

Kryogely a jejich využití jako nosičů aktivních látek

Kamila Kunzová

Bakalářská práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Kamila Kunzová
Osobní číslo:	T22954
Studijní program:	B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace:	Biomateriály a kosmetika
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Kryogely a jejich využití jako nosičů aktivních látek

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Vypracujte literární rešerši na zadané téma.

Charakterizujte kryogely a polymery vhodné k jejich přípravě.

Věnujte se metodám přípravy kryogelů a jejich využití se zaměřením na kosmetiku a farmaci.

Praktická část:

Věnujte se přípravě kryogelů s různými typy polymerů pro enkapsulaci aktivních látek.

Připravené kryogely charakterizujte a analyzujte dostupnými metodami.

Zaměřte se na uvolňování aktivní látky z nosiče.

Získané výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] MATTIASSON, B., 2014. Cryogels for Biotechnological Applications. In: O. OKAY, ed, *Polymeric Cryogels: Macroporous Gels with Remarkable Properties*. Cham: Springer International Publishing, pp. 245-281.
- [2] RAZAVI, M., QIAO, Y. and THAKOR, A.S., 2019. Three-dimensional cryogels for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **107**(12), pp. 2736-2755.
- [3] ABITBOL, T., JOHNSTONE, T., QUINN, T.M. and GRAY, D.G., 2011. Reinforcement with cellulose nanocrystals of poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by cyclic freezing and thawing. *Soft Matter*, **7**(6), pp. 2373-2379.
- [4] SOWASOD, N., NAKAGAWA, K., TANTHAPANICHAKOON, W. and CHARINPANITKUL, T., 2012. Development of encapsulation technique for curcumin loaded O/W emulsion using chitosan based cryotropic gelation. *Materials Science and Engineering: C*, **32**(4), pp. 790-798.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

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

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřená na kryogely a jejich využití jako nosičů aktivních látek. Teoretická část se zabývá obecnými informacemi o gelech a jejich přípravou, jsou zde podrobněji popsány kryogely, jejich vlastnosti, proces výroby a aplikace v medicíně a kosmetice. Větší pozornost je věnována gelům a kryogelům jako nosičům aktivních látek. V poslední části jsou popsány Pickeringovy emulze. Praktická část je zaměřená na přípravu kryogelů, ve kterých jsou inkorporovány Pickeringovy emulze s vysokou koncentrací vnitřní fáze (HIPPE), které jsou stabilizovány nanokrystalickou celulózą a obsahují kurkumin. Připravené HIPPE byly charakterizovány pomocí měření velikosti částic a mikroskopie. Připravené kryogely sloužily jako nosiče kurkuminu a bylo sledováno převážně jeho uvolňování na základě rozdílného složení kryogelu.

Klíčová slova: kryogel, emulze, Pickeringovy emulze, gelovatění, nosiče aktivních látek, gel, hydrogel

ABSTRACT

The bachelor thesis is focused on cryogels and their use as carriers of active substances. The theoretical part deals with general information about gels and their preparation, cryogels, their properties, production process and application in medicine and cosmetics are described in detail. More attention is paid to gels and cryogels as carriers of active substances. In the last section, Pickering emulsions are described. The practical part focuses on the preparation of cryogels incorporating high internal phase Pickering emulsions (HIPPE), which are stabilized by nanocrystalline cellulose and contain curcumin. The prepared HIPPEs were characterized by particle size measurements and microscopy. The prepared cryogels served as carriers for curcumin and its release was mainly monitored based on the different cryogel composition.

Keywords: cryogel, emulsion, Pickering's emulsion, gelation, carriers of active substances, gel, hydrogel

Tímto bych ráda poděkovat své vedoucí bakalářské práce paní Ing. Lucii Urbánkové, Ph.D. za pomoc, cenné rady, vstřícnost, za odbornou pomoc v laboratořích a také za poskytnuté materiály, které mi při tvorbě práce velice pomohly. Dále bych jí chtěla poděkovat za čas, který nad tím se mnou strávila a trpělivost. A hlavně bych chtěla poděkovat svojí rodině, za podporu a trpělivost během celé doby studia.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 GELY.....	14
1.1 VLASTNOSTI GELŮ.....	14
1.2 TYPY GELŮ	15
1.3 HYDROGELY.....	15
1.3.1 Rozdělení hydrogelů	16
1.3.2 Biomedicinské aplikace hydrogelů	17
1.4 AEROGELY	17
1.4.1 Příprava aerogelů	17
1.5 EMULGELY	18
2 KRYOGELY.....	19
2.1 PŘÍPRAVA KRYOGELŮ.....	20
2.2 INJEKTOVATELNÉ KRYOGELY	21
2.2.1 Proces přípravy.....	22
2.2.2 Aplikace injekčních kryogelů	22
3 GELY A KRYOGELY JAKO NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK	23
3.2 KRYOGELY JAKO NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK	24
4 PICKERINGOVY EMULZE.....	26
4.1.3 Emulgace za pomoci ultrazvuku	29
4.2 APLIKACE PICKERINGOVÝCH EMULZÍ NA BÁZI NANOCELULÓZY	30
4.3 VYUŽITÍ PICKERINGOVÝCH EMULZÍ V KOSMETICE	30
4.4 VYUŽITÍ PICKERINGOVÝCH EMULZÍ V BIOMEDICÍNĚ	31
5 HIPPE EMULZE	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
8 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....	37
8.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	37
8.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	37
9.1 PŘÍPRAVA DISPERZE NANOKRYSTALICKÉ CELULÓZY	39
9.2 PŘÍPRAVA OLEJOVÉ FÁZE S KURKUMINEM.....	39
9.3 PŘÍPRAVA POLYMERŮ PRO KRYOGELY	39
9.3.1 Příprava polyvinylalkoholu	39
9.3.2 Příprava karboxymethyl celulózy	39
9.4 PŘÍPRAVA PICKERINGOVÝCH EMULZÍ S VYSOKOU KONCENTRACÍ VNITŘNÍ FÁZE	40

9.5	PŘÍPRAVA KRYOGELŮ.....	40
9.6	CHARAKTERIZACE NANOKRYSTALICKÉ CELULÓZY A EMULZÍ.....	43
9.6.1	Měření zeta-potenciálu CNC.....	43
9.6.2	Měření velikosti částic CNC.....	43
9.6.3	Optická mikroskopie.....	44
9.6.4	Měření velikosti částic emulzí.....	44
9.8	UVOLŇOVÁNÍ KURKUMINU Z KRYOGELŮ.....	45
9.8.1	Příprava média pro uvolňování kurkuminu.....	45
9.8.2	Příprava kalibračních roztoků kurkuminu pro kalibrační přímku.....	45
9.8.3	UV-VIS spektrofotometrie pro stanovení obsahu kurkuminu.....	46
10.1	CHARAKTERIZACE NANOKRYSTALICKÉ CELULÓZY JAKO STABILIZÁTORU.....	48
10.1.1	Měření velikosti částic a zeta – potenciál.....	48
10.2	CHARAKTERIZACE EMULZÍ.....	49
10.2.1	Velikost emulzních kapek.....	49
10.3	KRYOGELY.....	50
10.3.2	Uvolňování kurkuminu z kryogelů.....	51
ZÁVĚR.....		56
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		57
SEZNAM OBRÁZKŮ.....		63
SEZNAM TABULEK.....		64
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		65

ÚVOD

Gely řadíme mezi disperzní systémy, kdy se částice gelu spojují do trojrozměrné sítě. Mohou být připravovány z jednoho nebo více polymerů. Mají unikátní vlastnosti jako je nerozpustnost, nekonečná molekulová hmotnost nebo schopnost reverzibilně bobtnat nebo smršťovat se. Podle vlastností nebo chemického složení rozdělujeme gely do mnoha skupin jako např. hydrogely, aerogely, xerogely, emulgely, kryogely a další.

Práce je zaměřena především na kryogely, kdy první zmínka o kryogelech pochází ze 40. let 20. století, přičemž svůj význam a zájem získaly v 80. letech. Výzkum tehdy zahájil Lozinsky spolu s jeho spolupracovníky, kteří studovali princip a mechanismus kryogelace. Kryogely řadíme mezi hydrogely a jejich název je odvozen z řeckého slova „kryos“ a to znamená mráz nebo led. Jak jejich název napovídá, připravují se polymerací z roztoku monomeru a iniciátoru při teplotách pod 0 °C. V dnešní době mají kryogely velké uplatnění hlavně v biomedicině nebo v tkáňovém inženýrství. Nejvíce jsou využity jako nosiče léčiv (aktivních látek), kdy dokážou začlenit a chránit léčivo za účelem zlepšení jeho biologické dostupnosti a účinnosti. Významně pomáhají k léčbě různých onemocnění anebo mohou najít své uplatnění v kosmetice a dermatologii.

Součástí práce byla inkorporace Pickeringových emulzí do kryogelu. Pickeringovy emulze byli zkoumány vědci W.Ramsdem a S.U. Pickeringem v letech 1903–1907. Je to typ emulzí, které jsou stabilizovány pomocí pevných částic buď organického, nebo anorganického charakteru. Jsou použity namísto konvenčních povrchově aktivních látek. Pickeringovy emulze mají specifické vlastnosti jako je vysoká odolnost vůči koalescenci a Ostwaldovu zrání. Připravují se vysokoenergetickou metodou jako je vysokotlaká nebo rotor-stator homogenizace a sonikace. Zájem o Pickeringovy emulze v posledních letech výrazně vzrostl, a to zejména pro aplikace ve zdravotnictví a kosmetice, kde může být použití povrchově aktivních látek nežádoucí, z hlediska jejich iritačního potenciálu. V kosmetice dokážou významně přispět k významnému snížení nebo dokonce odstranění jejich toxicity. Mohou být součástí různých kosmetických formulací, jako jsou například antiperspiranty nebo opalovací krémy. V medicíně mají mnohem širší využití, protože se především používají pro enkapsulaci aktivních farmaceutických složek v dispergované fázi, kdy zabrání degradaci a dokážou kontrolovat rychlost uvolňování aktivních farmaceutických látek. Pickeringovy emulze s vysokou vnitřní fází (HIPPE; High internal phase Pickering emulsions) jsou emulze, které mají poměr vnitřní fáze větší než 74 %. Používají se značně v

potravinářském průmyslu, dále jako nosiče biologických aktivních složek, v kosmetice a farmaceutickém průmyslu a tkáňovém inženýrství. Obecně mají vyšší stabilitu díky nízké pohyblivosti emulzních kapek a díky tomu zabraňují sedimentaci, flokulaci nebo koalescenci.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 GELY

Termín „gel“ je překládán z latinského slova „gelu“ jako mráz, zmrznout nebo ztuhnout. Gel tedy znamená změnu kapalin na pevné nebo polotuhé materiály, které netečou. Přesto si zachovávají některé vlastnosti kapalných materiálu v důsledku elastické nebo semielastické povahy. (Nayak, Das 2018)

Můžeme je definovat jako polotuhé pevné systémy vyrobené z jednoho nebo více polymerů. Ve většině případů jsou polymerní gely systémy polymer/rozpouštědlo. (Nayak, Das 2018) Gely jsou koloidně disperzní systémy, kde se disperzní částice spojují do trojrozměrné sítě, která v závislosti na koncentraci prostupuje disperzním prostředím a mechanicky tento systém zpevňuje. Spojité prostředí je zde jak disperzní prostředí, tak i disperzní podíl. Když vznikne zesíťovaná struktura gelu, tak se disperzní částice nemohou volně pohybovat v disperzním prostředí. Disperzní prostředí je sice kapalné, ale gely mají spíše vlastnosti charakteristické pro tuhý stav. Síly, které působí adhezi disperzních částic mohou být jak chemického, tak fyzikálního charakteru. Vysušením gelu se odstraní disperzní prostředí a vznikne systém, který obsahuje jenom disperzní podíl, tyto systémy se označují jako xerogely. Gelace vysokomolekulárních látek je jedním z důležitých procesů například u výroby vláken, aplikace lepidel nebo zpracování kůže. (Bartovská Lidmila 2005) (Novák Josef a kol. 2008)

1.1 Vlastnosti gelů

Většina gelů má alespoň jednu z následujících vlastností, může to být jejich nekonečná molekulová hmotnost, nerozpustnost a netavitelnost, a schopnost reverzibilně bobtnat nebo smršťovat se. Gely mohou mít i tak velmi různé a odlišné vlastnosti, a to závisí na několika faktorech, jako např. typy polymerních matic, povaha zesíťování, typ polymeru atd. Nejdůležitějšími vlastnostmi jsou bobtnání, synereze, stárnutí a pseudoplastické reologické chování atd. (Nayak, Das 2018)

Gely dokáží bobtnat tím, že absorbují zvýšený objem kapaliny neboli rozpouštědla. Rozpouštědlo proniká do gelové matrice a interakce gel-gel jsou obnoveny prostřednictvím interakce gel-rozpouštědlo. Gely z polyakrylátu mohou být připraveny bobtnáním, tyto vysoce nabobtnatelné gely se nazývají „superabsorbující polymery (SAP)“. SAP při kontaktu s vodným prostředím bobtná a tvoří hydrogelovou strukturu. Také mohou přijmout

vlhkost až v 1000násobku své suché hmotnosti, přičemž absorbované vodné médium udržují i pod tlakem. (Nayak, Das 2018)

Stárnutí gelového systému se projevuje pomalejší spontánní agregací koloidního systému. V gelových systémech stárnutí způsobuje postupné výraznější zesíťování gelujícího činidla. Proces stárnutí pokračuje i po počáteční gelaci, protože koncentrace/množství kapaliny jsou sníženy z nově vyrobených gelových systémů. (Nayak, Das 2018)

1.2 Typy gelů

Podle příslušného chování xerogelu ve styku s kapalinami můžeme gely rozdělit do dvou skupin. Gely reverzibilní neboli elastické, které při vysušení zmenšují svůj objem a přechází na kompaktní xerogely. Jsou schopny při styku s disperzním prostředím přecházet zpátky do původního stavu tzv. bobtnáním. Takto se chovají především makromolekulární gely (Bartovská Lidmila 2005) (Novák Josef a kol. 2008)

Gely ireverzibilní neboli neelastické, které mají ve vysušeném stavu přibližně stejný objem jako původní lyogely, ale jsou porézní. Lyogely je označení pro gely, které obsahují kapalné disperzní prostředí. Při styku s disperzním prostředím jsou schopné sorbovat určité množství kapaliny, ale do původního stavu se nevrátí. (Bartovská Lidmila 2005)

Gely je možné rozdělit i do dalších skupin podle chemického složení disperzního podílu na gely anorganické a organické. Dále podle charakteru disperzního prostředí na hydrogely s vodným disperzním prostředím a organogely, disperzní prostředí v tomhle případě tvoří organické kapaliny. (Bartovská Lidmila 2005) (Novák Josef a kol. 2008) Gely se dají rozdělit i do mnoha dalších skupin jako jsou např. kryogely, aerogely.

1.3 Hydrogely

V roce 1953 se podařilo českému vědci Drahoslavu Límovi připravit hydrogel zesíťováním poly(2-hydroxyethylmethakrylátu). Tento materiál sloužil jako základ pro výrobu prvních měkkých kontaktních čoček. Na tomto objevu se spolu s Drahoslavem Límem podílel i Otto Wichterle. (Ayatullah Hosne Asif et al. 2019)

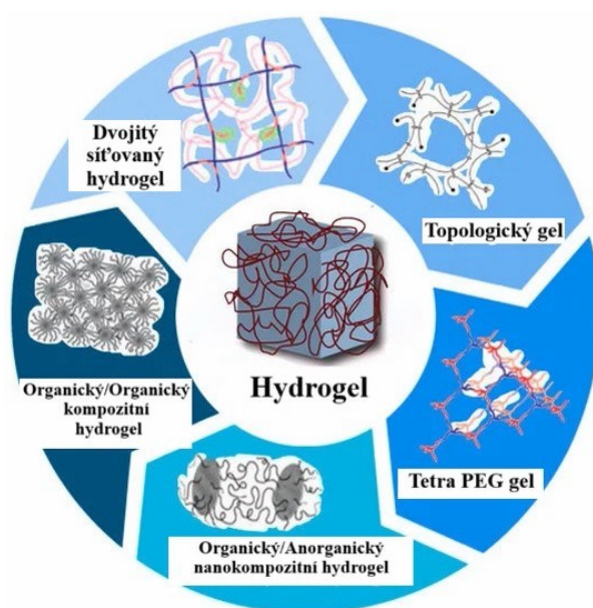
Hydrogel je gel, který dokáže pojmout až stonásobek množství vody, než kolik sám váží v suchém stavu, to znamená, že je silně hydrofilní.

Hydrogely jsou vyráběny z hydrofilních polymerů, které tvoří hydrofilní síť schopnou absorbovat větší množství kapalin nebo biologických tekutin. Obecně se dají vyrábět

z polymerů obsahující různé hydrofilní skupiny, jako jsou např. hydroxylové, karboxylové, amidové a imidové skupiny, skupiny sulfonových kyselin, které jsou buď zabudované, nebo naroubované na jejich polymerní struktury. Schopnost absorbovat tekutiny vzniká důsledkem hydrofilních funkčních skupin základního polymerního řetězce. Pronikání kapalin do struktury hydrogelů umožňuje volnou difúzi molekul rozpuštěné látky, polymer slouží jako hydrofilní matrice pro zadržení kapaliny. Nejdůležitějšími vlastnostmi hydrogelů jsou schopnost zachycovat kapalinu, měkkost, hydrofilita, vyšší bobtnatelnost, elasticita, pružnost a savost. (Nayak, Das 2018) Fyzikální a biochemické vlastnosti hydrogelů zaleží na jejich složení, způsobu polymerace a hustotě zesíťování. Některé hydrogely dokážou poskytovat požadované kombinace vlastností pro různé biomedicínské aplikace. Může to být např. regenerativní medicína a cílený transport léčiv. Nadále je můžeme využívat také v 3D kultivaci buněk pro studium buněčné matrice, buněčné interakce, proliferace, migrace a diferenciaci buněk. (Yue et al. 2015)

1.3.1 Rozdělení hydrogelů

Hydrogely rozdělujeme do 3 základních skupin podle jejich fyzikálních strukturních vlastností: 1) amorfní hydrogely jsou produkovány, když jsou makromolekulární řetězce uspořádány náhodně; 2) semikrystalické struktury jsou charakterizovány hustými oblastmi uspořádaných makromolekulárních řetězců; 3) 3D struktury, za které jsou zodpovědné vodíkové vazby. Dále je můžeme rozdělit podle konfigurace, typu zesíťování a polymerního složení (Obrázek 1). (Chen et al. 2019)



Obrázek 1 Typické struktury hydrogelů (upraveno dle Chen et al. 2019)

1.3.2 Biomedicinské aplikace hydrogelů

Hydrogely se díky svým vlastnostem jako je flexibilita, biokompatibilita a měkkost podobají biologickým tkáním. Proto se používají jako biomateriály v lékařských a farmaceutických aplikacích. (Popat B. Mohite and Sonali S. Adhav 2017)

Hydrogely mohou mít různé fyzikální formy: 1) pevné výlisky – používané v kontaktních čočkách; 2) povlaky – využívané jako krycí vrstva na vnitřních stěnách kapilár; 3) polymerní membrány nebo polymerní fólie – používané jako zásobníky léčiv v transdermálních náplastech; 4) lisované matrice – využívané v kapslích a tabletkách pro perorální podání; 5) mikročástice a kuličky – používané jako zásobníky léčiv při řízeném uvolňování léčiva. (Nayak, Das 2018)

1.4 Aerogely

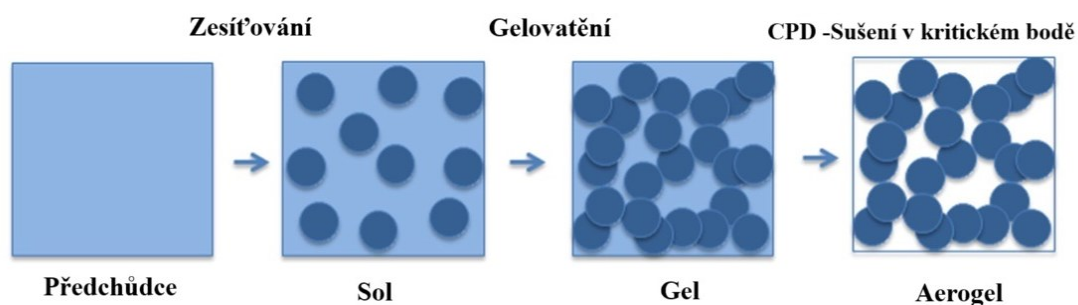
Aerogely byly poprvé vytvořeny z polysacharidů (agar, nitrocelulóza a celulóza) v roce 1931 Samuelem Stephensem Kistlerem z College of the Pacific v Stocktonu v Kalifornii procesem superkritického vysoušení. Jsou výjimečnou skupinou nanoporézních materiálů se zajímavými vlastnostmi. (Maleki et al. 2016) Aerogely jsou jediné gelové materiály, které jsou vyráběné pomocí postupu sol-gel, a to znamená, že kapalná složka gelového systému je nahrazena plynem vhodnou metodou sušení. Výsledný aerogel je pevný, ultralehký, porézní, v některých případech průhledný a je z 90–99 % tvořen vzduchem. Jelikož mají vyšší pórovitost jak na makroskopické, tak mikroskopické úrovni, tak vykazují víceúčelové a jedinečné vlastnosti. Např. vysoce specifický povrch, index lomu, ultranízkou tepelnou vodivost atd. (Nayak, Das 2018)

Vzhledem k vysokému rozsahu pórovitosti jsou aerogely využívány v několika odvětvích. Např. jako tepelná izolace ve stavebnictví a letectví, chemické senzory, biomateriály pro několik lékařských a farmaceutických aplikací atd. Existují různé druhy aerogelů: polymerní aerogely, aerogely na bázi uhlíku, polysacharidů, pryskyřic, polyamidu atd. Nejvíce využívaný aerogel je na bázi oxidu křemičitého, a to z toho důvodu, že má prokázanou vysokou tepelnou izolaci a je opticky transparentní ve viditelné vlnové délce. (Maleki et al. 2016) (Nayak, Das 2018)

1.4.1 Příprava aerogelů

Aerogely lze připravit z vlhkého gelu technologií sol-gel neboli gelovatěním (Obrázek 2). A to tak, že nanočástice jsou zesítňovány a hierarchicky sestaveny do vlhkého gelu.

Zesíťování může nastat spontánně nebo katalýzou pomocí katalyzátoru prostřednictvím hydrolýzy nebo kondenzačních reakcí. Následně podléhají procesu sušení, obvykle superkritickým sušením, které je schopné zabránit kolapsu pórů a zachovat neporušenou porézní texturu materiálu. (García-González et al. 2011) (Maleki et al. 2016)



Obrázek 2 Obecný postup pro syntézu aerogelů (upraveno dle Maleki et al. 2016)

1.5 Emulgely

Emulgely jsou gely na bázi emulze, můžeme je rozdělit na dva základní typy podle dispergované a spojité fáze, a to na typ olej/voda nebo voda/olej. Jejich vznik je řízen vlastnostmi neionických povrchově aktivních látek (PAL), jejichž chování je závislé na teplotě. Při nižší teplotě vznikají micely, pokud je teplota zvýšená, dochází ke konverzi na reverzní micely. Při teplotním přechodu, PAL koexistuje jak s vodnou, tak s olejovou fází. Výsledkem jsou měkké emulgely. (Milutinov et al. 2023) (Nayak, Das 2018)

Mezi jejich vlastnosti patří snadná roztíratelnost, mají transparentní vzhled a také mají lepší fyzikální a biologickou kompatibilitu s kůží. (Herrera-Lavados et al. 2023)

Poslední dobou se emulgely využívají pro podávání léčiv. Lokální uvolňování léčiva z emulgelových systémů je řízeno mechanismem difúze léčiva. Vnitřní fáze emulgelu funguje jako zásobník léčiva, a to se pak pomalu uvolňuje do vnější fáze emulze. Léčivo, které se vkládá do emulgelu penetruje přes *stratum corneum* jak intercelulárními, tak mezibuněčnými cestami. Emulgely mají řadu pozitivních dermatologických vlastností. (Nayak, Das 2018)

Mezi jejich další hlavní využití najdeme v potravinářském průmyslu ke strukturování potravinových systémů za účelem získání přizpůsobených reologických a texturních vlastností, nahrazení nasycených tuků v nízkotučných výrobcích a dodávání citlivých látek. (Milutinov et al. 2023)

2 KRYOGELY

První zmínka o syntéze kryogelů pochází ze 40. let 20. století, ale svůj význam a zájem získaly až v 80. letech. Kdy Lozinsky s jeho spolupracovníky z Institutu organoprvkových sloučenin Ruské akademie věd zahájili výzkum, který byl založený na studiu principů a mechanismu kryogelace. (Kumar 2016)

Slovo kryogel pochází z řeckého slova „kryos“, což znamená mráz nebo led. Kryogely můžeme zařadit do třídy hydrogelů a jsou to heterogenní, netransparentní makroporézní materiály. Vznikají polymerací z roztoku polymerních prekurzorů při teplotách pod nulu, tím vznikají makropóry obklopené elastickou propojenou sítí. Nejběžnějším používaným rozpouštědlem je voda. (Bakhshpour et al. 2019) Voda v kryogelech pomáhá vytvořit makroporézní strukturu s fázovou separací, při které se zmrzlé ledové krystaly vody působí jako porogeny. Jsou to tedy supermakroporézní polymerní gely, které vznikají procesem kryogelování, tj. za mrazu a za použití ledu jako porogenu. Velikost makropórů v kryogelech je mezi 1 μm a 100 μm , velikost se mění v závislosti na podmínkách přípravy. Můžou je ovlivňovat koncentrace a poměry polymeru, rozpouštědla, síťovacích činidel nebo také teplota a rychlost tuhnutí. Z toho vyplývá, že vlastnosti kryogelů závisí na struktuře pórů, tloušťce stěny pórů a hustotě polymeru v nabobtnaných stěnách pórů. Vysoce porézní propojená struktura umožňuje nerušenou difúzi všech rozpuštěných látek, včetně makromolekul a koloidních částic v kryogelech s póry většími než 50 μm . Díky této vlastnosti jsou kryogely atraktivními materiály pro bioseparaci a buněčnou kultivaci. Kryogely mohou být také připraveny ve formě prášku, membrán, kuliček nebo v injekční formě. (Çimen et al. 2021) (Kumar 2016)

Kryogely mohou být vyrobeny z přírodních i syntetických polymerů. Materiál pro vhodnou výrobu kryogelů se vybírá na základě dobré snášenlivosti pro ošetřovanou tkáň. Přírodní materiály podporují buněčnou interakci a mají nízkou toxicitu. Jelikož jsou, ale drahé a mají nízkou mechanickou pevnost, jsou při výrobě scaffoldů vhodnější syntetické materiály. I přesto, že mají nevýhody jako je například vznik infekce, rejekce a i potenciálně nebezpečné vedlejší produkty degradace. (Hixon et al. 2017) Kryogely mohou být rozložitelné, mohou tedy být biodegradabilní nebo nebiodegradabilní, to nám umožňuje kontrolu nad jejich životností a potenciálním dopadem na životní prostředí. (Omidian et al. 2023)

Kryogely způsobily revoluci v oblasti biomedicínského výzkumu. Mají uplatnění v oblasti biomedicíny, biotechnologie a farmacie, a to z důvodu své vysoce propojené a otevřené makroporézní struktury. Díky jedinečným vlastnostem kryogelů, včetně trojrozměrné struktury, značné pórovitosti, konzistence, velkého obsahu vody a vysoké propojitelnosti pórů, se výrazně podobají nativním měkkým tkáním. (Bakhshpour et al. 2019)

Supermakroporozita u kryogelů umožňuje jejich použití bez komplikací v procesu difúze biologických makromolekul. Můžou být použity k čištění makromolekul (proteiny a nukleové kyseliny), k separaci buněčných organel, virů, plazmidů mikroorganismů a buněk savců. (Bakhshpour et al. 2019)

Hlavní rozdíl mezi kryogely a jinými makroporézními materiály je ten, že kryogely mají tkáňovitou elasticitu a mohou být deformovány bez zničení. (Lozinsky, Vladimir I. et al. 2003)

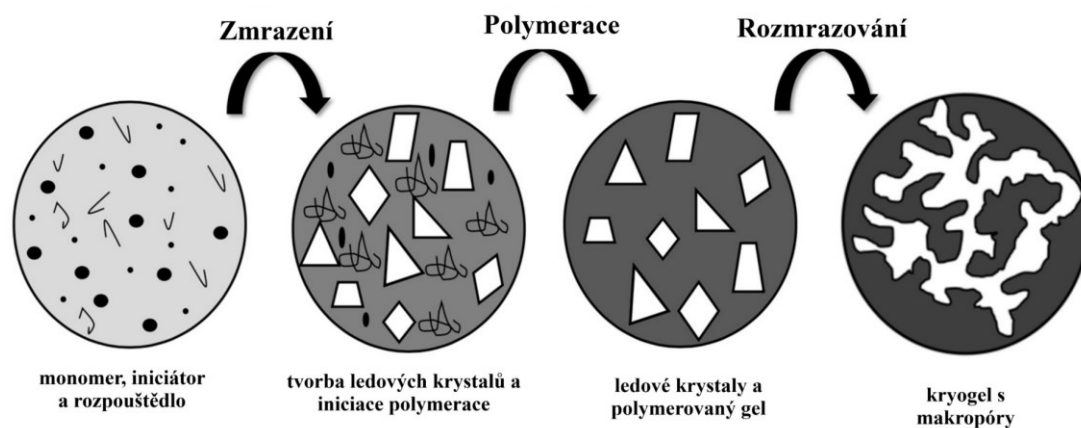
2.1 Příprava kryogelů

Kryogely mohou být vyráběny z přírodních, syntetických nebo hybridních materiálu, a to poskytuje flexibilitu v dostupnosti a přizpůsobení. Do kryogelů lze začlenit více polymerů, a tak zvýšit jejich účinnost. (Omidian et al. 2023)

Nejčastěji se používají pro přípravu kryogelů hydrofilní polymery a nejčastějším rozpouštědlem je voda. Naopak kryogely, které jsou složeny z hydrofobních polymerů, využívají organická rozpouštědla, které musí mít vhodný bod tuhnutí a musí být biologicky nezávadné. Problém v použití spočívá v tom, že v kryogelech zůstávají zbytková rozpouštědla, které musí být odstraněna vhodnými metodami. (Omidian et al. 2023)

Kryogelace je jednoduchá metoda gelace při teplotách pod bodem mrazu, která eliminuje potřebu odstraňovat porogen a vytváří inherentně vzájemně propojené póry ve struktuře scaffoldu. Více jak polovina rozpouštědla vykryštalizuje, a ke gelování dochází v malých nezmrzlých místech kolem krystalů rozpouštědla. Postup kryogelace je popsán na obrázku 3 a skládá se z: 1) fázové separace s formováním ledových krystalů, 2) zesíťování a 3) polymerace. Následuje rozmrazování ledových krystalů za vzniku vzájemně propojené porézní kryogelové sítě. Jako porogeny se zde používají krystaly rozpouštědla. Odstraněním porogenu je dosaženo udržováním kryogelu při teplotách nad bodem tuhnutí rozpouštědla. Gelový roztok se většinou ochladí na teplotu mezi -5 až -20 °C. Při těchto teplotách velké množství rozpouštědla krystalizuje, ale část roztoku gelu zůstává v kapalně formě. Složky

hydrogelů jsou při krystalizaci rozpouštědla koncentrovány v kapalných mikrofázích, které obklopují. Po uplynuté době gelace se kryogel vrátí na pokojovou teplotu a rozmrazováním krystalů rozpouštědla zanechá velké a vzájemně propojené póry. (Henderson et al. 2013) (Ertürk, Mattiasson 2014) (Hellebois et al. 2021)



Obrázek 3 Příprava supermakroporézního kryogelu (upraveno dle Ertürk, Mattiasson 2014)

Kryogely se mohou vyrábět s různou morfologií a vlastnostmi, které bývají přizpůsobeny pro konkrétní aplikaci. Ve srovnání s jinými technikami používanými ke generování makroporézních gelů bývá kryogelování jak časově, tak materiálově efektivní metoda. (Henderson et al. 2013)

2.2 Injektovatelné kryogely

První zmínka o injektovatelných kryogelech byla zveřejněna roku 2012, kde se o nich píše jako o velkoobjemových hydrogelech, které se mohou aplikovat konvenční hypodermickou injekční stříkačkou, aby se zabránilo invazivním chirurgickým implantacím. (Eggermont et al. 2020)

Injektovatelné kryogely se používají k vytvoření 3D porézní struktury, dále pomáhají chránit zapouzdřené biologické látky před degradací a řídit dodávání savčích buněk a biomolekul do hostitelské tkáně. Injektovatelné kryogely mají podobné vlastnosti jako kryogely. Mezi jejich nejvýznamnějšími vlastnostmi patří tvarová paměť a jsou reverzibilně stlačitelné. Pomocí vlastnosti zapamatovat si trvalou makroskopickou strukturu je možné s kryogely manipulovat a dočasně je stlačit bez trvalé deformace po uvolnění tlaku. Kromě toho mohou být díky tvarové paměti formovány do různých tvarů a velikostí. Z tohoto důvodu mohou být preferovaným biomateriálem pro biomedicinské

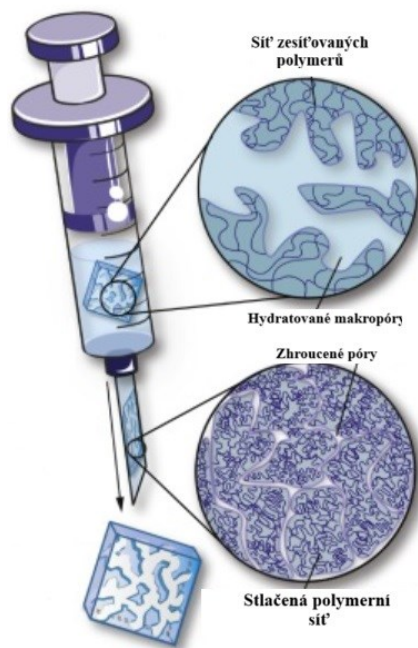
aplikace. Bývají využity například v imunoterapii, tkáňovém inženýrství nebo podávání léku. (Razavi et al. 2019) (Ertürk, Mattiasson 2014)

2.2.1 Proces přípravy

Připravují se kryotropní gelací, přičemž tento proces vede k fázové separaci rozpouštědla na zmrzlou fázi, kdy se vytvoří ledové krystalky a na nezmrzlou fázi, která vzniká kolem krystalů ledu, kde vznikají gelové prekurzory. Následně dochází k zesíťování gelových prekurzorů kolem ledových krystalů. Po úplné polymeraci a následné inkubaci při pokojové teplotě se tyto kryogely s tvarovou pamětí opláchnou vodou, aby se odstranily nezreagované polymerní prekurzory. (Eggermont et al. 2020)

2.2.2 Aplikace injekčních kryogelů

Aplikace se provádí pomocí injekční stříkačky, kdy se volná voda v makropórech kryogelového scaffoldu uvolňuje během injekce, kdy polymerní síť se reverzibilně zhroutí na zlomek své původní velikosti. To nám umožní, aby byl gel protlačen a prošel jehlou (Obrázek 4). (Eggermont et al. 2020)



Obrázek 4 Aplikace injekčního kryogelu (upraveno dle Eggermont et al. 2020)

3 GELY A KRYOGELY JAKO NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK

Nosiče léků v posledních letech vzbuzují vědecký zájem, a to vede k významnému rozvoji. Jsou definovány jako systémy, které mají schopnost začlenit a chránit léčivo za účelem zlepšení jeho selektivity, biologické dostupnosti a účinnosti. Vývoj přispěl k léčbě různých onemocnění a vedl k vědeckému pokroku v oblasti lékové terapie. Nosiče léčiv představují způsob, jak překonat problémy jako je nízká rozpustnost léků ve vodě, biologická degradace většiny léčivých látek a nízká biologická dostupnost. (Milutinov et al. 2023)

Podávání aktivních látek pro místní aplikaci se běžně využívá k dosažení lokalizovaných účinku na kůži pro kosmetické i dermatologické účely, kdy se provádí aplikace na zdravou nebo nemocnou pokožku. Používá se k léčbě různých kožních onemocnění, jako je lupenka, akné nebo ekzém. Formulace pro lokální aplikaci vykazují systémové účinky prostřednictvím jejich transdermálního podávání. Výhodou téhle aplikace je zabránění degradace v žaludku a častému podávání léku. (Milutinov et al. 2023)

Velmi často byly jako nosiče léků používány lipozomy, a to hlavně díky jejich bezpečnosti a schopnosti začlenit hydrofilní a hydrofobní léčiva, nicméně kvůli jejich fyzikální a chemické nestabilitě docházelo k vedlejším účinkům, a nedocházelo k řízenému uvolňování léčiv. Z toho důvodu se začali široce využívat přírodní polymerní materiály, a to hlavně díky jejich biokompatibilitě a degradovatelnosti. Mezi polysacharidové materiály pro řízené uvolňování aktivních látek patří chitosan, škrob, celulóza a alginát sodný. Pro dodávání hydrofobních léčiv se používají cyklodextriny. (Zagni et al. 2023) (Li et al. 2019)

Například nanokrystalická celulóza (CNC) a nanofibrilární celulóza (NCF) jsou polysacharidové nanomateriály, které vykazují jedinečné vlastnosti jako vysoká pevnost, modifikovatelnost, biokompatibilita a vysoký specifický povrch. To vede k potenciálnímu použití v biomedicině, pro účely jako je podání léků, obvazy na rány, implantace léků a tkáňové inženýrství. (Li et al. 2019) Dalším materiálem vhodným pro uvolňování aktivních látek jsou cyklodextriny (CD), které díky své jedinečné struktuře dokáží enkapsulovat hydrofobní látky. Bývají úspěšně využívány jako pomocné látky pro solubilizaci špatně rozpustných léčiv. CD je zodpovědný za enkapsulaci, biologickou dostupnost a rychlost uvolňování léčiva. Využívají se např. v obvazech na rány, kde je důležité sterilní prostředí v cílové oblasti. (Zagni et al. 2023)

3.1 Hydrogely jako nosiče aktivních látek

Hydrogely patří mezi moderní, slibné a tzv. „smart“ nosiče pro cílené dodání léku hlavně díky svým fyzikálním vlastnostem, které minimalizují nevýhody konvenčního podávání léčiv. Zesíťované hydrofilní polymerní sítě hydrogelů dokáží zachycovat velké množství vody. Díky těmto vlastnostem a schopnosti napodobovat biologické prostředí jsou široce používány v tkáňovém inženýrství a rekreativní medicíně. Pro biomedicinské aplikace je důležitý výběr polymerů, protože musí splňovat následující požadavky, nesmí být toxické a imunogenní, musí udržet sterilitu a zajišťovat vhodnou stabilitu *in vivo*. Hydrogelové scaffoldy mohou napodobovat extracelulární matici, tak aby se podařilo přichycení a růst buněk. Velkou nevýhodou hydrogelů je neschopnost dodávat hydrofobní léčiva. (Milutinov et al. 2023) (Savina et al. 2021)

3.2 Kryogely jako nosiče aktivních látek

Kryogely se díky své makroporézní struktuře využívají ve farmaceutických aplikacích jako nosiče léčiv. Díky rozmrazování a zmrazování se vytváří různě zesíťovaná struktura, která ovlivňuje průchod aktivní látky. Je nezbytné, aby systém pro uvolňování léčiva odpovídal fyziologické potřebě pacienta ve správný čas a případně na správném místě. Tyto chytré nosiče by měli mít jednu ze zásadních vlastností jako je správná ochrana léčiva, přesně řízené uvolňování, lokální zacílení a samoregulaci terapeutického účinku. I přesto je velmi náročné přidat všechny tyto funkce do jednoho systému. (Bagri et al. 2011) (Sowasod et al. 2012)

3.3 Kryogely v tkáňovém inženýrství

Makroporézní kryogely poskytují lepší vlastnosti než nanoporézní hydrogely. Díky jejich vysoce propojené makroporézní struktuře umožňují rychlé vrůstání a expanzi buněk, dále také umožňují rychlou výměnu kyslíku, živin a metabolických odpadů, což vede k usnadnění transportu a kultivaci buněk. Z tohoto důvodu jsou kryogely atraktivní materiál pro skladování a transport kryokonzervovaných buněk. Když jsou vystaveny vysokým tlakovým silám kryogely se dokážou plně zotavit do původního stavu, a to díky jejich houbovým elastickým vlastnostem. Právě díky tomu se s nimi dá snadno manipulovat a můžeme je aplikovat do injekčních stříkaček, to umožňuje minimální invazivní podání buněk a proteinů. (Sievers et al. 2021)

Mezi další výhody jejich makroporézní struktury jsou 3D kultivace a separace nanočástic (buněk, plazmidy, viry a buněčné organely). (Mikhalovsky et al. 2011) (Dainiak et al. 2010)

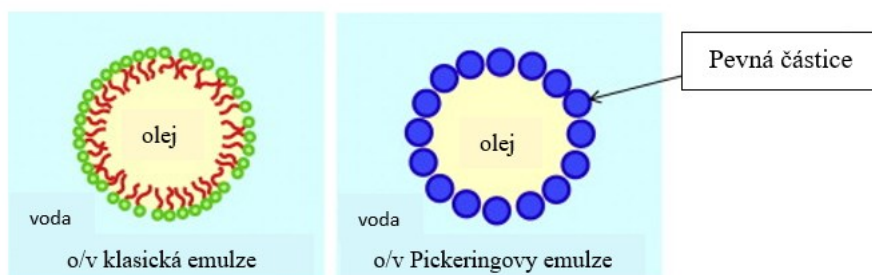
Tkáňové inženýrství je založeno na principu kultivace buněk ve 3D scaffoldech za podmínek, které jsou nezbytně nutné pro vývoj buněk ve funkční tkáni. Tkáňový nebo buněčný biomateriál by měl po implantaci do pacienta postupně degradovat a nahradit přirozenou tkán v těle. Případně se může do poraněné tkáně implantovat scaffold, který stimuluje tělu vlastní buňky k opravě tkáně. Kryogelové scaffoldy díky své vysoké poréznosti a velké velikosti pórů poskytují strukturní prostor, který je vhodný pro zachování a migraci buněk a dále umožní výměnu živin mezi scaffoldem a prostředím. Kryogelové scaffoldy jsou připravovány z velké škály syntetických a přírodních materiálů jako např. PEG, poly(2-hydroxyethylmethakylát), želatina, chitosan, dextran, alginát a dalších. (Dainiak et al. 2010) (Mikhalovsky et al. 2011)

4 PICKERINGOVY EMULZE

První zmínka o Pickeringových emulzích se objevila ve vědecké literatuře na počátku 20. století, kdy se jednalo o studii emulzí stabilizovaných částicemi. V roce 1903 vědec W. Ramsden a v roce 1907 vědec S.U. Pickering nezávisle za sebou prokázali, že pevné koloidní částice, jako jsou například jemný jíl a sraženina síranu měďnatého s vápnem, mohou stabilizovat rozhraní mezi dvěma nemísitelnými fázemi. I přesto, že první s objevem těchto emulzí přišel W. Ramsden, dostali název po druhém vědci Pickeringovi, proto tedy emulze stabilizované částicemi nazýváme "Pickeringovy emulze". (Rayner et al. 2014)

Zájem o Pickeringovy emulze v posledních 10 letech vzrostl zejména pro aplikace ve zdravotnictví a kosmetice, kde může být používání povrchově aktivních látek nežádoucí. Povrchově aktivní látky jsou při stabilizaci nahrazovány právě pevnými částicemi. U kosmetických emulgátorů nebo synteticky vyráběných povrchově aktivních látek dochází k omezení a častým kontrolám, a jejich použití je často regulováno z důvodu, že spousta z nich při opakovaném a dlouhodobém používání způsobují kožní iritace. (Kalashnikova et al. 2011) (Rayner et al. 2014)

Pickeringovy emulze jsou tedy typem emulzí, které jsou stabilizovány pomocí pevných částic anorganického nebo organického charakteru namísto konvenčních povrchově aktivních látek (Obrázek 5). Stabilizují rozhraní mezi dvěma nemísitelnými kapalinami pomocí pevných částic a ty snižují mezifázovou energii systému a tím vzniká stabilní emulze. Částice obvykle o průměru menším než 200 nm, mohou být tvořeny například oxidem zinečnatým a titaničitým nebo oxidem křemičitým. (Patravale, Mandawgade 2008) (Harman et al. 2019)



Obrázek 5 Rozdíl mezi emulzí a Pickeringovou emulzí (upraveno dle Chevalier, Bolzinger 2013)

U emulzí mohou vznikat dva typy, a to buď emulze typu voda v oleji (V/O) nebo olej ve vodě (O/V). To, který typ vznikne, je dáno smáčivostí částic, která je popsána Youngovou rovnicí a třífázovým kontaktním úhlem θ . Obecně se stabilní Pickeringovy emulze tvoří, když se kontaktní úhel částice na rozhraní fází blíží 90° . Emulze O/V se tvoří, když jsou částice středně hydrofilní ($\theta < 90^\circ$), zatímco emulze V/O se tvoří, když jsou částice mírně hydrofobní ($\theta > 90^\circ$). (Harman et al. 2019) Díky stabilizaci pevnými částicemi mají Pickeringovy emulze specifické vlastnosti. Jsou vysoce odolné vůči koalescenci, což je proces spojování dvou nebo více kapek emulze v jednu o větším objemu a menším povrchu, tedy menší povrchové energii. A jsou dlouhou dobu stabilní vůči Ostwaldovu zrání. Dlouhodobá stabilita je závislá především na složení emulze, také může být ovlivněna i metodou přípravy, jelikož velikost emulzních kapiček je řízená smykovým namáháním při emulgačním procesu. (Chevalier, Bolzinger 2013)_(Patravale, Mandawgade 2008)

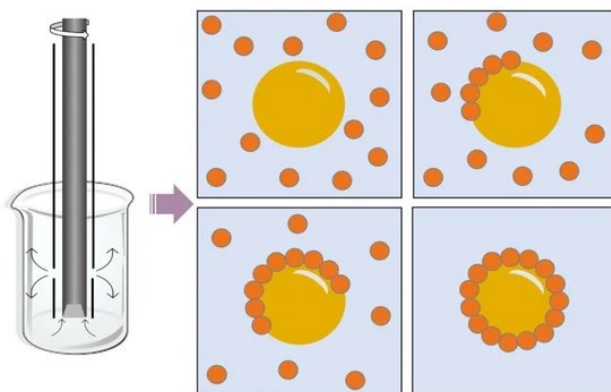
4.1 Metody přípravy

Pro přípravu Pickeringových emulzí se využívají vysokoenergetické metody jako například zařízení rotor-stator nebo vysokotlaká homogenizace a sonikace. Je důležité, aby se kapky emulze začaly tvořit přibližně stejnou rychlostí jako je zachycení stabilizujících částic na mezifázovém rozhraní. Mezi dostupnými metodami pro přípravu Pickeringových emulzí ve větším objemu (scaling-up), je možné použití metod rotor-stator a vysokotlakých homogenizačních procesů.

V posledních letech při přípravě Pickeringových emulzí vzrůstá zájem o membránové emulgační a mikrofluidní techniky. Dají se využít pro zlepšení formulace v kosmetických produktech nebo také pro výrobu emulzí s nízkou polydisperzitou. Výhodou je také, že při těchto metodách není potřeba zahřívání, což je vhodné pro přípravu emulzí, které obsahují termolabilní sloučeniny. (de Carvalho-Guimarães et al. 2022) (Guzmán et al. 2022)

4.1.1 Homogenizace pomocí mechanismu rotor-stator

Homogenizátory rotor-stator se skládají z rotujícího lopatkového rotoru, který se otáčí kolem své vlastní osy, a ten je připojený k stacionárnímu statoru. Kapičky v emulzi se tvoří pomocí kombinace vysokorychlostní rotace kapaliny a smykových sil vznikajících mezi rotorem a státorem, kdy kapalný vzorek je tažen na jeden konec směsi a vysokou rychlostí je vytlačován skrz otvory statoru (Obrázek 6). (de Carvalho-Guimarães et al. 2022)



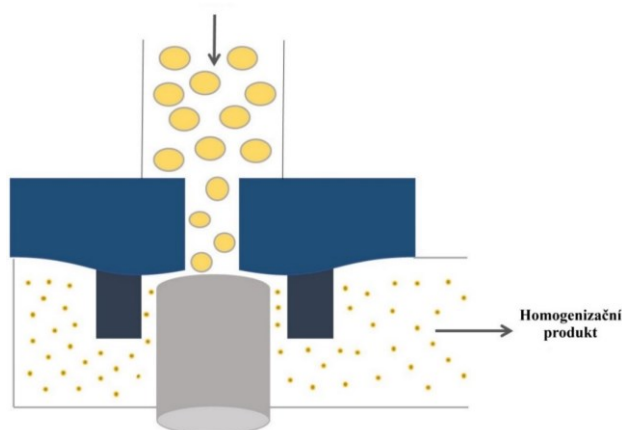
Obrázek 6 Znáznornění procesu homogenizace pomocí rotoru-statoru (upraveno dle de Carvalho-Guimarães et al. 2022)

Výhodou homogenizátorů rotor-stator spočívá ve snadné instalaci, snadném čištění a použití zařízení, mají také relativně vysokou výtěžnost a proces emulgace trvá převážně jenom několik minut. Umožňují přípravu velkých objemů emulze a zajišťují emulgaci různých typů kapalin, z toho důvodu jsou široce využívány při přípravě kosmetických emulzí a dalších průmyslových produktů. (Wu, Ma 2016) (Guzmán et al. 2022)

Mezi jejich nevýhody patří, že dokážou homogenizovat pouze jeden vzorek najednou. Při homogenizaci, kdy se překonává energetická bariéra pomocí vysokého mechanického smyku, může docházet k rozpadu agregátů částic, a to má za následek vysokou polydisperzitu kapiček emulze, a z toho důvodu je nezbytná optimalizace procesu. (Wu, Ma 2016)

4.1.2 Vysokotlaká homogenizace

Vysokotlaková homogenizace je kontinuální emulgační proces neboli vícestupňový proces (Obrázek 7). Toto zařízení obsahuje vysokotlaký ventil, který zapříčiní, že se jedna kapalina transformuje a rovnoměrně rozptyluje do malých kapiček uvnitř druhé kapaliny. Patří mezi vysokoenergetické metody, které dokážou rozbít olejovou a vodnou fázi za vzniku drobných kapiček emulze. (de Carvalho-Guimarães et al. 2022)

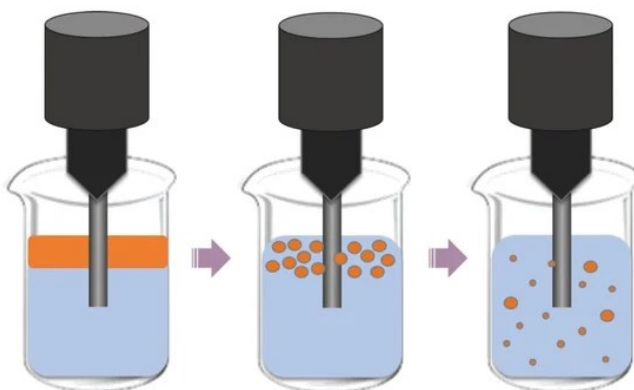


Obrázek 7 Schéma vysokotlakového homogenizátoru (upraveno dle de Carvalho-Guimarães et al. 2022)

Výhodou vysokotlakového homogenizátoru je schopnost kontinuálně vyrábět a získávat malé a rovnoměrné kapky. Nevýhodou je vysoká cena, riziko degradace během procesu, vysoká energie, a to, že metoda je omezena na výrobu pouze zředěných emulzí s nízkou viskozitou. (Guzmán et al. 2022)

4.1.3 Emulgace za pomoci ultrazvuku

Sonikační zařízení využívá kavitace vyplývající z interakce mezi směsí a ultrazvukem. Kavitace způsobuje rozpad kapiček, díky rychlé tvorbě a kolapsu bublin v kapalině (Obrázek 8). Ultrazvuková energie se koncentruje v blízkosti sondy, a to způsobí kavitaci, která připraví emulzi s menšími kapičkami emulze. Smykové napětí a kavitace způsobené ultrazvukem podporuje adsorpci stabilizátoru na dvoufázovém rozhraní. V důsledku toho bude velikost kapiček emulze menší a stabilita bude větší. Výhoda této metody spočívá v tom, že velikost kapiček emulze klesá podle doby sonikaci emulze a taky díky ultrazvuku dochází k výrobě vysoce stabilních emulzí. Nevýhoda této metody je vysoká spotřeba energie, z toho důvodu jsou i vysoké provozní nároky. (Ma et al. 2019) (de Carvalho-Guimarães et al. 2022) (Guzmán et al. 2022)



Obrázek 8 Ultrazvukové zařízení pro emulgaci (upraveno dle de Carvalho-Guimarães et al. 2022)

4.2 Aplikace Pickeringových emulzí na bázi nanocelulózy

Rostlinná a agroprůmyslová nanocelulóza se rozsáhle využívají pro stabilizaci Pickeringových emulzí. Částice nanocelulózy jsou obecně považovány za hydrofilní částice, ale díky jejich krystalické povaze mají amfifilní vlastnosti a jsou vhodné jako stabilizátory pro Pickeringovy emulze. Nanocelulóza má schopnost produkovat emulze s vysokou stabilitou, která může trvat několik měsíců za různých extrémních podmínek. Nanocelulóza, která má vysoký poměr stran, dokáže tvořit síť, která zvyšuje dlouhodobou stabilitu a soudržnost emulzí. (Bertsch, Fischer 2020) Mezi její výborné vlastnosti patří nízká toxicita, chemická stabilita, obnovitelnost a biokompatibilita. Díky těmto vlastnostem je nanocelulóza velmi žádaná pro širokou škálu aplikací v kosmetice v krémových a gelových bázích, ve výrobcích osobní péče nebo jako nosič v systémech podávání léčiv a bioaktivních látek pro farmaceutické a potravinářské aplikace, kde může docházet k přímému kontaktu mezi produkty a lidmi nebo zvířaty. (Chu et al. 2020)_(Teo et al. 2022)

4.3 Využití Pickeringových emulzí v kosmetice

Použití Pickeringových emulzí v kosmetice může přispět k významnému snížení nebo dokonce odstranění toxicity a eliminaci podráždění, které vznikají při použití běžných povrchově aktivních látek. Pro vhodné zabudování, postupné uvolňování a transdermalní absorpci aktivních látek, je výhodné použití Pickeringových emulzí, protože částice zvyšují tuhost kapiček. Pickeringovy emulze se dají využít pro mnoho formulací kosmetických přípravků, jako jsou například opalovací krémy, bělicí produkty, produkty proti stárnutí, antiperspiranty a produkty v péči o vlasy. (Guzmán et al. 2022) (Guo 2021)

Pickeringovy emulze mají výhodu oproti běžným emulzím v tom, že výroba je levnější, jsou bezpečnější, netoxické, mají lepší stabilitu. (Guo 2021)

Vývoj Pickeringových emulzí pro kosmetické aplikace je stále omezený z důvodu nedostatečného množství dostupných studií zabývajících se použitím kosmeticky přijatelných sloučenin. Jedná se zejména o nedostatek vhodných toxikologických testů, a také z důvodu různé snášenlivosti a citlivosti na kůži. (Guzmán et al. 2022)

4.4 Využití Pickeringových emulzí v biomedicíně

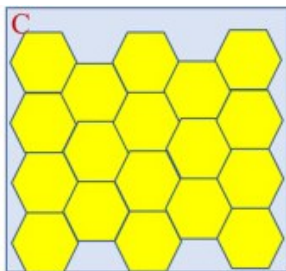
Ve farmacii a biomedicíně se emulze používají v mnoha produktech, jako jsou krémy, gely, vakcíny a další. Pickeringovy emulze se převážně používají pro zapouzdření aktivních farmaceutických složek (API) v dispergované fázi, aby se zabránilo degradaci a docházelo ke kontrole rychlosti uvolňování API v těle. V několika studiích se uvádí, že za pomoci nanocelulózy se enkapsulují bioaktivní sloučeniny v emulzích O/V, výsledkem je tvorba stabilních emulzí s antimikrobiálním účinkem. Pickeringovy emulze se díky svým viskoelastickým vlastnostem využívají také k léčbě nemocí, biozobrazování a biosnímaní nebo biokatalýze. (Chu et al. 2020) (Chen, J. et al. 2017)

I zde existuje mnoho problémů spojených s aplikací Pickeringových emulzí, může to být například velká velikost kapiček PE, které mohou být problémem pro intravenózní podání. Dále se jedná o orálně aplikované Pickeringovy emulze, které se setkávají s vysokým pH a s vysokou koncentrací enzymů a mikrobů v orálním a gastrointestinálním traktu, a to může ovlivnit jejich strukturní integritu. (Harman et al. 2019b)

5 HIPPE EMULZE

HIPPE (High internal phase Pickering emulsions) neboli Pickeringovy emulze s vysokou koncentrací vnitřní fáze jsou emulze s poměrem vnitřní fáze vyšší než 74 %. Vytváří gelovitou strukturu s viskoelastickými vlastnostmi. Pro své jedinečné vlastnosti jako je vysoká nosnost a krémová textura se široce používají v potravinářském průmyslu jako alternativa k hydrogenovaným tukům a olejům, dále se využívají jako nosiče biologicky aktivních složek, v inkoustech pro 3D tisk, v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu a také ve tkáňovém inženýrství. (Wang, L. et al. 2024) (Shi et al. 2020)

Ve srovnání s emulzemi s normální fází vykazují HIPPE obecně vyšší stabilitu díky nízké pohyblivosti emulzních kapek, a proto jde snáz zabránit destabilizačním jevům jako je sedimentace, flokulace nebo koalescence. Kapičky oleje jsou v HIPPE obvykle polydisperzní nebo jsou deformovány a mají tvar mnohostěnu, jak lze vidět na obrázku 9. Spojitá fáze se zde tvoří tenký film, který odděluje disperzní fázi, což vede k lepšímu prostorovému využití celkového objemu emulze. (Wang, Z. et al. 2024)



Obrázek 9 Mikrostruktura HIPPE (upraveno dle Shi et al. 2020)

HIPPE mají vynikající stabilitu vůči fyzikálním, chemickým a mikrobiologickým změnám. Stabilitu v některých případech ovlivňuje pH, koncentrace elektrolytu a proces emulgace. Pro stabilizaci se využívají pevné nebo koloidní částice, které mají silnou adhezi a mohou být nevratně adsorbovány na rozhraní olej-voda, a to zajišťuje trvanlivost emulzí na měsíce nebo dokonce roky. Některé pevné částice, které se používají pro stabilizaci Pickeringových emulzí, jsou biokompatibilní a méně toxické než povrchově aktivní látky. V posledních letech se HIPPE dají stabilizovat specifickými částicemi na bázi biopolymerů, jako jsou proteiny nebo polysacharidy. Široká škála proteinů dostupná z přírodních zdrojů umožňuje vyrábět emulze se specifickými vlastnostmi, které se využívají především ve farmacii a potravinářství. (Bago Rodriguez, Binks 2022) (Wang, L. et al. 2024) (Abdullah et al. 2020)

6 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

V posledních letech technologie nano/mikroenkapsulace zvyšuje zájem v potravinářském a farmaceutickém průmyslu pro různé aplikace, jako je zvýšená ochrana a řízené uvolňování. Průběhem enkapsulace (zapouzdření) se převážně dosahuje vytvoření polymerní matrice k ochraně aktivních a citlivých látek, jako jsou polyfenoly a vitamíny, které jsou nejvíce náchylné k oxidační nebo tepelné degradaci během skladování nebo výroby potravin. (Sowasod et al. 2012)

Lozinsky a kol. (Lozinsky, V. I. et al.) studovali kryotropní gelovatění pro potravinářské a farmaceutické aplikace. V současné době nebylo publikováno příliš studií o enkapsulaci olejové fáze s aktivní látkou do kryogelů za účelem kontroly uvolňování. V této studii byl vyvinut kryogelový systém na bázi NaCMC, chitosanu a κ -karagenanu pro enkapsulaci olejové fáze. Kurkumin byl vložen do olejové fáze jako modelová složka. Enkapsulační systém byl vytvořen tak, aby se dal použít ve zmíněných aplikacích. Ve studii byla zkoumána vhodná sol-gel formulace, efekt bobtnání, účinnost enkapsulace, chování kurkuminu při uvolňování ze získaných kryogelů z hlediska poměru κ -karagenanu/CMC, molekulové hmotnosti chitosanu, rychlosti ochlazování/zmrazování a pH fosfátového pufru. (Sowasod et al. 2012) (Lakkis 2016a)

Emulze, hydrogely, lipozomy a další systémy jsou široce využívány v medicíně a veterinářství jako nosiče léčiv. Nejběžnějším a nejdéle používaným systémem v kosmetice a farmakologii jsou emulze. Nejčastěji jsou jako média pro podávání léčiv používány emulze typu olej ve vodě. Mezi možné potenciální využití emulzí patří jejich použití jako nosičů lipofilních léčiv, systémů s prodlouženým účinkem, zvýšení propustnosti buněk pro léčiva a k zajištění cíleného podávání léčiv. V nedávných studiích byla připravena řada gelů, které byly obohaceny o emulzní systémy. Díky tomu bylo prokázáno, že kompozitní gely, které obsahují emulze, jsou účinnými absorbenty lipofilních organických látek, a proto se dá očekávat, že tyto systémy budou mít značný praktický význam jako účinné systémy pro podávání léčiv. (Komarova et al. 2012)

Ve studii autora Ari a spol. (Ari et al. 2021) použili polyvinylalkohol (PVA), který je netoxický a biokompatibilní syntetický polymer s velmi dobrými fyzikálně-mechanickými a viskoelastickými vlastnostmi pro enkapsulaci kyseliny tříslové (TA) a kurkuminu (Cur). v této studii byly testovány kryogelové kompozity PVA:TA a PVA:TA:Cur, byly stanoveny jejich antioxidační a antimikrobiální vlastnosti, a rovněž

hemolytické a koagulační účinky. Bylo zjištěno, že kryogelové kompozity PVA:TA mají nevýznamný účinek na koagulaci krve, naopak kryogel PVA a kryogelový kompozit PVA:TA:Cur mají účinky koagulační.

Rituparna Saha a Prakriti Tayalia (Saha, Tayalia 2022) použili hřebíčkový olej, který začlenili do želatino-chitosanových kryogelů, které byly použity jako antibakteriální dermální náhražky a k inhibici infekce, které významně zpomalují hojení ran. V prvním kroku byla hodnocena cytotoxicita oleje v různých koncentracích pomocí testu MTT, kde bylo zjištěno, že vysoké koncentrace oleje byly toxické pro různé typy buněk. Tyto studie naznačují, že ačkoliv je hřebíčkový olej dobře zaveden v tradiční medicíně, lze ho použít jen v určitém koncentračním rozmezí k dosažení pozitivních přínosů. Dále byly kryogely s obsahem oleje testovány na jejich fyzikální vlastnosti a antibakteriální účinnost, pro zjištění jejich vhodnosti jako náhrada kůže. Výsledkem antibakteriální účinnosti hřebíčkového oleje, bylo zjištěno, že inhibuje růst *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* v koncentracích nad 250 µg/ml, což bylo totožné s výsledky cytotoxicity. Hlavním aspektem, který byl zodpovědný za tento účinek, je přítomnost eugenolu, který tvoří hlavní složku hřebíčkového oleje.

7 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na téma kryogely a jejich využití jako nosičů aktivních látek. Teoretická část se zaměřuje na kryogely, kde jsou popsány různé metody přípravy, jejich typické vlastnosti a využití v biomedicíně a kosmetice. Dalším důležitým tématem jsou Pickeringovy emulze, které byly inkorporovány do kryogelů.

Cíl praktické části byl především zaměřen na přípravu kryogelů a emulzí s kurkuminem, které byly následně zabudovány do kryogelů. Připravené kryogely se lišily v přítomnosti karboxymethyl celulózy (CMC) a nanokrystalické celulózy (CNC). Cílem bylo sledovat vliv CMC a CNC na uvolňování kurkuminu z kryogelů.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

V následujících seznamech jsou sepsány všechny materiály a přístroje, které byly využity v praktické části bakalářské práce.

8.1 Použité chemikálie

- Saboderm TCC RSPO MB (MCT olej; Caprylic/Capric triglyceride, ACE Trade, Česká republika)
- Kurkumin (Sigma Aldrich, Německo)
- Chlorid sodný (NaCl; Merck, Německo)
- Nanokrystalická celulóza (CNC; Celluforce, Kanada)
- Karboxymethyl celulóza (CMC; Sigma Aldrich, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- Polyvinylalkohol (PVA; 146–186 kDa, Sigma Aldrich Německo)
- BRIJ 35 (Sigma Aldrich, Německo)
- Destilovaná voda

8.2 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (Typ SI - 64A Denver Instruments GmbH, Německo)
- Magnetická míchadla (Heidolph Hei-Mix S, Německo; MM4 Lavat Chotutice, Česká republika)
- Sonikační zařízení (Hielscher UP400St, Německo)
- Spektrofotometr (UV-VIS JASCO V-750 PC, USA)
- Mikropipety (DISCOVERY COMFORT, HTL, Polsko)
- Mikropipety (INTECH, MERCI, Česká republika)
- Zetasizer (Malvern Panalytical, Velká Británie)
- Kyveta pro měření velikosti částic (DTS0012)
- Třepačka (Reax top Heidolph Instruments GmbH, Německo)

- Mikroskop (Olympus CX21, Japonsko)
- Skenovací elektronový mikroskop Nova NanoSEM 450 (FEI, Česká republika)
- Digitální orbitální třepačka s univerzální plošinou (A11827, Heathrow Scientific)
- Stříkačkové mikrofiltry 0,2 μm
- Kyvety pro měření zeta-potenciálu (DTS1070)
- Ostatní běžné laboratorní sklo a pomůcky

9 METODIKA

9.1 Příprava disperze nanokrystalické celulózy

Pro přípravu 1% disperze (20 ml) bylo naváženo 0,2 g nanokrystalické celulózy, která byla dispergována v destilované vodě za stálého míchání po dobu 1 hodiny na magnetickém míchadle až do získání homogenní disperze. Hotová disperze byla sonikovaná 3x po dobu 1 minuty při amplitudě 60 %, sonikace pomohla k rozrušení agregátů nanokrystalické celulózy. V posledním kroku byla disperze zředěna na koncentraci CNC 0,5 %. Tato disperze byla použita pro stabilizaci Pickeringových emulzí. Pro přípravu kryogelů bylo potřeba připravit 4% vodnou disperzi nanokrystalické celulózy, a to navážením 4 g CNC a 96 g destilované vody, další postup se shodoval s výše uvedeným. Na závěr bylo pH 4% CNC upraveno na hodnotu pH 6,4.

9.2 Příprava olejové fáze s kurkuminem

Jako olejová fáze emulzí byl použit trikaprin/trikaprylin (MCT olej) s kurkuminem. Olejová fáze byla připravena tak, že do vialky bylo naváženo na analytických váhách 20 mg kurkuminu, ke kterému bylo přidáno 20 g MCT oleje. Připravený MCT olej s kurkuminem byl sonikován 2x po dobu 1 minuty při amplitudě 60 %, sonikace pomohla úplnému rozpuštění kurkuminu.

9.3 Příprava polymerů pro kryogely

9.3.1 Příprava polyvinylalkoholu

Bylo potřeba připravit 100 ml 9% roztoku polyvinylalkoholu. Pro jeho přípravu bylo naváženo 9 g PVA a 91 g destilované vody. Směs byla za teploty 80 °C míchána na elektromagnetické míchadle se zahřevem po dobu 72 h do kompletního rozpuštění PVA. Hodnota pH u polyvinylalkoholu byla upravena na pH 6,4.

9.3.2 Příprava karboxymethyl celulózy

Pro přípravu 100 ml 9% roztoku karboxymethyl celulózy bylo naváženo 9 g CMC, ke které bylo přidáno 91 g destilované vody. Roztok byl za teploty 40–60 °C míchán na elektromagnetickém míchadle 72 do úplného rozpuštění CMC a vzniku homogenního roztoku. Po rozpuštění bylo pomocí 1M HCl a pH metru upraveno pH na 6,4.

9.4 Příprava Pickeringových emulzí s vysokou koncentrací vnitřní fáze

Do kryogelů byly inkorporovány Pickeringovy emulze s vysokou koncentrací vnitřní fáze, tzv. HIPPE. Tyto emulze byly připraveny následujícím způsobem. Jako první bylo nutné připravit tzv. primární emulzi (O/V 10/90), do vialky byl navážen 1 g olejové fáze (MCT s kurkuminem), 9 g 0,5% disperze CNC a jako poslední bylo přidáno mikropipetou 450 μ l 1M NaCl pro usnadnění emulgace. (Capron et al. 2017) Následovala sonikace této směsi po dobu 1 minuty při amplitudě 60 %. Vialka se vznikající emulzí byla po dobu sonikace vložena do ledové lázně, aby se předešlo tepelné degradaci kurkuminu.

HIPPE byla připravena tak, že do vialky bylo naváženo 5 g primární emulze. Tato vialka byla umístěna do ledové lázně a po dobu 5 minut byla sonikována při 60% amplitudě. Během sonikace bylo k primární emulzi postupně přikapáno 5 ml olejové fáze. Výsledná emulze obsahovala 55 % olejové fáze a byla stabilizována cca 0,25 % CNC, nicméně dle literatury jsou za HIPPE považovány emulze s více než 74 % olejové fáze. (Capron, Cathala 2013) Protože k přípravě emulzí byl využit stejný postup jako pro přípravu emulzí s vysokou koncentrací vnitřní fáze, jsou emulze označovány jako HIPPE.

9.5 Příprava kryogelů

Jako základ kryogelů bylo použito 9% PVA, kryogely vždy obsahovaly HIPPE, a primárně se lišily v obsahu 9% CMC a 4% CNC. Byly připraveny 4 základní formulace kryogelů:

- kryogel A (KG A): PVA + HIPPE
- kryogel B (KG B): PVA + CMC + HIPPE
- kryogel C (KG C): PVA + CMC/CNC + HIPPE
- kryogel D (KG D): PVA + CNC + HIPPE.

Kryogely byly dále rozdílné v celkovém poměru polymerů (PVA, CMC a CNC) a HIPPE, a to 1:1 a 2:1. Příprava kryogelu probíhala tak, že do kádinky byly postupně na analytických váhách naváženy všechny potřebné složky dle tabulek 1 a 2. Pomocí skleněné tyčinky bylo vše dobře homogenizováno.

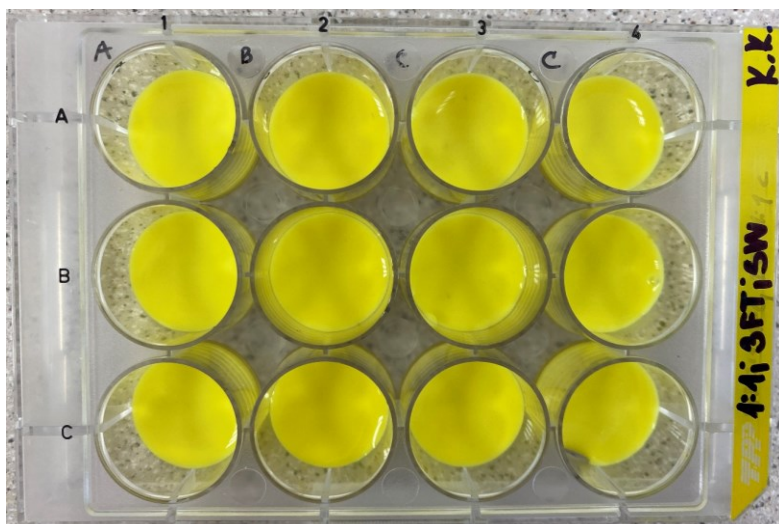
Tabulka 1 Množství jednotlivých složek pro přípravu kryogelu v poměru 1:1

Poměr 1:1				
	PVA	CMC	CNC	HIPPE
A	6 g	x	x	6 g
B	3 g	3 g	x	6 g
C	3 g	1,5 g	1,5 g	6 g
D	3 g	x	3 g	6 g

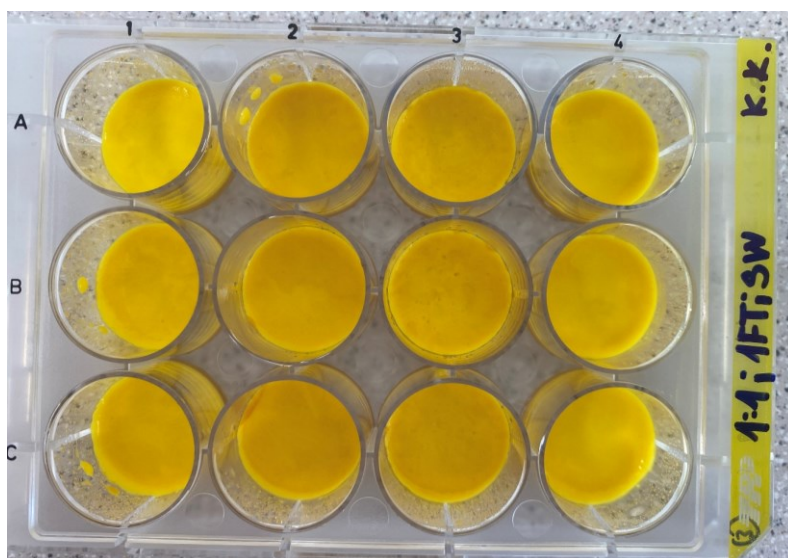
Tabulka 2 Množství jednotlivých složek pro přípravu kryogelu v poměru 2:1

Poměr 2:1				
	PVA	CMC	CNC	HIPPE
A	6 g	x	x	3 g
B	3 g	3 g	x	3 g
C	3 g	1,5 g	1,5 g	3 g
D	5 g	x	5 g	5 g

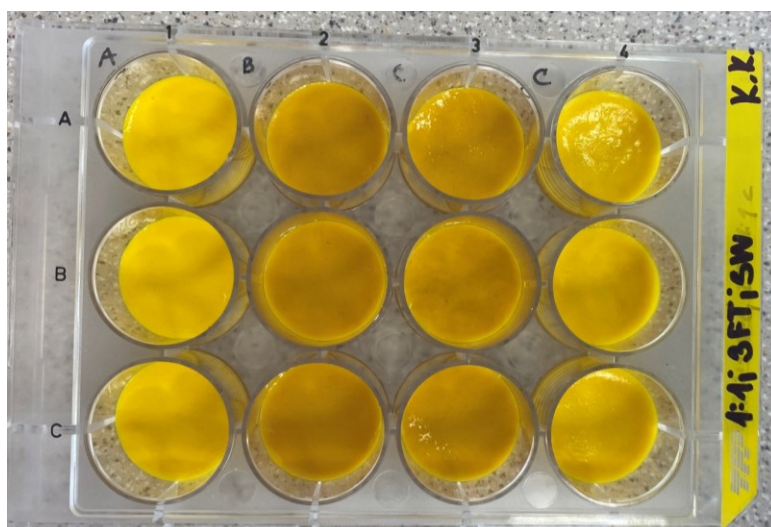
Takto připravené směsi byly následně naváženy do formiček. Jako formy pro kryogely byly použity jamky mikrodestiček, jak je zobrazeno na obrázku 10. Mikrodestička byla položena na analytické váhy a do každé jamky byl navážen 1 g směsi polymerů a HIPPE. Kryogely byly připraveny metodou tzv. kryogelace při teplotách pod bodem mrazu, kdy jako porogen slouží krystalky zmrzlé vody. Po rozmražení vznikají v gelu póry obklopené elastickou polymerní sítí (viz kap. 2. 1). Z tohoto důvodu byla naplněná destička uložena do mrazu (-18 °C) na 24 h. Po uplynutí této doby byly kryogely vyjmuty a nechaly se rozmrazit (8 h), kryogely jsou zobrazeny na obrázku 11. Po rozmražení byl buď každý kryogel uchováván v 10 ml destl. H₂O, tak aby nedocházelo k jeho vysychání, anebo se postup zmrazování/rozmrazování (freeze-thawing; FT) ještě 2x zopakoval (obrázek 12). Každý typ kryogelu byl připraven ve 3 replikátech.



Obrázek 10 Kryogel před zmražením



Obrázek 11 Kryogel po prvním zmražení



Obrázek 12 Kryogely po třetím zmražení

Tyto kryogely byly použity pro stanovení uvolňování kurkuminu v závislosti na složení kryogelu a stupni kryogelace (1 cyklus FT vs. 3 cykly FT). Jejich morfologie byla studována pomocí skenovací elektronové mikroskopie.

9.6 Charakterizace nanokrystalické celulózy a emulzí

9.6.1 Měření zeta-potenciálu CNC

Kolem každé částice se nachází elektrická dvojvrstva, která se skládá ze dvou částí, vnitřní vrstva se nazývá Sternova vrstva a obsahuje pevně vázané ionty, vnější vrstva je difuzní, a obsahuje méně vázané ionty. Uvnitř vrstev se nachází hypotetická hranice, kde jsou ionty a částice, které tvoří stabilní celek. A právě potenciál, který se na hranici nachází je zeta-potenciál (ZP). Dá se říct, že ZP je rozdíl potenciálů mezi stacionární vrstvou disperzního prostředí a pohyblivým disperzním prostředím navázaným na dispergovanou částici. ZP udává stabilitu koloidního systému. Částice v koloidní soustavě jsou schopny se vzájemně odpuzovat a nemají tendenci se flokulovat, jenom tehdy když mají velký záporný nebo kladný zeta-potenciál. Pokud mají hodnotu ZP kladnější než +30 mV nebo zápornější než -30 mV, jsou tyto koloidní roztoky stabilní. (Anon.2013)

Zeta-potenciál byl stanoven u částic nanokrystalické celulózy pomocí přístroje Zetasizer. Vzorek byl připraven tak, že z 1% disperze nanokrystalické celulózy bylo mikropipetou odebráno 12 μ l, které byly následně smíchány s 3 ml destilované vody. Vzorek byl důkladně promíchán a pomocí injekční stříkačky nadávkován do kyvety DTS1070. Kyveta byla vložena do přístroje, na kterém byly nastaveny příslušné parametry měření. Pro vzorek byly provedeny 3 měření.

9.6.2 Měření velikosti částic CNC

Pomocí přístroje Zetasizer lze změřit i velikost koloidních částic, měření je založeno na dynamickém rozptylu světla. Jeho podstatou je měřit Brownův pohyb, který vztahuje k velikosti částic. Částice jsou osvětleny laserem a analyzuje se fluktuace intenzity rozptýleného světla. Přístroj Zetasizer vypočítá velikost částic na základě měření rychlosti kolísání intenzity v určitém bodě. Toto kolísání je způsobené konstruktivním a destruktivním sčítáním fází rozptýleného světla, kdy světlé a tmavé oblasti získávají a ztrácejí intenzitu. (Anon.2013)

Pro měření velikosti částic nanokrystalické celulózy bylo do plastové kyvety s uzávěrem napipetováno 3,5 μ l CNC (1%) a k vzorku byl přidán 1 ml destilované vody. Vzniklá

disperze byla důkladně promíchána. Pro měření byly zadány potřebné parametry a měření probíhalo ve třech opakováních.

9.6.3 Optická mikroskopie

Optický mikroskop, je zařízení pro rozpoznání předmětu, které nejsme schopní rozeznat pouhým okem. Optický mikroskop se skládá ze 3 spojných soustav, a to z objektivu, okuláru a kondenzoru. Princip optického mikroskopu spočívá v procházení světla objektivem, které se zobrazí na okuláru. Objektiv funguje jako lupa, díky které se zvětší obraz, a okulárem sledujeme odraz, který se stává detailním a viditelným díky rozlišovací schopnosti mikroskopu, která závisí na typu použitého světla a jeho konstrukci. (Grubb 2012)

Pickeringovy a HIPPE emulze, byly pozorovány pomocí optického mikroskopu Olympus CX21. Na podložní sklíčko bylo pipetováno 10 μ l vzorku emulze, vzorek se překryl krycím sklíčkem a mikrostruktura emulzí byla pozorována při zvětšení 400x. Mikroskopické snímky byly upraveny pomocí softwaru ImageJ.

9.6.4 Měření velikosti částic emulzí

Velikost a distribuce emulzních kapek byly změřeny na přístroji Mastersizer 3000, jeho princip spočívá v laserové difrakci a dokáže stanovit velikost částic v rozmezí od 10 nm do 3,5 mm. Hlavním princip je měření úhlové změny intenzity rozptýleného světla, to znamená, že velké částice se rozptylují pod malými úhly a malé částice pod velkými úhly. Pomocí detektoru se data analyzují a vypočítá se velikost částic, která je vyjádřena jako ekvivalent průměru koule $D(4,3)$. (Mastersizer 2021)

Měření velikosti emulzních kapek bylo provedeno pomocí tzv. mokré cesty za pomoci jednotky „Hydro“, která obsahuje demineralizovanou vodou, ve které je vzorek dispergován. Jednotka „Hydro“ je opatřena míchadlem, jehož otáčky byly nastaveny na 2200 ot./min. Měření probíhalo za teploty 25 °C, kde parametry byly následující: absorpance emulzních kapek byla nastavena na hodnotu 0,001 a refrakční index na hodnotu 1,421. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a výsledná hodnota byla vyjádřena jako průměrná hodnota. Výsledky udávající velikost kapek jsou uvedeny jako objemově vážený průměr $D(4;3)$ v μ m.

9.7 Charakterizace kryogelů

9.7.1 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) je mikroskop, který využívá jako zdroj záření proud elektronů. K zobrazování se využívá pohyblivý svazek elektronů, který zobrazí detaily objektu, které není možné vidět při použití optického mikroskopu. SEM funguje na principu pohybu úzkého svazku elektronů po dílčích místech vzorku. Podle toho, jak dopadají elektrony a interagují s materiálem, vzniká signál o určité intenzitě. Ten se přenesení do detektoru a následně vyhodnotí. (Leamy 1982)

Před skenovací elektronovou mikroskopií byly vzorky kryogelů zlyofilizovány a mikroskopem byl pozorován povrch kryogelů. Kryogely byly rovněž ponořeny do kapalného dusíku a byly zlomeny, tak aby mohla být pozorována i jejich struktura na lomu. Vzorky byly zaprášeny Au/Pd k zamezení kumulace náboje na povrchu. Kryogely byly pozorovány při zvětšení 500x a byly foceny pomocí CBS detektoru při 5 kV SEM mikroskopem Nova NanoSEM 450.

9.8 Uvolňování kurkuminu z kryogelů

Kryogely s obsahem kurkuminu byly zkoumány z ohledu jejich využití jako nosiče aktivních látek, kde kurkumin patří mezi lipofilní aktivní látky. Z tohoto důvodu byla u kryogelů sledována schopnost uvolňovat kurkumin do média, které se skládalo z destilované vody a lipofilního surfaktantu Brij 35 v množství 0,5 %. Uvolňování kurkuminu z kryogelů bylo sledováno po dobu 504 h a množství kurkuminu bylo stanoveno pomocí UV/VIS spektrofotometrie.

9.8.1 Příprava média pro uvolňování kurkuminu

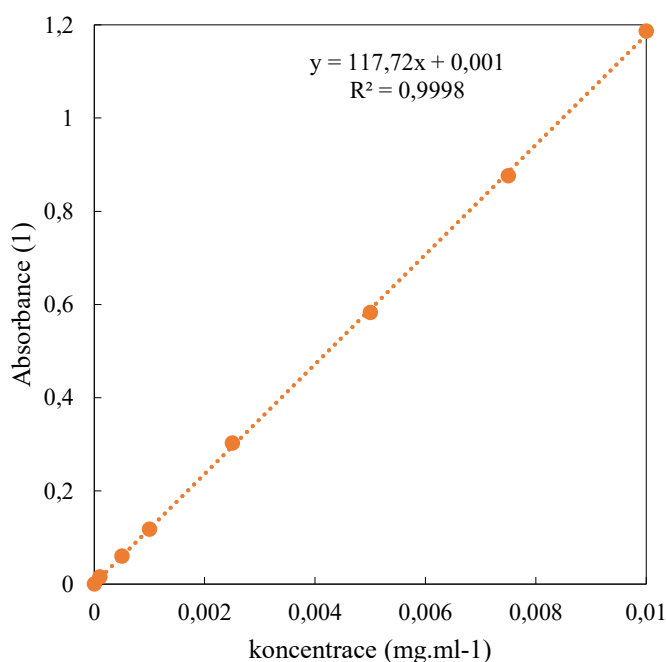
Jako první bylo připraveno médium 0,5% Brij 35 v destilované vodě. Na jeho přípravu bylo naváženo 5 g Brij 35, které bylo postupně rozpuštěno v 1 litru vody.

9.8.2 Příprava kalibračních roztoků kurkuminu pro kalibrační přímku

Koncentrace kurkuminu po dobu uvolňování z kryogelu do média byla zjištěna pomocí metody kalibrační přímky. Jako první bylo nutné připravit zásobní roztok kurkuminu, kdy bylo naváženo 0,0250 g kurkuminu, rozpuštěno v médiu a doplněno na objem 50 ml. Pro lepší rozpustnost byl zásobní roztok sonikován 3x po dobu jedné minuty při amplitudě

60 %. Nicméně ani sonikace nepomohla k úplnému rozpuštění kurkuminu v médiu. Proto byly nerozpustné agregáty odstraněny filtrací přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 5 μm . Vážkovou analýzou filtru byla zjištěna hmotnost nerozpuštěného kurkuminu a výsledná koncentrace zásobního roztoku byla 0,2 mg/ml.

Následně bylo potřeba připravit sérii kalibračních standardů kurkuminu v médiu Brij 35. Nejdříve byl připraven pracovní roztok o koncentraci 0,1 mg/ml naředěním zásobního roztoku médiem. Pracovní roztok byl použit pro přípravu kalibračních standardů kurkuminu v médiu o objemu 10 ml a koncentracích 0–0,01 mg/ml. Kalibrační přímka byla stanovena měřením absorbance kalibračních roztoků na spektrofotometru UV-VIS JASCO V-750 při vlnové délce 423 nm. Závislost absorbance na koncentraci kurkuminu je zobrazena na obrázku 13. Rovnice kalibrační přímky byla $y = 117,72x + 0,001$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9998$.



Obrázek 13 Závislost koncentrace roztoku na absorbanci

9.8.3 UV-VIS spektrofotometrie pro stanovení obsahu kurkuminu

Uvolňování kurkuminu z kryogelu probíhalo do 50 ml média, kryogely byly umístěny na orbitální třepačku, jejíž rychlost třepání byla nastavena na 160 RPM. Uvolňování probíhalo ve tmě, aby se předešlo světelné degradaci kurkuminu. V daných časových intervalech byly odebrány 2 ml média s uvolněným kurkuminem a ke kryogelu byly vždy přidány 2 ml čerstvého média. Vzorky byly odebírány po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48, 72, 96, 168, 336

a 504 hodinách. Každý vzorek byl následně přefiltrován přes mikrofiltr s průměrem pórů 0,2 μm a následně byla proměřena jeho absorbance pomocí UV-VIS spektrofotometrie při vlnové délce 423 nm.

Pro výpočet koncentrace uvolněného kurkuminu pro daný čas byla využita rovnice (1). Dále byl vypočítán kumulativní součet koncentrací ($\sum c$) a dopočítáno uvolněné množství kurkuminu v % podle rovnice (2).

$$c_k = \frac{\bar{\Delta A} - 0,001}{117,72} \quad (1)$$

$$R = \frac{c}{m_k} \cdot 100 (\%) \quad (2)$$

Kde: c_k – koncentrace uvolněného kurkuminu v daném čase [mg/ml]

$\bar{\Delta A}$ – průměr absorbance

q, k – koeficienty rovnice spojnice trendu

m_k – hmotnost kurkuminu v kryogelu [mg]

% R – uvolněné množství kurkuminu [%]

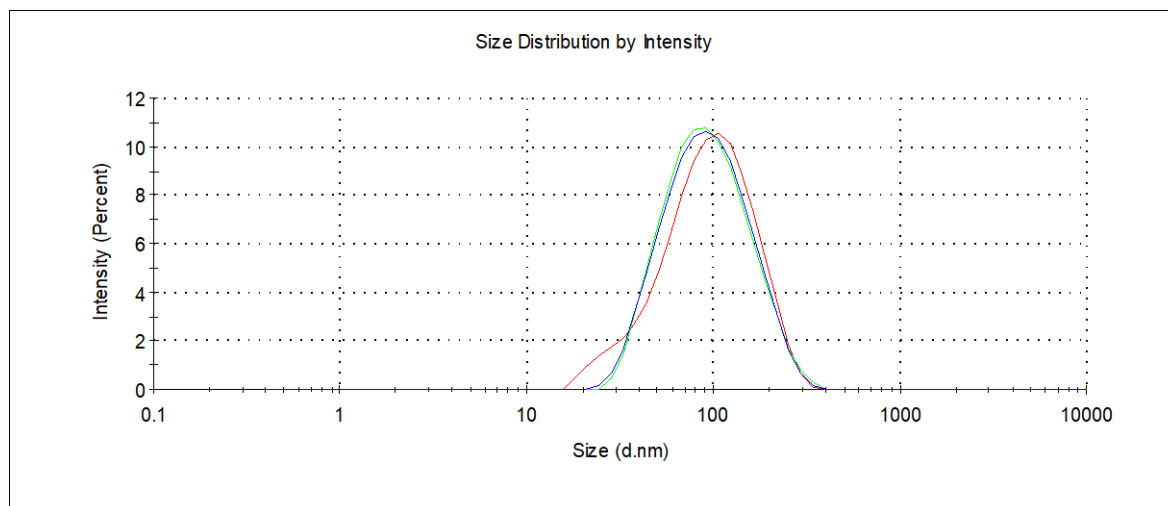
10 VÝSLEDKY A DISKUZE

10.1 Charakterizace nanokrystalické celulózy jako stabilizátoru

10.1.1 Měření velikosti částic a zeta – potenciál

Pro stabilizaci emulzí byla jako stabilizátor vybrána nanokrystalická celulóza, u které byl změřen zeta-potenciál a velikost částic. Stabilitu emulzí a velikost kapek značně ovlivňuje velikost stabilizujících částic, proto by velikost částic měla být řádově menší než požadovaná velikost kapek. Naměřená velikost částic nanokrystalické celulózy (Obrázek 14) byla 71,6 nm. V závislosti na zdroji celulózy a její úpravě se velikost nanokrystalické celulózy pohybuje od 50 do 500 nm. (Purkait, Halder 2021) Ve studii Brinkmann a kolegové (Brinkmann et al. 2016) analyzovali velikost nanokrystalů celulózy pomocí DLS a velikost byla 81,8 nm.

U částic CNC byl následně změřen zeta-potenciál (ZP), kdy jeho hodnota byla -41 mV. Pokud je ZP částic kladný, tak to znamená, že povrch částice je nabitý kladně, zatímco záporný ZP indikuje záporný povrch částice. Pro interakce mezi částicemi v disperzi je hodnota ZP nezbytná, protože opačně nabitě částice se přitahují, a to přispívá k nestabilitě disperzního systému. (Anon.2013) Hodnota ZP CNC je rovněž nižší než -30 mV, což značí koloidní stabilitu částic.



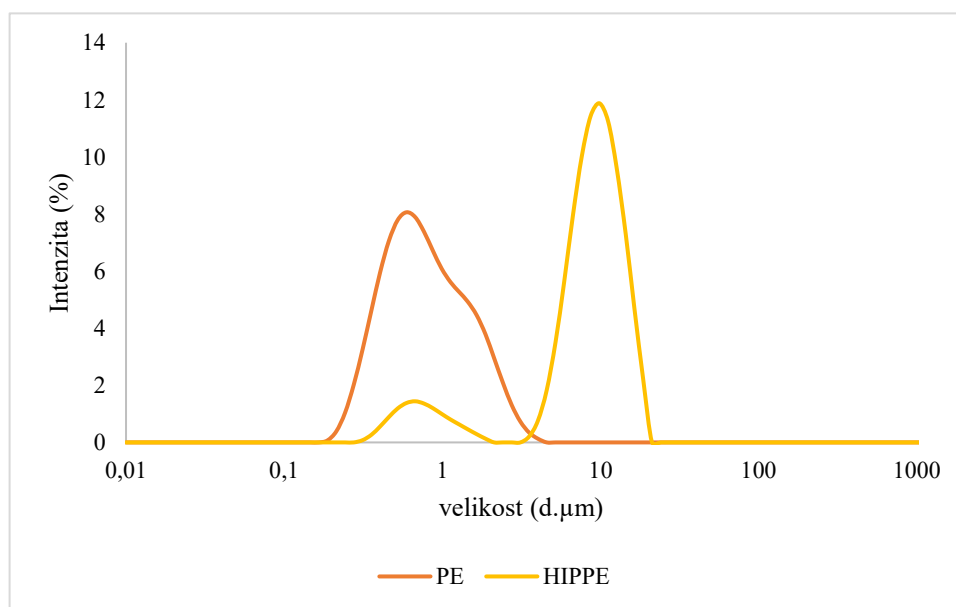
Obrázek 14 Distribuce velikosti částic nanokrystalické celulózy

10.2 Charakterizace emulzí

10.2.1 Velikost emulzních kapek

Velikost emulzních kapek má vliv na stabilitu emulzí a migraci buněk. Je to důležité pro zachování dlouhodobé stability emulzí, přesněji menší kapky jsou více stabilní než větší, a to z důvodu většího povrchu, který zajistí lepší dispergaci emulze, a tak nebude docházet ke srážení. (Albert et al. 2019) Měření velikosti emulzních kapek bylo provedeno pomocí přístroje Mastersizer 3000 a velikost je vyjádřena parametrem $D(4,3)$.

Bylo provedeno srovnání distribuce velikosti emulzních kapek primární emulze a HIPPE (Obrázek 15). První distribuce ukazuje velikost emulzních kapek primární emulze (PE) 10/90, která byla stabilizována 0,5% nanokrystalickou celulózą a podle parametru $D(4,3)$ má velikost $1,01 \pm 0,01 \mu\text{m}$. Tato distribuce je monomodální, emulze obsahuje pouze jednu populaci částic. Druhá distribuce ukazuje HIPPE, která byla stabilizována 0,25 % nanokrystalické celulózą, a má větší velikost emulzních kapek ($D(4,3)$ $9,50 \pm 0,01 \mu\text{m}$), než primární emulze. Distribuce má 2 píky, a je tedy bimodální. Část emulzních kapek v HIPPE má menší velikost, která odpovídá velikosti PE.

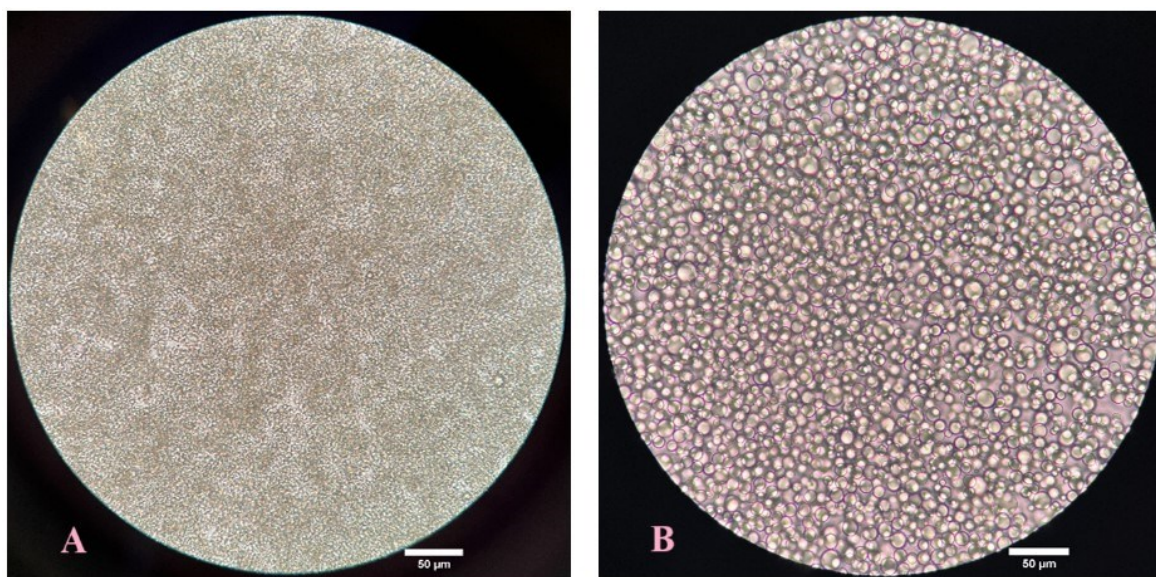


Obrázek 15 Distribuce velikosti emulzních kapek

10.2.2 Mikrostruktura

U primární emulze a HIPPE byly pozorovány emulzní kapky pomocí optického mikroskopu při zvětšení 40x. Mikroskopie podpořila výsledky z měření velikosti částic. Na obrázku 16A je primární emulze, kde vidět, že její mikrostruktura je velmi jemná s malými emulzními

kapkami. Oproti tomu na obrázku 16B vidíme HIPPE, kde je jasně viditelné zvětšení emulzních kapek.



Obrázek 16 Mikrostruktura emulzí: A) primární emulze, B) HIPPE (měřítko 50 µm)

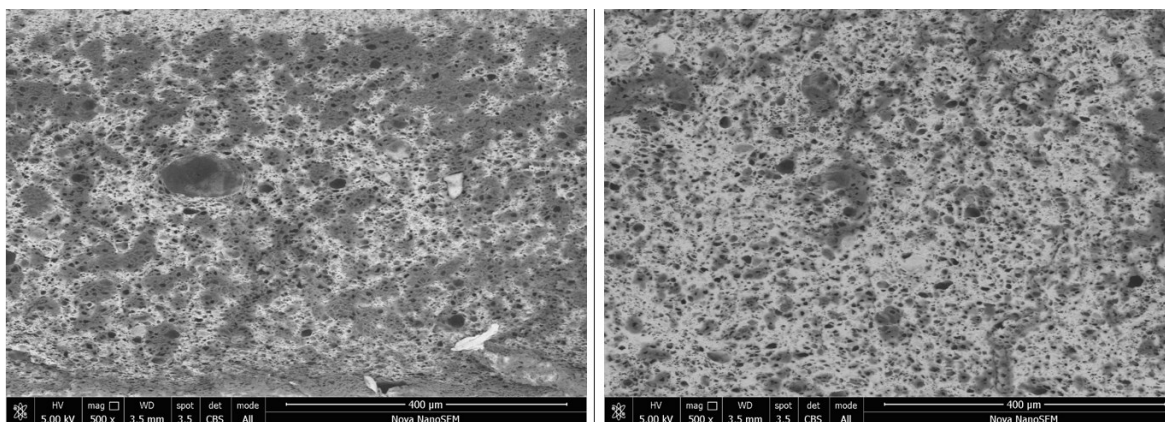
10.3 Kryogely

Struktura kryogelů s inkorporovanými emulzemi byla studována skenovací elektronovou mikroskopií, dále bylo stanoveno uvolňování kurkuminu z kryogelu v závislosti na jejich složení.

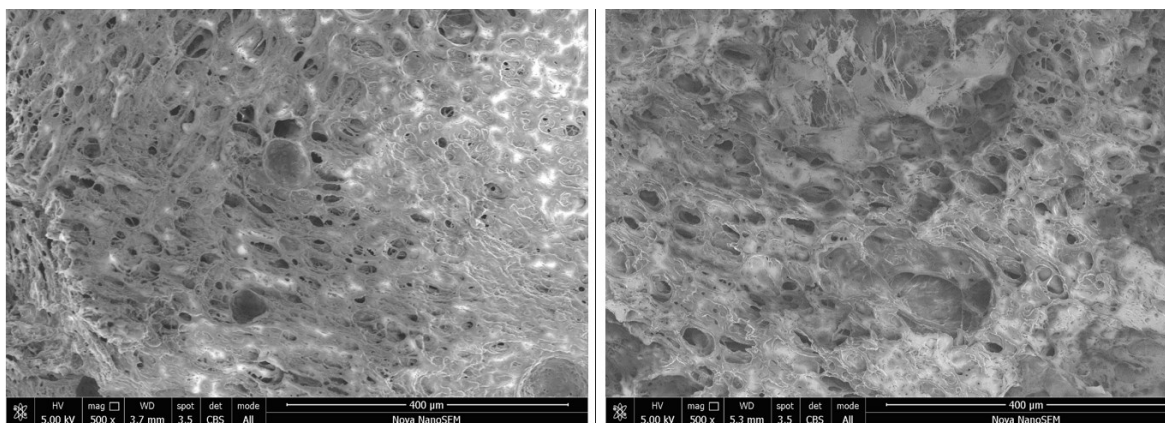
10.3.1 Mikrostruktura

Kryogely byly pozorovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Z připravených kryogelů bude v práci srovnána mikrostruktura kryogelu A, který se skládá z PVA + HIPPE a kryogelu C, který se skládá z PVA + CMC/CNC + HIPPE. Porovnány budou kryogely s různým počtem zmrazování/rozmrazování (freeze-thawing; FT) a poměrem polymery/HIPPE 2:1. Na obrázku 17 lze pozorovat strukturu kryogelu A po 1FT a 3FT na lomu. Kryogel A 1FT má zdánlivě menší póry než kryogel po 3FT. Na obrázku 18 je zobrazena struktura kryogelu C, lze vidět, výrazný rozdíl ve velikosti pórů v porovnání s KG A. Póry jsou mnohem větší a stěny kolem pórů méně silné. Rozdílná struktura kryogelů je způsobená rozdílným složením. Tento trend byl pozorován i u ostatních typů kryogelů (KG B, KG D). Větší množství HIPPE ve formulaci (poměr 1:1) měl rovněž vliv na strukturu, kryogely měly mnohem nižší pórovitost. Pomocí SEM byl pozorován i povrch

kryogelů. Spodní strana byla méně porézní, svrchní naopak více porézní, a to z důvodu sublimace ledu.



Obrázek 17 Mikrostruktura kryogelu A (2:1) 1FT (vlevo) a 3FT (vpravo)



Obrázek 18 Mikrostruktura kryogelu C (2:1) 1FT (vlevo) a 3FT (vpravo)

10.3.2 Uvolňování kurkuminu z kryogelů

Kryogely byly připraveny jako nosiče aktivních látek. Postupné uvolňování kurkuminu do média Brij 35 bylo pozorováno po dobu 504 hodin a následně bylo stanoveno množství uvolněné aktivní látky pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Bližší postup je popsán v kapitole 9.8.

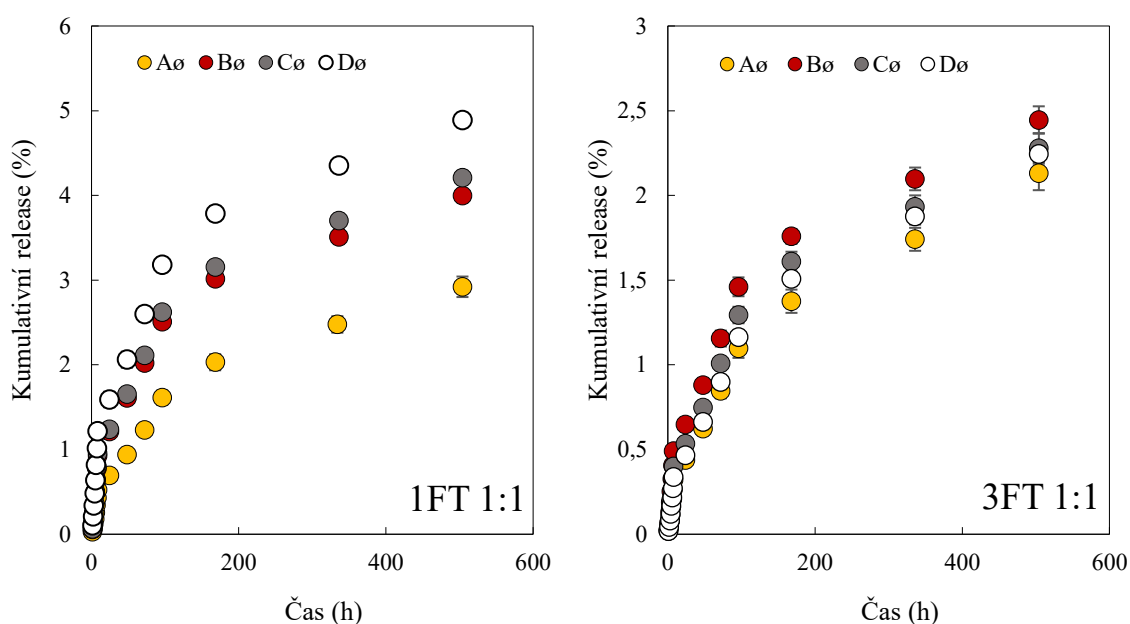
Uvolňování kurkuminu z kryogelu do média bylo sledováno z hlediska složení kryogelu, to znamená, jak složení polymerů ovlivní rychlost uvolňování. Při sledování hrálo také rozdíly, kolikrát byl kryogel zmrazován/rozmrazován, zda jednou nebo třikrát. Posledním parametrem byl také poměr polymery/HIPPE, v jakém byl kryogel připraven (2:1 vs. 1:1).

Obrázky 19 a 20 znázorňují grafy, ve kterých vidíme množství uvolněného kurkuminu v průběhu času v závislosti na jednotlivých typech kryogelu. Z grafů jde vidět, že na

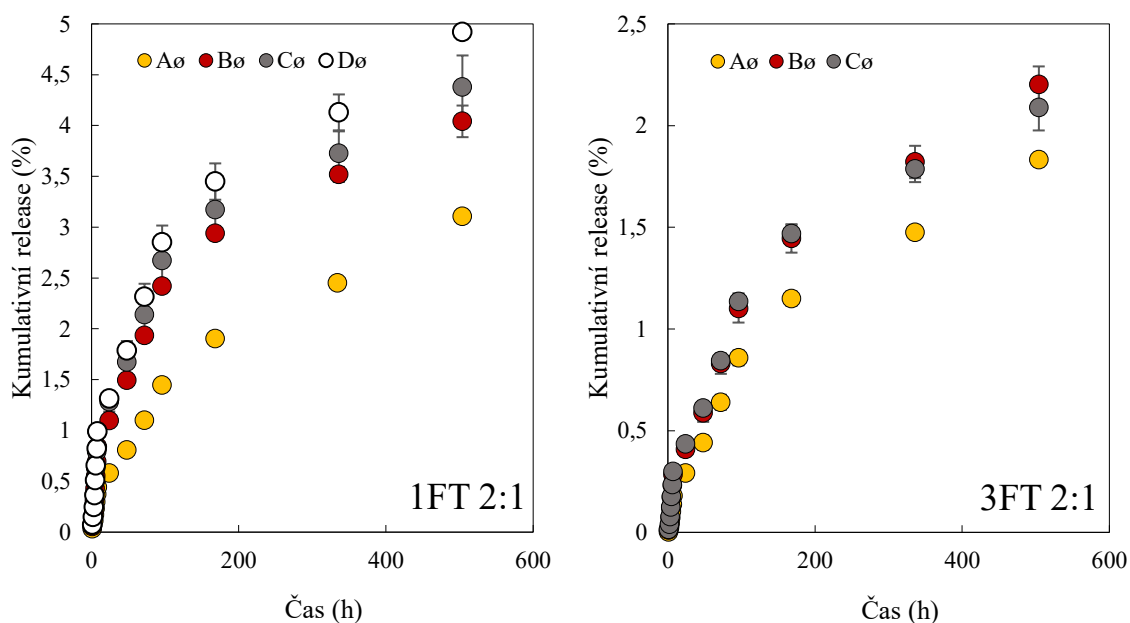
uvolňování kurkuminu má vliv především rozdílné složení kryogelů (KG A, B, C, D) a rovněž počet cyklů FT. Ve všech případech se nejméně a nejpomaleji vždy uvolňoval kurkumin z kryogelu A (PVA+HIPPE). U KG 1FT docházelo k nejrychlejšímu uvolňování z KG D (PVA+CNC+HIPPE). Lze říct, že CNC (KG D) nebo CNC+CMC (KG C) narušují strukturu kryogelu a tím otvírají difuzní cesty pro uvolnění aktivní látky. Celkově se nejvíce aktivní látky uvolnilo z kryogelu D (PVA+CNC+HIPPE) a nejméně z kryogelu A (PVA+HIPPE), protože neobsahoval ani CMC, ani CNC.

Zároveň platí, že čím byl kryogel více zmrazován/rozmrazován (1FT vs. 3FT), tím méně se aktivní látky do média uvolňuje. Což je způsobeno větší mírou zesíťování a krystalinity kryogelu v případě KG 3FT. Toto bylo pozorováno i ve studii (Bagri et al. 2011), kde byly kryogely vyrobeny z PVA v kombinaci se škrobem. Počet FT rovněž vedl ke snížení uvolňování aktivní látky. Čím více rostl počet FT, tím rostla krystalinita gelu, která omezuje mobilitu PVA a celulózových řetězců, a to vede k potlačovanému uvolňování léčiva. Bylo zjištěno, že s rostoucím FT se zmenšuje velikost pórů kryogelů a díky tomu se snižuje počet vstupních molekul vody a vystupujících molekul léčiv. To má za následek nižší množství uvolňování léčiva.

U kryogelů 3FT jsou rozdíly v uvolňování kurkuminu z KG s rozdílným složením mnohem menší (KG A, B, C, D) – rozdíly v množství uvolněného kurkuminu se téměř stírají. Nicméně platí, že nejpomaleji se kurkumin uvolňoval z KG A. U kryogelů 3FT 2:1 chybí uvolňování kurkuminu z KG D, které nebylo z časových důvodů proměřeno.



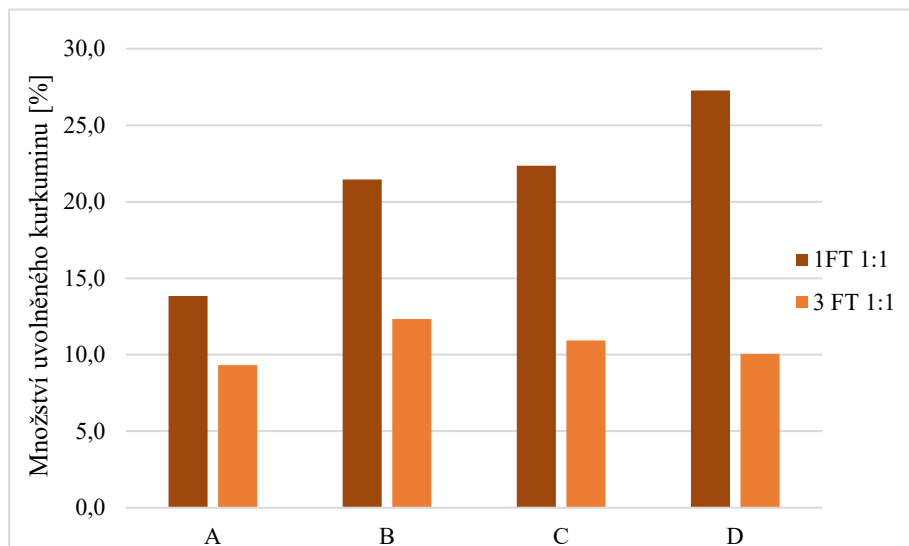
Obrázek 19 Uvolňování kurkuminu v průběhu času v závislosti na typu kryogelu, poměr 1:1



Obrázek 20 Uvolňování kurkuminu v průběhu času v závislosti na typu kryogelu, poměr 2:1

Na obrázku 21 je zobrazeno celkové množství uvolněného kurkuminu z kryogelů, které byly připraveny v poměru 1:1. Tyto výsledky potvrzují závěry z předchozích závislostí. Nejvíce se uvolnil kurkumin do média z kryogelu D (1FT) a to 27 %, a nejméně z kryogelu A (1FT) a to 14 % z celkového množství kurkuminu v daném kryogelu. Z obrázku je rovněž zřejmé, že čím více je kryogel zmrazován/rozmrazován, tím méně se aktivní látka uvolňuje.

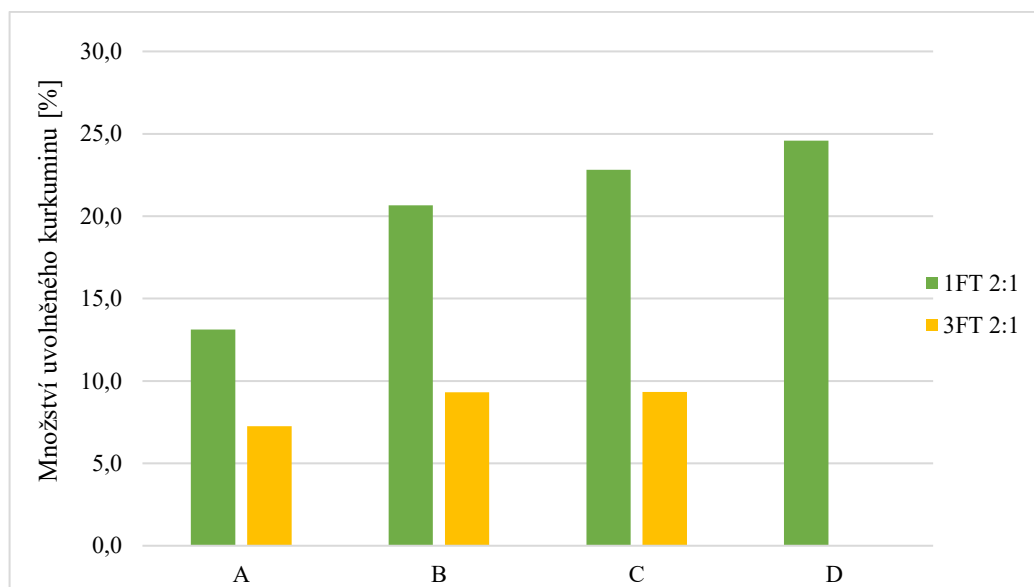
Například z KG C se v případě 1FT uvolnilo 21 % kurkuminu a u KG 3FT se uvolnilo pouze 10 % kurkuminu. Uvolňování je tedy ovlivněno mírou zesíťování, aktivní látka se hůře uvolňuje čím více je kryogel zesíťovaný.



Obrázek 21 Celkové množství uvolněného kurkuminu z KG 1:1

Obrázek 22 znázorňuje graf, kdy byly kryogely připraveny v poměru 2:1, v tomto typu kryogelu bylo celkově nižší množství kurkuminu. Nicméně trend v uvolňování kurkuminu z kryogelů je totožný s KG v poměru 1:1. Nejvíce kurkuminu se uvolnilo z kryogelu D (PVA+CNC+HIPPE) a nejméně z kryogelu A (PVA+HIPPE). Z kryogelů B a C se uvolnilo poměrně stejné množství aktivní látky, rozdíl je minimální. U kryogelů 3FT se stírají rozdíly ve vlivu složení kryogelů ABCD na uvolňování. Dále, jak bylo zmíněno výše, uvolňování je nejvíce ovlivněno počtem FT.

Ve studii (Sowasod et al. 2012) byla enkapsulace kurkuminu do kryogelu založená na chitosanu, κ -karagenanu a karboxymethylcelulóze. Jejich cílem bylo vyvinout systém enkapsulace pro použití kryogelu jako nosiče léčiv. Kurkumin se uvolňoval během 4 dní a jeho uvolněné množství bylo 41–60 %. Z výzkumu bylo zjištěno, že kryogely za pomoci zmrazování mají dobrý potenciál pro aplikace s řízeným uvolňováním v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.



Obrázek 22 Celkové množství uvolněného kurkuminu z KG 2:1

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo připravit kryogely jako nosiče aktivní látky, a zjistit, jak jejich složení a podmínky přípravy ovlivní uvolňování aktivní látky. Bylo sledováno, jestli přítomnost CMC a CNC v PVA kryogelech bude mít vliv na uvolňování kurkuminu. Nejprve byla připravena olejová fáze rozpuštěním kurkuminu v MCT oleji. Kurkumin v této podobě byl enkapsulován do Pickeringovy emulze, která byla následně inkorporována do kryogelu. Emulze použité k přípravě kryogelů byly charakterizovány měřením velikosti emulzních kapek a pomocí optického mikroskopu byla sledována jejich mikrostruktura. Zároveň byla charakterizována i nanokrystalická celulóza, která byla použita jako stabilizátor při přípravě emulzí a byla rovněž součástí kryogelů. Byla u ní změřena velikost částic a zeta potenciál.

Pro přípravu kryogelů byly použity polymery PVA, CMC a částice CNC. Následně byly vytvořeny 4 formulace kryogelů, PVA bylo vždy použito jako základ, každý kryogel obsahoval emulzi a primárně se lišily v obsahu CNC a CMC. Kryogely byly dále rozdílné v poměru polymerů a emulze, a to v poměrech 1:1 a 2:1, a nakonec se ještě lišily v počtu cyklů rozmrazování/zmrazování (FT).

Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu byla pozorována mikrostruktura kryogelů, kde s ohledem na počet cyklů zmrazování/rozmrazování byl více porézní kryogel po 3 cyklech. Přítomnost CMC a CNC zásadně ovlivňuje velikost pórů.

Kryogely byly zkoumány především kvůli uvolňování aktivní látky (kurkumin) do média Brij 35, a to z pohledu, jak uvolňování kurkuminu ovlivňují složky CNC a CMC. Dalším sledovaným parametrem, který ovlivnil uvolňování, byl počet cyklů zmrazování/rozmrazování. Z výsledků bylo zjištěno, že kryogel s 1 cyklem FT uvolní daleko více aktivní látky než se 3 cykly FT. Čím více je kryogel zmrazován/rozmrazován tím více je zesíťovaný a obsahuje více krystalinit, proto se z něho hůře uvolňuje aktivní látka.

V závislosti na složení se nejlépe uvolňovala aktivní látka z kryogelu se složením PVA+CNC+HIPPE. Z toho vyplývá, že nanokrystalická celulóza narušuje strukturu kryogelu a umožňuje její rychlejší uvolňování. Složením kryogelů a počtem cyklů zmrazování/rozmrazování lze kontrolovat rychlost uvolňování aktivní látky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abdullah et al. A review of recent progress on high internal-phase Pickering emulsions in food science. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2020, vol. 106, s. 91-103. ISSN 0924-2244. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224420306397>.

ALBERT, Claire et al. Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society* [online]. 2019, vol. 309, s. 302-332. ISSN 1873-4995; 0168-3659.

ARI, Betul et al. *Poly(vinyl alcohol)-tannic acid cryogel matrix as antioxidant and antibacterial material* [online]. MDPI AG, 2021.

AYATULLAH HOSNE ASIF, A. K. M. et al. *Hydrogel fibre: Future material of interest for biomedical applications* [online]. Scientific Research Publishing, Inc., 2019. 92 s. ISBN 2379-1543.

BAGO RODRIGUEZ, Ana Maria a Bernard P. BINKS. High internal phase Pickering emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2022, vol. 57, s. 101556. ISSN 1359-0294. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029421001400>.

BAGRI, L. P., J. BAJPAI a A. K. BAJPAI. Evaluation of starch based cryogels as potential biomaterials for controlled release of antibiotic drugs. *Bulletin of Materials Science* [online]. 2011, vol. 34, no. 7, s. 1739-1748. ISSN 0973-7669. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12034-011-0385-9>.

BAKSHPOUR, Monireh et al. Biomedical Applications of Polymeric Cryogels. *Applied Sciences* [online]. 2019, vol. 9, no. 3. ISSN 2076-3417.

BARTOVSKÁ LIDMILA, Šišková Marie. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav [online]. 2005 Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/ <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/>.

BERTSCH, Pascal a Peter FISCHER. Adsorption and interfacial structure of nanocelluloses at fluid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2020, vol. 276, s. 102089. ISSN 0001-8686. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2019.102089>.

BRINKMANN, Andreas et al. Correlating Cellulose Nanocrystal Particle Size and Surface Area. *Langmuir* [online]. 2016, vol. 32, no. 24, s. 6105-6114. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01376>.

CAPRON, Isabelle a Bernard CATHALA. Surfactant-Free High Internal Phase Emulsions Stabilized by Cellulose Nanocrystals. *Biomacromolecules* [online]. 2013, vol. 14, no. 2, s. 291-296. ISSN 1525-7797.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm301871k>.

CAPRON, Isabelle, Orlando J. ROJAS a Romain BORDES. Behavior of nanocelluloses at interfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2017, vol. 29, s. 83-95. ISSN 1359-0294. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135902941730002X>.

ÇIMEN, Duygu et al. Injectable Cryogels in Biomedicine. *Gels* [online]. 2021, vol. 7, no. 2. ISSN 2310-2861.

DAINIÁK, Maria B. et al. Gelatin–fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimisation and in vitro study. *Biomaterials* [online]. 2010, vol. 31, no. 1, s. 67-76. ISSN 0142-9612. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961209009594>.

DE CARVALHO-GUIMARÃES, Fernanda Brito et al. A Review of Pickering Emulsions: Perspectives and Applications. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* [online]. 2022, vol. 15, no. 11, s. 1413. ISSN 1424-8247. Dostupné z:

<https://search.proquest.com/docview/2748306675>.

EGGERMONT, Loek J. et al. Injectable Cryogels for Biomedical Applications. *Trends in Biotechnology* [online]. 2020, vol. 38, no. 4, s. 418-431. ISSN 0167-7799. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779919302392>.

ERTÜRK, Gizem a Bo MATTIASSON. Cryogels-versatile tools in bioseparation. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, vol. 1357, s. 24-35. ISSN 0021-9673. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967314008218>.

GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A., M. ALNAIEF a I. SMIRNOVA. Polysaccharide-based aerogels—Promising biodegradable carriers for drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, vol. 86, no. 4, s. 1425-1438. ISSN 0144-8617. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711005364>.

GRUBB, D. T. *Polymer science: A comprehensive reference* [online]. Krzysztof MATYJASZEWSKI a Martin MÖLLER. Amsterdam: Elsevier. , 2012. 17 - Optical Microscopy. . 465-478 s. ISBN 9780080878621. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444533494000352ID:282802>.

GUO, Qinxin. Progress in the preparation, stability and functional applications of Pickering emulsion. *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science* [online]. 2021, vol. 639, no. 1, s. 12028. ISSN 1755-1307. Dostupné z:

<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/639/1/012028>.

GUZMÁN, Eduardo, Francisco ORTEGA a Ramón G. RUBIO. Pickering Emulsions: A Novel Tool for Cosmetic Formulators. *Cosmetics (Basel)* [online]. 2022, vol. 9, no. 4, s. 68. ISSN 2079-9284. Dostupné z:

<https://search.proquest.com/docview/2706128424>.

HARMAN, Clarissa L. G. et al. Recent developments in Pickering emulsions for biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2019, vol. 39, s. 173-189. ISSN 1359-0294. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135902941830147X>.

HELLEBOIS, Thierry et al. Cryotropic gel-forming capacity of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed galactomannans. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, vol. 267, s. 118190. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861721005774>.

HENDERSON, Timothy et al. Cryogels for Biomedical Applications. *J.Mater.Chem.B* [online]. 2013, vol. 1, s. 2682-2695.

HERRERA-LAVADOS, Carolina et al. Development of bean-based emulgels for 3D printing applications: Feasibility for dysphagia diets. *Journal of Food Engineering* [online]. 2023, vol. 358, s. 111687. ISSN 0260-8774. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877423002856>.

HIXON, Katherine R., Tracy LU a Scott A. SELL. A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* [online]. 2017, vol. 62, s. 29-41. ISSN 1742-7061. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706117305470>.

Chen et al. *Applications of hydrogels with special physical properties in biomedicine* [online]. MDPI AG, 2019.

CHEN, Jianqiang et al. *Thermally tunable pickering emulsions stabilized by carbon-dot-incorporated Core-Shell nanospheres with fluorescence "On-Off" behavior* [online]. American Chemical Society (ACS), 2017. 273 s. ISBN 0743-7463.

CHEVALIER, Yves a Marie-Alexandrine BOLZINGER. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2013, vol. 439, s. 23-34. ISSN 0927-7757. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777571300157X>.

CHU, Youlu et al. Dispersion Properties of Nanocellulose: A Review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, vol. 250, s. 116892. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720310651>.

KALASHNIKOVA, Irina et al. New Pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids* [online]. 2011, vol. 27, no. 12, s. 7471-7479. ISSN 1520-5827; 0743-7463.

KOMAROVA, Galina A. et al. *Intelligent gels and cryogels with embedded emulsions of various oils* [online]. Wiley, 2012. 2703 s. ISBN 0021-8995.

KUMAR, A. *Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications* [online]. CRC Press, 2016. ISBN 9781482228823. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=-oCfCwAAQBAJ>.

LAKKIS, Jamileh M. *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*[online]., 2016Encapsulation and controlled release in bakery applications. . 204-235 s. ISBN 9781118946893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118946893.ch827>; Wiley Online Books.

LEAMY, H. J. Charge collection scanning electron microscopy. *Journal of Applied Physics* [online]. 1982, vol. 53, no. 6, s. R51-R80 [cit. 5/4/2024]. ISSN 0021-8979. Dostupné z: <https://doi.org/10.1063/1.331667>.

LI,Jian et al. *Nanocellulose/gelatin composite cryogels for controlled drug release* [online]. American Chemical Society (ACS), 2019. 6381 s. ISBN 2168-0485.

LOZINSKY, V. I. et al. Study of cryostructurization of polymer systems. *Colloid and Polymer Science* [online]. 1984, vol. 262, no. 10, s. 769-774. ISSN 1435-1536. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF01451705>.

LOZINSKY, Vladimir I. *Cryostructuring of polymeric systems. 50.† cryogels and cryotropic gel-formation: Terms and definitions* [online]. MDPI AG, 2018.

LOZINSKY, Vladimir I. et al. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology* [online]. 2003, vol. 21, no. 10, s. 445-451. ISSN 0167-7799. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779903002117>.

MA, Wuchao et al. Ultrasound treatment improved the physicochemical characteristics of cod protein and enhanced the stability of oil-in-water emulsion. *Food Research International* [online]. 2019, vol. 121, s. 247-256. ISSN 0963-9969. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996919301681>.

MALEKI, Hajar et al. Synthesis and biomedical applications of aerogels: Possibilities and challenges. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2016, vol. 236, s. 1-27. ISSN 0001-8686. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868616300392>.

Malvern zetasizer ZS DLS user manual [online].

MIKHALOVSKY, S. V. et al. *Comprehensive biotechnology (second edition)*[online]. Murray MOO-YOUNG. Burlington: Academic Press. , 20115.03 - Biomaterials/Cryogels. . 11-22 s. ISBN 9780080885049. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080885049004323ID:280858>.

MILUTINOV, Jovana et al. *Emulgels: Promising carrier systems for food ingredients and drugs* [online]. MDPI AG, 2023.

NAYAK, Amit K. a Biswarup DAS. *Polymeric gels*[online]. Kunal PAL a Indranil BANERJEE. Woodhead Publishing. , 20181 - Introduction to polymeric gels. . 3-27 s. ISBN 9780081021798. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081021798000016ID:319323>.

Novák Josef a kol. Fyzikální chemie - bakalářský a magisterský kurz [online]. 2008 Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-675-3/pages-pdf/148.html.

OMIDIAN, Hossein, Sumana DEY CHOWDHURY a Niloofar BABANEJAD. *Cryogels: Advancing biomaterials for transformative biomedical applications* [online]. MDPI AG, 2023.

PATRAVALE, V. B. a S. D. MANDAWGADE. Novel cosmetic delivery systems: an application update. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2008, vol. 30, no. 1, s. 19-33. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://api.istex.fr/ark:/67375/WNG-0NCNCKM0-F/fulltext.pdf>.

Popat B. Mohite and Sonali S. Adhav. A hydrogels: Methods of preparation and applications [online]. 2017. ISSN 2320-4923. Dostupné z: <https://core.ac.uk/download/335078040.pdf>.

PURKAIT, Mihir a Dibyajyoti HALDAR. [online]., 2021 Value-added products derived from lignocellulosic biomass. . 125-140 s. ISBN 9780128235348.

RAYNER, Marilyn et al. Biomass-based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2014, vol. 458, s. 48-62. ISSN 0927-7757. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777571400291X>.

RAZAVI, Mehdi, Yang QIAO a Avnesh S. THAKOR. *Three-dimensional cryogels for biomedical applications* [online]. Wiley, 2019. 2736 s. ISBN 1549-3296.

SAHA, Rituparna a Prakriti TAYALIA. *Clove oil-incorporated antibacterial Gelatin-Chitosan cryogels for tissue engineering: An in vitro study* [online]. American Chemical Society (ACS), 2022. 3557 s. ISBN 2373-9878.

SAVINA, Irina N., Mohamed ZOUGHAIB a Abdulla A. YERGESHOV. *Design and assessment of biodegradable macroporous cryogels as advanced tissue engineering and drug carrying materials* [online]. MDPI AG, 2021.

SHI, Aimin et al. Pickering and high internal phase Pickering emulsions stabilized by protein-based particles: A review of synthesis, application and prospective. *Food Hydrocolloids* [online]. 2020, vol. 109, s. 106117. ISSN 0268-005X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X20303131>.

SIEVERS, Jana et al. Customizing biohybrid cryogels to serve as ready-to-use delivery systems of signaling proteins. *Biomaterials* [online]. 2021, vol. 278, s. 121170. ISSN 0142-9612. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961221005275>.

SOWASOD, Nataporn et al. Development of encapsulation technique for curcumin loaded O/W emulsion using chitosan based cryotropic gelation. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2012, vol. 32, no. 4, s. 790-798. ISSN 0928-4931. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493112000434>.

TEO, Shao Hui et al. Review of Functional Aspects of Nanocellulose-Based Pickering Emulsifier for Non-Toxic Application and Its Colloid Stabilization Mechanism. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. 2022, vol. 27, no. 21, s. 7170. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://search.proquest.com/docview/2734707307>.

WANG, Lechuan et al. Development and characterization of novel ultra-stable high internal phase Pickering emulsions gel: Interface structure, stabilization mechanism, and applications. *Food Hydrocolloids* [online]. 2024, vol. 151, s. 109817. ISSN 0268-005X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X24000912>.

WANG, Zhi et al. Soy protein isolate-sodium alginate colloidal particles for improving the stability of high internal phase Pickering emulsions: Effects of mass ratios. *Food Chemistry: X* [online]. 2024, vol. 21, s. 101094. ISSN 2590-1575. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590157523005370>.

WU, Jie a Guang-Hui MA. Recent Studies of Pickering Emulsions: Particles Make the Difference. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* [online]. 2016, vol. 12, no. 34, s. 4633-4648. ISSN 1613-6810. Dostupné z: <https://api.istex.fr/ark:/67375/WNG-8PZNBWXC-C/fulltext.pdf>.

YUE, Kan et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* [online]. 2015, vol. 73, s. 254-271. ISSN 0142-9612. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296121500719X>.

ZAGNI, Chiara et al. *Sponge-like macroporous cyclodextrin-based cryogels for controlled drug delivery* [online]. Royal Society of Chemistry (RSC), 2023. 2693 s.

Zetasizer nano series user manual. , 2013.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Typické struktury hydrogelů (upraveno dle Chen et al. 2019)	16
Obrázek 2 Obecný postup pro syntézu aerogelů (upraveno dle Maleki et al. 2016)	18
Obrázek 3 Příprava supermakroporézního kryogelu (upraveno dle Ertürk, Mattiasson 2014)	21
Obrázek 4 Aplikace injekčního kryogelu (upraveno dle Eggermont et al. 2020)	22
Obrázek 5 Rozdíl mezi emulzí a Pickeringovou emulzí (upraveno dle Chevalier, Bolzinger 2013)	26
Obrázek 6 Znázornění procesu homogenizace pomocí rotoru-statoru (upraveno dle de Carvalho-Guimarães et al. 2022)	28
Obrázek 7 Schéma vysokotlakového homogenizátoru (upraveno dle de Carvalho-Guimarães et al. 2022)	29
Obrázek 8 Ultrazvukové zařízení pro emulgaci (upraveno dle de Carvalho-Guimarães et al. 2022)	30
Obrázek 9 Mikrostruktura HIPPE (upraveno dle Shi et al. 2020)	32
Obrázek 10 Kryogel před zmražením	42
Obrázek 11 Kryogel po prvním zmražení	42
Obrázek 12 Kryogely po třetím zmražení	42
Obrázek 13 Závislost koncentrace roztoku na absorbanci	46
Obrázek 14 Distribuce velikosti částic nanokrystalické celulózy	48
Obrázek 15 Distribuce velikosti emulzních kapek	49
Obrázek 16 Mikrostruktura emulzí: A) primární emulze, B) HIPPE (měřítko 50 μm)	50
Obrázek 17 Mikrostruktura kryogelu A (2:1) 1FT (vlevo) a 3FT (vpravo)	51
Obrázek 18 Mikrostruktura kryogelu C (2:1) 1FT (vlevo) a 3FT (vpravo)	51
Obrázek 19 Uvolňování kurkuminu v průběhu času v závislosti na typu kryogelu, poměr 1:1	53
Obrázek 20 Uvolňování kurkuminu v průběhu času v závislosti na typu kryogelu, poměr 2:1	53
Obrázek 21 Celkové množství uvolněného kurkuminu z KG 1:1	54
Obrázek 22 Celkové množství uvolněného kurkuminu z KG 2:1	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Množství jednotlivých složek pro přípravu kryogelu v poměru 1:141

Tabulka 2 Množství jednotlivých složek pro přípravu kryogelu v poměru 2:141

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AL	Aktivní látka
API	Aktivní farmaceutická složka
API	Akutní farmaceutická složka
Atd	A tak dále
CD	Cyklodextrin
CMC	Karboxymethylcelulóza
CNC	Nanokrystalická celulóza
Cur	Kurkumin
FT	Zmrazování/rozmrazování (freeze-thawing)
HCl	Kyselina chlorovodíková
HIPPE	High internal phase Pickering emulsions
KG	Kryogel
MCT	Triacylglycerol trikaprin/trikaprylin
NaCl	Chlorid sodný
Např	Například
NCF	Nanofibrilární celulóza
O/V	Olej ve vodě
PAL	Povrchově aktivní látky
PE	Pickeringova emulze
PEG	Poly(2-hydroxyethylmethakylát)
PVA	Polyvinylalkohol
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
TA	Kyselina tříslová
V/O	Voda v oleji
ZP	Zeta-potenciál

θ Kontaktní úhel