

# **Příprava ligninových nanočástic a jejich využití pro stabilizaci emulzí**

Bc. Michaela Biskupová

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Michaela Biskupová  
Osobní číslo: T22299  
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Příprava ligninových nanočástic a jejich využití pro stabilizaci emulzí

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část

V teoretické části vypracujte literární rešerši na zadané téma.

Stručně se zaměřte na charakterizaci ligninu, věnujte se především metodám přípravy ligninových nanočástic a jejich možnostem využití, např. pro stabilizaci Pickeringových emulzí.

### II. Praktická část

V praktické části připravte ligninové nanočástice pomocí různých metod, a dostupnými metodami je charakterizujte.

Nanočástice ligninu použijte pro přípravu Pickeringových emulzí.

Pro stabilizaci emulzí použijte i lignin spolu s jinými typy biopolymerů nebo částic.

U získaných emulzních systémů stanovte jejich vlastnosti pomocí relevantních analytických technik.

Získané výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] Tang Q, Qian Y, Yang D, Qiu X, Qin Y, Zhou M. Lignin-Based Nanoparticles: A Review on Their Preparations and Applications. *Polymers*. 2020; 12(11):2471.
- [2] Lievonen, M. et al. A simple process for lignin nanoparticle preparation. *Green Chemistry*. 2016, vol. 18, no. 5, p. 1416-1422.
- [3] Tang, C. et al. Pickering Emulsions Stabilized by Lignin/Chitosan Nanoparticles for Biphasic Enzyme Catalysis. *Langmuir*. 2022, vol. 38, no. 42, p. 12849-12858.
- [4] Li, X. et al. Acetone/Water Cosolvent Approach to Lignin Nanoparticles with Controllable Size and Their Applications for Pickering Emulsions. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2021, vol. 9, no. 15, p. 5470-5480.

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

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

L.S.

---

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

---

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

## **PROHLÁŠENÍ AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, 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 diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky: Michaela Biskupová

.....  
podpis studentky

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá přípravou nanočástic ligninu a jejich využitím jako stabilizátorů Pickeringových emulzí. Teoretická část diplomové práce je věnována charakterizaci ligninu od jeho struktury až po specifické vlastnosti, díky kterým se tomuto materiálu v současnosti věnuje široká škála studií. Experimentální část je zaměřena na přípravu ligninových nanočástic různými metodami. Nanočástice ligninu byly připravovány metodou přikapávání a dialýzy do čtyř organických rozpouštědel. Ligninovými nanočásticemi byly následně stabilizovány Pickeringovy emulze s jojobovým olejem, který vykazuje dobré vlastnosti pro lidskou pokožku. Připravené nanočástice i emulze byly charakterizovány zejména z pohledu jejich velikosti, stability nebo morfologie.

Klíčová slova: lignin, nanočástice ligninu, Pickeringovy emulze

## **ABSTRACT**

This diploma thesis deals with the preparation of lignin nanoparticles and their use as stabilizers of Pickering emulsions. The theoretical part of the thesis is devoted to the characterization of lignin from its structure to its specific properties, which have led to a wide range of studies on this material. The experimental part is focused on the preparation of lignin nanoparticles by different methods. Lignin nanoparticles were prepared by the method of addition and dialysis in four organic solvents. The lignin nanoparticles were then stabilized by Pickering emulsions with jojoba oil, which shows good properties for human skin. The prepared nanoparticles and emulsions were characterized mainly in terms of their size, stability or morphology.

Keywords: lignin, lignin nanoparticles, Pickering emulsions

Touto cestou bych chtěla upřímně poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní Ing. Lucii Urbánkové, Ph.D. nejen za skvělé odborné vedení, ochotu a čas, který mi věnovala, ale také za trpělivost, s jakou k celé práci přistupovala a za cenné rady, které mi během celé naší spolupráce dávala. Dále bych chtěla poděkovat laborantkám, které mi vždy velmi ochotně a rády pomohly.

Velké díky patří především mé rodině a blízkým za pochopení a velkou podporu nejen při psaní diplomové práce, ale i během celého studia na univerzitě.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 LIGNIN</b> .....	<b>11</b>
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA.....	11
1.2 METODY EXTRAKCE .....	13
1.2.1 Lignosulfonátový lignin .....	13
1.2.2 Kraft lignin .....	14
1.2.3 Organosolv lignin.....	14
1.2.4 Soda lignin .....	15
1.2.5 Enzymatická hydrolýza .....	15
1.3 VLASTNOSTI A VYUŽITÍ LIGNINU .....	15
1.3.1 Lignin jako UV blokátor .....	16
1.3.2 Podávání léčiv a biomedicínské aplikace.....	18
1.3.3 Balení potravin .....	19
1.3.4 Sanace životního prostředí .....	19
<b>2 LIGNINOVÉ NANOČÁSTICE</b> .....	<b>20</b>
2.1 VLASTNOSTI.....	20
2.2 METODY PŘÍPRAVY .....	21
2.2.1 Precipitace antirozpouštědlem .....	21
2.2.2 Polymerace .....	22
2.2.3 Superkritické antisolventní srážení .....	22
2.2.4 Ultrazvuk.....	22
2.2.5 Homogenizace .....	22
2.2.6 Dialýza .....	23
2.3 VYUŽITÍ LIGNINOVÝCH NANOČÁSTIC .....	23
2.3.1 Nosič protirakovinných léčiv .....	23
2.3.2 Antimikrobiální aktivita .....	24
2.3.3 Tkáňové inženýrství .....	24
3.1 CHARAKTERIZACE PICKERINGOVÝCH EMULZÍ .....	26
3.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti Pickeringových emulzí .....	26
3.1.2 Morfologie pevných částic .....	27
3.1.3 Adsorpce nanočástic na rozhraních.....	27
3.1.4 Druhy stabilizujících částic .....	28
3.1.5 Stabilita Pickeringových emulzí .....	29
3.1.6 Příprava Pickeringových emulzí .....	29
3.1.7 Biomedicínské aplikace Pickeringových emulzí .....	30
3.2 MOŽNOSTI VYUŽITÍ EMULZÍ V KOSMETICE .....	31
3.2.1 Částice používané v Pickeringových emulzích pro kosmetické účely.....	32
3.3 PICKERINGOVY EMULZE STABILIZOVANÉ LIGNINOVÝMI ČÁSTICEMI.....	33
<b>4 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>34</b>

<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>36</b>
<b>5 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE</b> .....	<b>37</b>
5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE .....	37
5.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	38
<b>6 POUŽITÉ METODY</b> .....	<b>39</b>
6.1 PŘÍPRAVA LIGNINOVÝCH ČÁSTIC .....	39
6.1.1 Příprava zásobního roztoku .....	39
6.1.2 Příprava antirozpouštědla .....	40
6.1.3 Příprava ligninových částic .....	41
6.2 CHARAKTERIZACE LIGNINOVÝCH ČÁSTIC .....	43
6.2.1 Měření velikosti částic a zeta-potenciálu .....	43
6.2.2 Skenovací elektronová mikroskopie .....	44
6.2.3 Stanovení množství částic v disperzi .....	44
6.2.4 Stanovení povrchového napětí a kontaktních úhlů .....	45
6.3 PŘÍPRAVA PICKERINGOVÝCH EMULZÍ.....	46
6.4 CHARAKTERIZACE EMULZÍ .....	46
6.4.1 Emulgační účinnost .....	46
6.4.2 Měření velikosti emulzních kapek .....	47
6.4.3 Optická mikroskopie .....	47
<b>7 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>48</b>
7.1 CHARAKTERIZACE LIGNINOVÝCH ČÁSTIC .....	48
7.1.1 Vliv antirozpouštědla a pH na ligninové částice .....	48
7.1.2 Vliv metody přípravy na velikost částic.....	52
7.1.3 Vliv rozpouštědla na ligninové částice .....	56
7.1.4 Shrnutí vlivu různých parametrů na vlastnosti částic .....	58
7.1.5 Stanovení koncentrace částic .....	59
7.1.6 Stanovení povrchových vlastností.....	59
7.1.7 Morfologie částic .....	62
7.2 CHARAKTERIZACE EMULZÍ .....	64
7.2.1 Vizuální pozorování a emulgační účinnost .....	64
7.2.2 Velikost emulzních kapek .....	67
7.2.3 Stabilita emulzí.....	71
7.2.4 Mikrostruktura emulzí.....	73
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>76</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>78</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>85</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>86</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>88</b>



## ÚVOD

Lignin patří mezi nejrozšířenější obnovitelný biopolymer na Zemi, který se v poslední době těší velké pozornosti díky svému širokému aplikačnímu potenciálu v různých průmyslových odvětvích.

Lignin je vysoce rozvětvená, amorfni biomakromolekula skládající se z trojrozměrné sítě složené ze tří fenylypropanových jednotek. Obecně lignin charakterizuje mnoho funkčních skupin, které jsou přítomny v jeho struktuře a tím disponuje hned několika dobrými vlastnostmi jako je ochrana proti UV záření, nebo vykazuje antimikrobiální či antioxidační aktivitu.

Nepravidelná morfologie a velikost ligninových částic jsou hlavní faktory ovlivňující využití tohoto materiálu v systémech s přidanou hodnotou. Z tohoto důvodu se lignin přeměňuje na nanočástice ligninu, které mají větší specifický povrch, čímž se zvýší například jeho antioxidační aktivita. Bylo vyvinuto hned několik metod přípravy, kdy se praktická část této práce zaměřuje na metody precipitace, a to antirozpouštědlem a dialýzou. Připravené ligninové nanočástice mají široké možnosti průmyslového využití. V kosmetickém a farmaceutickém průmyslu mohou najít tyto nanočástice uplatnění v systémech pro podávání léčiv, v přípravcích na ochranu proti slunečnímu záření nebo pro stabilizaci Pickeringových emulzí.

Pickeringovy emulze stabilizované nanočásticemi se řadí mezi nejvíce studované systémy vlivem snadné výroby a vynikající stability. Emulze jsou atraktivní pro svou širokou škálu aplikací, jako je zvýšené uvolňování léčiva nebo zlepšená stálost emulze na kůži. Konkrétně Pickeringovy emulze stabilizované ligninovými nanočásticemi lze využít v kosmetickém průmyslu v opalovacích krémech k ochraně lidské pokožky před UV zářením.

V praktické části této diplomové práce byly připraveny nanočástice ligninu, které se poté využily pro stabilizaci Pickeringových emulzí. Byla porovnána účinnost metod přípravy nanočástic a vliv částic na stabilitu Pickeringových emulzí. Jak nanočástice, tak emulze byly charakterizovány měřením velikosti částic, zeta-potenciálu, byla zkoumána morfologie částic nebo emulgační efektivita.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 LIGNIN

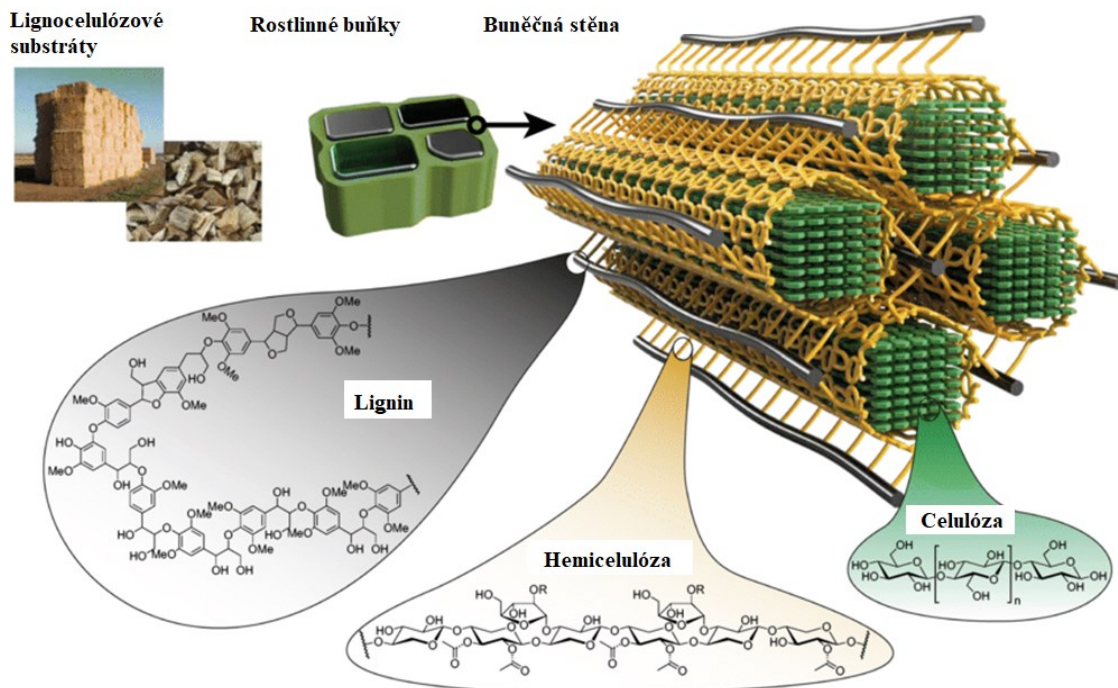
Lignin, odvozený z latinského slova pro dřevo, tj. *lignum*, je druhým nejrozšířenějším obnovitelným biopolymerem na Zemi [1].

Je rovněž nejrozšířenějším vedlejším produktem celulózo-papírenského průmyslu, kdy v posledních letech přitahuje zvýšenou pozornost díky svému potenciálu v přípravě různých materiálů. Čehož se využívá ve značné škále aplikací, zejména u dispergačních činidel, pojiv, polymerních materiálů nebo biopaliv [2, 3].

Díky mnoha funkčním skupinám přítomným v jeho struktuře lignin disponuje hned několika dobrými vlastnostmi, jako je ochrana proti ultrafialovému záření, antioxidační či antimikrobiální aktivita [4].

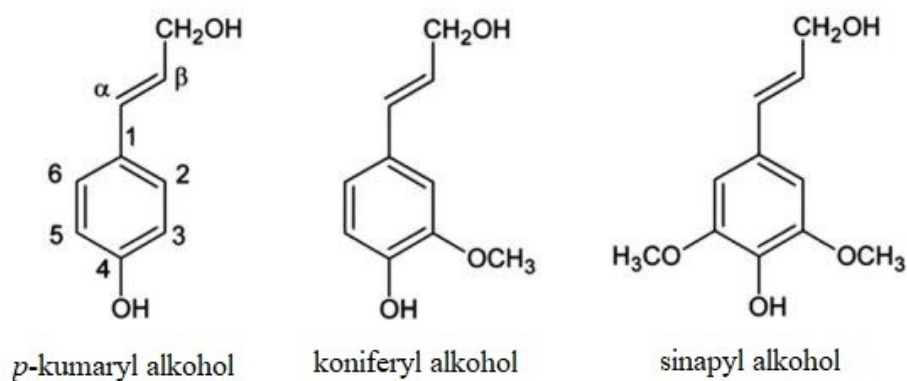
### 1.1 Chemická struktura

Lignocelulóza představuje nejlevnější obnovitelný materiál získaný ze dřeva a rostlin, který je složený především ze tří základních makromolekul, a to celulózy, hemicelulózy a ligninu (viz Obrázek 1). Právě biomasa procentuálně obsahuje 35–50 % celulózy, 20–35 % hemicelulózy a 10–25 % ligninu. Molekulární struktura ligninu je velmi závislá na druhu dřeva, rostliny, lokalitě a na procesech extrakce. Odlišné typy ligninu obsahují různé funkční skupiny, a tudíž vykazují i odlišnou molekulovou hmotnost či prvkové složení. Strukturu ligninu je z těchto důvodů nesmírně komplikované a obtížné určit. Jde o amfifilní polymerní materiál, kde je hlavní řetězec hydrofobní povahy, zatímco přítomné funkční skupiny vykazují hydrofilní charakter. Jedná se o fenolické a alifatické hydroxylové skupiny, methoxylové skupiny, karbonylové nebo fenylové skupiny, které jsou velmi důležitými aktivními místy pro případné chemické modifikace [3, 5, 6].



Obrázek 1 Struktura lignocelulózového materiálu, upraveno dle [5]

Obecně je ale lignin vysoce rozvětvená, amorfni biomakromolekula složená z trojrozměrné sítě, která se skládá ze tří základních fenylypropanových jednotek. Těmito monomery jsou *p*-kumaryl alkohol, koniferyl alkohol a sinapyl alkohol, (viz Obrázek 2). Tyto jednotky jsou spojeny řadou vazeb, především etherovými a C-C vazbami, základní jednotky se nazývají monolignoly [3].

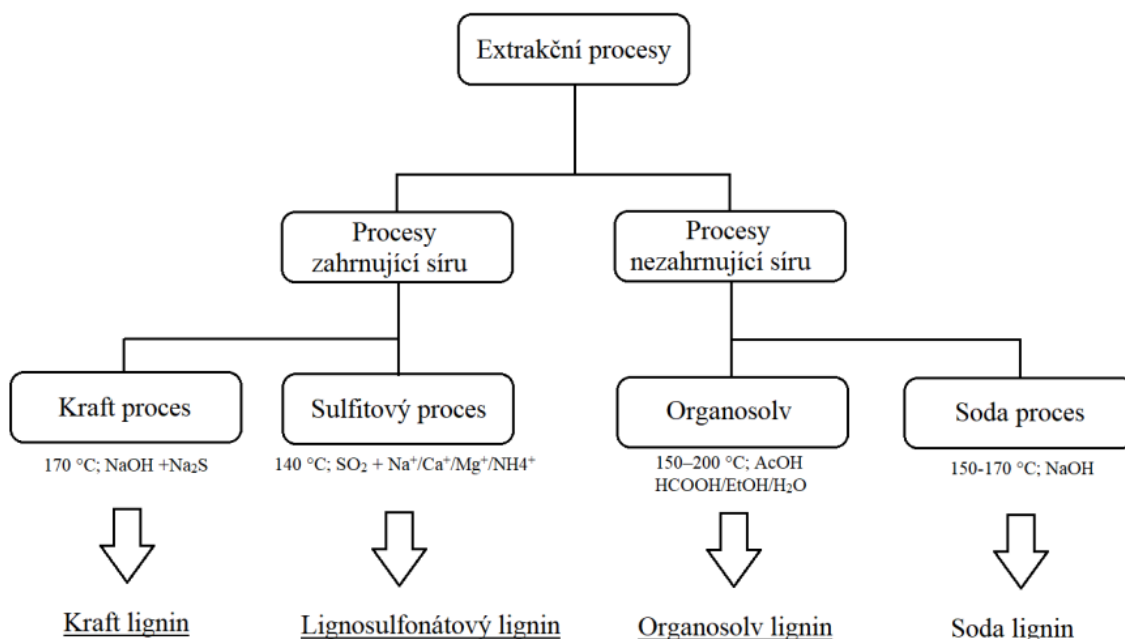


Obrázek 2 Struktura základních monolignolů, upraveno dle [1]

Ukládání ligninu v buněčné stěně je důležitým faktorem pro vývoj rostlin, jelikož zajišťuje tuhost a pevnost buněčné stěny a poskytuje mechanickou oporu rostlinným buňkám. Lignin v rostlinách působí jako lepidlo, které spojuje hemicelulózu a celulózu, díky němuž je umožněn transport rozpuštěných látek a vody v cévním systému a ochrana buňky před patogeny [5].

## 1.2 Metody extrakce

Rozmanitost ligninových struktur závisí především na jejich různých zdrojích, typech, a purifikačních nebo extrakčních metodách. Právě odlišné extrakční metody a postupy rozvláknování vytvářejí lignin s různou strukturou a vlastnostmi, které poté ovlivňují další vývoj nebo použití. Obecně lze lignin izolovat pomocí kraftovacího, sodného, sulfátového nebo organosolv procesu, anebo enzymatické hydrolýzy (viz Obrázek 3) [1, 7].



Obrázek 3 Souhrn extrakčních metod přípravy ligninu z lignocelulózové biomasy, upraveno dle [8]

### 1.2.1 Lignosulfonátový lignin

Lignosulfonát se připravuje procesem sulfítového rozvláknování obsahující reakce mezi ligninem a siřičitanovými solemi, nebo siřičitými kyselinami a sodíkem, vápníkem nebo hořčíkem jako protiionty. Reakce probíhá při teplotě 120–180 °C za určitého pH (kyselé, alkalické, neutrální), po dobu 1–5 hodin. Tento lignin obsahuje sulfonové skupiny, které spolu s dalšími hydrofilními (karboxylovými a fenolickými, hydroxylovými) skupinami zajišťují výrazné zlepšení rozpustnosti lignosulfonátu ve vodě. Ve své struktuře obsahuje i hydrofobní (alifatické a aromatické) skupiny, proto je považován za aniontovou povrchově aktivní látku. Tím, že je rozpustný a částečně povrchově aktivní, tak se lignosulfonát široce využívá v komerčních oblastech, jako jsou dispergátory barviv, činidla snižující obsah vody v betonu, dispergátory vodní uhelné kaše a kalů, dispergační činidla pro ropné vrty a pesticidy. Při této extrakci jsou výhodami široké zdroje surovin,

nízké náklady a šetrnost k životnímu prostředí. Naopak nevýhodou je strukturální změna ligninu v důsledku tvorby nových C-C vazeb a nízká čistota po izolaci, kde se nachází vysoký obsah jiných nečistot, například popela [3].

### 1.2.2 Kraft lignin

Na rozdíl od lignosulfonátu je sulfátový lignin připravován z procesu sulfátové výroby buničiny, která tvoří největší podíl průmyslového ligninu. Proces se provádí při vysoké teplotě a vysokých hodnotách pH. Nejdříve se lignin upraví hydroxidem sodným při teplotě 170 °C v rozmezí hodnot pH 13–14. Dochází tak ke štěpení etherové vazby a zavedení fenolických hydroxylových skupin. Tímto procesem dochází k solubilizaci ligninu. Poté následuje oddělení ligninu od zbývajících alkalických roztoků vlivem metody srážení kyselinou (například kyselina sírová), kdy hodnota pH klesne na 5–7,5. Získaný sulfátový lignin má oproti lignosulfonátu vyšší čistotu díky menšímu obsahu sacharidových zbytků a anorganických nečistot. Naopak obsahuje menší množství síry, kdy v důsledku dochází k horší rozpustnosti ve vodě. Kraft lignin je hydrofobní a není aktivní chemickou sloučeninou, pokud není modifikován za účelem zlepšení jeho reaktivity. Tento lignin se nejčastěji využívá jako biopalivo a biochemikálie po chemické pyrolýze nebo degradaci [3, 9].

### 1.2.3 Organosolv lignin

Organosolv lignin se připravuje z buničiny zpracováním lignocelulózové biomasy za využití organických rozpouštědel jako delignifikačních činidel. Při tomto procesu se používají různá rozpouštědla, jako jsou ethanol, methanol, aceton, glycerol, ethylenglykol, dioxan nebo organické kyseliny. Často se mísí s vodou, a to při teplotách 170–190 °C. Někdy se do procesu přípravy přidává kyselý nebo zásaditý katalyzátor z důvodu výroby vysoce kvalitního ligninu. Výsledný lignin se vyznačuje nižší molekulovou hmotností a vyšší čistotou s nižším obsahem sacharidů a popela. Takto připravený lignin neobsahuje síru a tím si zachovává přirozenou strukturu. Navzdory výhodám se organosolvový lignin obtížně vyrábí ve velkém měřítku. Důvodem je rozsáhlá koroze zařízení a značné náklady na použitá rozpouštědla [3].

#### 1.2.4 Soda lignin

Soda lignin (alkali lignin) je získáván procesem rozvlákňování v přítomnosti hydroxidu sodného. Během typického procesu výroby se lignocelulózová biomasa štěpí přidáním vodného roztoku hydroxidu sodného za použití katalyzátoru antrachinonu. Celá příprava probíhá při teplotách 140–170 °C. V důsledku oxidace alifatických hydroxylových skupin obsahuje připravený lignin značné množství karboxylových kyselin, což ztěžuje regeneraci filtrací nebo centrifugací. Avšak vyrobený lignin neobsahující síru má výhody pro další aplikace s vysokou přidanou hodnotou, kterými jsou bioplasty a kompozity [3].

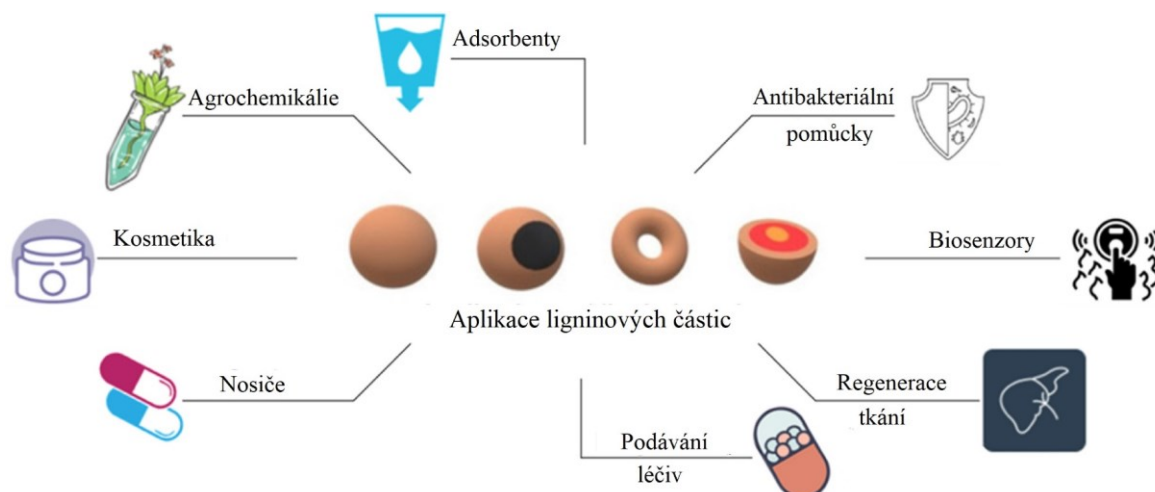
#### 1.2.5 Enzymatická hydrolýza

Lignin se získává z procesu enzymatické hydrolýzy, ve kterém jsou enzymy celulózy a hemicelulózy využívány k degradaci celulózy a hemicelulózy v biomase. Přičemž lignin zůstává jako nerozpustný pevný zbytek. Tento celý proces disponuje řadou ekologických výhod a je nákladově efektivní. Lignin opět neobsahuje síru, tudíž vykazuje velmi nízkou rozpustnost ve vodě nebo některých organických rozpouštědlech. Má však bližší strukturu podobající se nativnímu ligninu než ostatní druhy, které byly získány jiným způsobem extrakce. Využití nachází jako dispergační činidlo, sorbent, emulgátor či pojivo [3].

### 1.3 Vlastnosti a využití ligninu

Lignin představuje obnovitelný polymer a je vedlejší produkt celulózy a papírenského průmyslu, což z něj činí odpadní materiál s potenciálem pro využití při přípravě nových materiálů [7].

Sférické částice na bázi polymerů jsou v posledních letech velmi populární díky jejich nízkým výrobním nákladům, udržitelnosti, netoxicitě a vysoké dostupnosti. Právě lignin se stal oblíbeným materiálem pro výrobu těchto částic. Přítomnost různých funkčních skupin vede k řadě odlišných vlastností, čehož využívá velká řada průmyslových odvětví (viz Obrázek 4) [7].



Obrázek 4 Příklady využití ligninových částic v různých odvětvích, upraveno dle [7]

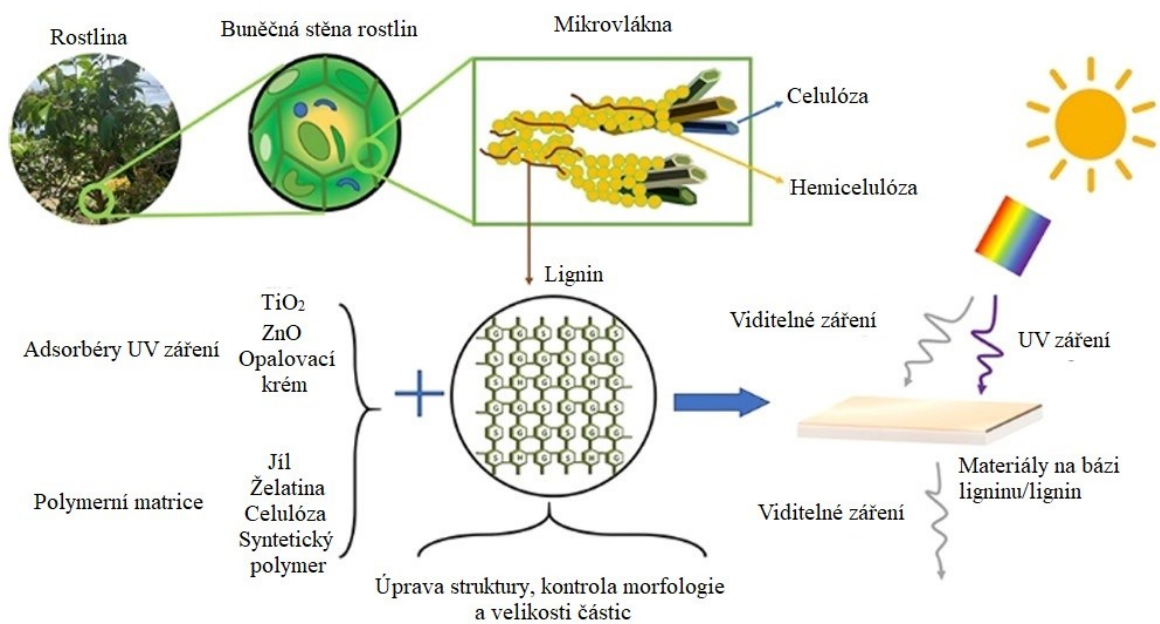
Nízká rozpustnost, účinek blokovat UV záření nebo vysoká stabilita umožňují široké využití ligninu. V biomedicíně se lignin využívá jako systém pro podávání léčiv a regeneraci tkání, jakožto i pro řízené uvolňování, nebo v biosenzorech. V kosmetických přípravcích se lignin může využívat především jako blokátor UV záření v krémech na opalování [7].

Lignin lze využít i v zemědělství, například při ochraně plodin. Dále se používá jako zpevňující plnivo nebo prekurzor uhlíku. V oblasti inteligentních materiálů bylo využití zaměřeno na lignin a kompozity z termoplastů, elastomerů a pěnových materiálů [1].

### 1.3.1 Lignin jako UV blokátor

Lignin je látka schopná působit jako blokátor slunečního záření v širokém spektru vlnových délek. Účinnost této makromolekuly jako náhradní složky sluneční ochrany závisí mimo jiné na zdroji, složení a na jeho specifické struktuře. Mechanismus jeho působení je znázorněn na Obrázku 5. Jestliže se lignin vhodnými metodami upraví, má velký aplikační potenciál právě v kosmetických přípravcích na slunění [10].





Obrázek 5 Mechanismus působení ligninu v přípravcích proti UV záření, upraveno dle [11]

Materiály na bázi ligninu se využívají jako blokátory UV záření ve zdravotnictví nebo kosmetice, kde se mohou nacházet v opalovacích krémech s ochranným faktorem (SPF). Avšak hodnota SPF neupraveného ligninu je nízká, a proto nemusí uspokojovat nároky konečného spotřebitele. V současné době je hlavním problémem ligninu, jakožto účinné látky v opalovacích přípravcích, jeho struktura. Právě struktura ligninu bývá po procesu rozvláknování silně narušena, protože při tomto procesu dochází ke kondenzaci značného množství chromoforů a struktur, což má za následek tmavší barvu ligninu. Tato tmavá barva není v krémech žádoucí, proto spotřebitelem není úplně vyhledávána [1, 10].

Lignin je materiál, který má vysoce aromatickou a konjugovanou strukturu, díky tomuto účinnému systému absorbuje UV záření a hojně se využívá v optoelektronice nebo v potravinářském průmyslu. UV absorpční zařízení, která se využívají v již zmíněné optoelektronice, jsou například solární články, organické světelné diody nebo výroba kontaktních čoček. Využití biologických absorbentů UV záření, například ligninu, v elektronických zařízeních umožňuje jakési omezení poruch způsobeným nadměrnému vystavování právě UV záření. Dále fungují jako i ochrana již zmíněných součástí. V potravinářském průmyslu se zvažuje využití v oblasti balení potravin, kde se očekává, že použitý materiál bude průhledný pro viditelné světlo a neprůhledný v UV oblasti, aby chránil potraviny před oxidačním znehodnocením, změnou barvy či ztrátou chuti

způsobenou tímto zářením. Zároveň je rovněž důležité se vyhnout účinkům UV záření, jelikož vyvolává oxidaci lipidů v potravinách obsahujících velké množství nenasycených mastných kyselin. Vzhledem k výjimečným vlastnostem fenolických hydroxylových skupin, které chrání před UV zářením, je lignin rovněž vhodným materiálem pro výrobu UV absorpčních kompozitů a nanokompozitů [1].

### 1.3.2 Podávání léčiv a biomedicínské aplikace

Materiálům na bázi ligninu je věnována pozornost i v biomedicínském odvětví. Ve vývoji ekologických medicínských materiálů je možné využít i ligninových extraktů. Využití ligninu a jeho derivátů směřuje především k návrhu a výrobě inovativních léčiv s osteoprotektivními, kardioprotektivními, protizánětlivými, neuroprotektivními nebo imunoprotektivními vlastnostmi. Ve zdravotnických a biomedicínských aplikacích lze materiály na bázi ligninu díky jeho antioxidačním, antimikrobiálním, antimutagenním či protizánětlivým vlastnostem využít například v tkáňovém inženýrství [1].

Lidská kůže je bariérou proti vnějšímu prostředí, kde je velmi důležité rychlé hojení poškozené tkáně po zranění. Byly navrženy systémy pro rychlejší hojení ran např. s kurkuminem, který taktéž vykazuje antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Tyto systémy jsou biokompatibilní a nejsou zároveň nikterak cytotoxické pro kožní bariéru, kde je možným ukazatelem zaručená proliferace buněk během hojení ran. Ošetření tímto systémem ligninových nanočástic s kurkuminem vykazují lepší uzavření kožní rány. Nicméně terapeutické využití je omezeno špatnou biologickou dostupností a propustností vlivem nízké rozpustnosti a stability [1].

Ligninové částice mimo jiné tvoří jednu z nejslibnějších aplikací při přípravě systémů dodávání léčiv. V poslední době s rostoucím počtem nových nespécifikovaných onemocnění, se začíná pracovat na nových metodách, jak zlepšit kvalitu života pacientů. Částice na bázi ligninu nabízejí tepelně stabilní vlastnosti reagující na pH s velmi vysokou účinností enkapsulace. Obsažené aktivní látky jsou uvnitř ligninové kapsle výborně chráněny, což značí kvalitní biologickou dostupnost a distribuci. Cílené dodávání léčiv může být efektivnější, důvodem je rychlý rozpad částic vlivem přítomnosti enzymu s rychlým uvolněním účinné látky, bez zvýšení vedlejších účinků či cytotoxicity ke zdravým buňkám [7].

### 1.3.3 Balení potravin

Rostoucí poptávka pro bezpečnější balení potravin vede výrobce k hledání nových technologií pro jejich konzervaci. Vývoj aktivních obalů je vhodnou možností, jak prodloužit trvanlivost potravin. Jednou z možností je využití antimikrobiálních látek získávaných z přírodních zdrojů. Ke zvýšení účinnosti těchto obalů se využívají různé metody a technologie. Jednou z nich je nanoenkapsulace, kdy nanonosiče s antimikrobiálními látkami jsou schopny zajistit řízené uvolňování antimikrobiální látky během jejich skladování. Ligninové extrakty mohou být využívány ke stabilizaci potravin a potravinářských výrobků, krmiv, a to vzhledem k jejich antimykotickým, antiparazitním či antioxidačním účinkům [1].

### 1.3.4 Sanace životního prostředí

Vzhledem ke stále výraznému počtu problémů životního prostředí se hledá vhodná alternativa vysoce aktivního a levného materiálu, který by mohl alespoň z části tyto problémy eliminovat. Jedním ze znečišťujících látek, které jsou škodlivé pro ekosystém a životní prostředí, jsou barviva z textilního průmyslu. Kationtová barviva, jako je například methylenová modř, jsou obsaženy ve značném množství odpadních vod, což způsobuje řadu vážných problémů. Pokud je voda nedostatečně vyčištěna, mohou se u lidské populace objevit zdravotní problémy představující poruchy reprodukce nebo mutagenní účinky. Vzhledem ke složité chemické struktuře jsou tato barviva odolná vůči způsobům čištění odpadních vod založených na aerobní biodegradaci. Pro úpravu a snížení barviv by mohlo být využito adsorpční čištění, které je vhodné a levnější. Vývoj různých nových a cenově dostupných adsorpčních materiálů s uspokojivým výkonem odstraňovat kationtová barviva je nezbytný pro ochranu životního prostředí. V poslední době se objevují levné adsorbenty z obnovitelné biomasy, kterými jsou kokosová vlákna, piliny a lignin. Právě lignin, ať už v nativní nebo modifikované formě, lze použít pro odstraňování těchto barviv, kdy jeho maximální adsorpční kapacita závisí na zdroji ligninu a jeho chemické modifikaci [1].

## 2 LIGNINOVÉ NANOČÁSTICE

Lignin je nejrozšířenější methoxylovaná polyfenolová sloučenina, která je přítomna v přírodě. Je považován za molekulu s vysokým potenciálem a s vynikajícími vlastnostmi, jako jsou netoxičita, vysoký výnos, původ z udržitelných zdrojů či nízká cena. Bohužel se značná část ligninu stále spaluje pro energetické účely [12].

Velikost částic a nepravidelná morfologie jsou hlavními faktory, které omezují využití ligninu v materiálech s vysokou přidanou hodnotou, avšak nedávné studie ukázaly, že tyto nedostatky lze překonat. Metoda spočívá v přeměně ligninu na nanočástice ligninu. Právě biologická aktivita ligninu souvisí se specifickým povrchem a velikostí ligninu. Ve srovnání s mikronovými nebo většími částicemi mají ligninové nanočástice větší specifický povrch, tudíž je jejich využití vyšší [12].

Přeměna na ligninové nanočástice umožní, aby obvykle ve vodě nerozpustný lignin vytvořil stabilní koloidní disperze. Navíc se například zvýší jeho antioxidační aktivita vlivem vyššího specifického povrchu. Samotný povrch nanočástic lze snadno chemicky modifikovat díky velké dostupnosti funkčních skupin, jako jsou fenolické hydroxylové, karboxylové či alifatické skupiny [1].

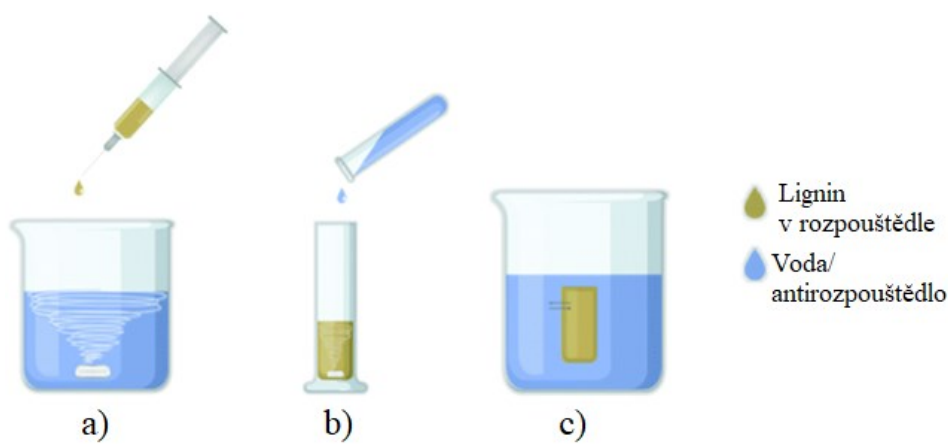
### 2.1 Vlastnosti

Na rozdíl od surového ligninu, který je tvořen nepravidelnými částicemi různých tvarů nebo velikostí, nabízí výroba nanočástic morfologickou kontrolu nad velikostí, tvarem částic a vůbec celou strukturou ligninu. Za účelem zlepšit využitelnost ligninu pro různé průmyslové oblasti je nutné přistoupit k chemické modifikaci, frakcionaci za účelem srážení do submikronových částic pro snadnější dispergaci nebo tvorby homogennějších vzorků. Přeměna ligninu na nanočástice má oproti použití nativního ligninu výhody, jelikož nanočástice mají dobré vlastnosti. Mezi ně se řadí zvýšená elektrostatická repulze pro vyšší stabilitu, nebo nižší povrchová energie a vysoká celková plocha na jednotku hmotnosti, která je odvozena od velikosti nanočástic [1].

## 2.2 Metody přípravy

Pro převedení různých druhů ligninu na nanočástice bylo vyvinuto několik metod, například srážení proti rozpouštědлу/výměny rozpouštědla, mezifázová výměna a mezifázové srážení, síťování, polymerace či dialýza [13].

Na Obrázku 6 jsou zobrazené některé z již zmíněných metod přípravy. Každá metoda má své výhody a omezení, pokud jsou využity pro syntézu nanočástic. Je třeba volit vhodnou metodu přípravy, aby bylo dosaženo požadovaných velikostí a tvaru [1].



Obrázek 6 Příprava nanočástic ligninu metodou a) přikapáváním ligninu do vody, b) přikapáváním vody do ligninu, c) dialýzou, upraveno dle [14]

### 2.2.1 Precipitace antirozpouštědlem

Nejběžnější postup přípravy pravidelných sférických ligninových nanočástic je precipitace antirozpouštědlem, kde se nejčastěji využívají rozpouštědla, jako jsou tetrahydrofuran, dimethylsulfoxid, ethanol nebo aceton. Touto metodou se získají rovnoměrné velikosti, hladký povrch a pravidelný tvar nanočástic, což je rozhodující pro dosažení koloidní stability. Nicméně morfologie a homogenita nanočástic připravených touto metodou se liší v závislosti na kvalitě ligninu, jelikož každý vykazuje odlišné vlastnosti (např. molární hmotnost, fenolické hydroxyskupiny, čistotu, rozpustnost). Částice připravené touto metodou se využívají v různých oblastech, včetně stabilizace emulzí či podávání léčiv [13]. Další možností je rozpuštění ligninu v ethylenglykolu, tento postup je vhodný především díky vysoké rozpustnosti sulfátového ligninu v tomto rozpouštědle. Nanočástice připravené pomocí precipitace antirozpouštědlem nebo dialýzy vykazují zajímavé antioxidační, antikoroziční nebo antimikrobiální vlastnosti. Takto připravené nanočástice jsou stabilní a odolné vůči vysokým hodnotám pH [15].

### 2.2.2 Polymerace

Metoda syntézy nanočástic na bázi ligninu spočívá v procesu roubování 2-(diethyl-amino)ethylmethakrylátu na alkalický lignin prostřednictvím radikálové polymerizace s přenosem atomů. Připravené nanočástice se mohou využít do Pickeringových emulzí, což představuje inovativní přístup ve vývoji ligninových nanočástic s vysokou přidanou hodnotou [3].

### 2.2.3 Superkritické antisolventní srážení

Technologie superkritického srážení je často využívána v oblasti přípravy nanočástic různých materiálů. Důvodem je mnoho výsledných unikátních fyzikálních a chemických vlastností. Principem technologie superkritického antisolventního srážení je fakt, že rozpustnost ligninu v superkritické kapalině CO<sub>2</sub> je menší než rozpustnost v rozpouštědle. Rozpustnost ligninu v původním rozpouštědle se snižuje, když se superkritická kapalina rozpustí v roztoku. Vytvoří se vysoký stupeň nasycení, vlivem vysrážení vysoce čistých nanočástic ligninu. Výhodou této přípravy je úzká distribuce a malá velikost částic vlivem nízké viskozity a nulového povrchového napětí superkritické kapaliny. Kromě těchto výhod je i používaný CO<sub>2</sub> netoxický a levný [16].

### 2.2.4 Ultrazvuk

Metoda přípravy nanočástic ultrazvukem se již používá pro syntézu biopolymerů, jako je celulóza nebo chitosan. Ultrazvuková kavitace způsobuje rozpad polymeru, rozrušení chemických vazeb a následnou tvorbu radikálů vlivem vysoké teploty a tlaku generovaných během kavitace. Principem je rozbíjení molekulárních vazeb ligninu ultrazvukovou energií. Makromolekulární lignin se rozpadá za vzniku nízkomolekulárního ligninu, což značí i zmenšení velikosti částic. Při této metodě se získají částice vykazující dobrou stabilitu s velmi nízkou tendencí sedimentovat [16].

### 2.2.5 Homogenizace

Proces dispergace a homogenizace částic ligninu v suspenzním nebo emulzním systému probíhá homogenizací s vysokým smykem. Na rozdíl od přípravy nanočástic ultrazvukem jsou chemické vazby ligninu rozrušeny působením vysoké smykové síly. Nanočástice ligninu mají horší stabilitu a více sedimentují, než u přípravy ultrazvukem [16].

### 2.2.6 Dialýza

Ze sférických ligninových částic, které jsou získávány rozpuštěním sulfátového ligninu v organickém rozpouštědle, se získají nanočástice následným zavedením vody do systému dialýzy. Roztok ligninu v rozpouštědle je umístěn do dialyzační membrány, kde je poté ponořen do vody. Dochází k výměně rozpouštědla za vodu. Celý tento proces trvá po dobu nejméně 24 hodin, je velmi jednoduchý a nezahrnuje žádnou chemickou úpravu ligninu. V této metodě voda působí jako antirozpouštědlo, snižuje stupně volnosti ligninu, kdy v důsledku tohoto jevu způsobuje segregaci hydrofobních oblastí na kompartmenty uvnitř tvořících se nanočástic. Výsledná velikost vzniklých nanočástic závisí na koncentraci rozpuštěného ligninu před dialýzou, použitím rozpouštědla nebo pH. Obecně ale mají získané nanočástice výbornou stabilitu [3, 17].

## 2.3 Využití ligninových nanočástic

Částice ligninu v mikro/nano měřítku se těší velkému zájmu vzhledem k rozsáhlým možnostem využití. Lze je použít jako dispergátory, v technických a biomedicínských lepidlech, úspěšně se využívají i ke zpevnění fenolových pěn. V kosmetickém a farmakologickém průmyslu ligninové nanočástice mohou najít uplatnění v přípravcích na ochranu proti slunečnímu záření, při stabilizaci Pickeringových emulzí nebo k přenosu iontů stříbra a jejich nanočástic. Kromě toho byly nanočástice široce zkoumány v systémech pro podávání léčiv, proto by mohly být potenciálním prekurzorem pro aplikace při podávání léčiv. Dále se hojně využívají jako plniva pro zvýšení mechanické, tepelné a antimikrobiální účinnosti. V neposlední řadě nacházejí uplatnění i jako plniva pro zvýšení kvality a účinnosti chemických vlastností polymerních směsí a biokompozitů v biomedicínských aplikacích. K řešení těchto potenciálních aplikací je zapotřebí celá řada výrobních postupů pro přípravu jak mokrých, tak suchých částic ligninu různých tvarů [1, 17].

### 2.3.1 Nosič protirakovinných léčiv

Chemoterapeutika mají nízkou klinickou účinnost z důvodu špatné selektivity, stability a nízké rozpustnosti. Vlivem těchto omezení existuje celá řada nosičů léčiv, které se zkoumají, aby cíleně doručily protirakovinná léčiva. Primárním cílem je vývoj nosičů léčiv vykazující biokompatibilní a biologicky rozložitelné vlastnosti. Právě proto může být využití ligninových nanočástic zajímavé při dodávání chemoterapeutických látek. Existuje několik studií potvrzujících použití nanočástic

jako potenciálních nosičů pro léčiva. Kromě toho lignin vykazuje antioxidační a protirakovinný potenciál, který může poskytnout synergický účinek v léčbě rakoviny, protože studie potvrzují, že jsou reaktivní formy kyslíku zapojeny v karcinogenezi. U pacientů s karcinomem bylo pozorováno zvýšené množství markerů oxidačního stresu. Výzkumy naznačují, že antioxidanty mohou působit jako preventivní činidla proti rakovinnému bujení. Z těchto důvodů je lignin vhodným nosičem díky zmiňovaným vlastnostem, ale také vzhledem ke skutečnosti, že je schopný vylučovat volné radikály díky svým fenolickým hydroxylovým skupinám [18].

### 2.3.2 Antimikrobiální aktivita

Nanočástice ligninu, které jsou napuštěné ionty stříbra a potažené vrstvou kationtového polyelektrolytu vykazují antimikrobiální vlastnosti. Syntetizované ligninové nanočástice prokázaly vynikající schopnost při zabíjení bakterií, jako je *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* apod., vlivem přilnutí nanočástic k buněčné stěně a negativnímu náboji. Byla hodnocena antibakteriální a protiplísňová aktivita, kde částice vykazovaly jak antifungální, tak antibakteriální aktivitu proti lidským patogenům *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* nebo *Escherichia coli* [19].

### 2.3.3 Tkáňové inženýrství

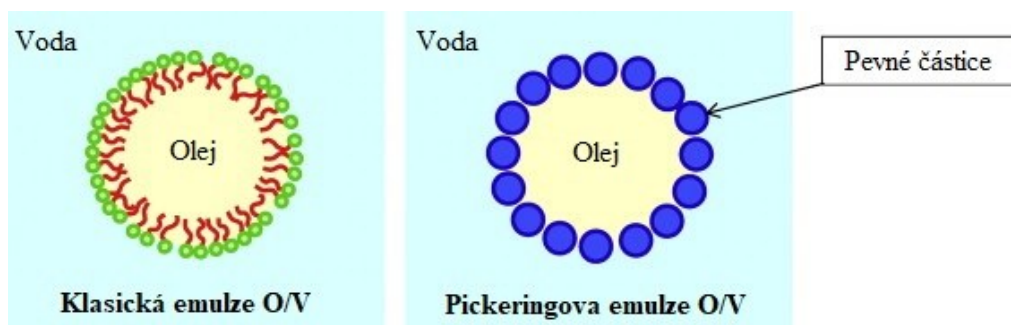
Lignin lze přeměnit na nanovlákná, hydrogely nebo další nanokompozity pro tkáňové inženýrství, což je slibný nástroj využívaný především k nahrazení, opravě nebo posílení funkce konkrétní tkáně nebo orgánu. Vývoj struktur vhodných pro buněčný růst *in vitro* a *in vivo* představuje značnou překážku, kterou je třeba v této technologii překonat. Byly navrženy modely kopolymeru sestávajícího z nanočástic ligninu a poly(N-isopropylakrylamidu), poly(ethylenglykolu) a poly(propylenglykolu) pomocí radikálové polymerizace. Vzniklé systémy vykazovaly termogelující chování, díky čemuž je použití těchto hydrogelů výhodné, jelikož jsou injektovatelné a tvarují se uvnitř tkáně, což eliminuje potřebu chirurgického zákroku. Dalšími možnostmi je například výroba biokompatibilních elektrospřádaných nanovláken kopolymerací nanočástic ligninu na poly(methylmethakrylát) pomocí radikálové polymerizace a smícháním s poly( $\epsilon$ -kaprolaktonem). Tyto hybridní nanokompozity vykazují kladný charakter při proliferaci, přichycení a interakci lidských dermálních fibroblastů [19].



### 3 PICKERINGOVY EMULZE

Emulze je disperzní systém, který tvoří dvě vzájemně nemísitelné kapaliny, ve kterých jsou kapičky jedné kapaliny rozptýleny ve druhé. Jedná se o opticky izotropní systém, tvořící nano- nebo mikronové kapičky. Nabízí tak širokou škálu aplikací vyžadujících účinné aplikační systémy nebo makroskopické homogenní směsi, jako např. kosmetika, palivo, jídlo, šablony pro porézní materiály, tekuté emulzní a pěnové filmy a další. Tyto nano- a mikroemulze ale vykazují špatnou stabilitu vlivem velkého mezifázového rozhraní. Ke stabilizaci systému se proto přidávají povrchově aktivní látky, které se díky svým amfifilním vlastnostem přednostně adsorbují na nemísitelných rozhraních kapalina-kapalina a vedou tak k účinnému snížení mezifázové energie [20].

Emulze stabilizované pevnými částicemi se nazývají Pickeringovy emulze a jedná se o stabilnější systémy než emulze stabilizované povrchově aktivní látkou, kde rozdíl mezi těmito emulzemi zobrazuje Obrázek 7 [20].



Obrázek 7 Rozdíl ve stabilizaci klasické a Pickeringovy emulze, upraveno dle [21]

Pickeringovy emulze jsou velmi atraktivní formulace vzhledem k jejich silné podobnosti s klasickými emulzemi na bázi povrchově aktivních látek. Jedná se o emulze jakéhokoli typu, a to olej ve vodě (O/V) nebo voda v oleji (V/O), či dokonce vícenásobně stabilizované právě pevnými částicemi. Tyto systémy si zachovávají základní vlastnosti klasických emulzí stabilizovaných povrchově aktivními látkami (emulgátory), z čehož vyplývá, že Pickeringovou emulzí lze ve většině aplikací nahradit klasickou emulzí [21].

### 3.1 Charakterizace Pickeringových emulzí

Pickeringovy emulze stabilizované nanočásticemi se řadí mezi nejvíce studované systémy díky jejich vynikající stabilizaci kapiček emulze, snadné výrobě nebo vysoké retenci molekul aktivní látky. Existence částic na rozhraní mezi vodnou a olejovou fází poskytuje vysokou stabilitu, citlivost na podněty či nízkou toxicitu. Tyto pozitivní vlastnosti činí emulze atraktivnější, např. při aplikaci v biomedicíně [22].

Pevné částice, které Pickeringovy emulze stabilizují, přináší těmto systémům specifické vlastnosti. Na rozdíl od molekul povrchově aktivních látek dochází u pevných částic k nevratné adsorpci na rozhraní kapalina-kapalina vlivem jejich vysoké adsorpční energie. Částečné smáčení povrchu pevných částic olejem a vodou je původcem velmi silného ukotvení pevných částic na mezifázovém rozhraní. Díky tomuto jevu jsou Pickeringovy emulze nejen stabilnější, ale vykazují i vysokou odolnost proti koalescenci. Dále tyto emulze neobsahují povrchově aktivní látky, které mají iritační potenciál. Emulze jsou atraktivní pro široké oblasti použití, zejména v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, kde emulgátory vykazují nepříjemné účinky (dráždivost, hemolytické chování,...) [20, 21].

#### 3.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti Pickeringových emulzí

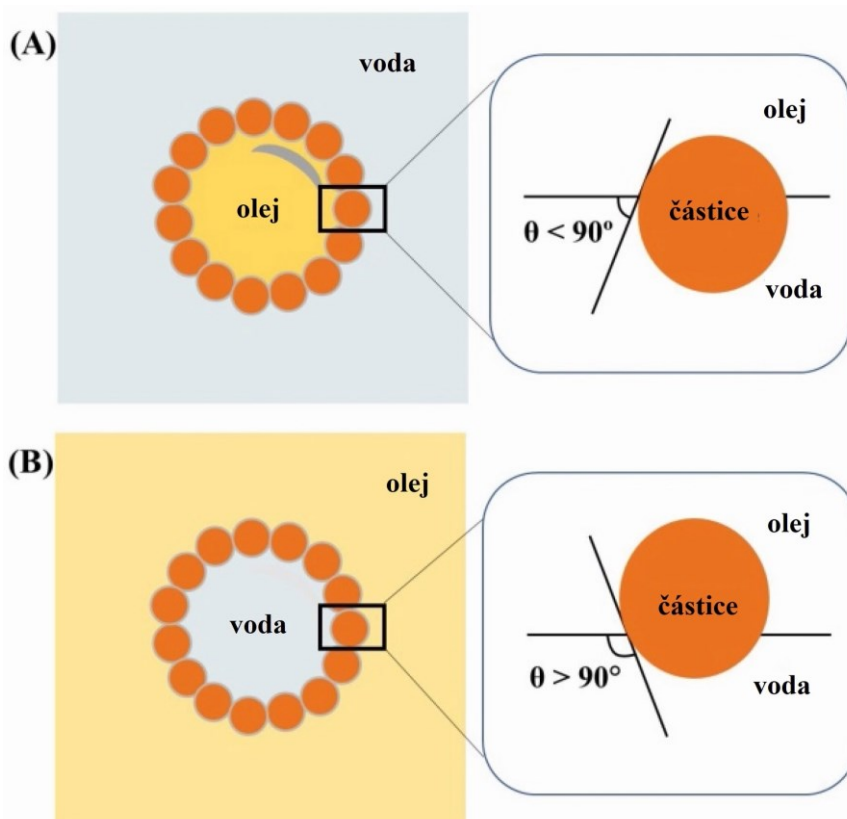
Vhodná příprava stabilních emulzí vyžaduje splnění několika hlavních kritérií, zejména dlouhodobá stabilita vůči jakémukoli destabilizačnímu jevu jako je koagulace, Ostwaldovo zrání nebo koalescence. Dlouhodobá stabilita je závislá zejména na formulaci, ale i na účinném procesu emulgace, jelikož velikost kapiček se často řídí smykovou rychlostí emulgačního procesu. Fyzikální chemie jakékoli emulze, včetně Pickeringových emulzí zahrnuje adsorpci částic, stabilizaci kapiček adsorbovanými částicemi, reologické vlastnosti, které řídí sedimentaci či krémování, a kinetiku adsorpce, která ovlivňuje proces emulgace [21].

### 3.1.2 Morfologie pevných částic

Pevné částice jsou jedním z velmi důležitých faktorů, který ovlivňuje stabilitu Pickeringových emulzí. Tradiční a nejčastěji využívané Pickeringovy stabilizátory jsou kulovité, ale existuje i řada jiných tvarů, včetně vloček, vláken, jehliček či elipsoidních částic. Byly publikovány práce zaměřující se primárně na mechanismus stabilizace těchto emulzí pomocí nekulovitých pevných částic. Ty prokázaly stabilizační účinek, který se netýká pouze sterickeho efektu, ale může být výsledkem kapilárních sil působících na mezifázovém rozhraní voda-olej [23].

### 3.1.3 Adsorpce nanočástic na rozhraních

Adsorpce pevných částic na mezifázovém rozhraní olej-voda vyžaduje částečné smáčení pevné látky olejovou a vodnou fází. Jedná se o záležitost mezifázových energií tří rozhraní, a to pevná částice-olej, pevná částice-voda a voda-olej. Povrch hydrofilních pevných částic je zcela smáčen vodou, tudíž se pevné částice neadsorbují, zůstávají tak rozptýleny ve vodné fázi emulze. Na stejném základě jsou hydrofobní částice zcela smáčené olejem. Proto je adsorpce částečně smáčených pevných částic značně silná. Volná energie adsorpce (volná energie potřebná pro desorpci jedné částice buď do vodné, nebo olejové fáze) souvisí s velikostí pevných částic a mezipovrchovým napětím. Adsorpce je nejsilnější, pokud je kontaktní úhel  $90^\circ$ , což odpovídá maximální stabilitě emulzí (viz Obrázek 8). Na poloze částice na rozhraní a kontaktním úhlu závisí typ emulze. Velké částice, které mají větší plochu ve styku s olejem a vodou vykazují větší adsorpční volnou energii. Pevné nanočástice se silně adsorbují na rozhraní voda-olej, kdy ve skutečnosti je volná adsorpční energie vždy větší než tepelná energie, i když jsou pevné částice velmi malé [21].



Obrázek 8 (A) Poloha pevné částice na rozhraní kapky s kontaktním úhlem ( $\theta$ ) menším než  $90^\circ$  - systém o/v, (B) Poloha pevné částice na rozhraní kapky s kontaktním úhlem ( $\theta$ ) větším než  $90^\circ$  - systém v/o, upraveno dle [24]

### 3.1.4 Druhy stabilizujících částic

Velké množství typů částic, ať už organických nebo anorganických, splňuje podmínku částečného smáčení pro většinu olejů. Jedná se o široké spektrum částic, mezi kterými jsou uhličitán vápenatý, jíly, síran barnatý, chitosan, saze, latex, uhlíkové nanotrubicce, magnetické částice, blokové kopolymerové micely, nebo přírodní stabilizátory (škrob, zein, sójový protein apod.). Mezi účinné stabilizátory Pickeringových emulzí se řadí i spory nebo bakterie. Funkční částice přinášejí doplňkové vlastnosti emulzí, jako je citlivost na teplotu nebo specifické pH emulzí [21, 23].

Velmi využívané anorganické částice byly prvními studovanými koloidními částicemi při přípravě a stabilizaci Pickeringových emulzí. Stále jsou velmi atraktivními a nejvíce studovanými částicemi pro tento účel. Některé jsou na povrchu velmi hydrofilní a vyžadují částečně hydrofobní povlak z důvodu zajištění částečného smáčení olejem a vodou. Jedná se o případ oxidu křemičitého, který je hojně využívaným systémem vzhledem ke své dobré

odolnosti vůči kyselému a zásaditému prostředí nebo pro snadnou modifikaci povrchu, či kontrolované velikosti a struktury [21, 25].

### 3.1.5 Stabilita Pickeringových emulzí

Pickeringovy emulze jsou považovány za vysoce stabilní systémy díky téměř nevratné mezifázové adsorpci částicových stabilizátorů. Díky vysoké energii desorpce částic z rozhraní může vysoká stabilita těchto emulzí účinně chránit zapouzdřené aktivní látky, proteiny nebo i enzymy v kapkách emulze po dlouhou dobu [25].

Stabilita Pickeringových emulzí se týká schopnosti emulze zachovat si své fyzikální vlastnosti v průběhu času. Těmito vlastnostmi je velikost, tvar, morfologie, reologie a další mechanické vlastnosti. Nejběžnější destabilizační mechanismy emulzí jsou gravitační separace, jako je sedimentace nebo krémování, koalescence, Ostwaldovo zrání, flokulace a separace fází [26].

Stabilitu Pickeringových emulzí ovlivňují i všechny typy interakcí mezi adsorbovanými částicemi, a to zejména disperzní a elektrostatické interakce. Vliv na stabilitu mají i interakce, které nemají specificky mezifázový charakter. Nejen že ovlivňují přítomnost částic v emulzi, ale i na mezifázovém rozhraní [21].

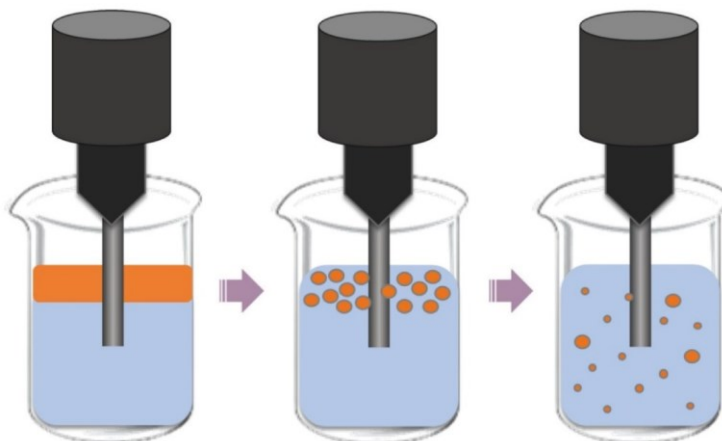
### 3.1.6 Příprava Pickeringových emulzí

Při přípravě Pickeringových emulzí je důležité, aby se pevné částice adsorbovaly na rozhraní voda-olej, kdy je nezbytné, aby byly částice smáčeny těmito fázemi. Jakmile jsou pevné částice adsorbovány, zvětšují plochu rozhraní, a tím snižují energii, která snižuje hnací sílu potřebnou pro přenos částic. Tvorba těchto emulzí tedy závisí na koncentraci, smáčivosti, velikosti, hustotě, pH vodné fáze a přítomnosti aditiv. Tyto parametry jsou hlavními kritérii pro hodnocení stability Pickeringových emulzí [24].

Hlavními procesy pro získání Pickeringových emulzí je s využitím emulgačních technik, jako je vysokotlaká homogenizace, vysokorychlostní homogenizace s rotor-stator systémem nebo nejvyužívanější sonikací pomocí ultrazvukového procesoru. Nedávné studie poukazují na nové techniky vytvoření Pickeringovy emulze pomocí membránové emulgace a mikrokanálové nebo mikrofluidní emulgace [24].

V experimentální části práce byl pro získání Pickeringových emulzí použit ultrazvukový procesor. Zařízení využívá metody kavitace, která způsobuje rozpad kapiček. Lze jej nazývat jako rychlou tvorbu a kolaps bublin v kapalině. Ultrazvuková energie se koncentruje

zejména v blízkosti sondy, což způsobuje kavitaci a tím připravuje emulzi s menšími kapičkami emulze (viz Obrázek 9). Kavítace a smykové napětí způsobené touto metodou přípravy mohou podporovat adsorpci stabilizátoru na dvoufázovém rozhraní, kdy v důsledku toho bude stabilita systému větší a velikost kapiček emulze menší [24].



Obrázek 9 Schématické znázornění emulgace v ultrazvukovém zařízení [24]

### 3.1.7 Biomedicínské aplikace Pickeringových emulzí

Pickeringovy emulze jsou velmi často stabilizovány pevnými částicemi, které jsou biokompatibilní, jako jsou přírodní cyklodextrin nebo chitosan. Pickeringovy emulze budou mít díky částicím rovněž tyto vlastnosti. Kolem kapiček se vytvoří hustá bariéra pevných částic, které zastávají bariérovou funkci, kdy v některých případech jsou polymerní částice schopny interagovat s nabitými léčivy. Tudíž se lépe dosahuje profilu trvalého uvolňování léčiva, kdy uvolňování probíhá pomalu a rovnoměrně po delší dobu, což je žádoucí pro léčivé přípravky vyžadující dlouhodobou a stabilní účinnost. Efektivní léčba vyžaduje zejména účinné léky, ale i správné dodání léku a postupné uvolňování vehikul na konkrétní místa. Dle nejrůznějších studií můžeme dojít k závěru, že Pickeringova emulze je velmi perspektivním vehikulem pro řízené dodávání léčiva [23, 27].

Další možností například k léčbě nebo regeneraci tkání jsou tkáňové scaffoldy, které přitahují pozornost vzhledem k možným aplikacím právě v tkáňovém inženýrství. Ty dokážou poskytnout jakési lešení pro biomimetické prostředí pro buněčnou proliferaci a diferenciaci, stejně jako fyzickou podporu pro nově vzniklé tkáně. Vhodné biologické scaffoldy pro inženýrství kostních tkání by měly být zejména porézní s dostatečnou mechanickou stabilitou, biologickou odbouratelností, vysokou biologickou aktivitou a také dostatečnou schopností adheze a adsorpce proteinů. Pro přípravu takovýchto

materiálů byly využity různé metody, zatímco Pickeringova emulze jako templát je nejperspektivnějším kandidátem. Důvodem je vysoká stabilita, snadné zpracování a kratší časová náročnost přípravy [23].

Inteligentní materiály reagující na podněty či prostředí, jejichž vlastnosti mohou být ovlivněny vnějšími podněty jako je pH, teplota, světlo, iontová síla, magnetické/elektrické pole, přitahují pozornost v biologických a lékařských oblastech. Důvodem je využití pro řízené uvolňování léčiva nebo separaci proteinů. Pickeringova emulgace je jedna z velmi dobře vyvinutých a popsanych metod, která by mohla začlenit zajímavé materiály a motivovat k dalšímu zkoumání při výrobě chytrých systémů [23].

### 3.2 Možnosti využití emulzí v kosmetice

Emulze jsou hojně používány ve farmaceutických, ale i kosmetických aplikacích. Lokální aplikace emulzí představuje hned několik výhod, mezi kterými je například zvýšené uvolňování aktivní látky. Vzhledem k faktu, že emulze nejsou termodynamicky stabilní systémy, je pro formulaci emulzí a dlouhodobou stabilitu velmi důležitý vhodný výběr stabilizátorů. V současnosti jsou emulze v kosmetice stabilizovány nízkomolekulárními povrchově aktivními látkami. Navíc je známo, že některé povolené syntetické povrchově aktivní látky mají nežádoucí vlastnosti jako je toxicita (kožní reakce, kontaktní dermatitida, zánět či poškození buněk, karcinogenita), nebo způsobují obavy týkající se životního prostředí. V tomto směru byly vyvinuty nové a méně škodlivé stabilizační postupy emulzí, jako je použití biopolymerů nebo právě pevných částic, které se stávají atraktivnějšími pro použití ve farmaceutických a kosmetických aplikacích [28, 29].

Dalšími výhodami je nižší toxicita, nižší cena nebo jednoduché regenerační vlastnosti ve srovnání s klasickými emulzemi. Důležitým parametrem je velikost částic použitých v emulzích pro topické aplikace. Nanočástice a mikročástice jsou vhodnou volbou vzhledem své přizpůsobitelné velikosti a polaritě povrchu, které zlepšují průnik kůží. Taktéž mohou vytvořit okluzivní vrstvu a prodloužit retenční čas, čehož se primárně využívá pro dodávání aktivních látek [28, 29].

### 3.2.1 Částice používané v Pickeringových emulzích pro kosmetické účely

Nano- a mikročástice mají vhodné vlastnosti pro použití do kosmetických přípravků, čímž otevírají důležité cesty pro výrobu nových produktů, které vynikají lepším složením, penetrací kůži, dodáním aktivních složek nebo dlouhodobými účinky [30].

Polymerní částice (přírodní i syntetické) se v současnosti využívají v produktech péče o pleť, hydratačních krémech nebo krémech proti stárnutí. Nejčastěji se jedná o částice chitosanu, kdy důvodem použití je biokompatibilita či snadná biologická rozložitelnost [30].

Nanočástice oxidu titaničitého a oxidu zinečnatého jsou v kosmetice běžně využívány pro zajištění ochrany proti UV záření díky jejich schopnosti odrážet UVB a UVA paprsky. Kombinace obou oxidů umožňuje připravit transparentní produkty s velmi dobrou roztíratelností a texturou [30].

Nanočástice oxidu křemičitého se v kosmetice využívají pro jeho příjemné sensorické vlastnosti. Tento typ oxidu lze běžně získat ve velkých množstvích za pomoci nízkonákladových procesů a lze jej chemicky upravit tak, aby získal specifické vlastnosti. Tento fakt podnítil využívání nanočástic oxidu křemičitého v produktech vlasového stylingu, zubních pastách nebo skin care [30].

Zmíněné částice byly v Pickeringových emulzích použity i v dalších systémech, např. v emulzích stabilizovaných oxidem křemičitým. Ukázaly zvýšené dodávání aktinu do kůže ve srovnání s klasickou emulzí na bázi povrchově aktivních látek. Pickeringova emulze byla navíc použita v přípravcích na ochranu proti slunečnímu záření, kdy umožní, aby chemické UV filtry zůstávaly na povrchu kůže a nepronikaly do hlubších vrstev. Dále byly Pickeringovy emulze stabilizovány např. chitosanem, který díky svým dobrým stabilizačním vlastnostem a baktericidní aktivitě přispíval k příznivému hojení ran. Pro topické aplikace se dále využívají jako stabilizátory arabská guma, cyklodextrin, škrob, jíly, celulósová nanokrystaly, oxid titaničitý apod. [28, 29].



### 3.3 Pickeringovy emulze stabilizované ligninovými částicemi

Jedním z mnoha různých způsobů, jak využít nativní lignin a jak se vyrovnat s jeho heterogenitou, je transformace na koloidní ligninové částice s dobře definovanou povrchovou energií a morfologií. Tyto částice jsou k dispozici ve vodných, vysoce koncentrovaných disperzích, které jsou dále různě využívány. Lignin se vyznačuje jedinečnými výhodami oproti ostatním přírodním materiálům, a to obsahem hydrofobní aromatické fenylové skupiny, a hydrofilními skupinami, kterými jsou hydroxylové a karboxylové skupiny. Tím je možné dále zavádět funkční skupiny pro dosažení různě hydrofobních a hydrofilních částic, aby byly splněny požadavky pro tvorbu emulze. Dalšími výhodami jsou vynikající UV absorpce a antioxidační vlastnosti ligninu [31, 32].

Jednou z aplikací je využití ligninových částic jako stabilizátoru v Pickeringových emulzích. Pickeringovy emulze připravené s nanočásticemi ligninu jsou extrémně konkurenceschopné v aplikačních oblastech, kde jsou účinné složky léčiv nebo kosmetiky velmi citlivé na světlo, oxidaci a teplo. Dále může lignin agregovat do částic a stabilizovat Pickeringovy emulze za kyselých podmínek, zatímco za alkalických podmínek bude depolymerovat a vést k deemulgaci, vlivem čehož emulze reagují na pH [31, 32].

V kosmetickém průmyslu se lignin a jeho vlastnosti v Pickeringových emulzích mohou využívat zejména v opalovacích krémech k ochraně lidské pokožky před UV zářením. Lignin nahrazuje i syntetické povrchově aktivní látky, což znamená zlepšení kosmetických přípravků z hlediska lidského zdraví a šetrnosti k životnímu prostředí [31].

## 4 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY

V posledních dvou desetiletích prošly Pickeringovy emulze velmi důležitým vývojem, kdy byly velmi intenzivně studovány [23, 30].

Pickeringovy emulze je možné připravit s různými vlastnostmi dle zamýšlené aplikace, což otevírá široké příležitosti pro design nových výrobků v průmyslových odvětvích, včetně kosmetického. Použití pevných částic umožňuje kontrolovat vlastnosti jako např. modifikovat pocit při aplikaci, vzhled, texturu, nebo ovlivňovat organizaci kapiček a viskozitu. Tyto aspekty umožňují výrobu inovativních multifunkčních systémů, včetně kosmetických přípravků. Nicméně vývoj Pickeringových emulzí pro kosmetické aplikace je velmi omezený vlivem dostupných studií zkoumající použití kosmeticky přijatelných částic [30].

Mezi pevnými částicemi, které se využívají ke stabilizaci Pickeringových emulzí, se řadí i přírodní biopolymer lignin. V současné době se např. mikročástice nebo nanočástice ligninu, které účinně stabilizují emulze, protože vykazují zvýšenou adsorpční schopnost na rozhraní voda-olej, což je výhodné pro tvorbu stabilních Pickeringových emulzí. Dosud byly zkoumány různé metody přípravy těchto nanočástic, např. pomocí kyselého srážení nebo výměnou rozpouštědla apod. Vlivem výborných vlastností, kterými se lignin vyznačuje, se v Pickeringových emulzích stále více objevuje a nachází využití v širokém spektru průmyslových oblastí [32].

Studie dle Qian a kol. se zaměřila na naroubování diethylaminoethylmethakrylátu na částice ligninu, kdy tyto vzorky reagují na oxid uhličitý za účelem přípravy Pickeringových emulzí, které lze řídit přívodem oxidu uhličitého nebo dusíku pro emulgaci a deemulgaci. Wang a kol. provedli modifikaci ligninu selektivní fenolizací za účelem přípravy Pickeringových emulzí. Tato modifikace vedla zejména ke zlepšení stability emulze, UV odolnosti a příznivým antioxidačním vlastnostem. Vyrobena emulze byla použita jako nosič pro avermektin, a umožnila ochranu a řízené uvolňování této sloučeniny [32–34].

Dai a kol. naroubovali poly-n-isopropylakrylamín na alkalický lignin a vytvořil nanočástice, které by mohly stabilizovat emulze, kde by se dosáhlo tepelně řízeného uvolňování trans-resveratrolu. Jedná se o léčivo, které je nestabilní na světle a má nízkou rozpustnost ve vodě. Studie Wei a kol. popisuje použití Pickeringovy emulze typu O/V stabilizované pomocí částic alkalického ligninu jako templátu pro výrobu makroporézní pěny, polystyrenových částic a vícevrstevných mikrokapslí. Lie a kol. popsali použití částic ligninu,

který byl zapuštěn do obalu mikrokapsle sloužícím k redukci iontů stříbra, čím se dosáhlo značné antibakteriální aktivity [22, 32, 35–37].

Výše zmíněné studie jsou však ve fázi počátečního vývoje a je nutné více základního výzkumu pro zjištění faktorů ovlivňující emulgační výkon částic, jako je jejich velikost, hydrofilita a hydrofobicita. Některé studie se liší i ve svých výsledcích. Studie Ago a kol. pozorovala, že emulze generované z menších částic ligninu vykazují větší stabilitu. Naopak studie Nypeloe a kol. uvedla pokles stability emulze vlivem zmenšení velikosti částic. Vzhledem k těmto výsledkům se ale různé studie shodují, že Pickeringovy emulze stabilizované pevnými částicemi vykazují lepší stabilitu a vyšší aplikační potenciál než klasické emulze stabilizované pomocí povrchově aktivních látek. Ligninové částice v emulzích vynikají anti-ultrafialovými a antioxidačními vlastnostmi a dobrou stabilitou. Tím si do budoucna zajišťují široké aplikační vyhlídky [32, 38, 39].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

Experimentální část práce se zaměřuje na přípravu nanočástic ligninu (LNP) pomocí metod precipitace. Následně byla sledována schopnost těchto nanočástic stabilizovat Pickeringovy emulze. Nanočástice i vyrobené emulze byly charakterizovány pomocí různých metod.

### 5.1 Použité materiály a chemikálie

Pro přípravu ligninových nanočástic byl použit alkalický lignin, který byl získán sulfátovou (kraft) metodou s nízkým obsahem síry. Výrobce je Sigma-Aldrich spol., s.r.o. V rámci přípravy LNP byly použity následující chemikálie a materiály:

- Organická rozpouštědla
  - Dimethylsulfoxid (DMSO, Chemapol, Česká republika)
  - Ethanol, 96 % (EtOH)
  - Tetrahydrofuran (THF, PENTA, Česká republika)
  - Aceton (Ac, IPL Ing. Lukeš, Česká republika)
- Antirozpouštědla
  - Citrát-fosfátový pufr
    - Dihydrogenfosforečnan sodný (Chemapol, Česká republika)
    - Kyselina citronová (IPL Ing. Lukeš, Česká republika)
  - Demineralizovaná voda
  - Pro úpravu pH
    - 1 M HCl, 1 M NaOH

Pro přípravu Pickeringových emulzí a jejich charakterizaci byly dále použity:

- BIO Jojobový olej (Nobilis Tilia)
- Cedrový olej (PENTA, Česká republika, pro mikroskopické pozorování emulzí)

## 5.2 Použité přístroje

- Analytické váhy (BA 110 S, Sartorius, Německo)
- Laboratorní váhy (EW 420-3NM, Kern, Německo)
- Bariérový pH metr CPH 51 s kombinovanou elektrodou HC 103
- Elektromagnetické míchadlo (Helidolph MR Hei-Standard)
- Ultrazvukový sonikátor (UP 400St, Heilscher, Německo)
- Laboratorní centrifuga (EBA 20, Hettich, Německo)
- Analyzátor nanočástic Zetasizer (Malvern Nano ZS 90, Velká Británie)
- Laserový analyzátor částic (Mastersizer 3000, Malvern, Velká Británie)
- Optický mikroskop (Olympus CX21, Japonsko)
- Skenovací elektronový mikroskop Nova NanoSEM 450 (FEI, Czech Republic)
- See Systém (Advex Instruments, Česká republika)
- Tenziometr EasyDyne (Krüss, Německo)
- Sušárna Memmert (Verkon, Česká republika)

## 6 POUŽITÉ METODY

### 6.1 Příprava ligninových částic

Surový lignin se vyznačuje nepravidelným tvarem a různou velikostí částic, proto se přeměňuje na nanočástice z důvodu kontroly struktury a vzniku jednotné velikosti částic. Pro tento experiment byl využit alkalický lignin, který byl rozpuštěn ve čtyřech organických rozpouštědlech.

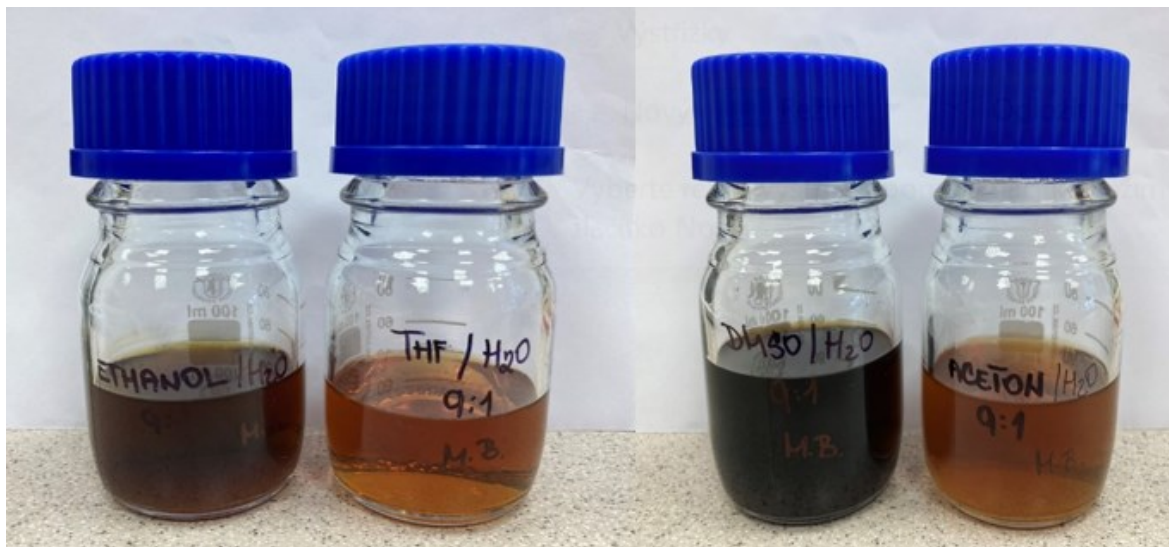
Jako rozpouštědla byly vybrány dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran, ethanol a aceton. Dle literatury [2] je kombinace rozpouštědla s určitým poměrem vody pro rozpouštění ligninu výhodnější. Proto byly zásobní roztoky ligninu připraveny následujícím způsobem.

#### 6.1.1 Příprava zásobního roztoku

Pro přípravu zásobního roztoku byla použita organická rozpouštědla a demineralizovaná voda v poměru 90:10. Přítomnost DEMI H<sub>2</sub>O v tomto poměru byla zvolena z důvodu lepší rozpustnosti ligninu než v samotném rozpouštědle, kde lignin sedimentoval a nebylo možné jej rozpustit.

Při použití odlišných rozpouštědel se díky jejich rozdílné polaritě rozpouštěla jiná frakce ligninu [4, 14]. Typem rozpouštědla lze např. ovlivnit morfologii a velikost částic.

Zásobní roztok ligninu (viz Obrázek 10) byl připraven navážením a rozpuštěním ligninu ve směsi rozpouštědlo/voda v poměru 90:10, aby výsledná koncentrace ligninu byla 5 mg/ml. Tato disperze byla míchána po dobu 24 hodin na elektromagnetickém míchadle. Následně byla zcentrifugována po dobu 5 minut při 6000 rpm, aby se oddělil nerozpustný podíl ligninu od rozpustné frakce. Rozpustná frakce byla na závěr ještě sonikována (1 minutu při 60% amplitudě) z důvodu lepšího rozpuštění ligninu. Na Obrázku 10 lze vidět znatelný rozdíl v rozpouštění ligninu v jednotlivých rozpouštědlech.



Obrázek 10 Připravené zásobní roztoky ligninu ve čtyřech rozpouštědlech

### 6.1.2 Příprava antirozpouštědla

Dle literatury se pro separaci ligninu z organických rozpouštědel velmi často používá srážení ligninu za použití antirozpouštědel, kterou provedli Colucci a kol. [40]. Byly připraveny dva druhy antirozpouštědel, které se dále používaly pro přípravu ligninových částic. U metody přikapávání se jako antirozpouštědlo využíval citrát-fosfátový pufr a DEMI H<sub>2</sub>O, jejichž pH bylo upraveno na hodnoty 2, 4, 6 a 8.

Citrát-fosfátový pufr byl namíchán z hydrogenfosforečnanu sodného (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), kyseliny citronové a DEMI H<sub>2</sub>O. Vždy bylo připravováno 100 ml roztoku, kdy k přesným navážkám chemikálií (viz Tabulka 1) pro dané pH bylo napipetováno 80 ml DEMI H<sub>2</sub>O, pH bylo upraveno pomocí 1M HCl a 1M NaOH. Poté byl odměrný roztok doplněn po rysku na objem 100 ml.

Tabulka 1 Příslušné navážky pro citrát-fosfátový pufr v daných pH

pH	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [g]	Kyselina citronová [g]
2	0,06	2,06
4	1,09	1,29
6	1,88	0,71
8	2,76	0,06



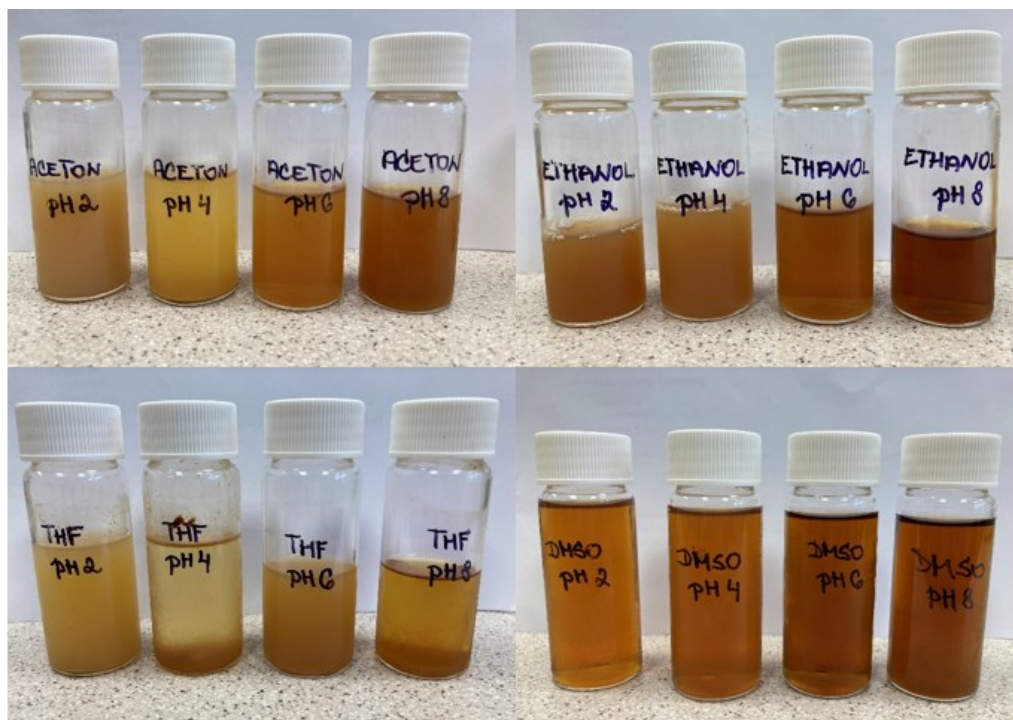
V případě DEMI H<sub>2</sub>O jako antirozpouštědla bylo upraveno její pH pomocí 1M HCl a 1M NaOH. Pomocí pH metru bylo pH vody upraveno na hodnoty pH 2, 4, 6 a 8, a následně byla použita pro přípravu ligninových nanočástic.

### 6.1.3 Příprava ligninových částic

Organizovaná struktura nanočástic vzniká díky specifickým intermolekulárním nekovalentním interakcím. Přídavkem ligninu do antirozpouštědla dochází k asociaci molekul a díky hydrofobním interakcím se tvoří koloidní částice. Ligninové nanočástice byly připravovány precipitací antirozpouštědlem, a to metodou přikapávání a dialýzou [41].

#### 6.1.3.1 Metoda přikapávání

U metody přikapávání byl zásobní roztok ligninu nakapán pomocí injekční stříkačky do antirozpouštědla (pufr nebo DEMI H<sub>2</sub>O s upraveným pH) v poměru lignin/antirozpouštědlo 1:2, směs byla míchána na elektromagnetickém míchadle po dobu 30 minut. Tímto způsobem vznikly ligninové nanočástice, které byly připravovány i ve studiích Österberg a kol. nebo Figueriedo a kol. [13, 42]. V dalším kroku bylo přítomné organické rozpouštědlo odpařeno za stálého míchání ve vodní lázni a při zvýšené teplotě na elektromagnetickém míchadle. Vzorčky byly poté sonikovány (1 minuta, 60% amplituda) kvůli lepší dispergaci částic ligninu a rozrušení případných agregátů. Disperze připravených částic jsou zobrazeny na Obrázku 11. Jelikož má dimethylsulfoxid (DMSO) vysoký bod varu, a jeho přítomnost v disperzi výrazně ovlivňuje vlastnosti částic, nebylo DMSO odpařeno, a dále nebyly částice z ligninu rozpuštěných v DMSO využity k dalším experimentům.



Obrázek 11 Jednotlivé vzorky připravené metodou přikapávání do pufru v daných pH

### 6.1.3.2 Metoda dialýzy

Postup přípravy LNP pomocí dialýzy byl odlišný, avšak korespondoval se studií, kterou provedli Lievonen a kol. [17]. Byla využita dialyzační membrána (6-8 kDa), kterou byla nejprve hydratována v DEMI H<sub>2</sub>O, a poté se do ní napipetovalo 10 ml zásobního roztoku ligninu. Takto připravená membrána s ligninem se vložila na 24 hodin do kádinky s 600 ml antirozpouštědla (DEMI H<sub>2</sub>O s upraveným pH), antirozpouštědlo bylo v pravidelných intervalech vyměňováno za čerstvé. Tímto postupem došlo k výměně rozpouštědel a v dialyzační membráně precipitací vznikaly nanočástice ligninu. Kádinky s membránami byly zakryty parafilmem a alobalem, aby se zamezilo odpařování kapaliny a přístupu denního světla. Po 24 hodinách byla membrána vyjmuta a její obsah (nanočástice) byly transferovány do vialky. Jednotlivé vzorky byly sonikovány po dobu 1 minuty při 60% amplitudě, opět aby došlo k rozrušení vzniklých agregátů ligninu. Vzniklé disperze LNP jsou zobrazeny na Obrázku 12.

Níže popsané testy (stanovení sušiny, povrchové napětí, SEM a měření kontaktních úhlů) byly provedeny jen u částic připravených dialýzou.



Obrázek 12 Jednotlivé vzorky připravené metodou dialýzy v různých pH

## 6.2 Charakterizace ligninových částic

Připravené ligninové nanočástice (LNP) byly charakterizovány po fyzikálně-chemické stránce, kdy byla stanovena velikost částic a stabilita. Dále byla studována morfologie částic pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Bylo stanoveno i množství částic v připravených vzorcích pomocí stanovení sušiny. Na závěr bylo u vzorků LNP změřeno povrchové napětí a kontaktní úhly mezi částicemi a jojobovým olejem.

### 6.2.1 Měření velikosti částic a zeta-potenciálu

Pro měření velikosti částic a zeta-potenciálu byl využit přístroj Zetasizer Malvern Nano ZS 90, který pracuje na principu dynamického rozptylu světla, měří Brownův pohyb a uvádí jej do vztahu s velikostí částic. Využívá se ozáření částic laserem a analýza fluktuací intenzity v rozptýleném světle. Výsledkem měření je distribuce velikosti podle intenzity, kde osa X popisuje distribuci tříd dle velikosti, osa Y relativní intenzitu rozptýleného světla [43].

Proměřeny byly všechny připravené vzorky nanočástic ligninu, jak z metody přikapávání, tak z dialýzy. Všechna měření proběhla v demineralizované vodě, kde do plastových kyvet bylo nadávkováno 100-300  $\mu\text{l}$  vzorku a 1000  $\mu\text{l}$  demineralizované vody, která byla z důvodu větší čistoty 2x přefiltrována přes mikrostríkačkový filtr (PVDF, 0,2  $\mu\text{m}$ ).

Výsledkem je průměr ze tří měření. Velikost částic byla proměřena ihned po přípravě a poté znovu po jakékoliv úpravě, např. po odpaření rozpouštědla nebo sonikaci, cílem bylo sledovat vliv těchto úprav na velikost LNP.

Zeta-potenciál nanočástic v roztoku zjišťuje povrchový náboj na základě pohyblivosti nanočástic mezi dvěma elektrodami. Hodnota zeta-potenciálu je důležitým vodítkem pro předpověď elektrostatické stability disperzí. Pokud jsou hodnoty zeta-potenciálu vyšší než + 30 mV nebo nižší než – 30 mV, považují se částice za koloidně stabilní [44].

Zeta-potenciál byl proměřen opět u všech připravených vzorků LNP i u poté připravených emulzí. Měření probíhalo v destilované vodě, která byla přefiltrována přes mikrostríkačkový filtr. U připravených vzorků jak z přikapávání, tak dialýzy bylo smícháno 300  $\mu$ l disperze LNP a 3000  $\mu$ l demineralizované vody. Koloidní stabilita byla přeměřována i u vzniklých emulzí, které byly stabilizovány připravenými nanočásticemi. U emulzí bylo nadávkováno 9  $\mu$ l vzorku a 3000  $\mu$ l demineralizované vody. Výsledná hodnota je průměrem ze tří měření.

### 6.2.2 Skenovací elektronová mikroskopie

Pro zjištění morfologie ligninových nanočástic byla využita skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Ta využívá metody proudu elektronů a tvorby výsledného obrazu, kde se dle charakteru povrchu mění úroveň signálu v detektoru. U této mikroskopie je tedy vzorek zkoumán bod po bodu a výsledný obraz vzniká složením jednotlivých signálů [45]. Pro SEM byly připraveny vzorky z přípravy LNP pomocí dialýzy, a to tak, že 1 ml vzorku byl zlyofilizován. Vysušený vzorek byl nanesen na uhlíkovou pásku. Vzorky byly zaprášeny Au/Pd kvůli zamezení kumulace náboje na povrchu. Vzorky byly pozorovány při zvětšení 30 000 a 50 000. Foceny byly pomocí ETD detektoru při 5 kV SEM mikroskopem Nova NanoSEM 450.

### 6.2.3 Stanovení množství částic v disperzi

Množství částic v disperzi bylo určeno stanovením hmotnosti částic po odstranění vody ze vzorku sušením. Hmotnost částic se stanoví z hmotnostního úbytku po vysušení daného vzorku při dané teplotě do konstantní hmotnosti. Pro stanovení byly zvoleny vzorky připravené metodou dialýzy. Pro stanovení byly použity čisté, vysušené a zvážené váženky, do kterých se nadávkoval 1 g vzorku. Sušení probíhalo za teploty 104 °C a vzorek byl v sušárně ponechán do konstantní hmotnosti.

Koncentrace částic byla vypočítána dle vzorce:

$$c = \frac{m_1}{m_0} \quad (1)$$

$m_0$  – hmotnost vzorku před vysušením [g]

$m_1$  – hmotnost vzorku po vysušení [g]

$c$  – koncentrace částic [mg/g]

#### 6.2.4 Stanovení povrchového napětí a kontaktních úhlů

Pro stanovení povrchového napětí byla využita metoda vyvažování Wilhelmyho destičky, kde principem je měření síly potřebné k vyvážení rovné svislé destičky, která je vnořena do zkoumané kapaliny. Síla je měřena pomocí vah vysoké citlivosti [46]. Měřenou kapalinou byla disperze nanočástic ligninu o pH 6, které byly připraveny dialýzou. Připravený vzorek ve skleněné misce byl vložen do přístroje a následně byly změřeny hodnoty povrchového napětí.

Smáčivost ligninových nanočástic olejovou fází byla stanovena měřením kontaktního úhlu pomocí See Systemu. Jedná se o metodu, která využívá pokročilého obrazového zpracování a analýzy obrazů k měření různých parametrů, jako je například kontaktní úhel, povrchové napětí nebo rozložení povrchového filmu. Základem měření jsou profily kapek měřících kapalin na zkoumané vrstvě, na které se analyzuje hodnota kontaktního úhlu [47].

Pro tento experiment byl stanoven kontaktní úhel ze vzorků částic z dialýzy v pH 6. Příprava vzorků byla velmi podobná jako u stanovení množství částic. Byly nadávkovány 2 ml vzorku LNP na mikroskopické krycí sklíčko ve váženec. Takto připravené vzorky byly vysušeny při teplotě 104 °C. Po vysušení bylo krycí sklíčko vyjmuto a podrobena analýze na See Systemu. Na vrstvu částic na krycím sklíčku byly nakapány v objemu 4 µl jojobový olej a DEMI H<sub>2</sub>O a byly změřeny kontaktní úhly.

Vrstva částic na krycím sklíčku byla pozorována i pod optickým mikroskopem Olympus CX 21 z důvodu zjištění morfologie vzniklých vrstev. Pozorování probíhalo při zvětšení 10x, 40x.

### 6.3 Příprava Pickeringových emulzí

Připravené disperze nanočástic ligninu byly využity pro stabilizaci emulzí typu O/V. Byly využity částice z obou metod přípravy, a to přikapávání i dialýzy. Jako olejová fáze byl použit bio jojobový olej s vlastnostmi vhodnými pro přípravu kosmetických emulzí (vysoká hydratace pokožky nebo tvorba nemastného filmu, který neucpává póry). Další výhodou, kterou jojobový olej disponuje je rovněž SPF faktor [48].

Jako první byly připraveny emulze v poměru O/V 10:90 a to navážením 1 g oleje a 9 g disperze částic. Emulgace byla provedena sonikací po dobu 1 minuty při amplitudě 60 %, dle potřeby byly emulze sonikovány další minutu.

Vlastnosti emulzí byly vyhodnoceny, pro další testování a přípravu emulzí byly vybrány částice připravené při pH 6 metodou dialýzy. Těmito částicemi byly stabilizovány emulze ve třech poměrech pro porovnání výsledných vlastností.

Emulze byly proto vyrobeny jak v poměrech 10:90, tak i v 5:95 a 20:80. Pro poměr 5:95 bylo naváženo 0,5 g oleje a přidáno 9,5 g vzorku. Pro poměr 20:80 byly naváženy 2 g oleje a přidáno 8 g vzorku. Sonikace probíhala po dobu 2 minut, při 60% amplitudě.

### 6.4 Charakterizace emulzí

Charakterizace emulzí je klíčová pro určení vlastností a další použití v různých kosmetických aplikacích. U vyrobených emulzí byly sledovány parametry jako je emulgační účinnost, jejich velikost a zeta-potenciál. Následně byly emulze sledovány pod optickým mikroskopem z důvodu zjištění jejich mikrostruktury.

#### 6.4.1 Emulgační účinnost

Emulgační účinnost (též emulgační efektivita) představuje zásadní vlastnost pro emulzní systémy a určuje schopnost stabilizátoru emulgovat olej. Metoda přípravy, pH částic a použité rozpouštědlo pro lignin zásadně ovlivnilo vlastnosti částic a jejich schopnost emulgovat olej. Použitá rozpouštědla (THF, aceton, ethanol) rozpouští jiné frakce ligninu, proto budou mít výsledné částice, a tím i emulze, odlišné vlastnosti.

Připravené emulze obsahovaly i nezaemulgovaný olej, který byl odebrán pomocí inzulinové injekční stříkačky a zvážen na analytických vahách.

Obsah nezaemulgovaného oleje byl spočítán dle vztahu:

$$EE = 100 - \left( \frac{m_0 \times 100}{m_T} \right) \quad (2)$$

EE – emulgační efektivita [%]

$m_0$  – hmotnost nezaemulgovaného oleje [g]

$m_T$  – celková hmotnost olejové fáze [g]

#### 6.4.2 Měření velikosti emulzních kapek

Velikost emulzních kapek byla charakterizována pomocí přístroje Mastersizer 3000. Principem měření je světelná difrakce, kdy měření je založeno na interakci částic s laserovým paprskem, který na částice dopadá. Tímto jevem se získá difrakční obrazec. Měření probíhá v disperzi, v jednotce „Hydro“ (tzv. mokrou cestou) naplněné DEMI H<sub>2</sub>O, díky níž je vzorek dopraven do měřicí cely. Jednotka obsahuje ultrazvukový homogenizátor a míchadlo, které zajišťuje pravidelné rozptýlení vzorku při jeho měření.

Otáčky míchadla byly nastaveny na 2200 ot/min. Měření probíhalo při 25 °C a parametry měření byly následující: absorbance emulzních kapek byla nastavena na hodnotu 0,001 a refrakční index na hodnotu 1,421. Každý vzorek byl proměřen třikrát a výsledná hodnota byla vyjádřena jako průměrná hodnota z měření. Výsledkem je velikost kapek emulze, označována jako D [4;3], která značí průměr částic v mikrometrech vztažený k jejich objemu.

#### 6.4.3 Optická mikroskopie

U vzniklých emulzí bylo provedeno i mikroskopické pozorování. Byl využit optický mikroskop značky Olympus CX 21. Mikroskopie byla využita z důvodu určení mikrostruktury emulzí. Na podložní sklíčko byly naneseny 3 μl emulze a následně přiklopeny krycím sklíčkem. Pozorování probíhalo nejčastěji při zvětšení 40x. Z důvodu lepšího pozorování byl na krycí sklíčko nakapán cedrový olej a další pozorování probíhalo při zvětšení 100x.



## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

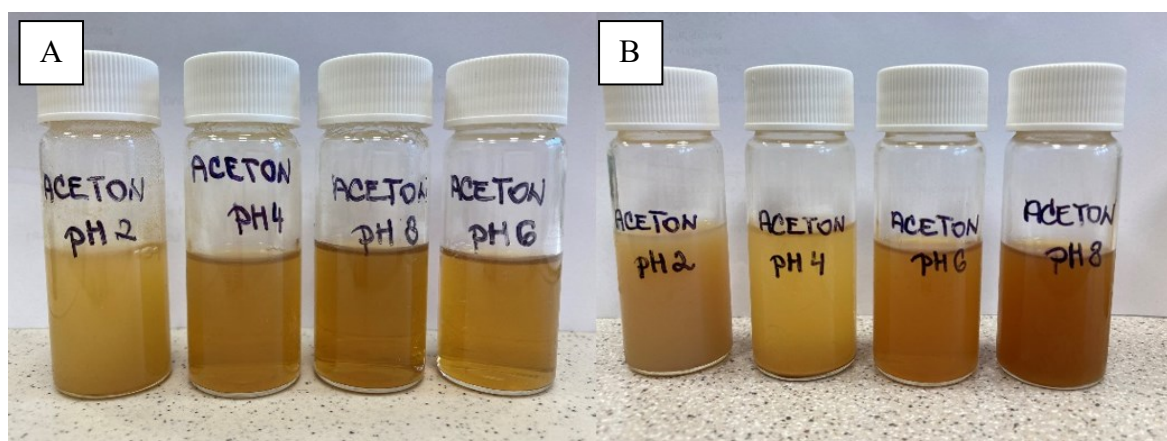
### 7.1 Charakterizace ligninových částic

Pro přípravu LNP byly použity dvě metody přípravy, a to přikapávání (LNP-P) a dialýza (LNP-D). Na vlastnosti částic měly vliv kromě metody přípravy, rovněž použité antirozpouštědlo a pH.

#### 7.1.1 Vliv antirozpouštědla a pH na ligninové částice

Při přípravě ligninových nanočástic byla použita dvě antirozpouštědla. Jednalo se o pufr (LNP-pufr) a o DEMI H<sub>2</sub>O s upraveným pH (LNP-voda).

Jako první byly disperze částic srovnány vizuálně. Na Obrázku 13 jsou zobrazeny disperze částic z ligninu rozpuštěného v acetonu (LNP-Ac) připravené do pufru a vody. U metody přikapávání je viditelnější větší zákal částic v prostředí upravené DEMI H<sub>2</sub>O. Největší viditelný zákal je jen u pH 2, jak u LNP-pufr, tak LNP-voda.



Obrázek 13 Ligninové částice připravené metodou přikapávání A) LNP-Ac-pufr, B) LNP-Ac-voda

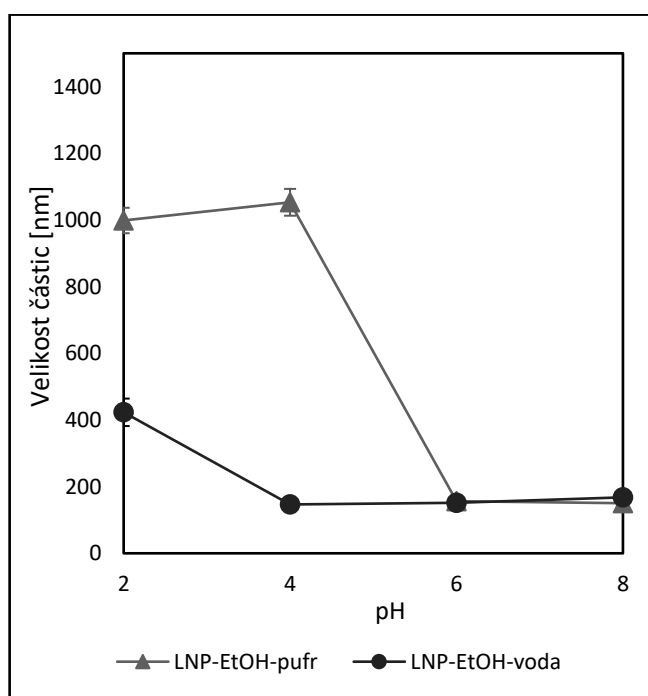
V každém pH je viditelná i jiná barva disperzí částic, která je způsobená odlišným prostředím. U LNP-pufr i LNP-voda se barva připravených LNP lišila i v jiných rozpouštědlech. Největší rozdíl byl u LNP-EtOH, kde byla jiná barva v různých pH LNP-pufr, avšak u LNP-voda se barva výrazně nelišila. Nicméně největší zákal byl opět viditelný v pH 2 jak u LNP-voda, tak LNP-pufr.



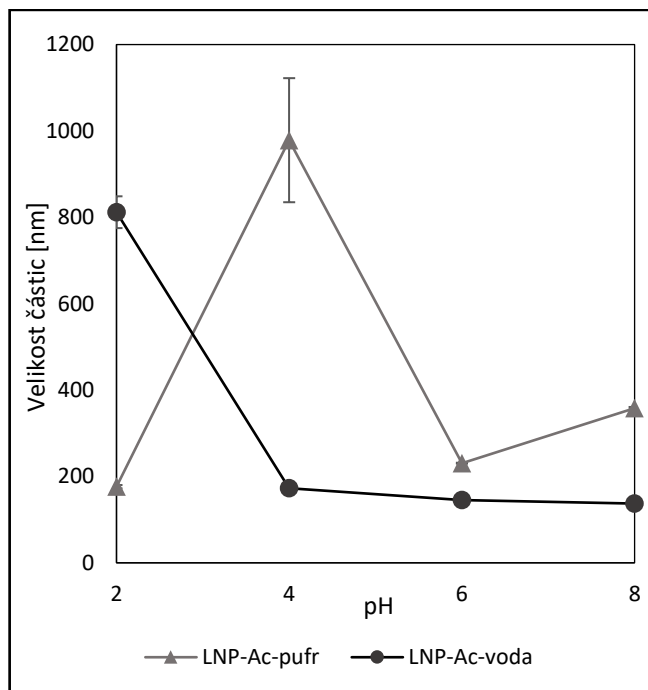
Pro celý experiment bylo velmi důležité znát koloidní stabilitu disperzí a interakce mezi částicemi. U všech částic byl změřen zeta-potenciál a hodnoty se pohybovaly pod  $-30$  mV, což značí koloidní stabilitu. Ta je dána vysokou elektrostatickou silou, která působí na částice a pomáhá jim tak se od sebe odpuzovat a udržovat disperzi stabilní. Tyto částice nebudou mít tendenci se shlukovat nebo agregovat.

V této kapitole bude diskutována velikost LNP-Ac, LNP-THF a LNP-EtOH. Částice byly měřeny ihned po přípravě, dále po odpaření rozpouštědla a po sonikaci, proto aby byl sledován vliv těchto úprav na velikost částic. Výsledky a hodnoty uvedené v jednotlivých grafech jsou z měření po sonikaci, tedy z posledního měření.

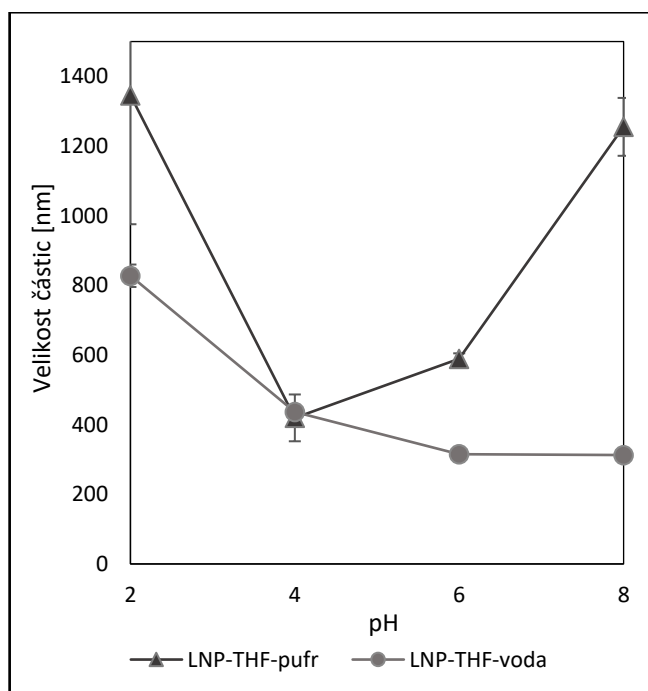
Na Obrázcích 14, 15, 16 lze pozorovat srovnání velikosti částic v závislosti na použitém antirozpouštědle (pufr, voda) a pH (2, 4, 6, 8). Je zřejmé, že u pufru je velikost vzniklých částic různá v závislosti na pH v každém z rozpouštědel.



Obrázek 14 Vliv metody přikapávání na velikost částic LNP-EtOH v různých pH



Obrázek 15 Vliv metody příkapávání na velikost částic LNP-Ac v různých pH



Obrázek 16 Vliv metody příkapávání na velikost částic LNP-THF v různých pH

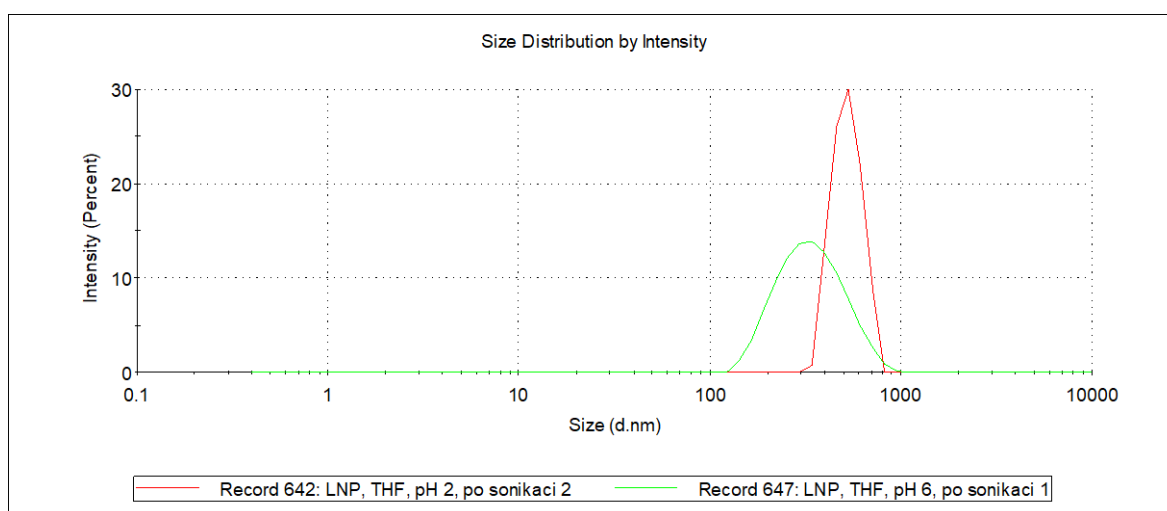
Také je z těchto grafů zjevné, že u příkapávání ligninu do pufru je velikost LNP větší, a to v rozsahu 150–1346 nm, než u příkapávání vody, kde se velikost částic pohybovala v rozsahu 137–827 nm. U LNP-pufr nebyl pozorován žádný trend a velikosti byly nekonzistentní, důvodem vyšších hodnot velikostí částic mohou být složky pufru.

Například u LNP-Ac-pufr (viz Obrázek 15) je velikost částic v pH 2 nízká, a to 176 nm, zatímco v pH 4 je 979 nm. V pH 6 hodnota velikosti sice klesá na 231 nm, ale v pH 8 opět roste na 358 nm. Avšak u LNP-Ac-voda je v pH 2 velikost 812 nm a v dalších pH velikost postupně klesá až k hodnotě 137 nm (pH 8).

Vliv pufru byl diskutován ve studii Figueiredo a kol., kde velikost připravených LNP nebyla jednotná, důvodem mohou být shluky menších částic nebo vznikající agregáty [13].

Z grafů je rovněž zřejmé, že LNP-voda v pH 2 mají vždy největší velikost, jelikož se v okolí pH 2 pravděpodobně nachází izoelektrický bod částic, kde dochází k protonaci nabitých skupin a tím k agregaci částic, který diskutovala mimo jiné studie Lievonen a kol. [17, 49]. Od pH 4 lze pozorovat stabilní trend ve velikosti částic v závislosti na jejich pH, kdy velikost klesá a příliš se nemění a pohybuje se například pro LNP-EtOH-voda 146,5–167,4 nm. I ve výsledcích studie, kterou provedli Zhang a kol. dosahují částice z ligninu rozpuštěného v THF a EtOH velikosti v průměru kolem 200 nm [16].

Na Obrázku 17 jsou srovnány distribuční křivky velikosti LNP-THF-voda, kde lze vidět rozdíl ve velikosti částic při pH 2 a pH 6. Hodnota píku částic při pH 2 je 803 nm a při pH 6 je 307,5 nm. Vzhledem k blízkosti izoelektrického bodu v pH 2 a vyšší velikosti částic nebyly v následujících fázích připravovány LNP v tomto pH. Pokračovalo se jen v pH 4, 6 a 8.



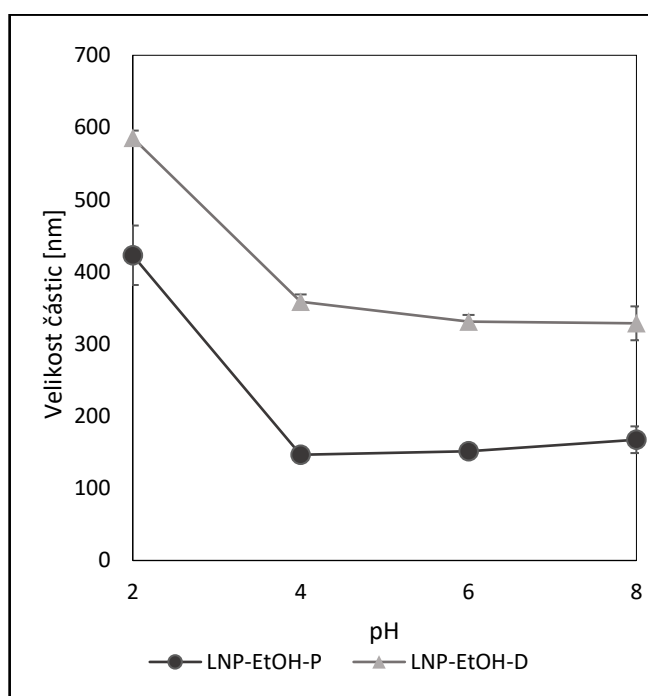
Obrázek 17 Distribuce částic LNP-THF-voda v pH 2 a pH 6

Při snaze získat co nejmenší LNP byla příprava částic do pufru vyřazena, protože přítomnost solí ovlivňuje charakter částic, kde pravděpodobně docházelo k jejich agregaci. Dále se jako antirozpouštědlo používala jen voda.

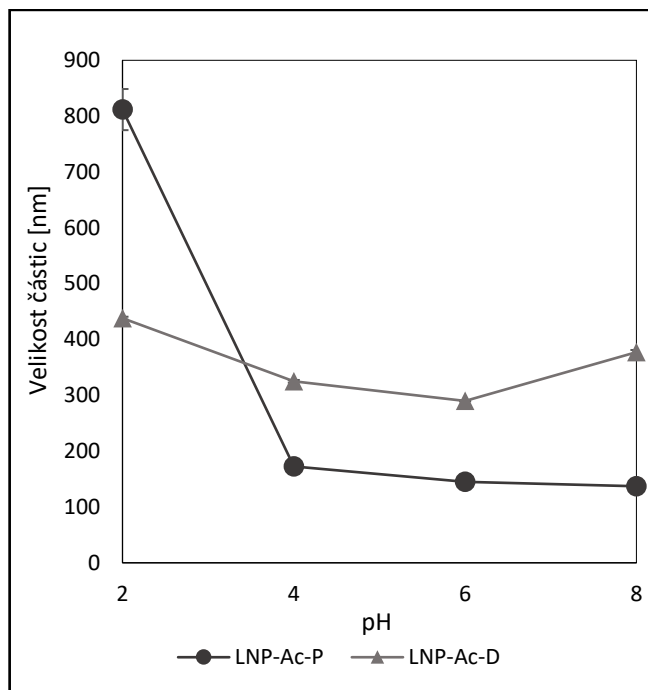
### 7.1.2 Vliv metody přípravy na velikost částic

V této kapitole srovnáváme vliv metody přípravy, kterými jsou přikapávání (P) a dialýza (D). Tyto metody přípravy LNP jsou popsány v kapitole 6.1.3.

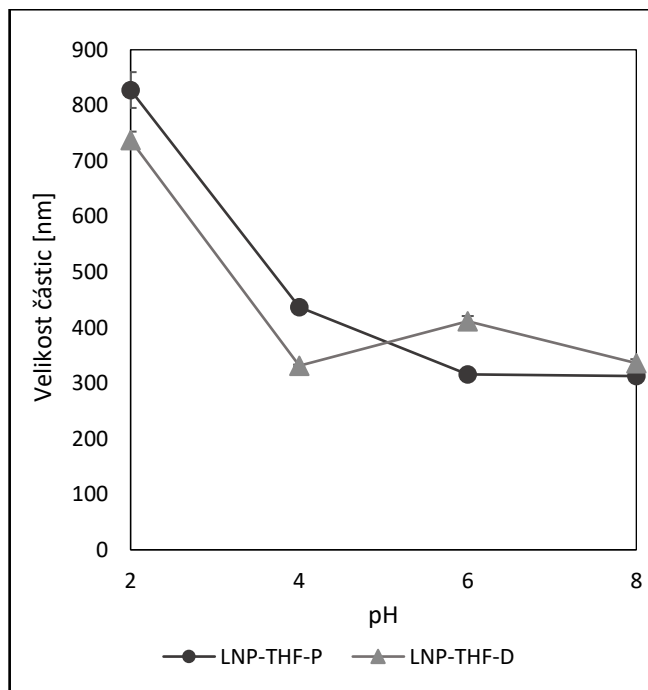
Na Obrázcích 18, 19 a 20 je graficky znázorněno srovnání metod přípravy LNP přikapáváním a dialýzou v jednotlivých rozpouštědlech. Na všech obrázcích je vidět, že při pH 2 je velikost částic největší bez ohledu na metodu přípravy LNP. Na Obrázku 18 a 19 je velikost částic připravených dialýzou (LNP-EtOH-D a LNP-Ac-D) obecně větší, než částic připravených přikapáváním (LNP-EtOH-P a LNP-Ac-P). Tuto skutečnost potvrzují studie Frangville a kol., kde metodou přikapávání vznikaly LNP menší velikosti v rozmezí 100–200 nm, a studie Lievonen a kol., kde LNP připravené dialýzou dosahovaly velikosti až 500 nm [17, 50]. Výjimka nastala u LNP-THF (viz Obrázek 20), kde velikost částic je u LNP-THF-D v pH 2 a 4 menší než LNP-THF-P.



Obrázek 18 Vliv použité metody přípravy na velikost částic LNP-EtOH



Obrázek 19 Vliv použité metody přípravy na velikost částic LNP-Ac



Obrázek 20 Vliv použité metody přípravy na velikost částic LNP-THF

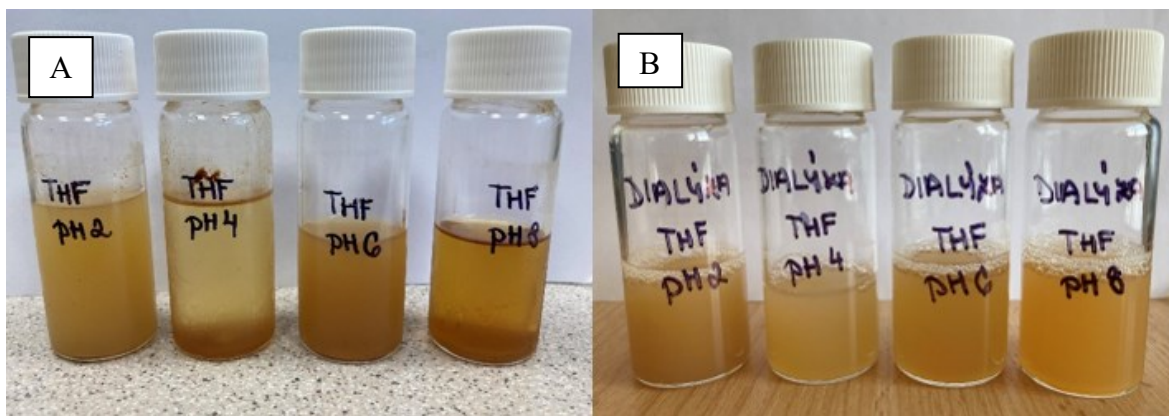
Zásadní vliv na velikost částic měly i jednotlivé kroky úpravy částic po přípravě. Nejvýznamnější vliv na velikost částic měla sonikace. Při sonikaci se vytvářejí mikrotrhliny a mikrobubliny v kapalině, což může vést k rozbíjení aglomerátů a agregátů částic na menší. Sonikace měla zásadní vliv na velikost částic LNP-EtOH, připravených jak metodou

přikapávání, tak dialýzou. Tyto částice tvořily pravděpodobně agregáty, které byly sonikací narušeny a velikost LNP byla následně menší, jak lze vidět v Tabulce 2.

*Tabulka 2 Srovnání velikosti částic LNP-EtOH-D před/po sonikaci*

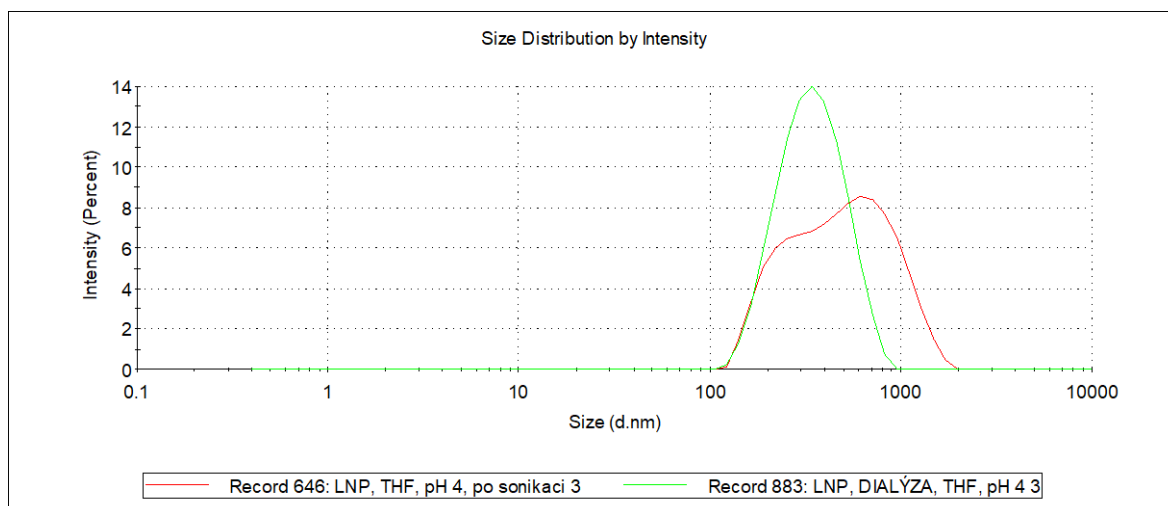
pH	Velikost částic LNP-EtOH-D [nm]	
	Před sonikací	Po sonikaci
2	1125,7 ± 10,2	585,6 ± 14,5
4	819,7 ± 10,3	284,1 ± 3,2
6	695,4 ± 9,5	349,9 ± 3,8
8	770,4 ± 23,6	272,8 ± 0,4

Srovnat metody přípravy lze i z vizuálního pozorování, na Obrázku 21 lze vidět, že se vzorky LNP-THF-P (A) a LNP-THF-D (B) na první pohled liší. U přikapávání částice výrazně sedimentují, avšak u dialýzy jsou částice v celém objemu rovnoměrně rozptýleny.

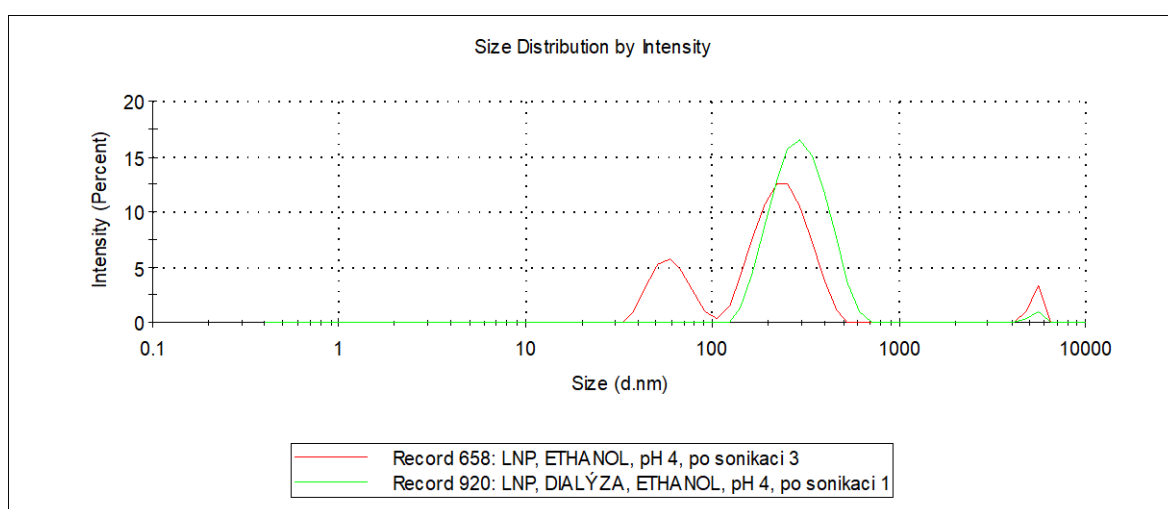


*Obrázek 21 Fotografie ihned po přípravě A) LNP-THF-P a B) LNP-THF-D*

Velikost částic v závislosti na použitých metodách zobrazují i distribuční křivky z přístroje Zetasizer. Na Obrázcích 22 a 23 lze pozorovat, že částice připravené dialýzou mají užší monodisperzní distribuci značící uniformnější charakter částic, oproti částicím připraveným přikapáváním, kde je distribuce širší či bimodální. Z Obrázku 22 lze pozorovat, že velikost LNP-P je vyšší (pík 405,1 nm) než u dialýzy, kde je pík distribuce 342 nm. Na Obrázku 23 je znázorněn stejný trend, kdy částice LNP-EtOH-P mají menší velikost, kde výška píku je 189,5 nm, ale disperze obsahuje dvě populace částic, a u dialýzy je pík 284,1 nm, nicméně distribuce je monomodální.



Obrázek 22 Srovnání distribuce velikosti částic pro LNP-THF-P a LNP-THF-D



Obrázek 23 Srovnání distribuce velikosti částic LNP-EtOH-P a LNP-EtOH-D

Částice byly připravovány bez nutnosti odpařování použitého rozpouštědla, které mělo taktéž vliv na velikost částic. Navíc LNP-Ac a LNP-THF nemusely být po přípravě sonikovány, jelikož se se netvořily agregáty a po sonikaci se neměnila velikost částic. Částice připravené dialýzou vykazovaly monodisperzní charakter a uniformnější velikosti částic. Z těchto důvodů byly dále LNP připravovány jen pomocí dialýzy.

Obecně byla příprava LNP metodou dialýzy vyhodnocena jako výhodnější, což potvrdila i studie Beisl a kol., kde se ukázala příznivá schopnost pracovat s různými typy jak ligninu, tak rozpouštědly či antirozpouštědly [51].

### 7.1.3 Vliv rozpouštědla na ligninové částice

Pro přípravu LNP byly použity čtyři organická rozpouštědla, a to DMSO, THF, EtOH a Ac. Každé z použitých rozpouštědel má rozdílnou polaritu, a proto rozpouští jinou frakci ligninu, díky tomu vzniklé nanočástice vykazují odlišné chování, které se projevuje různou velikostí LNP, distribucí velikosti částic, morfologií nebo stabilitou LNP.

Důležitým faktorem byla i rozdílná permitivita použitých rozpouštědel (viz Tabulka 3), která udává schopnost rozpouštědla polarizovat se v přítomnosti elektrického pole. Rozpouštědla, která mají vysokou permitivitu, jsou typicky polární, což znamená, že mají kladný a záporný konec kvůli rozdílu v elektronegativitě mezi atomy. Tato rozpouštědla lépe rozpouštějí polární látky díky silnější interakci dipól-dipól. Nepochopitelně rozpouštědla s nízkou permitivitou jsou vhodnější pro rozpouštění nepolárních látek prostřednictvím disperzních sil. Permitivita rozpouštědla může významně ovlivnit rozpustnost ovlivněním síly a povahy interakcí mezi molekulami rozpuštěné látky a vybraným rozpouštědlem [52, 53].

*Tabulka 3 Souhrn permitivit jednotlivých rozpouštědel*

Rozpouštědlo	Permitivita rozpouštědla $\epsilon$ [ $F \cdot m^{-1}$ ]
DMSO	46,7
THF	7,58
Ac	20,7
EtOH	24,5

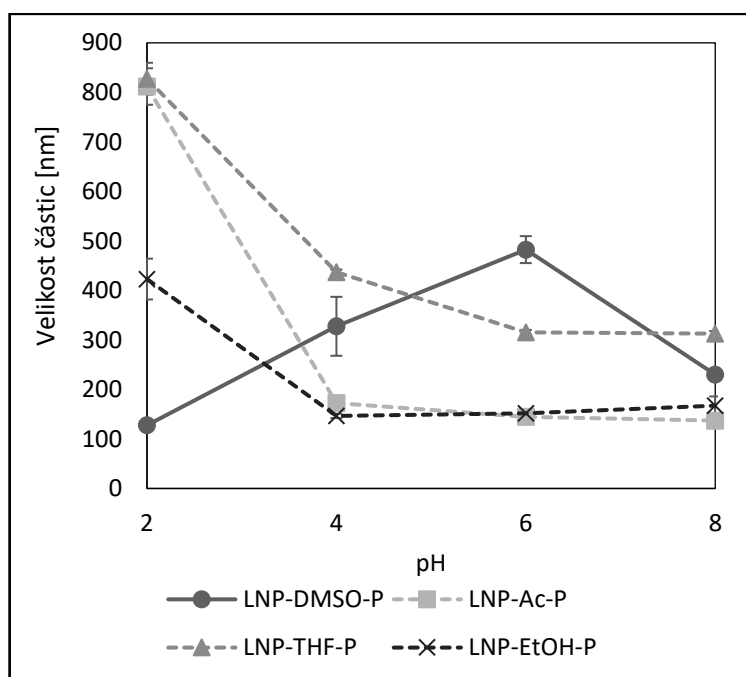
Jak zobrazuje Tabulka 3, každé použité rozpouštědlo je odlišné. U DMSO je zřejmá nejvyšší permitivita, která značí charakter polárního rozpouštědla. Alkalický lignin se v DMSO rozpouštěl kompletně bez sedimentujících částic, avšak velikost LNP-DMSO se pohybovala mimo trend ostatních rozpouštědel (viz Obrázky 24, 25). Nevýhodou u DMSO byl jeho vysoký bod varu, který je 189 °C, takže jej nebylo možné u LNP-P odpařit tak jako aceton, THF a ethanol, proto bylo vyloučeno z dalších příprav LNP.

Jak Tabulka 3 dále zobrazuje, jak velmi podobný charakter mají rozpouštědla aceton a ethanol. Jedná se o polární rozpouštědla, která mají dobrou schopnost solvatace polárních látek díky vodíkovým můstkům. Mohou tak hrát klíčovou roli při solvataci hydroxylových

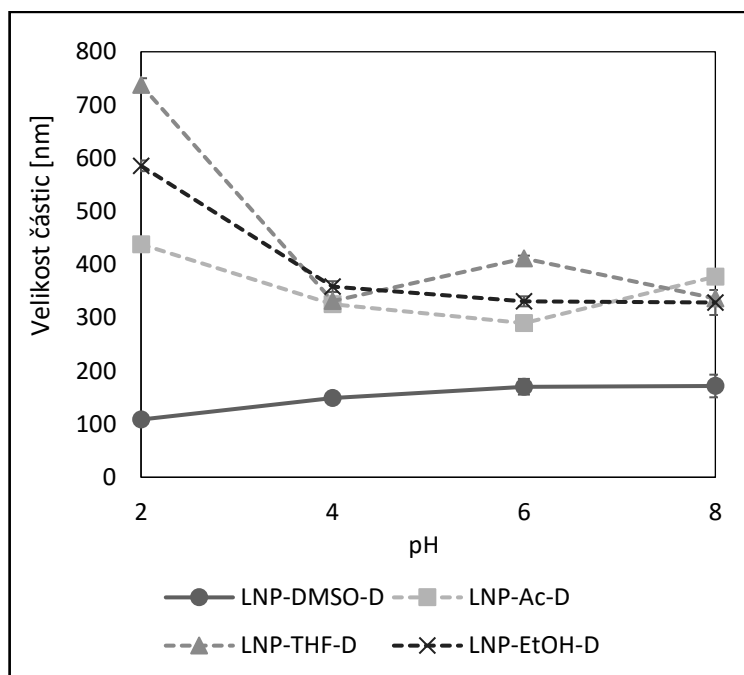


skupin ligninu a tím přispět k jeho rozpouštění [54]. Z Obrázků 24, 25 je vidět i velmi podobný trend velikosti částic LNP-Ac a LNP-EtOH.

Rozpouštědlo THF má výrazně odlišnou permitivitu na rozdíl od ostatních rozpouštědel. THF se řadí mezi nepolární rozpouštědla, tudíž bude rozpouštět jiné frakce ligninu než DMSO, Ac a EtOH. Mezi možné frakce, které by mohly být rozpouštěny v THF patří například alifatické a malé aromatické struktury ligninu, jelikož jsou méně polární. Opět z Obrázků 24, 25 lze pozorovat jiné chování částic, kde jak u LNP-THF-P, tak LNP-THF-D vznikaly největší částice s největším rozsahem velikostí, a to v rozmezí 312–827 nm.



Obrázek 24 Srovnání velikosti LNP-P v závislosti na použitém rozpouštědle ligninu



Obrázek 25 Srovnání LNP-D v závislosti na použitém rozpouštědle ligninu

#### 7.1.4 Shrnutí vlivu různých parametrů na vlastnosti částic

Pro přípravu nanočástic ligninu byla dle literatury využita precipitace antirozpouštědlem a to metodou přikapávání a dialýzou [14]. LNP byly připravovány v pH 2, 4, 6, 8. Pro rozpuštění ligninu byly využity čtyři organická rozpouštědla s rozdílnou polaritou, a to DMSO, THF, Ac, EtOH [10]. První metodou bylo přikapávání do pufru nebo upravené DEMI H<sub>2</sub>O. Z výsledků v kapitole 7.1.1 je zřejmé, že soli obsažené v pufru ovlivňovaly velikost částic, která byla nekonzistentní, a nebyl viditelný žádný trend ve velikostech ligninových částic [13]. Z tohoto důvodu byly dále LNP připraveny přikapáváním jen do vody.

Ve srovnání použití přikapávání a dialýzy bylo zjištěno, že dialýzou se získají uniformnější částice, které mají užší monodisperzní distribuce. I z vizuálního hlediska nebyl pozorován žádný sediment na dně vialek. Dialýza byla pro přípravu LNP výhodnější, jelikož se částice připravovaly bez nutnosti odpařování použitého rozpouštědla. Částice LNP-Ac-D a LNP-THF-D nemusely být po přípravě ani sonikovány, jelikož se velikost částic před/po sonikaci neměnila.

Vzhledem k různým pH antirozpouštědla bylo zjištěno i vhodné pH pro přípravu LNP. Částice měly největší velikost v pH 2, kde se nachází izoelektrický bod částic a pravděpodobně docházelo k agregaci částic vlivem nedostatečných odpuzivých sil mezi

LNP [17]. Byl ale potvrzen trend, že velikost klesá s rostoucím pH, kdy od pH 4 se velikost částic příliš nemění. V prvním kroku bylo z přípravy LNP vyloučeno antirozpouštědlo s pH 2, následně byly částice připravovány pouze do antirozpouštědla s pH 6.

Co se týká použitých rozpouštědel, vyrobené LNP v prostředí Ac a EtOH měly velmi podobný charakter. THF vlivem rozdílných vlastností rozpouštělo jiné ligninové frakce, proto byla velikost vzniklých LNP jiná, a to výrazně vyšší. Rozpouštědlo DMSO bylo vyloučeno z experimentu, protože má vysoký bod varu a jeho odpaření by bylo komplikované, avšak i mimo tento důvod vzniklé LNP vykazovaly úplně jiný charakter než ostatní, viz kapitola 7.1.3.

### 7.1.5 Stanovení koncentrace částic

Stanovení bylo prováděno u vzorků částic připravených metodou dialýzy. Konkrétně s pH 4 a 8, které bylo provedeno dvakrát vedle sebe. U pH 6 bylo stanovení zopakováno čtyřikrát vedle sebe.

Hodnoty koncentrace částic v disperzích se pohybují v rozmezí od 0,6–1,3 mg/g. Znalost koncentrace částic v disperzi byla důležitá z hlediska stabilizace emulzí.

### 7.1.6 Stanovení povrchových vlastností

Stanovení povrchových vlastností připravených částic bylo testováno z hlediska přípravy emulzí. Kde např. povrchové napětí ovlivňuje schopnost interakce s disperzním médiem nebo morfologie částic může ovlivnit stabilitu emulzí.

Pro toto stanovení se využívaly nanočástice vyrobené metodou dialýzy při pH 6. U povrchového napětí, které bylo měřeno pomocí metody Wilhelmyho destičky byly změřeny disperze částic třikrát vedle sebe.

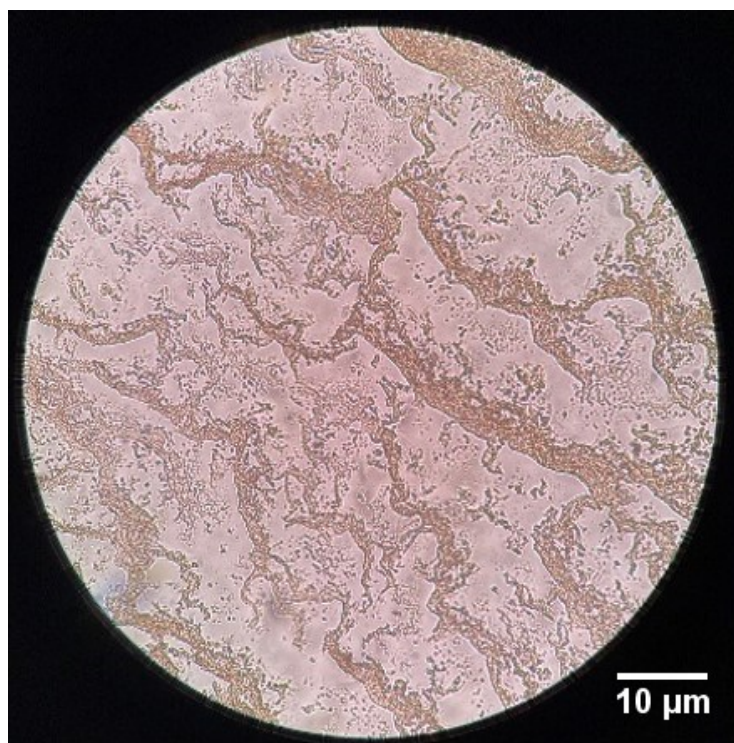
Pro srovnání bylo změřeno i povrchové napětí demineralizované vody, které při teplotě 26,3 °C dosahovalo 72 mN·m<sup>-1</sup>, což je standardní hodnota.

Z Tabulky 4 je patrné, že povrchové napětí částic je nižší než u demineralizované vody. Důvodů, proč mají částice menší povrchové napětí, může být hned několik, avšak hlavním mohou být různé funkční skupiny ligninu. Dalšími vlastnostmi, které ovlivňují výsledné hodnoty, mohou být rozpustnost, molekulární struktura nebo molekulární hmotnost.

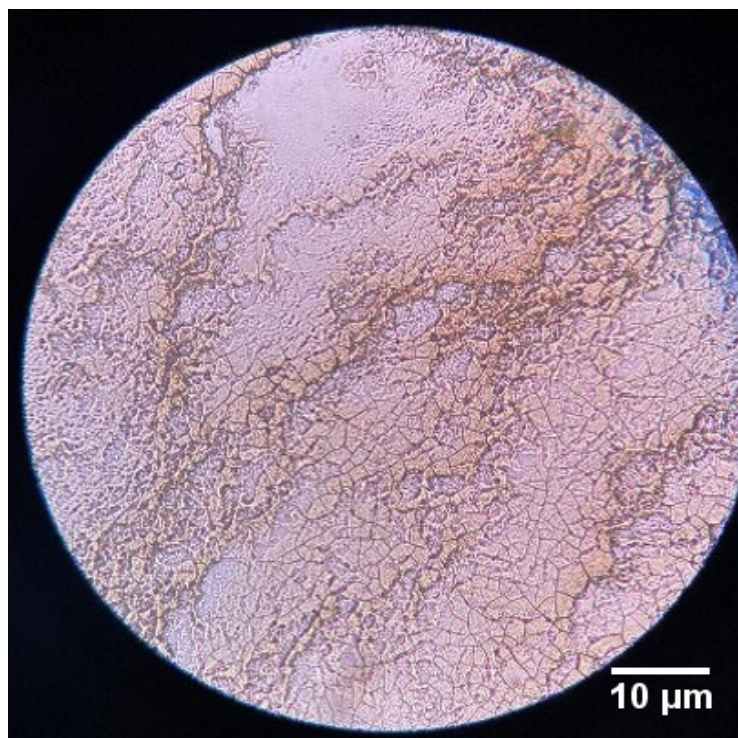
Tabulka 4 Naměřené hodnoty povrchového napětí u vzorků nanočástic

Vzorek	$\sigma$ [mN/m]	Teplota [°C]
Aceton	$53,5 \pm 0,3$	26,4
Ethanol	$60,0 \pm 0,1$	26,4
THF	$50,6 \pm 0,2$	26,4

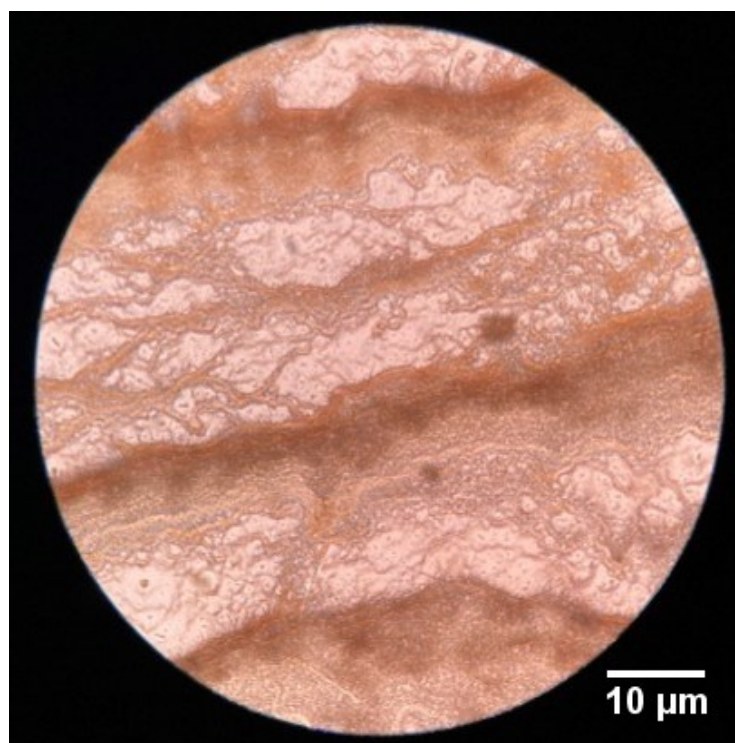
Smáčivost částic byla stanovena měřením kontaktního úhlu kapalin (DEMI H<sub>2</sub>O, jojobový olej) na povrchu částic. Pro představu, jak vypadá vrstva vysušených ligninových nanočástic byly vzorky mikroskopicky pozorovány pod optickým mikroskopem při zvětšení 40x (viz Obrázky 26, 27 a 28).



Obrázek 26 Morfologie vrstvy LNP-EtOH, zvětšení 40x



*Obrázek 27 Morfologie vrstvy LNP-Ac, zvětšení 40x*



*Obrázek 28 Morfologie vrstvy LNP-THF, zvětšení 40x*

Samotné měření kontaktního úhlu bylo provedeno na přístroji See System. Měřenými částicemi byly opět vzorky připravené dialýzou při pH 6. Měření probíhalo pětikrát vedle sebe, kde v Tabulce 5 jsou uvedeny průměrné hodnoty těchto měření.

Obecně vztah velikosti kontaktního úhlu a smáčivosti popisuje interakce mezi pevným povrchem a kapalinou. Velikost kontaktního úhlu vyjadřuje míru, do jaké kapalina smáčí povrch, kdy malý úhel naznačuje vysokou smáčivost, zatímco vysoký kontaktní úhel odpovídá nízké smáčivosti. Samotná smáčivost značí schopnost kapaliny rozprostřít se na pevném povrchu a vytvořit co největší kontaktní plochu [55]. Z Tabulky 5 lze pozorovat, že voda na vysušených částicích měla mnohem vyšší kontaktní úhel než jojobový olej. To znamená, že částice jsou více smáčeny jojobovým olejem než vodou.

*Tabulka 5 Výsledné hodnoty kontaktních úhlů u jednotlivých měření*

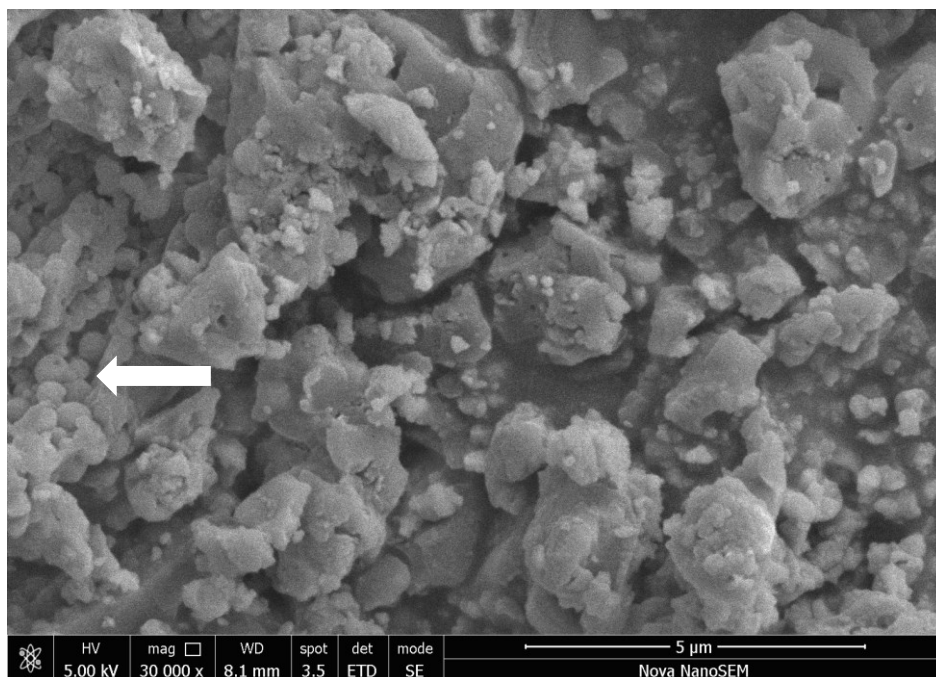
Rozpouštědlo	Jojobový olej	Demineralizovaná voda
	$\theta$ [°]	$\theta$ [°]
Aceton	$12,9 \pm 1,5$	$38,0 \pm 3,6$
Ethanol	$17,6 \pm 1,4$	$26,1 \pm 3,2$
THF	$14,2 \pm 1,1$	$41,9 \pm 0,6$

### 7.1.7 Morfologie částic

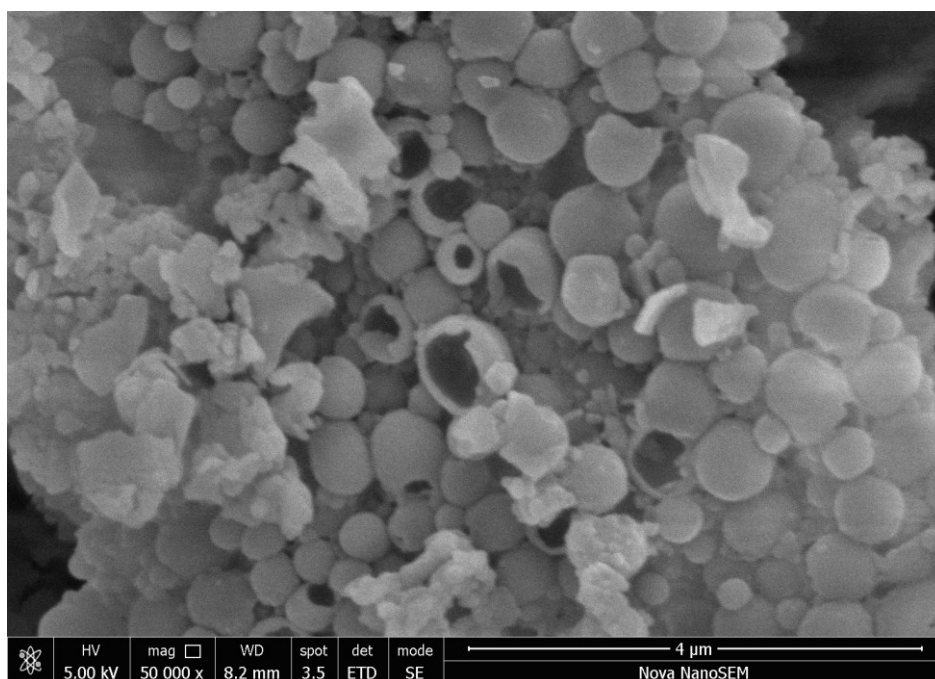
Morfologie částic byla stanovena pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), pro kterou byly vybrány vzorky ligninových nanočástic připravených metodou dialýzy při pH 6 a metodou přikapávání do vody s pH 4.

Na Obrázku 29 a 30 je zřetelně vidět morfologie LNP-THF připravených oběma způsoby, kdy u přikapávání je velikost částic různorodá, avšak v levé části Obrázku 29 lze vidět i kulovité částice. U LNP-THF-D (viz Obrázek 30) je patrné, že vzniklé částice mají charakter dutých, symetrických kulovitých útvarů. Výsledky lze porovnat se studií, kterou provedli Lievonen a kol., kde byla taktéž sledována struktura a velikost částic připravených jako LNP-THF. Výsledkem byly symetrické a kulovité tvary částic. Důvodem může být lepší rozpustnost ligninu v THF a nižší rozpustnost ve vodě, dále polarita rozpouštědla nebo vhodná interakce výměny rozpouštědla s vodou [17].





Obrázek 29 Morfologie částic LNP-THF-P, pH 4



Obrázek 30 Morfologie částic LNP-THF-D, pH 6

U LNP-Ac-P a LNP-EtOH-P v pH 4 neměly částice hladký symetrický kulovitý tvar, a byly podstatně menší než u LNP-THF-P. Zatímco částice LNP-Ac-D a LNP-EtOH-D v pH 6 vykazovaly navzájem podobnou velikost částic, kdy jejich tvar nebyl symetrický a uniformní tak jako u LNP-THF-D. Částice byly rovněž výrazně menší než u LNP-THF.

## 7.2 Charakterizace emulzí

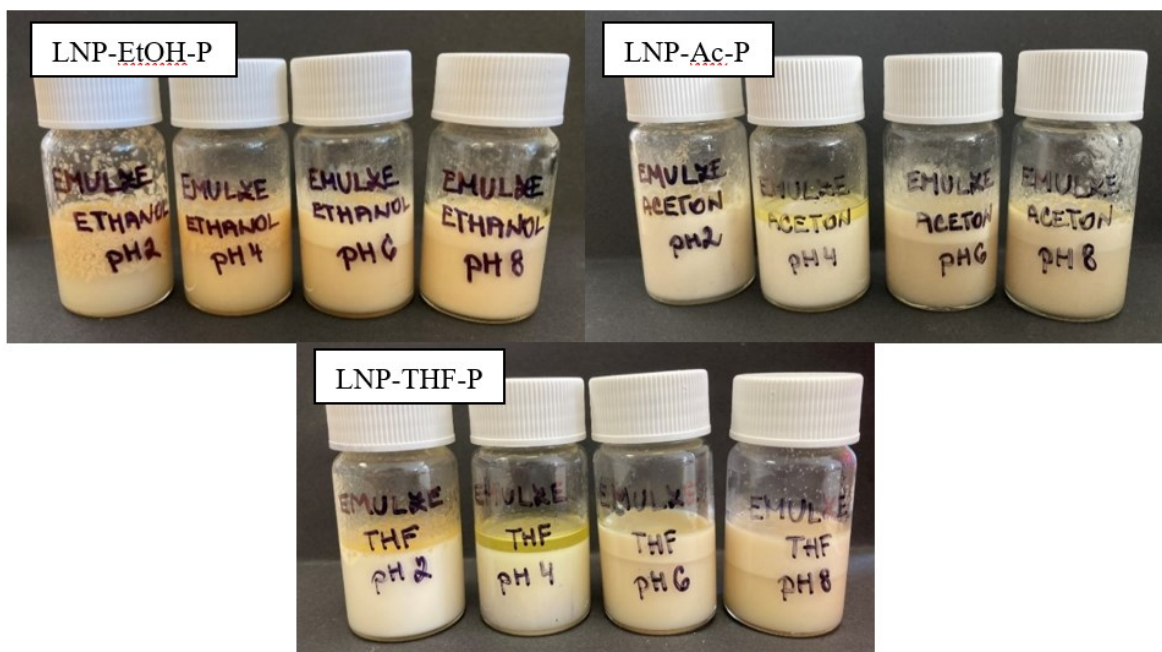
Ligninové nanočástice byly využity pro stabilizaci Pickeringových emulzí typu O/V. Emulze byly charakterizovány pomocí přístroje Mastersizer 3000, kde byla změřena velikost částic. Dále byla zjišťována koloidní stabilita emulzí měřením zeta-potenciálu pomocí přístroje Zetasizer Malvern Nano ZS 90. Důležitým aspektem bylo i vizuální pozorování připravených emulzí, hlavním důvodem bylo pozorování krémování emulzí a množství zaemulgovaného oleje. Po vizuálním pozorování byly emulze pozorovány i pod optickým mikroskopem Olympus CX21, pro zjištění mikrostruktury emulzí. Rovněž byla stanovena emulgační účinnost.

### 7.2.1 Vizuální pozorování a emulgační účinnost

Na Obrázku 31 vidíme emulze O/V 10:90 stabilizované částicemi z přikapávání (LNP-P). U emulzí stabilizovaných LNP-EtOH s pH 2 a 4 je viditelná silná agregace emulzních kapek vlivem částic s pH v blízkosti izoelektrického bodu, zatímco pokud byly použity LNP s pH 6 a 8, emulze jsou bez agregace, s homogenní emulzní vrstvou. U emulzí stabilizovaných LNP-Ac a LNP-THF s pH 4 je viditelný nezaemulgovaný olej, zatímco u pH 6 a 8 byla emulgační účinnost 100 % a lze vidět krémovou vrstvu emulzí.

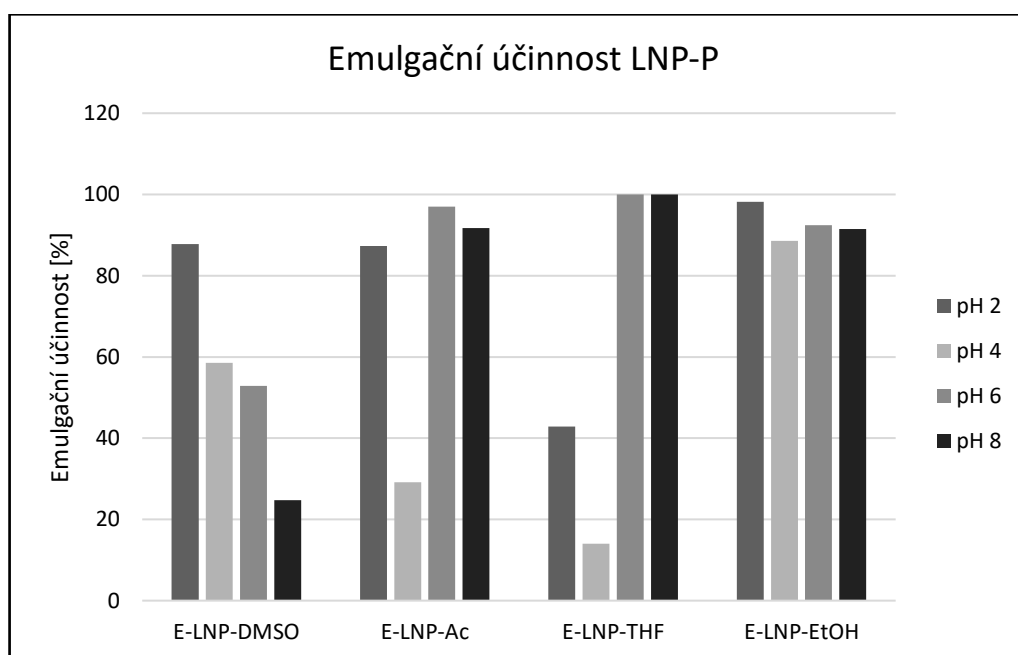
Na stabilizaci emulzí měl zásadní vliv typ částic, a to v závislosti na použitém rozpouštědle ligninu a pH antirozpouštědla, podobný trend pozorovali ve studii [56]. Jak je z Obrázku 31 zřejmé, LNP poskytují emulze rozdílných vlastností, co se týká krémování nebo emulgační účinnosti.





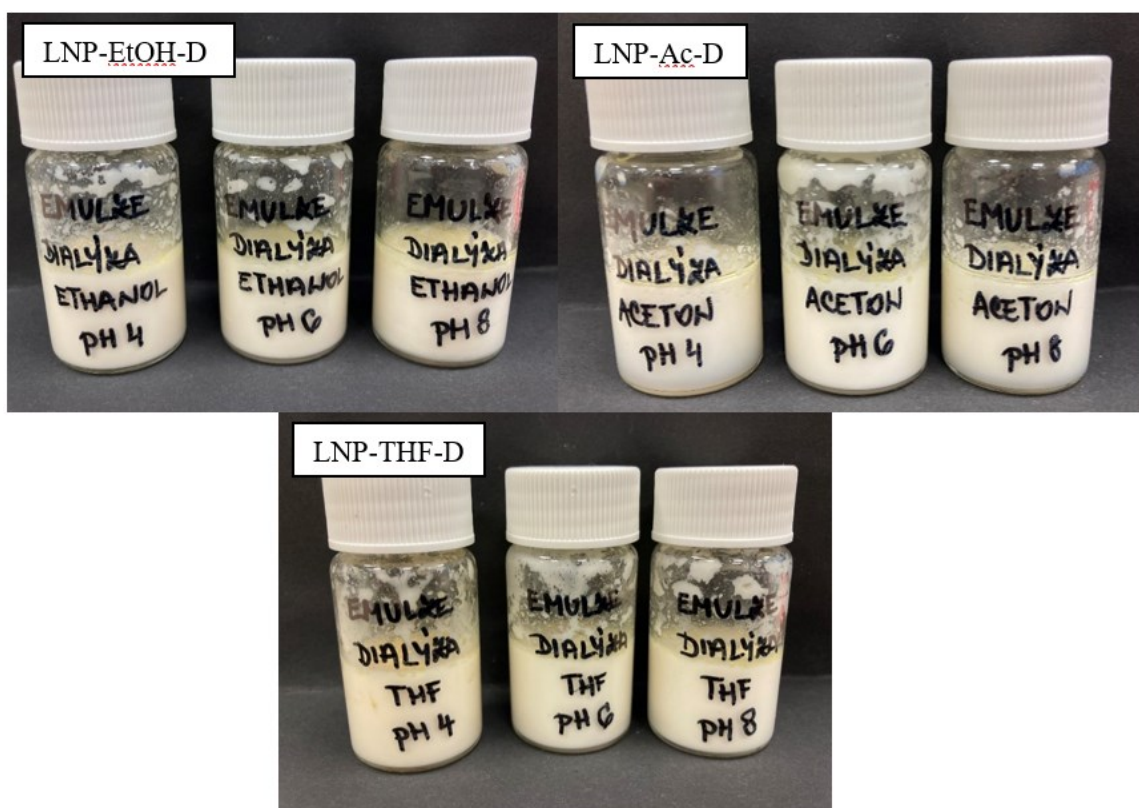
Obrázek 31 Fotografie emulzí s LNP připravených metodou přikapávání

U připravených emulzí byla stanovena emulgační účinnost (viz Obrázek 32). Ta byla stanovena především u emulzí stabilizovaných LNP-P (E-LNP-P), kde lze říct, že emulgační účinnost je vysoká u E-LNP-EtOH, avšak v pH 2 a 4 se tvoří agregáty (viz Obrázek 31). Podobné vlastnosti měly i emulze připravené ve studii Colucii a kol., kde se projevily nepatrné známky agregace emulzních kapek [2]. U emulzí stabilizovaných LNP-Ac-P a LNP-THF-P je vysoká emulgační účinnost v pH 6 a 8. Naopak nízká je v pH 2 a 4.



Obrázek 32 Emulgační účinnost emulzí stabilizovaných LNP-P

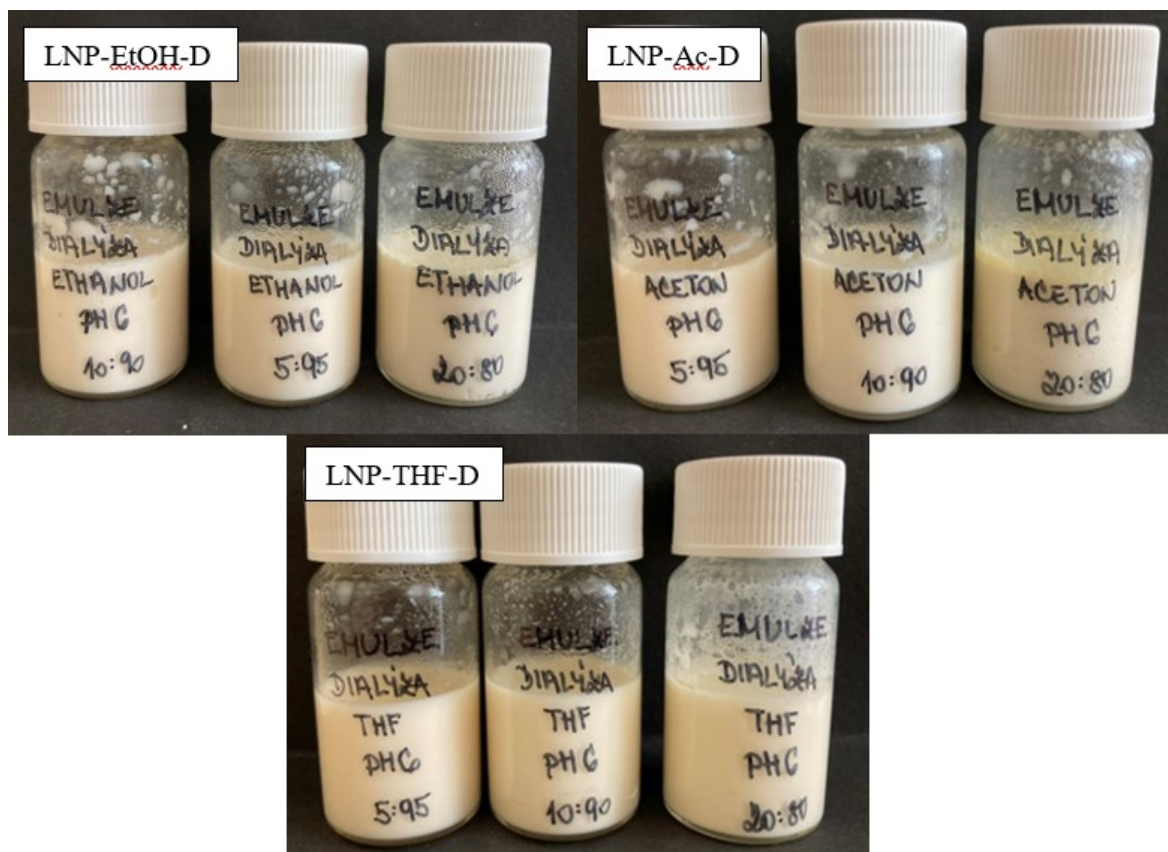
Na Obrázku 33 vidíme fotografie emulzí, které byly stabilizovány částicemi připravenými metodou dialýzy (LNP-D). Emulze mají jednak jinou barvu oproti emulzím stabilizovanými částicemi připravených metodou přikapávání. Navíc je z fotografií zřejmé, že u emulzí nedocházelo k agregaci emulzních kapek, jako u emulzí stabilizovaných LNP-EtOH-P při pH 4, ani nedocházelo ke krémování. Emulze stabilizované LNP-D (E-LNP-D) jsou homogenní, vykazují tak vyšší kinetickou stabilitu systému. Emulze měly taktéž vysokou emulgační účinnost bez závislosti na pH LNP, která byla téměř 100 %. I studie Pang a kol. uvedla, že emulze stabilizované ligninovými nanočásticemi připravenými metodou dialýzy vykazují vysokou stabilitu [57].



Obrázek 33 Fotografie emulzí s LNP připravených metodou dialýzy

V pozdější fázi experimentu byly připraveny emulze stabilizované pouze LNP-D díky lepší emulgaci a homogenitě emulzí. Následně byly vyloučeny pro stabilizaci emulzí LNP-D s pH 2 a ve finální části byly emulze stabilizovány pouze s LNP-D s pH 6 (viz kapitola 7.2.2). Nicméně emulze byly připravovány v různých poměrech O/V, a to 10:90, 20:80 a 5:95.

Na Obrázku 34 jsou emulze v různých poměrech stabilizované nanočásticemi ligninu připravených metodou dialýzy při pH 6. Emulze viditelně neobsahují nezaemulgovaný olej, tudíž emulgační účinnost byla opět vysoká (100 %). Tyto emulze v jakémkoliv poměru O/V mají všechny stejnou barvu a nekrémují. Dále vykazují i homogenní charakter.

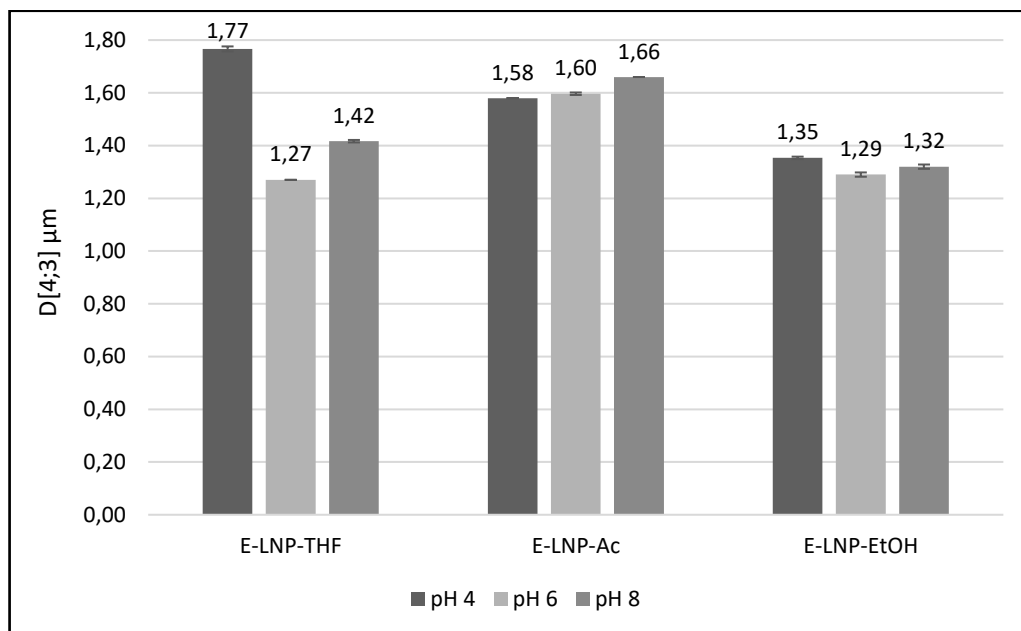


Obrázek 34 Fotografie emulzí stabilizovaných LNP-D v poměrech O/V 5:95, 10:90, 20:80

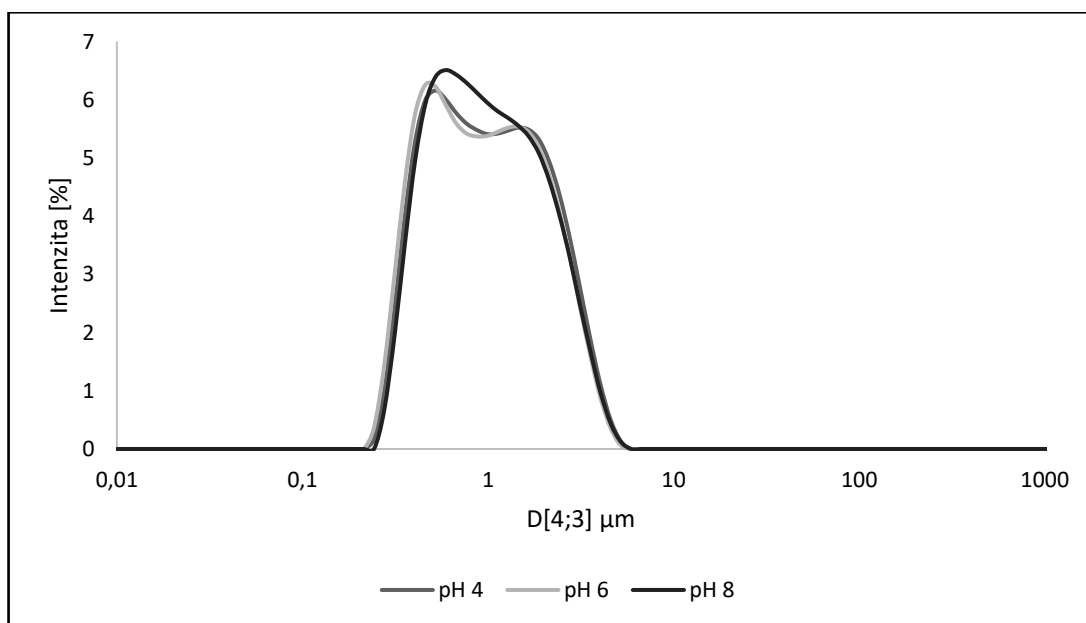
### 7.2.2 Velikost emulzních kapek

Velikost emulzních kapek byla stanovena pro emulze stabilizované LNP-D s pH 4, 6 a 8 pomocí laserové difrakce na přístroji Mastersizer 3000. Průměrnou hodnotu velikosti kapek v emulzi vyjadřuje hodnota D [4;3], která se pohybovala pro připravené emulze v rozmezí 1,27–1,77  $\mu\text{m}$  (viz Obrázek 35). U E-LNP-THF-D je viditelný rozdíl mezi velikostmi emulzních kapek. Největší velikost měly emulze stabilizované LNP s pH 4 a dosahovaly hodnoty 1,77  $\mu\text{m}$ , naopak nejmenší velikost emulzních kapek měly emulze stabilizované LNP-EtOH-D (viz Obrázek 36). U těchto emulzí je zároveň zanedbatelný rozdíl ve velikosti kapek (1,29–1,35  $\mu\text{m}$ ) v závislosti na pH LNP. Minimální rozdíl ve velikosti emulzních kapek má i E-LNP-Ac-D, kdy velikost není ovlivněna hodnotou pH částic. Velikost emulzních kapek koresponduje i se studií Gharehkhani a kol.[59].

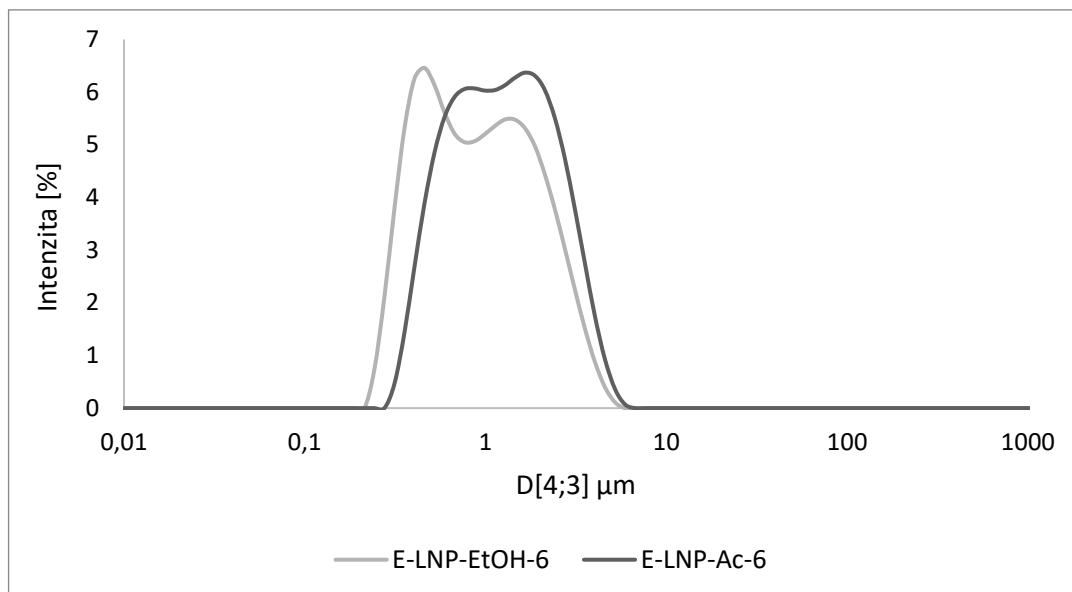
Jak je uvedeno výše, LNP-Ac a LNP-EtOH mají podobný charakter a dále tedy vznikaly i emulze podobných vlastností. Distribuce emulzních kapek E-LNP-Ac-D a E-LNP-EtOH-D s pH 6 jsou srovnány na Obrázku 37. Právě částice s tímto pH přispěly ke vzniku nejmenší velikosti emulzních kapek, tudíž pH 6 bylo zvoleno pro další testování.



Obrázek 35 Vliv pH a typu LNP-D na velikosti emulzních kapek

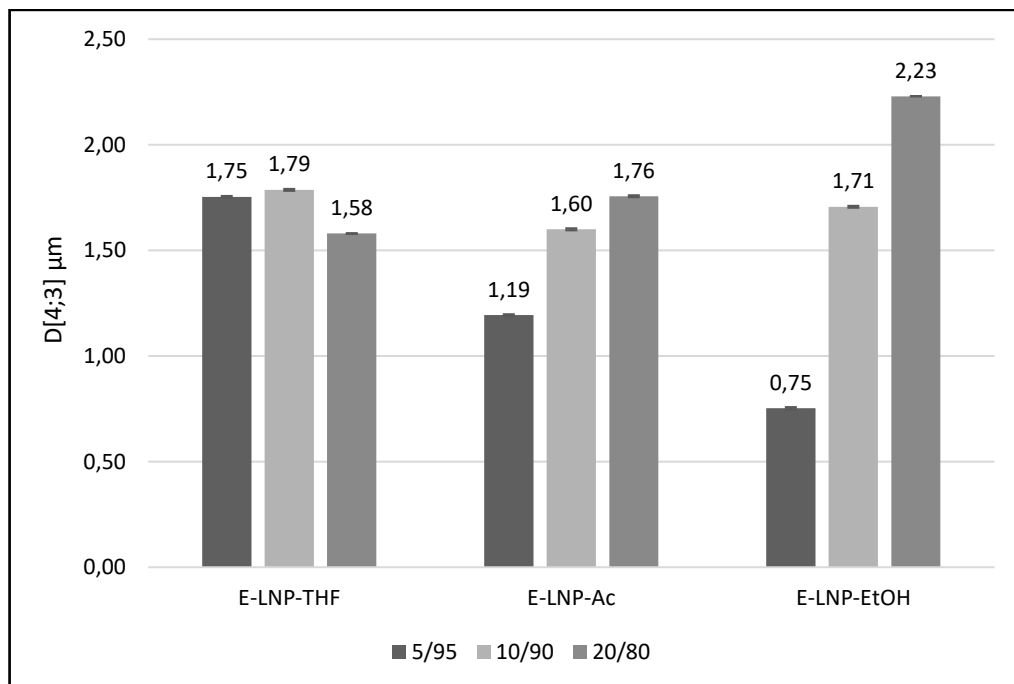


Obrázek 36 Distribuce velikosti emulzních kapek pro E-LNP-EtOH-D

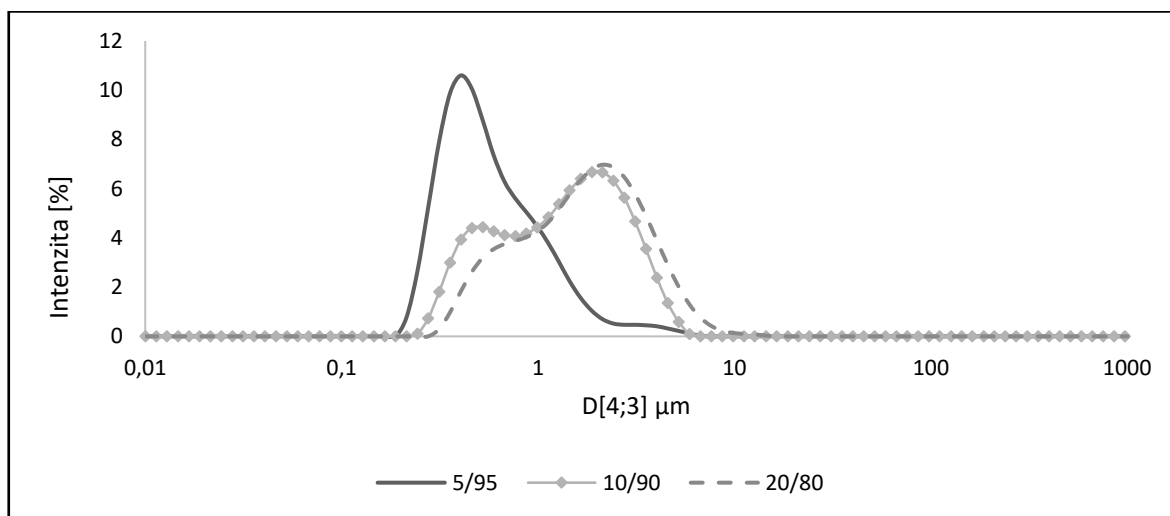


Obrázek 37 Srovnání distribuce emulzních kapek E-LNP-EtOH a E-LNP-Ac (pH 6)

Emulze stabilizované LNP s pH 6 byly připraveny v různých poměrech O/V, a to 5:95, 10:90 a 20:0, aby byl zjištěn případný vliv olejové fáze na velikost emulzních kapek. Z Obrázku 38, lze pozorovat, že největší rozdíly ve velikosti emulzních kapek měly systémy stabilizované LNP-EtOH-D, kde v poměru 5:95 měla emulze velikost kapek 0,75  $\mu\text{m}$ , zatímco v poměru 20:80 velikost byla 2,23  $\mu\text{m}$ . Emulzní kapky jsou tím větší, čím více je olejové fáze v emulzi, což lze vidět například u E-LNP-EtOH-D (viz Obrázek 39). Tento fakt potvrzuje i studie Li a kol., kde se velikost kapiček měnila s obsahem LNP a poměrem O/V fáze [56].

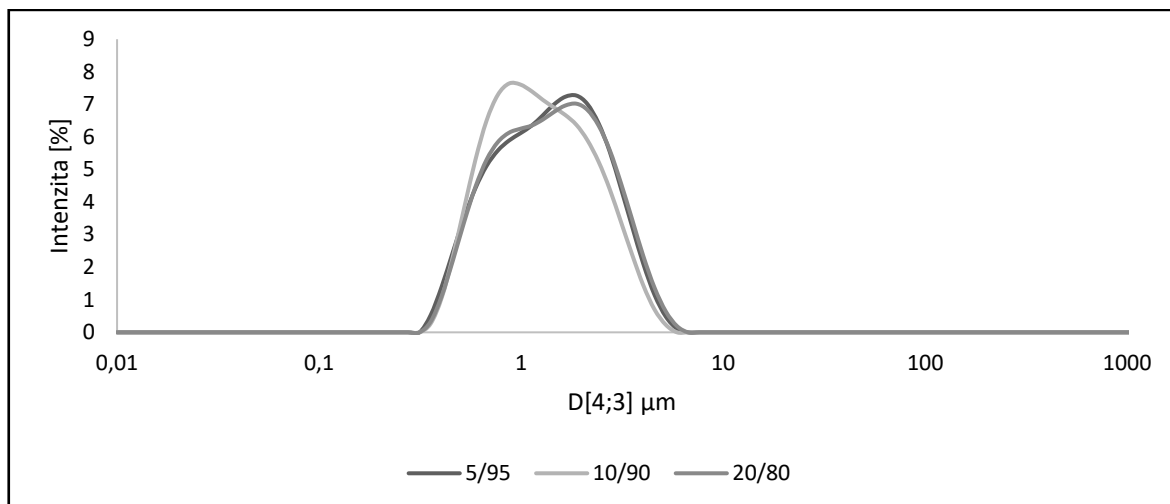


Obrázek 38 Vliv poměru O/V na velikost emulzních kapek



Obrázek 39 Distribuce emulzních kapek E-LNP-EtOH-D v různých poměrech O/V

Odlišné chování emulzních kapek bylo u E-LNP-THF-D, kde se velikost v závislosti na odlišném poměru O/V neměnila, naopak u emulze O/V 20:80 byly velikosti emulzních kapek mírně nižší, a to 1,58  $\mu\text{m}$ . Dalším ukazatelem velmi podobných velikostí emulzních kapek jsou distribuční křivky (viz Obrázek 40).



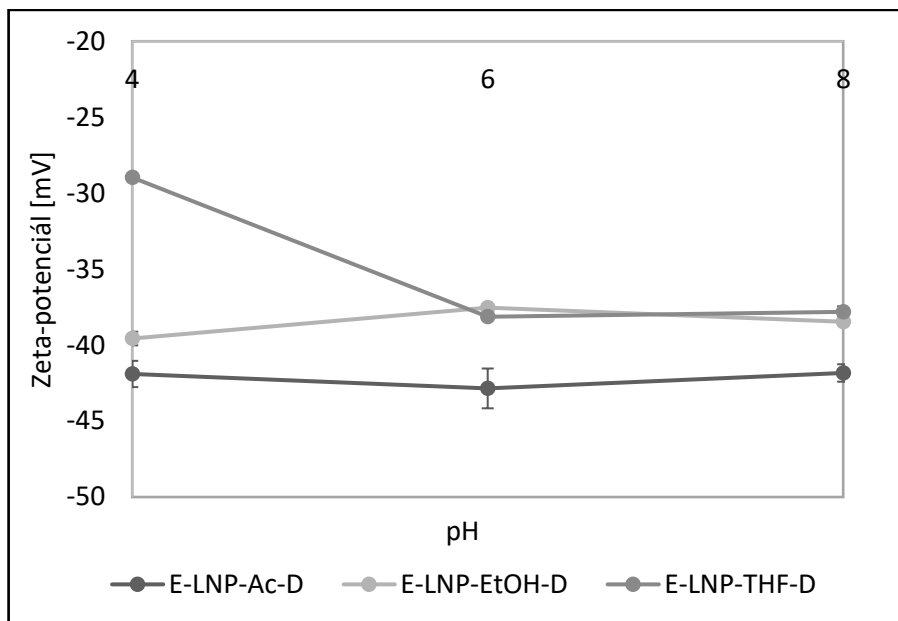
Obrázek 40 Distribuce emulzních kapek E-LNP-THF-D v různých poměrech O/V

### 7.2.3 Stabilita emulzí

Hodnota zeta-potenciálu ukazuje na stabilitu koloidních systémů. Pro experiment bylo důležité znát i koloidní stabilitu emulzí stabilizovaných LNP. Aby nedocházelo k nežádoucím jevům, jako je agregace nebo flokulace, měla by být hodnota zeta-potenciálu větší než +30 mV nebo nižší než -30 mV. Systémy v tomto rozmezí lze považovat za stabilní [58].

Již připravené ligninové nanočástice vykazovaly koloidní stabilitu a hodnoty LNP-Ac-D, LNP-EtOH-D a LNP-THF-D se pohybovaly v rozmezí od -36 mV do -46,9 mV.

Důležitým aspektem, který ovlivňuje zeta-potenciál je pH. Na Obrázku 41 lze vidět, že u emulze stabilizované částicemi s pH 4 se naměřené hodnoty zeta-potenciálu pohybují v největším rozsahu hodnot. Zeta-potenciál E-LNP-THF-D s pH 4 dosahuje hodnot  $-28,9 \pm 0,3$  mV, hodnoty zeta-potenciálu u ostatních emulzí jsou nižší než -30 mV, kdy se jedná o stabilní systémy, které korespondují s hodnotami zeta-potenciálu stabilizujících LNP. Od emulzí v pH 6 lze pozorovat stabilní trend velikosti zeta-potenciálu, který se pro E-LNP-EtOH-D a E-LNP-THF-D pohyboval v rozmezí hodnot od -37,5 do -38,4 mV. Emulze stabilizované LNP-Ac-D vykazují stabilní trend zeta-potenciálu již od pH 4, kde se hodnoty pohybují od -42,8 mV do -41,8 mV.

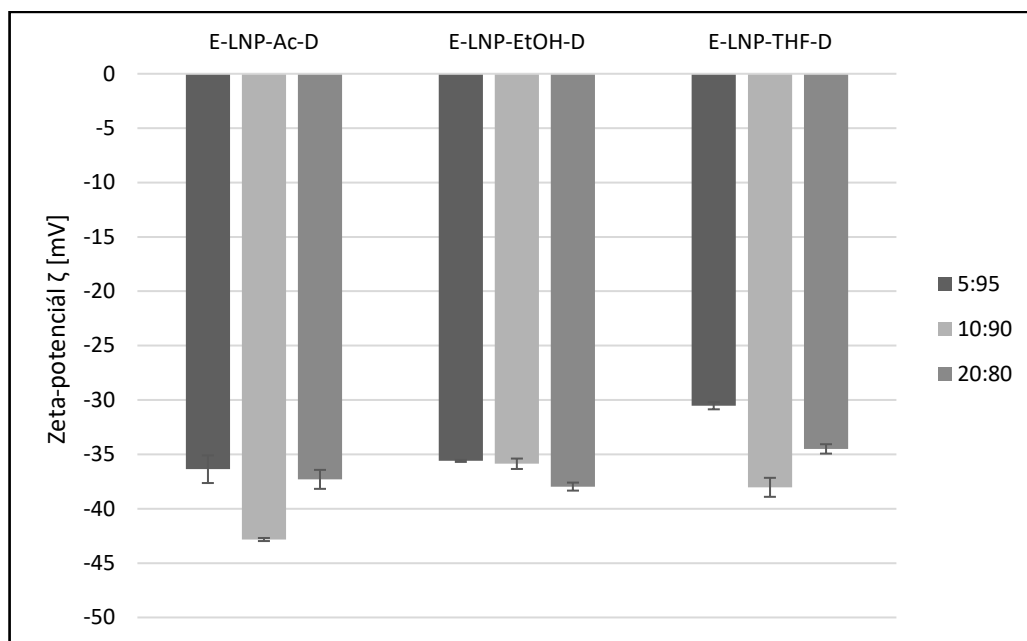


Obrázek 41 Zeta-potenciál emulzí stabilizovaných LNP-Ac, LNP-EtOH a LNP-THF

Stabilita vzniklých emulzí byla zjištěna i u E-LNP-D (pH 6) v různých poměrech (viz Obrázek 42). Všechny připravené emulze stabilizované částicemi dosahují hodnot pod  $-30$  mV, tudíž se jedná o stabilní systémy. Nejmenší rozsah hodnot zeta-potenciálu mají E-LNP-EtOH-D, kdy v poměru 5:95 má emulze  $-35,6 \pm 0,2$  mV, a v poměru 20:80 dosahuje hodnoty  $-37,9 \pm 0,9$  mV. Za to největší rozsah hodnot má E-LNP-THF-D, avšak stále jsou hodnoty nižší než  $-30$  mV. I z fotografií na Obrázku 34 lze vidět, že se jedná o homogenní a stabilní systémy, kde nedocházelo ke krémování emulze.

Koloidně stabilní byly i emulze připravené ve studii Gharekhani a kol., kde se hodnoty zeta-potenciálu pohybovaly od  $-26$  mV do  $-46$  mV [59].



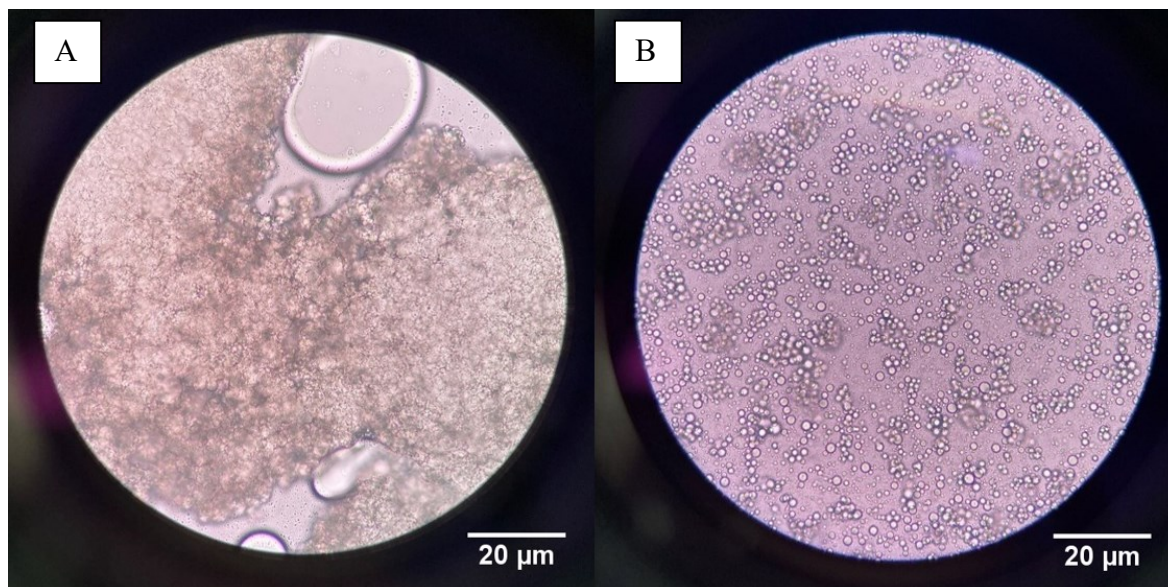


Obrázek 42 Stabilita E-LNP-Ac-D, E-LNP-EtOH-D, E-LNP-THF-D v různých poměrech O/V

#### 7.2.4 Mikrostruktura emulzí

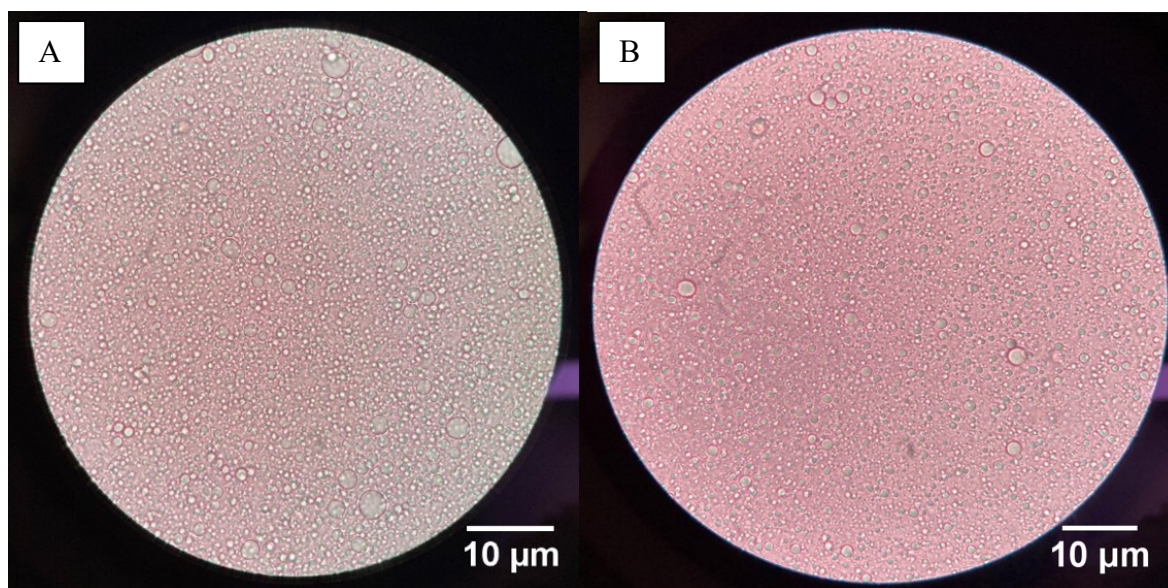
Emulze byly pozorovány pod optickým mikroskopem při zvětšení 40x nebo 100x. Při zvětšení 100x byl použit cedrový olej z důvodu lepšího pozorování emulzních kapiček. Byly pozorovány emulze stabilizované částicemi LNP připravených jak metodou přikapávání, tak dialýzou.

Na Obrázku 43 jsou fotografie emulze stabilizované pomocí LNP-EtOH připravené metodou přikapávání. Srovnáváme zde dvě pH, a to pH 2 a 6, při zvětšení 40x. Na Obrázku A jsou viditelné agregáty emulzních kapiček, zatímco na Obrázku B jdou vidět emulzní kapičky podobných velikostí. Podobný charakter emulzí měly i systémy stabilizované z LNP-Ac-P a LNP-THF-P. Emulzní byly tvořeny shluky různých velikostí kapiček.



Obrázek 43 Emulze stabilizované LNP-EtOH-P v A) pH 2, B) pH 6, zvětšení 40x

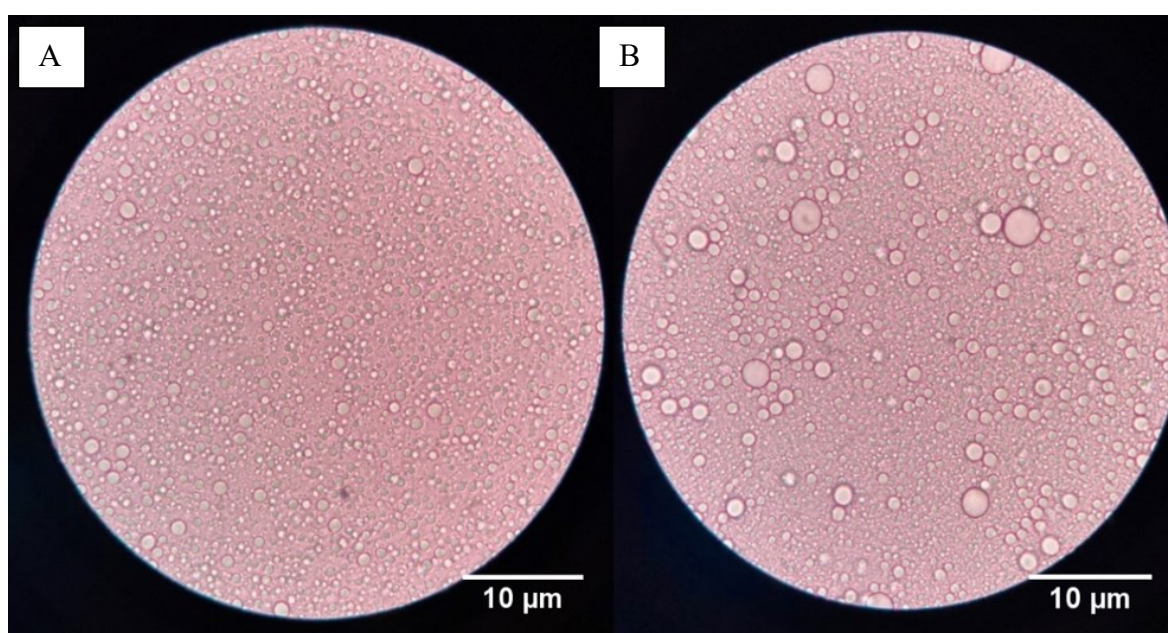
Na Obrázku 44 jsou fotografie emulzí stabilizovaných částicemi LNP-D při zvětšení 100x, konkrétně se jedná o emulze E-LNP-THF-D v pH 6 a 8. Emulze s LNP pH 6 mají podobnou velikost kapiček, zatímco u pH 8 jsou viditelné emulzní kapky různých velikostí, které nejsou ani tak soudržné. Nicméně při porovnání Obrázku 45 a 46, jsou emulze stabilizované LNP-D více homogenní a kapičky netvoří shluky, oproti emulzím připravených z LNP-P. U ostatních E-LNP-D se nevytvořily žádné agregáty kapiček, ani nebyly viditelné shluky v jednotlivých emulzích. Emulzní kapičky byly podobných velikostí u emulzí stabilizovaných LNP se všemi pH. Charakterově podobné emulzní kapičky byly sledovány i u emulzí ve studii Pang a kol. [57].



Obrázek 44 Emulze stabilizované LNP-THF-D v A) pH 6, B) pH 8, zvětšení 100x

Na Obrázku 45 jsou fotografie emulzí stabilizovaných LNP připravených metodou dialýzy s pH 6. Emulze byly připraveny v různých poměrech, aby se zjistil charakter emulzních kapiček v závislosti na různém množství olejové a vodné fáze. Pro srovnání je zde uvedena E-LNP-Ac-D v poměru O/V A) 5:95 a B) 20:80. V případě A lze pozorovat větší hustotu a soudržnou síť emulzních kapiček, které jsou podobné velikosti. V případě B není velikost kapiček homogenní, můžeme vidět emulzní kapky různých velikostí.

Další emulze měly velmi podobný charakter. V poměru O/V 5:95 emulze stabilizované LNP-EtOH-D a LNP-THF-D měly nejmenší kapičky, za to v poměru 20:80 měly emulzní kapičky různou velikost, jako v případě B na Obrázku 45.



*Obrázek 45 Emulze stabilizované LNP-Ac-D při pH 6 v poměrech O/V A) 5:95, B) 20:80, zvětšení 100x*

Emulze stabilizované částicemi, které byly připraveny metodou přikapávání, nebyly homogenní a měly nižší emulgační účinnost. Tento fakt se podepsal i na mikroskopických snímcích, kdy se v emulzích objevují kapky nezaemulgovaného oleje. Stabilita těchto emulzí nedosahovala ani takových hodnot jako u emulzí stabilizovaných LNP-D.



## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo připravit ligninové částice a stabilizovat jimi Pickeringovy emulze. Pro rozpuštění ligninu byly využity čtyři organická rozpouštědla, kterými byly DMSO, THF, Ac a EtOH. Ligninové nanočástice byly připraveny metodou precipitace antirozpouštědlem. Konkrétně šlo o přikapávání a dialýzu do antirozpouštědla s pH 2, 4, 6 a 8. U přikapávání byly jako antirozpouštědla použity citrát-fosfátový pufr a upravená DEMI H<sub>2</sub>O. Při použití pufru jako antirozpouštědla byla velikost částic nekonzistentní a nebyl zde žádný viditelný trend. Za to při přípravě nanočástic do vody jako antirozpouštědla, měly částice menší velikosti, kdy od pH 4 byl viditelný stabilní trend velikosti částic v závislosti na jejich pH. Tím, že byla velikost částic při přípravě LNP do pufru nekonzistentní, z důvodu přítomnosti solí, které zjevně ovlivňují vlastnosti částic, nebyl pufr jako antirozpouštědlo dále používáno. V pH 2 měly částice největší velikost. Tento jev je způsoben přítomností izoelektrického bodu částic poblíž pH 2. V této oblasti pH dochází k protonaci nabitých skupin, což vedlo k agregaci částic. Proto ani antirozpouštědlo s pH 2 nebylo dále pro přípravu částic používáno.

Další metodou přípravy LNP byla dialýza, kterou byly získány uniformnější částice, které mají užší monodisperzní distribuce. Důležitým aspektem při výrobě nanočástic dialýzou je obecně snadnější příprava LNP, jelikož byly částice připravovány bez nutnosti odpařování rozpouštědla a u LNP-Ac-D a LNP-THF-D nebyla provedena ani sonikace, vzhledem k neměnné velikost částic. Metoda přípravy dialýzou byla vyhodnocena jako vhodnější pro přípravu LNP.

U použitých rozpouštědel ligninu, kterými byly Ac, EtOH, THF a DMSO, měly připravené LNP odlišný charakter, jelikož každé rozpouštědlo rozpouštělo vlivem rozdílné polarity jinou frakci ligninu. Zejména při použití nepolárního rozpouštědla THF, oproti polárním rozpouštědlům Ac a EtOH, byla velikost LNP jiná, a to vyšší. Vysoce polární rozpouštědlo DMSO vykazovalo úplně odlišné vlastnosti vzniklých LNP, a mimo jiné vzhledem k jeho vysokému bodu varu nemohlo být odpařeno, tudíž bylo vyloučeno z experimentu.

Byly stanoveny i povrchové vlastnosti připravených LNP, kvůli následující přípravě emulzí. Bylo změřeno povrchové napětí disperzí částic, dále byl měřen i kontaktní úhel, kde vrstva ligninových částic byla dle kontaktních úhlů smáčena méně DEMI H<sub>2</sub>O než jojobovým olejem. Morfologie částic byla sledována skenovací elektronovou mikroskopií. U LNP-THF v pH 6, které byly připraveny dialýzou byly pozorovány duté, hladké a symetrické kulovité

částice. Taktéž u LNP-Ac-D a LNP-EtOH-D vykazovaly navzájem částice podobnou velikost. Naopak u metody přikapávání byl tvar a velikost částic různorodý.

Ligninovými částicemi byly stabilizovány Pickeringovy emulze typu O/V v poměru 10:90, kde byla změřena velikost emulzních kapek, emulgační efektivita či samotná stabilita pomocí zeta-potenciálu. Porovnávány byly emulze stabilizované LNP-P a LNP-D. Emulze stabilizované právě LNP-P byly v pH 2 a 4 silně agregované, avšak v pH 6 a 8 byly bez agregace, s homogenní emulzní vrstvou. U emulzí stabilizovaných LNP-D nedocházelo ke krémování, byly homogenní a měly stejnou barvu ve všech pH a jejich emulgační účinnost byla 100 %. Nejlepší vlastnosti měly emulze stabilizované LNP-D s pH 6, tyto emulze měly nejmenší velikost emulzních kapiček. Vzhledem k tomuto faktu byly dále připraveny emulze v různých poměrech O/V fáze, a to 5:95, 10:90 a 20:80. Emulze v jakémkoli z připravených poměrů měly homogenní charakter a nekrémovaly. Byly proměřeny velikosti emulzních kapek, kde se ukázal vliv množství olejové fáze na velikost kapek. Emulzní kapky byly tím větší, čím více bylo olejové fáze v emulzi.

Jak u připravených částic, tak u emulzí byla proměřena koloidní stabilita systémů. Jak LNP, tak emulze vykazovaly koloidní stabilitu a jejich hodnoty zeta-potenciálu se pohybovaly pod  $-30$  mV. Hodnoty zeta-potenciálu emulzí odpovídaly hodnotám zeta-potenciálu připravených ligninových nanočástic.

Připravené emulze byly zkoumány i pod optickým mikroskopem z důvodu pozorování mikrostruktury. Obecně u emulzí stabilizovaných ligninovými nanočásticemi připravenými metodou přikapávání do pufry se tvořily agregáty, shluky kapiček, avšak emulze stabilizované LNP připravenými dialýzou měly emulzní kapičky podobných velikostí ve všech měřených pH.

Na základě výsledků této studie jsou ligninové částice slibným materiálem pro budoucí použití. LNP připravené metodou dialýzy měly lepší vlastnosti a jako nejvhodnější pH pro přípravu nanočástic bylo určeno pH 6. Organická rozpouštědla, která byla vybrána pro přípravu ligninových nanočástic vykazující odlišné vlastnosti, díky jejich polaritě a schopnosti rozpouštět různé frakce ligninu. Pickeringovy emulze stabilizované LNP-D vykazovaly homogenní charakter bez krémování, který svědčí o dobré kinetické stabilitě.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PUGLIA, Debora, Carlo SANTULLI a Fabrizio SARASINI, ed. *Micro and nanolignin in aqueous dispersions and polymers: interactions, properties, and applications*. Amsterdam: Elsevier, 2022. Polymer science. ISBN 978-0-12-823702-1.
- [2] COLUCCI, Giovana, Arantzazu SANTAMARIA-ECHART, Samara C. SILVA, Liandra G. TEIXEIRA, Andreia RIBEIRO, Alírio E. RODRIGUES a M. Filomena BARREIRO. Development of colloidal lignin particles through particle design strategies and screening of their Pickering stabilizing potential. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2023, **666**, 131287 [vid. 2023-11-29]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2023.131287
- [3] TANG, Qianqian, Yong QIAN, Dongjie YANG, Xueqing QIU, Yanlin QIN a Mingsong ZHOU. Lignin-Based Nanoparticles: A Review on Their Preparations and Applications. *Polymers* [online]. 2020, **12**(11), 2471 [vid. 2023-11-29]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12112471
- [4] PEREIRA, Anderson Do Espirito Santo, Jhones LUIZ DE OLIVEIRA, Susilaine MAIRA SAVASSA, Carolina BARBARA ROGÉRIO, Gerson ARAUJO DE MEDEIROS a Leonardo Fernandes FRACETO. Lignin nanoparticles: New insights for a sustainable agriculture. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2022, **345**, 131145 [vid. 2023-11-29]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2022.131145
- [5] GBENEBOR, Oluwashina Philips, Oludolapo Akanni OLANREWAJU, Mohammed Awwalu USMAN a Samson Oluropo ADEOSUN. Lignin from Brewers' Spent Grain: Structural and Thermal Evaluations. *Polymers* [online]. 2023, **15**(10), 2346 [vid. 2023-12-03]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym15102346
- [6] PANG, Yuxia, Yixuan CHENG, Yanling LUO, Conghua YI, Mingsong ZHOU a Hongming LOU. Effect of hydrophilicity of lignin particles on emulsifying properties of Pickering emulsion. *Journal of Dispersion Science and Technology* [online]. 2023, 1–9 [vid. 2023-11-30]. ISSN 0193-2691, 1532-2351. Dostupné z: doi:10.1080/01932691.2023.2239333
- [7] STANISZ, M., Ł. KLAPISZEWSKI, M.N. COLLINS a T. JESIONOWSKI. Recent progress in biomedical and biotechnological applications of lignin-based spherical nano- and microstructures: a comprehensive review. *Materials Today Chemistry* [online]. 2022, **26**, 101198 [vid. 2023-11-30]. ISSN 24685194. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtchem.2022.101198
- [8] MANDLEKAR, Neeraj, Aurélie CAYLA, François RAULT, Stéphane GIRAUD, Fabine SALAÛN, Giulio MALUCELLI a Jin-Ping GUAN. An Overview on the Use of Lignin and Its Derivatives in Fire Retardant Polymer Systems. In: Matheus POLETTI, ed. *Lignin - Trends and Applications* [online]. B.m.: InTech, 2018 [vid. 2023-12-03]. ISBN 978-953-51-3901-0. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.72963
- [9] CHIO, Chonlong, Mohini SAIN a Wensheng QIN. Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects. *Renewable and Sustainable Energy*

- Reviews* [online]. 2019, **107**, 232–249 [vid. 2024-02-27]. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2019.03.008
- [10] WU, Chen, Yumeng YANG, Kaiqi SUN, Dan LUO, Xiuyu LIU, Huining XIAO, Huiyang BIAN a Hongqi DAI. Lignin decolorization in organic solvents and their application in natural sunscreen. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2023, **237**, 124081 [vid. 2023-12-01]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.124081
- [11] ZHANG, Yi a Maryam NAEBE. Lignin: A Review on Structure, Properties, and Applications as a Light-Colored UV Absorber. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. 2021, **9**(4), 1427–1442 [vid. 2023-12-22]. ISSN 2168-0485, 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.0c06998
- [12] YU, Mengtian, Hanwen XIN, Dongpo HE, Chen ZHU, Qi LI, Xing WANG a Jinghui ZHOU. Electro spray lignin nanoparticles as Pickering emulsions stabilizers with antioxidant activity, UV barrier properties and biological safety. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2023, **238**, 123938 [vid. 2023-11-29]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.123938
- [13] FIGUEIREDO, Patrícia, Maarit H. LAHTINEN, Melissa B. AGUSTIN, Danila Morais DE CARVALHO, Sami-Pekka HIRVONEN, Paavo A. PENTTILÄ a Kirsi S. MIKKONEN. Green Fabrication Approaches of Lignin Nanoparticles from Different Technical Lignins: A Comparison Study. *ChemSusChem* [online]. 2021, **14**(21), 4718–4730 [vid. 2023-12-01]. ISSN 1864-5631, 1864-564X. Dostupné z: doi:10.1002/cssc.202101356
- [14] ZWILLING, Jacob D., Xiao JIANG, Franklin ZAMBRANO, Richard A. VENDITTI, Hasan JAMEEL, Orlin D. VELEV, Orlando J. ROJAS a Ronalds GONZALEZ. Understanding lignin micro- and nanoparticle nucleation and growth in aqueous suspensions by solvent fractionation. *Green Chemistry* [online]. 2021, **23**(2), 1001–1012 [vid. 2023-12-21]. ISSN 1463-9262, 1463-9270. Dostupné z: doi:10.1039/D0GC03632C
- [15] YANG, Mingkun, Wenwen ZHAO, Seema SINGH, Blake SIMMONS a Gang CHENG. On the solution structure of kraft lignin in ethylene glycol and its implication for nanoparticle preparation. *Nanoscale Advances* [online]. 2019, **1**(1), 299–304 [vid. 2023-12-03]. ISSN 2516-0230. Dostupné z: doi:10.1039/C8NA00042E
- [16] ZHANG, Zhao, Vincent TERRASSON a Erwann GUÉNIN. Lignin Nanoparticles and Their Nanocomposites. *Nanomaterials* [online]. 2021, **11**(5), 1336 [vid. 2023-11-29]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano11051336
- [17] LIEVONEN, Miikka, Juan José VALLE-DELGADO, Maija-Liisa MATTINEN, Eva-Lena HULT, Kalle LINTINEN, Mauri A. KOSTIAINEN, Arja PAANANEN, Géza R. SZILVAY, Harri SETÄLÄ a Monika ÖSTERBERG. A simple process for lignin nanoparticle preparation. *Green Chemistry* [online]. 2016, **18**(5), 1416–1422 [vid. 2023-12-21]. ISSN 1463-9262, 1463-9270. Dostupné z: doi:10.1039/C5GC01436K

- [18] CHAUDHARY, Mehak a V.R. SINHA. Lignin-based carriers for drug delivery applications: From an industrial waste to a pharmaceutical aid. *European Polymer Journal* [online]. 2023, **195**, 112206 [vid. 2023-12-22]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2023.112206
- [19] SCHNEIDER, Willian Daniel Hahn, Aldo José Pinheiro DILLON a Marli CAMASSOLA. Lignin nanoparticles enter the scene: A promising versatile green tool for multiple applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2021, **47**, 107685 [vid. 2024-04-11]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107685
- [20] FUJISAWA, Shuji, Eiji TOGAWA a Katsushi KURODA. Nanocellulose-stabilized Pickering emulsions and their applications. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2017, **18**(1), 959–971 [vid. 2024-03-01]. ISSN 1468-6996, 1878-5514. Dostupné z: doi:10.1080/14686996.2017.1401423
- [21] CHEVALIER, Yves a Marie-Alexandrine BOLZINGER. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2013, **439**, 23–34 [vid. 2024-03-11]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2013.02.054
- [22] DAI, Lin, Yuantao LI, Fangong KONG, Kefeng LIU, Chuanling SI a Yonghao NI. Lignin-Based Nanoparticles Stabilized Pickering Emulsion for Stability Improvement and Thermal-Controlled Release of *trans*-Resveratrol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. 2019, **7**(15), 13497–13504 [vid. 2024-03-03]. ISSN 2168-0485, 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.9b02966
- [23] YANG, Yunqi, Zhiwei FANG, Xuan CHEN, Weiwang ZHANG, Yangmei XIE, Yinghui CHEN, Zhenguo LIU a Weien YUAN. An Overview of Pickering Emulsions: Solid-Particle Materials, Classification, Morphology, and Applications. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2017, **8**, 287 [vid. 2024-03-13]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2017.00287
- [24] DE CARVALHO-GUIMARÃES, Fernanda Brito, Kamila Leal CORREA, Tatiane Pereira DE SOUZA, Jesus Rafael RODRÍGUEZ AMADO, Roseane Maria RIBEIRO-COSTA a José Otávio Carréra SILVA-JÚNIOR. A Review of Pickering Emulsions: Perspectives and Applications. *Pharmaceuticals* [online]. 2022, **15**(11), 1413 [vid. 2024-03-13]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph15111413
- [25] JIANG, Hang, Yifeng SHENG a To NGAI. Pickering emulsions: Versatility of colloidal particles and recent applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2020, **49**, 1–15 [vid. 2024-04-11]. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2020.04.010
- [26] LOW, Liang Ee, Sangeetapriya P. SIVA, Yong Kuen HO, Eng Seng CHAN a Beng Ti TEY. Recent advances of characterization techniques for the formation, physical properties and stability of Pickering emulsion. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2020, **277**, 102117 [vid. 2024-04-11]. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2020.102117



- [27] FRELICHOWSKA, Justyna, Marie-Alexandrine BOLZINGER, Jean-Pierre VALOUR, Hanna MOUAZIZ, Jocelyne PELLETIER a Yves CHEVALIER. Pickering w/o emulsions: Drug release and topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2009, **368**(1–2), 7–15 [vid. 2024-04-11]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2008.09.057
- [28] WU, Fengjuan, Jianjun DENG, Liuyun HU, Zhenhua ZHANG, Hang JIANG, Yunxing LI, Zonglin YI a To NGAI. Investigation of the stability in Pickering emulsions preparation with commercial cosmetic ingredients. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2020, **602**, 125082 [vid. 2024-03-14]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125082
- [29] PEITO, Sofia, Diana PEIXOTO, Inês FERREIRA-FARIA, Ana MARGARIDA MARTINS, Helena MARGARIDA RIBEIRO, Francisco VEIGA, Joana MARTO a Ana CLÁUDIA PAIVA-SANTOS. Nano- and microparticle-stabilized Pickering emulsions designed for topical therapeutics and cosmetic applications. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2022, **615**, 121455 [vid. 2024-03-14]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121455
- [30] GUZMÁN, Eduardo, Francisco ORTEGA a Ramón G. RUBIO. Pickering Emulsions: A Novel Tool for Cosmetic Formulators. *Cosmetics* [online]. 2022, **9**(4), 68 [vid. 2024-03-14]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics9040068
- [31] TOMASICH, Julia, Stefan BEISL a Michael HARASEK. Production and Characterisation of Pickering Emulsions Stabilised by Colloidal Lignin Particles Produced from Various Bulk Lignins. *Sustainability* [online]. 2023, **15**(4), 3693 [vid. 2024-03-02]. ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:10.3390/su15043693
- [32] PANG, Yuxia, Yingdong LUO, Zhiping LI, Yanling LUO, Hongming LOU a Mingsong ZHOU. Pickering emulsion stabilized by lignin particles: Influence of oil phase, lignin concentration, and particle size. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2024 [vid. 2024-03-14]. ISSN 0303-402X, 1435-1536. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-024-05226-1
- [33] QIAN, Yong, Qi ZHANG, Xueqing QIU a Shiping ZHU. CO<sub>2</sub>-responsive diethylaminoethyl-modified lignin nanoparticles and their application as surfactants for CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>-switchable Pickering emulsions. *Green Chem.* [online]. 2014, **16**(12), 4963–4968 [vid. 2024-03-27]. ISSN 1463-9262, 1463-9270. Dostupné z: doi:10.1039/C4GC01242A
- [34] YU, Xiaona, Shanshuai CHEN, Weichen WANG, Tiansheng DENG a Hongliang WANG. Empowering alkali lignin with high performance in pickering emulsion by selective phenolation for the protection and controlled-release of agrochemical. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2022, **339**, 130769 [vid. 2024-03-27]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2022.130769
- [35] WEI, Zengjiang, Yu YANG, Rui YANG a Chaoyang WANG. Alkaline lignin extracted from furfural residues for pH-responsive Pickering emulsions and their recyclable polymerization. *Green Chemistry* [online]. 2012, **14**(11), 3230 [vid. 2024-03-27]. ISSN 1463-9262, 1463-9270. Dostupné z: doi:10.1039/c2gc36278c

- [36] YANG, Yu, Zengjiang WEI, Chaoyang WANG a Zhen TONG. Lignin-based Pickering HIPEs for macroporous foams and their enhanced adsorption of copper(ii) ions. *Chemical Communications* [online]. 2013, **49**(64), 7144 [vid. 2024-03-27]. ISSN 1359-7345, 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/c3cc42270d
- [37] YI, Huan, Yu YANG, Xiaoyu GU, Jian HUANG a Chaoyang WANG. Multilayer composite microcapsules synthesized by Pickering emulsion templates and their application in self-healing coating. *Journal of Materials Chemistry A* [online]. 2015, **3**(26), 13749–13757 [vid. 2024-03-27]. ISSN 2050-7488, 2050-7496. Dostupné z: doi:10.1039/C5TA02288F
- [38] AGO, Mariko, Siqi HUAN, Maryam BORGHEI, Janne RAULA, Esko I. KAUPPINEN a Orlando J. ROJAS. High-Throughput Synthesis of Lignin Particles (~30 nm to ~2 µm) via Aerosol Flow Reactor: Size Fractionation and Utilization in Pickering Emulsions. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2016, **8**(35), 23302–23310 [vid. 2024-03-27]. ISSN 1944-8244, 1944-8252. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.6b07900
- [39] NYPELÖ, Tiina E., Carlos A. CARRILLO a Orlando J. ROJAS. Lignin supracolloids synthesized from (W/O) microemulsions: use in the interfacial stabilization of Pickering systems and organic carriers for silver metal. *Soft Matter* [online]. 2015, **11**(10), 2046–2054 [vid. 2024-03-27]. ISSN 1744-683X, 1744-6848. Dostupné z: doi:10.1039/C4SM02851A
- [40] HOLTZ, Arne, Dennis WEIDENER, Walter LEITNER, Holger KLOSE, Philipp M. GRANDE a Andreas JUPKE. Process development for separation of lignin from OrganoCat lignocellulose fractionation using antisolvent precipitation. *Separation and Purification Technology* [online]. 2020, **236**, 116295 [vid. 2024-04-14]. ISSN 13835866. Dostupné z: doi:10.1016/j.seppur.2019.116295
- [41] PYLYPCHUK, Ievgen a Mika H. SIPPONEN. Organic solvent-free production of colloidally stable spherical lignin nanoparticles at high mass concentrations. *Green Chemistry* [online]. 2022, **24**(22), 8705–8715 [vid. 2024-04-03]. ISSN 1463-9262, 1463-9270. Dostupné z: doi:10.1039/D2GC02316D
- [42] ÖSTERBERG, Monika, Mika H. SIPPONEN, Bruno D. MATTOS a Orlando J. ROJAS. Spherical lignin particles: a review on their sustainability and applications. *Green Chemistry* [online]. 2020, **22**(9), 2712–2733 [vid. 2024-05-01]. ISSN 1463-9262, 1463-9270. Dostupné z: doi:10.1039/D0GC00096E
- [43] *Dynamický rozptyl světla* [online]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [44] CLOGSTON, Jeffrey D. a Anil K. PATRI. Zeta Potential Measurement. In: Scott E. MCNEIL, ed. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011 [vid. 2024-04-03], *Methods in Molecular Biology*, s. 63–70. ISBN 978-1-60327-197-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60327-198-1\_6
- [45] ZHU, Fu-Yun, Qi-Qi WANG, Xiao-Sheng ZHANG, Wei HU, Xin ZHAO a Hai-Xia ZHANG. 3D nanostructure reconstruction based on the SEM imaging principle, and

- applications. *Nanotechnology* [online]. 2014, **25**(18), 185705 [vid. 2024-04-03]. ISSN 0957-4484, 1361-6528. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/25/18/185705
- [46] MOHAMMAD KARIM, Alireza a H. Pirouz KAVEHPOUR. Effect of viscous force on dynamic contact angle measurement using Wilhelmy plate method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2018, **548**, 54–60 [vid. 2024-05-01]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2018.03.058
- [47] See System. *Advex Instruments - See System* [online]. 2008. Dostupné z: <http://www.advex-instruments.cz/>
- [48] GAD, Heba A., Autumn ROBERTS, Samirah H. HAMZI, Haidy A. GAD, Ilham TOUISS, Ahmed E. ALTYAR, Osama A. KENSARA a Mohamed L. ASHOUR. Jojoba Oil: An Updated Comprehensive Review on Chemistry, Pharmaceutical Uses, and Toxicity. *Polymers* [online]. 2021, **13**(11), 1711 [vid. 2024-05-01]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13111711
- [49] BEISL, Stefan, Johannes ADAMCYK a Anton FRIEDL. Direct Precipitation of Lignin Nanoparticles from Wheat Straw Organosolv Liquors Using a Static Mixer. *Molecules* [online]. 2020, **25**(6), 1388 [vid. 2024-04-30]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25061388
- [50] FRANGVILLE, Camille, Marius RUTKEVIČIUS, Alexander P. RICHTER, Orlin D. VELEV, Simeon D. STOYANOV a Vesselin N. PAUNOV. Fabrication of Environmentally Biodegradable Lignin Nanoparticles. *ChemPhysChem* [online]. 2012, **13**(18), 4235–4243 [vid. 2024-05-01]. ISSN 1439-4235, 1439-7641. Dostupné z: doi:10.1002/cphc.201200537
- [51] BEISL, Stefan, Angela MILTNER a Anton FRIEDL. Lignin from Micro- to Nanosize: Production Methods. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(6), 1244 [vid. 2024-05-01]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18061244
- [52] VERMAAS, Josh V., Michael F. CROWLEY a Gregg T. BECKHAM. Molecular Lignin Solubility and Structure in Organic Solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. 2020, **8**(48), 17839–17850 [vid. 2024-05-01]. ISSN 2168-0485, 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.0c07156
- [53] MARENICH, Aleksandr V., Christopher J. CRAMER a Donald G. TRUHLAR. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2009, **113**(18), 6378–6396 [vid. 2024-05-01]. ISSN 1520-6106, 1520-5207. Dostupné z: doi:10.1021/jp810292n
- [54] PONNUCHAMY, Veerapandian, Oihana GORDOBIL, René Herrera DIAZ, Anna SANDAK a Jakub SANDAK. Fractionation of lignin using organic solvents: A combined experimental and theoretical study. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, **168**, 792–805 [vid. 2024-05-02]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.139
- [55] YUAN, Yuehua a T. Randall LEE. Contact Angle and Wetting Properties. In: Gianangelo BRACCO a Bodil HOLST, ed. *Surface Science Techniques* [online].

- Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013 [vid. 2024-05-02], Springer Series in Surface Sciences, s. 3–34. ISBN 978-3-642-34242-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-34243-1\_1
- [56] LI, Xiang, Jiajun SHEN, Bijia WANG, Xueling FENG, Zhiping MAO a Xiaofeng SUI. Acetone/Water Cosolvent Approach to Lignin Nanoparticles with Controllable Size and Their Applications for Pickering Emulsions. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. 2021, **9**(15), 5470–5480 [vid. 2024-05-02]. ISSN 2168-0485, 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.1c01021
- [57] PANG, Yuxia, Shengwen WANG, Xueqing QIU, Yanling LUO, Hongming LOU a Jinhao HUANG. Preparation of Lignin/Sodium Dodecyl Sulfate Composite Nanoparticles and Their Application in Pickering Emulsion Template-Based Microencapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2017, **65**(50), 11011–11019 [vid. 2024-05-07]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.7b03784
- [58] MCNEIL, Scott E., ed. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. New York: Humana Press, 2010. Methods in molecular biology, 697. ISBN 978-1-60327-198-1.
- [59] GHAREHKHANI, Samira, Nasim GHAVIDEL a Pedram FATEHI. Kraft Lignin–Tannic Acid as a Green Stabilizer for Oil/Water Emulsion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. 2019, **7**(2), 2370–2379 [vid. 2024-05-07]. ISSN 2168-0485, 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.8b05193

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

Ac	aceton
DEMI H <sub>2</sub> O	demineralizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
EtOH	ethanol
LNP	ligninové nanočástice
LNP-Ac	ligninové nanočástice připravené v prostředí rozpouštědla aceton
LNP-D	ligninové nanočástice připravené metodou dialýzy
LNP-DMSO	ligninové nanočástice připravené v prostředí rozpouštědla dimethylsulfoxid
LNP-EtOH	ligninové nanočástice připravené v prostředí rozpouštědla ethanol
LNP-P	ligninové nanočástice připravené metodou přikapávání
LNP-pufr	ligninové nanočástice připravené metodou přikapávání do pufru
LNP-THF	ligninové nanočástice připravené v prostředí rozpouštědla tetrahydrofuran
LNP-voda	ligninové nanočástice připravené metodou přikapávání do vody
O/V	emulze typu olej ve vodě
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SPF	Sun Protection Factor – míra udávající ochranu proti UV záření
THF	tetrahydrofuran
UV	ultrafialové záření
UVA	ultrafialové záření v rozmezí 315-400 nm
UVB	ultrafialové záření v rozmezí 280-315 nm

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1</i> Struktura lignocelulózového materiálu, upraveno dle [5] .....	12
<i>Obrázek 2</i> Struktura základních monolignolů, upraveno dle [1] .....	12
<i>Obrázek 3</i> Souhrn extrakčních metod přípravy ligninu z lignocelulózové biomasy, upraveno dle [8] .....	13
<i>Obrázek 4</i> Příklady využití ligninových částic v různých odvětvích, upraveno dle [7] .....	16
<i>Obrázek 5</i> Mechanismus působení ligninu v přípravcích proti UV záření, upraveno dle [11] .....	17
<i>Obrázek 6</i> Příprava nanočástic ligninu metodou a) přikapáváním ligninu do vody, b) přikapáváním vody do ligninu, c) dialýzou, upraveno dle [14] .....	21
<i>Obrázek 7</i> Rozdíl ve stabilizaci klasické a Pickeringovy emulze, upraveno dle [21] .....	25
<i>Obrázek 8</i> (A) Poloha pevné částice na rozhraní kapky s kontaktním úhlem ( $\theta$ ) menším než $90^\circ$ - systém o/v, (B) Poloha pevné částice na rozhraní kapky s kontaktním úhlem ( $\theta$ ) větším než $90^\circ$ - systém v/o, upraveno dle [24] .....	28
<i>Obrázek 9</i> Schématické znázornění emulgace v ultrazvukovém zařízení [24] .....	30
<i>Obrázek 10</i> Připravené zásobní roztoky ligninu ve čtyřech rozpouštědlech .....	40
<i>Obrázek 11</i> Jednotlivé vzorky připravené metodou přikapávání do pufru v daných pH ....	42
<i>Obrázek 12</i> Jednotlivé vzorky připravené metodou dialýzy v různých pH .....	43
<i>Obrázek 13</i> Ligninové částice připravené metodou přikapávání A) LNP-Ac-pufr, B) LNP-Ac-voda .....	48
<i>Obrázek 14</i> Vliv metody přikapávání na velikost částic LNP-EtOH v různých pH .....	49
<i>Obrázek 15</i> Vliv metody přikapávání na velikost částic LNP-Ac v různých pH .....	50
<i>Obrázek 16</i> Vliv metody přikapávání na velikost částic LNP-THF v různých pH .....	50
<i>Obrázek 17</i> Distribuce částic LNP-THF-voda v pH 2 a pH 6 .....	51
<i>Obrázek 18</i> Vliv použité metody přípravy na velikost částic LNP-EtOH .....	52
<i>Obrázek 19</i> Vliv použité metody přípravy na velikost částic LNP-Ac .....	53
<i>Obrázek 20</i> Vliv použité metody přípravy na velikost částic LNP-THF .....	53
<i>Obrázek 21</i> Fotografie ihned po přípravě A) LNP-THF-P a B) LNP-THF-D .....	54
<i>Obrázek 22</i> Srovnání distribuce velikosti částic pro LNP-THF-P a LNP-THF-D .....	55
<i>Obrázek 23</i> Srovnání distribuce velikosti částic LNP-EtOH-P a LNP-EtOH-D .....	55
<i>Obrázek 24</i> Srovnání velikosti LNP-P v závislosti na použitém rozpouštědle ligninu .....	57
<i>Obrázek 25</i> Srovnání LNP-D v závislosti na použitém rozpouštědle ligninu .....	58
<i>Obrázek 26</i> Morfologie vrstvy LNP-EtOH, zvětšení 40x .....	60
<i>Obrázek 27</i> Morfologie vrstvy LNP-Ac, zvětšení 40x .....	61
<i>Obrázek 28</i> Morfologie vrstvy LNP-THF, zvětšení 40x .....	61
<i>Obrázek 29</i> Morfologie částic LNP-THF-P, pH 4 .....	63

<i>Obrázek 30 Morfologie částic LNP-THF-D, pH 6 .....</i>	<i>63</i>
<i>Obrázek 31 Fotografie emulzí s LNP připravených metodou přikapávání .....</i>	<i>65</i>
<i>Obrázek 32 Emulgační účinnost emulzí stabilizovaných LNP-P .....</i>	<i>65</i>
<i>Obrázek 33 Fotografie emulzí s LNP připravených metodou dialýzy .....</i>	<i>66</i>
<i>Obrázek 34 Fotografie emulzí stabilizovaných LNP-D v poměrech O/V 5:95, 10:90, 20:80 .....</i>	<i>67</i>
<i>Obrázek 35 Vliv pH a typu LNP-D na velikosti emulzních kapek .....</i>	<i>68</i>
<i>Obrázek 36 Distribuce velikosti emulzních kapek pro E-LNP-EtOH-D .....</i>	<i>68</i>
<i>Obrázek 37 Srovnání distribuce emulzních kapek E-LNP-EtOH a E-LNP-Ac (pH 6) .....</i>	<i>69</i>
<i>Obrázek 38 Vliv poměru O/V na velikost emulzních kapek .....</i>	<i>70</i>
<i>Obrázek 39 Distribuce emulzních kapek E-LNP-EtOH-D v různých poměrech O/V .....</i>	<i>70</i>
<i>Obrázek 40 Distribuce emulzních kapek E-LNP-THF-D v různých poměrech O/V .....</i>	<i>71</i>
<i>Obrázek 41 Zeta-potenciál emulzí stabilizovaných LNP-Ac, LNP-EtOH a LNP-THF .....</i>	<i>72</i>
<i>Obrázek 42 Stabilita E-LNP-Ac-D, E-LNP-EtOH-D, E-LNP-THF-D v různých poměrech O/V .....</i>	<i>73</i>
<i>Obrázek 43 Emulze stabilizované LNP-EtOH-P v A) pH 2, B) pH 6, zvětšení 40x .....</i>	<i>74</i>
<i>Obrázek 44 Emulze stabilizované LNP-THF-D v A) pH 6, B) pH 8, zvětšení 100x .....</i>	<i>74</i>
<i>Obrázek 45 Emulze stabilizované LNP-Ac-D při pH 6 v poměrech O/V A) 5:95, B) 20:80, zvětšení 100x .....</i>	<i>75</i>

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tabulka 1 Příslušné navážky pro citrát-fosfátový pufr v daných pH .....</i>	<i>40</i>
<i>Tabulka 2 Srovnání velikosti částic LNP-EtOH-D před/po sonikaci .....</i>	<i>54</i>
<i>Tabulka 3 Souhrn permitivit jednotlivých rozpouštědel .....</i>	<i>56</i>
<i>Tabulka 4 Naměřené hodnoty povrchového napětí u vzorků nanočástic .....</i>	<i>60</i>
<i>Tabulka 5 Výsledné hodnoty kontaktních úhlů u jednotlivých měření.....</i>	<i>62</i>



