrována v obalu částice. V případě **modelu jádro-obal (jádro obohacené o léčivo)** vede chlazení disperze k přesycení léčiva rozpuštěného v lipidu a dochází k jeho přednostnímu srážení v jádře částice. Další ochlazování nakonec vede k rekrystalizaci lipidů. Výsledkem je tvorba jádra obohaceného o léčivo [13].

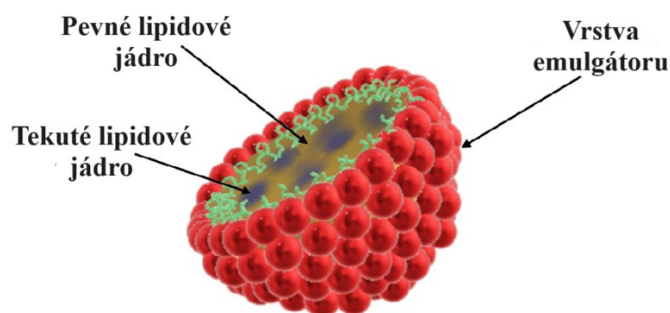


Obrázek 4: Struktura modelů SLN. Model pevného roztoku (A), model jádro-obal (obal obohacený o léčivo) (B), model jádro-obal (jádro obohacené o léčivo) (C) upraveno podle [14]

### 1.1.3 Nanostrukturované lipidové nosiče

Nanostrukturované lipidové nosiče (NLC, Nanostructured Lipid Carriers) byly vyvinuty jako nová zlepšená verze lipidových nanočástic za účelem překonání potenciálních potíží se SLN. NLC se skládají ze směsi pevných a kapalných lipidů, čímž vzniká částečně krystalizovaný lipidový systém (viz Obr. 5). Lipidová fáze se připravuje smícháním pevných lipidů s kapalnými lipidy (oleji), nejlépe v poměru 70:30 – 99,9:0,1. V důsledku přítomnosti oleje v těchto směsích dochází ke snížení teploty tání ve srovnání s čistým pevným lipidem, ale získané směsi jsou stále tuhé i při tělesné teplotě.

Začlenění oleje do pevné matrice lipidových nanočástic taktéž zabraňuje procesu krystalizace a vytváří nedokonalosti v krystalické mřížce, které umožňují v porovnání se SLN pojmout větší množství účinné látky. Kromě již zmíněné vyšší enkapsulační účinnosti mají NLC oproti SLN další řadu výhod jako je např. lepší kontrola uvolňování léčiva nebo lepší stabilita [5], [11], [15], [16].

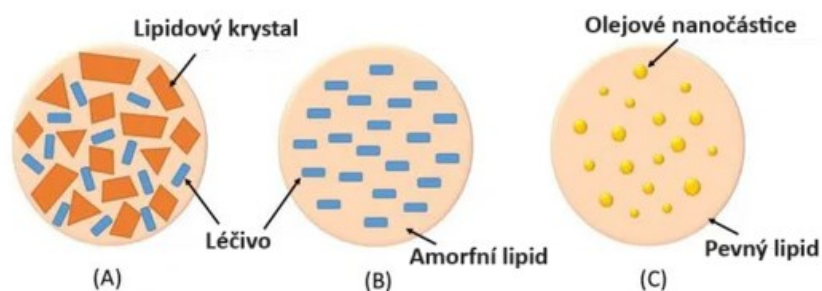


Obrázek 5 Struktura NLC upraveno podle [17]

Strukturu NLC je dále možné popsat třemi typy nanočástic (viz Obr. 6) [7]:

- nedokonalý typ (A),
- amorfní typ (B),
- vícenásobný typ (C).

V **nedokonalém typu** NLC jsou tuhé a kapalné lipidy smíchány v různých lipidových strukturách. Specifické podmínky v postupu krystalizace vedou k extrémní neuspořádanosti tohoto modelu. Nedokonalá struktura lipidové matrice spočívá v přítomnosti mezery mezi řetězci mastných kyselin triacylglycerolu v krystalu, která zvyšuje schopnost léčiv vstupovat do matrice. **Amorfní typ** NLC nemá krystalickou strukturu a brání tak vyloučení enkapsulovaného léčiva krystalizací. Třetím typem je **vícenásobný typ**, ve kterém je rozpustnost léčiva v kapalném lipidu větší než v pevném lipidu, čímž je léčivo chráněno před působením pevného lipidu [13], [18].



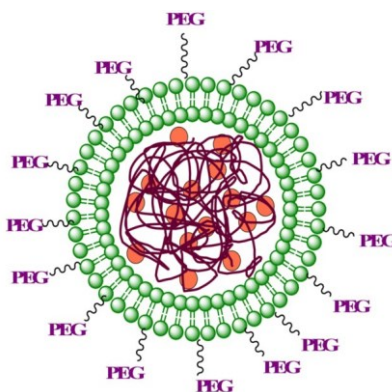
Obrázek 6 Typy NLC – Nedokonalý typ (A), Amorfní typ (B), Vícenásobný typ (C) upraveno podle [14]

Nanostrukturované lipidové nosiče našly široké uplatnění ve farmaceutickém i kosmetickém průmyslu, zejména díky snadné přípravě, proveditelnosti škálování, biokompatibilitě, absenci toxicity, zvýšené účinnosti cílení a možnosti aplikace na konkrétní místo různými způsoby podání [15].

#### 1.1.4 Hybridní lipido-polymerní nanočástice

Hybridní lipido-polymerní nanočástice (hLNP) lze definovat jako integrovaný systém složený z nejméně dvou typů materiálů, který umožňuje dosáhnout více funkcí nebo řešit omezení jednosložkových nanomateriálů. Jedná se o velmi slibný systém pro dodávání léčiv. Skládá se z polymerního jádra obsahujícího léčivo, které je obaleno vnitřní lipidovou vrstvou a vnější lipidovou vrstvou obsahující poly(ethylenglykol) (viz Obr. 7).

Díky vlastnostem lipidů i polymerů vykazují hLNP velkou stabilitu, trvalé uvolňování enkapsulované látky a vysokou biokompatibilitu. Při přípravě hLNP je nezbytná reprodukovatelnost a přesná kontrola vlastností nanočástic. Z tohoto důvodu se k přípravě hybridních nanočástic hojně využívá mikrofluidika [7].



Obrázek 7 Struktura hLNP [19]

## 1.2 Vlastnosti nosičů na bázi lipidů

Jak již bylo zmíněno výše, nosiče na bázi lipidů jsou velmi užitečné jako systémy pro doručování aktivních látek, zejména díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě [4]. Ideální nanočásticový systém pro podávání aktivních látek musí vykazovat následující vlastnosti [20]:

- maximální biologická dostupnost léčiva,
- cílení na tkáň,
- řízená kinetika uvolňování,

- minimální imunitní odpověď organismu,
- schopnost dodávat obtížně dostupné aktivní látky, jako jsou lipofylní amfifylní molekuly i biomolekuly,
- dostatečná kapacita pro enkapsulaci aktivní látky.

I když nosiče na bázi lipozomů představují jedinečné výhody (ochrana léčiva před enzymovou degradací, nízká toxicita, flexibilita, biokompatibilita a biodegradabilita,) je mnoho jejich aplikací omezeno řadou nevýhod, jako je krátká skladovatelnost, nízká stabilita nebo nízká účinnost enkapsulace. Z těchto důvodů dominují mezi nosiči na bázi lipidů NLC a SLN, které lze ve srovnání s lipozomy modifikovat tak, aby uvedené nevýhody lipozomů nevykazovaly [20], [21].

Mezi výhody SLN oproti lipozomům patří zejména nepřítomnost organických rozpouštědel při jejich výrobě, vynikající reprodukovatelnost výroby ve velkém měřítku, zvýšená stabilita účinné látky (díky tuhému lipidovému jádru matrice), vyšší efektivita enkapsulace pro hydrofobní léčiva (SLN neobsahují vodné jádro s lipidovou dvojvrstvou jako lipozomy) nebo schopnost umožnit řízené uvolňování a cílení léčiva z SLN pomocí potahování či připojování ligandů k jejich povrchu [20].

Mezi dva hlavní problémy spojené se SLN patří špatné dlouhodobé uchování léčiva a nízká enkapsulační účinnost. Během skladování dochází v lipidové matici k polymorfnímu přechodu, což vede k tvorbě více uspořádané krystalické mřížky a k postupnému vylučování enkapsulovaných léčiv. Proto byly následně vyvinuty NLC, u nichž je pevný lipid částečně nahrazen tekutými lipidy, které poskytují lepší stabilitu při skladování a díky zhoršené krystalizaci v přítomnosti kapalného lipidu i vyšší enkapsulační účinnost [7].

Všechny lipidové částice mají okluzivní vlastnosti, díky nimž podporují hydratační účinek přípravku, ve kterém jsou obsaženy, na kůži. Další jejich výhodnou vlastností je schopnost zvýšit chemickou stabilitu sloučenin citlivých na světlo, oxidaci a hydrolýzu. Zvýšení chemické stability po inkorporaci do lipidových nanonosičů bylo prokázáno u mnoha kosmetických aktivních látek, např. koenzymu Q10, askorbylpalmitátu, tokoferolu (vitaminu E) a retinolu (vitaminu A) [11].



### 1.3 Složení lipidových nanočástic SLN, NLC

Lipidy hrají při přípravě nanočástic důležitou roli, protože zajišťují požadované fyzikální a chemické vlastnosti a stabilitu. Výběr lipidů je založen na mnoha faktorech, např. použité lipidy by měly být biokompatibilní a biologicky odbouratelné a měly by být schopny vytvářet částice s nanometrovou velikostí. Důležitý je výběr tuhých i kapalných lipidů použitých při formulaci NLC, kdy by nemělo docházet k rozpouštění pevných lipidů do tekutých lipidů a k fázové separaci při teplotě nižší, než je teplota tání lipidů. Vybrané lipidy by neměly uvolňovat toxická rezidua, a proto by měly mít nízkou toxicitu. Za účelem snížení krystalinity lipidové matrice lze použít i kombinaci různých pevných lipidů, čímž dojde ke zvýšení enkapsulace léčiva.

Další důležitou složkou lipidových nanočástic (LNP, Lipid Nanoparticles) jsou povrchově aktivní látky (PAL). Jsou vybírány na základě hodnoty HLB, způsobu podání LNP a modifikace jejich povrchu. Jedním z kritérií pro výběr PAL je také jejich schopnost omezit chemickou degradaci lipidů. Aby se zabránilo agregaci částic, je možno používat i kombinaci více PAL. Cirkulaci léčiv enkapsulovaného do LNP lze zlepšit modifikací jejich povrchu poly(etylglykolem). Povrchová modifikace zabraňuje vychytávání částic retikuloendoteliálním systémem [22].

#### 1.3.1 Složení tuhých lipidových nanočástic

Tuhé lipidové nanočástice jsou velmi podobné emulzím, kde se jako náhrada olejové fáze používají pevné lipidy (0,1-30 hm. %), které se roztaví a smíchají se zahřátou vodnou fází. Lipidy používané při tvorbě SLN jsou tuhé jak při fyziologické, tak při pokojové teplotě. Na směs lipidové a vodné fáze se působí mícháním při vysoké rychlosti, což vede k tvorbě jemných kapiček dispergované fáze v disperzním prostředí. Přidáním PAL (0,5 – 5 hm. %) se sníží mezifázové napětí mezi oběma kapalinami, čímž se sníží i povrchová energie, a vytvoří se stabilní SLN. Při přípravě LNP jsou PAL přidávány pro potřebu stabilizace jako emulgátory. Jako příklady široce používaných PAL lze uvést Poloxamer 407 a Tween 80, které zvyšují účinnost SLN při podávání léčiv [11], [20].

### 1.3.2 Složení nanostrukturovaných lipidových nosičů

Jak již bylo uvedeno, NLC jsou druhou generací SLN. Oproti SLN mají rozdílné složení lipidové fáze, která je z části tvořena tuhým a z části kapalným lipidem (olejem). Podobně jako u nanoemulzí typu O/V jsou hlavními složkami NLC lipidy, PAL a voda. Systém se stabilizuje pomocí 0,5 - 5% roztoků PAL [15].

Mezi nejčastěji využívané tuhé lipidy patří např. kyselina stearová a její deriváty, monoacylglyceroly, přírodní tuky, ztužené (hydrogenované) tuky a vosky živočišného i rostlinného původu. Příklady lipidů a PAL vhodných k přípravě NLC jsou uvedeny v Tabulce [15], [20].

Tabulka 1 Příklady složek vhodných pro přípravu NLC [15], [20]

<b>Pevný lipid</b>	<b>Kapalný lipid</b>	<b>PAL</b>
Glyceryl behenát	Kyselina olejová	Poloxamer 188
1-monostearin	Jojobový vosk	Tween 80
Karnaubský vosk	Sójový olej	Tween 20
Cetyl-palmitát	Triacylglyceroly se středně dlouhým řetězcem	Dodecylsulfát sodný
Kyselina stearová	Kukuřičný olej	Deoxycholát sodný
Kyselina palmitová	Skvalen	Lecitin

## 2 METODY PŘÍPRAVY LIPIDOVÝCH NANOČÁSTIC

V literatuře je popsána řada technik výroby SLN a NLC. Mezi tyto metody patří vysokotlaká homogenizace, metoda mikroemulze, sonikace, emulgační metoda odpařování rozpouštědla, metoda vstřikování rozpouštědla, metoda dvojité emulze typu voda v oleji ve vodě (V/O/V), extrakce emulze superkritickou kapalinou, elektrosprejová metoda, metoda hydratace tenkého lipidového filmu nebo metoda fázové inverze [11], [13], [20].

### 2.1 Vysokotlaká homogenizace

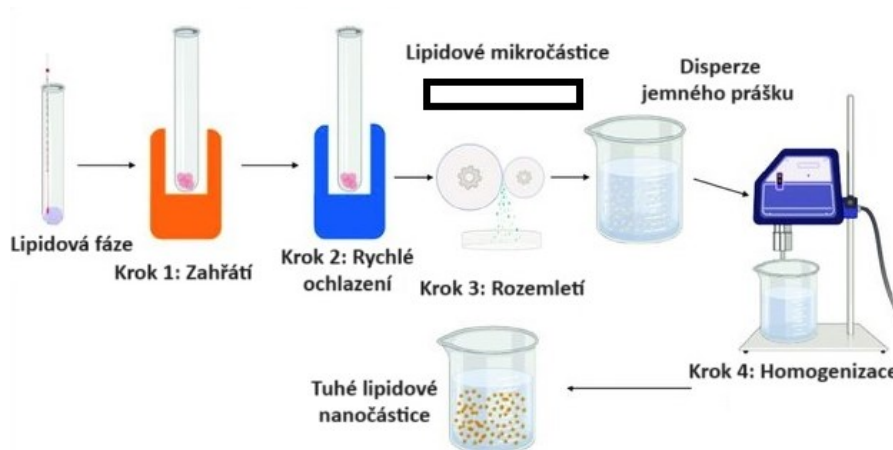
Vysokotlaká homogenizace (HPH, High Pressure Homogenization) je metoda přípravy LNP, při níž se za použití vysokého tlaku (100 až 2000 barů) protlačuje disperze mezerou o velikosti několika mikrometrů, aby se vytvořily částice submikronové velikosti. Vysoké smykové napětí a kavitační síly rozbíjejí částice, což vede ke zmenšení jejich velikosti. Lze ji provádět buď při vysoké teplotě (vysokotlaká homogenizace za horka – Obr. 8), nebo při teplotě nižší než pokojová (vysokotlaká homogenizace za studena – Obr. 9).



Obrázek 8 Příprava SLN metodou vysokotlaké homogenizace za horka upraveno podle [23]

V prvním kroku obou procesů jsou lipid(y) a aktivní látka(y) zahřáty na teplotu přibližně o 5-10 °C vyšší, než je teplota tání lipidů, aby se aktivní látka rozpustila nebo dispergovala v roztaveném lipidu. Koncentrace lipidů se pohybuje v rozmezí 5-20 hm. %. Ve druhém kroku metody HPH se vodná fáze obsahující *amfifilní* molekuly přidá k lipidové fázi (při stejné teplotě, jako je teplota tání lipidů) a pomocí vysokorychlostního míchacího zařízení se získá horká pre-emulze. Následně je lipid vytlačován za vysokého tlaku úzkým prostorem (několik mm) 3 až 5×, což závisí na složení a požadovaném produktu. Tato metoda má však určité nevýhody, jelikož ji nelze použít pro léčiva citlivá na teplo z důvodu jejich degradace a zvýšení tlaku při homogenizaci často vede ke zvětšení velikosti částic. Tato omezení však

lze překonat použitím HPH za studena. Při tomto postupu první krok zahrnuje vytvoření suspenze tajícího lipidu a léčiv, po níž následuje rychlé ochlazení v suchém ledu a kapalném dusíku. Ve třetím kroku se prášek převede na mikročástice mletím. Následně se mikročástice dispergují ve studeném vodném roztoku PAL. V posledním kroku se pro vytvoření SLN obvykle provádí HPH po dobu 5 cyklů při tlaku 500 barů [20].



Obrázek 9 Příprava SLN metodou vysokotlaké homogenizace za studena upraveno podle [23]

Tato technika má ve srovnání s ostatními metodami mnoho výhod, např. nepřítomnost organických rozpouštědel a krátkou dobu výroby. Tuto metodu lze považovat za průmyslově nejproveditelnější [11].

## 2.2 Metoda mikroemulze

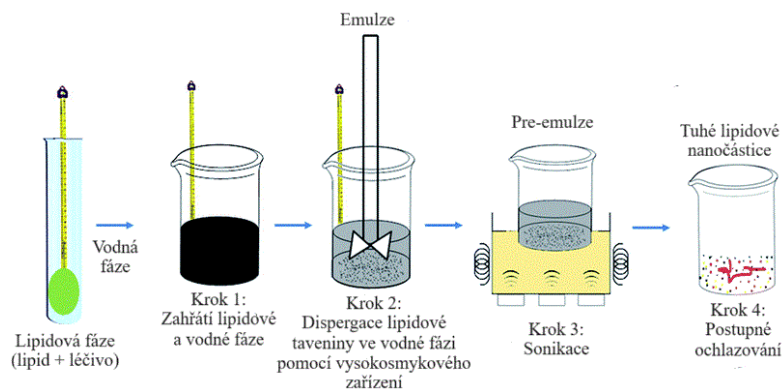
Při přípravě LNP touto metodou se nejprve připraví mikroemulze smícháním taveniny lipidů se směsí léčiva, PAL a ko-surfaktantu, která je přehřátá na teplotu rovnající se bodu tání lipidů a následně je získaná mikroemulze rozptýlena ve vodě o teplotě mezi 2-10 °C [20].



Obrázek 10 Příprava LNP metodou mikroemulze upraveno podle [23]

## 2.3 Sonikace

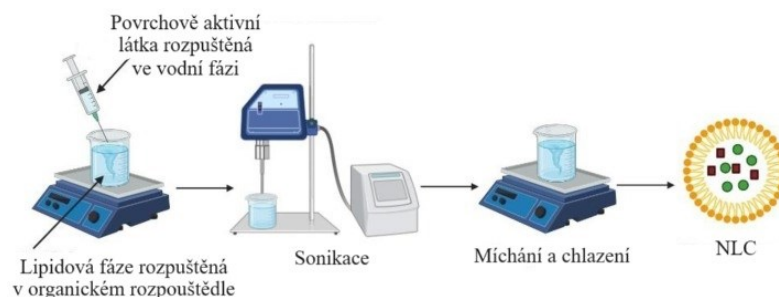
Tato metoda je založena na principu zmenšování velikosti částic pomocí zvukových vln. Při této metodě se současně používá homogenizace za vysokého tlaku a ultrazvuk, aby se připravily SLN o velikosti v rozmezí 80-800 nm (viz Obr. 9) [20].



Obrázek 11 Příprava SLN metodou sonikace upraveno podle [20]

## 2.4 Emulgační metoda odpařování rozpouštědla

V případě této metody přípravy LNP jsou nejprve rozpuštěny lipidy v organickém rozpouštědle, které není mísitelné s vodou (např. v cyklohexanu, dichlormethanu, toluenu nebo chloroformu). Následně dojde k emulgaci ve vodné fázi obsahující povrchově aktivní látku. K odstranění rozpouštědla z emulze se používá odpařování za sníženého tlaku. Vytvořená preemulze se podrobí sonikaci. Poté se disperze ochladí na pokojovou teplotu, aby se získaly vodné disperze LNP (viz Obr. 10). Tato metoda je spojena s rychlým a jednoduchým výrobním procesem. Na druhou stranu zahrnuje použití organických rozpouštědel a vzniklá suspenze je zředěná a vyžaduje další odpařování nebo ultrafiltraci. Velikost částic vzniklých LNP se může lišit v závislosti na pevném lipidu a povrchově aktivní látce [13], [24].



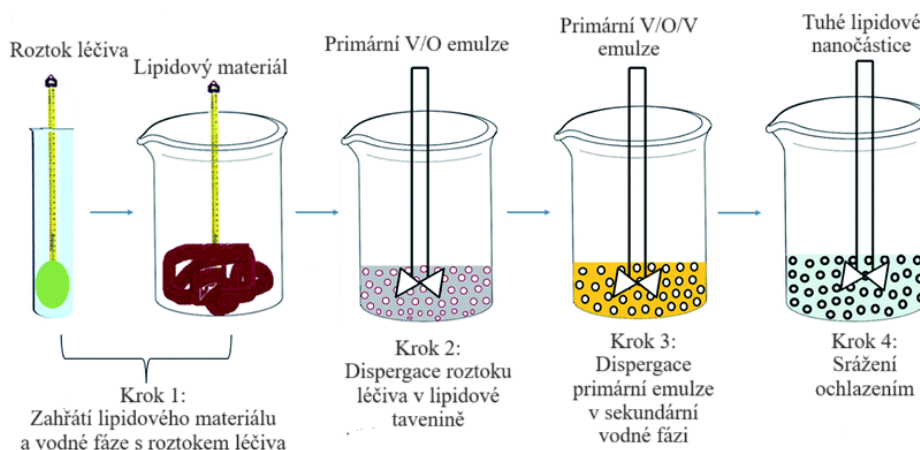
Obrázek 12 Schématické znázornění přípravy NLC emulgační metodou odpařování rozpouštědla upraveno podle [24]

## 2.5 Metoda vstřikování rozpouštědla

Při přípravě LNP touto metodou jsou nejprve lipidy rozpuštěny v organickém rozpouštědle a následně jsou rozpuštěné lipidy vstříknuty injekční jehlou do vodného roztoku s povrchově aktivní látkou nebo bez ní, který je neustále míchán. Parametry procesu přípravy nanočástic při této metodě zahrnují povahu vstřikovaného rozpouštědla, koncentraci lipidů, vstřikované množství roztoku lipidů, viskozitu a difúzi rozpuštěných lipidů do vodné fáze [20].

## 2.6 Metoda dvojité emulze typu voda v oleji ve vodě (V/O/V)

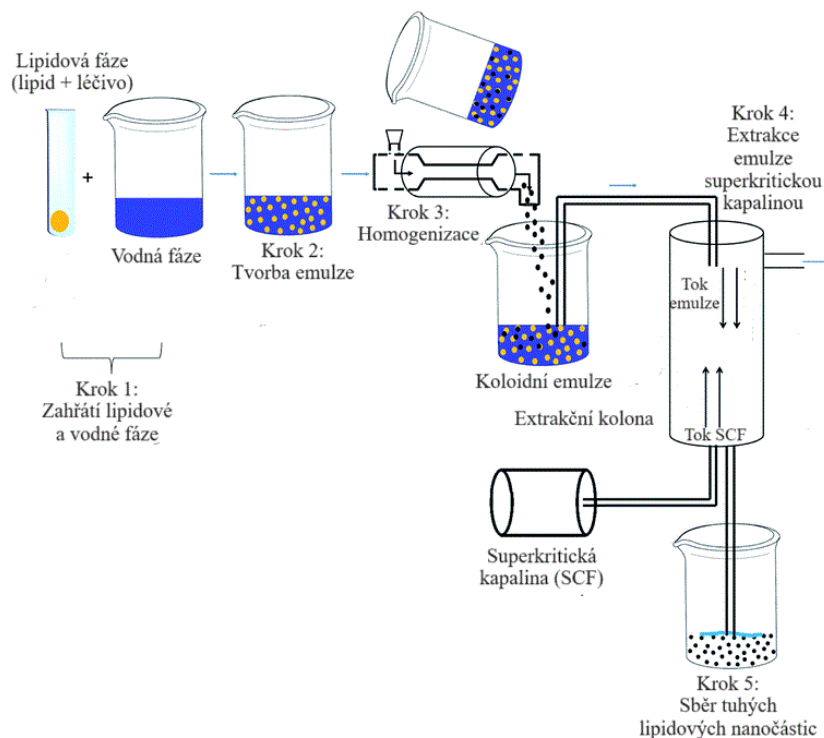
Tato metoda je používána především pro přípravu SLN s obsahem hydrofilních léčiv a s biologickými molekulami, jako jsou např. peptidy. Tuhé lipidové nanočástice jsou vyráběny z vícenásobných emulzí typu V/O/V technikou difúze rozpouštědla ve vodné emulzi, kdy je aktivní látka rozpuštěna ve vnitřní fázi vícenásobné emulze V/O/V a lipidy jsou rozpuštěny v organické fázi mísitelné s vodou. Následně jsou SLN vyráběny ředěním emulze V/O/V ve vodě. To vede k difúzi organického rozpouštědla do vodné fáze a k vysrážení SLN (viz Obr. 11). Proces přípravy touto metodou ovlivňuje povaha rozpouštědla a interakce hydrofilního léčiva s rozpouštědlem a pomocnými látkami [20].



Obrázek 13 Příprava SLN metodou dvojité emulze typu V/O/V upraveno podle [20]

## 2.7 Extrakce emulze superkritickou kapalinou

Jedná se poměrně o novou metodu, která se používá k přípravě SLN. Tato metoda využívá k extrakci rozpouštědla z emulze typu O/V nadkritickou kapalinu, jako je např. oxid uhličitý (viz Obr. 12). Nevýhodou oxidu uhličitého je jeho neschopnost rozpustit řadu léčiv. Z tohoto důvodu se jako alternativa k této metodě používá metoda srážení superkritickým antisolventem [13].



Obrázek 14 Příprava SLN metodou extrakce emulze superkritickou kapalinou upraveno podle [20]

## 2.8 Elektrosprejová metoda

Jedná se o relativně novou techniku přípravy SLN, při níž je využita elektrodynamická atomizace k výrobě úzce rozptýlených sférických SLN, jejichž velikost je menší než 1  $\mu\text{m}$ . Při této metodě jsou SLN získávány přímo ve formě prášku [20].

## 2.9 Metoda hydratace tenkého filmu s následnou sonikací

V případě této metody jsou tuhé lipidy, kapalné lipidy a léčiva rozpuštěny ve vhodném organickém rozpouštědle, které je později odstraněno vakuovým odpařením. Pro vytvoření vrstvy smíšených lipidových filmů lze přidat vodný roztok PAL. Pomocí sondy pro ultrazvukovou dispergaci jsou následně vytvořeny malé a rovnoměrné NLC. Tato metoda se

nejčastěji používá pro svou jednoduchost a praktičnost a pro přípravu malých, stejnorodých částic. Nevýhodou této metody je možná přítomnost zbytků rozpouštědel v produktu, které mohou způsobit toxikologické problémy [25].

## **2.10 Metoda fázové inverze**

Za stálého míchání se vytvoří směs lipidů, léčiva, vody a PAL. Tato směs je následně vystavena třem cyklům zahřívání a ochlazování (85-60-85 °C). V dalším kroku je systém zředěn studenou vodou (0 °C), což vede k vytvoření NLC fázovou inverzí. Mezi výhody této metody patří absence organických rozpouštědel a vhodnost jejího použití pro termosenzitivní léčiva. Nevýhodou je, že proces přípravy NLC touto metodou je zdlouhavý [25].



### 3 BIOAKTIVNÍ LÁTKY S ANTIOXIDAČNÍM ÚČINKEM

Při metabolismu kyslíku v buňkách vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species). Za fyziologických podmínek ROS opakovaně vznikají a jsou odstraňovány prostřednictvím systémů odstraňujících ROS, aby byla zachována redoxní homeostáza. Nárůst oxidačního stresu může být iniciován řadou vnitřních a vnějších faktorů. K nejvýznamnějším vnějším faktorům patří ultrafialové (UV, Ultraviolet) záření, které je jednou z hlavních příčin vnějšího stárnutí, protože podněcuje vznik ROS přímo v kůži. Změna redoxní rovnováhy vede ke změněné produkci ROS, čímž dochází k oxidačnímu stresu, jehož působením dochází k poškození buněk, narušení buněčné signalizace, k oxidačnímu poškození proteinů, nukleových kyselin a lipoperoxidaci. ROS mohou způsobovat onemocnění jako jsou kardiovaskulární choroby, rakovina nebo diabetes [26], [27], [28], [29].

Jednou z možností, jak potlačit škodlivý vliv oxidačního stresu na kůži je začlenění látek s antioxidačními účinky (antioxidanty) do kosmetických přípravků. Antioxidanty jsou molekuly nebo sloučeniny, které se vážou na volné radikály, neutralizují a deaktivují jejich aktivitu, čímž chrání před oxidačním stresem a poškozením buněk. Antioxidanty mohou být syntetického nebo přírodního původu a v kosmetických přípravcích se používají oba typy. Mezi syntetické antioxidanty patří např. butylhydroxyanizol nebo butylhydroxytoluen. Syntetické antioxidanty jsou široce používány, jelikož je jejich výroba levná. Výzkumy však naznačují, že jejich nadměrné užívání může představovat zdravotní rizika. Z tohoto důvodu roste preference antioxidantů přírodního původu, které se získávají z rostlinných extraktů a patří sem např. karotenoidy, polyfenoly, flavonoidy, flavanoly, flavanoly a stilbeny [27], [29], [30], [31].

#### 3.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou vysoce nenasycené, červené, oranžové nebo žluté přírodní pigmenty rozpustné v tucích. Jsou zodpovědné za zbarvení řady fotosyntetických organismů. Ačkoliv hrají důležitou roli při fotosyntéze, jsou přítomny i v nefotosyntetických rostlinných tkáních, houbách a bakteriích. U červených, hnědých a zelených řas jsou důležitými sloučeninami, jejichž účelem je ochrana před fotooxidačními procesy. Karotenoidy jsou zodpovědné za zbarvení různých fotosyntetizujících organismů a taktéž jsou účinnými antioxidanty. Synergické interakce karotenoidů s jinými antioxidanty mohou zvýšit antioxidační účinnost směsí ve srovnání s jednotlivými sloučeninami. Řada bioaktivních sloučenin, včetně

karotenoidů, má nízkou stabilitu, špatnou vstřebatelnost a omezenou biologickou dostupnost. Z tohoto důvodu se využívá technika nanoenkapsulace, díky níž si tyto sloučeniny zachovají původní vlastnosti během zpracování a skladování [26], [32], [33], [34], [35].

Karotenoidy mají strukturu tetraterpenu a většina se skládá z osmi isoprenových jednotek tvořené páteří o čtyřiceti atomech uhlíku. Jejich obecná struktura je běžně tvořena dlouhým polyenovým řetězcem s 8 až 13 konjugovanými dvojnými vazbami a koncovými skupinami po obou stranách polyenového řetězce. Právě dlouhý polyenový řetězec se strukturou konjugovaných dvojných vazeb tvoří chromofor molekuly karotenoidu, který je zodpovědný za jejich barevné i pigmentační vlastnosti. Karotenoidy absorbují světlo ve viditelném rozsahu 400-500 nm elektromagnetického spektra [26], [33].

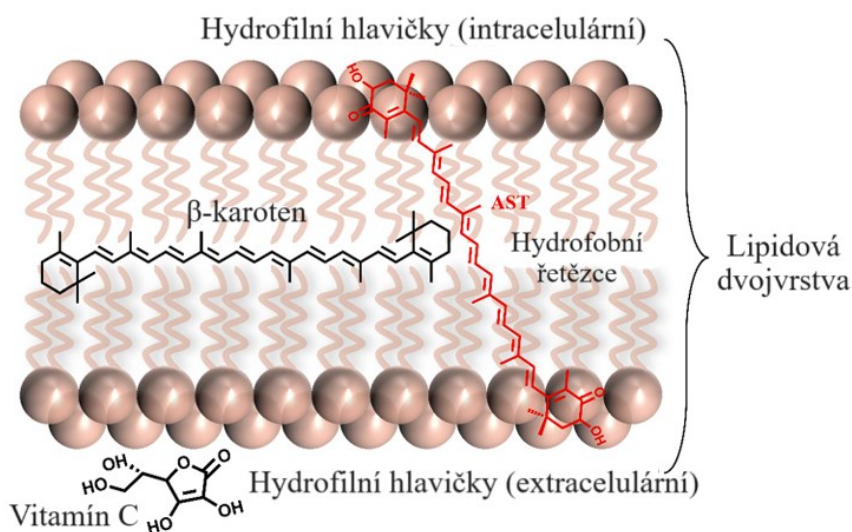
Karotenoidy mají významné terapeutické využití, např. pro zlepšení imunitního systému a prevenci neurodegenerativních onemocnění. Velká pozornost jim je však věnována zejména díky schopnosti zhaset singletový kyslík a vychytávat volné radikály. Vzhledem k tomu, že jejich tripletové energetické hladiny leží blízko energetickým hladinám singletového kyslíku jsou karotenoidy řazeny mezi nejúčinnější fyzikální zhasěče singletového kyslíku. Neutralizace singletového kyslíku je obecně založena na přeměně přebytečné energie na teplo prostřednictvím nejnižšího excitovaného trojného stavu karotenoidů. Mechanismy vychytávání radikálů karotenoidy jsou: 1) přenos elektronů, jehož výsledkem je kationt nebo aniont karotenoidového radikálu, 2) adice radikálu a 3) odstranění allylového vodíku za vzniku neutrálního karotenoidového radikálu [26].

Antioxidační aktivita i jejich biologické vlastnosti jsou významně ovlivněny délkou polyenového řetězce, přítomností funkčních skupin a jejich umístění (např.  $\alpha$  a  $\beta$ ), glykosylací hydroxylové skupiny, esterifikací s mastnými kyselinami, acyklickou a cyklickou strukturou a (E)- nebo (Z)-konfigurací. Vyšší antioxidační potenciál mají karotenoidy s keto funkčními skupinami (např. kanthaxanthin) než hydroxy deriváty (např. zeaxanthin) [26], [36].

Karotenoidy lze klasifikovat do dvou skupin na karoteny a xantofyly. Mezi karoteny patří  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten (prekurzor vitamínu A),  $\gamma$ -karoten a lykopen a jedná se o uhlovodíky. V přírodě se vyskytuje asi 50 druhů karotenů. Na druhé straně xantofyly jsou karotenoidy obsahující v molekulách atomy kyslíku jako hydroxylové, karbonylové, aldehydové, karboxylové, epoxidové a furanoxidové skupiny. Některé xantofyly jsou přítomny ve formě esterů mastných kyselin, glykosidů, sulfátů a proteinových komplexů a jejich struktura je



a tedy i AST. Mechanismus antioxidačního účinku spočívá v tom, že molekuly AST neutralizují singletový kyslík, vychytávají volné radikály a/nebo ukončují řetězovou reakci volných radikálů a inhibují peroxidaci lipidů v živých organismech. Dva atomy kyslíku na koncovém cyklohexenovém kruhu AST tvoří stabilní chelátové komplexy s kationty kovů, jako jsou např.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , které jsou lepšími donory a akceptory elektronů než AST. Kationty kovů vedou ke změnám v absorpčním spektru a ke zlepšení účinnosti AST. Ve své studii Cai a kol. [37] uvádějí, že při komplexaci s  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  vykazuje AST lepší antioxidační schopnost, zabraňuje unfoldingu v glykovaném lidském sérovém albuminu (gHSA) a zvyšuje stabilitu proteinů gHSA i lidského sérového albuminu (HSA). Mimo to uvádějí, že za tyto antioxidační vlastnosti je zodpovědná unikátní molekulární struktura AST. Ve srovnání s jinými karotenoidy poskytuje AST lepší antioxidační aktivitu, protože je schopen vychytávat volné radikály jak z vnitřní, tak z vnější strany buněčné membrány, tj. hydrofilní fosfátové skupiny na vnější straně a hydrofobní polyenových uhlíkových řetězců na vnitřní straně lipidové dvojvrstvy buněčné membrány – viz Obr. 14:



Obrázek 16 Pozice AST v buněčné membráně upraveno podle [37]

AST, který účinněji chrání membránové fosfolipidy a další lipidy před peroxidací, je dosud nejsilnějším nalezeným přírodním antioxidantem. Jeho antioxidační aktivita je přibližně desetkrát vyšší než zeaxantinu, luteinu, tunaxantinu, kantaxantinu,  $\beta$ -karotenu a asi stokrát vyšší než  $\alpha$ -tokoferolu. Výzkum taktéž ukázal, že účinek antioxidační aktivity se liší v závislosti na optické R/S a geometrické E/Z izomerii a zda se jedná o esterifikované nebo volné formy AST, přičemž pořadí antioxidační aktivity AST je následující: 9Z AST > 13Z

AST > E AST a S AST > R AST, zatímco antioxidační aktivita esterifikovaných a volných forem přírodních AST je stále předmětem diskusí [37], [41].

AST má mimo jiné i protizánětlivé účinky, tudíž je schopen zastavit vznik zánětu v biologických systémech. AST zpomaluje genovou expresi následných zánětlivých mediátorů, jako jsou interleukiny, tumor nekrotizující faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a mezibuněčná adhezní molekula 1. AST inhibuje signální dráhu závislou na jaderném faktoru- $\kappa$ B vedoucí k regulaci transkripce zánětlivých genů. Taktéž omezuje produkci zánětlivých mediátorů tím, že inhibuje aktivaci nebo potlačuje degradaci enzymu cyklooxygenázy-2 a oxidu dusnatého v mikrogliových buňkách BV2 stimulovaných lipopolysacharidem. Kromě toho může AST modifikovat některé důležité apoptotické proteiny prostřednictvím anti-apoptotických nebo pro-apoptotických účinků a následně předcházet souvisejícím onemocněním nebo je léčit [37].

Potenciální klinické využití AST zahrnuje prevenci a léčbu onemocnění spojených s ROS. Byly studovány jeho protinádorové, kardioprotektivní, antidiabetické, hepatoprotektivní, imunomodulační a neuroprotektivní aktivity. Použití přírodního AST jako barviva krmiv pro zvířata a vodní organismy bylo schváleno různými agenturami, jako je Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropská komise. Přírodní zdroje bohaté na AST, především *Haematococcus pluvialis* se využívají jako doplněk stravy regulovaný Evropskou komisí. V kosmetickém průmyslu lze AST využívat zejména pro jeho schopnost snížit syntézu oxidu dusnatého a apoptózu keratinocytů, ochranu kožní buňky před poškozením vyvolaným UV zářením, regulaci aktivity enzymů matrix metaloproteinázy-1 a elastázy kožních fibroblastů. To vše zpomaluje stárnutí kůže, reguluje oxidační stres a inhibuje zánětlivé cytokiny [37], [38], [42].

Aktivní konjugované dvojně vazby sice propůjčují AST silnou antioxidační schopnost, ale jsou také náchylné k oxidaci a snadno se rozkládají. Stabilitu AST může ovlivnit řada podnětů z prostředí během zpracování a použití, jako je teplota, kyslík, světlo a pH. Byla provedena řada stabilitních studií např. Armenta a Guerrero-Legarreta [43] zkoumali stabilitu přírodních a syntetických AST a uvedli, že vzduch a plné světlo jsou dva jednotlivé faktory s největším vlivem na oxidaci AST. Po 8 týdnech bylo 97 % přírodního a 88 % syntetického AST oxidováno plným světlem a vzduchem při 45 °C. V procesu oxidační degradace může AST podléhat reakcím, jako je izomerizace a oxidační narušení konjugovaných dvojných vazeb, které ovlivňují jeho biologické účinky. Obvykle je v přírodě nejvíce zastoupen E stabilní izomer AST, zatímco Z-izomer je méně dostupný. Obsah Z-

izomeru se však zvyšuje při působení nepříznivých faktorů během zpracování nebo skladování, jako je teplo a osvětlení. Chemickou nestabilitu mohou taktéž způsobovat změny hodnoty pH, v jejichž závislosti se mění struktura molekul AST. Špatná stabilita a rozpustnost může negativně ovlivnit prostup léčiva/aktivní látky přes biologické membrány a vede k nízké účinnosti absorpce AST do lidského krevního oběhu, což omezuje použití AST ve funkčních potravinách, kosmetickém i farmaceutickém průmyslu. AST má také intenzivní zápach a chuť, které je obecně nutné redukovat. Jsou vyvíjeny systémy dodávání aktivních látek s cílem vyřešit problémy s formulací vyvolané nízkou stabilitou, kontrolou uvolňování účinné složky a/nebo zlepšením biologické dostupnosti živin. Lze dosáhnout takových cílených dodávacích systémů pro dodání AST do specifických oblastí těla nebo selektivněji zacílit na specifické tkáně a buňky. Jako potenciální vhodné systémy pro dodávání AST na cílené místo lze uvést NLC, SLN, emulze, liposomy, polymerní nanočástice, micely nebo gely [37], [38], [42] [44].

### 3.2 Kanabinoidy

Kanabinoidy jsou meroterpeny s aryllovou substitucí. Obecně se jedná o skupinu biologických sloučenin, které se vážou na kanabinoidní receptory. Nejčastěji pocházejí z rostlin rodu *Cannabis*. Na základě původu lze kanabinoidy rozdělit do tří skupin: fytoKANABINOIDY, endokanabinoidy a syntetické kanabinoidy. FytoKANABINOIDY jsou přítomny ve stoncích, listech, květech a semenech rostliny a také v pryskyřici vylučované samičí rostlinou. Doposud byly izolovány a identifikovány stovky kanabinoidů, z nichž nejznámější jsou fytoKANABINOIDY tetrahydrokanabinol (THC), který je zodpovědný za psychoaktivní účinky konopí, a canabidiol (CBD) [45], [46] [47].

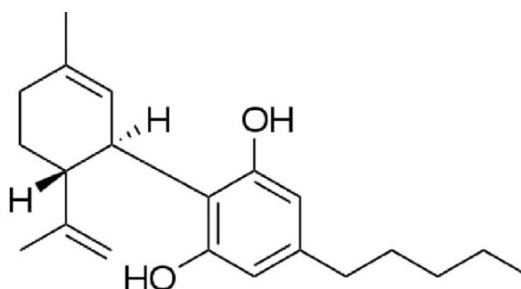
Biologické účinky kanabinoidů se projevují interakcí s endokanabinoidním systémem, což je signální systém založený na lipidech, který se skládá z ligandů, jež se vážou na kanabinoidní receptory. Tento systém je nezbytný pro různorodé mozkové funkce, jako jsou rovnováhy nálad a energetické rovnováhy nebo učení a paměť, ale má rovněž vliv na imunitu nebo pocit bolesti. Kanabinoidy účinkují tak, že v rámci endokanabinoidního systému stimulují dva receptory – kanabinoidní receptor typu 1 (CB1) a typu 2 (CB2), přičemž většina koncových účinků kanabinoidů, včetně psychotropních látek, je způsobena aktivací CB1, zatímco CB2 plní důležitější roli v imunitních a zánětlivých funkcích [46], [48].

Kanabinoidy jsou proslulé svými psychotropními a fyziologickými účinky. THC a některé syntetické analogy se používají terapeuticky, např. při nevolnosti a zvracení po

chemoterapii, jako analgetikum, při léčbě epilepsie, jako protizánětlivý prostředek, stimulator chuti k jídlu u pacientů s HIV/AIDS nebo s rakovinou, ale také při léčbě onemocnění jako je astma a glaukom. V klinických studiích prokázaly kanabinoidy mírnou až silnou účinnost na chronickou bolest, závislost na opioidech, Tourettův syndrom nebo roztroušenou sklerózu [46], [47].

### 3.2.1 Kanabidiol

Kanabidiol (CBD) je nepsychoaktivní fytokanabinoid, který se přirozeně vyskytuje v rostlině konopí seté (*Cannabis sativa*). Chemická struktura CBD je znázorněna na Obr. 15. Pro své neuroprotektivní, protizánětlivé, antioxidační a analgetické účinky je CBD věnována značná pozornost zejména ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu [49], [50], [51].



Obrázek 17 Chemická struktura CBD [52]

CBD se jeví jako slibné léčivo jak neurologických onemocnění (epilepsie, roztroušená skleróza, Parkinsonova a Alzheimerova choroba, neuropatická bolest), tak i kožních onemocnění, včetně kopřivky, lupénky nebo akné [49], [50].

Jako antioxidant reguluje CBD redoxní stavy buněk tím, že snižuje tvorbu ROS a zvyšuje hladinu a aktivitu neenzymatických i enzymatických endogenních antioxidantů na transkripční úrovni. Giacoma a kol. [53] ve své studii uvedli, že extrakt z konopné vody obsahující CBD, kyselinu kanabidiolovou a rutin chrání lidské fibroblasty a keratinocyty před cytotoxicitou a apoptózou vyvolanou oxidačním stresem.

Co se týká stability, může CBD degradovat působením světla, zvýšení teploty nebo kyslíku. Jelikož je CBD vysoce lipofilní molekula, má tendenci se hromadit v horní vrstvě kůže, a špatně proniká do jejích hlubších vrstev. Z těchto důvodů je pro aplikaci CBD používáno systémů pro podávání léčiv, jako jsou např. liposomy, polymerní nanočástice nebo lipidové nanočástice, které zvyšují účinnost průniku CBD na cílené místo a zlepšují jeho stabilitu [49].

## 4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Jelikož má mnoho aktivních látek lipofilní povahu, je jejich cílené podávání na určité místo náročné. Jedním ze způsobů, jak tento problém překonat, je enkapsulace těchto látek do syntetických nanonosičů, která může účinně zabránit jejich degradaci a zajistit jejich lepší biodistribuci. Některé typy nanočástic, např. polymerní nanočástice, jsou však často spojovány s možnými cytotoxickými vedlejšími účinky. Tuhé lipidové nanočástice (SLN) a nanostrukturované lipidové nosiče (NLC), které se připravují z fyziologicky inertních lipidů, se proto ukázaly jako ideální strategie, jak obejít problémy s toxicitou a vyhnout se použití organických rozpouštědel v jejich formulacích [54]. Tato část diplomové práce se bude věnovat současné problematice lipidových nanonosičů s enkapsulovaným antioxidantem.

V roce 2023 López a kol. publikovali práci zaměřenou na SLN a NLC připravené syntézou pomocí mikrovln a ultrazvuku. Ve své studii uvedli, že obě syntézy představují jednoduché, rychlé, bezpečné a ziskové technologie, které z hlediska škálování nabízejí slibné možnosti pro vývoj a výrobu stabilních, monodisperzních nanosystémů.

Bylo zjištěno, že mikrovlnná syntéza nabízí možnost ovlivňovat složení připravovaných nanočástic lokalizovaným způsobem, což způsobuje, že tepelná energie se přenáší z vnitřku jádra částic do vnějšího prostředí a podporuje tvorbu nanostruktur, čímž se daří zabránit jejich koalescenci. Intenzivní ultrazvukové vlnění zase poskytuje jedinečné podmínky pro formulaci prostřednictvím akustických kavitací. Použití ultrazvuku, samo o sobě nebo v kombinaci s jinými enkapsulačními přístupy, umožňuje rychlou a účinnou tvorbu lipidových nanočástic. Dále bylo uvedeno, že po použití ultrazvuku došlo ke zlepšení fyzikálně-chemických parametrů částic, jako je velikost a polydispersita (PDI), a ovlivnilo také enkapsulaci a profil uvolňování aktivních látek. V neposlední řadě bylo prokázáno, že tyto typy nanočástic formulované pomocí uvedených technik mají pozitivní vliv na funkční vlastnosti různých enkapsulovaných molekul, jako je např. rozpustnost, dostupnost a profil uvolňování. Autoři však upozorňují, že se jedná o nové postupy, a tudíž je nutné pokračovat ve výzkumu, který by podpořil dosud získané výsledky [54].

Jiwankar a Sabale v roce 2023 vydali studii zabývající se potenciálem NLC při perorálním podávání špatně rozpustných léčiv. Perorální podání je jedním z nejpreferovanějších způsobů podání, protože je pohodlné a bezpečné. Autoři uvedli, že NLC jsou slibnými nosiči pro podávání léčiv perorální cestou, protože zlepšují jejich biologickou, obcházejí



metabolismus prvního průchodu a inhibují mechanismus vyplavování léčiv z P-glykoproteinu. Lipidy použité při formulaci NLC jsou biokompatibilní a biologicky odbouratelné, a proto vykazují nízkou toxicitu. Mimo to enkapsulace léčiva v NLC pomáhá zvyšovat perorální absorpci léčiva tím, že prodlužuje dobu střevního tranzitu [22].

Morakul a kol. v roce 2023 vydali studii, jejíž cílem bylo enkapsulovat extrakt z kanabidiolu CBD do NLC za účelem zlepšení chemické stability a protizánětlivé aktivity CBD pro kožní podání. Bylo uvedeno, že vzorky byly připraveny s použitím cetylpalmitátu jako pevného lipidu a jako kapalný lipid byly použity tři různé oleje, včetně Transcutolu® P, triacylglycerolů se středně dlouhým řetězcem (MCT) a kyseliny olejové. NLC byly stabilizovány pomocí Tego® Care 450 (TG450) nebo poloxameru 188 (P188). Extrakt CBD byl enkapsulován v koncentraci 1 hm. %. Jako metoda přípravy byla zvolena vysokotlaká homogenizace. Ve výsledcích studie autoři uvedli, že NLC s CBD byly úspěšně připraveny se 100% enkapsulační účinností. Všechny formulace vykazovaly velikost částic v rozmezí 160 až 200 nm s PdI < 0,10. Typ použité PAL a oleje ovlivnil velikost částic,  $\zeta$ -potenciál a krystalinitu vzorků, kdy NLC s CBD stabilizované pomocí TG450 vykazovaly po výrobě a skladování při 30 °C po dobu 30 dnů vyšší krystalinitu ve srovnání se vzorky stabilizované pomocí P188. Enkapsulace extraktu CBD v NLC zvýšila jeho chemickou stabilitu po vystavení simulovanému slunečnímu záření (1000 kJ/m<sup>2</sup>) v porovnání s extraktem CBD v ethanolovém roztoku. NLC s CBD připravené z MCT a kyseliny olejové vykazovaly pomalejší uvolňování CBD ve srovnání s uvolňováním z Transcutolu®. U vzorků byla také testována cytotoxicita extraktu CBD na buněčné linii lidských fibroblastů a na buněčné linii lidských immortalizovaných keratinocytů. Bylo zjištěno, že cytotoxicita se enkapsulací do NLC snížila. Protizánětlivá aktivita extraktu CBD testovaná na makrofázích RAW264.7 byla zvýšena enkapsulací CBD do NLC připravených z MCT a kyseliny olejové [49].

Ngoc-Bich-Dao Vu a kol. v roce 2024 publikovali studii, která si kladla za cíl navrhnout NLC s enkapsulovaným AST, které by bylo možno využívat k ochraně kůže pacientů před ionizujícím zářením během radioterapie. NLC s enkapsulovaným AST byly připraveny kombinovanou metodou homogenizace za tepla a sonikace. U připravených vzorků byla testována cytotoxicita pomocí kolorimetrického testu MTT, dále byla zkoumána radioprotekce pro buňky lidských fibroblastů *in vitro* na základě úrovně ROS, poškození DNA a buněčné smrti způsobené ozářením rentgenem. Mimo to byla radioprotekce také hodnocena *in vivo* na základě vzhledu a histologické struktury ozářené kůže. Autoři ve výsledcích studie uvedli, že byly úspěšně připraveny NLC s enkapsulovaným AST

s průměrnou velikostí částic 114,4 nm,  $\zeta$ -potenciálem  $-34,1$  mV a účinností enkapsulace 85,67 %. Po ozáření rentgenovým zářením v podmínkách *in vitro* působením NLC s AST došlo ke snížení množství generovaných ROS o 81,6 % a poškození DNA o 41,6 %, což vedlo k významnému snížení buněčné smrti o 62,69 % ve srovnání s kontrolou. V podmínkách *in vivo* se po 9. dnu ozařování rentgenovým zářením projevilo na hřbetní kůži pěti ze šesti myší neléčených NLC s AST poškození kůže stupně 1 (podle Společného terminologického kritéria pro nežádoucí účinky – CTCAE), zatímco léčba NLC s AST ochránila šest ze šesti myší před akutním poškozením kůže. Mimo to 28. den po prvním ozáření rentgenovým zářením histologické snímky ukázaly, že působení NLC s AST v koncentraci AST 0,25  $\mu\text{g/ml}$  vykazuje dobré zotavení kůže, přičemž v kolagenových vláknech a mazových žlázách nebyl zaznamenán téměř žádný rozdíl ve srovnání s normální kůží [55].

V roce 2023 Gu a kol. publikovali studii s cílem stanovení fyzikálně-chemických charakteristik NLC s AST, které byly připravené pomocí vysokotlaké homogenizace za účelem lokální aplikace AST. Ke studiu vlivu mikroenkapsulace na vlastnosti NLC s AST byl použit dynamický rozptyl světla (DLS) a rentgenová difrakce (XRD). Průměrná velikost částic NLC s AST byla přibližně 108,43 nm a PDI bylo 0,176. NLC s AST vykazovaly vysokou účinnost enkapsulace, která činila 95,69 %. U vzorků byla prokázána dobrá teplotní stabilita. Test zhášení radikálů s použitím DPPH ukázal, že NLC s AST vykazuje antioxidační vlastnosti. Studie uvolňování *in vitro* ukázaly, že ve srovnání s ethanolovým roztokem AST může NLC s AST efektivněji uvolňovat AST. Na Výsledky studie permeace *in vitro* naznačily, že NLC s AST může zvýšit retenci AST v kůži. Autoři závěrem uvedli, že NLC s AST by mohly významně zvýšit akumulaci AST při dermálních aplikacích. [56].

Na základě výše uvedených studií a jejích výsledků lze konstatovat, že lipidové nanočástice jsou slibnými nosiči aktivních látek i léčiv s potenciálem pro praktické aplikace v kosmetickém i farmaceutickém průmyslu.

## 5 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši o lipidových nanočásticích a bioaktivních látkách s antioxidačním účinkem. Pozornost se soustředila zejména na karotenoidy (astaxanthin) a kanabinoidy (kanabidiol), jako na antioxidační látky vhodné pro začlenění do lipidových nanočástic.

Praktická část diplomové práce si kladla za cíl navrhnout vhodné složení lipidové matrice a stabilizátoru pro přípravu lipidových nanočástic obsahujících některý z uvedených antioxidantů. Dalším cílem pak bylo vodné disperze lipidových nanočástic s enkapsulovaným antioxidantem použít pro přípravu Pickeringových emulzí. V neposlední řadě bylo cílem praktické části stanovit vhodnými technikami fyzikálně-chemické charakteristiky připravených vzorků zejména s důrazem na vztah mezi složením a vlastnostmi studovaných formulací.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 POUŽITÉ MATERIÁLY

Tato kapitola diplomové práce popisuje použité přístrojové vybavení, pracovní pomůcky a chemické látky.

### 6.1 Přístroje a pracovní pomůcky

- Homogenizační zařízení T 25 digital Ultra Turrax (IKA, Německo)
- Sonikační zařízení (Hielscher UP400St, Německo)
- Analyzátor velikosti částic Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern, Spojené království)
- Laserový analyzátor velikosti částic Mastersizer 3000 (Malvern, Spojené království)
- Zařízení vysokoúčinné kapalinové chromatografie UFLC (Shimadzu, Japonsko)
- Diferenční skenovací kalorimetr (Mettler – Toledo, USA)
- Mikroskop skenující sondou (Bruker, USA)
- Optický mikroskop CX 21 (Olympus, Japonsko)
- Membrána dialyzační z regenerované celulózy Spectra/Por 1 (6-8 kDa)
- Běžné laboratorní sklo, plasty a další vybavení

### 6.2 Chemické látky

- Glyceryl behenát – Compritol® 888 CG ATO (Nature-Store, Česká republika)
- Kyselina laurová (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina palmitová (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina olejová (Sigma-Aldrich, USA)
- Jojobový olej (Saloos, Česká republika)
- Trikaprylin/trikaprin – Saboderm® TCC MB (dále jen „MCT“ z angl. Medium-Chain Triglyceride) (ACE Trade, Česká republika)
- Polyoxyetylen-80-sorbitan monooleát – Tween® 80 (dále jen „Tween“) (Carl Roth, Německo)
- Poloxamer 407 – Pluronic® F-127 (Sigma-Aldrich, USA)

- D- $\alpha$ -tokoferol polyethylenglykol 1000 sukcinát (dále jen „sukcinát“) (Sigma-Aldrich, USA)
- Deoxycholát sodný (dále jen „deoxycholát“) (Sigma-Aldrich, USA)
- CBD (Lipomed AG, Švýcarsko)
- Oleoresin s obsahem 10 % astaxanthinu (ALGAMO, Česká republika)
- Astaxanthin  $\geq 97\%$  z *Blakeslea trispora* (Sigma-Aldrich, USA)
- Askorbylpalmitát (ZVC Dr. Hoffmann, Česká republika)
- Ethanol 96% (Penta, Česká republika)
- Demineralizovaná voda

## 7 METODIKA

Následující kapitola diplomové práce představuje popis zvolených metod přípravy NLC bez aktivních látek (preformulační studie) i s enkapsulovanými aktivními látkami. Uvádí rovněž postup použitý pro přípravu Pickeringových emulzí, včetně fyzikálně-chemické charakterizace připravených vzorků a stabilitní studie.

### 7.1 Příprava NLC a preformulační studie

Za účelem výběru vhodné metody přípravy a složení lipidové matrice i stabilizátoru pro přípravu NLC byla provedena preformulační studie.

#### 7.1.1 Složení NLC

V rámci preformulační studie byl zkoumán vliv složení lipidové matrice a stabilizátoru na vlastnosti NLC. Látky, které byly testovány, jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2 Přehled použitých látek v rámci preformulační studie

<b>Pevný lipid</b>	<b>Kapalný lipid</b>	<b>Stabilizátor</b>
Kyselina laurová	Kyselina olejová	Sukcinát
Kyselina palmitová	Jojobový vosk	Tween
Glyceryl behenát	MCT	Poloxamer 407
–	–	Deoxycholát

#### 7.1.2 Metody přípravy NLC

Pro přípravu NLC byly v rámci preformulační studie testovány dvě metody přípravy, které byly pojmenovány jako Metoda 1 a Metoda 2. V obou případech se jednalo o metodu homogenizace za horka.

##### *Metoda 1*

V případě Metody 1 se jednalo o postupné přikapávání vodné fáze do lipidové fáze. Nejprve byla připravena lipidová fáze v hmotnostním poměru pevný lipid:kapalný lipid 7:3, konkrétně 140 mg tuhého lipidu a 60 mg kapalného lipidu. Vodnou fázi tvořila PAL o koncentraci 5 hm. % a 20 ml demineralizované vody. Lipidová fáze byla navážena do zkumavky, která byla umístěna do vodní lázně vytemperované na 70 °C. Po zahřátí vodné

fáze na 70 °C bylo do zkumavky s lipidovou fází přidáno 5 ml vodné fáze a byla zahájena homogenizace homogenizačním zařízením T 25 digital Ultra Turrax, který byl nastaven na 5000 rpm. Následně bylo zahájeno měření času a postupně byla přikapávána vodná fáze, která byla neustále udržována při teplotě vyšší než 70 °C. Po nadávkování poloviny objemu vodné fáze byly zvýšeny otáčky homogenizačního zařízení na 13500 rpm. Dalším postupným přikapáváním byla do lipidové fáze přidána i druhá polovina objemu vodné fáze. Jmile bylo dosaženo celkového času 10 minut, byla homogenizace ukončena. Poté byla vzniklá emulze (lipidová fáze byla v kapalném stavu) pipetou odsána do plastové nádoby a celý objem byl sonikován ve studené vodní lázni po dobu 5 min při amplitudě 100 % a cyklování 80 %, čímž lipidová fáze přešla do tuhého stavu. Na závěr byl připravený vzorek dochlazen v ledové lázni.

V rámci diplomové práce byla rovněž testována modifikace Metody 1. Postup byl zcela totožný, avšak bylo změněno složení lipidové i vodné fáze. Lipidová fáze byla připravena navážením 450 mg pevného lipidu, 100 mg kapalného lipidu a 60 mg Tweenu. Vodnou fází tvořilo 450 mg Polooxameru 407 a 16 ml destilované vody.

#### *Metoda 2*

Metoda 2 spočívala v prudkém ochlazení vzorku – emulze vzniklé smícháním olejové a vodné fáze za teploty 70 °C. Nejprve byla připravena lipidová fáze navážením 140 mg pevného lipidu a 60 mg kapalného lipidu. Následně byla připravena vodná fáze, která obsahovala 1, 2 nebo 5 hm. % stabilizátoru a 15 ml demineralizované vody. Lipidová fáze byla navážena do 50ml úzké skelněné kádinky, která byla poté umístěna do vodní lázně vytemperované na 70 °C. V dalším kroku byla vodná fáze (vytemperována na 80 °C) přidána do kádinky s lipidovou fází a spustila se homogenizace po dobu 5 min při 13500 rpm. Vzniklá emulze byla poté sonikována po dobu 10 minut při amplitudě 100 % a cyklování 80 % ve vodní lázni bez ledu. Na závěr byl vzorek umístěn opět na homogenizační zařízení, kde k němu bylo přidáno 15 ml demineralizované vody vychlazené na 3 až 5 °C a následovala další homogenizace při 13500 rpm po dobu 1 minuty.

V rámci preformulační studie byla připravena řada formulací za účelem volby konečného složení NLC. Složení těchto formulací je uvedeno v Tabulce 3.



Tabulka 3 Přehled složení vzorků připravených v rámci preformulační studie spolu s použitou metodou přípravy částic.

<b>Pevný lipid</b>	<b>Kapalný lipid</b>	<b>Stabilizátor</b>	<b>Metoda</b>
Kyselina laurová	MCT	Sukcinát	2
		Deoxycholát	2
		Tween	2
		Poloxamer 407	2
	Kyselina olejová	Tween	1 i 2
Kyselina palmitová	Kyselina olejová	Tween	2
Glyceryl behenát	Jojobový vosk	Tween	2
	Kyselina olejová		2
	MCT		2
	Jojobový vosk	Sukcinát	2
	Kyselina olejová		2
	MCT		2

### 7.1.3 Charakterizace NLC bez aktivních látek

V rámci formulační studie byla následující den po přípravě NLC provedena jejich charakterizace, a to změřením velikosti částic a indexu polydispersity (PDI) pomocí dynamického rozptylu světla na přístroji Zetasizer Nano ZS 90. Měření byla provedena při teplotě 25 °C a rozptylovém úhlu 90 °.

Velikost částic byla vyjádřena jako z-průměr velikosti koloidní částice, což je intenzitně vážený střední průměr jejich velikosti. Pro analýzu bylo 10 µl vzorku dispergováno v 990 µl demineralizované vody o pH = 6. Výsledky jsou uvedeny jako průměr šesti naměřených hodnot spolu se směrodatnou odchylkou.

## 7.2 Příprava NLC s aktivními látkami

Na základě výsledků preformulační studie bylo vybráno vhodné složení NLC a metoda jejich přípravy. Jako nosiče pro aktivní látku byly použity NLC obsahující glyceryl behenát (tuhý

lipid), kyselinu olejovou (kapalný lipid) a stabilizátory Tween nebo sukcinát o koncentraci 2 hm.%. Složení připravovaných NLC je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4 Složení připravovaných NLC s aktivními látkami astaxantinem (AST), kanabidiolem (CBD) a oleoresinem obsahujícím 10 % AST

Stabilizátor	Pevný lipid	Kapalný lipid	Aktivní látka
Tween	Glyceryl behenát	Kyselina olejová	AST
			CBD
			Oleoresin
Sukcinát	Glyceryl behenát	Kyselina olejová	AST
			CBD
			Oleoresin

Jako metoda přípravy NLC byla zvolena Metoda 2, jelikož poskytovala homogennější vzorky a byla časově výhodnější. Po zkušenostech z předchozích studií byla rovněž provedena stabilizace aktivní látka v NLC antioxidantem.



Obrázek 18 Homogenizace lipidové a olejové fáze

Pro přípravu NLC byla nejprve byla připravena lipidová fáze v hmotnostním poměru tuhý lipid:kapalný lipid 7:3. Konkrétně bylo na analytických vahách s přesností na 1 mg naváženo 140 mg glyceryl behenátu a 60 mg kyseliny olejové. Do olejové fáze bylo přidáno 25 mg aktivní látky a 5 mg askorbyl palmitátu jako antioxidantu. Vodnou fázi tvořilo 350 mg stabilizátoru a 15 ml destilované vody. Pro vlastní přípravu NLC byla použita Metoda 2, jejíž postup byl však mírně modifikován. Lipidová fáze byla umístěna do vodní lázně vytemperované na 80 °C. Následně k ní byla přidána vodná fáze vytemperována na 85 °C a byla zahájena homogenizace pomocí homogenizačního zařízení Ultra Turrax (5 min při 13500 rpm; Obr. 18). Vzniklá emulze byla poté krátce sonikována (5 minut při amplitudě 80 % a cyklování 80 %) ve vodní lázni bez ledu. Na závěr bylo 15 ml demineralizované vody vychlazené na ca 4 °C přidáno ihned po dokončení sonikace a takto připravený vzorek byl opět sonikován za stejných podmínek po dobu 20 sekund.

### 7.2.1 Dialýza

Připravené NLC s aktivní látkou byly pro odstranění nadbytečného surfaktantů dialyzovány a to tak, že vždy 10 ml vzorku bylo pipetováno do 6-8 kDA dialyzační membrány, která byla zajištěna dialyzačními sponami. Takto připravené vzorky byly dialyzovány přes noc ve 2200 ml demineralizované vody za stálého míchání na magnetické míchače.

## 7.3 Charakterizace NLC s aktivními látkami

### 7.3.1 Velikost částic a její distribuce

NLC s aktivními látkami byly charakterizovány měřením velikosti částic a její distribucí. Velikost částic byla měřena na přístroji Zetasizer Nano ZS 90 při 25 °C a rozptylovém úhlu 90 °. Vzorky pro měření velikosti částic byly připraveny rozdispergováním 10 µl vzorku v 990 µl demineralizované vody. Výsledky jsou uvedeny jako průměr šesti naměřených hodnot se směrodatnou odchylkou. Ve výsledcích jsou taktéž uvedeny křivky distribuce velikosti částic a hodnota Pdl.

### 7.3.2 $\zeta$ -potenciál

Pro charakterizaci NLC s aktivními látkami byl stanoven  $\zeta$ -potenciál, což je potenciál ve vzdálenosti pohybového rozhraní od povrchu částice. Velikost  $\zeta$ -potenciálu závisí na adsorbovaných iontech a iontové síle roztoků a je ovlivněn hodnotou pH a přidávkem elektrolytů.  $\zeta$ -potenciál byl naměřen obdobně jako velikost částic na přístroji Zetasizer Nano

ZS 90 při 25 °C a rozptylovém úhlu 90 °. Příprava vzorků pro jeho měření byla provedena tak, že 25 µl vzorku bylo rozdispergováno ve 4 ml demineralizované vody o pH = 6. Stanovená hodnota  $\zeta$ -potenciálu je uvedena jako průměr šesti naměřených hodnot spolu se směrodatnou odchylkou.

### 7.3.3 Stanovení teplotních vlastností

Termická analýza zahrnuje techniky používané ke stanovení fyzikálních nebo chemických vlastností látky při zahřívání, ochlazování nebo udržování konstantní teploty. Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC, Differential Scanning Calorimetry) je technika termické analýzy pro získávání poznatků o fázových přechodech materiálů, jako je bod tání, krystalizace nebo teplota skelného přechodu v závislosti na čase a teplotě. Při měření je vzorek vložen do pánvičky, která je následně spolu s prázdnou referenční pánvičkou umístěna do přístroje. Obě pánvičky jsou zahřívány a ochlazovány lineární rychlostí. Během změny teploty je měřeno množství tepla, které je uvolňováno nebo nadměrně absorbováno vzorkem na základě rozdílu teplot mezi pánvičkou se vzorkem a pánvičkou referenční. Výstupem je křivka závislosti tepelného toku na teplotě [58], [59].

DSC analýze byly vystaveny látky čisté i ve směsi včetně aktivní látky CBD a disperzí NLC s enkapsulovaným CBD. Přehled vzorků pro DSC včetně navážek je uveden v Tabulce 5.

Tabulka 5 Přehled vzorků pro DSC

Látka	Navážka [mg]
Glyceryl behenát	5,02
Kyselina olejová	5,09
MCT	5,50
Jojobový vosk	4,30
CBD	6,02
Glyceryl behenát a kyselina olejová	5,47
Glyceryl behenát a MCT	5,40
Glyceryl behenát a jojobový vosk	5,35
Glyceryl behenát, kyselina olejová a CBD	4,75
Glyceryl behenát, MCT a CBD	4,44
Glyceryl behenát, jojobový vosk a CBD	4,38
NLC s CBD a stabilizátorem Tween	7,89
NLC s CBD a stabilizátorem sukcinát	6,79

Vzorky čistých látek byly přímo naváženy do DSC pánviček. Vzorky směsí byly nejprve připraveny do mikrozkušavek typu Eppendorf navážením 70 mg tuhého lipidu (glyceryl behenát) a 30 mg tekutého lipidu (kyselina olejová nebo MCT nebo jojobový vosk). Do vzorků s aktivní látkou bylo k tuhému a tekutému lipidu naváženo 10 mg CBD. Následně byly mikrozkušavky se vzorky temperovány na 80 °C po dobu 5 minut a byly umístěny na třepačku vortex, kde byly homogenizovány po dobu 1 minuty. Takto připravené vzorky byly umístěny do pánviček. Vzorky připravených NLC s enkapsulovaným CBD stabilizované Tweenem nebo sukcinátem byly bez předchozích úprav Pasteurovou pipetou nakapány do pánvičky. Jednotlivé navážky jsou uvedeny v Tabulce 5.

Při samotné DSC analýze byly vzorky zahřívány při 25 °C po dobu 2 minut. Následně byly zahřáty rychlostí 10 °C/min na teplotu 80 °C, při které byly udržovány 3 minuty. Poté byly vzorky ochlazeny stejnou rychlostí na teplotu -10 °C, při které byly ponechány po 3 minuty.

Následoval druhý ohřev rychlostí 10 °C/min na 80 °C, při které vzorky byly ponechány opět 3 minuty. Na závěr analýzy byly vzorky ochlazeny na 25 °C.

### 7.3.4 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost (EE, Encapsulation Efficiency) je jednou ze základních charakteristik popisující úspěšnost zachycení aktivní látky v daném nosiči. Množství enkapsulovaného CBD bylo stanoveno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) ve dvou vzorcích NLC o složení glyceryl behenát/kyselina olejová/CBD a stabilizátorem byl Tween nebo sukcinát. Z každého ze vzorků byly připraveny 3 extrakty následujícím postupem. Do kádinky bylo napipetováno 5 ml ethanolu a 500 µl vzorku NLC. Následně byl celý objem sonikován po dobu 2 minut při amplitudě 80 % a cyklování 100 %. V dalším kroku byl celý objem vzorku přefiltrován přes 0,45 mm filtry do 10ml odměrné baňky a doplněn ethanolom po rysku. Takto připravené extrakty byly podrobeny HPLC analýze při laboratorní teplotě. Podmínky analýzy jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6 Podmínky HPLC analýzy

Eluce	Kolona	Mobilní fáze (v/v)	Nástříkový objem [µl]	Průtok mobilní fáze [ml/min]
Isokratická	XSelect CSH C18	Methanol:voda (80:20)	5	0,8

Za účelem vyhodnocení dat byla ze série standardů CBD v ethanolu (koncentrační rozsah 5 až 100 µg/ml) sestrojena kalibrační přímka.

Z naměřených hodnot byla pomocí kalibrační přímky vypočtena koncentrace CBD v jednotlivých extraktech. Následně byla pomocí rovnice 1 [60] vypočtena EE, kde  $C_s$  je stanovená koncentrace CBD z HPLC a  $C_t$  je teoretická maximální koncentrace CBD v lipidových částicích, která byla vypočtena jako 41,67 µg/ml.

$$EE = \frac{C_s}{C_t} \times 100 [\%] \quad (1)$$

Výsledné hodnoty EE jsou po vyloučení odlehlých hodnot uvedeny jako průměry měření ze tří extraktů včetně směrodatné odchylky.

### 7.3.5 Mikroskopie atomárních sil

Morfologie vybraného vzorku NLC s enkapsulovaným CBD stabilizovaný sukcinátem byla charakterizována mikroskopií atomárních sil (AFM, Atomic Force Microscopy). AFM je mikroskopická technika, která je citlivá na povrch založená na sledování oscilací a polohy kantileveru vybaveného hrotem (o velikosti v nano měřítku) v blízkosti zkoumaného povrchu. Existují různé režimy měření, které umožňují nejen určit geometrii anizotropních částic prostřednictvím vyhodnocení topografie vzorku, ale také poskytnout informace o drsnosti povrchu nebo mechanických vlastnostech a adhezních silách [61], [62].

Stanovení morfologie vzorku NLC s CBD a stabilizátorem sukcinát bylo provedeno pomocí mikroskopu se skenující sondou Dimension ICON (Bruker). Vzorek byl před měřením 100× zředěn ultračistou vodou, aplikován na povrch slídy a sušen při laboratorní teplotě. Obrázky jsou editovány pomocí softwaru Gwyddion.

### 7.3.6 Stanovení stability NLC disperzí

U připravených vzorků NLC s CBD byla stanovena jejich stabilita v čase, a to měřením změn velikosti částic (včetně Pdl),  $\zeta$ -potenciálu a koncentrace CBD pomocí HPLC. Vzorky byly charakterizovány ihned po přípravě a následně bylo měření opakováno v sedmidenních intervalech po dobu 4 týdnů. Měření byla provedena stejným postupem, jako je popsáno v kapitole 7.3.1 pro velikost částic, 7.3.2 pro  $\zeta$ -potenciál a 7.3.4 pro koncentraci CBD stanovenou pomocí HPLC. Během zmiňovaného období byly vzorky skladovány v chladničce při teplotě  $\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 7.4 Příprava Pickeringových emulzí

Pickeringovy emulze (PE) jsou emulze stabilizované částicemi [63]. V další části práce byly připraveny PE, k jejichž stabilizaci byly použity připravené NLC s enkapsulovaným CBD. Vodná disperze NLC s CBD byla použita jako vodná fáze (VF) a jako olejová fáze (OF) byl použit AST oleoresin rozpuštěný v MCT. Pickeringovy emulze byly typu olej ve vodě (O/V). Testované vzorky byly připraveny v hmotnostních poměrech O/V 20:80, 10:90 a 5:95 vždy v celkové hmotnosti 5 g emulze. Složení PE je uvedeno v Tabulce 7.

Tabulka 7 Navážky vodné (VF) a olejové fáze (OF) pro přípravu 5 g Pickeringových emulzí. Olejovou fází tvořil oleoresin obsahující 10 % AST rozpuštěný v MCT

Stabilizátor NLC	Hmotnostní poměr O/V	Navážka VF [g]	Navážka OF [g]
Tween	20/80	4	1
	10/90	4,5	0,5
	5/95	4,75	0,25
Sukcinát	20/80	4	1
	10/90	4,5	0,5
	5/95	4,75	0,25

Nejprve byla připravena OF a to rozpuštěním 100 nebo 200 mg oleoresinu (obsah AST 10 %) v 5 ml MCT. Takto připravený roztok byl za účelem zlepšení homogenizace sonikován po dobu 1 minuty při amplitudě 80 % a cyklování 100 %. V dalším kroku bylo naváženo příslušné množství VF, která byla tvořena vodnou disperzí NLC s enkapsulovaným CBD, které byly stabilizované buď Tweenem, nebo Sukcinátem. K VF bylo následně přidáno příslušné množství OF a vzorek byl sonikován na rozhraní fází po dobu 1 minuty při amplitudě 80 % a cyklování 100 %.

## 7.5 Charakterizace Pickeringových emulzí

Pickeringovy emulze byly charakterizovány stanovením velikosti částic, optickou mikroskopií a vizuálním pozorováním.

### 7.5.1 Stanovení velikosti částic

Pickeringovy emulze byly charakterizovány měřením velikosti částic. Ta byla stanovena pomocí laserového analyzátoru velikosti částic Mastersizer 3000, který pracuje na principu světelné difrakce. Měření je prováděno ve speciální dispergační jednotce, do níž je napuštěna demineralizovaná voda jako dispergační médium. Vzorek je do dispergační jednotky dávkován Pasteurovou pipetou v takovém objemu, aby bylo dosaženo doporučené hodnoty „obskurace“. Homogenitu vzorku zajišťuje zabudovaný ultrazvukový homogenizátor



a dispergační jednotka přístroje je opatřena míchadlem, které usnadňuje pravidelné rozptýlení vzorku v dispergačním médiu.

Při samotném měření byl vzorek homogenizován po dobu 1 minuty při otáčkách 2000 rpm. Výsledkem měření byla velikost kapek emulze označovaná jako  $D [4;3]$ , což je průměr částic v mikrometrech vztažený k jejich objemu. Stanovená hodnota velikosti emulzních kapek je uvedena jako průměr šesti naměřených hodnot včetně směrodatné odchylky.

### **7.5.2 Optická mikroskopie**

Připravené Pickeringovy emulze, které obsahovaly 200 mg Oleoresinu byly charakterizovány optickou mikroskopií pomocí optického mikroskopu značky Olympus CX 21. 10  $\mu$ l vzorku bylo nanášeno na podložní sklíčko a vzorek byl pozorován při zvětšení 1000  $\times$ , kdy byl jako imerzní olej použit olej cedrový.

### **7.5.3 Vizualní hodnocení**

Vedle mikroskopického pozorování byly emulze hodnoceny rovněž vizuálně. Byly sledovány případně nestability, jako krémování, aglomerace a rozpad emulze doprovázený uvolněním olejové fáze.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato kapitola diplomové práce se věnuje představení naměřených výsledků a jejich podrobné diskuzi.

### 8.1 Preformulační studie – NLC bez aktivní látky

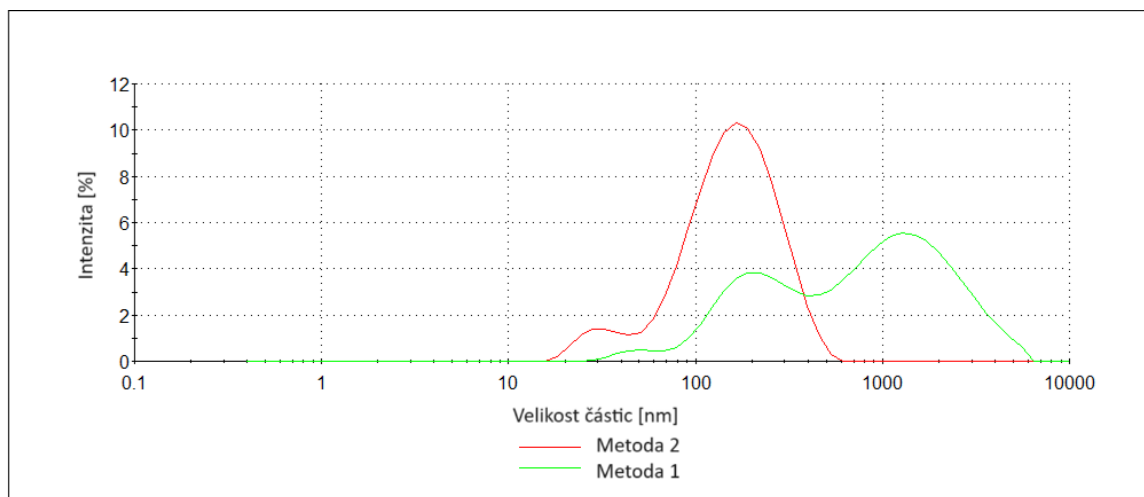
Cílem preformulační studie bylo zvolit nejvhodnější metodu přípravy, složení lipidové matrice a typ a koncentraci stabilizátoru. Přehled složení připravených vzorků v rámci preformulační studie je uveden v Tabulce 3 v kapitole 7.1.2.

#### 8.1.1 Volba metody přípravy

V první části preformulační studie byla potřeba zvolit metodu přípravy. Byly testovány dvě metody přípravy, které jsou podrobně popsány v kapitole 7.1.2. NLC obsahující kyselinu laurovou jako pevný lipid, kyselinu olejovou jako kapalný lipid a Tween jako stabilizátor byly připraveny oběma metodami. Oba vzorky byly charakterizovány změřením velikostí částic a jejich distribucí včetně PDI. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 8 a distribuce velikosti částic obou vzorků na Obrázku 19.

Tabulka 8 Velikost částic a PDI NLC připravených metodami 1 (postupné přikapávání) a 2 (rychlé ochlazení)

Metoda přípravy	Velikost částic [nm]	PDI
Metoda 1	427±18	0,54±0,04
Metoda 2	121,4±0,6	0,278±0,005



Obrázek 19 Distribuce velikosti částic NLC připravených Metodou 1 a Metodou 2

Z Tabulky 8 je zřejmé, že u NLC připravených Metodou 1 (postupné přikapávání) byla průměrná velikost částic  $427 \pm 18$  nm s PdI  $0,54 \pm 0,04$ , zatímco u NLC připravených Metodou 2 (rychlé ochlazení) byla průměrná velikost částic  $121,4 \pm 0,6$  nm a PdI  $0,278 \pm 0,008$ . NLC připravené Metodou 2 mají tedy výrazně menší velikost částic i PdI, což je patrné i z distribuce velikosti částic uvedené na Obrázku 19. Ta je v případě NLC připravených Metodou 1 multimodální, zatímco u Metody 2 je distribuce velikosti částic monomodální. Metoda 2 rovněž poskytla reprodukovatelnější výsledky, co se týká velikosti NLC.

Na základě výsledků charakterizace NLC připravených oběma metodami byla pro přípravu dalších formulací zvolena Metoda 2. Dalším důvodem zvolení této metody byla její nižší časová náročnost, kdy příprava NLC Metodou 2 je rychlejší a jednodušší na provedení než Metoda 1.

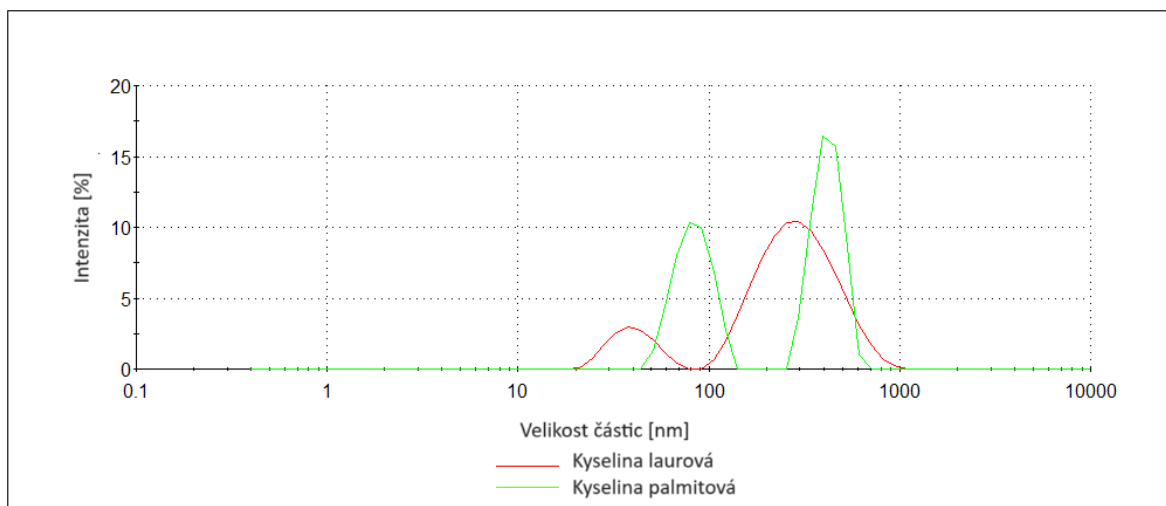
### 8.1.2 Volba formulace

#### *Pevný lipid – mastné kyseliny*

V rámci volby vhodného pevného lipidu byly nejprve testovány mastné kyseliny laurová (bod tání  $\sim 44$  °C) a palmitová (bod tání =  $61,8$  °C) [64]. Byly připraveny vzorky NLC obsahující kyselinu laurovou nebo palmitovou, jako pevný lipid kyselinu olejovou jako kapalný lipid a jako stabilizátor byl použit Tween. Připravené vzorky byly charakterizovány změřením velikostí částic a jejich distribucí včetně PdI. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 9 a distribuce velikosti částic obou vzorků na Obrázku 20.

Tabulka 9 Velikost částic a PdI NLC s mastnými kyselinami jako pevným lipidem

Pevný lipid	Kapalný lipid	Stabilizátor	Velikost částic [nm]	PdI
Laurová	Kyselina olejová	Tween	$121,4 \pm 0,6$	$0,278 \pm 0,005$
Palmitová			$732 \pm 93$	$0,938 \pm 0,018$



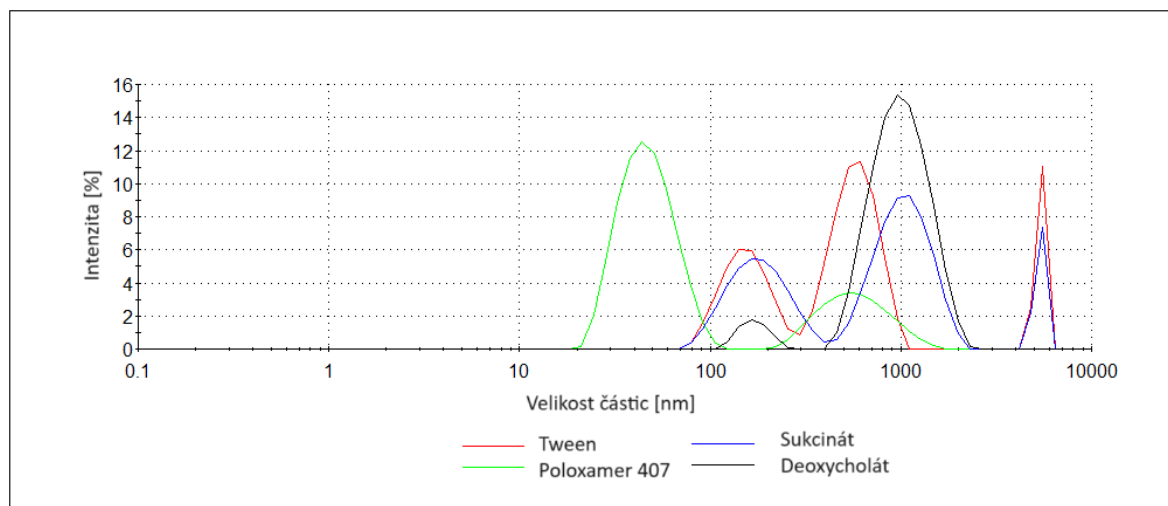
Obrázek 20 Distribuce velikosti částic NLC s kyselinou laurovou a palmitovou jako pevným lipidem a kyselinou olejovou jako lipidem kapalným

Z Tabulky 9 lze vyčíst, že u NLC s kyselinou laurovou byla naměřena výrazně menší velikost částic i PdI než u formulace s kyselinou palmitovou. Distribuce velikosti částic byla v případě NLC s kyselinou laurovou monomodální, zatímco v případě NLC s kyselinou palmitovou byla bimodální a obsahovala dvě frakce částic s rozdílnou velikostí částic. Jelikož NLC s kyselinou laurovou vykazovaly lepší vlastnosti než NLC s kyselinou palmitovou, byla kyselina palmitová ze studie vhodných lipidů pro formulaci vyřazena.

V rámci této studie byly testovány i vhodné typy stabilizátorů, mezi nimiž byly Tween, sukcinát, deoxycholát, a poloxamer 407. Jako pevný lipid byla použita kyselina laurová a jako kapalný MCT. U připravených vzorků byla stanovena velikost částic a její distribuce a PdI. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 10 a distribuce velikosti částic na Obrázku 21.

Tabulka 10 Velikost částic a PdI NLC připravených s kyselinou laurovou/MCT a různými stabilizátory

Stabilizátor	Velikost částic [nm]	PdI
Sukcinát	608±49	1±0
Deoxycholát	777±50	0,49±0,17
Tween	672±36	0,91±0,07
Poloxamer 407	52±2	0,38±0,02



Obrázek 21 Distribuce velikosti částic NLC připravených s různým stabilizátorem

Vzhledem k výsledkům měření velikosti částic a PdI uvedených v Tabulce 10 lze konstatovat, že nejmenší velikost částic i PdI byla naměřena u NLC připravených se stabilizátorem Poloxamer 407, a to  $52 \pm 2$  nm a  $0,38 \pm 0,02$ . Zde je však nutné podotknout, že distribuční křivka dokumentuje přítomnost ještě jedné frakce částic s velikostí mezi 200 a 1000 nm. Velikost částic u formulací s Tweenem a deoxycholátem se pohybovala okolo 700 nm a u formulací se sukcinátem okolo 600 nm. U formulací se sukcinátem a Tweenem byl naměřen vysoké PdI a distribuční křivky svědčí i o přítomnosti částic s velikostí větší než  $5 \mu\text{m}$ , které leží na hranici detekčního limitu pro metodu DLS.

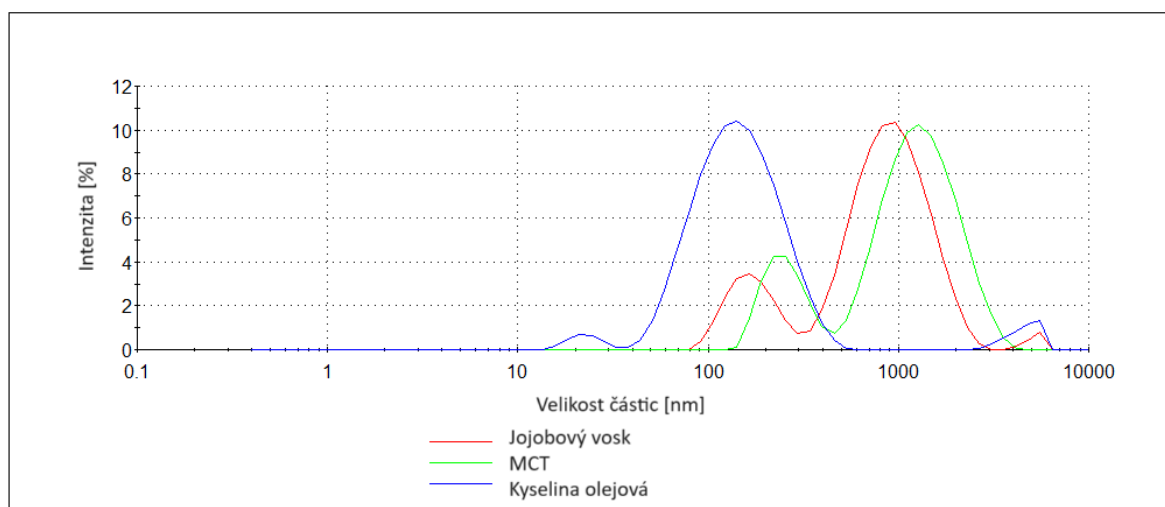
Na základě získaných výsledků bylo upuštěno od používání kyseliny laurové jako pevného lipidu. Při volbě stabilizátoru byly vzhledem k získaným zkušenostem vybrány pro další studii Tween a sukcinát.

#### *Pevný lipid – monoacylglycerol*

Vzhledem k tomu, že v literatuře je často uváděno použití glyceryl behenátu (bod tání  $\sim 65$ - $77$  °C [65]) jako pevného lipidu pro přípravu NLC, byly dále testovány systémy s tímto monoacylglycerolem. Jako kapalná složka olejové fáze byl použit vždy jeden z následujících lipidů, a to kyselina olejová (bod tání =  $13,4$  °C [64]), MCT (bod tání  $\sim 10$  °C [64]) nebo jojobový vosk (bod tání  $\sim 7$  °C [66]). Stabilizátorem byl v této části studie Tween o koncentraci 5 hm. %. Takto připravené formulace byly charakterizovány pomocí velikosti částic a PdI. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 11 a distribuce velikosti částic jsou znázorněny na Obrázku 22.

Tabulka 11 Velikost částic a PDI NLC s glyceryl behenátem jako pevným lipidem, stabilizátorem Tween a různými kapalnými lipidy

Kapalný lipid	Velikost částic [nm]	PDI
Jojobový vosk	520±4	0,51±0,04
MCT	709±31	0,44±0,03
Kyselina olejová	127±3	0,28±0,02



Obrázek 22 Distribuce velikosti částic NLC připravených s glyceryl behenátem, Tweenem a různými kapalnými lipidy

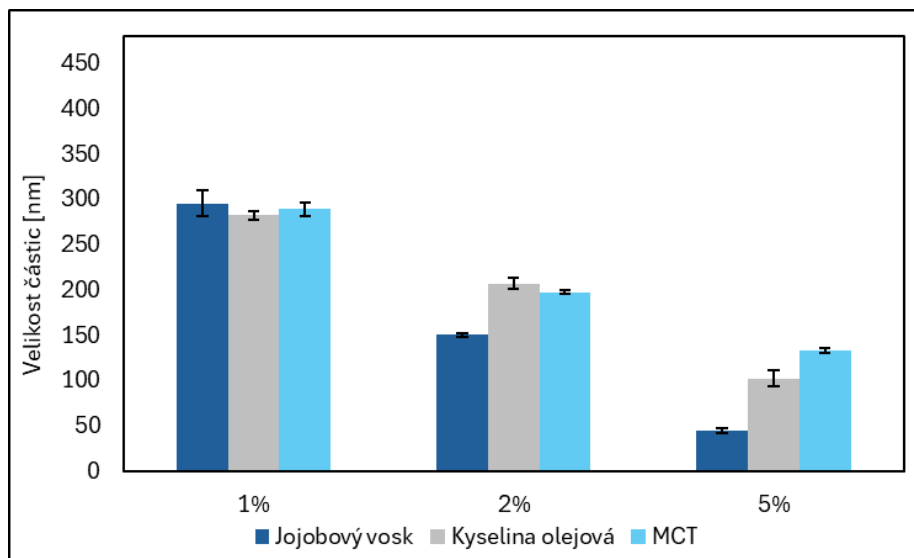
Na základě výsledků uvedených v Tabulce 11 lze konstatovat, že nejmenší velikost částic i nejnižší PDI byly naměřeny u NLC s kyselinou olejovou. Velikost částic byla 127±3 nm a PDI 0,28±0,02. Největší částice pak obsahoval vzorek NLC s MCT, a to 709±31 nm a nejvyšší hodnotu PDI vykazovaly NLC s jojobovým voskem. Distribuce velikosti částic byla v případě NLC s glyceryl behenátem a kyselinou olejovou monomodální, zatímco v případě MCT a jojobového vosku bimodální. Na základě těchto výsledků této dílčí studie se jako perspektivní formulace NLC jeví glyceryl behenát s kyselinou olejovou a stabilizátorem Tween.

V poslední části preformulační studie bylo potřeba zvolit vhodnou koncentraci stabilizátoru Tween vzhledem k výše testovaným typům kapalných lipidů. Formulace byly složeny na základě předchozí studie z pevného lipidu glyceryl behenát, stabilizátoru Tween a byla

testována i formulace, kde byl stabilizátorem sukcinát. Stabilizátory byly použity v koncentracích 1, 2 a 5 %. Vzorčky byly ihned po přípravě charakterizovány měřením velikosti částic a její distribuce, PDI a  $\zeta$ -potenciálu. Výsledky pro NLC stabilizované Tweenem jsou uvedeny v Tabulce 12 a na Obrázku 23 a pro NLC stabilizované sukcinátem v Tabulce 13 a na obrázku 26. Na těchto Obrázcích jsou graficky znázorněny závislosti velikosti částic NLC koncentraci stabilizátoru. Distribuční křivky studovaných formulací jsou pak uvedeny na Obrázcích 24 a 27.

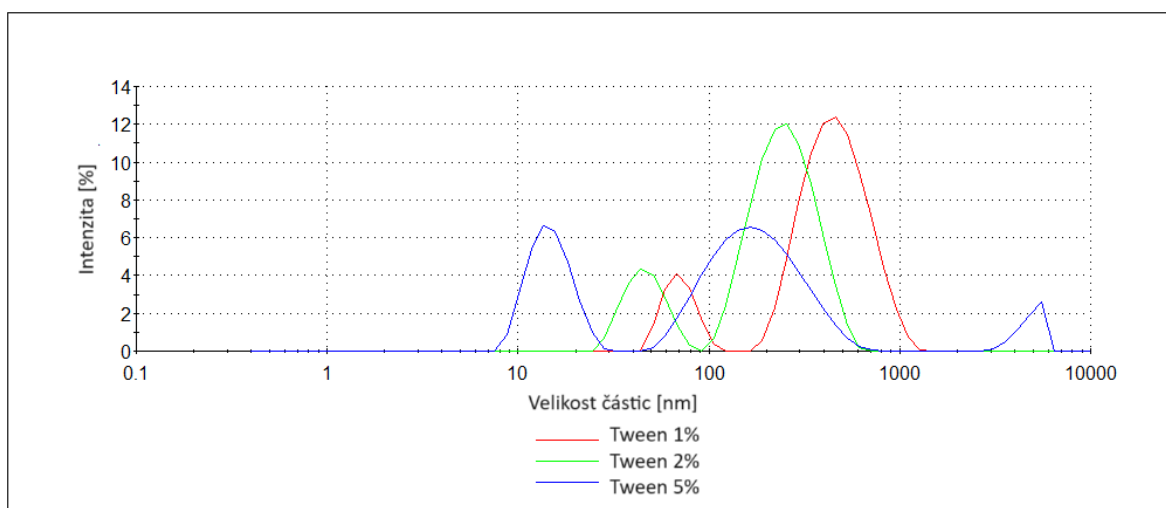
Tabulka 12 Velikost částic, PDI a  $\zeta$ -potenciál NLC připravených s různým kapalným lipidem a stabilizátorem Tween o různé koncentraci

<b>Kapalný lipid</b>	<b>Koncentrace stabilizátoru Tween [%]</b>	<b>Velikost částic [nm]</b>	<b>PDI</b>
Jojobový vosk	1	295±14	0,426±0,016
	2	150±2	0,454±0,009
	5	44±3	0,92±0,04
Kyselina olejová	1	282±5	0,31±0,06
	2	207±6	0,25±0,05
	5	102±8	0,56±0,04
MCT	1	289±8	0,33±0,04
	2	197±2	0,32±0,05
	5	133±2	0,46±0,05



Obrázek 23 Vliv kapalného lipidu a koncentrace stabilizátoru Tween na velikost částic

V Tabulce 12 a na Obrázku 23 lze vidět očekávaný trend, tedy pokles velikosti připravených NLC s rostoucí koncentrací stabilizátoru. Největší pokles velikosti byl zaznamenán u formulací s jojobovým voskem (1 % stabilizátoru poskytlo částice ~ 300 nm, 5 % stabilizátoru pak částice ~ 50 nm). Distribuce velikosti částic formulací s glyceryl behenátem, jojobovým voskem a Tweenem (Obrázek 24) zároveň ukazují, že formulace s Tweenem mají výrazně bimodální charakter a dokumentují i přítomnost NLC s velikostí větší než 5  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 24 Distribuce velikosti částic NLC připravených s různou koncentrací stabilizátoru Tween a jojobovým voskem jako kapalným lipidem



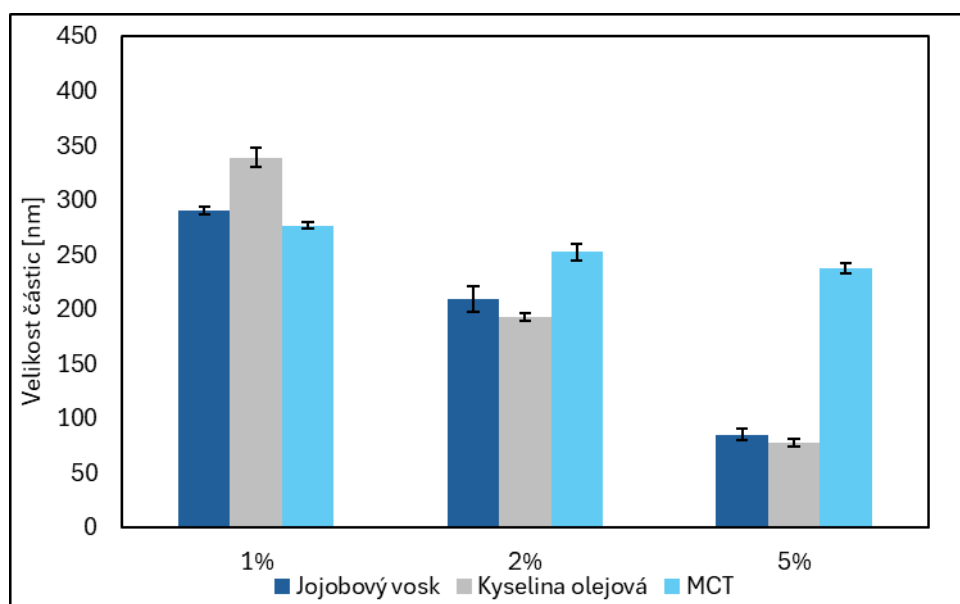


Obrázek 25 NLC připravené se stabilizátorem Tween o koncentraci 5 % (vlevo), 2 % (uprostřed) a 1 % (vpravo)

Na Obrázku 25 je příklad vzhledu vzorků NLC obsahujících glyceryl behenát, kyselinu olejovou a Tween v již zmíněných koncentracích. Tento obrázek potvrzuje trend poklesu velikosti připravených NLC s rostoucí koncentrací stabilizátoru, jelikož vzorek obsahující Tween o koncentraci 5 % je transparentní, zatímco vzorek obsahující 1 % nikoliv. U ostatních vzorků NLC bylo pozorováno obdobné chování bez ohledu na použití kapalný lipid či stabilizátor. Tuto skutečnost potvrzuje např. i publikace [67], ve které autoři zkoumali vliv koncentrace Tweenu 80 (0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 a 1,0 % hm.) na vlastnosti a stabilitu NLC. Výsledky ukázaly, že zvýšení koncentrace Tween způsobilo snížení velikosti částic ( $z$ -průměr) bez významného vlivu na index polydisperzity (PDI).

Tabulka 13 Velikost částic a PDI NLC připravených s různým kapalným lipidem a stabilizátorem sukcinát o různé koncentraci

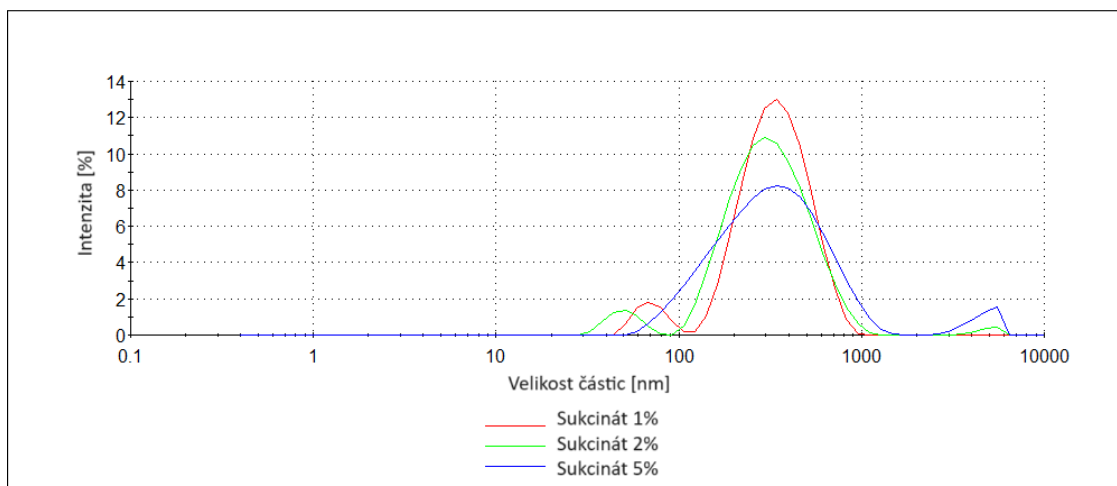
Kapalný lipid	Koncentrace stabilizátoru Sukcinát [%]	Velikost částic [nm]	PdI
Jojobový vosk	1	290±4	0,306±0,011
	2	210±11	0,46±0,04
	5	85±5	0,95±0,05
Kyselina olejová	1	339±9	0,39±0,07
	2	193±4	0,33±0,04
	5	78±4	0,55±0,04
MCT	1	277±3	0,27±0,02
	2	253±8	0,33±0,05
	5	238±5	0,48±0,04



Obrázek 26 Vliv kapalného lipidu a koncentrace stabilizátoru sukcinát na velikost částic

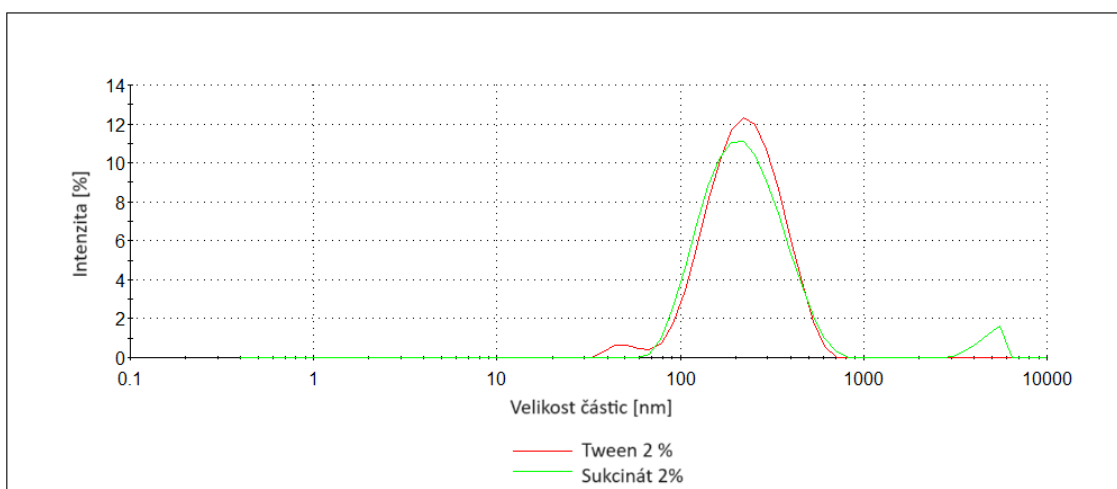
Na základě výsledků v Tabulce 13 není v případě NLC stabilizovaných sukcinátem závislost velikosti částic na koncentraci tak výrazná jako v případě NLC stabilizovaných Tweenem. Jak je patrné z Obrázku 26, u formulací s jojobovým voskem a kyselinou olejovou velikost

částic klesala s rostoucí koncentrací stabilizátoru, avšak u formulací s MCT se velikost částic s koncentrací stabilizátoru výrazně nemění. Distribuce velikosti částic NLC s glyceryl behenátem, MCT a sukcinátem je znázorněna na Obrázku 26. Je zajímavé, že při 5% koncentraci sukcinátu je podobně jako u formulací s Twenem, přítomná i frakce částic s velikostí větší než 5  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 27 Distribuce velikosti částic NLC připravených s různou koncentrací stabilizátoru sukcinát a MCT jako kapalným lipidem

Na základě shrnutí všech výsledků preformulační studie bylo zvoleno konečné složení NLC pro další práci. Jako pevný lipid byl vybrán glyceryl behenát, jako kapalným lipidem kyselina olejová a jako stabilizátor Tween nebo sukcinát o koncentraci 2 %. U těchto formulací byla stanovena velikost částic  $\sim 200$  nm a PdI  $\sim 0,3$ . Distribuce velikosti částic zvolených výsledných formulací jsou monomodální (Obrázek 28).



Obrázek 28 Distribuce velikosti částic NLC – konečná formulace pro další práci o složení: glyceryl behenát, kyselina olejová, stabilizátory Tween nebo sukcinát o koncentraci 2 %

Ve své studii zkoumali Murthy a kol. NLC skládající se z glyceryl behenátu (pevný lipid) a kyseliny olejové (tekutý lipid) ve stejném hmotnostním poměru pevný lipid:kapalný lipid 7:3 se stabilizátorem o koncentraci 5 %. Autoři studie uvádí velikost částic ~ 120 nm a PDI ~ 0,2 [68].

## 8.2 NLC s aktivními látkami

### 8.2.1 Volba aktivní látky

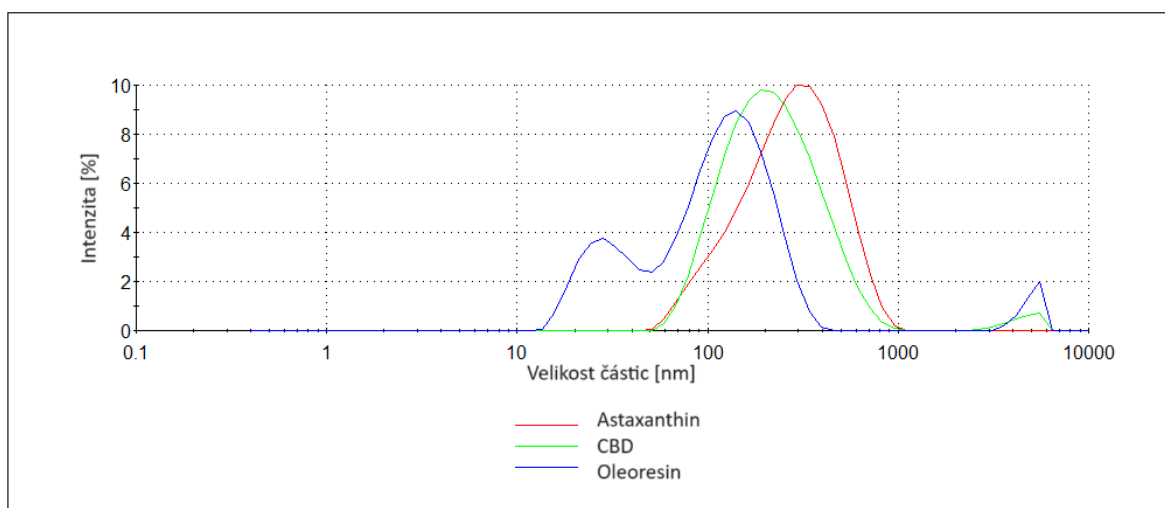
Po volbě složení NLC bez obsahu enkapsulované látky bylo přistoupeno k výběru aktivní látky vhodné pro začlenění do NLC. Byly testovány 3 látky s antioxidačními vlastnostmi, a to AST, CBD a oleoresin, který obsahoval 10 % AST. Vzhled připravených NLC s aktivními látkami lze vidět na Obrázku 29. NLC s aktivní látkou byly charakterizovány ihned po přípravě měřením velikosti částic, PDI a  $\zeta$ -potenciálu. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 14. Distribuce velikosti částic NLC stabilizovaných Tweenem je znázorněna na Obrázku 30 a NLC stabilizovaných sukcinátem na Obrázku 31.



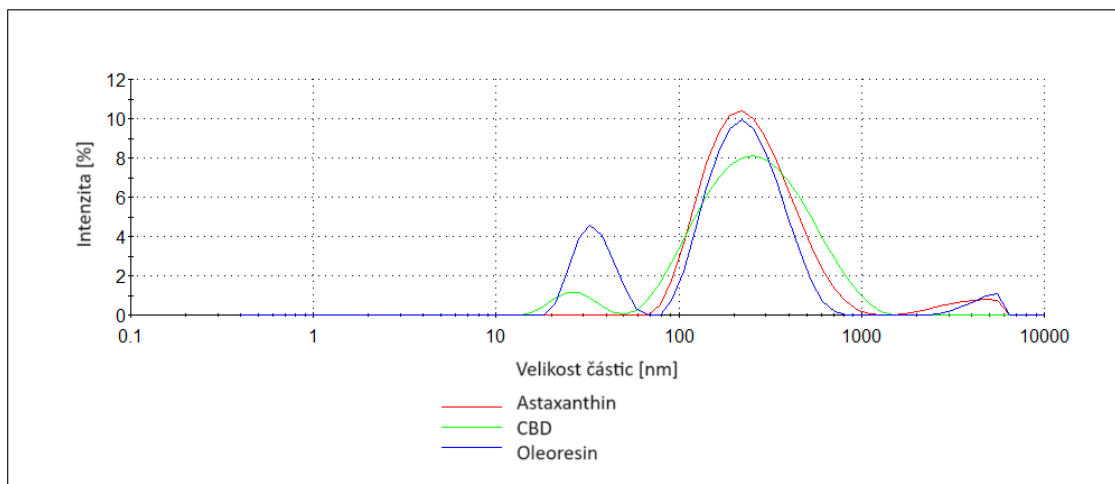
Obrázek 29 NLC s aktivními látkami – AST (vlevo), CBD (uprostřed) a AST oleoresin (vpravo)

Tabulka 14 Velikost částic, PDI a  $\zeta$ -potenciál NLC s různou aktivní látkou a stabilizátorem

Stabilizátor	Aktivní látka	Velikost částic [nm]	PDI	$\zeta$ -potenciál [mV]
Tween	Astaxanthin	230±6	0,22±0,03	-26±0
	CBD	202±3	0,29±0,06	-26±1
	Oleoresin	82±4	0,48±0,05	-25±1
Sukcinát	Astaxanthin	221±4	0,28±0,04	-20±1
	CBD	171±7	0,47±0,04	-27±1
	Oleoresin	121±6	0,58±0,05	-23±1



Obrázek 30 Distribuce velikosti částic NLC stabilizovaných Tweenem s aktivními látkami AST, CBD a oleoresin s 10 % AST

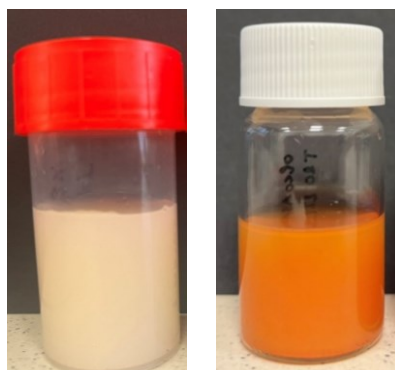


Obrázek 31 Distribuce velikosti částic NLC stabilizovaných sukcinátem s aktivními látkami AST, CBD a oleoresin s 10 % AST

Z Tabulky 14 je patrné, že bez ohledu na stabilizátor byly nejmenší částice pozorovány u NLC s AST oleoresinem a největší částice u NLC s AST. Velikost částic prázdných NLC byla v případě formulace stabilizované Tweenem  $207 \pm 6$  nm a sukcinátem  $193 \pm 4$  nm. Na základě srovnání velikosti částic NLC s aktivní látkou a prázdných NLC u formulací s AST a stabilizátorem Tween vzrostla velikost částic na  $230 \pm 6$  nm a se stabilizátorem sukcinát na  $221 \pm 4$  nm. V případě aktivní látky CBD došlo k poklesu velikosti částic na  $202 \pm 3$  nm u NLC se stabilizátorem Tween a na  $171 \pm 7$  nm u NLC se stabilizátorem sukcinát. U NLC s aktivní látkou AST oleoresin došlo k poklesu velikosti částic na  $83 \pm 4$  nm v případě NLC stabilizovaných Tweenem a na  $121 \pm 6$  nm u NLC stabilizovaných sukcinátem. Ve všech případech byla tato změna signifikantní.

Praktická příprava vzorků s obsahem AST byla komplikována jeho horší rozpustností v kyselině olejové. Další komplikací bylo, že během dialýzy došlo, i přes přítomnost antioxidantu askorbyl palmitátu, u vzorků NLC s AST a NLC s AST oleoresinem (u obou byl stabilizátorem Tween) k degradaci, která se projevila změnou barvy disperze. V případě vzorku NLC s AST došlo ke změně barvy z červené na světle oranžovou a v případě vzorku NLC obsahujícího AST oleoresin z červené na oranžovou (Obrázek 32). Rovněž literatura uvádí, že nevýhodou AST je jeho nestabilita. Vzhledem k vysoce konjugované struktuře a nenasycenému charakteru AST snadno degraduje, zejména pokud je izolován od své původní matrice [43], [69]. Jako karotenoid je AST citlivý na světlo, které působí jeho excitaci. Reakcí excitovaného AST s rozpouštědly pak vznikají volné radikály, které v závislosti na podmínkách způsobí pomalou nebo rychlou degradaci. Kromě toho je pro AST

běžná také tepelná degradace. Mezi stupněm degradace AST a změnou barvy existuje dobrá korelace [70]. U vzorků NLC stabilizovaných sukcinátem ke změně barvy nedošlo.



Obrázek 32 Degradace vzorků NLC obsahujících AST (vlevo) a oleoresin s AST (vpravo) stabilizovaných Tweenem

U vzorků s CBD degradace pozorována nebyla, i když CBD je aktivní látkou, která rovněž nevykazuje dobrou stabilitu. Například Mazzetti a kol. publikovali ve své práci [71], že degradace CBD závisí na teplotě, světle a autooxidaci. Ve své práci zkoumali devět komerčně dostupných CBD E-liquidů a zjistili, že při vystavení světlu a pokojové teplotě dochází během 30 dnů k 13% degradaci. U vzorků skladovaných ve tmě a při pokojové teplotě však došlo pouze k 4% degradaci, což naznačuje, že k degradaci významně přispívá světlo.

Vzhledem k barevné změně vzorků NLC s AST naznačující jeho degradaci a z důvodu lepší stability aktivní látky CBD, jakož i na základě výsledků z charakterizace připravených vzorků (Tabulka 14) byl pro další práci vybrán jako aktivní látka k zapouzdření do NLC CBD.

V další části studie byl testován vliv množství aktivní látky CBD na vlastnosti připravených částic. Při výběru vhodné aktivní látky (viz předchozí kapitola) byla studie provedena s navázkou 25 mg CBD a nyní bylo otestováno její snížení na 10 mg. Byly připraveny dvě formulace NLC s CBD a stabilizátory Tween nebo sukcinát. Vzorky byly ihned po přípravě charakterizovány změřením velikosti částic, PdI a  $\zeta$ -potenciálu a výsledky jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15 Velikost částic, PDI a  $\zeta$ -potenciál NLC s různým stabilizátorem a různou koncentrací CBD

Stabilizátor	Navážka CBD [mg]	Velikost částic [d.nm]	PDI	$\zeta$ -potenciál [mV]
Tween	10	174±5	0,28±0,01	-24±1
	25	178±1	0,40±0,07	-25±2
Sukcinát	10	147±4	0,46±0,03	-22±1
	25	134±1	0,54±0,02	-28±0,4

Na základě výsledků uvedených v Tabulce 15 lze konstatovat, že velikost NLC s obsahem 10 i 25 mg CBD se lišila jen nepatrně, a proto bylo rozhodnuto, že konečná formulace NLC bude obsahovat vyšší navážku aktivní látky CBD, tedy 25 mg.

### 8.2.2 Dialýza

Vzhledem k zamýšlenému použití v biomateriálech a kosmetice, které předpokládají biologické testování připravených vzorků, byla pro účely dalšího testování provedena dialýza vyrobených disperzí. Dialyzované vzorky byly charakterizovány změřením velikosti částic, PDI a  $\zeta$ -potenciálu před provedením dialýzy a následně po ní. Výsledky měření vzorků před dialýzou a po dialýze jsou uvedeny v Tabulce 16.

Tabulka 16 Velikost částic, PDI a  $\zeta$ -potenciál NLC s aktivní látkou CBD před dialýzou a po dialýze

Stabilizátor	Velikost částic [nm]		PDI		$\zeta$ -potenciál [mV]	
	Před dialýzou	Po dialýze	Před dialýzou	Po dialýze	Před dialýzou	Po dialýze
Tween	202±3	178±1	0,29±0,06	0,40±0,07	-26±1	-25±2
Sukcinát	171±7	134±1	0,47±0,04	0,54±0,02	-27±1	-29±1

Po porovnání dat z Tabulky 16 lze konstatovat, že vlivem dialýzy došlo v případě NLC stabilizovaných Tweenem s CBD k poklesu velikosti částic z 202±3 nm na 179±1 nm a v případě NLC stabilizovaných sukcinátem s CBD se zmenšila velikost částic z původních 171±7 nm na 133±1 nm. Výsledky testování vlivu dialýzy na velikost částic naznačují,



že výraznější vliv na velikost částic byl pozorován u NLC stabilizovaných Tweenem než u NLC stabilizovaných sukcinátem. Co se týká šířky distribuce vyjádřené pomocí hodnoty PdI, NLC obsahující CBD a Tween vykazovaly PdI  $\sim 0,4$ , zatímco distribuce vzorků NLC s CBD stabilizovaných sukcinátem byla širší s hodnotou PdI  $\sim 0,54$ .

Kromě velikosti částic byly NLC s CBD charakterizovány rovněž pomocí PdI a  $\zeta$ -potenciálu. Na základě hodnot  $\zeta$ -potenciálu lze odvodit stabilitu částic. Obvykle je jako hranice stability uváděna hodnota  $\zeta$ -potenciálu  $\pm 30$  mV, přičemž absolutní hodnota vyšší než 30 mV označuje stabilní stav, zatímco hodnota  $\zeta$ -potenciálu nižší než 30 mV indikuje stav směřující k agregaci, nestabilitě, flokulaci nebo koagulaci [72]. U formulace NLC obsahující CBD a stabilizátor Tween byl  $\zeta$ -potenciál naměřen  $-25 \pm 2$  mV a u formulace NLC s CBD stabilizované sukcinátem  $-28 \pm 0,4$  mV. Hodnoty  $\zeta$ -potenciálu formulací NLC s CBD stabilizovaných Tweenem a zejména sukcinátem se hodnotě  $-30$  mV blíží, a tudíž lze předpokládat, že systémy by mohly vykazovat dobrou koloidní stabilitu.

### 8.2.3 Stanovení tepelných vlastností

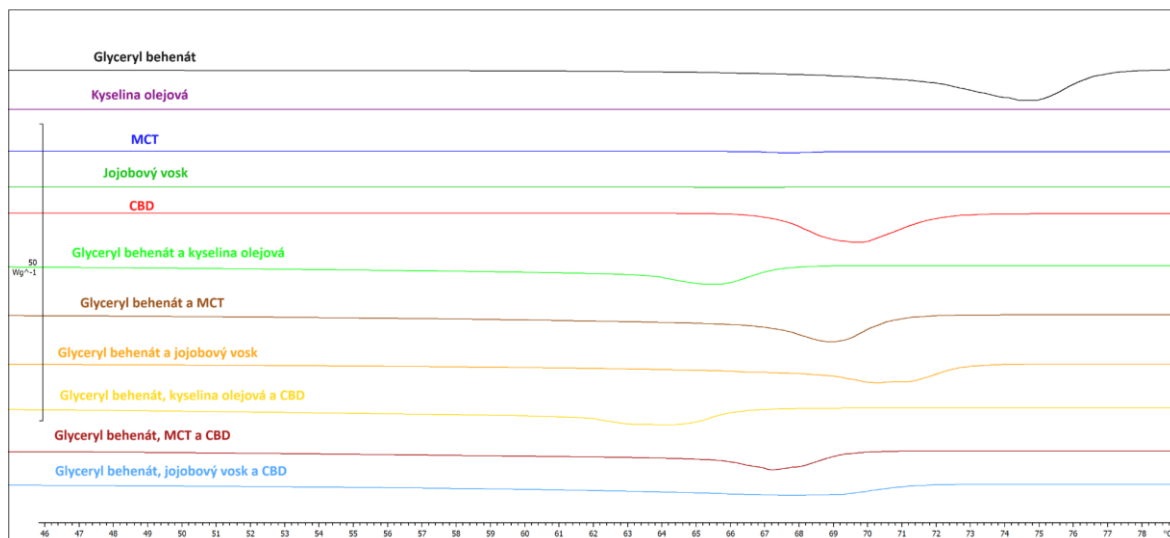
Vzhledem k tomu, že pro vytvoření lipidových částic musí být teplota fázové přechodu lipidů vyšší, než je teplota pokojová, byly pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) sledovány tepelné vlastnosti studovaných systémů. Termická analýza byla provedena u výchozích látek (glyceryl behenát, kyselina olejová, CBD), směsí lipidů, směsí lipidů s aktivní látkou CBD a NLC disperzí s enkapsulovaným CBD, které byly stabilizovány Tweenem nebo sukcinátem. Před DSC analýzou byly vzorky disperzí podrobeny dialýze. Podmínky tepelného cyklu jsou popsány v kapitole 7.3.3. Výsledky po prvním ohřevu (entalpie tání  $\Delta H$ ,  $T_{\text{onset}}$ ,  $T_{\text{pik}}$  a  $T_{\text{endset}}$ ) jsou uvedeny v Tabulce 17. Pro srovnání jsou v Tabulce 18 uvedeny stejné údaje pro lipidové systémy, kde jsou použité i další, dříve testované kapalné lipidy, MCT a jojobový vosk. Na Obrázku 33 jsou pak znázorněny kalorimetrické křivky výchozích látek a jejich směsí při prvním ohřevu.

Tabulka 17 Výsledky termické analýzy čistých látek a jejich směsí při prvním ohřevu od 25 do 80 °C. Systémy, kde kapalným lipidem je kyselina olejová

Vzorek		$\Delta H$ [Jg <sup>-1</sup> ]	T <sub>onset</sub> [°C]	T <sub>pík</sub> [°C]	T <sub>endset</sub> [°C]
Glyceryl behenát		-150,8	70,3	74,7	76,9
Kyselina olejová (kapalný lipid)		—	—	—	—
Glyceryl behenát a kyselina olejová		-139,2	62,1	65,5	67,6
CBD		-93	67,1	69,7	72,2
Glyceryl behenát, kyselina olejová a CBD		-142	60,1	63,9	66,4
NLC	Glyceryl behenát, kyselina olejová, CBD, Tween	-0,3*	59	65	67,2
	Glyceryl behenát, kyselina olejová, CBD, sukcinát	-0,9*	61	66	69,1

Tabulka 18 Tabulka 18 Výsledky termické analýzy čistých látek a jejich směsí při prvním ohřevu od 25 do 80 °C. Systémy, kde kapalnými lipidy jsou MCT a jojobový vosk

Vzorek		$\Delta H$ [Jg <sup>-1</sup> ]	T <sub>onset</sub> [°C]	T <sub>pík</sub> [°C]	T <sub>endset</sub> [°C]
Glyceryl behenát		-150,8	70,3	74,7	76,9
MCT (kapalný lipid)		—	—	—	—
Glyceryl behenát a MCT		-164,1	66,2	68,9	71
Glyceryl behenát, MCT a CBD		-126,1	64,2	67,2	69,5
Jojobový vosk (kapalný lipid)		—	—	—	—
Glyceryl behenát a jojobový vosk		-138,5	67,1	70,3	73
Glyceryl behenát, jojobový vosk a CBD		-131,6	58,4	67,9	71,4



Obrázek 33 Kalorimetrické křivky výchozích látek a jejich směsí při prvním ohřevu od 25 do 80 °C

Na základě výsledků uvedených v Tabulce 17 a v Tabulce 18 lze konstatovat, že přidáním kapalného lipidu ke glyceryl behenátu došlo ke snížení bodu tání z  $\sim 75$  °C na  $\sim 66$  °C v případě použití kyseliny olejové, na  $\sim 69$  °C při použití MCT a nejmenší pokles bodu tání byl zaznamenán v případě jojobového vosku na  $\sim 70$  °C. Přidáním aktivní látky CBD do směsi došlo opět k poklesu bodu tání, který ovšem nebyl tak signifikantní jako v případě směsi tuhého a kapalného lipidu bez aktivní látky. Bod tání pro NLC, kde byla kapalným lipidem kyselina olejová s enkapsulovaným CBD a stabilizátorem Tween byl  $\sim 65$  °C a v případě stejného systému se stabilizátorem sukcinátem byl bod tání  $\sim 66$  °C. Body tání všech zkoumaných směsí lipidů, směsí lipidů s aktivní látkou i disperzí NLC se příliš neliší, jelikož v jejich složení je největší podíl tuhého lipidu glyceryl behenátu, který kontroluje tepelné vlastnosti celého systému.

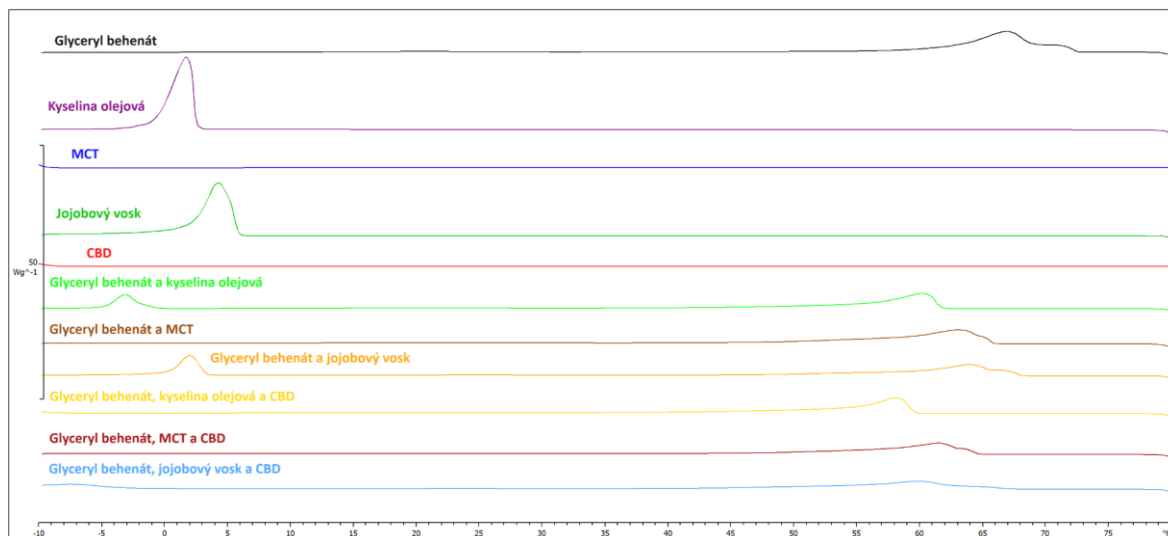
Výsledky termické analýzy zaznamenané při prvním chlazení studovaných systémů jsou uvedeny v Tabulce 19 a příslušné kalorimetrické křivky na Obrázku 34.

Tabulka 19 Výsledky termické analýzy výchozích látek a jejich směsí při prvním chlazení od 80 do  $-10$  °C. Systémy, kde kapalným lipidem je kyselina olejová

Vzorek		$\Delta H$ [Jg <sup>-1</sup> ]	T <sub>onset</sub> [°C]	T <sub>pík</sub> [°C]	T <sub>endset</sub> [°C]
Glyceryl behenát		7,8	28,4	20,4	9,6
		158,1	69,7	66,9	61,9
Kyselina olejová		183,1	2,6	1,6	-0,9
Glyceryl behenát, kyselina olejová		35,8	-1,5	-3,3	-4,9
		110,8	61,8	60,3	55,1
CBD		—	—	—	—
Glyceryl behenát, kyselina olejová, CBD		112,3	59,7	58,1	53,8
NLC	Glyceryl behenát, kyselina olejová, CBD, Tween	0,45	49	46,4	41,3
	Glyceryl behenát, kyselina olejová, CBD, sukcinát	0,45	48	45,7	41,2

Tabulka 20 Výsledky termické analýzy výchozích látek a jejich směsí při prvním chlazení od 80 do  $-10$  °C. Systémy, kde kapalnými lipidy jsou MCT a jojobový vosk

Vzorek		$\Delta H$ [Jg <sup>-1</sup> ]	T <sub>onset</sub> [°C]	T <sub>pík</sub> [°C]	T <sub>endset</sub> [°C]
MCT		—	—	—	—
Glyceryl behenát, MCT		4,5	32,2	25,1	13,8
		132,3	66,1	63	56,6
Glyceryl behenát, MCT a CBD		105,6	64,8	61,5	55,1
Jojobový vosk		185	6	4,2	1,9
Glyceryl behenát, jojobový vosk		185,01	5,95	4,23	1,83
		110,44	68,16	64,03	58,28
Glyceryl behenát, jojobový vosk a CBD		0,54	1,56	0,57	-0,51
		97,51	63,88	59,93	52,77



Obrázek 34 Kalorimetrické křivky výchozích látek a jejich směsí při prvním chlazení od 80 do  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$

Z Tabulek 19 a 20 je patrné, že přidáním kapalného lipidu ke glyceryl behenátu došlo ke snížení bodu tuhnutí z  $\sim 67\text{ }^{\circ}\text{C}$  na  $\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  v případě přidavku kyseliny olejové, na  $\sim 63\text{ }^{\circ}\text{C}$  v případě použití MCT a na  $\sim 64\text{ }^{\circ}\text{C}$  při použití jojobového vosku. Přidáním aktivní látky CBD do směsi pevného a kapalného lipidu došlo obdobně jako v případě bodu tání k dalšímu poklesu bodu tuhnutí, který ovšem již nebyl tak výrazný jako v případě přidání pouze kapalného lipidu. Body tuhnutí obou disperzí NLC s enkapsulovaným CBD, které byly stabilizovány buď Tweenem, nebo sukcinátem byl  $\sim 46\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Obecně lze konstatovat, že největší vliv na tepelné vlastnosti má tuhý lipid, kterého je ve směsích největší podíl. Dále lze říci, že z kapalných lipidů měla největší vliv na tepelné vlastnosti přítomnost kyseliny olejové, zatímco jojobový vosk ovlivňoval tepelné vlastnosti nejméně.

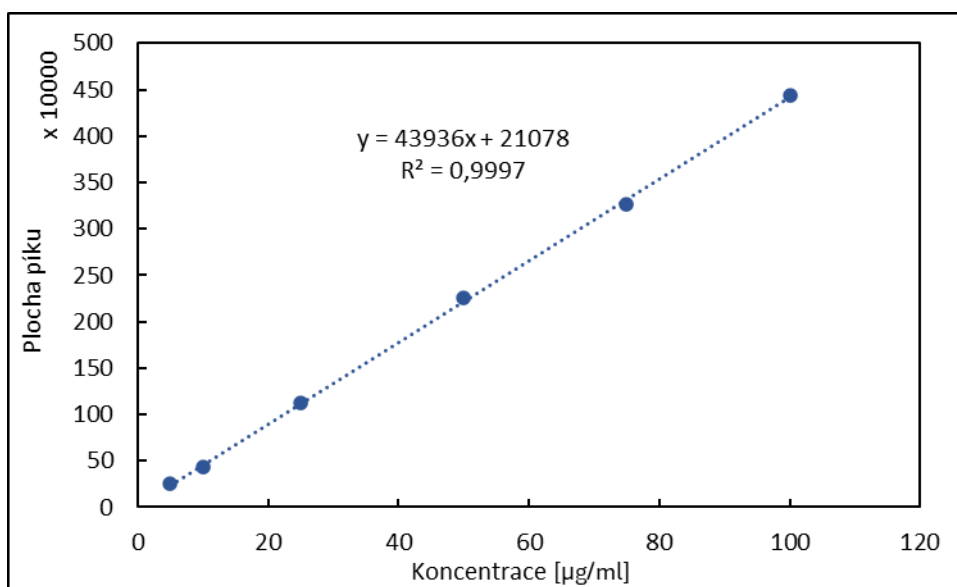
Stanovení tepelných vlastností glyceryl behenátu a NLC s glyceryl behenátem jako tuhým lipidem rovněž prováděli Youshia a kol. Hodnoty a hodnoty uvedené v této studii se významně nelišily [73].

#### 8.2.4 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost (EE) připravených formulací NLC byla vyhodnocena stanovením koncentrace CBD v jednotlivých extraktech NLC připravených podle postupu uvedeného v kapitole 7.3.4 pomocí HPLC. Byl taktéž proveden test správnosti extrakčního postupu, kdy byly z jednoho vzorku připraveny totožným způsobem 3 extrakty, které byly analyzovány

na přítomnost CBD pomocí HPLC. Výsledná průměrná koncentrace CBD v těchto 3 extraktech činila  $44,5 \pm 0,4$   $\mu\text{g/ml}$ . Na základě výsledků tohoto testu lze konstatovat, že opakovatelnost zvoleného extrakčního postupu byla dobrá.

Pro stanovení CBD byla nejprve na HPLC proměřena koncentrační řada standardů CBD v ethanolu (koncentrační rozsah 5 až 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Na základě závislosti plochy píku na koncentraci CBD v extraktech byla sestrojena kalibrační přímka (Obrázek 35), která byla následně využita pro stanovení koncentrace ( $C_s$ ) CBD ve formulacích NLC, jejíž hodnota byla následně použita pro výpočet EE podle Rovnice 1. Teoretická koncentrace CBD v NLC disperzi byla vypočtena jako 41,67  $\mu\text{g/ml}$ . Výsledky EE formulací NLC s CBD stabilizovaných Tweenem nebo sukcinátem jsou uvedeny v Tabulce 20.



Obrázek 35 Kalibrační přímka CBD v ethanolu stanovená pomocí HPLC

Tabulka 21 Průměrné hodnoty enkapsulační účinnosti vzorků NLC s obsahem CBD

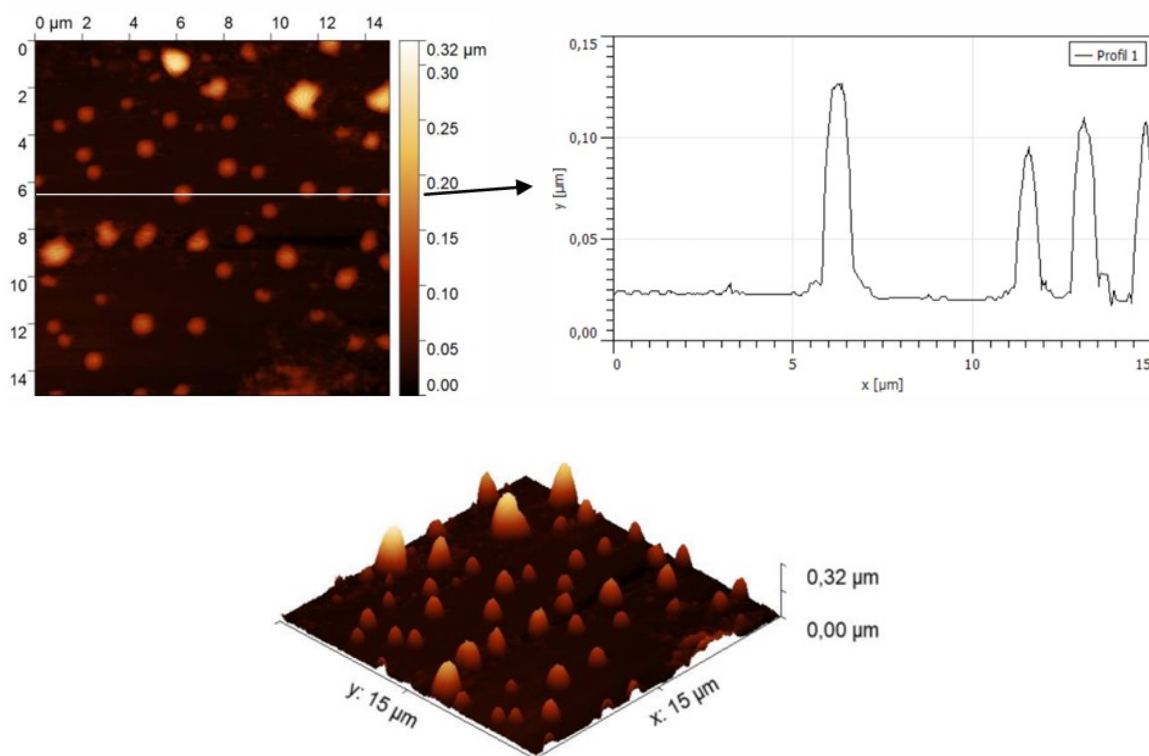
Formulace	$C_s$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	EE [%]
NLC s CBD a Tweenem	$35 \pm 2$	$84 \pm 5$
NLC s CBD a sukcinátem	$40 \pm 1$	$97 \pm 3$

Na základě výsledků EE uvedených v Tabulce 21 lze konstatovat, že NLC s CBD stabilizované Tweenem i sukcinátem vykazovaly vysoké hodnoty EE. Vyšší hodnota EE byla pozorována u formulace stabilizované sukcinátem, která byla velmi vysoká a to  $\sim 97$  %.

NLC s enkapsulovaným CBD se ve svých studiích zabývali Morakul a kol. a Matarazzo a kol. V obou studiích jsou autory rovněž uváděny velmi vysoké hodnoty EE [3], [49].

### 8.2.5 Mikroskopie atomárních sil

Stanovení morfologie pomocí AFM bylo provedeno u vybraného vzorku NLC s enkapsulovaným CBD stabilizovaný sukcinátem. Výsledky stanovení jsou uvedeny na Obrázku 36.



Obrázek 36 2D rekonstrukce a profilový řez 3D snímkem NLC s CBD a stabilizátorem sukcinát (nahore) a 2D rekonstrukce vzorku NLC s CBD a stabilizátorem sukcinát (dole)

Stanovení vzorku NLC s CBD a stabilizátorem sukcinát pomocí AFM nebylo zcela jednoduché, jelikož se lipidové částice pravděpodobně pohybovaly společně s pohybem sondy. Může to být způsobeno tím, že jsou více měkké nebo více elastické. Velikost částic se podařilo stanovit na  $\sim 0,5$  až  $2,5 \mu\text{m}$ .

### 8.2.6 Stanovení stability

Stabilita formulací NLC s CBD stabilizovaných Tweenem nebo sukcinátem byla stanovena měřením velikosti částic,  $\zeta$ -potenciálu a koncentrace CBD pomocí HPLC ihned po přípravě a poté v sedmidenních intervalech po dobu 4 týdnů. Vzorky byly skladovány

při chladničkové teplotě. Výsledky měření pro NLC obsahující CBD a Tween jsou uvedeny v Tabulce 22 a pro formulaci NLC stabilizovanou sukcinátem v Tabulce 23. Výsledky stanovení stability měřením velikosti částic formulací NLC jsou graficky znázorněny na Obrázku 37. Distribuce velikosti částic formulace NLC obsahujícího CBD a Tween je znázorněna na Obrázku 38 a formulace NLC s CBD stabilizované sukcinátem na Obrázku 39. Distribuce velikosti částic je měřena ihned po přípravě, poté po 2 týdnech a na závěr po 4 týdnech.

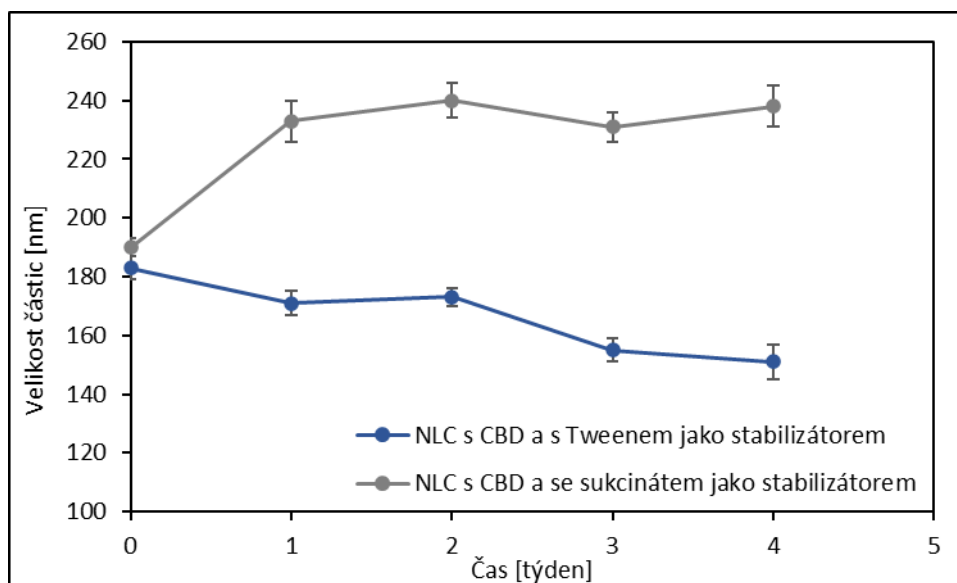
Tabulka 22 Výsledky stanovení stability vzorku NLC obsahujícího CBD a Tween

Čas od přípravy [týdny]	Velikost částic [nm]	PdI	ζ-potenciál [mV]	Koncentrace [μg/ml]
0	183±4	0,43±0,04	-27±1	35±2,0
1	171±4	0,45±0,04	-25,1±0,6	36,4±1,9
2	173±3	0,47±0,05	-24,1±0,8	37,6±0,9
3	155±4	0,49±0,02	-26,4±1,1	36,5±0,8
4	151±6	0,47±0,04	-26,1±1,1	39,1±1,5

Tabulka 23 Výsledky stanovení stability vzorku NLC obsahujícího CBD a sukcinát

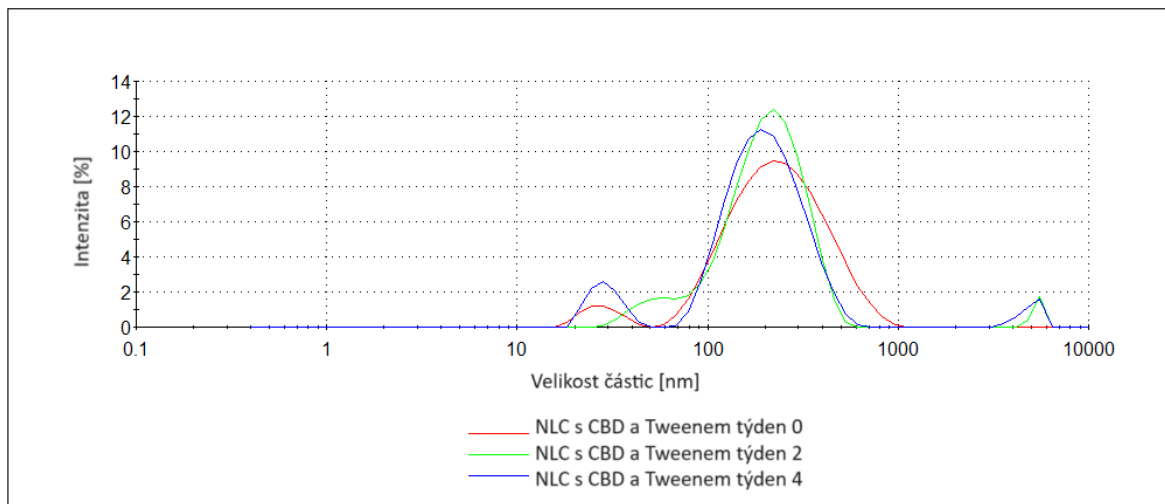
Čas od přípravy [týdny]	Velikost částic [nm]	PdI	ζ-potenciál [mV]	Koncentrace [μg/ml]
0	190±3	0,38±0,04	-25,3±0,6	40±1,0
1	233±7	0,35±0,04	-21,7±0,9	42±4,0
2	240±6	0,38±0,04	-21,4±0,9	42,0±0,5
3	231±5	0,46±0,05	-23,9±0,8	40,3±0,2
4	238±7	0,44±0,04	-24,3±0,4	44,5±0,4



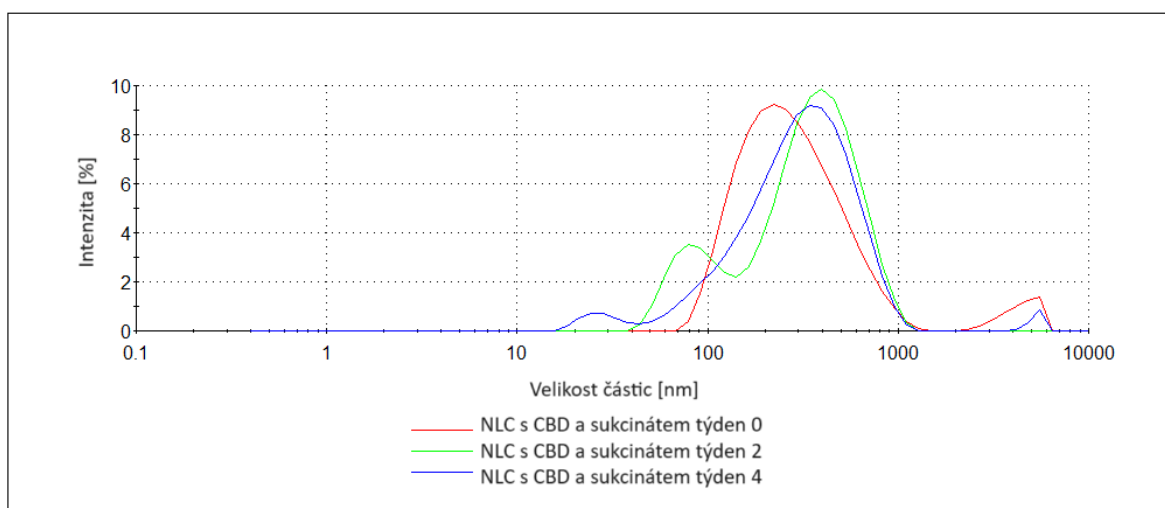


Obrázek 37 Stanovení stability vzorků NLC s CBD měřením velikosti částic

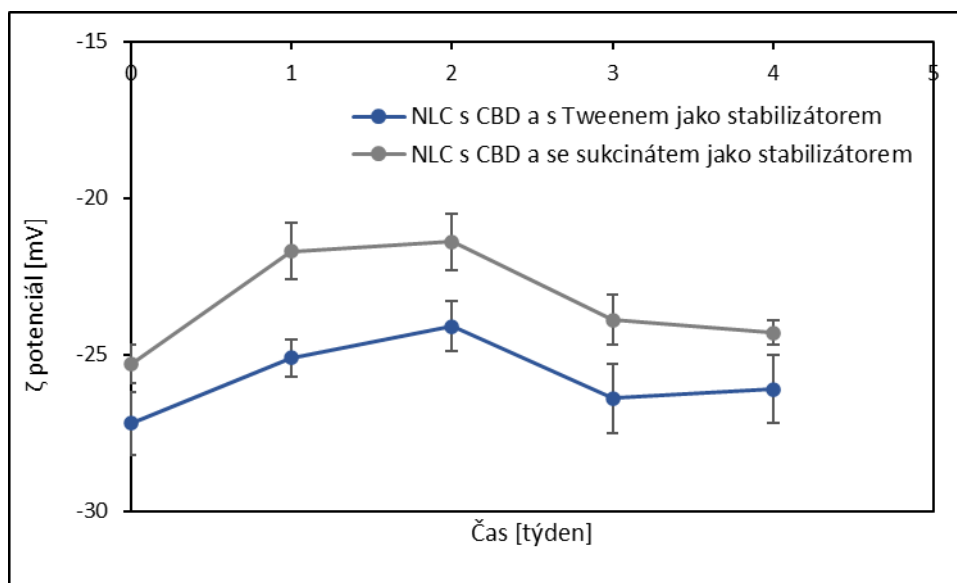
Na základě naměřených hodnot uvedených v Tabulce 22 lze konstatovat, že velikost částic formulace NLC obsahující CBD a stabilizátor Tween byla ihned po přípravě ~ 183 nm. Z Tabulek 22 a 23 a Obrázku 37 je patrné, že za týden od přípravy velikost částic klesla na ~ 171 nm a po dobu dalšího týdne zůstala konstantní. Po třech týdnech od přípravy velikost částic opět klesla na ~ 155 nm a následující týden se velikost částic již výrazně nezměnila. Velikost částic ve sledovaném čtyřtýdenním období poklesla na 82,5 % původní velikosti stanovené ihned po přípravě NLC. V případě formulace NLC s CBD stabilizované sukcinátem byla velikost částic ihned po přípravě ~ 190 nm, následující týden vzrostla na ~ 233 nm a po dobu dalších 3 týdnů již nedošlo k žádné výrazné změně velikosti částic. Částice po 4 týdnech skladování vzrostly na 128 % své původní velikosti. Obecně lze konstatovat, že velikost částic NLC s CBD stabilizovaných Tweenem v době pozorování klesala, zatímco v případě NLC s CBD a stabilizátorem sukcinát týden po přípravě vzrostla a poté již byla konstantní. Změnám velikosti částic v čase odpovídají i distribuční křivky velikosti částic obou vzorků, které jsou znázorněny na Obrázku 38 pro NLC s CBD a stabilizátorem Tween a na Obrázku 39 pro NLC obsahující CBD a stabilizátor sukcinát.



Obrázek 38 Distribuce velikosti částic formulace NLC s CBD a Tweenem měřená ihned po přípravě, po 2 týdnech a po 4 týdnech

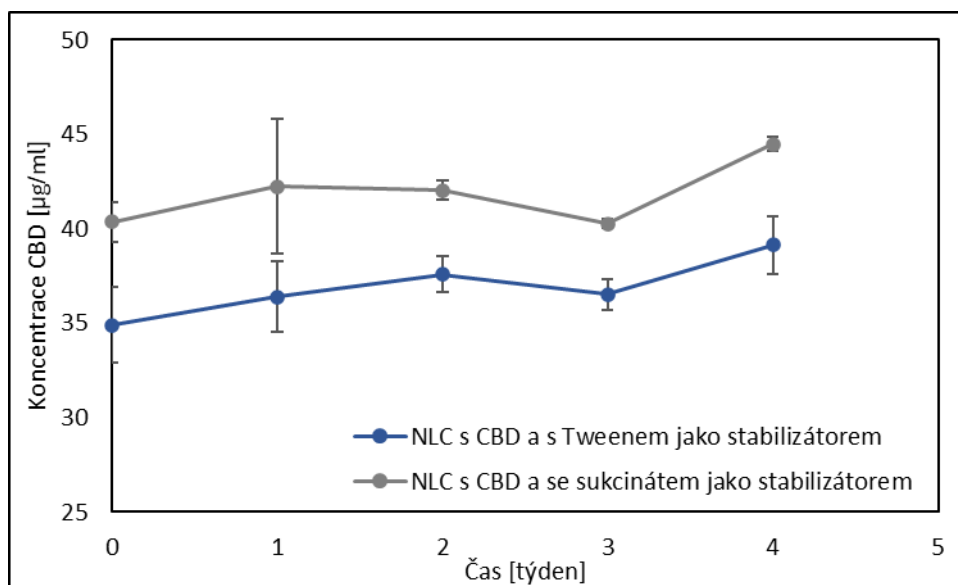


Obrázek 39 Distribuce velikosti částic formulace NLC s CBD a sukcinátem měřená ihned po přípravě, po 2 týdnech a po 4 týdnech



Obrázek 40 Stanovení stability vzorků NLC s CBD měřením  $\zeta$ -potenciálu

Jak již bylo zmíněno výše, na základě hodnoty  $\zeta$ -potenciálu lze odvodit stabilitu částic. U vzorku NLC s CBD a stabilizátorem Tween byl naměřen  $\zeta$ -potenciál (Obrázek 40) ihned po přípravě  $\sim -27$  mV. Po týdnu skladování byla jeho hodnota  $\sim -25$  mV a po dvou týdnech  $\sim -24$  mV. Po třech týdnech klesl na hodnotu  $\sim -26$  mV a do konce pozorování se již nezměnil. V případě formulace NLC obsahující CBD a stabilizátor sukcinát byl naměřen  $\zeta$ -potenciál ihned po přípravě  $\sim -25$  mV a po mírném vzrůstu jeho hodnoty po 1. a 2. týdnu skladování se hodnota  $\zeta$ -potenciálu ustálila na  $\sim -24$  mV. Obecně lze konstatovat, že  $\zeta$ -potenciál kolísá, ale k výrazným změnám nedochází. V této souvislosti je potřeba rovněž poznamenat, že měření  $\zeta$ -potenciálu má ve srovnání s jinými technikami relativně velkou chybu. Přesnost měření je v nejlepším případě  $\pm 2$  mV nebo  $\pm 10$  %, což znamená, že drobné změny v  $\zeta$ -potenciálu by neměly být přehnaně interpretovány [74]. Jelikož nebyly očekávány výrazné změny formulací během sledované doby skladování, bylo popsáno chování disperzí a hodnot jejich  $\zeta$ -potenciálu očekáváno. Hodnoty  $\zeta$ -potenciálu by mohly být ovlivněny např. změnou pH, která by mohla nastat degradací.



Obrázek 41 Stanovení stability vzorků NLC s CBD měřením koncentrace CBD pomocí HPLC

Stabilita formulací NLC s CBD a stabilizátory Tween nebo sukcinát byla taktéž stanovena měřením časových změn koncentrace CBD v extraktech z NLC disperzí pomocí HPLC. Z Obrázku 41 je patrné, že v případě obou formulací docházelo během skladování k mírnému růstu koncentrace CBD. Vzhledem k velmi nízké rozpustnosti CBD ve vodě (12,6 mg/l) a jeho vysoké lipofilitě [75] je nárůst koncentrace CBD v čase velice nepravděpodobný. Proto se lze domnívat, že chyba ve stanovení mohla nastat např. při odběru vzorku pro extrakci, či při samotné extrakční proceduře. V tomto ohledu je potřeba v následující práci věnovat více pozornosti validaci použitého extrakčního postupu.

### 8.3 Pickeringovy emulze a jejich charakterizace

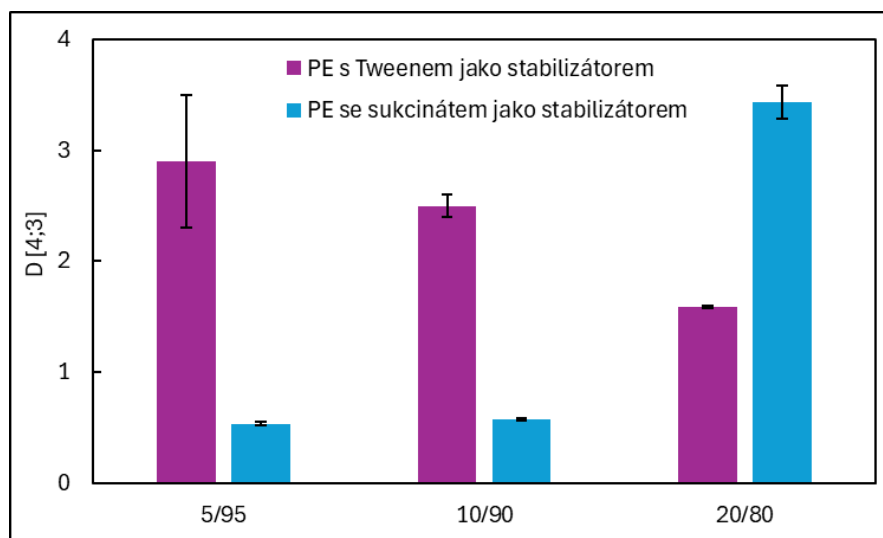
Pro přípravu Pickeringových emulzí (PE) byly použity přímo vodné disperze lipidových nanočástic s enkapsulovaným CBD (stabilizované Tweenem nebo sukcinátem), které tvořily vodnou fázi (VF). Jako olejová fáze (OF) byl použit oleoresin s 10% obsahem AST. Při přípravě PE byl nejprve k NLC s enkapsulovaným CBD přidáván přímo AST oleoresin. Tento postup se ukázal jako nevhodný, jelikož ve výsledných PE zůstávalo mnoho volného oleje. Následně byl postup modifikován tak, že OF byla připravena disperzí 100 nebo 200 mg AST oleoresinu v 5 ml MCT (viz postup uvedený v kapitole 7.4). Použití takto připravené OF vedlo k výraznému zlepšení emulgačního procesu a u PE mohl být testován vliv množství oleje na enkapsulaci AST. Vzorky PE byly připraveny ve třech hmotnostních poměrech olej/voda (O/V) 5/95, 10/90 a 20/80.

### 8.3.1 Velikost emulzních kapek PE

Pickeringovy emulze byly charakterizovány měřením velikosti emulzních kapek a její distribucí pomocí přístroje Mastersizer 3000 pracujícího na principu laserové difrakce. Tento přístroj je (na rozdíl od DLS) schopen spolehlivě měřit i kapky s mikrometrovou velikostí. Výsledky velikosti kapek PE jsou vyjádřeny jako D [4;3], což je průměr velikosti kapek vztahující se k jejich objemu. Stanovené hodnoty velikosti jsou uvedeny v Tabulce 24 pro PE obsahující 100 mg AST oleoresinu a v Tabulce 25 pro PE obsahující 200 mg AST oleoresinu. Hodnota Span pak vyjadřuje šířku distribuce velikostí emulzních kapek. Grafické znázornění velikosti kapek v závislosti na hmotnostním poměru O/V jsou pro vzorky PE se 100 mg AST oleoresinu uvedeny na Obrázku 42 a pro vzorky PE s 200 mg AST oleoresinu na Obrázku 43.

Tabulka 24 Výsledky měření velikosti emulzních kapek Pickeringových emulzí obsahujících 100 mg AST oleoresinu v MCT

Stabilizátor NLC	Poměr O/V	D [4;3] [ $\mu\text{m}$ ]	Span
Tween	5/95	2,9 $\pm$ 0,6	3,6 $\pm$ 0,1
	10/90	2,5 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,1
	20/80	1,6 $\pm$ 0,01	1,7 $\pm$ 0,01
Sukcinát	5/95	0,5 $\pm$ 0,02	1,9 $\pm$ 0,05
	10/90	0,6 $\pm$ 0,00	1,7 $\pm$ 0,01
	20/80	3,4 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,02

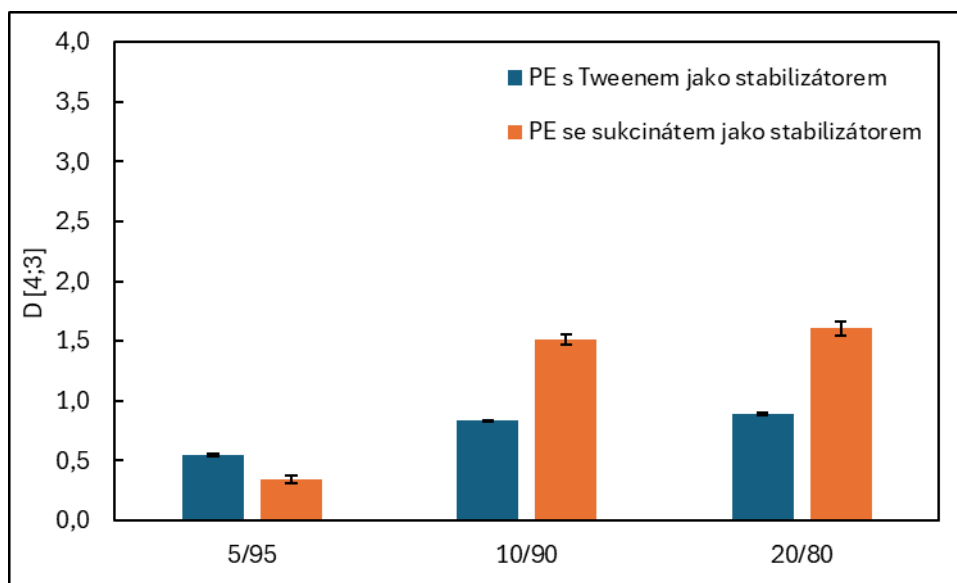


Obrázek 42 Velikost kapek Pickeringových emulzí obsahujících 100 mg AST oleoresinu v MCT

Na základě výsledků uvedených v Tabulce 24 a na Obrázku 42 lze konstatovat, že v případě PE, které obsahovaly NLC stabilizované Tweenem a 100 mg AST v olejové fázi klesla velikost kapek se vzrůstajícím množstvím oleje z  $\sim 2,9 \mu\text{m}$  (O/V 5/95) na  $\sim 1,6 \mu\text{m}$  (O/V 20/80). V případě PE obsahujících NLC stabilizované sukcinátem byla velikost kapek obdobná u vzorků připravených v poměru O/V 5/95 a 10/90 a to  $\sim 0,5 \mu\text{m}$ . Vzorek připravený v poměru O/V 20/80 obsahoval vůbec největší emulzní kapky, s velikostí  $\sim 3,4 \mu\text{m}$ .

Tabulka 25 Výsledky měření velikosti emulzních kapek Pickeringových emulzí obsahujících 200 mg AST oleoresinu v MCT

Stabilizátor NLC	Poměr O/V	D [4;3] [ $\mu\text{m}$ ]	Span
Tween	5/95	0,6±0,008	2,13±0,02
	10/90	0,8±0,002	2,26±0,009
	20/80	0,9±0,007	1,70±0,02
Sukcinát	5/95	0,3±0,03	1,75±0,03
	10/90	1,5±0,04	4,03±0,03
	20/80	1,6±0,06	1,81±0,02

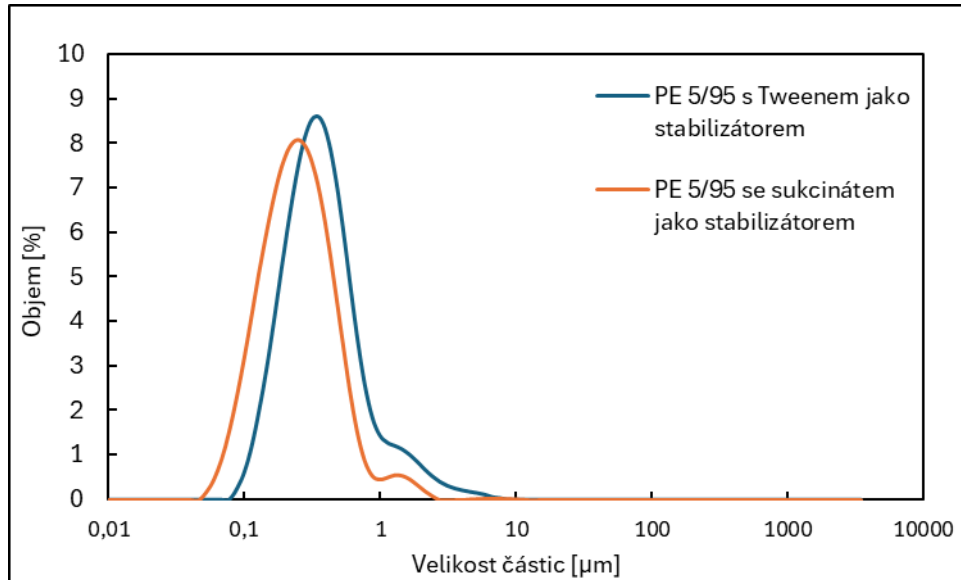


Obrázek 43 Velikost kapek Pickeringových emulzí obsahujících 200 mg AST oleoresinu v MCT

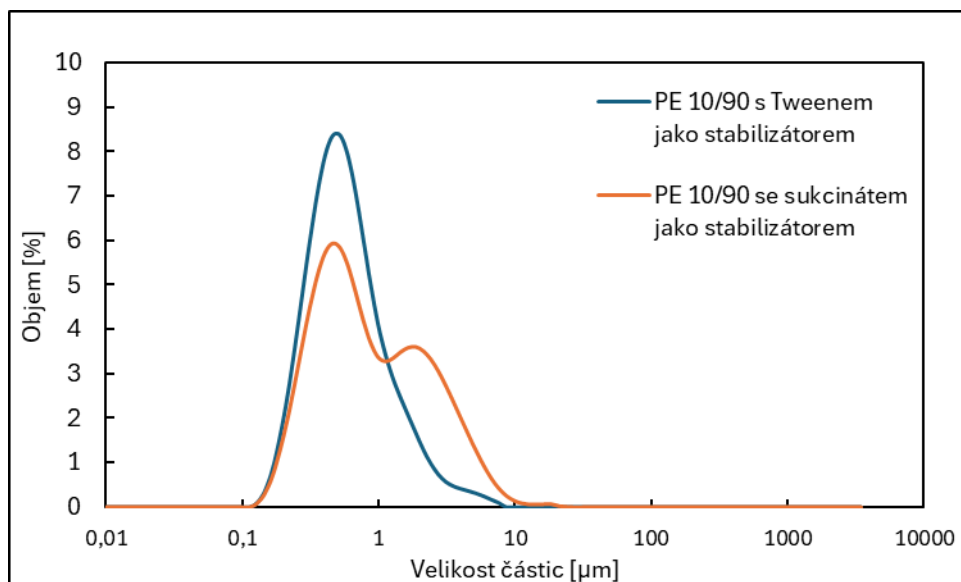
Vyšší koncentrace AST oleoresinu v olejové fázi (200 mg) poskytly ve srovnání s nižším množstvím AST oleoresinu odlišné výsledky, které jsou uvedeny v Tabulce 25 a na Obrázku 43. Lze konstatovat, že v případě PE připravených z NLC stabilizovaných Tweenem byla velikost kapek  $\sim 0,9 \mu\text{m}$ , výjimkou byl vzorek připravený v hmotnostním poměru O/V 5/95, kdy byla velikost kapek mírně menší a to  $\sim 0,5 \mu\text{m}$ . U vzorku PE připraveného z NLC stabilizovaného sukcinátem v poměru O/V 5/95 byla pozorována vůbec nejmenší velikost kapek  $\sim 0,3 \mu\text{m}$ . V případě vzorků PE připravených v hmotnostním poměru O/V 10/90 a 20/80 byla velikost kapek podobná a to přibližně  $1,6 \mu\text{m}$ . Příklady distribucí velikosti kapek PE připravených s 200 mg AST oleoresinu v MCT jsou uvedeny na Obrázku 44 (O/V 5/95), Obrázku 45 (O/V 10/90) a na Obrázku 46 (O/V 20/80).

Na základě porovnání výsledků uvedených v Tabulkách 24 a 25 a na Obrázcích 42 a 43 lze říci, že menší velikosti kapek byly pozorovány u vzorků PE, které obsahovaly v olejové fázi větší množství (200 mg) AST oleoresinu. Je tedy zřejmé, že na velikost emulzních kapek má vliv i povaha olejové fáze, např. její polarita a viskozita. V tomto konkrétním případě větší množství AST oleoresinu mohlo přispět k modifikaci povahy olejové fáze a tím i změně velikosti kapek. Vliv viskozity a polaritativy olejové fáze na velikost emulzních kapek byl zmíněn a diskutován např. v publikaci autorů Urbánková, Sedláček, Kašpárková a kol. z roku 2021, ve které uvádějí, že olejové fáze s vysokou viskozitou vytvářejí emulze s většími kapkami než oleje s nízkou viskozitou [76]. V další studii (Yao, Lin a kol., 2019)

zabývající se touto problematikou autoři uvádějí, že viskozita je důležitý parametr ovlivňující rychlost generování emulzních kapek, kdy vyšší viskozita olejové fáze napomáhá snadnějšímu rozbití a vytvoření disperzní fáze [77].

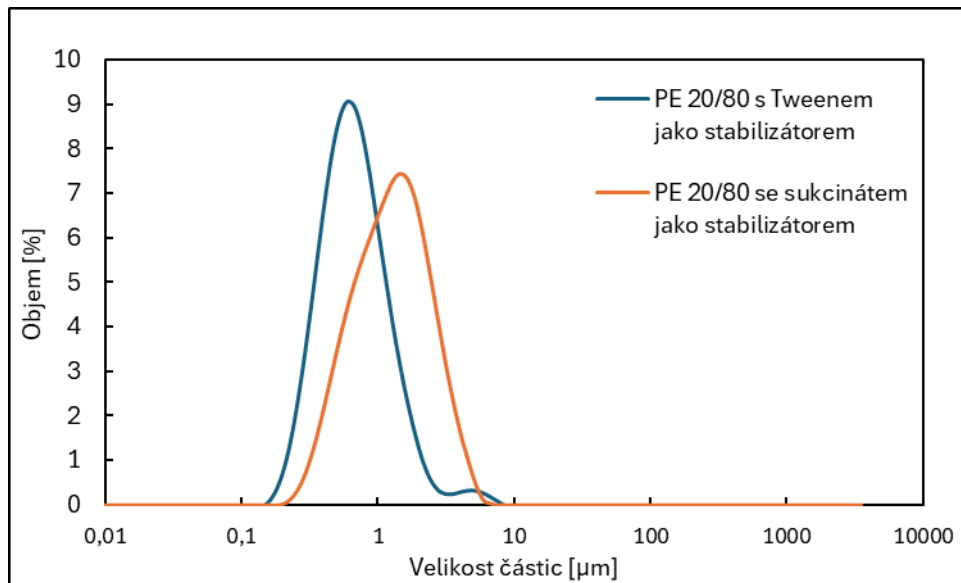


Obrázek 44 Distribuce velikosti kapek Pickeringovy emulze připravené v hmotnostním poměru O/V 5/95



Obrázek 45 Distribuce velikosti kapek Pickeringovy emulze připravené v hmotnostním poměru O/V 10/90



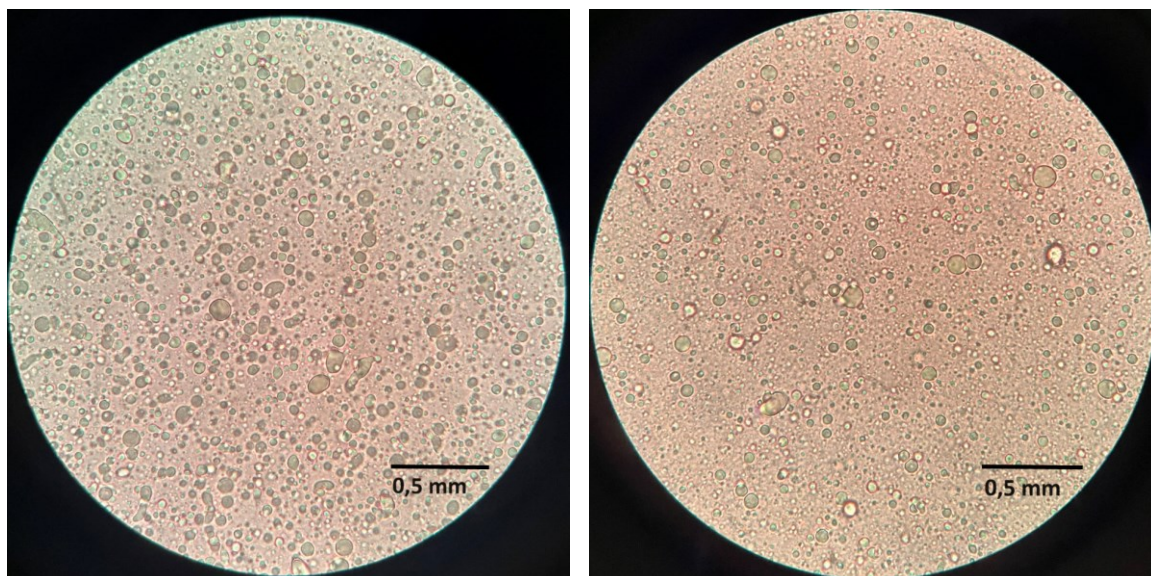


Obrázek 46 Distribuce velikosti kapek Pickeringovy emulze připravené v hmotnostním poměru O/V 20/80

Z Obrázků 44 až 46 je patrné, že distribuce velikostí kapek PE jsou úzké a monomodální. Výjimkou je distribuce vzorku emulze, která obsahuje NLC stabilizované sukcinátem a byla připravená v hmotnostním poměru O/V 10/90. Ta je bimodální.

### 8.3.2 Optická mikroskopie

Pro charakterizaci pomocí optické mikroskopie byly taktéž vybrány PE, které obsahovaly v olejové fázi 200 mg AST oleoresinu. Vzorke byly pozorovány při zvětšení 1000 $\times$ . Na Obrázku 47 je uvedeno jako příklad porovnání PE připravených v hmotnostním poměru O/V 5/95 obsahující NLC, které jsou stabilizovány Tweenem (vlevo) nebo sukcinátem (vpravo).



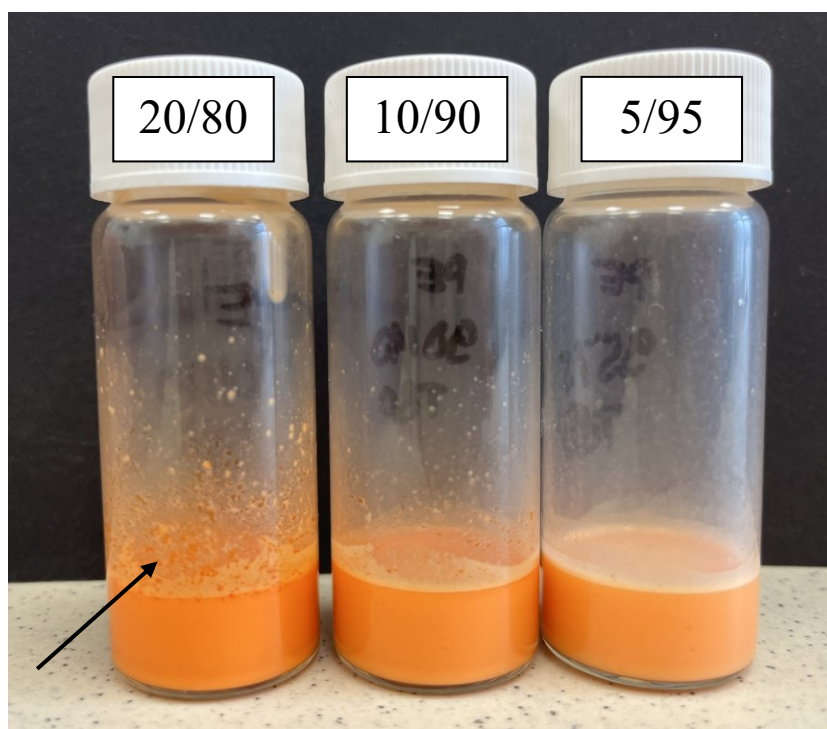
Obrázek 47 Snímky z optického mikroskopu Pickeringových emulzí připravených v hmotnostním poměru O/V 5/95 stabilizovaných Tweenem (vlevo) nebo sukcinátem (vpravo)

Na Obrázku 47 lze pozorovat, že kapky PE obsahující NLC stabilizované Tweenem jsou větší než PE, které byly připraveny z NLC stabilizovaných sukcinátem, čemuž odpovídá i naměřená velikost emulzních kapek pomocí přístroje Mastersizer diskutovaná v kapitole 8.3.1.

V případě vzorků PE připravených v hmotnostních poměrech O/V 10/90 a 20/80 byla větší velikost kapek mikroskopicky pozorovány u PE obsahujících NLC stabilizované Tweenem, čemuž ale neodpovídá velikost kapek naměřená přístrojem Mastersizer. Toto lze vysvětlit tím, že v případě měření světelnou diffrakcí se jedná o průměrnou velikost kapek a během měření byla emulze po celou dobu v měřicí cele míchána, což mohlo velikost ovlivnit. Rovněž mohlo dojít k tomu, že v zorném poli mikroskopu byly zobrazeny frakce menších kapek, než je průměr stanovený světelnou diffrakcí.

### 8.3.3 Vizuální pozorování

Pickeringovy emulze byly vizuálně pozorovány ihned po přípravě. Příklad vzhledu PE je uveden na Obrázku 48, na kterém jsou vzorky obsahující ve vodné fázi NLC s CBD stabilizované Tweenem a v olejové fázi 200 mg AST oleoresinu v MCT, připravené v hmotnostních poměrech O/V 20/80, 10/90 a 5/95.



Obrázek 48 Pickeringovy emulze připravené v hmotnostním poměru O/V 20/80, 10/90 a 5/95 s obsahem 200 mg AST oleoresinu v MCT (OF)

Všechny vzorky PE měly oranžovou barvu svědčící o přítomnosti AST. Z Obrázku 48 je patrné, že s rostoucí koncentrací OF se zvyšoval obsah volného oleje. Nejvíce volného oleje bylo tedy pozorováno u vzorku PE připraveného v hmotnostním poměru O/V 20/80. Kapky volného oleje lze zřetelně pozorovat na Obrázku 48, kde jsou označeny šipkou. Stejně chování bylo pozorováno i u PE, které obsahovaly v OF 100 mg AST oleoresinu v MCT bez ohledu na použitý stabilizátor NLC.

Vzorky PE obsahující ve vodné fázi NLC s CBD stabilizované Tweenem vykazovaly mírně zvýšené množství volného oleje než vzorky PE připravené z NLC s CBD, které byly stabilizovány sukcinátem. U vzorků PE připravených v poměrech O/V 20/80 a 10/90 docházelo ke krémování bez ohledu na typ použitého stabilizátoru NLC.

Obecně lze konstatovat, že vzorek PE připravený v hmotnostním poměru O/V 5/95 obsahující ve vodné fázi NLC s CBD stabilizované sukcinátem a 200 mg AST oleoresinu v olejové fázi se jeví jako nejlepší.

## ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá lipidovými nanočásticemi jako nosiči antioxidantů, aktivních látek v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Pozornost je soustředěna zejména na nanostrukturované lipidové nosiče (NLC), které jsou pokročilejším typem lipidových nanočástic.

Nejprve byla provedena preformulační studie s cílem vybrat metodu přípravy částic a navrhnout vhodné složení lipidové matrice. Byly testovány dvě metody přípravy a několik různých formulací NLC. Jako pevný lipid byly použity kyselina laurová, kyselina palmitová a glyceryl behenát a jako kapalný lipid kyselina olejová, MCT a jojobový vosk. Ze stabilizátorů byly testovány Tween, sukcinát, deoxycholát a Poloxamer 407.

Při volbě metody přípravy NLC bylo zjištěno, že částice připravené Metodou 2, spočívající v prudkém ochlazení lipidové disperze, mají výrazně menší velikosti i užší distribuci, a proto byla tato metoda zvolena pro další práci.

Při volbě vhodného tuhého lipidu pro NLC bylo zjištěno, že vzorky s mastnou kyselinou laurovou vykazovaly lepší charakteristiky než formulace s kyselinou palmitovou. Další testovaný tuhý lipid, glyceryl behenát, však poskytoval částice s reprodukovatelnějšími vlastnostmi než obě mastné kyseliny a byl proto zvolen pro další práci. Glyceryl behenát byl pak dále testován v kombinaci s kapalnými lipidy. Nejmenší velikost částic i nejužší distribuci vykazovaly NLC s kyselinou olejovou, která měla rovněž i monomodální distribuci. Ze stabilizátorů byly zvoleny Tween a sukcinát, u nichž byla následně provedena studie vhodné koncentrace. Na základě získaných výsledků preformulační studie byl zvolen systém obsahující glyceryl behenát, kyselinu olejovou a stabilizátory Tween nebo sukcinát o koncentraci 2 %, který byl dále používán pro přípravu NLC v celé diplomové práci.

Při volbě vhodné aktivní látky vhodné pro zapouzdření do NLC byly testovány AST, CBD a oleoresin s 10 % AST. Nejmenší částice byly pozorovány u NLC s aktivní látkou AST oleoresin ~ 82 nm, avšak praktická příprava NLC obsahujících AST (ať už v čisté formě nebo v oleoresinu) byla komplikována jeho degradací během dialýzy. Vzhledem k této skutečnosti byl jako aktivní látka zvolen CBD.

V další části práce byly úspěšně připraveny a charakterizovány NLC s CBD a stabilizátory Tweenem nebo sukcinátem. Analýza prokázala, že NLC s CBD stabilizované Tweenem měly velikost částic ~ 178 nm, PdI ~ 0,4 a  $\zeta$ -potenciál ~ -25 mV, zatímco NLC stabilizované sukcinátem obsahovaly menší částice ~ 134 nm, distribuce byla širší (PdI ~ 0,5) a  $\zeta$ -potenciál

nabýval hodnoty  $\sim -28$  mV. Stanovením tepelných vlastností (DSC) bylo zjištěno, že přidáním CBD a kapalného lipidu k pevnému lipidu glyceryl behenátu došlo ke snížení bodu i entalpie tání připravených částic. Enkapsulační účinnost NLC byla velmi vysoká, a to v případě NLC s CBD a Tweenem  $\sim 84$  % a u NLC s CBD a sukcinátem 97 %.

Provedená stabilitní studie na vzorcích uchovávaných po 4 týdny při 5 °C prokázala jejich dobrou stabilitu, jelikož ve sledovaném období se sledované parametry výrazně neměnily. U vzorku NLC s CBD a Tweenem mírně poklesla velikost částic (z  $\sim 183$  na  $\sim 151$  nm) a u vzorku NLC s CBD a sukcinátem naopak velikost částic vzrostla (ze  $\sim 190$  na  $\sim 238$  nm). Hodnoty  $\zeta$ -potenciálu se neměnily.

Vzorky NLC s enkapsulovaným CBD stabilizované Tweenem nebo sukcinátem byly následně použity pro přípravu Pickeringových emulzí (PE) typu olej-voda (O/V). Tyto emulze obsahovaly v olejové fázi AST oleoresin dispergovaný v MCT. U vzorků PE byl zkoumán vliv množství oleje a množství AST oleoresinu v MCT na vlastnosti emulzí. Pickeringovy emulze byly následně charakterizovány měřením velikosti emulzních kapek, mikroskopickým a vizuálním pozorováním.

V rámci této studie bylo zjištěno, že s rostoucím množstvím olejové fáze rostla i velikost emulzních kapek, výjimkou byl vzorek PE, připravený z NLC stabilizovaných Tweenem s obsahem 100 mg AST oleoresinu v MCT. Dále bylo zjištěno, že menší velikosti kapek byly pozorovány u vzorků PE, které obsahovaly v olejové fázi 200 mg AST oleoresinu, což nasvědčuje tomu, že vyšší obsah AST oleoresinu přispíval k lepší emulgaci. Vizuální pozorování prokázalo, že s rostoucím množstvím oleje v emulzi se rovněž zvyšovalo množství volného oleje. U vzorků PE připravených v hmotnostních poměrech O/V 20/80 a 10/90 docházelo ke krémování bez ohledu na typ použitého stabilizátoru. Nejlepší vlastnosti vykazovala PE připravená v hmotnostním poměru O/V 5/95 obsahující NLC s CBD stabilizované sukcinátem a olejovou fází s 200 mg AST oleoresinu dispergovanou v MCT.

Výsledky diplomové práce prokázaly, že NLC se jeví jako slibné systémy pro dodávání aktivních látek. Konkrétně NLC s enkapsulovaným bioaktivním CBD mohou nalézt praktické použití v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Dalším originálním příspěvkem diplomové práce je využití NLC s enkapsulovaným CBD pro přípravu Pickeringových emulzí, které mají vysoký potenciál pro praktické aplikace, jelikož umožňují společnou enkapsulaci více aktivních látek v rámci jednoho nosiče.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] LÜDTKE, Fernanda Luisa; GRIMALDI, Renato; CARDOSO, Lisandro Pavie; GIGANTE, Mirna Lúcia; VICENTE, António Augusto et al. Development and Characterization of Fully Hydrogenated Soybean Oil and High Oleic Sunflower Oil  $\beta$ -carotene Loaded Nanostructured Lipid Carriers. Online. *Food Biophysics*. 2023, roč. 18, č. 3, s. 338-352. ISSN 1557-1858. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11483-023-09777-8>. [cit. 2024-05-03].
- [2] TAMJIDI, Fardin; SHAHEDI, Mohammad; VARSHOSAZ, Jaleh a NASIRPOUR, Ali. Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers. Online. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2014, roč. 26, s. 366-374. ISSN 14668564. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.06.012>. [cit. 2024-05-03].
- [3] MATARAZZO, Ananda Pulini; ELISEI, Livia Maria Silvestre; CARVALHO, Flávia Chiva; BONFÍLIO, Rudy; RUELA, André Luís Morais et al. Mucoadhesive nanostructured lipid carriers as a cannabidiol nasal delivery system for the treatment of neuropathic pain. Online. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021, roč. 159, s. 1-11. ISSN 09280987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105698>. [cit. 2024-05-04].
- [4] SAKELLARI, Georgia I.; ZAFEIRI, Ioanna; BATCHELOR, Hannah a SPYROPOULOS, Fotis. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers of dual functionality at emulsion interfaces. Part I: Pickering stabilisation functionality. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2022, roč. 654, s. 1-12. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.130135>. [cit. 2024-05-04].
- [5] MONTENEGRO, Lucia; LAI, Francesco; OFFERTA, Alessia; SARPIETRO, Maria Grazia; MICICCHÈ, Lucia et al. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016, roč. 32, s. 100-112. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.10.003>. [cit. 2024-05-03].

- [6] MITCHELL, Michael J.; BILLINGSLEY, Margaret M.; HALEY, Rebecca M.; WECHSLER, Marissa E.; PEPPAS, Nicholas A. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. Online. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021, roč. 20, č. 2, s. 101-124. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>. [cit. 2024-05-04].
- [7] XU, Letao; WANG, Xing; LIU, Yun; YANG, Guangze; FALCONER, Robert J. et al. Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. Online. *Advanced NanoBiomed Research*. 2022, roč. 2, č. 2, s. 1-17. ISSN 2699-9307. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/anbr.202100109>. [cit. 2024-05-04].
- [8] NSAIRAT, Hamdi; KHATER, Dima; SAYED, Usama; ODEH, Fadwa; AL BAWAB, Abeer et al. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. Online. *Heliyon*. 2022, roč. 8, č. 5, s. 2-15. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>. [cit. 2024-05-04].
- [9] VIEGAS, Cláudia; SECK, Fatumata a FONTE, Pedro. An insight on lipid nanoparticles for therapeutic proteins delivery. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022, roč. 77, s. 1-18. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103839>. [cit. 2024-05-04].
- [10] Successful drug delivery with liposomes: Nanotechnology in liposomes. Online. In: *Inprocess-LSP*. Dostupné z: <https://www.inprocess-lsp.com/liposomes/>. [cit. 2024-05-03].
- [11] PARDEIKE, Jana; HOMMOSS, Aiman a MÜLLER, Rainer H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, roč. 366, č. 1-2, s. 170-184. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>. [cit. 2024-05-03].
- [12] ALSAAD, Ahmed A.A; HUSSIEN, Ahmed A. a GAREEB, Mowafaq M. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) as a Novel Drug Delivery System: A Theoretical Review. Online. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2020, roč. 11, č. 5, s. 259-273. ISSN 09762779. Dostupné z: <https://doi.org/10.31838/srp.2020.5.39>. [cit. 2024-05-03].



- [13] NASERI, Neda; VALIZADEH, Hadi a ZAKERI-MILANI, Parvin. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. Online. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2015, roč. 5, č. 3, s. 305-313. ISSN 2228-5881. Dostupné z: <https://doi.org/10.15171/apb.2015.043>. [cit. 2024-05-03].
- [14] SUBROTO, Edy; ANDOYO, Robi a INDIARTO, Rossi. Solid Lipid Nanoparticles: Review of the Current Research on Encapsulation and Delivery Systems for Active and Antioxidant Compounds. Online. *Antioxidants*. 2023, roč. 12, č. 3, s. 2-28. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox12030633>. [cit. 2024-05-04].
- [15] KHOSA, Archana; REDDI, Satish a SAHA, Ranendra N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. Online. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018, roč. 103, s. 598-613. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.055>. [cit. 2024-05-03].
- [16] CHAUHAN, Iti; YASIR, Mohd; VERMA, Madhu a SINGH, Alok Pratap. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. Online. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2020, roč. 10, č. 2, s. 150-165. ISSN 2228-5881. Dostupné z: <https://doi.org/10.34172/apb.2020.021>. [cit. 2024-05-03].
- [17] ZOABI, Amani; TOUITOU, Elka a MARGULIS, Katherine. Recent Advances in Nanomaterials for Dermal and Transdermal Applications. Online. *Colloids and Interfaces*. 2021, roč. 5, č. 1, s. 2-69. ISSN 2504-5377. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/colloids5010018>. [cit. 2024-05-04].
- [18] GANESAN, Poovi a NARAYANASAMY, Damodharan. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. Online. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2017, roč. 6, s. 37-56. ISSN 23525541. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2017.07.002>. [cit. 2024-05-03].
- [19] SHARMA, Mala; PANDEY, Chitranshu; SHARMA, Neha; KAMAL, Mohammad A.; SAYEED, Usman et al. Cancer Nanotechnology-An Excursion on Drug Delivery Systems. Online. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2019, roč. 18, č. 15, s. 2078-2092. ISSN 18715206. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1871520618666180720164015>. [cit. 2024-05-03].

- [20] DUAN, Yongtao; DHAR, Abhishek; PATEL, Chetan; KHIMANI, Mehul; NEOGI, Swarnali et al. A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. Online. *RSC Advances*. 2020, roč. 10, č. 45, s. 26777-26791. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D0RA03491F>. [cit. 2024-05-03].
- [21] KAUL, Shreya; GULATI, Neha; VERMA, Deepali; MUKHERJEE, Siddhartha a NAGAICH, Upendra. Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. Online. *Journal of Pharmaceutics*. 2018, roč. 2018, s. 1-19. ISSN 2090-9918. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2018/3420204>. [cit. 2024-05-04].
- [22] JIWANKAR, Manasi a SABALE, Vidya. Potential of nanostructured lipid carriers in oral delivery of the poorly soluble drugs. Online. *Journal of Nanoparticle Research*. 2023, roč. 25, č. 9, s. 1-21. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11051-023-05840-0>. [cit. 2024-05-04].
- [23] SASTRI, Trideva; GADELA, Radha; PIDIKITI, Sruthi a VAJJHALA, Priya. Solid lipid nanoparticles: Preparation techniques, their characterization, and an update on recent studies. Online. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2020, roč. 10, č. 6, s. 126-141. ISSN 22313354. Dostupné z: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.10617>. [cit. 2024-05-04].
- [24] GOMAA, Eman; FATHI, Heba A.; EISSA, Noura G. a ELSABAHY, Mahmoud. Methods for preparation of nanostructured lipid carriers. Online. *Methods*. 2022, roč. 199, s. 3-8. ISSN 10462023. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.05.003>. [cit. 2024-05-04].
- [25] LI, Qianwen; CAI, Tiange; HUANG, Yinghong; XIA, Xi; COLE, Susan et al. A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. Online. *Nanomaterials*. 2017, roč. 7, č. 6, s. 1-25. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano7060122>. [cit. 2024-05-04].
- [26] GENÇ, Yasin; BARDAKCI, Hilal; YÜCEL, Çiğdem; KARATOPRAK, Gökçe Şeker; KÜPELI AKKOL, Esra et al. Oxidative Stress and Marine Carotenoids: Application by Using Nanoformulations. Online. *Marine Drugs*. 2020, roč. 18, č. 8, s. 1-32. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md18080423>. [cit. 2024-05-04].

- [27] GULCIN, İlhami. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Online. *Archives of Toxicology*. 2020, roč. 94, č. 3, s. 651-715. ISSN 0340-5761. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>. [cit. 2024-05-04].
- [28] NRIAGU, Jerome O. *Encyclopedia of environmental health*. Amsterdam: Elsevier, 2011. ISBN 978-0-444-52272-6.
- [29] MUNTEANU, Irina Georgiana a APETREI, Constantin. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 7, s. 1-30. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>. [cit. 2024-05-04].
- [30] HOANG, Hien Thi; MOON, Ju-Young a LEE, Young-Chul. Natural Antioxidants from Plant Extracts in Skincare Cosmetics: Recent Applications, Challenges and Perspectives. Online. *Cosmetics*. 2021, roč. 8, č. 4, s. 1-24. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040106>. [cit. 2024-05-04].
- [31] HUSSAIN, Chaudhery Mustansar. *Bio-Based Materials and Waste for Energy Generation and Resource Management*. Volume 5 of Advanced Zero Waste Tools: Present and Emerging Waste Managem. Elsevier, 2023. ISBN 9780323911498.
- [32] BHATT, Takshma a PATEL, Kirtan. Carotenoids: Potent to Prevent Diseases Review. Online. *Natural Products and Bioprospecting*. 2020, roč. 10, č. 3, s. 109-117. ISSN 2192-2195. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00244-2>. [cit. 2024-05-04].
- [33] MAOKA, Takashi. Carotenoids as natural functional pigments. Online. *Journal of Natural Medicines*. 2020, roč. 74, č. 1, s. 1-16. ISSN 1340-3443. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>. [cit. 2024-05-04].
- [34] HERMUND, Ditte B. Antioxidant Properties of Seaweed-Derived Substances. Online. In: *Bioactive Seaweeds for Food Applications*. 2018. Elsevier, s. 201-221. ISBN 9780128133125. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813312-5.00010-8>. [cit. 2024-05-04].
- [35] DE CARVALHO, Carla C. C. R. a CARAMUJO, Maria J. Carotenoids in Aquatic Ecosystems and Aquaculture: A Colorful Business with Implications for Human Health. Online. *Frontiers in Marine Science*. 2017, roč. 4, s. 1-14. ISSN 2296-7745. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00093>. [cit. 2024-05-04].

- [36] SAINI, Ramesh Kumar; PRASAD, Parchuri; LOKESH, Veeresh; SHANG, Xiaomin; SHIN, Juhyun et al. Carotenoids: Dietary Sources, Extraction, Encapsulation, Bioavailability, and Health Benefits—A Review of Recent Advancements. Online. *Antioxidants*. 2022, roč. 11, č. 4, s. 1-34. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox11040795>. [cit. 2024-05-04].
- [37] CAI, Luyun; GAN, Miaoyu; REGENSTEIN, Joe M. a LUAN, Qian. Improving the biological activities of astaxanthin using targeted delivery systems. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. S. 1-22. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2176816>. [cit. 2024-05-04].
- [38] AMBATI, Ranga; PHANG, Siew-Moi; RAVI, Sarada a ASWATHANARAYANA, Ravishankar. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. Online. *Marine Drugs*. 2014, roč. 12, č. 1, s. 128-152. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md12010128>. [cit. 2024-05-04].
- [39] SANTONOCITO, Debora; RACITI, Giuseppina; CAMPISI, Agata; SPOSITO, Giovanni; PANICO, Annamaria et al. Astaxanthin-Loaded Stealth Lipid Nanoparticles (AST-SSLN) as Potential Carriers for the Treatment of Alzheimer's Disease: Formulation Development and Optimization. Online. *Nanomaterials*. 2021, roč. 11, č. 2, s. 1-17. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano11020391>. [cit. 2024-05-04].
- [40] YIN, Yinyan; XU, Nuo; QIN, Tao; ZHOU, Bangyue; SHI, Yi et al. Astaxanthin Provides Antioxidant Protection in LPS-Induced Dendritic Cells for Inflammatory Control. Online. *Marine Drugs*. 2021, roč. 19, č. 10, s. 1-14. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md19100534>. [cit. 2024-05-04].
- [41] SANTOS-SANCHEZ, Norma Francenia; HERNÁNDEZ-CARLOS, Beatriz; TORRES-ARINO, Alejandra a SALAS-CORONADO, Raul. Astaxanthin and its Formulations as Potent Oxidative Stress Inhibitors. Online. *Pharmacognosy Reviews*. 2021, roč. 14, č. 27, s. 8-15. ISSN 09737847. Dostupné z: <https://doi.org/10.5530/phrev.2020.1.2>. [cit. 2024-05-04].

- [42] GENG, Qiang; ZHAO, Yuming; WANG, Lu; XU, Lulu; CHEN, Xiong et al. Development and Evaluation of Astaxanthin as Nanostructure Lipid Carriers in Topical Delivery. Online. *AAPS PharmSciTech*. 2020, roč. 21, č. 8. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01822-w>. [cit. 2024-05-04].
- [43] ARMENTA, Roberto E. a GUERRERO-LEGARRETA, Isabel. Stability Studies on Astaxanthin Extracted from Fermented Shrimp Byproducts. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, roč. 57, č. 14, s. 6095-6100. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf901083d>. [cit. 2024-05-07].
- [44] BOONLAO, Nuntarat; RUKTANONCHAI, Uracha Rungsardthong a ANAL, Anil Kumar. Enhancing bioaccessibility and bioavailability of carotenoids using emulsion-based delivery systems. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022, roč. 209, s. 1-16. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112211>. [cit. 2024-05-04].
- [45] SHEIKH, N. K. a DUA, A. Cannabinoids. Online. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. PMID 32310522. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556062/>. [cit. 2024-05-04].
- [46] CHILAKAPATI, Jaya a MEHENDALE, Harihara M. Cannabinoids. Second Edition. Elsevier, 2005. ISBN 978-0-12-369400-3.
- [47] CHILAKAPATI, J. a FARRIS, F.F. *Cannabinoids*. Online. In: *Encyclopedia of Toxicology*. Third Edition. Elsevier, 2014, s. 649-654. ISBN 9780123864550. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00267-0>. [cit. 2024-05-04].
- [48] HARRY, G. Jean. Cannabinoids. Online. In: *Neurotoxicity of Drugs of Abuse*. Advances in Neurotoxicology. Elsevier, 2022, s. 1-48. ISBN 9780323915854. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2022.06.001>. [cit. 2024-05-04].
- [49] MORAKUL, Boontida; JUNYAPRASERT, Varaporn Buraphacheep; SAKCHAISRI, Krisada a TEERANACHAIDEEKUL, Veerawat. Cannabidiol-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Dermal Delivery: Enhancement of Photostability, Cell Viability, and Anti-Inflammatory Activity. Online. *Pharmaceutics*. 2023, roč. 15, č. 2, s. 1-18. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020537>. [cit. 2024-05-04].

- [50] SINGH, Kuldeep; BHUSHAN, Bharat; CHANCHAL, Dilip Kumar; SHARMA, Satish Kumar; RANI, Ketki et al. Emerging Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) in Neurological Disorders: A Comprehensive Review. Online. *Behavioural Neurology*. 2023, roč. 2023, s. 1-17. ISSN 1875-8584. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2023/8825358>. [cit. 2024-05-04].
- [51] PENG, Jiangling; FAN, Mingjie; AN, Chelsea; NI, Feng; HUANG, Wendong et al. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). Online. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2022, roč. 130, č. 4, s. 439-456. ISSN 1742-7835. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/bcpt.13710>. [cit. 2024-05-04].
- [52] PERUCCA, Emilio. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy: Hard Evidence at Last? Online. *Journal of Epilepsy Research*. 2017, roč. 7, č. 2, s. 61-76. ISSN 2233-6249. Dostupné z: <https://doi.org/10.14581/jer.17012>. [cit. 2024-05-04].
- [53] DI GIACOMO, Viviana; RECINELLA, Lucia; CHIAVAROLI, Annalisa; ORLANDO, Giustino; CATALDI, Amelia et al. Metabolomic Profile and Antioxidant/Anti-Inflammatory Effects of Industrial Hemp Water Extract in Fibroblasts, Keratinocytes and Isolated Mouse Skin Specimens. Online. *Antioxidants*. 2021, roč. 10, č. 1, s. 1-21. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox10010044>. [cit. 2024-05-04].
- [54] LÓPEZ, Karla L.; RAVASIO, Andrea; GONZÁLEZ-ARAMUNDIZ, José Vicente a ZACCONI, Flavia C. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) Prepared by Microwave and Ultrasound-Assisted Synthesis: Promising Green Strategies for the Nanoworld. Online. *Pharmaceutics*. 2023, roč. 15, č. 5, s. 1-26. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051333>. [cit. 2024-05-04].
- [55] VU, Ngoc-Bich-Dao; PHAM, Ngoc-Duy; TRAN, Thi-Ngoc-Mai; PHAM, Xuan-Hai; NGO, Dai-Nghiep et al. Possibility of nanostructured lipid carriers encapsulating astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* to alleviate skin injury in radiotherapy. Online. *International Journal of Radiation Biology*. 2024, roč. 100, č. 2, s. 209-219. ISSN 0955-3002. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/09553002.2023.2267650>. [cit. 2024-05-04].

- [56] GU, Liyuan; WANG, Wenjuan; WU, Bi; JI, Suping a XIA, Qiang. Preparation and in vitro characterization studies of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers with antioxidant properties. Online. *Journal of Biomaterials Applications*. 2023, roč. 38, č. 2, s. 292-301. ISSN 0885-3282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/08853282231189779>. [cit. 2024-05-04].
- [57] BIEBERLE-HÜTTER, A; BRONNEBERG, A C; GEORGE, K a VAN DE SANDEN, M C M. Operando attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy for water splitting. Online. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2021, roč. 54, č. 13, s. 1-12. ISSN 0022-3727. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1361-6463/abd435>. [cit. 2024-05-04].
- [58] GILL, Pooria; MOGHADAM, Tahereh Tohidi a RANJBAR, Bijan. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. Online. *J Biomol Tech*. 2010, roč. 21, č. 4, s. 167–193. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2977967/>. [cit. 2024-05-04].
- [59] ZAINAL, Nurul Fatahah Asyqin; SAITER, Jean Marc; HALIM, Suhaila Idayu Abdul; LUCAS, Romain a CHAN, Chin Han. Thermal analysis: basic concept of differential scanning calorimetry and thermogravimetry for beginners. Online. *Chemistry Teacher International*. 2021, roč. 3, č. 2, s. 59-75. ISSN 2569-3263. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/cti-2020-0010>. [cit. 2024-05-04].
- [60] BAJEROVÁ, Martina; KUBOVA DVORACKOVA, Katerina; GAJDZIOK, Jan a MASTEIKOVA, Ruta. Mikročástice na bázi oxycelulosity – vliv procesních proměnných na enkapsulační účinnost. Online. *Česká a slovenská farmacie*. 2010, roč. 59, č. 2, s. 67-73. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/288164282\\_Microparticles\\_on\\_the\\_oxycelulose\\_base\\_Influence\\_of\\_processual\\_variables\\_on\\_encapsulation\\_efficiency#fullTextFileContent](https://www.researchgate.net/publication/288164282_Microparticles_on_the_oxycelulose_base_Influence_of_processual_variables_on_encapsulation_efficiency#fullTextFileContent). [cit. 2024-05-04].
- [61] VOIGTLÄNDER, Bert. *Atomic Force Microscopy*. Online. Second Edition. NanoScience and Technology. Cham: Springer International Publishing, 2019. ISBN 978-3-030-13653-6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-13654-3>. [cit. 2024-05-06].

- [62] FRANK, Uwe; UTTINGER, Maximillian J.; WAWRA, Simon E.; LÜBBERT, Christian a PEUKERT, Wolfgang. Progress in Multidimensional Particle Characterization. Online. *KONA Powder and Particle Journal*. 2022, roč. 39, s. 3-28. ISSN 0288-4534. Dostupné z: <https://doi.org/10.14356/kona.2022005>. [cit. 2024-05-06].
- [63] WANG, Wenbo a WANG, Aiqin. Palygorskite Nanomaterials: Structure, Properties, and Functional Applications. Online. In: *Nanomaterials from Clay Minerals*. Elsevier, 2019, s. 21-133. ISBN 9780128145333. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814533-3.00002-8>. [cit. 2024-05-07].
- [64] NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (US), NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *PubChem*. Online. 2004. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [cit. 2024-05-07].
- [65] DEVI, RAJNI a AGARWAL, SHWETA. SOME MULTIFUNCTIONAL LIPID EXCIPIENTS AND THEIR PHARMACEUTICAL APPLICATIONS. Online. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2019, roč. 11, č. 9, s. 1-7. ISSN 0975-1491. Dostupné z: <https://doi.org/10.22159/ijpps.2019v11i9.34194>. [cit. 2024-05-07].
- [66] GAD, Heba A.; ROBERTS, Autumn; HAMZI, Samirah H.; GAD, Haidy A.; TOUISS, Ilham et al. Jojoba Oil: An Updated Comprehensive Review on Chemistry, Pharmaceutical Uses, and Toxicity. Online. *Polymers*. 2021, roč. 13, č. 11, s. 1-22. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym13111711>. [cit. 2024-05-07].
- [67] WITAYAUDOM, Pimchanok a KLINKESORN, Utai. Effect of surfactant concentration and solidification temperature on the characteristics and stability of nanostructured lipid carrier (NLC) prepared from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) kernel fat. Online. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017, roč. 505, č. 2017, s. 1082-1092. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.008>. [cit. 2024-05-07].
- [68] MURTHY, Aditya; RAO RAVI, Punna; KATHURIA, Himanshu a MALEKAR, Shrinivas. Oral Bioavailability Enhancement of Raloxifene with Nanostructured Lipid Carriers. Online. *Nanomaterials*. 2020, roč. 10, č. 6, s. 1-17. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano10061085>. [cit. 2024-05-07].



- [69] AHMED, Faruq; LI, Yan; FANNING, Kent; NETZEL, Michael a SCHENK, Peer M. Effect of drying, storage temperature and air exposure on astaxanthin stability from *Haematococcus pluvialis*. Online. *Food Research International*. 2015, roč. 74, č. 2015, s. 231-236. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.021>. [cit. 2024-05-07].
- [70] YAO, Qimeng; MA, Jiaqi; CHEN, Xuemin; ZHAO, Guanghua a ZANG, Jiachen. A natural strategy for astaxanthin stabilization and color regulation: Interaction with proteins. Online. *Food Chemistry*. 2023, roč. 402, č. 2023, s. 1-12. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134343>. [cit. 2024-05-07].
- [71] MAZZETTI, Carlo; FERRI, Emanuele; POZZI, Monica a LABRA, Massimo. Quantification of the content of cannabidiol in commercially available e-liquids and studies on their thermal and photo-stability. Online. *Scientific Reports*. 2020, roč. 10, č. 1, s. 1-7. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60477-6>. [cit. 2024-05-07].
- [72] KEPEKÇI, Remziye Aysun; YENER İLÇE, Burcu a DEMİR KANMAZALP, Sibel. Plant-derived biomaterials for wound healing. Online. In: *Bioactive Natural Products*. 227-264. Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier, 2021, s. 227-264. ISBN 9780128194898. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819489-8.00001-6>. [cit. 2024-05-05].
- [73] YOUSHA, John; KAMEL, Amany O.; EL SHAMY, Abdelhameed a MANSOUR, Samar. Gamma sterilization and in vivo evaluation of cationic nanostructured lipid carriers as potential ocular delivery systems for antiglaucoma drugs. Online. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021, roč. 163, s. 1-11. ISSN 09280987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105887>. [cit. 2024-05-04].
- [74] LOWRY, Gregory V.; HILL, Reghan J.; HARPER, Stacey; RAWLE, Alan F.; HENDREN, Christine Ogilvie et al. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. Online. *Environmental Science: Nano*. 2016, roč. 3, č. 5, s. 953-965. ISSN 2051-8153. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6EN00136J>. [cit. 2024-05-07].

- [75] 32. WHO Cannabidiol (CBD) pre-review report; Proceedings of the Expert Committee on Drug Dependence, Thirty-Ninth Meeting; Geneva, Switzerland. 6–10 November 2017; pp. 6–10.
- [76] URBÁNKOVÁ, Lucie; SEDLÁČEK, Tomáš; KAŠPÁRKOVÁ, Věra a BORDES, Romain. Formation of oleogels based on emulsions stabilized with cellulose nanocrystals and sodium caseinate. Online. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2021, roč. 596, č. 2021, s. 245-256. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.02.104>. [cit. 2024-05-07].
- [77] YAO, Junyi; LIN, Fan; KIM, Hyun a PARK, Jaewon. The Effect of Oil Viscosity on Droplet Generation Rate and Droplet Size in a T-Junction Microfluidic Droplet Generator. Online. *Micromachines*. 2019, roč. 10, č. 12, s. 1-8. ISSN 2072-666X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mi10120808>. [cit. 2024-05-07].

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

NLC	Nanostrukturované lipidové nosiče (Nanostructured Lipid Carriers)
AST	Astaxanthin
CBD	Kanabidiol
SLN	Pevné lipidové nanočástice (Solid Lipid Nanoparticles)
O/V	Systém olej ve vodě
TEM	Transemisní elektronová mikroskopie
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
hLNP	Hybridní lipidové nanočástice (Hybrid Lipid Nanoparticles)
LNP	Lipidové nanočástice (Lipid Nanoparticles)
PAL	Povrchově aktivní látka
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha (Hydrophilic-Lipophilic Balance)
HPH	Vysokotlaká homogenizace (High Pressure Homogenization)
V/O/V	Systém voda v oleji ve vodě
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
UV	Ultrafialový (Ultraviolet)
gHSA	Glykovaný lidský sérový albumin (Glycated Human Serum Albumin)
HSA	Lidský sérový albumin (Human Serum Albumin)
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor- $\alpha$
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
pH	Vodíkový exponent
THC	Tetrahydrokanabinol
CB1	Kanabinoidní receptor typu 1
CB2	Kanabinoidní receptor typu 2
HIV	Virus lidské imunodeficiency (Human Immunodeficiency Virus)

---

AIDS	Syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
PdI	Index polydisperzity
MCT	Triglycerid se středně dlouhým řetězcem (Medium-Chain Triglyceride)
TG450	Tego® Care 450
P188	Poloxamer 188
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
CTCAE	Společné terminologické kritérium pro nežádoucí účinky (Common Terminology Criteria for Adverse Events)
DLS	Dynamický rozptyl světla (Dynamic Light Scattering)
D	Translační difúzní koeficient
XRD	Rentgenová prášková difrakce (X-ray Powder Diffraction)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikryl hydrazyl
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry)
EE	Enkapsulační účinnost (Encapsulation Efficiency)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
AFM	Mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy)
C	Koncentrace
$\Delta H$	Entalpie tání
T	Termodynamická teplota
VF	Vodná fáze
OF	Olejová fáze
PE	Pickeringovy emulze

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Struktura lipidové nanočástice [6].....	11
Obrázek 2 Struktura lipozomu [10] .....	12
Obrázek 3 Struktura SLN upraveno podle [11] .....	12
Obrázek 4: Struktura modelů SLN. Model pevného roztoku (A), model jádro-obal (obal obohacený o léčivo) (B), model jádro-obal (jádro obohacené o léčivo) (C) upraveno podle [14].....	13
Obrázek 5 Struktura NLC upraveno podle [17].....	14
Obrázek 6 Typy NLC – Nedokonalý typ (A), Amorfní typ (B), Vícenásobný typ (C) upraveno podle [14].....	14
Obrázek 7 Struktura hLNP [19].....	15
Obrázek 8 Příprava SLN metodou vysokotlaké homogenizace za horka upraveno podle [23] .....	19
Obrázek 9 Příprava SLN metodou vysokotlaké homogenizace za studena upraveno podle [23].....	20
Obrázek 10 Příprava LNP metodou mikroemulze upraveno podle [23] .....	20
Obrázek 11 Příprava SLN metodou sonikace upraveno podle [20] .....	21
Obrázek 12 Schématické znázornění přípravy NLC emulgační metodou odpařování rozpouštědla upraveno podle [24].....	21
Obrázek 13 Příprava SLN metodou dvojité emulze typu V/O/V upraveno podle [20].....	22
Obrázek 14 Příprava SLN metodou extrakce emulze superkritickou kapalinou upraveno podle [20].....	23
Obrázek 15 Vzorec AST [40] .....	27
Obrázek 16 Pozice AST v buněčné membráně upraveno podle [37] .....	28
Obrázek 17 Chemická struktura CBD [52].....	31
Obrázek 18 Homogenizace lipidové a olejové fáze.....	42
Obrázek 19 Distribuce velikosti částic NLC připravených Metodou 1 a Metodou 2.....	50
Obrázek 20 Distribuce velikosti částic NLC s kyselinou laurovou a palmitovou jako pevným lipidem a kyselinou olejovou jako lipidem kapalným .....	52
Obrázek 21 Distribuce velikosti částic NLC připravených s různým stabilizátorem.....	53
Obrázek 22 Distribuce velikosti částic NLC připravených s glyceryl behenátem, Tweenem a různými kapalnými lipidy .....	54
Obrázek 23 Vliv kapalného lipidu a koncentrace stabilizátoru Tween na velikost částic...	56
Obrázek 24 Distribuce velikosti částic NLC připravených s různou koncentrací stabilizátoru Tween a jojobovým voskem jako kapalným lipidem .....	56
Obrázek 25 NLC připravené se stabilizátorem Tween o koncentraci 5 % (vlevo), 2 % (uprostřed) a 1 % (vpravo).....	57
Obrázek 26 Vliv kapalného lipidu a koncentrace stabilizátoru sukcinát na velikost částic	58

Obrázek 27 Distribuce velikosti částic NLC připravených s různou koncentrací stabilizátoru sukcinát a MCT jako kapalným lipidem.....	59
Obrázek 28 Distribuce velikosti částic NLC – konečná formulace pro další práci o složení: glyceryl behenát, kyselina olejová, stabilizátory Tween nebo sukcinát o koncentraci 2 %	59
Obrázek 29 NLC s aktivními látkami – AST (vlevo), CBD (uprostřed) a AST oleoresin (vpravo).....	60
Obrázek 30 Distribuce velikosti částic NLC stabilizovaných Tweenem s aktivními látkami AST, CBD a oleoresin s 10 % AST.....	61
Obrázek 31 Distribuce velikosti částic NLC stabilizovaných sukcinátem s aktivními látkami AST, CBD a oleoresin s 10 % AST.....	62
Obrázek 32 Degradace vzorků NLC obsahujících AST (vlevo) a oleoresin s AST (vpravo) stabilizovaných Tweenem.....	63
Obrázek 33 Kalorimetrické křivky výchozích látek a jejich směsí při prvním ohřevu od 25 do 80 °C.....	67
Obrázek 34 Kalorimetrické křivky výchozích látek a jejich směsí při prvním chlazení od 80 do -10 °C.....	69
Obrázek 35 Kalibrační přímka CBD v ethanolu stanovená pomocí HPLC.....	70
Obrázek 36 2D rekonstrukce a profilový řez 3D snímkem NLC s CBD a stabilizátorem sukcinát (nahore) a 2D rekonstrukce vzorku NLC s CBD a stabilizátorem sukcinát (dole)	71
Obrázek 37 Stanovení stability vzorků NLC s CBD měřením velikosti částic.....	73
Obrázek 38 Distribuce velikosti částic formulace NLC s CBD a Tweenem měřená ihned po přípravě, po 2 týdnech a po 4 týdnech.....	74
Obrázek 39 Distribuce velikosti částic formulace NLC s CBD a sukcinátem měřená ihned po přípravě, po 2 týdnech a po 4 týdnech.....	74
Obrázek 40 Stanovení stability vzorků NLC s CBD měřením $\zeta$ -potenciálu.....	75
Obrázek 41 Stanovení stability vzorků NLC s CBD měřením koncentrace CBD pomocí HPLC.....	76
Obrázek 42 Velikost kapek Pickeringových emulzí obsahujících 100 mg AST oleoresinu v MCT.....	78
Obrázek 43 Velikost kapek Pickeringových emulzí obsahujících 200 mg AST oleoresinu v MCT.....	79
Obrázek 44 Distribuce velikosti kapek Pickeringovy emulze připravené v hmotnostním poměru O/V 5/95.....	80
Obrázek 45 Distribuce velikosti kapek Pickeringovy emulze připravené v hmotnostním poměru O/V 10/90.....	80
Obrázek 46 Distribuce velikosti kapek Pickeringovy emulze připravené v hmotnostním poměru O/V 20/80.....	81
Obrázek 47 Snímky z optického mikroskopu Pickeringových emulzí připravených v hmotnostním poměru O/V 5/95 stabilizovaných Tweenem (vlevo) nebo sukcinátem (vpravo).....	82

---

Obrázek 48 Pickeringovy emulze připravené v hmotnostním poměru O/V 20/80, 10/90 a 5/95 s obsahem 200 mg AST oleoresinu v MCT (OF) .....	83
---	----

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Příklady složek vhodných pro přípravu NLC [15], [20].....	18
Tabulka 2 Přehled použitých látek v rámci preformulační studie .....	39
Tabulka 3 Přehled složení vzorků připravených v rámci preformulační studie spolu s použitou metodou přípravy částic. ....	41
Tabulka 4 Složení připravovaných NLC s aktivními látkami astaxantinem (AST), kanabidiolem (CBD) a oleoresinem obsahujícím 10 % AST .....	42
Tabulka 5 Přehled vzorků pro DSC .....	45
Tabulka 6 Podmínky HPLC analýzy .....	46
Tabulka 7 Navážky vodné (VF) a olejové fáze (OF) pro přípravu 5 g Pickeringových emulzí. Olejovou fází tvořil oleoresin obsahující 10 % AST rozpuštěný v MCT.....	48
Tabulka 8 Velikost částic a Pdl NLC připravených metodami 1 (postupné přikapávání) a 2 (rychlé ochlazení) .....	50
Tabulka 9 Velikost částic a Pdl NLC s mastnými kyselinami jako pevným lipidem .....	51
Tabulka 10 Velikost částic a Pdl NLC připravených s kyselinou laurovou/MCT a různými stabilizátory.....	52
Tabulka 11 Velikost částic a Pdl NLC s glyceryl behenátem jako pevným lipidem, stabilizátorem Tween a různými kapalnými lipidy.....	54
Tabulka 12 Velikost částic, Pdl a $\zeta$ -potenciál NLC připravených s různým kapalným lipidem a stabilizátorem Tween o různé koncentraci.....	55
Tabulka 13 Velikost částic a Pdl NLC připravených s různým kapalným lipidem a stabilizátorem sukcinát o různé koncentraci .....	58
Tabulka 14 Velikost částic, Pdl a $\zeta$ -potenciál NLC s různou aktivní látkou a stabilizátorem .....	61
Tabulka 15 Velikost částic, Pdl a $\zeta$ -potenciál NLC s různým stabilizátorem a různou koncentrací CBD.....	64
Tabulka 16 Velikost částic, Pdl a $\zeta$ -potenciál NLC s aktivní látkou CBD před dialýzou a po dialýze.....	64
Tabulka 17 Výsledky termické analýzy čistých látek a jejich směsí při prvním ohřevu od 25 do 80 °C. Systémy, kde kapalným lipidem je kyselina olejová.....	66
Tabulka 18 Tabulka 18 Výsledky termické analýzy čistých látek a jejich směsí při prvním ohřevu od 25 do 80 °C. Systémy, kde kapalnými lipidy jsou MCT a jojobový vosk .....	66
Tabulka 19 Výsledky termické analýzy výchozích látek a jejich směsí při prvním chlazení od 80 do -10 °C. Systémy, kde kapalným lipidem je kyselina olejová .....	68
Tabulka 20 Výsledky termické analýzy výchozích látek a jejich směsí při prvním chlazení od 80 do -10 °C. Systémy, kde kapalnými lipidy jsou MCT a jojobový vosk .....	68
Tabulka 21 Průměrné hodnoty enkapsulační účinnosti vzorků NLC s obsahem CBD .....	70
Tabulka 22 Výsledky stanovení stability vzorku NLC obsahujícího CBD a Tween .....	72
Tabulka 23 Výsledky stanovení stability vzorku NLC obsahujícího CBD a sukcinát.....	72



---

Tabulka 24 Výsledky měření velikosti emulzních kapek Pickeringových emulzí obsahujících 100 mg AST oleoresinu v MCT .....	77
Tabulka 25 Výsledky měření velikosti emulzních kapek Pickeringových emulzí obsahujících 200 mg AST oleoresinu v MCT .....	78