

Příprava a charakterizace emulzních systémů na bázi nanocelulosy a proteinu vhodných pro lyofilizaci

Bc. Eliška Hlaváčová

Diplomová práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2020/2021

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

Jméno a příjmení: **Bc. Eliška Hlaváčová**
Osobní číslo: **T19404**
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**
Studijní obor: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Příprava a charakterizace emulzních systémů na bázi nanocelulosity a proteinu vhodných pro lyofilizaci**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma.
2. Stručně se zaměřte na emulze a alternativní mechanismy stabilizace emulzí při použití více typů stabilizátorů.
3. Věnujte se rovněž lyofilizaci emulzí a charakterizujte kryoprotektanty.

II. Praktická část

1. Připravte a dostupnými metodami charakterizujte emulze stabilizované kombinací nanocelulosity a kaseinátu sodného s aktivní látkou.
2. Vyberte vhodné typy kryoprotektantů a studujte jejich vliv na vlastnosti emulzí.
3. Emulzní systémy lyofilizujte a stanovte jejich vlastnosti pomocí relevantních analytických metod, zaměřte se na redispergovatelnost lyofilizovaných emulzí ve vodném prostředí a uvolňování aktivní látky do média.
4. Získané výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] HU, Z. et al. Dried and Redispersible Cellulose Nanocrystal Pickering Emulsions. *Acs Macro Letters*. 2016, vol. 5, no. 2, p. 185-189. doi: 10.1021/acsmacrolett.5b00919.
- [2] LIU, F. et al. Pickering high internal phase emulsions stabilized by protein-covered cellulose nanocrystals. *Food Hydrocolloids*. 2018, vol. 82, p. 96-105. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.03.047.
- [3] MORAIS, Andreza Rochelle do Vale et al. Freeze-drying of emulsified systems: A review, 2016. 102-114 s. ID: 271189. ISBN 0378-5173.
- [4] OUADAKER, M. et al. Porous granules by freeze granulation of pickering emulsions stabilized with halloysite particles, 2020. 124156 s. ID: 271384. ISBN 0927-7757.

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

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 20. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA 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 uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....

podpis studenta

ABSTRAKT

Předkládaná diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací emulzních systémů s enkapsulovaným kurkuminem na bázi celulózy a proteinu, dále lyofilizací těchto emulzí a charakterizací jejich produktů. V teoretické části práce je popsána problematika emulzí a možnosti jejich stabilizace, dále je rozebrán pojem enkapsulace a popsán proces lyofilizace včetně použití kryoprotektantů. Praktická část diplomové práce je zaměřena na přípravu a stabilizaci emulzí kombinací nanocelulózových částic a kaseinátu sodného jako nosiče aktivní látky (kurkuminu), a jejich následnou lyofilizaci. Připravené emulze byly charakterizovány vizuálním pozorováním, měřením velikosti a distribuce emulzních kapek a mikroskopií. Lyofilizované emulze byly rovněž pozorovány vizuálně, byla určena jejich mikrostruktura, a dále byla sledována rekonstituce a uvolňování aktivní látky.

Klíčová slova: emulze, enkapsulace lyofilizace, kryoprotektant, CNC, CAS, glukóza, mannitol, sacharóza, kurkumin

ABSTRACT

Submitted diploma thesis is focused on preparation and characterization of cellulose and protein-based emulsions systems with encapsulated curcumin, as well as lyophilization of these emulsions and characterization of the products of lyophilization. Theoretical part describes emulsions and possibilities of their stabilization, the concept of encapsulation is further explained and the process of lyophilization together with use of cryoprotectants is summarized. Practical part of thesis deals with preparation of emulsions stabilized with nanocellulose and sodium caseinate as carrier of active substance (curcumin), and further is focused on lyophilization of emulsion. The prepared emulsions were characterized by observing, measuring the size and distribution of emulsions droplets and microscopy. Lyophilizates were observed visually, as well as microstructure was studied. Moreover, the reconstitution was analysed as well as release of curcumin.

Keywords: emulsion, encapsulation, lyophilization, cryoprotectant, CNC, CAS, glucose, mannitol, sucrose, curcumin

Velké poděkování patří vedoucí mé práce Ing. Lucii Urbánkové, Ph.D. která se mi po celou dobu věnovala s obrovským nasazením, prohlubovala ve mně zájem o danou problematiku a vše mi trpělivě vysvětlovala.

Ráda bych také poděkovala své rodině a partnerovi, kteří mě po celou dobu studia a při psaní této práce podporovali a měli pochopení.

OBSAH

Úvod	9
1 Emulze	11
1.1 <i>Vlastnosti emulzí</i>	11
1.1.1 Polarita emulzí.....	11
1.1.2 Velikost emulzních kapek.....	12
1.1.3 Stabilita emulzí.....	12
1.2 <i>Stabilizace emulzí</i>	13
1.2.1 Stabilizace nízkomolekulárními surfaktanty.....	14
1.2.2 Elektrostatická stabilizace.....	14
1.2.3 Stérická stabilizace.....	15
2 Biopolymery a stabilizace emulzí	17
2.1 <i>Proteiny</i>	18
2.1.1 Kaseináty.....	19
2.2 <i>Polysacharidy</i>	20
2.2.1 Celulóza.....	20
3 Pickeringovy emulze a stabilizace emulzí pevnými částicemi	22
3.1 <i>Fyzikálně – chemické vlastnosti Pickeringových emulzí</i>	22
3.2 <i>Typy částic používaných u Pickeringových emulzí</i>	24
3.2.1 Anorganické částice.....	24
3.2.2 Biopolymerní částice.....	25
4 Interakce protein-polysacharid na mezifázovém rozhraní olej-voda	28
4.1 <i>Ko-adsorpce</i>	28
4.2 <i>Komplexace</i>	29
4.3 <i>Layer-by-layer</i>	30
5 Enkapsulace	32
5.1 <i>Enkapsulace aktivních látek</i>	33
5.1.1 Enkapsulace kurkuminu.....	33
5.1.2 Typy enkapsulačních systémů.....	35
6 Lyofilizace	36
6.1 <i>Cykly lyofilizace</i>	36
6.1.1 Zmrazení.....	36
6.1.2 Primární sušení.....	37
6.1.3 Sekundární sušení.....	37
6.2 <i>Kryoprotektanty</i>	38
6.2.1 Glukóza.....	39
6.2.2 Mannitol.....	40
6.2.3 Sacharóza.....	41
7 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	43
8 Cíl práce	45
PRAKTICKÁ ČÁST	46
9 Materiál a přístrojové vybavení	47
9.1 <i>Použité chemikálie</i>	47
9.2 <i>Přístroje</i>	47
10 postup práce	49
10.1 <i>Příprava vodných disperzí CAS a CNC</i>	49

10.2	<i>Příprava olejové fáze s kurkuminem</i>	49
10.2.1	UV-VIS spektrofotometrie pro stanovení koncentrace kurkuminu v oleji.....	49
10.3	<i>Příprava emulzí</i>	50
10.3.1	Pickeringovy emulze s přidavkem kryoprotektantů	51
10.4	<i>Charakterizace emulzí</i>	52
10.4.1	Velikost a distribuce emulzních kapek	52
10.4.2	Mikrostruktura emulzí	52
10.5	<i>Příprava a charakterizace lyofilizátů</i>	53
10.5.1	Lyofilizace emulzí	53
10.5.2	Mikrostruktura lyofilizátu.....	53
10.5.3	Rekonstituce.....	53
10.6	<i>Stanovení uvolňování kurkuminu z lyofilizátu</i>	54
10.6.1	UV-VIS spektrofotometrie pro stanovení koncentrace kurkuminu v médiu.....	54
10.6.2	Stanovení množství uvolněného kurkuminu z lyofilizátů	55
11	Výsledky a diskuze	56
11.1	<i>Charakterizace olejové fáze s obsahem kurkuminu</i>	56
11.2	<i>Charakterizace emulzí</i>	56
11.2.1	Vizuální hodnocení emulzí stabilizovaných systémem CAS/CNC s přidavkem kryoprotektantů.....	56
11.2.2	Měření velikosti a distribuce částic	58
11.2.3	Popis mikrostruktury.....	62
11.3	<i>Charakterizace lyofilizátů</i>	64
11.3.1	Vizuální hodnocení lyofilizátů.....	64
11.3.2	Mikrostruktura lyofilizátů.....	67
11.3.3	Rekonstituce.....	68
11.4	<i>Uvolňování kurkuminu</i>	68
	Závěr	72
	Seznam použité literatury	74
	Seznam použitých symbolů a zkratk	85
	Seznam obrázků	86
	Seznam tabulek	88

ÚVOD

Aktivní látky používané v kosmetickém či farmaceutickém průmyslu jsou takové, které mají pozitivní účinek na pokožku či jiný orgán lidského těla. Některé z aktivních látek však mohou být nestabilní, mohou podléhat oxidaci a degradaci, či špatně pronikají pokožkou. Z důvodu zabránění nebo zlepšení těchto nežádoucích vlastností se využívá jejich enkapsulace, kdy dochází k obalení aktivní látky sekundárním materiálem. Proces enkapsulace může probíhat různými mechanismy závislými na aplikaci konečného produktu či použitých materiálech.

Jednou z možností je enkapsulovat aktivní látky do emulzních systémů, které je využito i v této diplomové práci. Emulze jsou systémy, ve kterých dochází ke smíchání dvou vzájemně nemísitelných fází. Z důvodu jejich nestability je nutná přítomnost další látky v systému, emulgátoru či stabilizátoru, kterými mohou být nízkomolekulární povrchově aktivní látky, biopolymery nebo pevné částice. Emulze stabilizované pevnými částicemi se nazývají Pickeringovy emulze a tyto částice zde nemusí mít pouze stabilizační účinek, ale mají také schopnost chránit aktivní látku. V diplomové práci jsou Pickeringovy emulze lyofilizovány, což dále přispívá k ochraně a stabilizaci enkapsulované aktivní látky. Podstatou lyofilizace je vakuová sublimace, při které dochází k odstranění vody z emulzí. Nejen že je díky lyofilizaci podpořen proces enkapsulace, ale také dochází k tvorbě produktů, které jsou bezvodé. Výhodou takových produktů – lyofilizátů – je jejich stabilita a snadné skladování. Protože je na produkt během lyofilizace vyvíjeno napětí, může tak dojít k jeho destabilizaci. Pro zabránění tohoto nechtěného jevu se k systému přidávají kryoprotektivní látky.

Experimentální část práce je zaměřena na přípravu Pickeringových emulzí stabilizovaných částicemi nanokrystalické celulózy a kaseinátem sodným, olejová fáze tohoto systému nese aktivní látku – kurkumin. Do formulace jsou také přidány kryoprotektivní látky (D-mannitol, D-glukóza a sacharóza) a je sledován jejich vliv jak na vlastnosti emulzí, tak lyofilizátů. U takto připravených emulzí je zkoumána velikost emulzních kapek a mikrostruktura, po lyofilizaci je získaný lyofilizát sledován vizuálně i mikroskopicky, a rovněž byla studována schopnost lyofilizátu uvolňovat enkapsulovanou aktivní látku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 EMULZE

Emulze jsou systémy, které jsou často využívány v mnoha průmyslových odvětvích již řadu let. Emulze je definována jako systém dvou vzájemně nemísitelných (či omezeně mísitelných) kapalných fází dispergovaných jedna v druhé. Emulze je tedy tvořena disperzním prostředím a v něm dispergovanou látkou. Díky tomu často slouží jako nosné vehikulum pro aktivní látky s vodným nebo olejovým základem, a proto mají největší potenciál využití ve farmacii či kosmetické oblasti. Například u dermatologických přípravků mohou emulze v závislosti na jejich typu a složení vykazovat hydratační, emolientní či okluzivní vlastnosti a přispívat tak k lepšímu terapeutickému efektu. Farmaceutické využití emulzí spočívá také v jejich schopnosti maskovat zápach či nepříjemnou chuť léčiva. V kosmetické oblasti jsou ve formě emulzí produkty skin care péče jako například hydratační pleťové krémy, odličovací mléka nebo čistící emulze. S emulzemi se také často můžeme setkat u kosmetiky dekorativní v rámci make-upů a korektorů (Schramm, 2006; McClements, 2016).

1.1 Vlastnosti emulzí

Obecné vlastnosti, klasifikace a příprava emulzí byly popsány již nesčetněkrát v dřívějších publikacích, proto je tato kapitola zaměřena především na stručnou charakterizaci základních vlastností emulzí jako je polarita, velikost částic a stabilita.

1.1.1 Polarita emulzí

Nemísitelnost kapalin v emulzi je dána rozdílnou polaritou fází. Pokud je polarita disperzního prostředí vyšší než polarita dispergované látky, pak se jedná o přímou emulzi. Disperzní prostředí je zde tvořeno vodnou fází a dispergovanou látku představuje olejová fáze. Tento typ emulze se označuje jako emulze olej ve vodě (O/V) – kapky oleje jsou dispergované ve vodě. Naopak v případě, kdy je disperzní prostředí nepolární a dispergovaná látka polárnější, jedná se o obrácenou emulzi voda v oleji (V/O) – kapky vody jsou dispergované v oleji (Bouyer et al., 2012). Zda se jedná o emulzi přímou nebo obrácenou lze zjistit např. podle schopnosti rozpouštět polární/nepolární barviva, podle její elektrické vodivosti (emulze O/V jsou vodivější než emulze V/O), nebo podle smáčivosti (emulze O/V smáčí hydrofilní povrchy, zatímco V/O ne) (Bartovská & Šišková, 2005).

V praxi se lze setkat i s tzv. dvojitými emulzemi, jako jsou O/V/O nebo V/O/V. U druhého příkladu V/O/V, jde o emulzi, kde jsou kapky vody dispergované v olejových kapkách a ty jsou dále dispergované v disperzní vodné fázi (Garti & Bisperink, 1998).

1.1.2 Velikost emulzních kapek

Vedle polarity je velmi důležité znát velikost dispergovaných částic. Dle této velikosti se emulze rozdělují do tří skupin – makroemulze, mikroemulze a nanoemulze, které se od sebe zásadně liší ve fyzikálních a chemických vlastnostech.

- Makroemulze – jsou mléčně zbarvené systémy s velikostí částic od 100–1000 nm. Mléčné zbarvení se odvíjí od vlnové délky světla dopadajícího na tyto částice. Kineticky jsou stabilní, avšak termodynamicky nestabilní právě z důvodu velkého rozměru částic. Pro vznik makroemulzí postačí promíchání fází, nicméně dochází k opětovné agregaci částic kvůli zmiňované nestabilitě.
- Mikroemulze – jsou transparentní a lehce opalescentní emulze. Velikost dispergovaných částic se pohybuje v rozmezí 10–100 nm, nejčastěji 10–50 nm. Mikroemulze jsou jak kineticky, tak i termodynamicky stabilní. Mikroemulze vznikají samovolně po přidání vhodného stabilizátoru k fázím. Vzhledem k jejich stabilitě jsou hojně využívány v kosmetickém průmyslu.
- Nanoemulze – představují transparentní systém s velikostí částic 50–200 nm. Stejně jako makroemulze jsou nanoemulze pouze kineticky stabilní. Pro zvýšení termodynamické stability je potřeba přidat k fázím poměrně velké množství stabilizátoru. Na rozdíl od mikroemulzí je potřeba při vzniku nanoemulzí působit smykovým napětím (McClements, 2012).

1.1.3 Stabilita emulzí

Jak již bylo zmíněno v přechozím odstavci, emulze jsou obecně termodynamicky nestabilní systémy. Termodynamická stabilita značí pravděpodobnost, při které dochází k destabilizaci emulze. Vedle toho kinetická stabilita určuje rychlost tohoto jevu (Binks, 1998). Stabilita emulzí je podmíněna řadou fyzikálně-chemických činitelů, mezi které patří například velikost částic a jejich distribuce v emulzi; rozdíl hustot mezi fázemi; van der Waalovy síly mezi částicemi (Tadros, 2009). Velmi často je nestabilita emulzí zapříčiněna poklesem volné Gibbsovy energie z důvodu změny povrchového napětí na mezifázovém rozhraní (McClements, 2016). Dalším z častých důvodů nestability emulzí je působení gravitační síly. Všechny tyto faktory vedou k rozpadu emulzí zpět na vodnou a olejovou

fázi. Základní mechanismy, kterými k rozpadu dochází jsou sedimentace a krémování, koalescence, flokulace, Ostwaldovo zrání a fázová inverze (Bartovská & Šišková, 2005). Právě termodynamická nestabilita, která může vést až k rozpadu emulze, je hlavní výzvou při formulaci a přípravě stabilních systémů. Termodynamická stabilita emulze může být zvýšena přidáním emulgátoru, který přispívá ke vzniku a stabilizaci systému.

1.2 Stabilizace emulzí

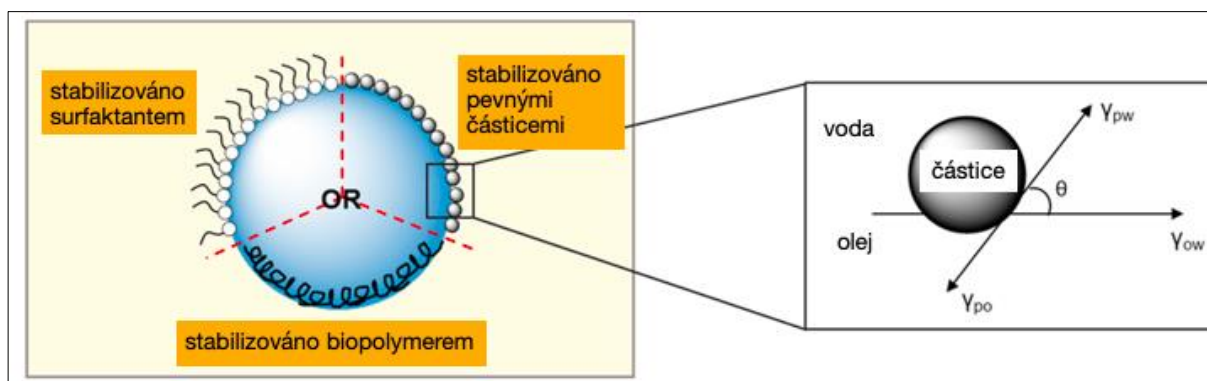
Hlavním úkolem emulgátoru je zajištění kinetické stability emulze a zabránění jejímu rozpadu na jednotlivé fáze. Emulgátor je většinou povrchově aktivní látka, která brání nově vzniklým kapkám opětovné agregaci. Obecně působí molekuly emulgátoru tak, že se velmi rychle adsorbují na mezifázové rozhraní olejové a vodné fáze už během procesu emulgace, čímž vytváří ochrannou bariéru, snižují mezifázové napětí (díky hydrofobní a hydrofilní části molekuly), a chrání tak nově vzniklé emulzní kapky před jejich opětovným slučováním. Emulgátor se může vyskytovat v různých formách, ať už jako povrchově aktivní látka (PAL) o nízké molekulové hmotnosti, nebo jako přírodní makromolekula, ale také jako pevná částice (Vaclavik & Christian, 2008). Látka označovaná jako stabilizátor se k emulzi přidává z důvodu zvýšení viskozity disperzní fáze, což způsobuje snížení rychlosti agregace kapek a jejich následné sedimentace či krémování (Borreani et.al, 2019).

Z výše popsaného vyplývá, že existuje více možností a také více typů látek (schematicky znázorněno na Obrázku 1), kterými lze stabilizovat emulze. V současné době se využívá především stabilizace pomocí:

- a. Nízkomolekulárních PAL, tzv. surfaktantů, jako je např. lecitin, sorbitan monooleát, polyglycerol-polyricin-oleát;
- b. biopolymerů, jako jsou polysacharidy a proteiny (kasein, β -laktoglobulin, želatina, xantan)
- c. pevných nerozpustných částic, např. silika, latex, modifikované částice celulózy, polyfenolové krystaly.

V závislosti na tom, jaká stabilizační látka je použita, jsou emulze stabilizovány rozdílnými mechanismy. Při aplikaci PAL dochází ke stabilizaci pomocí snížení povrchové energie na rozmezí fází. Polymery mají obrovský potenciál díky tomu, že působí mnoha mechanismy. Mezi ně patří snížení napětí na mezifázovém rozhraní, indukce elektrostatické a sterické stabilizace, a změna viskozity. Pevné částice působí tak, že se adsorbují na

rozhraní a vytvářejí fyzikální bariéru, čímž chrání emulzní kapky před agregací či koalescencí (Lam & Nickerson, 2013).



Obrázek 1 Vlevo – Schematické znázornění emulzní částice V/O a její stabilizace surfaktantem/biopolymerem/pevnými částicemi. Vpravo – Znázornění kontaktního úhlu mezi třemi fázemi (částice-olej/částice-voda/olej-voda) souvisejícího s povrchovou volnou energií (Zembyla et.al, 2020).

1.2.1 Stabilizace nízkomolekulárními surfaktanty

Stabilizace pomocí PAL probíhá na fázovém rozhraní, kde dochází k adsorpci surfaktantu. Díky amfipatické struktuře je jeho hydrofilní část přitahována k polární fázi a hydrofobní se spojuje s nepolární fází. Obecně hydrofilní část molekuly tvoří polární funkční skupina a hydrofobní část je složena z uhlovodíkového řetězce (Binks, 1998).

Adsorpci surfaktantu na fázovém rozhraní dochází k oslabování mezimolekulových interakcí a klesá tak povrchové napětí. Pravidlem je, že povrchové napětí surfaktantu je vždy menší než povrchové napětí disperzní fáze a hodnota polarit se nachází mezi hodnotami polarit obou fází. Tímto je zajištěno promíchání obou fází, tedy vznik emulze i její stabilizace (Bartovská & Šišková, 2005).

Ačkoliv je použití PAL z funkčního hlediska úspěšné, v kosmetické praxi se často naráží na problém, kdy právě obsah surfaktantů v emulzích způsobuje kožní iritace. Proto je výzkum v posledních letech zaměřen jiným „šetrnějším“ směrem, kdy se využívají ke stabilizaci například biopolymery a jiné látky.

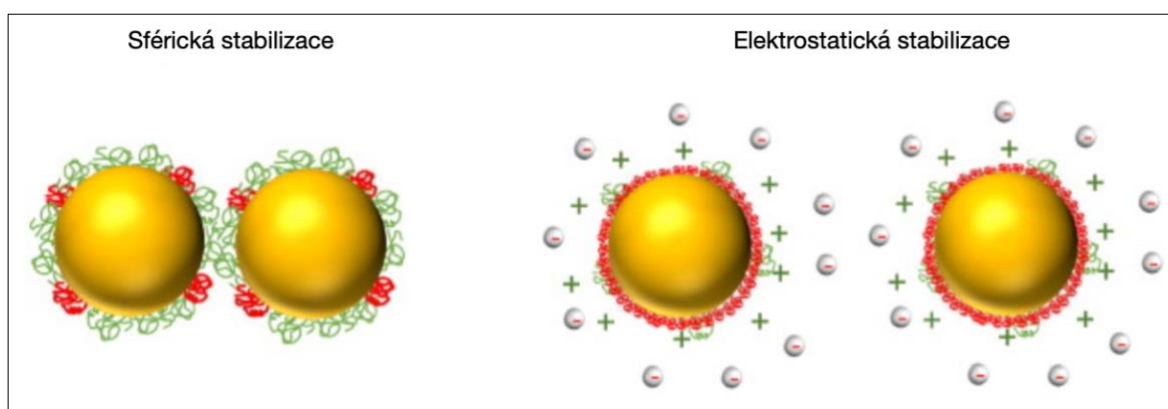
1.2.2 Elektrostatická stabilizace

Stabilizace emulzí elektrickou dvojvrstvou neboli elektrostatická stabilizace (Obrázek 2) má základy v repulsních silách, které vznikají mezi nabitými molekulami. Elektrický náboj molekul ovlivňuje jejich vzájemné interakce, protože určuje velikost elektrostatického odpuzování mezi nimi. Pokud je náboj molekul/kapek dostatečně velký,

pak je emulze stabilní vůči agregaci kapek, jelikož jsou elektrostatické odpudivé síly dostatečně velké na to, aby nedocházelo k přibližování těchto kapek (McClements, 2005).

To je i případ emulzí stabilizovaných některými biopolymery, především proteiny. Schopnost proteinů adsorbovat se na povrch kapek je dána jejich povrchovou aktivitou (jejich struktura se skládá z hydrofilních i lipofilních oblastí), navíc proteiny nesou v závislosti na pH kladný nebo záporný náboj, čímž po adsorpci proteinu na povrch kapky dochází ke vzájemnému odpuzování kapek s adsorbovaným proteinem, čímž je zabráněno agregaci kapek. Přesněji řečeno, u takto stabilizované emulze se na fázovém rozhraní vytváří nabitá vrstva, která vede jak k elektrostatické repulzi mezi sousedními molekulami proteinů uvnitř naadsorbované vrstvy, tak mezi sousedními emulzními kapkami. Stabilizace tímto způsobem se využívá u emulzí O/V, zředěných emulzí a hydrosolů. Důvodem je menší počet kolizí kapek v emulzi (Bartovská & Šišková, 2005; McClements, 2016).

To, zda zůstane systém stabilizován a jestli nedojde k rozpadu elektrické dvojvrstvy, závisí také iontové síle roztoku, typu rozpouštědla a hustotě povrchového náboje. S rostoucí hustotou povrchového náboje a zároveň snižující se iontovou silou roztoku jsou odpudivé interakce silnější, tím pádem dochází k silnější elektrostatické stabilizaci. Na druhou stranu lze říct, že vyšší iontová síla způsobuje snížení tloušťky elektrické dvojvrstvy. Celkově velmi záleží na velikosti náboje částice a na samotné tloušťce elektrické vrstvy – čím silnější dvojvrstva je, tím jsou větší odpudivé interakce (McClements, 2016).



Obrázek 2 Grafické znázornění stérické stabilizace vs. elektrostatické stabilizace (McClements & Jafari, 2018).

1.2.3 Stérická stabilizace

Stabilizace stérickou bariérou (Obrázek 2) je zajištěna díky látkám, které jsou schopny adsorpce na povrch emulzních kapek v disperzní fázi a zároveň jsou rozpustné v disperzním prostředí. Stérická stabilizace nastává při nízké koncentraci proteinu, nebo pokud je emulze stabilizována nenabitými polysacharidy. Stabilita emulze je dána stérickým

odpuzováním mezi naadsorbovanými vrstvami molekul na povrchu dvou kapek. Při přibližování dvou emulzních kapek s naadsorbovanými makromolekulami dochází k více kontaktům mezi jejich segmenty. V této chvíli záleží na afinitě makromolekul k disperznímu prostředí (tj. rozpouštědlu). V případě, kdy je disperzní prostředí vhodným rozpouštědlem pro makromolekuly, vznikají vazby právě mezi nimi a nedochází k přibližování částic a případné koagulaci. Avšak v případě, kdy disperzní prostředí nepředstavuje dobré rozpouštědlo pro makromolekuly, jsou vazby utvářeny mezi nimi samotnými, což má za následek přibližování emulzních kapek (Bartovská, 2016).

Při stérické a elektrostatické stabilizaci biopolymery může dojít k destabilizaci emulze depleční nebo můstkovou flokulací. Můstková flokulace může nastat v případě, kdy se jedna molekula stabilizující látky naadsorbuje na více kapek zároveň a tím dochází k jejich flokulaci. Tento typ flokulace nastává při nízké koncentraci stabilizujícího polysacharidu. Depleční flokulace je jev, při kterém stabilizační biopolymer nedokáže obklopit emulzní kapku v místě styku dvou sousedních kapek. Z tohoto prostoru je biopolymer vytlačován, mezi emulzními kapkami je pouze disperzní prostředí a začínají se uplatňovat van der Waalsovy síly. Emulzní kapky jsou k sobě přitahovány a nastává flokulace. (McClements, 2015; Bartovská, 2016, Bouyer et al., 2012).

2 BIOPOLYMERY A STABILIZACE EMULZÍ

Emulzní systémy lze kromě klasických surfaktantů stabilizovat i biopolymery, jako jsou například proteiny a polysacharidy. V posledních letech existuje snaha omezit či nahradit emulze stabilizované pomocí PAL, a to zejména proto, že některé používané surfaktanty způsobují kožní iritace a následné alergické reakce. Z tohoto důvodu se stále více výzkumů zaměřuje na stabilizaci emulzních systémů biopolymery, přičemž je jejich použití také v souladu se stále více populárním šetrnějším způsobem života. Schopnost stabilizovat emulze a zlepšit jejich reologické vlastnosti vykazují jak polysacharidy, tak i proteiny. Proteiny mají ve své struktuře hydrofilní i hydrofobní oblasti, proto jsou povrchově aktivní a mohou adsorbovat na mezifázové rozhraní emulzních systémů. Naproti tomu pouze malé množství polysacharidů má ve své molekule i nepolární řetězec. Proto často působí polysacharidy jako zahušťovadla a zvyšují viskozitu dispergované fáze. Některé z nich ve své hydrofilní oblasti obsahují bílkovinnou „nečistotu“, která má za následek jejich povrchovou aktivitu (Bouyer et al., 2012; McClements, 2015).

Při stabilizaci emulze může být biopolymer navázán na emulzní kapku dvěma možnými způsoby v závislosti na tom, zda je povrchově aktivní (tedy většina proteinů) nebo není povrchově aktivní (většina polysacharidů). Na mezifázovém rozhraní dochází buď k:

- adsorpci biopolymeru přímo v průběhu emulgace a stabilizace, nebo
- interakci s jinou povrchově aktivní látkou nebo jiným biopolymerem již přítomným na fázovém rozhraní (Dickinson, 2010).

Nevýhoda použití biopolymerů jako stabilizátorů emulzí je jejich větší citlivost na změny prostředí než při použití PAL. U emulzí, které jsou stabilizované proteinem, je potřeba brát v potaz možné změny pH, iontové síly a teploty. Emulzní kapky obklopené proteinem jsou chráněné před flokulací elektrostatickým odpuzováním, a proto je velmi důležité sledovat hodnotu blízkou izoelektrickému bodu (pI - tj. hodnotu pH, při které se protein nepohybuje v elektrickém poli a jeho volný náboj je nulový) adsorbovaného proteinu kvůli možné agregaci. Tomuto problému lze předejít přidáním nabitého polysacharidu jako je pektin, alginát, karboxymethylcelulóza aj. Nabité skupiny polysacharidu jsou vázány k opačně nabitým skupinám na adsorbovaném proteinu elektrostatickou přitažlivostí. Na mezifázovém rozhraní tak vzniká polysacharid-proteinová vrstva, která zvyšuje elektrostatické i sterické síly mezi kapkami a současně jsou snižovány van der Waalsovy síly. Tím je zvýšena stabilita emulze. Vznikající mezifázový komplex polysacharid-protein

musí být volen s rozvahou tak, aby nedocházelo k můstkové nebo depleční flokulaci (Ozturk & McClements, 2016; Evans et al, 2013).

2.1 Proteiny

Jak bylo zmíněno výše, proteiny jsou povrchově aktivní z důvodu, že obsahují hydrofilní a hydrofobní oblasti. Tyto oblasti tvoří různé aminokyselinové zbytky polypeptidového řetězce (Lam & Nickerson, 2013). Díky tomu je umožněna adsorpce proteinů na mezifázové rozhraní, kde snižují mezifázové napětí a zpomalují koalescenci olejových kapek tím, že kolem nich vytvoří ochrannou membránu v průběhu homogenizace. Proteiny působí proti agregaci také elektrostatickými silami způsobenými aminokyselinami, které obsahují negativně nabitě skupiny (COO⁻) a pozitivně nabitě skupiny (NH₃⁺). Další možností stabilizace emulzí je pomocí stérických sil, kdy protein vytváří na mezifázovém rozhraní silnou vrstvu nebo je k němu přidán polysacharid a vzniká tak stabilizující spojení protein-polysacharid (Dickinson, 2010; McClements 2004).

Proces adsorpce proteinu na mezifázové rozhraní zahrnuje tři hlavní kroky: difúze na rozhraní, adsorpce a reorganizace proteinu (McClements, 2004). Po adsorpci na mezifázové rozhraní je protein v kontaktu s molekulami vody z jedné strany a molekulami oleje na druhé straně. Na mezifázovém rozhraní proto dochází ke konformačním změnám tak, aby nastalo co nejvíce požadovaných interakcí a zároveň aby byl minimalizován počet nepříznivých interakcí. Čas potřebný pro změnu konformace je závislý na flexibilitě proteinu. Více flexibilní proteiny, jako je například kasein, procházejí konformačními změnami poměrně rychle, zatímco rigidní globulární proteiny (např. β -lactoglobulin) potřebují delší čas. Jev, kdy dochází ke změně konformace proteinu při adsorpci na mezifázovém rozhraní se nazývá povrchová denaturace (Feer et al., 2004). U globulárních proteinů je rozsah konformačních změn závislý na povaze olejové fáze. Bylo zjištěno, že větší konformační změny byly způsobeny u více nepolárních olejů. Důvodem mohla být silnější hydrofobní síla, která způsobovala rozplétání proteinu. Pokud se kapky emulze nacházejí v těsné blízkosti (např. při pH v okolí pI proteinu nebo kvůli vysoké iontové síle) může povrchová denaturace ještě umocnit flokulaci kapek hydrofobní přitažlivostí a tvorbou disulfidové vazby mezi adsorbovaným proteinem a kapkami. Avšak pokud je zabráněno kapkám být v těsné blízkosti (díky pH vzdálené od hodnoty pI proteinu nebo nízké iontové síle), tak vzniká mezifázová ochranná bariéra, která velice účinně zabraňuje koalescenci emulzních kapek (Rampon et al., 2004).

Proteiny stabilizující emulze musí mít funkční vlastnosti v produktech, které mají širokou škálu hodnot pH a iontové síly. Takto stabilizované emulze jsou však na tyto hodnoty velmi citlivé. Proto bylo vyvinuto několik strategií, které vedou ke zlepšení stability a zabránění možné flokulace vlivem pH a iontové síly:

- a. přidání ionického surfaktantu – způsobí změnu závislosti pH na ζ -potenciálu u kapek. Tím je změněn rozsah hodnot pH, při kterých je emulze stabilní (Kelley & McClements, 2003).
- b. přidání elektricky nabitých biopolymerů a jejich adsorpce na povrch opačně nabitých kapek – způsobí změnu závislosti pH na ζ -potenciálu, čímž se změní rozsah hodnot pH, při kterých je emulze stabilní (Dickinson, 2003).

Mezi proteiny, které jsou vhodné pro stabilizaci emulzí se řadí například syrovátkový protein, kasein, ovalbumin, sójový a hovězí sérový protein (Lam & Nickerson, 2013). Jelikož byl pro praktickou část této diplomové práce zvolen protein kaseinát sodný, budou kaseináty podrobněji popsány v následující podkapitole.

2.1.1 Kaseináty

Kaseiny jsou primárním proteinem v savčím mléce, kde tvoří cca 80 % všech mléčných bílkovin. Kaseiny mají heterogenní kvartérní strukturu a skládají se ze směsi čtyř hlavních proteinů: α_{s1} -, α_{s2} -, β - a κ -kasein. Monomerní formy dosahují poměrně nízkých molekulových hmotností od 15 do 26 kDa, avšak v přírodě se vyskytují jako heterogenní komplexy – micely. Nejčastěji tvoří micely společně s fosfátem vápenatým. Více než tři čtvrtiny celkového proteinu jsou tvořeny α_{s1} -kaseinem a β -kaseinem, které jsou nejvíce povrchově aktivní, a tak přispívají nejvíce k emulgačním schopnostem kaseinu, popř. kaseinátu sodného (CAS), který se používá ke stabilizaci emulzí díky jeho rozpustnosti ve vodném prostředí (McClements, 2015). Kaseinát sodný je surovina, která je vyráběna z kaseinu neutralizací pomocí NaOH.

Kaseiny mají nepravidelnou strukturu a jsou v podstatě hydrofobní. Díky těmto vlastnostem dokážou rychleji adsorbovat na mezifázové rozhraní, tím vytvářejí mezifázovou ochrannou vrstvu a kapky chrání před agregací. Schopnost emulgace CAS je ovlivněna jak jeho koncentrací, tak i pH vodné fáze a typu olejové fáze. Bylo zjištěno, že při dostatečné koncentraci CAS je velikost kapek oleje menší, což způsobuje lepší stabilitu emulze (Amine et al., 2014). Nevýhodou použití CAS je jeho koagulace při hodnotách pH 4,5 – 5,3, které jsou blízké jeho pI \sim 4,6. V tomto rozmezí se vytváří mezi molekulami CAS koagulační síť a emulgační schopnost zaniká. Stabilitu CAS je možné zlepšit např. přidáním sacharidu. Při

výzkumech bylo zjištěno, že vzájemné působení molekul proteinu a sacharidu (konkrétně disacharidu trehalózy) na fázovém rozhraní snižuje možnou flokulaci kapek emulze tím, že je potlačena agregace proteinu působením právě trehalózy (Huck-Iriart et al., 2016).

Další vlastností, pro kterou je CAS využíván, je schopnost enkapsulace aktivních látek. Emulze, které jsou stabilizované pomocí CAS dosahují výborných výsledků při měření fyzikální a oxidační stability. Nespornou výhodou použití CAS je vysoký obsah potenciálně antioxidačních aminokyselin. Kupříkladu obsah fenylalaninu je 2-3x vyšší v porovnání s pšeničným proteinovým izolátem nebo sójovým proteinovým izolátem (Hu et al., 2003).

2.2 Polysacharidy

Polysacharidy patří mezi přírodní polymery skládající se z více než 10 (většinou ale stovek nebo tisíců) monosacharidových jednotek, které jsou spojeny glykosidickou vazbou. Molekuly polysacharidů jsou poměrně velké – obvykle 100 až 1000 kDa. Polysacharidy jsou snadno dostupné, netoxické, biokompatibilní a oproti proteinům stabilní v širokém rozmezí pH a teplot. Díky své vysoké molekulové hmotnosti a hydrofilní povaze mají schopnost zadržovat vodu a zvyšovat viskozitu roztoku. Ve většině případech nemají polysacharidy emulgační vlastnosti a nemohou samy o sobě adsorbovat na mezifázové rozhraní. Jejich přidání do emulzí způsobuje již zmíněné zvýšení viskozity vodné fáze (které může vést až ke gelaci), čímž dochází ke zpomalování pohybu kapek, a tedy ke stabilizaci emulzí. Některé polysacharidy na sebe mohou vázat části proteinů nebo lipidů, a proto mohou být také povrchově aktivní. Existují však i polysacharidy, které kromě polární skupiny obsahují i nepolární řetězec a jejich amfifilní povaha jim umožní adsorbovat se na mezifázové rozhraní. Velikost molekul způsobuje relativně pomalou adsorpci a také vytvoření silné ochranné vrstvy na mezifázovém rozhraní. K takovým polysacharidům patří např. modifikovaný škrob, africká guma nebo deriváty celulózy (McClements & Gumus, 2016; Bouyer et al., 2012).

Stabilizace emulzí je v podstatě stejná jako u proteinů. Polysacharidy mohou adsorbovat na povrch olejových kapek a vytvářet tak ochranou vrstvu a také mohou působit pomocí elektrostatických a stérických sil, čímž zabraňují koalescenci a flokulaci kapek (McClements & Gumus, 2016).

2.2.1 Celulóza

Celulóza patří k nejrozšířenějším přírodním sacharidům na světě. Jedná se o polysacharid, který se vyskytuje v buněčných stěnách rostlinných buněk a lze ji nalézt i

v buňkách pláštěnců. Vzhledem k výskytu celulózy jsou jejím primárním zdrojem rostliny, konkrétně lýko, které obsahuje až 80 % tohoto biopolymeru. S rozvojem biotechnologií v posledních letech je celulóza získávána pomocí vhodných mikroorganismů.

Základní jednotkou celulózy jsou dvě molekuly D-glukózy, které jsou spojeny $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou, vzniká disacharid celobióza, což je základní opakující se jednotka celulózy, dvě jednotky celobiózy jsou v nerozvětveném lineárním řetězci vůči sobě o 180° otočeny. Protože je celulóza biopolymer nemá pevně daný stupeň polymerace a jednotlivé makromolekuly celulózy se od sebe mohou lišit v molekulové hmotnosti. Při vzniku celulózy vznikají v prvním stupni vlákna označována jako fibrily. Ty jsou poté organizovány do vyšších struktur – mikrofibril, ve kterých se rozlišují amorfni a krystalické oblasti. Při úpravě dochází k odstranění amorfni oblastí tzv. kyselou hydrolyzou za použití např. kyseliny chlorovodíkové a vzniká mikrokrystalická celulóza. Pro své dobré fyzikální vlastnosti (chemicky netečná, biodegradabilní, bez zápachu a chuti) je velmi oblíbenou surovinou ve farmacii, kde slouží jako plnivo při výrobě léčiv. Mikrokrystalická celulóza nachází své využití také jako vehikulum pro aromatické látky a oleje. V neposlední řadě je využívána jako emulgátor u emulzí O/V. Útvary vznikající z mikrofibril jsou makrofibrily, které je možno pozorovat světelným mikroskopem (Nechyporchuk et al., 2016; Wüstenberg, 2014).

Zmíněná kyselá hydrolyza je jedním z procesů, při kterých vznikají nanočástice celulózy. Tak jsou označovány částice, u kterých je alespoň jeden rozměr ve velikosti nanometru. Podle rozdílných vlastností jsou nanočástice celulózy dále děleny na mikrofibrilární celulózu (MFC), celulóзовé nanokrystaly (CNC) a bakteriální nanocelulózu (BNC) (Klemm et al., 2011).

Využití celulózy a jejich částic, jakožto stabilizátorů emulzí, je intenzivněji zkoumáno posledních 10 let. V roce 2015 byla provedena studie, při které byla celulóza modifikována kyselinou fosforečnou na amorfni celulózu. Tato amorfni celulóza byla následně přidána k emulzím typu O/V. Amorfni celulóza adsorbovala na povrch olejových kapek a při hmotnostní koncentraci od 0,83 % byly takové emulze stabilní po několik měsíců (Jia *et al.*, 2015). Další studie využívala pro zkoumání emulzí na bázi celulózy metody difúzní vlnové spektroskopie a kryo-skenovací elektronovou mikroskopii. Výsledky ukázaly, že celulóza byla adsorbována na mezifázové rozhraní a chránila emulzní kapky před koalescencí. Neadsorbovaná celulóza se nacházela v disperzní fázi a přispívala ke zvýšení viskozity, a tedy ke zlepšení stability emulze (Costa *et al.*, 2021).

3 PICKERINGOVY EMULZE A STABILIZACE EMULZÍ PEVNÝMI ČÁSTICEMI

Vedle stabilizace emulzí surfaktanty nebo biopolymery existuje i možnost stabilizace pevnými částicemi. Takto stabilizované emulze se označují jako Pickeringovy emulze. Poprvé byly studovány a popsány již na počátku 20. století pány Ramsdenem a Pickeringem (Pickering 1907; Ramsden 1904). Dlouhou dobu byly opomíjeny, avšak v posledních dekádách se jim věnuje větší pozornost. Stabilizace pomocí PAL se stále ve velké míře využívá například v potravinářství, barvířství nebo při úpravách vody. Jejich použití ve výrobcích osobní hygieny nebo ve velkém měřítku v průmyslových aplikacích není ale nákladově efektivní a také může v určitých případech způsobit nepříznivé účinky jako je iritace kůže či alergická reakce. Z tohoto důvodu mohou být koloidní částice vhodnou alternativou k PAL.

3.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti Pickeringových emulzí

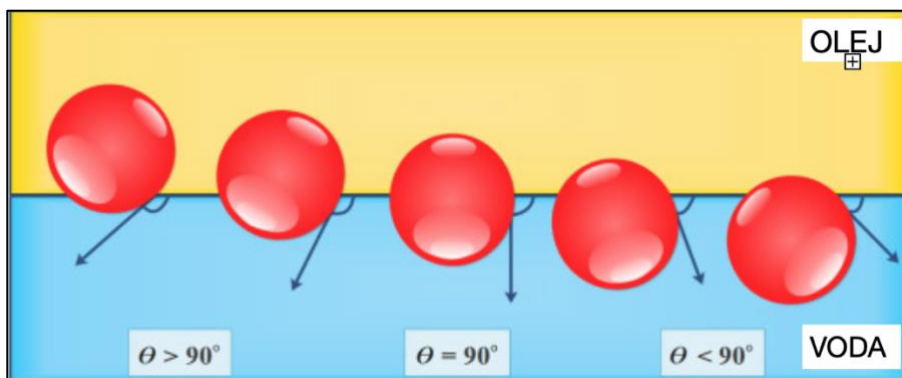
Částice používané pro stabilizaci emulzí bývají menších rozměrů než emulzní kapky, proto se mohou při stabilizaci adsorbovat na povrch těchto kapek. Nejčastěji se používají částice do velikosti 200 μm . Jedna z hlavních výhod použití pevných částic jako stabilizátorů emulzí je velká odolnost emulzních kapek vůči koalescenci. Při dostatečně vysoké koncentraci stabilizujících částic je vytvořena stérická bariéra, která koalescenci emulzních kapek zabraňuje. Oproti surfaktantům nedochází u částic ke shlukování a následné agregaci (Binks, 2002). Velkou výhodou použití pevných částic jako stabilizátorů emulzí je fakt, že mají velmi nízkou toxicitu, či vůbec žádnou. Díky těmto vlastnostem se Pickeringovy emulze využívají například pro enkapsulaci aktivních látek, proteinů a enzymů ale také při mikroenkapsulaci, řízeném uvolňování léčiv nebo bifázové katalýze. Pevné částice nepůsobí pouze jako stabilizátory emulzí, ale mohou jim dodávat řadu dalších funkcí, jako je ochrana proti oxidaci, ochrana proti UV záření nebo jim dokonce dodávají elektromagnetické vlastnosti (Yang et al., 2017).

Pickeringovy emulze jsou velmi stabilní díky téměř ireverzibilní adsorpci částic na mezifázové rozhraní (Binks & Lumsdon, 2000). V těchto emulzích nemají pevné částice amfifilní charakter, stabilizace probíhá díky částečné smáčivosti jejich povrchu vodou nebo olejem (Chevalier & Bolzinger, 2013). Je důležité znát hodnotu tzv. úhlu smáčivosti θ , který vyjadřuje afinitu pevné částice k dané fázi. Úhel smáčivosti je definován pomocí Youngovy rovnice:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{\text{co}} - \gamma_{\text{cv}}}{\gamma_{\text{ov}}},$$

kde: γ_{co} – hodnota mezifázového napětí mezi pevnou částicí a olejovou fází,
 γ_{cv} – hodnota mezifázového napětí mezi pevnou částicí a vodnou fází,
 γ_{ov} – hodnota mezifázového napětí mezi olejem a vodou (Binks & Lumsdon, 2000).

Úhel smáčivosti, jak je znázorněno na Obrázku 3 vyjadřuje úhel smáčení mezi všemi třemi fázemi, a to voda-emulgátor-olej, a je přímo spojen s typem stabilizované emulze (zda se jedná o emulzi typu O/V, V/O nebo emulzi vícenásobnou). Pokud je hodnota $\theta < 90^\circ$, větší část částice je ponořena do vodné fáze. Částice je tedy hydrofilní a může stabilizovat emulze O/V. V případě hodnoty $\theta > 90^\circ$ je stabilizována emulze typu V/O. Pro dosažení co nejlepší stabilizace by měla být hodnota θ velmi blízko 90° (Yang *et al.*, 2017).



Obrázek 3 Adsorpce pevných částic na mezifázové rozhraní na základě smáčivosti (Abdulah *et al.* 2020).

Schopnost pevných částic stabilizovat emulze závisí především na jejich smáčivosti a morfologii. Vedle toho jsou ale důležité vlastnosti jako koncentrace částic, typ oleje, objemový poměr fází nebo například samotný postup během procesu emulgace.

Gelot *et al.* potvrdili v roce 1984 trend, který ukazoval, že při vyšší koncentraci pevných částic dochází k prodloužení doby, po kterou je emulze stabilní a chráněna vůči koalescenci. Při dostatečné koncentraci přechází více částic na mezifázové rozhraní a tím zlepšují stabilitu emulze (Gelot *et al.*, 1984). Další ochranou před koalescencí je při vysoké koncentraci pevných částic jejich „těsné“ pokrytí emulzích kapek souvislou vrstvou (Tamble & Sharma, 1993). Tohle ovšem neplatí vždy – existují studie, při kterých vyšší koncentrace částic vedla pouze k tomu, že v jedné fázi byl jejich přebytek (Mwangi *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2015).

Ani u pevných částic nelze opomenout důležitost pH. Změna pH může zapříčinit změnu hydrofobicity a tím i smáčivost částic s povrchovými skupinami, které mohou být ionizovány. Hao *et al.* (2018) ve své práci popsali emulzní systém závislý na pH. Jejich

emulze byla stabilizována nanočásticemi oxidu titaničitého. Při hodnotách pH 3-4 nastal rozpad emulze a nanočástice byly rozdistributedy ve vodné části. Avšak při navýšení hodnoty pH na 7-8 hydroxidem sodným došlo k opětovné tvorbě emulze (Hao *et al.*, 2018).

3.2 Typy částic používaných u Pickeringových emulzí

Pro stabilizaci Pickeringových emulzí se používají různé typy pevných částic, které se liší ve svém původu, tvaru nebo velikosti. Bylo provedeno velké množství studií využívajících jak anorganické částice (např. oxidu křemičitého, zlata, oxidu titaničitého...) tak i organické částice na základě polysacharidu nebo proteinu (např. zeinu, chitinu, kaseinu...).

3.2.1 Anorganické částice

Anorganické částice byly prvními koloidními částicemi, které byly zkoumány při přípravě a stabilizaci Pickeringových emulzí. Z důvodu jejich vysoké stability zůstávají v posledních desetiletích stále předmětem výzkumů.

Jedním z nejčastěji používaných materiálů anorganického původu jsou koloidní částice oxidu křemičitého, které jsou odolné vůči zásaditému i kyselému prostředí a snadno se upravuje jejich struktura a velikost. Dalšími využívanými částicemi jsou laponitové jíly, které byly použity v Pickeringově emulzi s vodou a toluenovou fází (Ashby & Binks, 2000).

Oblíbené jsou i částice oxidů kovů, jako např. nanočástice oxidu železnato-železitého (Fe_3O_4) a částice oxidu titaničitého (TiO_2). Nanočástice Fe_3O_4 poskytují emulzím schopnost magnetické reakce a díky nanočásticím TiO_2 jsou emulze chráněny před UV zářením a je zlepšena fotokatalytická aktivita (Xie *et al.*, 2017; Fessi *et al.*, 2019).

Částice na bázi uhlíku, jako jsou uhlíkové kvantové tečky, uhlíkové nanotrubičky a částice grafenoxidu, patří mezi vynikající materiály pro stabilizaci Pickeringových emulzí. Používají se v aplikaci při čištění vody, jako biosenzory nebo v oblastech souvisejících s elektrochemií (Zhai *et al.*, 2018; Briggs *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2018).

I přesto, že je využitelnost anorganických částic široká, ne vždy jsou tou nejlepší volbou. Řáda aplikací si žádá, aby byly pevné částice biokompatibilní a biodegradabilní. Proto jsou v těchto případech využívány organické částice, jako např. biopolymerní částice (Dickinson, 2017).

3.2.2 Biopolymerní částice

Existuje řada způsobů, jak připravit biopolymerní částice. Mezi ně patří chemické metody jako je např. denaturace proteinů, kyselá hydrolyza amorfních oblastí polymerů nebo zesíťování proteinů pomocí enzymů. Výhodou využití biopolymerních částic oproti anorganickým částicím je, že lze upravovat jejich velikost a náboj, které závisí na počáteční koncentraci biopolymeru, teplotě, pH a iontové síle. Adsorpce částic na mezifázové rozhraní závisí právě na jejich velikosti a také na objemové koncentraci (Dickinson, 2017; Yang *et al.*, 2017).

Pro přípravu a stabilizaci Pickeringových emulzí se využívají částice na bázi proteinů, polysacharidů a v menší míře také živé mikroorganismy (např. bakterie a kvasinky). Ty slouží jako stabilizátory emulzí díky jejich povrchovým vlastnostem – náboj, funkční skupiny, specifické struktury (Yang *et al.*, 2017).

Mnoho vědeckých studií je zaměřeno na využití proteinů v kosmetické oblasti, farmakologii nebo v potravinářství. Částice na bázi proteinů pocházejících ze zvířecích, rostlinných nebo mikrobiálních zdrojů jsou pro tyto oblasti velmi vhodné, jelikož se jedná o přírodní složky a jsou tedy pro lidské tělo přijatelné.

Proteiny se mohou díky jejich amfifilní povaze adsorbovat na mezifázové rozhraní a tím stabilizovat emulze – tato možnost stabilizace byla popsána v předcházející kapitole. Existuje ale i možnost stabilizace emulzí pomocí agregátů proteinů, které jsou považovány v tomto směru za pevné částice. Agregáty proteinů je možné vytvořit za pomoci změny teploty nebo pH, sonikací a desolvací (Dickinson, 2017).

I u proteinových částic platí, že pro správnou adsorpci je důležitá jejich velikost a smáčivost povrchu (Chevalier & Bolzinger, 2013). Byly provedeny studie, které dokázaly, že smáčivost zeinových koloidních nanočástic a funkční vlastnosti lze změnit modifikací jejich povrchu, například kaseinátem sodným. Například stabilizační schopnost a pokrytí povrchu byly zvýšeny změnou poměru zeinu a kaseinátu sodného z 10:1 na 10:4. Tento účinek byl přičítán skutečnosti, že kaseinát sodný je i před svou hydrofobicitou více hydrofilní než zein, takže smáčivost byla upravena pomocí změny poměrů těchto dvou proteinů (Feng & Lee, 2016).

Stabilitu Pickeringových emulzí lze také zvýšit tvorbou trojrozměrné viskoelastické sítě proteinových částic v disperzní fázi. Při takovéto stabilizaci musí být koncentrace neadsorbovaných částic v disperzní fázi dostatečně vysoká a také musí působit mezi částicemi vhodná přitažlivá síla. Tato viskoelastická síť zvyšuje stabilitu emulze tím, že

brání kapkám v olejové fázi v pohybu. Na druhou stranu, pokud je koncentrace částic až příliš vysoká, může se emulzní systém stát natolik viskózním, že jej nebude možné homogenizovat. Mezimolekulární interakce musí být také kontrolovány, pokud jsou mezi bílkovinnými částicemi silné odpudivé síly, pak nemají tendenci vzájemně agregovat. A naopak pokud budou přitažlivé síly velmi silné, pak agregují všechny částice a nejsou schopny emulzi vytvořit. Proto se při výrobě Pickeringových emulzí volí cesta, kdy proteinové částice nejprve neagregují příliš silně a až poté se mění podmínky, kterými se podpoří jejich agregace (změna pH, iontové síly, aktivita enzymu, teplota).

Polysacharidy patří mezi přírodní polymery, z nichž některé jsou nerozpustné ve vodě nebo v oleji. Kvůli tomu jsou polysacharidové částice vhodné pro stabilizaci Pickeringových emulzí. Výhodou polysacharidových částic je, že je lze snadno chemicky modifikovat (přizpůsobení hydrofobicity a náboje) a přizpůsobit tak jejich vlastnosti a chování v emulzích. Nejvíce používanými polysacharidy jsou škrob, chitosan a celulóza (Habibi, 2014).

3.2.2.1 Nanocelulózové částice

Celulózové nanočástice lze vyrábět z obnovitelných zdrojů, jako je biomasa z odpadních rostlin, dřevní buničina nebo biosyntézou pomocí bakterie *Acetobacter xylinum*. Z biomasy se průměrně během roku vyrobí až 28 miliard tun celulózy, což z ní činí nejhojnější biopolymer na zemi (Eyley & Thielemans, 2014; Klemm et al., 2005).

I když je celulóza nerozpustná ve vodě, je považována za vhodný stabilizátor Pickeringových emulzí, jelikož se nejčastěji používá celulóza v nanoměřítku s různými poměry stran. Použitou celulózu v nanoměřítku mohou být celulózové nanokrystaly (CNC), mikrofibrilovaná celulóza (MFC) nebo celulózové mikrogely, které mají rozdílné vlastnosti oproti nativní celulóze.

Vlastnosti částic celulózy lze upravit oxidací povrchu, esterifikací, kationizací nebo roubováním polymeru. Tyto změny mohou ovlivnit povrchový náboj, hustotu náboje nebo hydrofobicitu částice, což má za následek změnu vlastností Pickeringových emulzí (Habibi et al., 2010).

Je známo, že morfologie částic má velký vliv na stabilitu Pickeringových emulzí. Není tomu jinak ani u CNC, kde jejich morfologie ovlivňuje desorpční energii na mezifázovém rozhraní. Při použití tyčinkovitých CNC, které mají vysoký poměr stran a mohou vytvořit můstkové struktury na rozhraní fází, je stabilita emulzí vyšší než při použití sférických částic (Wu & Ma, 2016).

Celulózové nanokrystaly ve tvaru tyčinek mají částečně amfifilní charakter, kdy jsou okraje hydrofobní a povrch vlákna přitahuje vodu. Z tohoto důvodu CNC stabilizují v první řadě emulze typu O/V (Tarimala & Dai, 2004). Při jejich použití jako stabilizátorů se předpokládá, že budou odolné vůči změnám teplot, pH nebo po přidavku elektrolytu k emulzi z důvodu nulového povrchového náboje. U substituovaných CNC to však platit nemusí, jelikož mohou nést na svém povrchu nabitě funkční skupiny. Ve studii, kde proběhlo srovnání nesubstituovaných CNC a substituovaných CNC bylo zjištěno, že obě varianty byly schopné stabilizovat emulze bez přidavku dalších surfaktantů, ale náboj u substituovaných CNC způsobil, že byla stabilita o něco lepší (Gestranius *et al.*, 2017). Mierelles *et al.* (2020) zkoumali stabilizační mechanismus CNC v emulzi O/V se lněným olejem. Bylo zjištěno, že největší krystaly CNC se nacházely mezi olejovými kapkami, což zabraňovalo flokulaci kapek. Menší částice CNC byly adsorbovány na mezifázovém rozhraní. Stabilizace byla spojena s účinkem elektrostatického odpuzování a také se zvýšením viskozity. V téže roce byla tato studie rozšířena o další poznatky související s množstvím CNC v emulzích. Emulze s nižším podílem CNC byly kineticky stabilnější než emulze s vyšším podílem CNC, které měly po sedmidenním skladování sníženou viskozitu, což přímo souviselo s destabilizací emulze (Mierellee *et al.*, 2020).

Dle studií uvedených v posledních letech je zřejmé, že stoupá zájem o přípravu emulzí, které jsou stabilizované spíše nanočásticemi celulózy než klasickou fibrilární celulórou, či jejími rozpustnými deriváty.

4 INTERAKCE PROTEIN-POLYSACHARID NA MEZIFÁZOVÉM ROZHRAŇÍ OLEJ-VODA

Ne vždy je použití jednoho samostatného stabilizátoru při tvorbě emulzí dostatečné. Aplikace biopolymerů jako stabilizátorů emulzí může být limitována jejich vlastnostmi a s tím související nestabilitou za určitých podmínek (pH, iontová síla, změna teploty...). Je také dokázána řada rozdílů v emulgačních schopnostech jednotlivých proteinů nebo polysacharidů. Kupříkladu přidání proteinu o nízké koncentraci k emulzi je mnohem žádanější než přidání polysacharidu o nízké koncentraci z důvodu tvorby emulzních kapek o menší velikosti. Pokud je potřeba vytvořit emulzi, která bude odolnější vůči změně podmínek prostředí jako je pH, iontová síla nebo teplota, pak je účinnější použít polysacharid. Schopnost těchto stabilizátorů tvořit a stabilizovat emulze se může zlepšit, pokud budou v kombinaci s jinými stabilizátory (ať už biopolymery nebo surfaktanty). Protein s polysacharidem tak na mezifázovém rozhraní působí synergicky (Guzey & McClements, 2006).

Studie uvádí, že kombinace protein-polysacharid jsou lepšími stabilizátory než biopolymery použité samostatně. Bylo prokázáno zlepšení stability vůči změnám pH, teploty a přísadám soli. Příkladem může být emulze odolnější vůči pH, kde byly kapky olejové fáze stabilizovány proteinem β -laktoglobulinem a na něm navázaným polysacharidem pektinem. Pektin zde zvyšoval sterickej a elektrostatickej odpor mezi kapénkami a zabraňoval tak jejich agregaci (Dickinson, 2003).

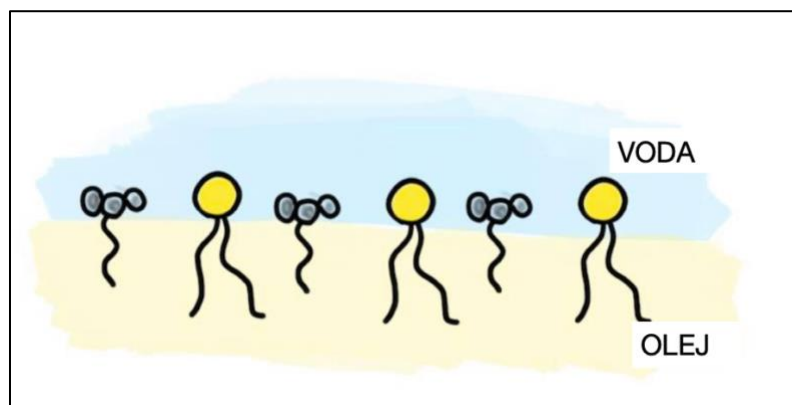
Pro vytvoření jiných mechanismů stabilizace, které se mohou uplatňovat i při enkapsulaci aktivních látek, se využívá postupů zvaných ko-adsorpce, komplexace a metody vrstvení stabilizátorů – layer-by-layer. Protein a polysacharid jsou vázány fyzikálními nebo kovalentními vazbami a různé typy interakce mohou vznikat před, během nebo i po procesu homogenizace. (Gumus & McClements, 2016).

4.1 Ko-adsorpce

Při ko-adsorpci (kompetitivní adsorpce) probíhá adsorbování stabilizátorů na povrch kapek olejové fáze v podobě jednotlivých molekul nehledě na to, zda se jedná o PAL, biopolymer nebo pevnou částici. Mezifázové rozhraní může být v tomto případě tvořeno buď homogenní směsí stabilizátorů, nebo může obsahovat oblasti bohaté na jeden ze stabilizátorů (Obrázek 4). Celkové složení mezifázového rozhraní závisí především na relativní afinitě stabilizátorů k rozhraní a na jejich relativních koncentracích. Uplatňují se

dvě možnosti, kdy stabilizátory k systému přidat. Jednou z možností je přidavek směsi stabilizátorů před homogenizací, druhá varianta nabízí možnost přidat jeden ze stabilizátorů před homogenizací a druhý až po ní (Dickinson, 2011; Pugnaroni *et al.*, 2004).

V roce 2012 byla provedena studie, která zkoumala vliv koncentrace karboxymethylcelulózy na chování CAS v emulzi. Při zvýšení koncentrace karboxymethylcelulózy docházelo k tomu, že se CAS více adsorboval na olejové kapky. V této studii tedy bylo dokázáno, že celulóza sama zlepšuje stabilitu emulze a zároveň podněcuje protein k adsorpci na mezifázovém rozhraní (Liu *et al.*, 2012).

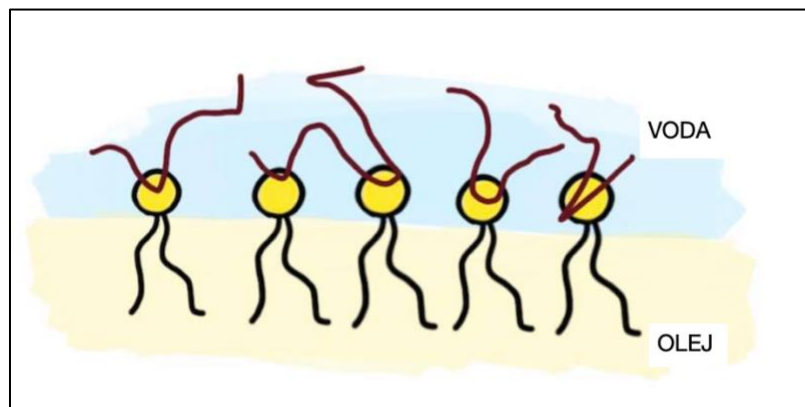


Obrázek 4 Grafické znázornění ko-adsorpce (upraveno dle McClements & Gumus, 2016).

4.2 Komplexace

U komplexace mohou být komplexy vytvořeny před homogenizací nebo až po ní. V prvním případě se obě složky smísí dohromady ve vodné fázi za vzniku komplexu a poté probíhá homogenizace vodné fáze s olejovou. V případě, že je komplex tvořen až po homogenizaci se postupuje tak, že se jeden ze stabilizátorů použije při vytváření emulze. Tento stabilizátor se adsorbuje na kapky olejové fáze a až poté je přidána druhá složka komplexu (Obrázek 5). Interakce mezi jednotlivými složkami komplexu je uskutečněna pomocí elektrostatických nebo hydrofobních sil, vodíkovými vazbami nebo kovalentními vazbami v závislosti na povaze složek (Dickinson, 2011).

Studie o komplexu chitosan-CAS z roku 2012 ukázala, že komplex zlepšuje stabilitu emulzí o mnohem více než použití samotného CAS. Zmíněný komplex byl schopen chránit emulzní kapky před agregací po úpravě pH, která odpovídala potřebám CAS. Zlepšení stability bylo zapříčiněno především elektrostatickými a stericými silami mezi chitosanem a olejovými kapkami na mezifázovém rozhraní. Díky chitosanu došlo také ke zvýšení viskozity, což přispělo ke stabilitě emulzí (Zinoviadou *et al.*, 2012).



Obrázek 5 Grafické znázornění komplexace (upraveno dle McClements & Gumus, 2016).

4.3 Layer-by-layer

Metoda layer-by-layer zahrnuje v prvním kroku společnou homogenizaci vodné fáze, olejové fáze a stabilizátoru, který má ve své molekule ionizovatelné skupiny. Adsorpce tohoto stabilizátoru na emulzní kapky způsobuje jejich elektrický náboj, čehož se využívá v dalším kroku. Při něm je emulze smíšena s roztokem, který obsahuje druhý, opačně nabitý stabilizátor. Nastává tak adsorpce druhého stabilizátoru na emulzní kapky již obalené prvním stabilizátorem v důsledku působení zejména elektrostatických sil, ale také i van der Waalových sil, vodíkových můstků nebo kovalentních vazeb. Tento proces lze několikrát opakovat a jeho výsledkem je řada vrstev kolem emulzních kapek, které zvyšují stabilitu a funkci emulzí (Obrázek 6).

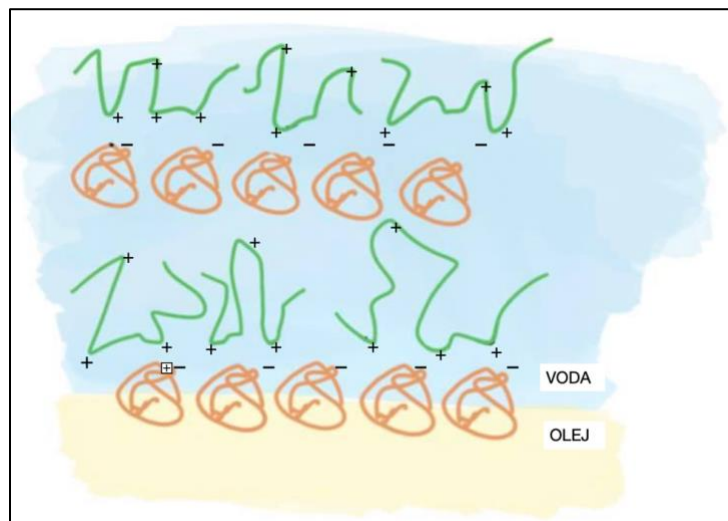
Pokud mluvíme o vrstvení protein-polysacharid, každý ze stabilizátorů zde zastává specifickou funkci. Protein, který je amfifilní, má za úkol ukotvit celý komplex na mezifázové rozhraní. Polysacharid, který je hydrofilní, zasahuje do vodné fáze a tím napomáhá lepší smáčivosti stabilizátoru. Také vytváří stérickou bariéru, díky které je zabráněno agregaci.

Tento proces musí být po celou dobu důkladně sledován, aby nedocházelo k nežádoucí flokulaci kapek. Můstková flokulace může nastat v případě, že je koncentrace polysacharidu velmi nízká. V ten moment dochází k flokulaci rychleji, než se částice polysacharidu stihnou navázat na kapky obalené proteinem. Také existuje riziko depleční flokulace, která nastává při překročení kritické koncentrace neadsorbovaného polysacharidu (Guzey & McClements, 2006; Cho & McClements, 2009).

Emulze stabilizované postupem layer-by-layer se využívají často ve farmaceutickém, kosmetickém průmyslu ale také v potravinářství. V oblasti farmacie a kosmetologie jejich

použití souvisí se schopností enkapsulace a uvolňování aktivních látek v místě potřeby. V případě řízeného uvolňování aktivních látek záleží na vlastnostech první naadsorbované částice a také na konečném počtu vrstev komplexu (Guzey & McClements, 2006).

Příkladem použití metody layer-by-layer může být studie emulzí stabilizovaných pomocí komplexu lecitin-chitosan. Vytvořené emulze vykazovaly dlouhodobě dobrou stabilitu i při nízkém pH a nízké iontové síle. Také je předpoklad, že oproti jednovrstevným emulzím mají zlepšenou stabilitu vůči oxidaci lipidů a jsou odolnější vůči teplotním výkyvům (Ogawa *et al.*, 2003).

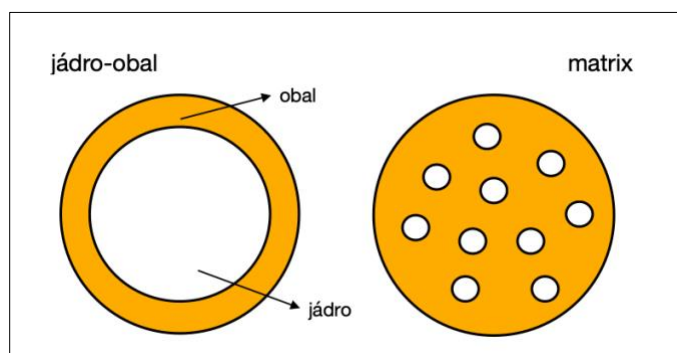


Obrázek 6 Grafické znázornění postupu layer-by-layer (upraveno dle McClements & Gumus, 2016).

5 ENKAPSULACE

Při práci s bioaktivními látkami je důležité myslet na jejich stabilitu. Ne vždy je možné aktivní látky přímo zabudovat do konečného produktu právě z důvodu jejich možné degradace. Proto se využívá enkapsulace neboli zapouzdření. Jde o proces, při kterém je aktivní látka zapouzdřena/enkapsulována ve vhodném sekundárním materiálu. Enkapsulace zlepšuje stabilitu látek, poskytuje ochranu před chemickou, fyzikální a biologickou degradací a také napomáhá s řízeným uvolňováním. Zapouzdření je běžnou součástí praxe ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu (McClements, 2014).

Sekundární materiál vybraný pro enkapsulaci může aktivní látku buď zcela obalit anebo může být látka v materiálu dispergována a do konečného produktu dodána v podobě kapslí. Kapsle nabývají velikostí od nanometrů po jednotky milimetrů a mají rozmanitý tvar závislý na enkapsulované aktivní látce. Dle velikosti se kapsle rozdělují na nanokapsle, mikrokapsle (mikročástice) a makročástice. Obecně se kapsle skládá z jádra a obalu, kde je jádro tvořeno aktivní látkou a obal sekundárním materiálem neboli nosičem. Struktura kapsle závisí jak na zvolené látce, tak i na metodě použité pro enkapsulaci. Z tohoto hlediska se kapsle dělí na dva typy: jádro-obal (rezervoárový typ) a matrixový typ (Obrázek 7). Mezi rezervoárový enkapsulační typ patří vícevrstvé emulze, lipozomy nebo polymerní kapsle a do matrixového typu se řadí micely, mikroemulze nebo například nanoemulze (Mishra, 2015; Donsi *et al.*, 2015).



Obrázek 7 Typy kapslí – zleva: typ jádro-obal, typ matrix.

Aktivní látky představují např. léčiva, vitamíny, minerály, antioxidanty a enzymy ale také pufrý, barviva aj. Nejčastěji se pro enkapsulaci využívají částice látek v kapalné formě, ale výjimkou nejsou ani formy plynné či pevné (McClements, 2014).

Pro enkapsulaci jsou také důležité vlastnosti samotného nosiče, jelikož určuje stabilitu kapsle a účinnost enkapsulace. Dle použití kapslí je potřeba zvážit jeho fyzikálně-chemické vlastnosti (molekulová hmotnost, rozpustnost...), a například i emulgační

vlastnosti. Nosič musí být inertní vůči aktivním látkám, netoxický a biodegradabilní. Při použití v kosmetické oblasti pro topické aplikace musí být známá jeho bezpečnost a kompatibilita s pokožkou. Mezi nejpoužívanější sekundární materiály patří polymery na přírodní i syntetické bázi. Přírodními jsou buď polysacharidy (škrob, celulóza, chitosan...) nebo proteiny (kasein, zein, želatina) a syntetické zahrnují např. kyselinu polymlečnou (PLA), kopolymer kyseliny polymlečné a polyglykolové (PLGA), parafin nebo polypropylen (Pawar & Babu, 2010; Lakkis, 2016).

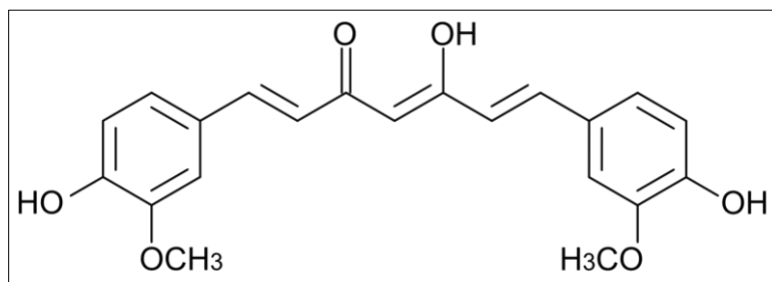
5.1 Enkapsulace aktivních látek

Důvod k enkapsulaci aktivních látek závisí především na oblasti použití. V potravinářství jde hlavně o ochranu bioaktivních látek, které mohou podléhat rychlé oxidaci či degradaci (vitamíny, polyfenoly). Dalším důvodem pro enkapsulaci je maskování chuti (minerály a polyfenoly) nebo usnadnění manipulace s enkapsulovanou látkou (esenciální oleje a rostlinné výtažky). Mezi enkapsulované bioaktivní látky patří např. vitamíny – vitamin C, vitamin E, β -karoten, kofein, nisin, enzymy aj. (Nedović *et al.*, 2013).

V kosmetickém průmyslu vzniká množství produktů s bioaktivními látkami, které jsou často citlivé na změny teploty, pH nebo podléhají světelné degradaci. Z důvodu ochrany a zvýšení stability jsou látky enkapsulovány. Vhodnými nosiči pro enkapsulaci mohou být v kosmetickém průmyslu často přírodní polymery, jelikož je možné jejich enzymatické nebo hydrolytické štěpení a zároveň jsou produkty tohoto štěpení biokompatibilní. Po aplikaci kosmetického produktu a uvolnění aktivní látky je nosič degradován a jeho produkty jsou organismem dále zpracovány a odstraněny (Casanova & Santos, 2016).

5.1.1 Enkapsulace kurkuminu

Vzhledem k tomu, že praktická část práce je zaměřena na enkapsulaci kurkuminu, budou jeho vlastnosti a možnosti enkapsulace krátce shrnuty v této podkapitole. Kurkumin (strukturní vzorec na Obrázku 8), patří mezi kurkuminoidy, které lze nalézt v oddenku rostliny kurkumy patřící do čeledi zázvorovitých. Nejčastěji se vyskytuje v krystalické podobě oranžové barvy bez přítomnosti zápachu.



Obrázek 8 Strukturální vzorec kurkuminu (Zdroj: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Curcumin_structure.svg).

Kurkumin se v posledních letech těší oblibě zejména díky jeho prokázaným antioxidačním a protizánětlivým účinkům. A protože se z hlediska zdravotní nezávadnosti jedná o bezpečnou surovinu, je používán v potravinářství jako barvivo a potravinový doplněk. V kosmetice je využíván taktéž jako barvivo a v poslední době je i součástí produktů v péči o pleť poskytující protizánětlivý účinek. Příkladem může být kurkumová řada výrobků Curcuma Clear od norské značky Neutrogena (Obrázek 9), která napomáhá regulovat tvorbu nadbytečné mazu, zklidňuje a hydratuje pokožku (neutrogena.com).



Obrázek 9 Produkty skin care s obsahem kurkuminu (Zdroj: <https://vanessabratschi.com/reine-haut-dank-superfood-die-curcuma-clear-reihe-von-neutrogena/>).

Kurkumin se řadí mezi hydrofobní látky a je rozpustný v organických sloučeninách jako je chloroform, aceton, ethanol nebo kyselina octová anebo také v olejích. Stabilita kurkuminu velmi závisí na pH prostředí – v kyselém je degradován pomalu, jelikož nedochází k disociaci hydroxylových skupin. Avšak při neutrálním pH je nestabilní a k jeho degradaci dochází během několika desítek minut. Pro zajištění stability při neutrálním pH se často využívá možnosti enkapsulace (Mohamed *et al.*, 2017).

Enkapsulace kurkuminu představuje vhodný způsob, jakým jej lze do organismu dopravit v co nejvíce přírodním stavu. Tímto procesem se předejde problémům, které souvisí

s vlastnostmi kurkuminu jako je jeho rychlá degradace, poměrně nízká adsorpce a rozpustnost, a vysoká lipofilita.

Možností enkapsulace kurkuminu je více, popsány byly již emulzní systémy a Pickeringovy emulze. Při enkapsulaci v emulzi typu O/V je nejprve kurkumin dispergován v olejové fázi. Jeho rozpustnost nezávisí pouze na vnějších podmínkách (teplota a doba inkubace) ale právě také na zvoleném oleji. Schopnost disperze v oleji se označuje jako nosnost a je dána jeho polaritou, molekulovou hmotností a dalšími fyzikálními podmínkami (Araiza-Calahorra *et al.*, 2018). Během posledních deseti let byly provedeny studie, které se zabývaly vlivem molekulové hmotnosti olejů na rozpustnost kurkuminu. Bylo zjištěno, že u triacylglycerolů (TAG) s kratšími řetězci dochází k lepší rozpustnosti kurkuminu než u TAG s delšími řetězci z důvodu častějších interakcí typu dipól-dipól (Ahmed *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2017).

5.1.2 Typy enkapsulačních systémů

Existuje poměrně široké rozmezí enkapsulačních systémů. Jedním typem jsou enkapsulační systémy na bázi PAL, které obsahují jako hlavní složky fosfolipidy a PAL. Tyto systémy vznikají jednoduchým smícháním vody, oleje a PAL a řadí se k nim liposomy, micely a mikroemulze (McClements, 2016).

Dalším typem jsou emulzní enkapsulační systémy. Na rozdíl od systémů na bázi PAL je při přípravě nutné k vodné a olejové fázi přidat emulgátor. Do této skupiny se mohou řadit emulze, nanoemulze nebo Pickeringovy emulze a ty mohou sloužit pro výrobu dalších složitějších systémů jako jsou mikroklastry, hydrogelové částice, koloidosomy nebo vícevrstvé emulze (McClements, 2014; Anandharamakrishnan, 2014).

Při výběru typu enkapsulačního systému je potřeba brát v potaz vlastnosti enkapsulované látky i nosiče. Proto není výjimkou, že se pro dosažení nejlepší enkapsulace kombinuje více přístupů, například emulgace v kombinaci se sprejovým sušením nebo emulgace následovaná lyofilizací. Lyofilizace je jednou z mechanických enkapsulačních metod, a protože byla tato metoda aplikována na emulze v praktické části této práce, bude podrobněji probrána v následující kapitole.

6 LYOFILIZACE

Lyofilizace je proces, při kterém je z produktu odstraněna voda vakuovou sublimací. Toho se s oblibou využívá u emulzí, mikroemulzí a nanoemulzí, které nesou aktivní látku. Obsah vodné fáze těchto systémů s sebou přináší nevýhody spojené s možnou mikrobiální kontaminací, celkovou fyzikálně-chemickou nestabilitou, možností hydrolytické degradace a únikem aktivní látky. Produkty vzniklé lyofilizací jsou oproti tomu stabilní a snadno se skladují. Celý proces lyofilizace probíhá za poměrně nízkých teplot, čehož se využívá zejména u vzorků citlivých na vysoké teploty.

Sušení zmrzlých produktů v prostředí vakua bylo poprvé popsáno již v roce 1906, nicméně až po druhé světové válce došlo k průmyslovému využití pro uchování plazmy (Bordas & d'Arsonval, 1906). V současnosti se lyofilizace využívá nejvíce ve farmacii, kosmetickém průmyslu, potravinářství a agrochemii, kde tato metoda pomáhá zlepšit stabilitu produktů a zpomaluje nežádoucí reakce jako je oxidace, hydrolyza nebo disulfidové přesmyky vedoucí k destabilizaci (Franks, 1998).

Jak již bylo zmíněno, lyofilizace je dehydratační proces, při kterém se odstraňuje ze systému voda sublimací ve vakuu při nízkém tlaku a teplotě. Výsledkem je produkt nazývaný lyofilizát, který je bezvodý nebo téměř bezvodý. Během procesu působí na lyofilizovaný vzorek napětí, které může způsobit jeho destabilizaci. Aby k tomuto nedocházelo, přidávají se k systému tzv. kryoprotektivní látky (Franks, 1998; Abdelwahed *et al.*, 2006). Proces lyofilizace a působení vybraných kryoprotektantů bude podrobněji popsán dále.

6.1 Cykly lyofilizace

Proces lyofilizace se skládá ze tří základních fází/cyklů, kterými jsou zmrazení, primární sušení a sekundární sušení (Tang & Pikal, 2004). V prvním kroku cyklu dochází ke zmrazení produktu, což způsobí zakoncentrování pevných částic. Primární sušení, druhý krok, začíná ve chvíli snížení tlaku na hodnoty tlaku vodních par nad ledem a zvýšením teploty. Tím dochází k sublimaci ledu. Během sekundárního sušení nastává další pokles tlaku a zvýšení teploty, čímž jsou odstraněny poslední zbytky vody (Wang *et al.*, 2012).

6.1.1 Zmrazení

Prvním krokem lyofilizace je zmrazení vzorku na teplotu tak nízkou, aby došlo k jeho ztuhnutí. Vždy záleží na charakteru vzorku, nicméně ve farmacii je nejběžnější teplotou při

mrazení $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zmrazení vzorku může být uskutečněno v mrazáku, mrazící sušičce nebo použitím tekutého dusíku. V tomto kroku dochází ke změnám fyzikálních vlastností v důsledku tvorby ledových krystalů, které mohou zapříčinit agregaci emulzních kapek. Pokud vzorek obsahuje pufř, pak jeho krystalizace, způsobená zmrazením, zapříčiňuje změnu pH (Tang & Pikal, 2004; Wang 200). Důležitým parametrem v tomto kroku je rychlost mrazení. Rozdílné rychlosti způsobují tvorbu různě velikých ledových krystalů. Pomalé zmrazování vytváří velké krystaly v menším počtu, zatímco rychlé zmrazování způsobuje tvorbu menších početnějších krystalů. Velikost a povrch těchto krystalů má vliv na další kroky lyofilizace (Ingvarsson *et al.*, 2011).

6.1.2 Primární sušení

Primární sušení způsobuje sublimaci ledu, ke kterému dochází díky nízkému tlaku a teplotě. Nejprve sublimuje povrch vzorku, následně spodnější vrstvy. Poté je pára ze vzorku odstraněna difúzí nebo konvekcí přes porézní vrstvy. Velikost pórů souvisí s velikostí krystalů vytvořených v prvním kroku, což má vliv na rychlost difúze. U rychle zmrazených vzorků, kde jsou menší krystaly ve větším množství je odstranění páry mnohem náročnější a primární sušení trvá delší dobu. U vzorků, které byly zmrazovány pomalu a obsahují velké krystaly je transport páry snazší a primární sušení tak probíhá kratší dobu. Velmi důležité je, že v tomto kroku je snížen tlak, díky tomu je usnadněn transport vodních par, což způsobuje rychlejší sublimaci ledu (Tank & Pikal, 2004; Ingvarsson *et al.*, 2011).

6.1.3 Sekundární sušení

Cílem sekundárního sušení je odstranění zbytkové vody, kterou vzorek i po primárním sušení obsahuje asi z 10–35 %. Pro kvalitu a stabilitu vzorku je potřeba dosáhnout jeho optimální vlhkosti, proto se v tomto kroku reguluje nejenom teplota (která je při sekundárním sušení zvýšena) ale i vlhkost. I v tomto kroku platí korelace mezi povrchem a rychlostí sušení. U rychle zmrazených vzorků s velkou povrchovou plochou probíhá během sekundárního sušení desorpce vody, což má za následek kratší průběh sekundárního sušení. Vzorky pomalu zmrazené s velkými kusy ledových krystalů mají povrch malý, proto je desorpce vody zhoršena, a tak i sekundární sušení probíhá delší dobu (Wang *et al.*, 2012).

6.2 Kryoprotektanty

U emulzí, které jsou vystavené mrazení a sušení při procesu lyofilizace, může docházet k chemickému a fyzikálnímu poškození. K ochraně lipidových dvojvrstev emulze se proto používají látky, které mají kryoprotekční vlastnosti.

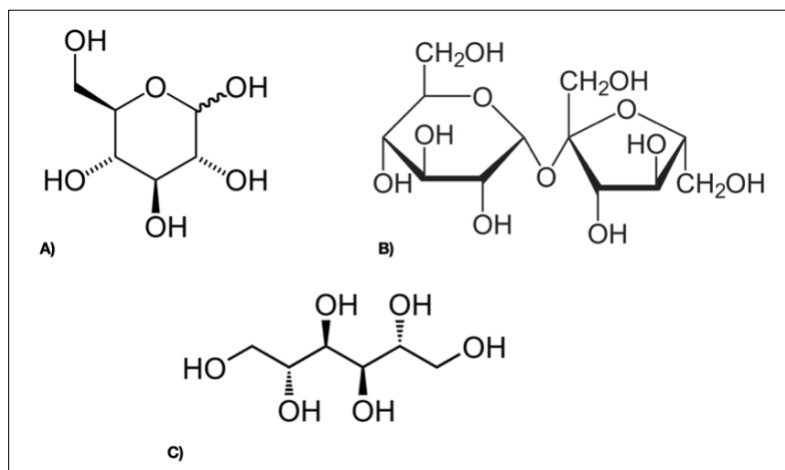
Při mrazení vzorku dochází k zakoncentrování pevných částic, které může vést až k jejich agregaci a následné destabilizaci celého systému. Při přítomnosti kryoprotektantu k agregaci částic nedochází, jelikož sám migruje z vodné fáze (Lee et al., 2009).

Odstranění vody při sušení způsobí přiblížení hydrofilních částí fosfolipidů (obsažených v olejích) a s tím spojené působení silnějších van der Waalsových sil. Kryoprotektant se dostává mezi olejové kapky, zvyšuje tak vzdálenost mezi jejich uhlovodíkovými řetězci a tím jsou interakce oslabeny. Dále také dochází k nahrazení vodíkových můstků mezi fosfolipidy a vodou novými vodíkovými můstkami mezi fosfolipidem a kryoprotektantem. Dochází tak k omezení pohybu fosfolipidů, čímž je také zabezpečena ochrana před nechtěným uvolněním aktivní látky (Cacela & Hinch, 2006; Ingvarsson *et al.*, 2011).

Nesmírně důležitou roli pro stabilitu systému hraje koncentrace kryoprotektantu. Obecně platí, že vyšší koncentrace je z hlediska zajištění stability lepší, avšak pokud je dosaženo tzv. limity stabilizace, pak může vysoká koncentrace vyvolat naopak destabilizaci (Abdelwahed *et al.*, 2006).

Nejčastěji používanými kryoprotektanty jsou sacharidy (monosacharidy, disacharidy i polysacharidy). Konkrétně nejvíce popisovanými kryoprotektanty pro emulze jsou sacharóza, maltóza, glukóza, trehalóza a mannitol, které jsou si podobny svými chemickými vlastnostmi. Výsledky s nimi jsou ale rozdílné v závislosti na chemických a fyzikálních vlastnostech emulzního systému (Zhang et al., 2008).

V praktické části předkládané diplomové práce byly použity sacharidy D-glukóza, sacharóza a D-mannitol (Obrázek 10).



Obrázek 10 Strukturní vzorce A) D-glukóza, B) Sacharóza, C) D-mannitol.

6.2.1 Glukóza

Glukóza patří mezi monosacharidy, je ze skupiny aldohexóz. V přírodě je jedním z produktů fotosyntézy a představuje základní kámen zásobní energie pro rostliny. Glukóza je stavební jednotkou pro mnoho přírodních oligosacharidů (laktóza, maltóza, sacharóza) a polysacharidů (škrob, glykogen). V čistém stavu se vyskytuje jako bílá krystalická látka nasládlé chuti. Glukóza se vyskytuje ve dvou enantiomerech, konkrétně jako D-glukóza a L-glukóza. Jejich fyzikální a chemické vlastnosti se neliší, kromě schopnosti stáčet polarizované světlo, kdy jej enantiomery stáčí opačným směrem. V živých organismech je však nelze zaměnit, jelikož hexokináza nedokáže L-glukózu fosforylovat, a ta se tak nemůže zúčastnit metabolismu cukrů (Koolman & Röhm, 2012)

Nejčastější metodou výroby D-glukózy je buď enzymatická nebo kyselá hydrolyza rostlinného škrobu. Může se ale také vyrábět krystalizací rostlinných šťáv (např. z vinné révy). Přítomnost aldehydické skupiny dává glukóze schopnost fungovat jako redukční činidlo (Koolman & Röhm, 2012).

D-glukóza je esenciální živinou pro lidské tělo, protože patří mezi nejrychlejší zdroje energie pro všechny tkáně a představuje jediný zdroj energie pro červené krvinky a mozkovou tkáň. V organismu se vyskytuje ve formě glykogenu v játrech, ze kterého se molekuly glukózy uvolňují díky procesu glykogenolýzy. V případě nedostatku glukózy probíhá její syntéza z tuků při glukoneogenezi. Glukóza má tedy využití v medicíně, kdy je pacientům aplikován její roztok při dehydrataci a při vysoké spotřebě sacharidů (Matouš *et al.*, 2010).

V potravinářství je používána jako přírodní sladidlo a taktéž se používá na výrobu lihu. Glukóza je využívána i v kosmetickém průmyslu, kde se používá jako zahušťovadlo.

Působí také jako zvlhčující přísada, která napomáhá udržovat pleť hydratovanou a zabraňuje ztrátě vlhkosti z pokožky. Velmi často je součástí přípravků na suchou a stárnoucí pleť, přispívá k regeneraci pokožky a zlepšuje schopnost buněčné obnovy. Vyskytuje se jako součást hydratačních krémů, očních sér, ale také v přípravcích na čištění pleti či sprchových gelech a šamponech, kde snižuje možnou dráždivost způsobenou PAL (Syrový, 2015).

Již v roce 1996 byla publikována studie, ve které byl sledován vliv glukózy a jejích oligomerů na stabilitu sonikovaných lipozomů během lyofilizace. Výsledky ukázaly, že glukóza měla vysoký kryoprotektivní účinek na lipozomy obsahující dipalmitoylfosfatidylcholin. Taktéž bylo zjištěno, že glukóza zabránila agregaci a fúzi lipozomů (Suzuki & Komatsu, 1996).

Další studie se zabývala efektem glukózy na uvolňování protinádorového léčiva z polysacharidových nanočástic. Byly porovnávány formulace o různé koncentraci glukózy a výsledkem bylo, že částice s nižší koncentrací, konkrétně 0,5% koncentrací, vykazovaly větší schopnost interakce s nádorovými buňkami než částice obsahující glukózu v 5% koncentraci. Obecným zjištěním bylo, že koncentrace glukózy (popř. jiného kryoprotektantu) hraje velkou roli (Curcio *et al.*, 2015).

6.2.2 Mannitol

Mannitol je cukerný alkohol, který se přirozeně vyskytuje v čerstvých houbách, stromech (fíkovník, olivovník, jasan) a mořských řasách. Nejčastěji má formu bílého až nažloutlého krystalického prášku nasládlé chuti bez zápachu. Produkce mannitolu je velmi rozmanitá. Jelikož se jedná o cukerný alkohol, jednou z možností přípravy je redukce manózy. Obvyklým způsobem průmyslové výroby je hydrogenace fruktózy s použitím niklu jako katalyzátoru. Při této výrobě vzniká i sorbitol, což je izomer mannitolu (liší je pouze v orientaci hydroxylové skupiny na druhém uhlíku). V přírodě je mannitol produkován řadou organismů včetně bakterií, kvasinek, hub, řas a mnoha jiných rostlin (Kearsley & Deis, 2012).

Mannitol je hojně využíván v medicíně. Pacientům je indikován při léčbě mozkového edému, zvýšeného nitroočního tlaku, dále je volen jako doplňková léčba při cystické fibróze. V některých případech je také podáván při selhání ledvin ke zvýšení eliminace určitých toxinů a k léčbě hromadění tekutin. Zajímavostí je, že Světová anti-dopingová agentura řadí mannitol k zakázaným látkám z toho důvodu, že by mohl maskovat jiné látky (European Medicines Agency, 2012; World Anti-Doping Agency, 2017).

V kosmetickém průmyslu je taktéž oblíbenou surovinou. Používá se jako pojivo, zajišťující soudržnost kosmetických přípravků, dále jako humektant, k maskování základního zápachu a jako hydratační složka. Ve vysokých koncentracích může zvyšovat účinnost konzervačních látek. Díky jeho antioxidačním a UV-ochranným vlastnostem je častou přísadou v hydratačních pleťových krémech, v kosmetických přípravcích s anti-aging efektem, či v opalovacích krémech (Syrový, 2015).

Mannitol je neodmyslitelnou součástí i potravinářského průmyslu, kde je náhražkou sacharózy a je vhodný pro diabetiky, jelikož nezvyšuje hladinu inzulínu v krvi. Na obalech produktů jej lze nalézt pod označením E 421 a v České republice se smí používat jen v nezbytném množství ve výrobcích se sníženým obsahem cukrů, protože může mít negativní vliv na zažívací trakt (Vrbová, 2001).

Studie z roku 2019 o využití mannitolu a dalších látek jako kryoprotektantů mikroemulzí s pupalkovým olejem ukázala, že představuje optimální ochranný účinek a čím více bylo v emulzi použito jednodruhového kryoprotektantu, tím byl snadnější rehydratační účinek. Lyofilizace sice způsobila zvětšení částic emulze, ale v nanoměřítku se hodnota indexu disperze částic zmenšila a systém byl stabilnější (Wu *et al.*, 2019).

Kulkarni *et al.* (2018) zkoumali smáčivost lyofilizátů, která je směrodatná při jejich rekonstituci. Právě při dobré smáčivosti proniká rekonstituční kapalina snáze vně lyofilizát a je podpořena jeho další dezintegrace. Mannitol zlepšil smáčivost pevných látek lyofilizátu, což usnadnilo a urychlilo rekonstituci (Kulkarni *et al.*, 2018).

6.2.3 Sacharóza

Sacharóza je nejběžnější disacharid, který vzniká z monosacharidů α -D-glukózy a β -D-fruktózy spojených glykosidickou vazbou. Spojení vzniká na 1. uhlíku α -D-glukózy a 2. uhlíku β -D-fruktózy, proto patří sacharóza mezi neredukující disacharidy. Sacharóza se přirozeně nachází ve všech zelených rostlinách jako jejich metabolický produkt a můžeme ji nalézt ve stonku, listech i plodech. Sacharóza se vyskytuje ve formě bílé krystalické látky, ale jednotlivé krystaly jsou bezbarvé. Má nasládlou chuť a používá se jako standard pro určení relativní sladkosti (Koolman & Röhm, 2012).

Ročně se vyrobí více než 140 milionů tun sacharózy z cukrové řepy nebo cukrové třtiny. Do distribuce se dostávají různé druhy sacharózy, které vznikají rozdílnými výrobními postupy (hnědý cukr, kapalný cukr, krystalový cukr...). Z toho plyne, že největší využití sacharózy je právě v potravinářství, kde se používá jako sladidlo a při vyšších koncentracích působí jako konzervant. Využitelnost sacharózy je také možná

v biotechnologiích, kde slouží jako fermentační substrát např. při výrobě droždí nebo ethanolu (Koolman & Röhm, 2012).

Sacharóza najde své uplatnění i ve farmacii a kosmetickém průmyslu. Často se používá jako regulátor chuti nebo pojivo při přípravě léků. Je základní složkou cukrových peelingů, které mají exfoliační účinek, dále je složkou past určených na epilaci. Najít ji lze i šamponech a mýdlech, kde působí jako konzervant a prodlužuje tak trvanlivost produktu (Syrový, 2015).

V roce 2001 byla provedena studie, ve které byl zkoumán vliv Tweenu 20 a sacharózy na stabilitu anti-L-selektinu v průběhu lyofilizace a následné rekonstituce. Bylo zjištěno, že přídavek sacharózy má pozitivní vliv na sekundární strukturu proteinu, která zůstala po provedení lyofilizace neporušená. Avšak při rekonstituci nebyl pouhý přídavek sacharózy dostatečný, docházelo k agregaci částic. K tvorbě agregátu nedošlo až poté, co byl k sacharóze přidán Tween 20 (Jones *et al.*, 2001).

O rok později bylo zkoumáno chování směsi mannitolu se sacharózou v průběhu lyofilizace. Bylo prokázáno, že ve směsi v poměru 3:1 mannitol:sacharóza je dostatek mannitolu na vytvoření pevného lyofilizátu, u kterého nedochází ke kolapsu struktury a zároveň je ve směsi dostatek sacharózy pro ochranu proteinu před agregací (Johnson *et al.*, 2002).

7 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Emulze jsou systémy, které jsou schopné transportovat aktivní látky, kvůli zvýšení jejich rozpustnosti, stability nebo z důvodu minimalizování jejich vedlejších účinků. Nicméně, emulze jsou disperze, ve kterých vodná fáze zaujímá podstatnou část jejich objemu. U takových systémů to může znamenat několik nevýhod, jako je riziko mikrobiální kontaminace nebo hydrolyzy, které mohou vést k destabilizaci a degradaci celého systému. Jednou z možností, jak předejít výše zmíněným problémům, může být lyofilizace emulze, při které dochází k odstranění vody sublimací ve vakuu.

Zároveň se v současnosti stává stále více populárním šetrnější způsob života, na což reaguje výzkum ve všech oblastech. U emulzních systémů, například v oblasti kosmetiky, se tyto zájmy soustředí především na snahu nalézt vhodnou alternativu pro klasické surfaktanty, které mají iritační potenciál. U stabilizace emulzí mohou být klasické PAL nahrazeny přírodními polymery, pevnými částicemi nebo jejich kombinací. Stabilizace emulzí kombinací právě povrchově aktivního proteinu a částicového stabilizátoru přináší řadu zajímavých vlastností a výhod, navíc tento systém může být vhodným nosičem pro aktivní látku.

Stabilizaci emulzí kombinací proteinu a nanokrystalické celulózy se věnovali ve své publikaci Liu *et al.* (2018), kteří využili interakce hovězího sérového albuminu (BSA) a CNC pro přípravu emulzí s vysokým obsahem vnitřní fáze (HIPE – z angl. high internal phase emulsion). Principem stabilizace emulze bylo pokrytí CNC molekulami BSA. U takto připravených emulzí byla potvrzena stabilní a tuhá mikrostruktura (Lit *et al.*, 2018). Dále podobnou problematiku studovala ve své publikaci Pindřáková *et al.* (2019). Jejich emulze byly připraveny třemi rozdílnými způsoby, které se lišily v pořadí přídavku CAS a CNC. V této studii byla potvrzena důležitost pořadí přidávání stabilizujících látek (Pindřáková *et al.*, 2019).

Emulze stabilizované kombinací CAS a CNC studovala ve své diplomové práci také Kočí (2020), kdy stejným způsobem připravené emulze byly použity pro přípravu oleogelů jako nosiče aktivní látky kurkuminu (Kočí, 2020). Z toho je zřejmé, že aktivní látky do takto stabilizovaných systémů je možné enkapsulovat.

Kurkumin se díky svým vlastnostem (Rauf *et al.*, 2018) tradičně považuje za aktivní látku v disperzních systémech, kde ale sám může působit jako stabilizátor. Schopnost kurkuminu stabilizovat emulze zkoumal Aditva *et al.* v roce 2017, kdy byly použity kurkuminové nanočástice ke stabilizaci Pickeringových emulzí typu V/O. Kurkumin byl

schopen snižovat mezipovrchové napětí, což usnadňovalo přípravu emulze a přispívalo k její stabilitě. Do formulace připravovaných emulzí byl přidán i syrovátkový protein, který zabraňoval zpětné krystalizaci kurkuminu. Ten nadále sloužil jako aktivní látka, ale zároveň byly využity jeho vlastnosti pro stabilizaci systému (Aditva *et al.*, 2017).

Nová studie z roku 2020 pojednává o enkapsulaci kurkuminu do kaseinátových nanočástic, které jsou posléze lyofilizovány. I když se nejedná o emulzi v pravém slova smyslu, lyofilizát byl stabilní více než 6 měsíců při teplotě 4-8 °C. Následně provedená rekonstituce byla taktéž úspěšná, velikost částic nebyla větší o víc než 5 % oproti původní velikosti částic (Barick *et al.*, 2020).

Zajímavá je také studie, ve které byly hodnoceny lyofilizáty obsahující kurkumin. Bylo zjištěno, že barevnost lyofilizátů poukazuje na úspěšnost enkapsulace kurkuminu. Více žluté lyofilizáty značí větší množství volného kurkuminu, zatímco světlejší lyofilizáty obsahují kurkumin enkapsulovaný. Porovnání barevnosti, a tedy množství volného vs. enkapsulovaného kurkuminu, poukazuje na to, že lyofilizáty světlejší (enkapsulovaný kurkumin) jsou více stabilní (vůči vyšším teplotám či kyselým podmínkám) (Guo *et al.*, 2020). Tato skutečnost může mít vliv na uvolňování kurkuminu z lyofilizátů, kdy se předpokládá, že volný kurkumin bude uvolňován snadněji než enkapsulovaný kurkumin.

Literární rešerše ukazuje, že problematika týkající se lyofilizace emulzí s obsahem kurkuminu nebyla dosud velmi zkoumána. Tato práce tedy může sloužit jako základní stavební kámen pro získání a prohloubení dalších znalostí z oblasti lyofilizace emulzí s aktivními látkami.

8 CÍL PRÁCE

Jedním z cílů diplomové práce bylo vypracování literární rešerše týkající se stabilizace emulzí, konkrétně alternativními mechanismy stabilizace pomocí více typů stabilizátorů. V teoretické části jsou také rozebrány témata týkající se enkapsulace aktivních látek, podrobněji enkapsulace kurkuminu, dále je popsán proces lyofilizace a jeho praktické uplatnění a také je pozornost věnována kryoprotektantům. Teoretická část slouží jako podklad pro zpracování výsledků a praktickému porozumění další části práce.

Cílem praktické části byla příprava emulzí stabilizovaných částicemi nanokrystalickou celulózu a kaseinátem sodným s enkapsulovanou aktivní látkou kurkuminem. Dále byly připraveny emulze s přídavkem kryoprotektantů D-mannitolem, D-glukózou a sacharózou. Tyto emulze byly lyofilizovány a produkty lyofilizace byly charakterizovány. Neposledním cílem práce byla analýza uvolňování aktivní látky kurkuminu z lyofilizátů.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

9 MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

V následujících seznamech jsou shrnuty materiály a metody, které byly využity při zpracování praktické části diplomové práce.

9.1 Použité chemikálie

- Olivový olej extra virgin nefiltrovaný (Borges original, obchodní síť českého trhu)
- Kaseinát sodný (Sigma Aldrich, Německo)
- Nanokrystalická celulóza (Cellulforce, Kanada)
- Destilovaná voda, demineralizovaná voda
- Kurkumin (Sigma Aldrich, Německo)
- Chlorid sodný (Merck, Německo)
- Methanol (Sigma Aldrich, Německo)
- Sacharóza (Chemapol, Česká republika)
- D-Mannitol (Penta, Česká republika)
- D-Glukóza (Chemapol, Česká republika)
- Fosfátem pufovaný fyziologický roztok-Dulbeccos's Phosphate Bufferet Saline 10x, zkráceně PBS (Biosera, Francie)
- Polysorbát 80 - TweenTM 80 (Sigma Aldrich, Německo)
- dialyzační membrána (MUCO:3,5 kDA, spectapor, Dialysis membrane, Standard RC tubing)

9.2 Přístroje

- Běžné laboratorní vybavení
- Analytické váhy (BA 110 S, Sartorius, Německo)
- Laboratorní centrifuga (EBA 20, Hettich, Německo)
- Laboratorní váhy (EW 420-3NM, Kern, Německo)
- Laserový analyzátor částic (Mastersizer 3000, Malvern, Velká Británie)
- Elektromagnetické míchadlo (MR Hei-Standard, Heidolph)
- Ultrazvukový sonikátor (UP 400St, Heilscher, Německo)
- UV-VIS spektrofotometr (V-750, Jasco, USA)
- Míchadlo Vortex (Biosan, V-1 plus)
- Skenovací elektronový mikroskop (SEM; Phenom-World's Phenom ProX Desktop SEM, ThermoFisher Scientific, Česká republika)

- Laboratorní lyofilizátor Alpha 2-4/LSCbasic (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Německo)
- Konfokální laserový mikroskop (Olympus Fluoview FV3000, Japonsko)

10 POSTUP PRÁCE

10.1 Příprava vodných disperzí CAS a CNC

Zásobní disperze kaseinátu sodného byla připravena v koncentraci 2 hm.%. Navážené množství CAS bylo rozpuštěno v destilované vodě a disperze byla ponechána na magnetické míchačce po dobu 4 hodin do úplného rozpuštění CAS. Po uplynutí této doby byl roztok uložen do lednice až do následného použití. Jelikož je CAS velmi náchylný na mikrobiální degradaci, byla jeho nová disperze připravena vždy před plánovanou laboratorní prací.

Vodná disperze CNC (2 hm.%) byla připravena stejným způsobem jako disperze CAS. K tomu byla navíc provedena trojnásobná sonikace v délce trvání jedné minuty při amplitudě 60 %.

Tyto disperze sloužily po celou dobu jako zásobní, a při další práci byly ředěny na požadovanou koncentraci.

10.2 Příprava olejové fáze s kurkuminem

Pro přípravu Pickeringových emulzí bylo potřeba nejprve připravit olejovou fázi emulze s přídavkem kurkuminu. Do skleněné vialky bylo naváženo 15 mg kurkuminu a přidáno 20 g olivového oleje. Vialky byly obaleny alobalem kvůli možné světelné degradaci kurkuminu a na magnetické míchačce byla směs míchána do úplného rozpuštění kurkuminu. Následovala sonikace této směsi při amplitudě 60 % a po dobu 1 minuty. Sonikace byla provedena celkem třikrát a mezi každou operací bylo potřeba počkat na ochlazení oleje z důvodu zabránění tepelné degradace kurkuminu i oleje. Poté byla směs 5 minut centrifugována při 6000 rpm, pro případy, že se nepodařilo rozpustit veškerý kurkumin. Zcentrifugovaný kurkumin zůstal usazen na stěnách zkumavky a olej s rozpuštěným kurkuminem byl po centrifugaci slit do čisté zkumavky.

10.2.1 UV-VIS spektrofotometrie pro stanovení koncentrace kurkuminu v oleji

Spektrální metody jako například spektrofotometrie jsou založeny na absorpci záření. Základ tedy mají v Lambert-Beerově zákoně, kterým lze matematicky vyjádřit závislost absorbance roztoku na koncentraci absorbující látky (kurkumin).

Pro stanovení koncentrace kurkuminu v oleji byla zvolena UV-VIS spektrofotometrie. Jako rozpouštědlo byl vybrán methanol, ve kterém je sice olivový olej

nerozpustný, nicméně kurkumin je v tomto rozpouštědle rozpustný výborně, což umožnilo jeho extrakci z olivového oleje.

Jako první bylo změřeno spektrum referenčního vzorku (methanol). Poté bylo provedeno proměření spektra u vzorku obsahujícího methanol spolu s kurkuminem o hmotnostní koncentraci 0,1 mg/ml. Nejvyšší hodnota absorbance byla naměřena při vlnové délce $\lambda = 423$ nm. Tato hodnota byla poté použita pro určení absorbance u vzorků kalibrační řady a vlastního vzorku kurkuminu v oleji. Kalibrační řadu tvořily roztoky kurkuminu v methanolu s hmotnostní koncentrací 0 mg/ml; 0,001 mg/ml; 0,002 mg/ml; 0,003 mg/ml; 0,004 mg/ml a 0,005 mg/ml. Pro stanovení koncentrace kurkuminu v oleji bylo napipetováno 250 μ l tohoto vzorku do odměrné baňky a doplněno methanolem na objem 25 ml, u takto připraveného vzorku byla proměřena absorbance.

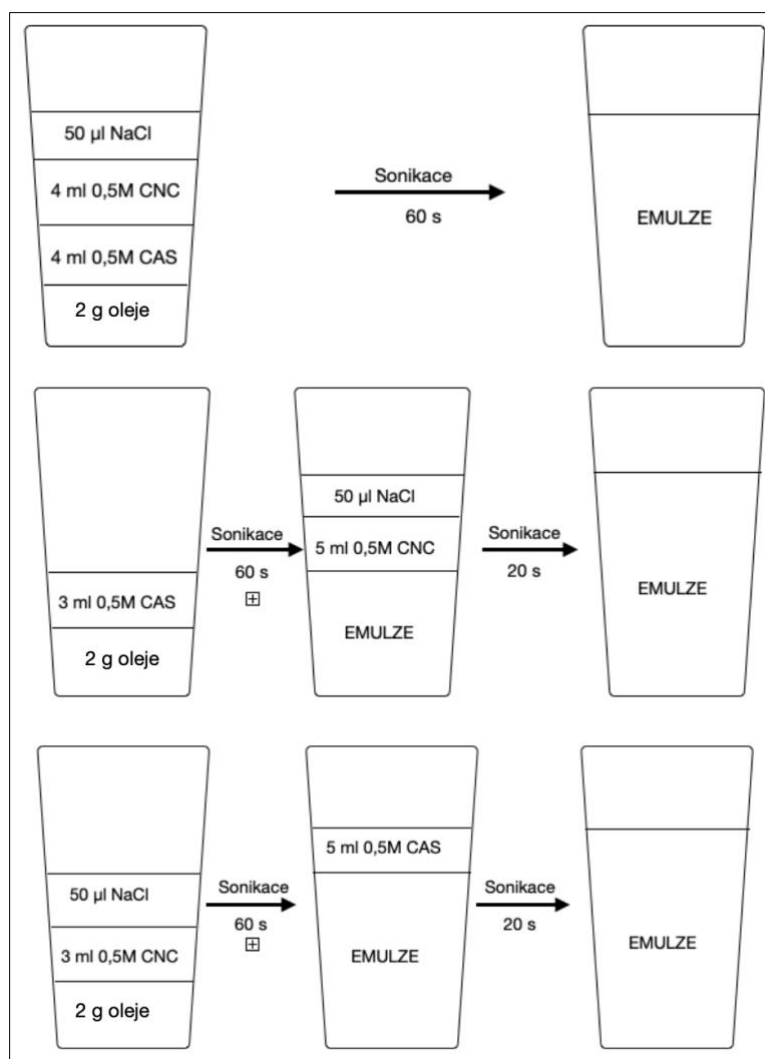
10.3 Příprava emulzí

Pickeringovy emulze byly připraveny smícháním olejové a vodné fáze s následnou sonikací při amplitudě 60 %. Poměr olejové a vodné fáze byl 20/80, kdy do skleněné vialky byly naváženy 2 g olejové fáze (s/bez kurkuminu), přičemž celkové množství emulze bylo 10 g. Vodná fáze sestávala z disperzí CAS a CNC v rozličných objemech v závislosti na způsobu přípravy. Do vodné fáze bylo také zahrnuto vždy 50 μ l 1M roztoku NaCl, které zajišťovalo zvýšení stability emulze.

Postup přípravy emulzí byl převzat z dříve publikovaného článku (Pindřáková *et al.*, 2019), kdy pro přípravu emulzí byly zvoleny 3 rozdílné způsoby, které byly použity i v této práci:

- Způsob přípravy emulzí R1 zahrnoval smíchání 2 g oleje + 4 ml 0,5% disperze CAS + 4 ml 0,5% disperze CNC + 50 μ l 1M roztoku NaCl. Následovalo zvortexování směsi po dobu 1 minuty pro lepší promíchání vodné a olejové fáze, nakonec byla směs sonikována po dobu 1 minuty.
- Způsob přípravy emulzí R2 zahrnoval smíchání 2 g oleje se 3 ml 0,5% disperze CAS. Tato směs byla vortexována 1 minutu a následně 1 minutu sonikována. Poté bylo ke směsi přidáno 5 ml 0,5% disperze CNC spolu s 50 μ l 1M roztoku NaCl a proběhla opětovná sonikace po dobu 20 sekund.
- Způsob přípravy emulzí R3 spočíval nejprve ve smíchání 2 g oleje se 3 ml 0,5% disperze CNC a 50 μ l 1M roztoku NaCl. Tato směs byla podrobena vortexování

v délce 1 minuty a následné sonikaci o stejném čase. Ke směsi bylo následně přidáno 5 ml 0,5% disperze CAS a proběhla sonikace v délce 20 sekund.



Obrázek 11 Schéma přípravy emulzí; nahore R1, uprostred R2, dole R3.

Amplituda sonikace (60 %) byla zvolena na základě předchozích zkušeností z pracoviště. Při této amplitudě bylo možné získat částice emulze o nejmenším rozměru, a tudíž tak zajistit nejlepší stabilitu emulze.

10.3.1 Pickeringovy emulze s přidavkem kryoprotektantů

Příprava Pickeringových emulzí s obsahem kryoprotektantů probíhala dle stejného schématu uvedeného v kapitole 10.3 s tím rozdílem, že před první sonikací byl ke směsi přidán kryoprotektant. To znamená, že při způsobu přípravy emulzí R1 následoval přidavek kryoprotektantu ihned po smíchání vodné a olejové fáze (před sonikací). U cesty R2 byl smíchán olej, CAS a kryoprotektant, následovala sonikace a přidání zbytku vodné fáze dle

schématu. U cesty R3 byla nejprve připravena směs oleje s CNC, NaCl a kryoprotektantem, následná sonikace a přidavek zbylé vodné fáze.

Jako kryoprotektanty byly vybrány sacharidy D-glukóza, D-mannitol a sacharóza. Počáteční koncentrace kryoprotektantů byla stanovena na 10 %, v našem případě byl do směsi tedy přidáván 1 g polysacharidu. V pozdější fázi experimentu byly použity rozdílné koncentrace sacharózy 5 % a 15 %.

Emulze byly připraveny v sadách s olejovou fází jak bez kurkuminu, tak i s olejovou fází s kurkuminem. Byla také zvolena společná amplituda 60 % pro všechny emulze. Připravené emulze byly uloženy při 4 °C ve tmě do jejich další analýzy.

10.4 Charakterizace emulzí

10.4.1 Velikost a distribuce emulzních kapek

Velikost a distribuce emulzních kapek byla měřena pomocí přístroje Mastersizer 3000. Přístroj funguje na principu laserové difrakce a je schopen stanovit velikost částic v rozmezí od několika desítek nanometrů po jednotky milimetrů. Přístroj detekuje rozptýlené světlo od laserem ozářených částic. Velikosti částic hrají roli při rozdílném rozptylu světla – velké částice rozptylují světlo pod menšími úhly než malé částice. Přístroj měří vzdálenost, úhel a intenzitu světelných vln. Detektor poté tato data analyzuje a vypočítává velikost částic (výsledkem je průměr koule ekvivalentního objemu).

Měření velikosti emulzních kapek probíhá tzv. mokrou cestou za použití jednotky „Hydro“, která je plněna demineralizovanou vodou, a ve které je vzorek dispergován. Jednotka „Hydro“ je opatřena míchadlem, jehož otáčky byly nastaveny na 2200 ot./min. Měření probíhalo při 25 °C, a parametry měření byly následující: absorpance 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. Výsledky udávající velikost kapek jsou uvedeny jako objemově vážený průměr D(4;3) v μm .

10.4.2 Mikrostruktura emulzí

Emulze byly pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu FLUOVIEW FV3000. Konfokální mikroskop je druhem světelného mikroskopu, u kterého dochází k eliminaci zkreslení kvůli paprskům vycházejícím z hmoty nad a pod zaostřenou rovinou. Pro práci s konfokálním mikroskopem je velmi důležitá tloušťka preparátu, která by se ideálně měla blížit nule. V tomto případě bylo na podložní sklíčko přidáno cca 10 μl vzorku emulze a

překryto krycím sklíčkem. Zobrazení emulzí bylo možné díky přítomnosti kurkuminu v olejové fázi. Emulze byly pozorovány při zvětšení 40x. Fotky byly pořízeny a zpracovány softwarem Olympus FV31S.

10.5 Příprava a charakterizace lyofilizátů

10.5.1 Lyofilizace emulzí

Připravené vybrané emulze byly uloženy do mrazících boxů do doby jejich lyofilizace. Před samotnou lyofilizací byly emulze zmrazeny na teplotu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dále na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takto připravené vzorky byly vloženy do lyofilizátoru a po ustálení teploty na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla zahájena hlavní fáze sušení při tlaku 0,06 mbar. Hlavní sušení probíhalo 30 hodin, po něm ihned začala druhá fáze konečného sušení při tlaku 0,001 mbar v délce trvání 14 hodin.

10.5.2 Mikrostruktura lyofilizátu

Skenovací elektronové mikroskopii byly podrobeny vzorky s přídavkem 10 % glukózy, 10 % mannitolu a 5 % sacharózy, jelikož byly vizuálním pozorováním vyhodnoceny jako nejlepší. Vzorky byly pozorovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) Phenom Pro X. Vzorky byly umístěny na uhlíkovou pásku na terčičku a jejich přebytek byl odstraněn vzduchem. V tomto případě nebyly vzorky pokryty vrstvou zlata. Zrychlovací napětí bylo 10 kV. SEM je druh mikroskopu, který využívá pro zobrazování pohyblivý svazek elektronů a používá se k zobrazování detailů objektů, které běžný optický mikroskop nezobrazí. Principem SEM je pohyb úzkého svazku elektronů po jednotlivých místech zkoumaného vzorku. Dle interakce dopadajících elektronů s materiálem vzorku vzniká signál o určité intenzitě, který je přenesen do detektoru a následně vyhodnocen.

10.5.3 Rekonstituce

Jedním z důvodů lyofilizace je snížení nároků na skladování produktu. V případě lyofilizovaných emulzí může být výhodnou vlastností lyofilizátu jeho zpětná rekonstituce do podoby emulze. Proto byla jednou ze studovaných charakteristik lyofilizátů i tato vlastnost. Rekonstituce lyofilizátu probíhala jeho rehydratací pomocí destilované vody v poměru 20:80 (lyofilizát:voda), tak aby byl zachován původní poměr emulze. V našem případě bylo naváženo 0,2 g lyofilizátu do vialky a postupně k němu bylo přidáno po 100 μl

destilované vody až do celkového objemu 0,8 ml. Mezi každým přidavkem vody byl vzorek krátce promíchán na vortexu. Rekonstituce byla sledována vizuálně.

10.6 Stanovení uvolňování kurkuminu z lyofilizátu

Připravené formulace emulzí a jejich následná lyofilizace byla studována z hlediska jejich využití jako nosiče aktivní látky, kdy byl zvolen kurkumin, který je lipofilní aktivní látkou. Důležitou vlastností nosičů aktivních látek je jejich schopnost tuto látku uvolňovat v biologickém prostředí (organismu). Proto byla sledována schopnost lyofilizátu uvolňovat kurkumin do média (PBS + Tween 80). Uvolňování kurkuminu ze studovaných formulací bylo sledováno po dobu 72 h, přičemž vzorek lyofilizátu byl umístěn do dialyzační membrány. Množství uvolněného kurkuminu bylo stanoveno spektrofotometricky, kdy jeho koncentrace byla vypočítána pomocí metody kalibrační přímky.

10.6.1 UV-VIS spektrofotometrie pro stanovení koncentrace kurkuminu v médiu

Pro určení koncentrace kurkuminu během jeho uvolňování do média byla použita metoda kalibrační přímky. Bylo tedy nutné připravit sérii kalibračních standardů kurkuminu v médiu. Médium bylo tvořeno fosfátovým pufrům (PBS), ve kterém bylo rozpuštěno 0,5 % Tweenu 80 pro zajištění vyšší lipofility média. Z důvodu špatné rozpustnosti kurkuminu ve vodě (0,1 mg/ml) byl pro přípravu roztoku kurkuminu v médiu zvolen následující postup. Jako výchozí (zásobní) roztok kurkuminu v médiu byl připraven roztok s koncentrací 0,5 mg/ml. Po navážení kurkuminu a doplnění roztoku na příslušný objem, byl roztok míchán na elektromagnetické míchačce po dobu 24 hodin, aby se zajistilo rozpuštění kurkuminu v co nejvyšším rozsahu. Pro ještě lepší rozpuštění kurkuminu byl roztok následně sonikován 2x po dobu 1 min (60% amplituda). Poté byl tento roztok přefiltrován přes předem zvážený stříkačkový mikrofiltr (5 μ m), tak aby byl získán roztok bez nerozpuštěného kurkuminu. Vážkovou analýzou byla získána skutečná koncentrace zásobního roztoku kurkuminu v PBS+Tween 80, která byla 0,4919 mg/ml (v potaz byly vzaty i soli z fosfátového pufru, které vykrytalizovaly na mikrofiltru po jeho uschnutí). Ze zásobního roztoku kurkuminu v PBS+Tween 80 byly dále připraveny kalibrační roztoky o skutečné koncentraci 0,00098 mg/ml; 0,00196 mg/ml; 0,00295 mg/ml; 0,00491 mg/ml, 0,00591 mg/ml, 0,00787 mg/ml a 0,09838 mg/ml.

Jako první bylo změřeno spektrum referenčního vzorku (PBS+Tween 80). Poté bylo provedeno proměření spektra u vzorku obsahujícího médium spolu s kurkuminem o hmotnostní koncentraci 0,4919 mg/ml. Nejvyšší hodnota absorbance byla naměřena při

vlnové délce $\lambda = 424$ nm. Tato hodnota byla poté použita pro určení absorbance u vzorků kalibrační řady a vlastního vzorku uvolněného kurkuminu z lyofilizátu. Výsledná hodnota rovnice spojnice trendu kalibrační řady sloužila dále při stanovení množství uvolněného kurkuminu z lyofilizátu.

10.6.2 Stanovení množství uvolněného kurkuminu z lyofilizátů

Nejprve byla připravena dialyzační membrána rozstříháním na menší části a byla ponechána v destilované vodě po dobu 30 minut. Mezitím bylo naváženo 0,5 g vybraných vzorků lyofilizátů na analytických vahách. Navážky byly následně vloženy do dialyzačních membrán a byl k nim napipetován 1 ml média (PBS+Tween 80). Takto připravené vzorky lyofilizátů v membránách byly vloženy do kádinek, do kterých bylo přidáno dalších 9 ml média (celkový objem média byl tedy 10 ml). Kádinky překryté parafilmem byly poté umístěny na elektromagnetickou míchačku (350 ot./min). Všechny vzorky, které byly sledovány pro uvolňování kurkuminu, byly umístěny ve tmě, aby se předešlo světelné degradaci kurkuminu.

Odebírání vzorků probíhalo v pravidelných intervalech nejprve po půl hodině, poté po hodině (5x) a následně po 24, 48 a 72 hodinách. Vždy byly odebrány 2 ml média a objem byl doplněn opět 2 ml čerstvého média. Po každém odebrání byl vzorek proměřen pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Vzorky byly měřeny při vlnové délce $\lambda = 424$ nm ve třech opakováních. Jejich průměrná hodnota sloužila pro výpočet koncentrace kurkuminu v lyofilizovaném vzorku.

Pro výpočet koncentrace uvolněného kurkuminu v daném čase byla použita rovnice (1). Následně byl určen kumulativní součet vypočítaných koncentrací a vypočítáno kumulativní uvolnění kurkuminu (Rovnice 2).

$$(1) c_k = \frac{\emptyset A - q}{k}$$

$$(2) \% R = \frac{c}{m_k} \times 100,$$

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

$\emptyset A$ – průměrná absorbance

q, k – koeficienty rovnice spojnice trendu uvedené v kapitole 10.6.1

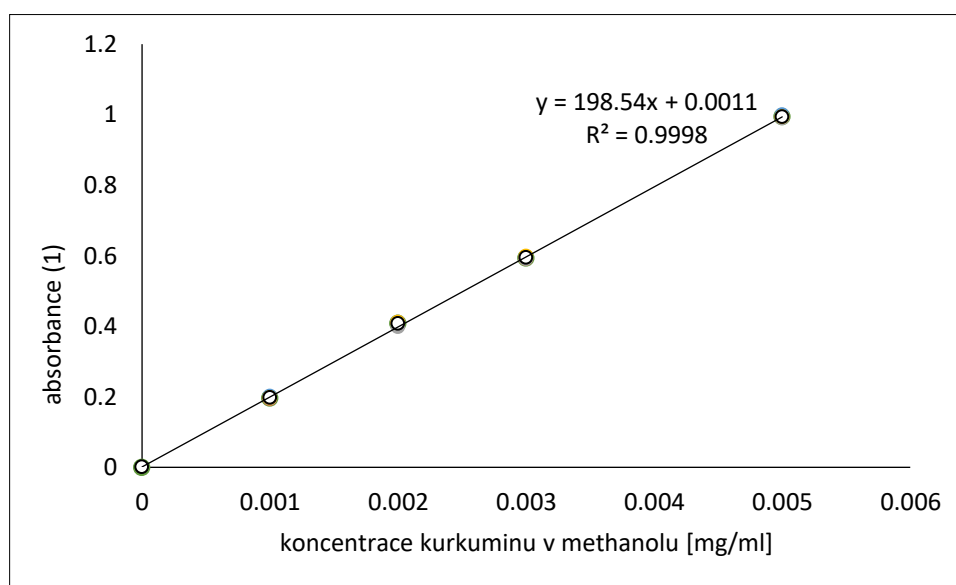
$\% R$ – uvolněné množství kurkuminu [%]

m_k – hmotnost kurkuminu o známé koncentraci vztažená na navážku lyofilizátu

11 VÝSLEDKY A DISKUZE

11.1 Charakterizace olejové fáze s obsahem kurkuminu

Koncentrace kurkuminu v olivovém oleji byla stanovena pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Nejprve byla proměřena kalibrační řada standardů kurkuminu v methanolu. Rovnice kalibrační přímky byla ve tvaru $y = 198,54x + 0,0011$ a faktor spolehlivost R^2 byl 0,9998.



Obrázek 12 Kalibrační křivka kurkuminu rozpuštěného v methanolu.

Vzorky olivového oleje s kurkuminem byly vždy měřeny ve čtyřech opakováních, průměrná hodnota získaných absorbancí byla dosazena do rovnice regrese z kalibrační křivky a následně byla vypočítána skutečná koncentrace kurkuminu v oleji. Toto množství bylo v proměřených vzorcích v rozmezí 0,14–0,38 mg/ml. Oproti původní navážce kurkuminu (0,75 mg/ml) lze vidět úbytek, který může být způsoben manipulací s olejem, jeho možnou tepelnou nebo světelnou degradací či zachycením kurkuminu na stěnách zkušavek po centrifugaci. Olivový olej jako nosič kurkuminu byl nadále použit pro přípravu emulzí.

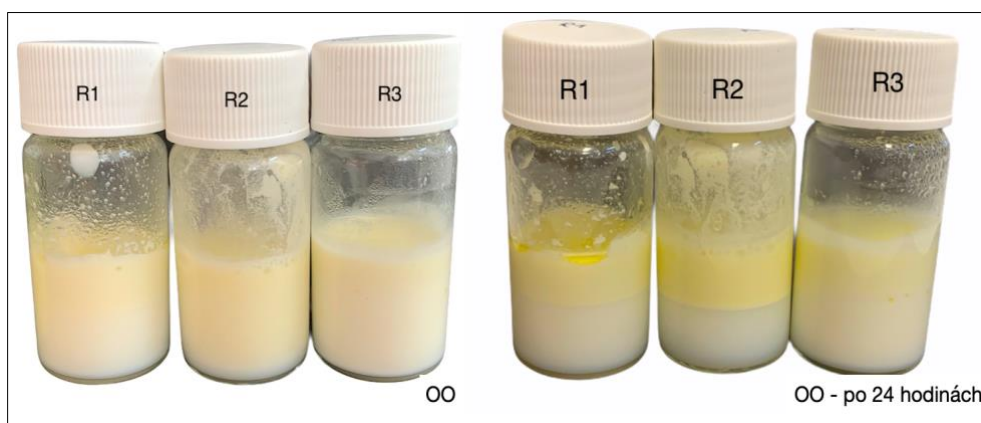
11.2 Charakterizace emulzí

11.2.1 Vizuální hodnocení emulzí stabilizovaných systémem CAS/CNC s přidavkem kryoprotektantů

Vizuálně pozorovány byly vzorky emulzí obsahující olejovou fází s kurkuminem i bez kurkuminu. Rovněž byly připraveny emulze s přidavkem kryoprotektantů i vzorky bez

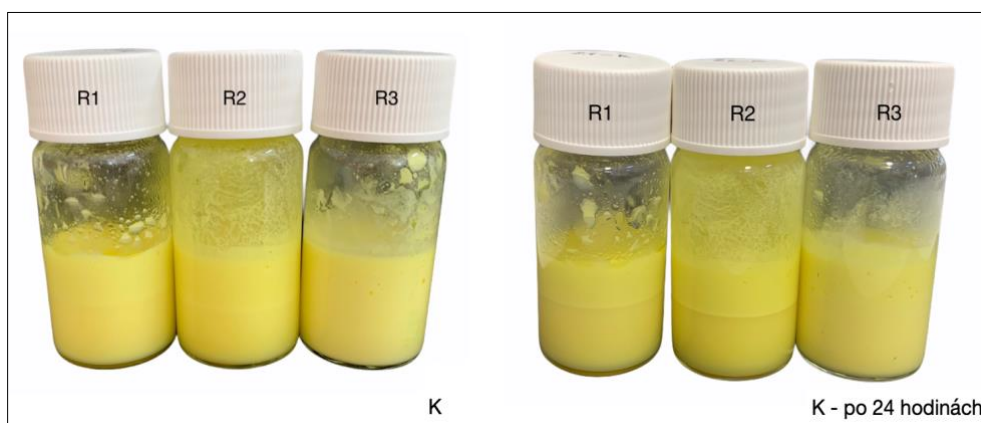
kryoprotektantů. Vizuální hodnocení bylo provedeno nejprve ihned po emulgaci, poté po uplynutí 24 hodin. Výsledky jsou zobrazeny na následujících obrázcích. Emulze obsahující kurkumin jsou označeny písmenem K, emulze bez něj jsou značeny písmeny OO (olivový olej). Způsob cesty přípravy (R1, R2, R3) je zakreslen na víčkách vialek. Případná přítomnost kryoprotektantu a jeho koncentrace je poznačena vždy vpravo dole. Pořízené fotografie byly upraveny v programu PhotoRoom.

Na obrázku 13 jsou vyobrazeny emulze vytvořené třemi rozdílnými cestami popsanými v kapitole 10.3 bez obsahu kurkuminu ve vodné fázi a také bez přídavku kurkuminu. Krátce po emulgaci začalo docházet ke krémování u cesty R1, vzorky vytvořené způsobem R2 a R3 byly homogenní. Po uplynutí 24 hodin došlo ke krémování u vzorků připravených cestou R1 i R2. U vzorku R3 bylo pozorováno slabé krémování.



Obrázek 13 Emulze s olejovou fází bez kurkuminu a bez přídavku kryoprotektantu.

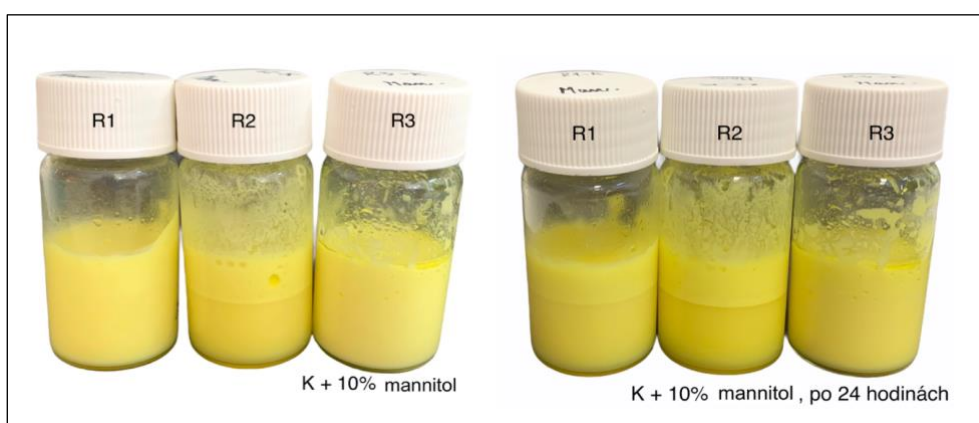
Obrázek 14 dokumentuje emulze vytvořené stejným způsobem, také bez kryoprotektantů, avšak nesoucí enkapsulovaný kurkumin. Po emulgaci začalo docházet ke krémování u vzorků R1 a R2, emulze připravená cestou R3 byla stabilní. Po 24 hodinách došlo k rozdělení fází vzorků R1 a R2, vzorek R3 byl stále stabilní.



Obrázek 14 Emulze s olejovou fází s kurkuminem bez přídavku kryoprotektantu.

Pokud porovnáme vzhled emulzí bez kurkuminu a s kurkuminem bez přídavku kryoprotektantů, můžeme říct, že oba typy emulzí dosáhly stejných výsledků. Po 24 hodinách došlo k jasnému krémování u vzorků připravených způsobem R1 a R2, vzorky R3 byly více homogenní. Vzhledem k faktu, že emulze byly dále používány pro tvorbu lyofilizátů, nebylo cílem pozorování jejich krátkodobé či dlouhodobé stability.

Na obrázku 15 lze vidět emulze s obsahem kurkuminu v olejové fázi a také s přídavkem 10 % mannitolu. Po provedení emulgace docházelo ke krémování vzorku připraveného dle cesty R2, vzorky R1 a R3 byly homogenní. Po uplynutí 24 hodin zůstal homogenní pouze vzorek R3. Emulze s obsahem sacharózy a glukózy vykazovaly stejné chování jako emulze s mannitolem, proto jejich fotografie nejsou zařazeny. Z tohoto krátkodobého pozorování nelze usoudit, zda může mít na stabilitu emulzí vliv přídavek kryoprotektantu, či kurkumin. Můžeme pouze konstatovat, že se podařilo ve všech případech vytvořit emulze, přičemž na jejich nestabilitu (krémování) má vliv především cesta přípravy. I přes krémování byly připravené formulace stabilní a byly následně využity pro lyofilizaci.



Obrázek 15 Emulze s olejovou fází s kurkuminem a přídavkem 10 % mannitolu.

11.2.2 Měření velikosti a distribuce částic

Měření velikosti částic a jejich distribuce byla provedena dle postupu uvedeném v kapitole 10.4.1. Byl vyhodnocován vliv cesty přípravy na velikost emulzních kapek a také ovlivnění velikosti kapek způsobené přítomností kurkuminu a kryoprotektantů ve formulaci.

11.2.2.1 Vliv cesty přípravy emulzí

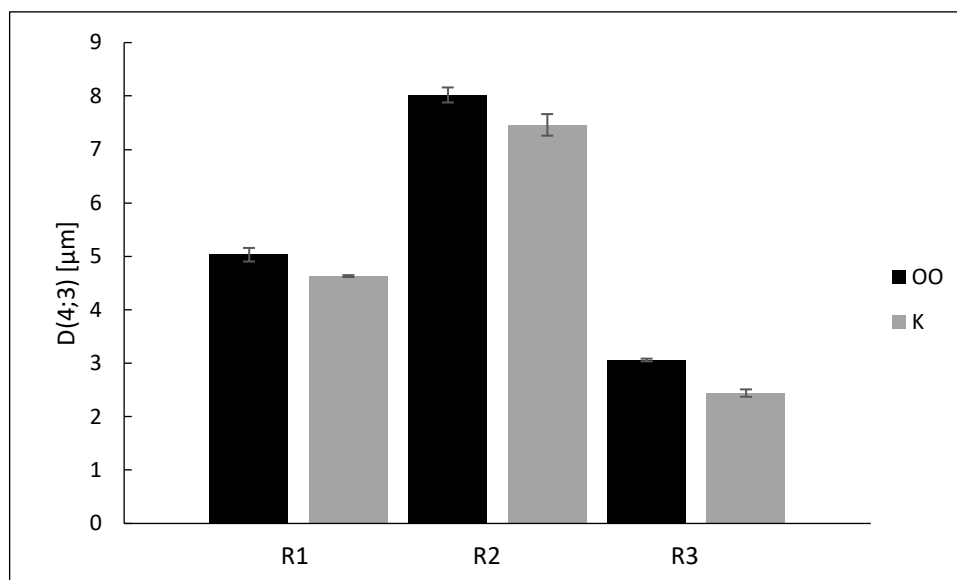
Vliv způsobu přípravy emulzí na velikost jejich kapek byl zkoumán u emulzí bez kurkuminu a s enkapsulovaným kurkuminem.

V Tabulce 1 jsou uvedeny průměrné velikosti emulzních kapek a jejich směrodatné odchylky. U emulzí bez kurkuminu (v tabulce označeno jako OO) lze vidět, že největší velikosti emulzních kapek (8,02 μm) bylo dosaženo při přípravě cestou R2, nejmenší velikosti pak cestou R3 (3,06 μm). Stejný trend byl pozorován i u emulzí s kurkuminem (v tabulce označeno jako K) – největší velikost emulzních kapek měla emulze R2 a nejmenší emulze R3. Velikost kapek závisí na mechanismu stabilizace, tedy na zvolené cestě přípravy. Dle Pindřákové *et al.* (2019) vznikají největší emulzní kapky cestou R2 proto, že množství CAS množství pro pokrytí veškerého oleje není dostatečné, a proto stabilizuje populaci menších emulzních kapek, a pozdější přidání CNC stabilizuje větší kapky, a tím zvyšuje emulgační kapacitu systému. Naopak důvodem vzniku nejmenších kapek cestou R3 je právě pozdější přidavek CAS k emulzi s obsahem CNC a NaCl – v tomto okamžiku dochází ke snížení velikosti emulzních kapek pravděpodobně díky povrchové aktivitě CAS, CNC a CAS tak působí synergicky (Pindřáková *et al.*, 2019). Výsledky uvedené v Tabulce 1 tak korespondují s výsledky z uvedené studie.

Tabulka 1 Průměrná velikost emulzních kapek vyjádřená jako $D(4;3) \pm$ směrodatná odchylka SD [μm]

Cesta přípravy	Typ olejové fáze	
	OO	OO + K
R1	5,03 \pm 0,13	4,63 \pm 0,02
R2	8,02 \pm 0,14	7,46 \pm 0,20
R3	3,06 \pm 0,04	2,44 \pm 0,07

Z porovnání jasně vyplývá, že u emulzí obsahujících kurkumin byla velikost kapek menší než u emulzí bez kurkuminu, a to ve všech případech. Srovnání velikosti kapek je vyobrazeno také na Obrázku 16. Rozdíl ve velikostech je poměrně malý, přesto lze tento trend pozorovat u všech cest přípravy. Je patrné, že kurkumin v tomto případě není pouze bioaktivní látkou, ale přispívá ke stabilizaci emulzí. Schopností kurkuminu přispívat ke stabilizaci emulze se zabýval Aditva *et al.* (2017), který zjistil, že kurkumin snižuje mezifázové napětí a tím usnadňuje přípravu emulzí a zvyšuje její stabilitu (Aditva *et al.*, 2017).



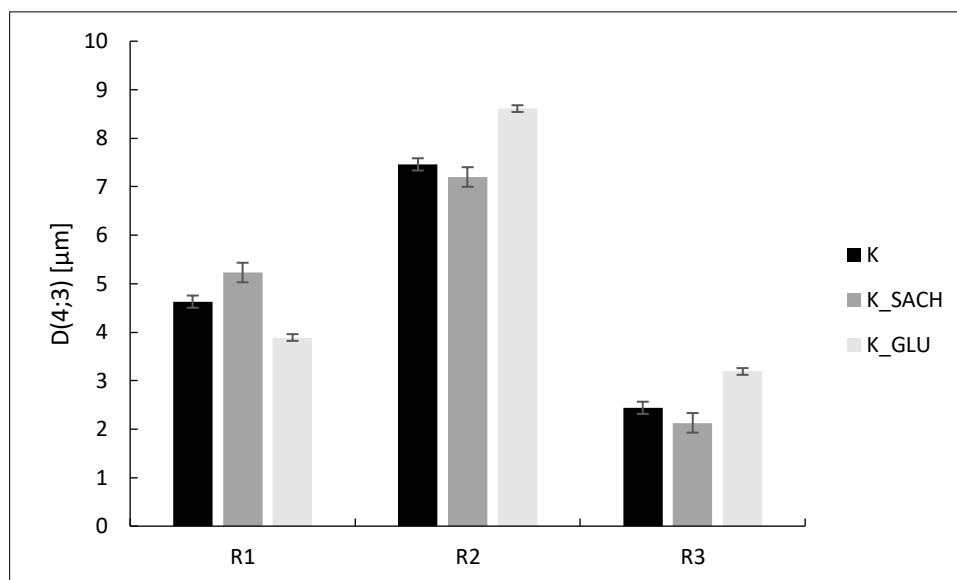
Obrázek 16 Vliv cesty přípravy emulzí na velikost emulzních kapek (OO – olejová fáze s olivovým olejem; K – olejová fáze s olivovým olejem a kurkuminem).

11.2.2.2 Vliv kryoprotektantů

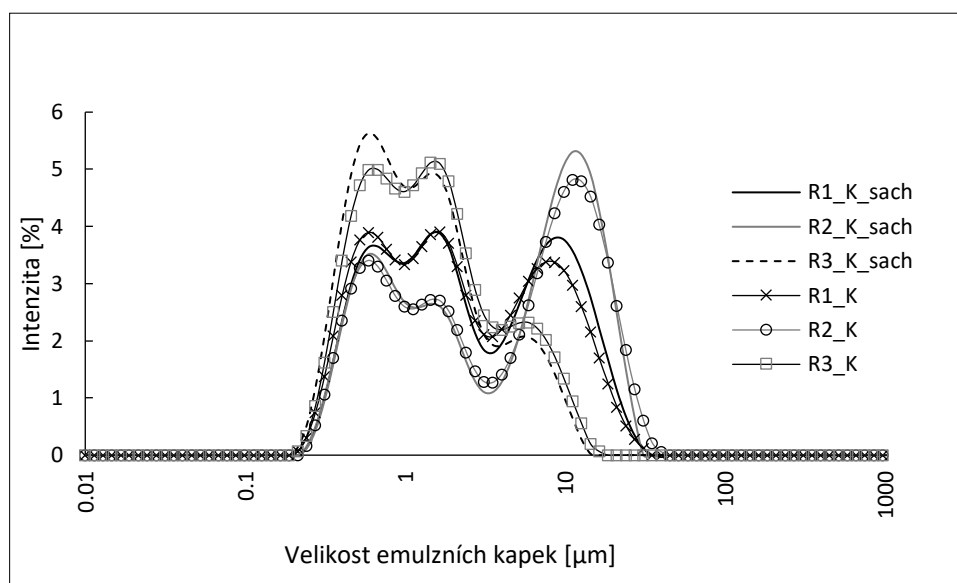
Vliv kryoprotektantů na velikost emulzních kapek byl pozorován u emulzí s obsahem kurkuminu a přísadkou 10 % mannitolu, 10 % glukózy a 10 % sacharózy. Emulze obsahující mannitol nebylo možné proměřit z důvodu výrazné agregace kapek, proto nejsou výsledky z tohoto měření uvedeny. Měření velikosti emulzních kapek na přístroji Mastersizer bylo těmito agregáty znehodnoceno, bylo potřeba neustálého čištění přístroje, a ani přesto nebyly výsledky uspokojivé.

Pokud porovnáme vliv cesty příprav na velikost kapek emulzí s kryoprotektantem, tak obecně největší kapky vznikaly při přípravě cestou R2, nejmenší kapky pak cestou R3. Tyto výsledky korespondují s výsledky emulzí bez přísady kryoprotektantu, které byly prezentovány v kapitole o vlivu cesty přípravy.

Na Obrázku 17 je zobrazeno porovnání velikosti emulzních kapek s kurkuminem bez kryoprotektantu i s kryoprotektanty. Přídavek 10 % sacharózy do emulze nezapříčinil přílišné rozdíly mezi velikostí kapek emulzí se sacharózou a emulzí bez kryoprotektantu. Což lze vidět i na Obrázku 18, kde jsou zobrazeny distribuční křivky těchto emulzí. Je zřejmé, že přídavek sacharózy neovlivňuje velikost emulzních kapek žádným způsobem, ani se nepodílí na stabilizačním mechanismu emulzí, protože distribuční křivky emulzí jsou téměř totožné. Ve všech případech můžeme pozorovat tři populace částic, přičemž vliv cesty přípravy zůstává zachován.

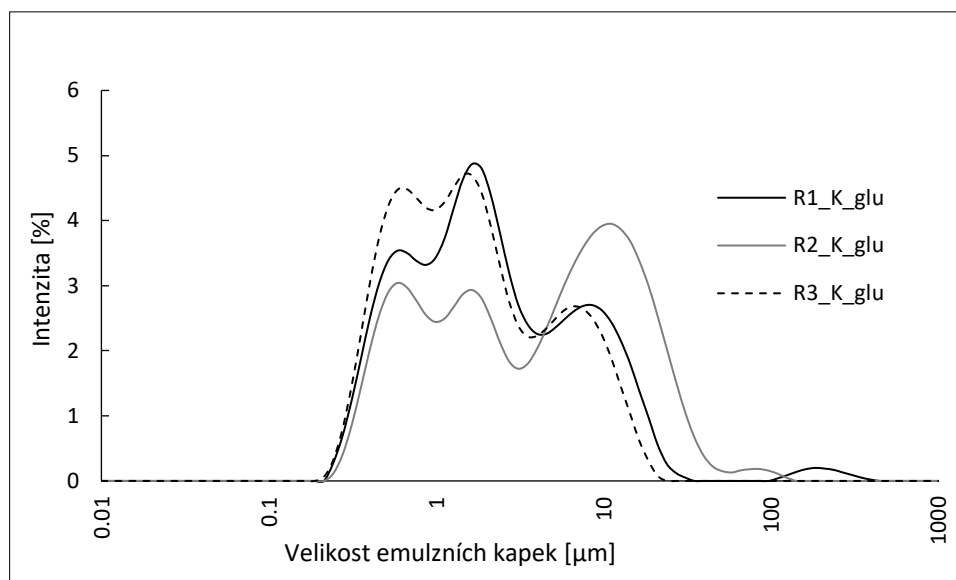


Obrázek 17 Porovnání vlivu přidavku kryoprotektantu glukózy (GLU) a sacharózy (SACH) na velikost emulzních částic, K značí obsah kurkuminu v emulzi.



Obrázek 18 Distribuce velikosti emulzních kapek připravených cestami R1, R2 a R3 s přidavkem kryoprotektantu sacharózy (sach) a bez kryoprotektantu. K značí obsah kurkuminu v emulzi.

Glukóza (10 %) ve formulaci ovlivnila velikost emulzních kapek výrazněji, pokud porovnáme parametr $D(4; 3)$, tak cestou přípravy R1 vznikly kapky menší, cestou přípravy R2 a R3 kapky větší, než jaké se vyskytovaly u emulzí bez kryoprotektantů. I přesto, stejně jako u emulzí bez kryoprotektantu nebo emulzí se sacharózou, mají distribuční křivky trimodální charakter (obrázek 19).



Obrázek 19 Distribuce velikosti emulzních kapek připravených cestami R1, R2 a R3 s přidavkem kryoprotektantu glukózy (glu). K značí obsah kurkuminu v emulzi.

Nicméně rozdíly vliv kryoprotektantu na velikost emulzních kapek nebyl příliš zásadní. Stále platí, že vlastnosti emulzí nejvíce ovlivňuje zvolená cesta přípravy.

11.2.3 Popis mikrostruktury

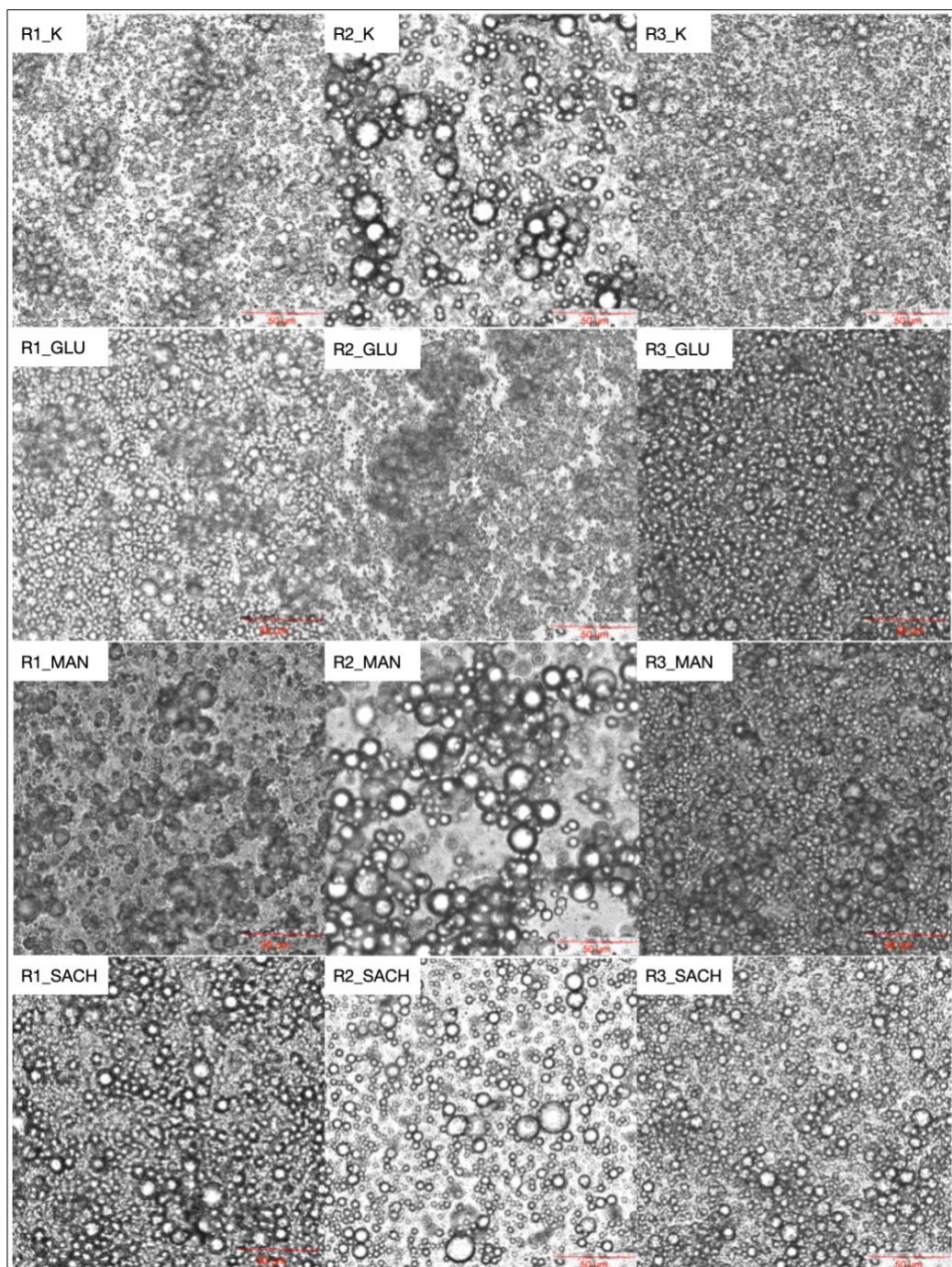
Na Obrázku 20 jsou zachyceny mikrostruktury výše popsaných připravených emulzí. Vrchní řádek představuje emulze bez kryoprotektantu připravených různými cestami (zleva R1, R2, R3). Emulze R1_K není homogenní, objevují se v ní shluky kapek, můžeme rovněž pozorovat více populací emulzních kapek. Emulze R2_K obsahuje více populací kapek o výrazně rozdílných velikostech a taktéž není homogenní, lze vidět výrazné floky emulzních kapek. Emulze R3_K je nejvíce homogenní, netvoří se floky, a velikost emulzních kapek se liší minimálně, přičemž je výrazně nižší než v případě R2-K. Toto pozorování je v korelaci s výsledky měření velikosti emulzních kapek a jejich distribučními křivkami.

Na druhém řádku jsou emulze s obsahem 10 % glukózy. Mikroskopické pozorování těchto emulzí odhalilo flokulaci, na kterou nepoukázaly distribuční křivky. Konkrétně se flokulace vyskytla u emulze připravené cestou R1 (R1_GLU), která je flokulovaná pouze mírně, naopak emulze R2_GLU je flokulovaná ve velkém rozsahu, avšak lze si všimnout emulzních kapek o velmi nízké velikosti. Emulze R3_GLU je naopak homogenní (jak ve velikosti kapek, tak ve struktuře).

Emulze obsahující 10 % mannitolu jsou zobrazeny na druhém řádku odspodu. Emulze R1_MAN tvoří poměrně velké kapky, které se shlukují. Emulze R2_MAN působí nekonzistentně a je tvořena největšími emulzními kapkami. Emulze R3_MAN je víc homogenní než emulze R1_MAN, avšak také její kapky tvoří shluky. U emulzí s přidavkem

mannitolu (R1 a R3) lze pozorovat poměrně hustou, soudržnou síť emulzních kapek, což mohlo způsobit komplikace při měření jejich velikosti laserovou difrací (Mastersizer), kdy tuto kompaktní síť nebylo možné rozdispergovat v dispergační jednotce „hydro“.

Poslední zkoumanou sadou emulzí byla sada s 10 % sacharózy, které jsou vyobrazeny na posledním řádku. U emulze R1_SACH je pozorovatelná mírná flokulace, emulze R2_SACH obsahuje více populací kapek, avšak je bez výskytu shluků. Emulze R3_SACH je tvořena také více populacemi kapek, které nejsou flokulované.



Obrázek 20 Mikrostruktura emulzí připravených cestami R1, R2, R3 bez/s obsahem kryoprotektantů (měřítko je 50 µm).

Porovnáním všech emulzí vyplývá, že nejvíce homogenní emulze vznikaly při cestě přípravy R3, čemuž odpovídají i výsledky z předcházející kapitoly (nejmenší emulzní kapky vznikly právě cestou přípravy R3). Dále je z fotografií patrné, že neoptimálnějších výsledků bylo dosaženo při použití kryoprotektantu sacharózy, kdy nedocházelo k flokulaci a agregaci částic. Proto byly vytvořeny i emulze obsahující 5 a 15 % sacharózy. Fotografie nejsou zařazeny, jelikož odpovídaly fotografiím emulzí s 10 % sacharózy.

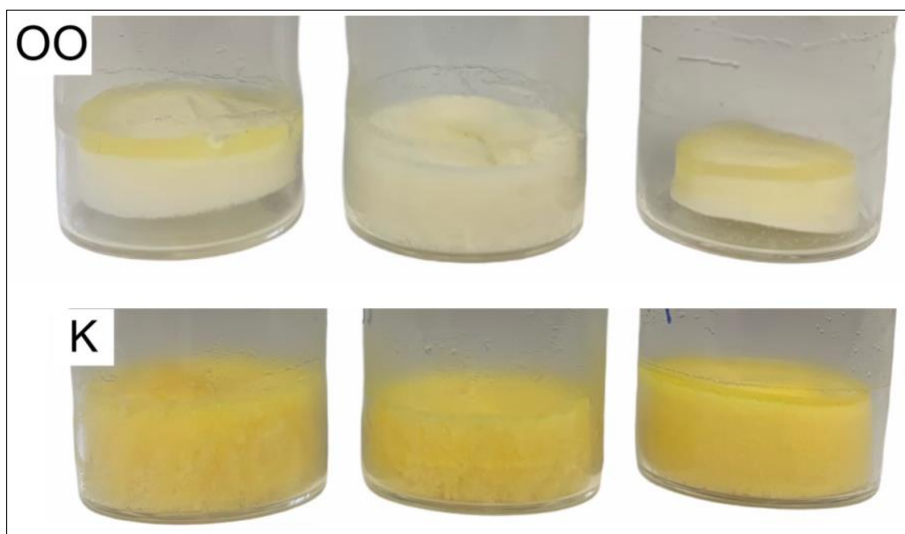
11.3 Charakterizace lyofilizátů

Lyofilizace emulzí byla provedena postupem uvedeným v kapitole 10.3.1. Nejprve byly lyofilizáty zhodnoceny vizuálně a následně byly vybrány vzorky k SEM analýze pro zjištění mikrostruktury. Analýza SEM byla provedena u vzorků lyofilizátů, které byly vyhodnoceny vizuálním pozorováním nejlépe.

11.3.1 Vizuální hodnocení lyofilizátů

Z literatury vyplývá, že správný lyofilizát má tvar koláče bez propadlého či vypouklého středu, dotýká se stěn vialky tzn. není smrsklý a nejsou u něj pozorovatelné oddělené fáze původní emulze (Ray & May, 2016). Stejným způsobem byly zhodnoceny i vzorky námi studovaných lyofilizátů.

Na Obrázku 21 jsou zobrazeny lyofilizáty emulzí bez přídavku kryoprotektantů, nahoře bez kurkuminu v olejové fázi, dole s obsahem kurkuminu připravených cestami R1, R2 a R3. Lepší produkty lyofilizace vznikly z emulzí s přídavkem kurkuminu. Tyto lyofilizáty jsou kompaktní, mají koláčový tvar a nemají oddělené fáze. U lyofilizátů z emulzí R1 a R2 lze pozorovat lehce zborcenou strukturu, lyofilizát R3_K je prakticky bez vady. Oproti tomu lyofilizáty bez kurkuminu mají zborcenou strukturu, oddělený olej a jsou smrsklé. Tímto pozorováním lze potvrdit, že kurkumin přispívá ke stabilizaci systému nejen při emulgaci, ale také při následné lyofilizaci.

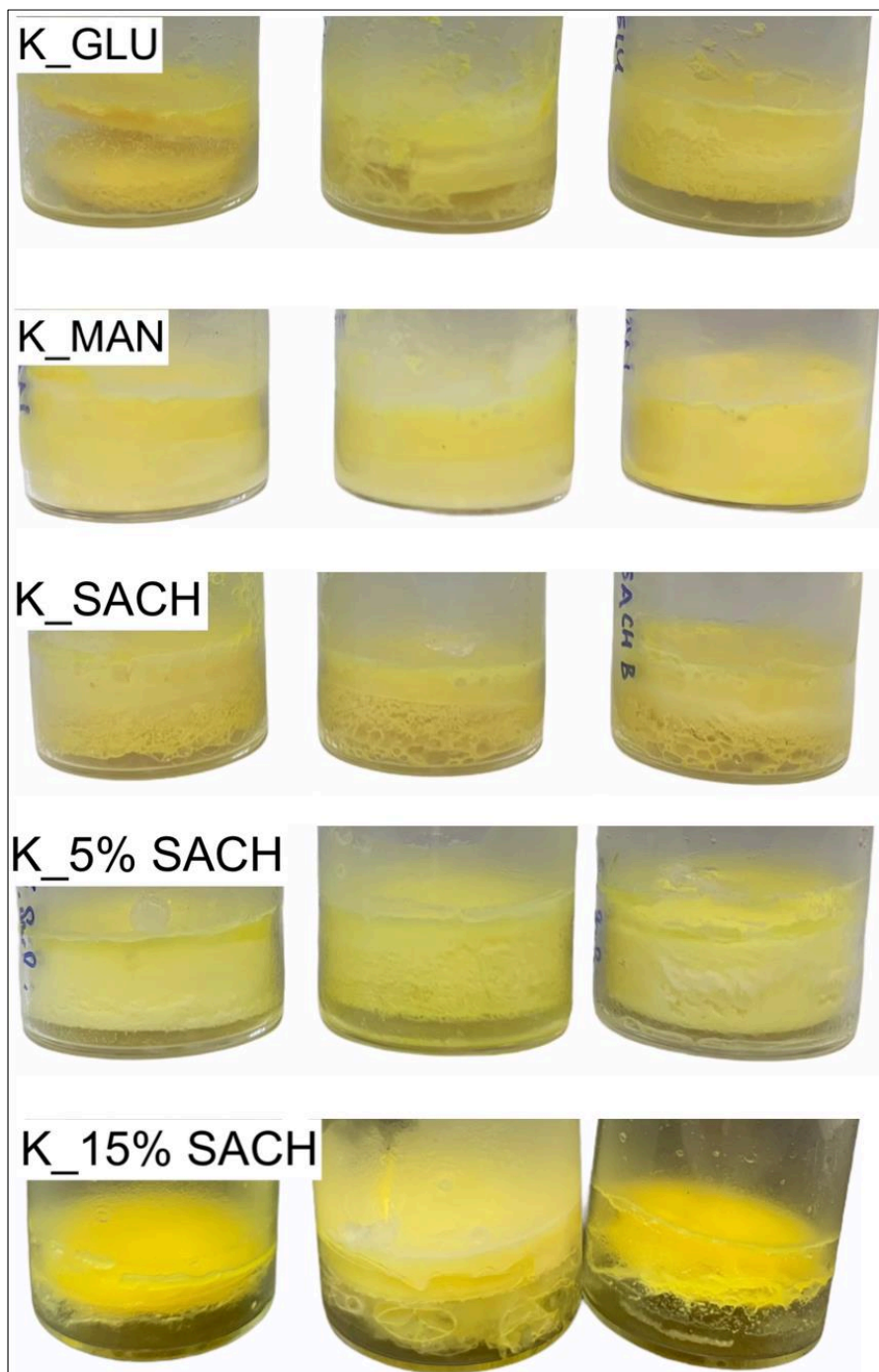


Obrázek 21 Vzhled lyofilizátů z emulzí připravených cestou: zleva R1, R2, R3. OO značí olejovou fázi z olivového oleje, K značí olejovou fázi s přidavkem kurkuminu.

Obrázek 22 srovnává vliv kryoprotektantů na vzhled lyofilizátů zohledňující cestu přípravy emulzí. Na prvním řádku jsou lyofilizáty s přidavkem 10 % glukózy řazeny dle cesty přípravy emulzí zleva R1, R2 a R3. U lyofilizátů R1_GLU a R2_GLU je zborcená či zcela rozpadlá struktura, lyofilizát R3_GLU má vzhled koláče a je nejvíce kompaktní. Lyofilizáty s obsahem 10 % mannitolu byly celistvé, bez zborcené struktury bez oddělených fází. Rozdíl mezi cestami R1, R2 a R3 nebyl pozorován. Důvodem vzniku takových lyofilizátů byla pravděpodobně struktura emulze, ze které lyofilizáty vznikly. Emulze s mannitolem vytvářely hustou a kompaktní síť, což mohlo přispět ke vzniku kvalitního lyofilizačního produktu. Lyofilizáty s přidavkem sacharózy byly vytvořeny z emulzí, které obsahovaly 5, 10 a 15 % tohoto kryoprotektantu. Nejlepších produktů lyofilizace bylo dosaženo při koncentraci 5 % sacharózy. Lyofilizáty s 10 a 15 % sacharózy měly oddělenou olejovou fázi a rozpraskanou spodní část struktury. Koncentrace kryoprotektantu a její vliv na stabilitu systému zkoumal Abdelwahed et al. (2006), dle kterého může vysoká koncentrace kryoprotektantu (po dosažení limity stabilizace) systém destabilizovat. Tomuto tvrzení odpovídají i naše výsledky, kdy koncentrace 10 % a 15 % sacharózy způsobila vznik horších produktů, než použití nižší 5% hmotnostní koncentrace.

Při bližším zkoumání byly zjištěny rozdíly i v textuře lyofilizátů. Například lyofilizáty pouze s kurkuminem bez kryoprotektantu měly pěnovou strukturu, lyofilizáty s 5 % sacharózy měly jemnou texturu bez velkých částec s voskovým omakem. Textura lyofilizátů s 10 % mannitolu byla podobná jemnému pevnému prášku, u kterého docházelo po rozpracování k tání. Lyofilizáty s 10 % glukózy měly texturu cukrové vaty, která se po rozpracování tavně do olejových částec. Vliv na rozdíly v textuře mohly být

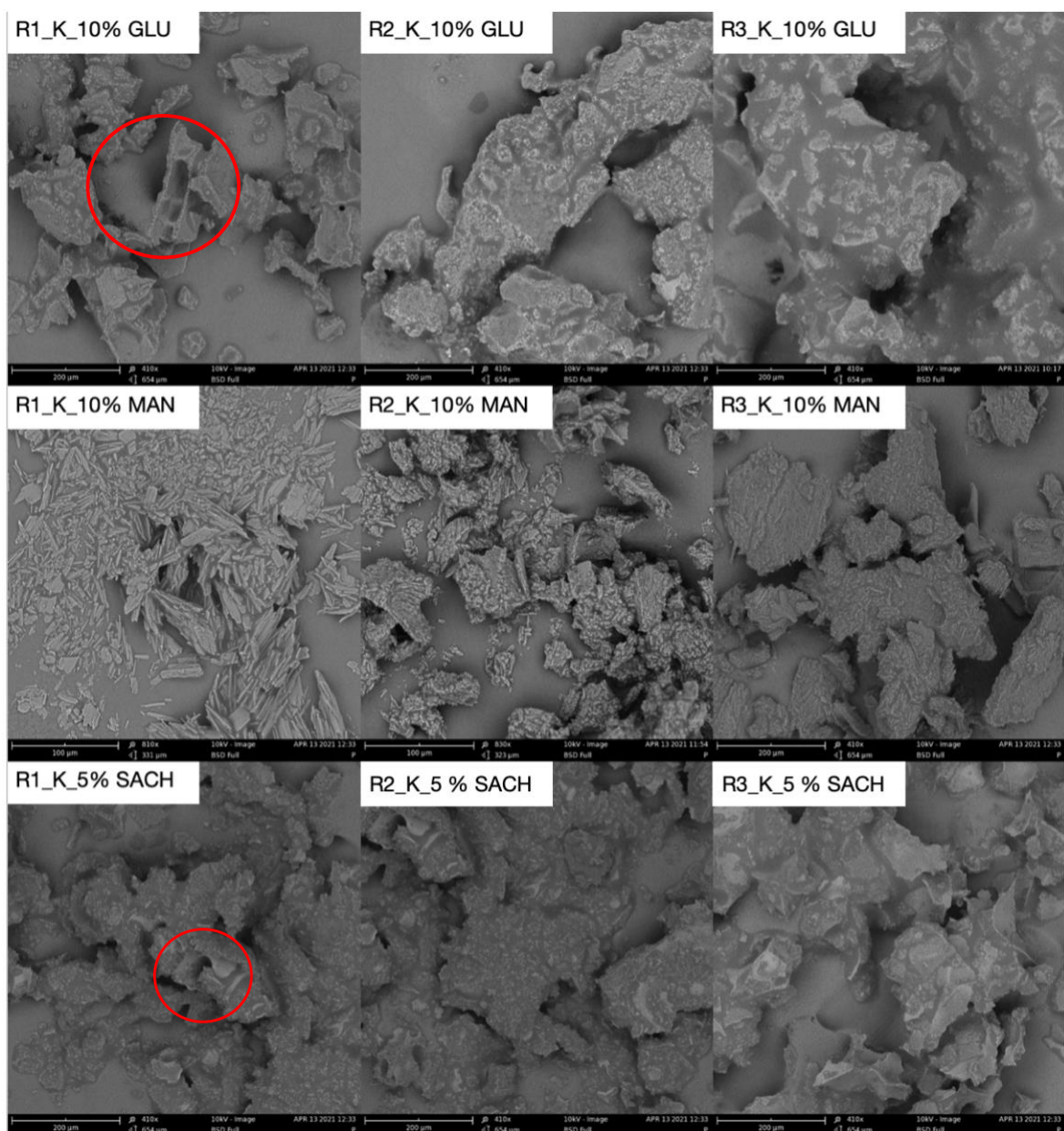
pravděpodobně způsobeny rozdílnou strukturou samotných kryoprotektantů (velikost jejich krystalů). D-mannitol byl do emulzí přidáván v podobě velmi jemného prášku, sacharóza byla tvořena krystalky o velikosti kuchyňské soli a největší krystaly tvořila glukóza.



Obrázek 22 Vzhled lyofilizátů z emulzí připravených cestou: zleva R1, R2, R3 s přidavkem daných kryoprotektantů. K značí přítomnost kurkuminu v olejové fázi.

11.3.2 Mikrostruktura lyofilizátů

Mikrostruktura lyofilizátů byla pozorována pomocí SEM analýzy při zvětšení 410x a zrychlovacím napětí 10 kVA. Na Obrázku 23 jsou zobrazeny výsledky analýzy pro lyofilizáty s kurkuminem a přísadkou kryoprotektantů – 10 % glukózy, 10 % mannitolu a 5 % sacharózy. Výsledky SEM analýzy korespondují s vizuálním hodnocením lyofilizátů. Na první pohled lze rozlišit strukturu lyofilizátů s mannitem od lyofilizátů s glukózou nebo sacharózou – jeho struktura je více krystalická, prášková. Lyofilizáty s obsahem glukózy a sacharózy tvoří naopak kompaktní strukturu. Povrch a struktura lyofilizátů tak odráží vlastnosti krystalů kryoprotektantů.



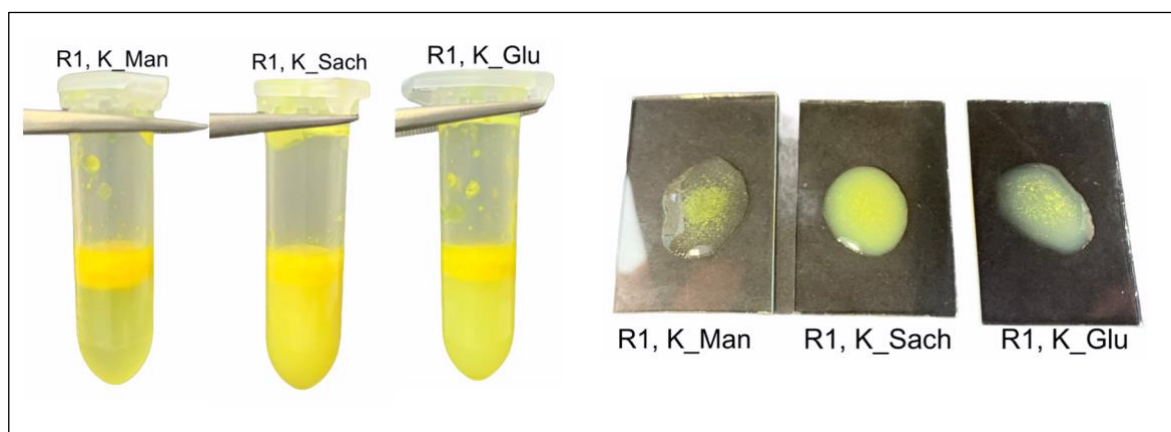
Obrázek 23 SEM analýza vybraných lyofilizátů z emulzí připravených cestou R1, R2, R2 s přísadkou kryoprotektantů, K značí přítomnost kurkuminu v olejové fázi emulze.

Na tomtéž obrázku ve vyznačeném poli (lyofilizát R1_K_10 % Glu) lze pozorovat emulzní klastr tvořený asi čtyřmi kapkami oleje obklopenými pevnými částicemi. Dále se podařilo zachytit emulzní kapku u lyofilizátu R1_K_5 % SACH. Díky tomuto vyobrazení se dá konstatovat, že emulzní struktura byla zachována v matrix lyofilizátu i po lyofilizaci.

11.3.3 Rekonstituce

Rekonstituce byla provedena dle postupu v kapitole 10.3.5. Ačkoliv byl dodržen doporučený postup dle Wang (2000) a to takový, aby byla k lyofilizátům voda dávkována postupně a ne najednou, nebylo dosaženo uspokojivých výsledků. Po rehydrataci docházelo k silné agregaci emulzních kapek s následnou separací fází emulze na olej a vodu. Výsledky rekonstituce jsou zobrazeny na obrázku 24.

Pro názornost byly vybrány lyofilizáty z emulzí připravených stejnou cestou R1 obsahujících vždy jiný kryoprotektant o hmotnostní koncentraci 10 %. Je mezi nimi patrný rozdíl – nejúspěšnější rekonstituce, a tedy nevíce homogenní emulze vznikla z lyofilizátu se sacharózou. Následovala emulze z lyofilizátu s glukózou a nejvíce separované fáze byly pozorovány u emulze vzniklé z lyofilizátu obsahujícího mannitol. Z tohoto pozorování můžeme usoudit, že zvolené formulace nejsou vhodné pro rekonstituci zpět na emulzní systém.

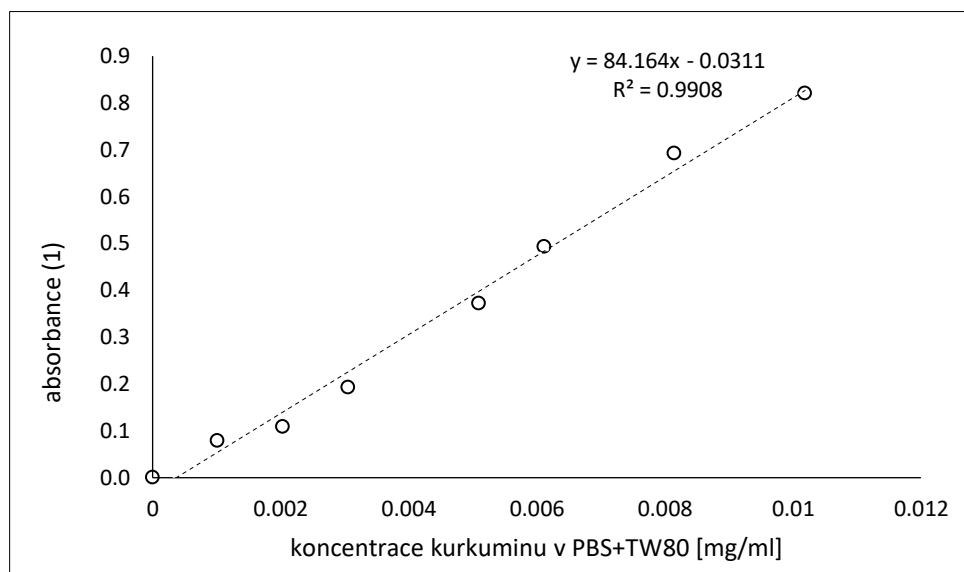


Obrázek 24 Vzhled rekonstituovaných emulzí. Zleva přidavek 10 % mannitolu, 10 % sacharózy a 10 % glukózy.

11.4 Uvolňování kurkuminu

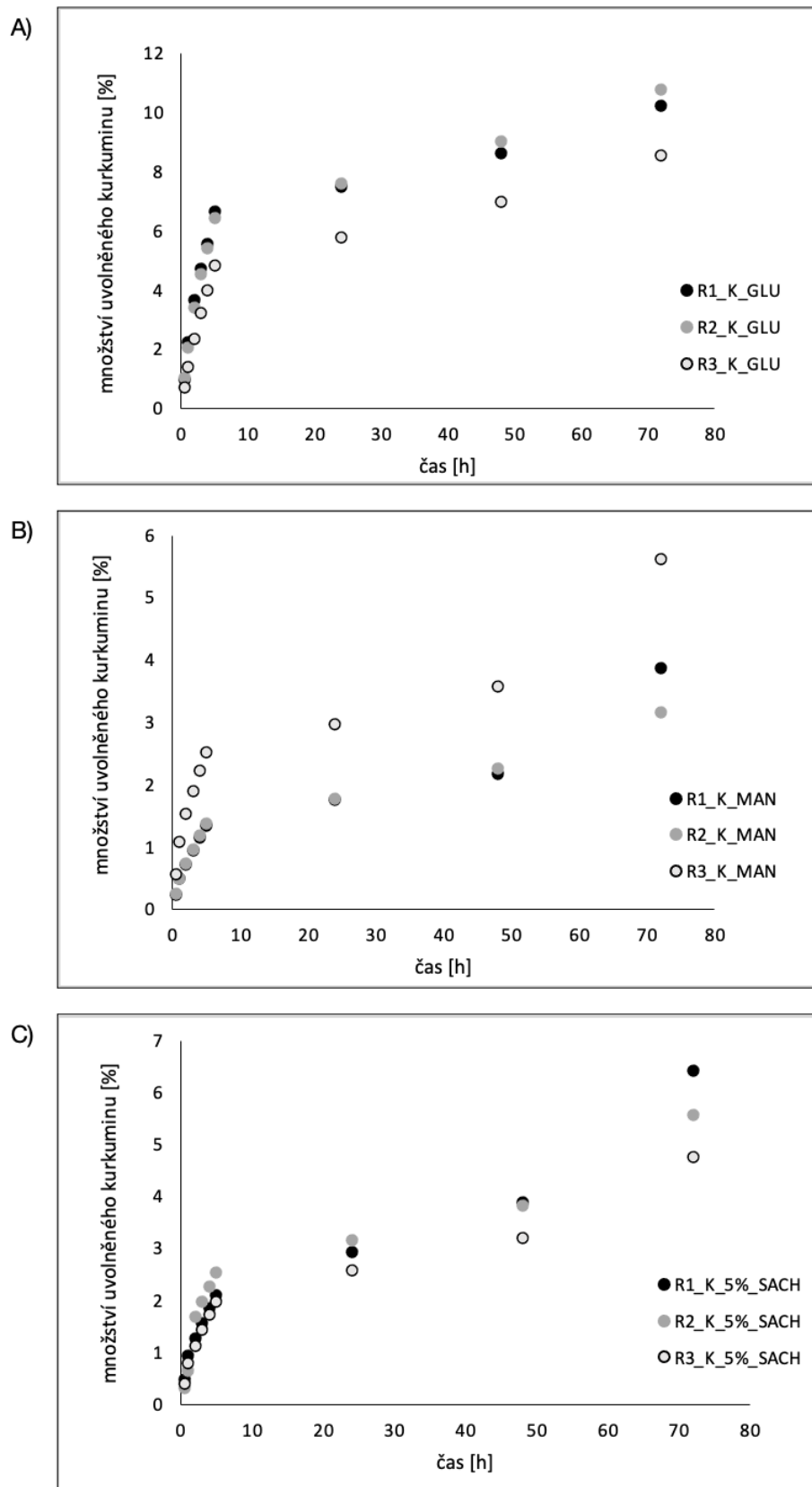
Aby mohlo být stanoveno množství uvolňovaného kurkuminu z lyofilizátu, byla jako první provedena kalibrace metodou kalibrační přímky (Obrázek 25), kdy byly pomocí UV-VIS spektrofotometrie proměřeny absorbance kalibračních roztoků kurkuminu v PBS+Tween 80, ze závislosti absorbance na koncentraci roztoku byla získána rovnice

lineární regrese ve tvaru $y = 84,164x - 0,0311$ s hodnotou spolehlivosti R^2 0,9908. Tato rovnice byla následně využita pro výpočet uvolněného kurkuminu do média (PBS + Tween 80) v průběhu 72 h. Vzorke uvolněného kurkuminu v PBS+TW 80 byly proměřeny ve čtyřech opakováních. Výsledné konstanty rovnice regrese (k; q) byly následně použity pro výpočet uvolněného množství kurkuminu z lyofilizátů podle výpočtů rovnic (1) a (2) uvedených v kapitole 10.6.2. Koncentrace kurkuminu byla následně přepočítána na procenta z celkového množství kurkuminu v 0,5 g lyofilizátu, který byl navážen pro stanovení uvolňování.



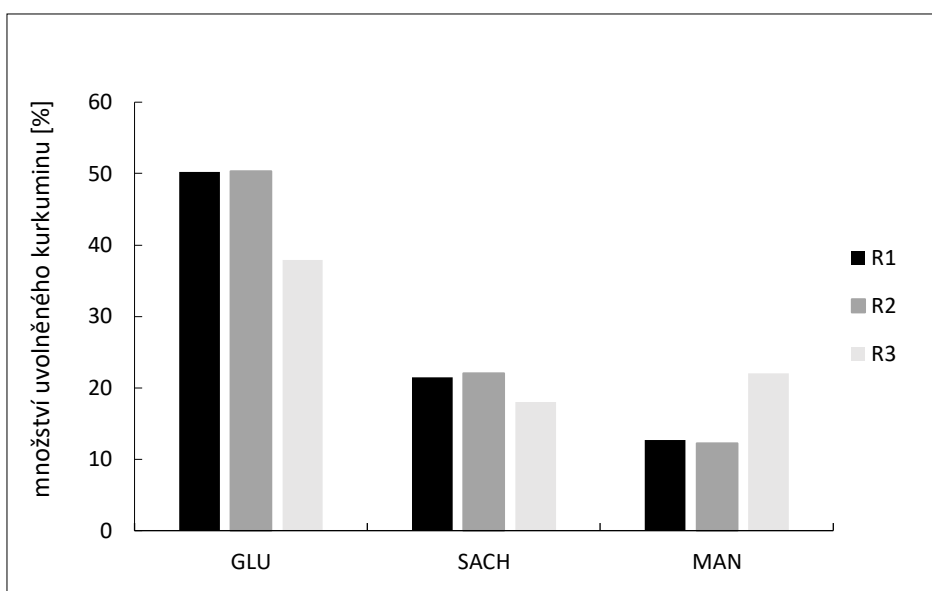
Obrázek 25 Kalibrační křivka kurkuminu rozpuštěného v PBS+TW 80.

Na obrázku 26 jsou vyobrazeny grafy závislosti množství uvolněného kurkuminu v průběhu 72 h z rozdílných lyofilizátů. Na Obrázku 25 A) jsou uvedeny výsledky lyofilizátů s 10 % glukózy z emulzí připravených cestou R1, R2 a R3. Je patrné, že rozdíl mezi R1_K_GLU a R2_K_GLU je zcela minimální a uvolňování probíhá stejně. Lyofilizát R3_K_GLU uvolňuje naopak nejméně kurkuminu. Stejný trend je patrný i u lyofilizátů s 5 % sacharózy, avšak rozdíl mezi cestami je zde ještě menší, projevuje se až po 72 hodinách. Naopak lyofilizáty s 10 % mannitolu uvolňují nejvíce, pokud byly připraveny cestou R3, méně pak cestou R1 a R2. Také u těchto lyofilizátů dochází k uvolňování v nejmenším rozsahu, nejvíce je uvolňován kurkumin ze systémů s obsahem glukózy.



Obrázek 26 Vliv času na uvolňování kurkuminu z lyofilizátu s ohledem na cestu přípravy emulzí (R1, R2, R3) a přidavkem kryoprotektantu. A) 10 % glukózy, B) 10 % mannitolu, C) 5 % sacharózy.

Na obrázku 27 lze porovnat celkové množství uvolněného kurkuminu po 72 hodinách uvolňování kurkuminu z lyofilizátů s rozdílnými kryoprotektanty. Nejvíce uvolněného kurkuminu bylo dosaženo při použití glukózy jako kryoprotektantu, nejméně za přítomnosti mannitolu v systému. I tady je patrné, že vliv cesty přípravy emulzí na uvolňování kurkuminu z lyofilizátů nebyl pozorován, cesty R1 a R2 se téměř u stejných kryoprotektantů nelišily. Cesta R3 za přítomnosti glukózy a sacharidu způsobila snížení uvolňování, u mannitolu došlo k navýšení uvolňování kurkuminu. Maximální množství uvolněného kurkuminu bylo dosaženo u lyofilizátu R2_GLU, kdy toto množství činilo 50,4 % původního množství kurkuminu v lyofilizátu. Nejnižší maximální množství kurkuminu bylo uvolněno z lyofilizátu R2_MAN, konkrétně se jednalo o 12,2 %.



Obrázek 27 Porovnání závislosti celkového množství uvolněného kurkuminu na přítomnosti kryoprotektantu s ohledem na použitou cestu přípravy emulzí.

Uvolňování kurkuminu závisí na úspěšnosti jeho enkapsulace. O té svědčí i barevnost lyofilizátů – více barevný lyofilizát obsahuje více neenkapsulovaného oleje s kurkuminem, a je tedy vyšší uvolňování (Guo *et al.*, 2020). Při pohledu zpět do kapitoly 11.3.1 na obrázek 22 lze vidět, že více žluté byly lyofilizáty s přídavkem glukózy, čemuž odpovídá i nejvyšší množství uvolněného kurkuminu. Z výsledků je patrné, že na uvolňování kurkuminu nemá vliv cesta přípravy emulze, ale patrně největší vliv má použitý kryoprotektant. Uvolňování kurkuminu u emulzí stabilizovaných systémem CNC/CAS tedy nelze kontrolovat původním složením emulze (cesta R1, R2 a R3), ale především typem kryoprotektantu (Glu, Man, Sach). I přesto lze vidět, že studované systémy jsou vhodné pro pozvolné uvolňování kurkuminu.

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala přípravou Pickeringových emulzí stabilizovaných nanocelulózovými částicemi a kaseinátem sodným s enkapsulovanou aktivní látkou kurkuminem. Do emulzí byly přidány kryoprotektanty D-mannitol, D-glukóza a sacharóza pro jejich následnou lyofilizaci. Poté byla provedena charakterizace produktů lyofilizace, přičemž pozornost byla zaměřena na určení mikrostruktury lyofilizátů, jejich rekonstituce a schopnost uvolňování aktivní látky kurkuminu.

Emulze byly připraveny třemi různými cestami (R1, R2 a R3) vždy s jedním druhem kryoprotektantu (D-mannitol, D-glukóza, sacharóza) či bez něj. Připraveny byly sady s olejovou fází s obsahem kurkuminu i bez něj.

Měřením velikosti emulzních částic pomocí laserové difrakce bylo zjištěno, že velikost emulzních kapek závisí více na zvolené cestě přípravy než na přítomnosti kryoprotektantu. Nejžádanější jsou u emulzí rozměry co nejmenší, čehož bylo dosaženo při přípravě cestou R3. Lze tedy říct, že je vhodné emulzi nejprve stabilizovat pomocí celulózových nanokrystalů (tj. Pickeringovou stabilizací) a posléze snížit mezipovrchové napětí přidáním povrchově aktivního proteinu kaseinátu sodného. Porovnáním emulzí s kurkuminem a bez kurkuminu bylo zjištěno, že emulze obsahující kurkumin byly složeny z menších emulzních kapek, z čehož vyplývá, že kurkumin nezastává roli pouze bioaktivní látky, ale přispívá ke stabilizaci emulzního systému.

Dalším krokem bylo pozorování mikrostruktury emulzí, které nám potvrdilo výsledky z měření velikosti emulzních kapek. Emulze připravené cestou R3 měly strukturu husté kompaktní sítě s nejmenšími emulzními kapkami. Největší emulzní kapky a nejvíce flokulovaná struktura byla pozorována přípravou R2, čemuž opět odpovídaly výsledky z laserové difrakce. Nejméně flokulované a zároveň nejvíce kompaktní působily emulze s přídavkem 10 % sacharózy.

Následně byla provedena lyofilizace všech emulzí. Vizuálním hodnocením byly pro další práci vybrány dle literatury neoptimálnější lyofilizáty. Porovnáním lyofilizátů bez kurkuminu a s kurkuminem byla potvrzena schopnost kurkuminu podílet se na stabilizaci systému – lyofilizáty s kurkuminem měly nezborcenou strukturu a nedocházelo u nich k oddělování olejové fáze. Přídavek kryoprotektantů sehrál důležitou roli při vzniku lyofilizátů. Viditelně nejlepších výsledků bylo dosaženo u lyofilizátů s 10 % mannitolu. Koláče byly celistvé, nebylo pozorováno smrsknutí či dělení fází. Důležitá byla i samotná koncentrace kryoprotektantů. Bylo zjištěno, že při dosažení tzv. limity stabilizace může

kryoprotektant působit naopak destabilizačně. Při použití sacharózy byla nižší koncentrace, konkrétně 5 %, účinnější než vyšší koncentrace. Lyofilizáty s 5 % sacharózy měly jednotnou strukturu, kdežto vyšší koncentrace způsobovaly větší pórovitost, dělení olejové fáze a zborcenou strukturu.

Při mikroskopické analýze vybraných lyofilizátů byla studována jejich mikrostruktura. Povrch a struktura lyofilizátů odrážely vlastnosti krystalů kryoprotektantů. Jemné drobné krystaly mannitolu daly vzniknout práškovým lyofilizátům, kdežto větší krystaly glukózy a sacharózy vytvářely lyofilizáty s kompaktní strukturou.

Byla také provedena zkouška rekonstituce lyofilizátů, která nevedla k žadáným výsledkům. Rehydratace způsobovala separaci fází, přičemž byly viditelné rozdíly v závislosti na použitém kryoprotektantu. Lze tedy říct, že zvolené formulace nejsou vhodné pro rehydrataci zpět na emulzní systém.

Posledním krokem práce bylo vyhodnocení uvolňování kurkuminu z lyofilizátů. Bylo zjištěno, že na uvolňování aktivní látky nemá vliv cesta přípravy emulzí (R1, R2, R3) ale spíše zvolený kryoprotektant. Nejvyšší množství uvolněného kurkuminu bylo pozorováno u lyofilizátů s obsahem kryoprotektantu glukózy, jelikož v lyofilizátu bylo nejvyšší množství neenkapsulovaného kurkuminu – ochrana lipidových dvojvrstev kryoprotektantem glukózou byla nejnižší. Naopak nejvyšší kryoprotektivní účinek poskytoval mannitol, u jehož systémů došlo k nejpomalejšímu a nejnižšímu uvolňování kurkuminu. I přes rozdíly byly studované systémy vyhodnoceny jako vhodné pro postupné uvolňování aktivní látky.

Závěrem lze říct, že diplomová práce potvrdila vliv cesty přípravy a ne/přítomnost kurkuminu na stabilitu emulzí. Bylo také dokázáno, že přítomnost kryoprotektantu ve formulaci nemá signifikantní vliv na velikost emulzních částic. Nicméně výběr kryoprotektantu významně ovlivňuje kvalitu lyofilizačních produktů a samotný kryoprotektant působí při procesu uvolňování aktivní látky. Tyto výsledky mohou sloužit pro další výzkumnou práci zabývající se lyofilizací emulzních systémů s enkapsulovanou aktivní látkou.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., STAINMESSE, S., FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2006, 58(15), 1688-1713 [cit. 2021-03-21]. ISSN: 0169-409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>.

ABDULLAH, WEISS, J., AHMAD T., ZHANG C., ZHANG, H. A review of recent progress on high internal-phase Pickering emulsions in food science. *Trends in Food Science & Technology*. [online] 2020, 106, 91-103 [cit. 2021-02-09]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.016>.

AHMED, K., LI, Y., MCCLEMENTS, D.J., XIAO, H. Nanoemulsion and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food chemistry* [online]. 2012, 132(2), 799-807 [cit. 2021-03-18]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.039. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611016207?via%3Dihub>.

AMINE, C., et al. Investigation of emulsifying properties and emulsion stability of plant and milk proteins using interfacial tension and interfacial elasticity. *Food hydrocolloids*. [online] 2014, 39, 180-186 [cit. 21-01-17]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.001>.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C., *Liquid-Based Nanoencapsulation Techniques*, in *Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients*. 2014, Springer New York: New York, NY. ISBN 978-1-4614-9387-7.

ARAIZA-CALAHORRA, A., M. AKHTAR a A. SARKAR. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility. *Trends in Food Science* [online]. 2018, 71, 155-169 [cit. 2021-03-18]. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.11.009. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417304387?via%3Dihub>.

ASHBY N.P., BINKS B.P., Pickering emulsions stabilised by Laponite clay particles. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online] 2000, 2, 5640-5646 [cit. 2021-02-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/B007098J>.

BARICK, K.C., TRIPATHI, A., DUTTA, B., SHELAR, S.B., HASSAN P.A. Curcumin Encapsulated Casein Nanoparticles: Enhanced Bioavailability and Anticancer Efficacy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online] 2021, 11, 2124-2120 [cit. 2021-04-24]. ISSN: 0022-3549. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354920307905>.

BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Co je co v povrchové a koloidní chemii* [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2020-11-03]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/. Výkladový slovník. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.

BARTOVSKÁ, Lída. *10-Disperze-popis.pdf*. Praha, 2016. Dostupné také z: <https://old.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/10-Disperze-popis.pdf>.

BINKS B.P., LUMSDON S.O. Influence of particle wettability on the type and stability of surfactant-free emulsion. *Langmuir* [online]. 2000, 16, 8622-8631 [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/la000189s>.

BINKS Bernard P. Particles as surfactants—similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2002, 7, 21-41 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1359-0294. Dostupné z: [doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00008-0).

BINKS, Bernard P. Modern aspects of emulsion science. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, Information Services, 1998. ISBN 978-0-85404-439-9.

Borreani, J., Leonardi, C., Moraga, G. *et al.* How do Different Types of Emulsifiers/Stabilizers Affect the In Vitro Intestinal Digestion of O/W Emulsions?. *Food Biophysics* [online] 2019, 14, 313–325 [cit. 2021-03-21]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11483-019-09582-2>.

BOUYER, E., MEKHLOUFI, G., ROSILIO, V., GROSSIORD, J-L., AGNELY, F. Proteins, Polysaccharides, and Their Complexes Used as Stabilizers for Emulsions: Alternatives to Synthetic Surfactants in the Pharmaceutical Field. *International Journal of Pharmaceutics* [online] 2012, vol. 436, no. 1-2 s. 359-378 [cit. 2021-03-11] ISSN:0378-5173. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22759644/>.

BRIGGS N., RAMAN A.K.Y., BARRETT L., *et al.* Stable Pickering emulsions using multi-walled carbon nanotubes of varying wettability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online] 2018, 537, 227-235 [cit.2021-02-11]. ISSN: 0927-7757. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.10.010>.

Bronchitol EPAR (mannitol). European Medicines Agency. [online]. 2012 [cit. 2021-03-24]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/bronchitol>.

CACELA, C., HINCHA, D.K. Low Amounts of Sucrose Are Sufficient to Depress the Phase Transition Temperature of Dry Phosphatidylcholine, but Not for Lyoprotection of Liposomes. *Biophysical Journal* [online]. 2006, 90(8), 2831-2842 [cit. 2021-03-23]. ISSN: 0006-3495. Dostupné z: <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.074427>.

CASANOVA, F., SANTOS, L. Encapsulation of Cosmetic Active Ingredients for Topical Application-a Review. *Journal of Microencapsulation* [online] 2016, vol. 33,1 [cit. 2021_04-01]. ISSN:0265-2048. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26612271/>.

COSTA, C., ROSA, P., FILIPE, A., MEDRONHO, B., ROMANO, A. LIBERMAN, L., TALMON, Y., NORGRÉN, M. Cellulose-stabilized oil-in-water emulsions: Structural features, microrheology, and stability. *Carbohydrate Polymers* [online] 2021, 252 [cit. 2021-04-02]. ISSN: 0144-8617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117092>.

CURCIO, M. *et al.* Glucose cryoprotectant affects glutathione-responsive antitumor drug release from polysaccharide nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2015, 93, 281-292 [cit. 2021-03-24]. ISSN: 0939-6411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.04.010>.

DICKINSON E., Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids* [online] 2011, 25, 1966-1983 [cit. 2021-02-15]. ISSN: 0268-005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.001>.

DICKINSON, E. Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. [online] 2010, 81, 130-140 [cit. 21-01-16]. ISSN 0927-7765. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776510003644>.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids* [online] 2017, 25-39 [cit. 21-01-16]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00120-5).

Donsì, F., M. Sessa, and G. Ferrari. Encapsulation of Bioactive Compounds. *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*, M. Mishra, Editor. 2015, CRC Press: Boca Raton, FL. ISBN 978-1-4822-3232-5.

ECHYPORCHUK, O., BELGACEM M.N., BRAS., J. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products* [online]. 2016, 93, 2-25 [cit. 2021-01-17]. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092666901630084X?via%3Dihub>.

EVANS, M., RATCLIFFE, I., WILLIAMS, P. M. *Emulsion stabilisation using polysaccharide-protein complexes*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. [online] 2013, 18, 272-282 [cit. 2021-01-14]. ISSN 1359-0294. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.04.004>.

EYLEY S., THIELEMANS W., Surface modification of cellulose nanocrystals. *Royal Society of Chemistry* [online] 2014, 6, 7764-7779 [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C4NR01756K>.

FEER, E.M., YIM, K.S., FULLER, G.G., RADKE, C.J. *Interfacial Rheology of Globular and Flexible Proteins at the Hexadecane/Water Interface: Comparison of Shear and Dilatation Deformation*. *The Journal of Physical Chemistry B*. [online] 2004, 108, 3835-3844 [cit. 21-01-16]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp037236k>.

FENG Y., LEE Y., Surface modification of zein colloidal particles with sodium caseinate to stabilize oil-in-water Pickering emulsion. *Food hydrocolloids* [online] 2016, 56, 292-302 [cit. 2021-02-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.030>.

FESSI N., MOHAMED F.N., CHEVALIER Y., GUILLARD C., DAPPOZZE F., HOUAS A., PALMISANO L., PARIINO F. Photocatalytic Degradation Enhancement in Pickering Emulsion Stabilized by Solid Particles of Bare TiO₂. *Langmuir* [online] 2019, 35, 2129-2136 [cit. 2021-02-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03806>.

FRANKS, Felix. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 1998, 45(3), 221-229 [cit. 2021-03-21]. ISSN: 0939-6411. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00004-6).

GARTI, Nissim, BISPERINK, Chris. *Double emulsion: Progress and application*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 1998, s. 657-667 [cit. 2020-11-08]. ISBN

1359-0294. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/journal/current-opinion-in-colloid-and-interface-science/vol/3/issue/6>.

GELOT A., FRIESEN W., HAMZA H.A. Emulsification of oil and water in the presence of finely divided solids and surface-active agents. *Colloids and Surfaces* [online] 1984, 12, 271-303 [cit. 2021-02-09]. ISSN: 0166-6622. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(84\)80105-5](https://doi.org/10.1016/0166-6622(84)80105-5).

GESTRANIUS, M., P. STENIUS, E. KONTTURI, J. SJOBLOM a T. TAMMELIN. Phase behaviour and droplet size of oil-in-water Pickering emulsions stabilised with plant-derived nanocellulosic materials. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2017, 60-70 [cit. 2021-02-12]. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775716302576?via%3Dihub>.

GUO, J., LI, P., KONG, L., XU, B. Microencapsulation of curcumin by spray drying and freeze drying. *LWT* [online] 2020, 132 [cit. 2021-04-24]. ISSN: 0023-6438. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820308811>.

GUZEY D., McCLEMENTS D.J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science* [online] 2006, 128-130, 227-248. ISSN: 0001-8686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.021>.

HABIBI Y., Key advances in the chemical modification of nanocelluloses. *Chemical Society Reviews* [online] 2014, 43, 1519-1542 [cit. 2021-02-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C3CS60204D>.

HABIBI Y., LUCIA L.A., ROJAS O.J., Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical Reviews* [online] 2010, 110, 3479-3500 [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cr900339w>.

HAO Y., LIU Y., YANG R., ZHANG X., LIU J., YANG H. A pH-responsive TiO₂-based Pickering emulsion system for in situ catalyst recycling. *Chinese Chemical Letters* [online] 2018, 29, 778-782 [cit. 2021-02-09]. ISSN: 1001-8417. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.01.010>.

HU, M., McCLEMENTS, D.J., DECKER, E.A. Lipid Oxidation in Corn Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Casein, Whey Protein Isolate, and Soy Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. [online] 2003, 51, 1696-1700 [cit. 21-01-17]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf020952j>.

HUCK-IRIART, C., et al. New insight about flocculation proces in sodium caseinate-stabilized emulsion. *Food Research International*. [online] 2016, 89, 338-346 [cit. 21-01-17]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.026>.

CHEVALIER Y., BOLZINGER M. Emulsion stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. [online] 2013, 439, 23-24 [cit. 2021-02-09]. Dostupné z: [doi.10.1016/j.colsurfa.2013.02.054](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.054).

CHO Y.-H., McCIEMENTS D.J., Theoretical Stability Maps for Guiding Preparation of Emulsions Stabilized by Protein–Polysaccharide Interfacial Complexes. *Langmuir* [online] 2009, 25, 6649-6657 [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/la8006684>.

INGVARSSON, P.T., YANG, M., NIELSEN, H.M., RANTANEN, J., FOGED, C. Stabilization of Liposomes During Drying. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2011, 8(3), 375-388 [cit. 2021-03-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.553219>.

JIA, Xuejuan, Ranran XU, Wei SHEN, et al. Stabilizing oil-in-water emulsion with amorphous cellulose. *Food Hydrocolloids*[online]. 2015, 43, 275-282 [cit. 2021-4-30]. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi:10.1016/j.foodhyd.2014.05.024>.

JOHNSON, R.E., KIRCHHOFF, C.F., GAUD, H.T. Mannitol–Sucrose Mixtures—Versatile Formulations for Protein Lyophilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2002, 91(4), 914-922 [cit. 2021-03-26]. ISSN: 0022-3549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jps.10094>.

JONES, L.S. *et al.* The Effects of Tween 20 and Sucrose on the Stability of Anti-L-Selectin during Lyophilization and Reconstitution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2001, 90(10), 1466-1477 [cit. 2021-03-26]. ISSN: 0022-3549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jps.1098>.

KEARSLEY, M.W., DEIS, R.C. Sorbitol and Mannitol. *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology, Second Edition* [online]. 2012, 2, 331-346 [cit. 2021-03-24]. ISBN: 9781118373941. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118373941>.

KELLEY, D., McCLEMENTS, D.J. *Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions*. *Food Hydrocolloids*. [online] 2003, 17, 75-83 [cit. 21-01-16]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00040-1).

KLEMM D., HEUBLEIN B., FINK H.P., BOHN A., Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition* [online] 2005, 44, 3358-3393 [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>.

KLEMM, D., F. KRAMER, S. MORITZ a kol. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angewandte Chemie* [online]. 2011, 50(24), 5438-5466 [cit. 2021-01-18]. ISSN 14337851. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201001273>.

KOČÍ, Berenika. *Pickeringovy emulze pro enkapsulaci kurkuminu* [online]. Zlín, 2020 [cit. 2021-04-24]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/9ywgfd/>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM, 2012. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-3-13-759404-8.

KULKARNI, S.S., SURYANARAYANAN, R., RINELLA, J.V., BOGNER, R.H. Mechanisms by which crystalline mannitol improves the reconstitution time of high concentration lyophilized protein formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2018, 131, 70-81 [cit. 2021-03-24]. ISSN: 0939-6411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.022>.

Lakkis, J.M., *Introduction*, in *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. 2016, John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, NJ. p. 1-15. ISBN 978-1-1189-4689-3.

LAM, Ricky S.H., NICKERSON, Michael T. *Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach*. *Food Chemistry* [online]. 2013, **141**(2), 975-984 [cit. 2020-11-14]. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>.

LEE, M.K., KIM, M.J.K, KIM, S., LEE J. Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: Effect of freezing rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2009, 98(12), 4808-4817 [cit. 2021-03-23]. ISSN: 0022-3549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jps.21786>.

LIU, Fu, Jie ZHENG, Cai-Huan HUANG, Chuan-He TANG a Shi-Yi OU. Pickering high internal phase emulsions stabilized by protein-covered cellulose nanocrystals. *Food Hydrocolloids*[online]. 2018, **82**, 96-105 [cit. 2021-4-30]. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.047>.

LIU, H. *et al.* Sodium caseinate/carboxymethylcellulose interaction at oil-water interface: Relationship to emulsion stability. *Food chemistry* [online] 2012, 132, 1822-1829 [cit.2021-04-03]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1019/j.foodhyd.2011.10.007>.

LUO Q., WANG Y., YOO E., WEI P., PENTZER E., Ionic liquid-containing Pickering emulsions stabilized by graphene oxide-based surfactants. *Langmuir* [online] 2018, 34, 10114–10122 [cit. 2021-02-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02011>.

MA, P., Q. ZENG, K. TAI, X. HE, Y. YAO, X. HONG a F. YUAN. *Preparation of curcumin-loaded emulsion using high pressure homogenization: Impact of oil phase and concentration on physicochemical stability*. *LWT* [online]. 2017, 84, 34-46 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.04.074. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817303018?via%3Dihub>.

MATOUŠ, Bohuslav, et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha: Galén, 2010. 540 s. ISBN: 978-80-7262-702-8.

MCCLEMENTS, D.J. *Food emulsion-principles, practises, and techniques* [online]. 3rd edition. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 30: Taylor & Francis Group, 2016 [cit. 2020-11-08]. ISBN 978-1-4987-2669-6. Dostupné z: https://www.academia.edu/26245657/Food_emulsions_principles_practices_and_techniques_pdf.

McCLEMENTS, D.J. *Nanoemulsion versus microemulsion: terminology, differences and similarities*. *Soft Matter* [online]. 2012, 8, 1719 [cit. 2020-11-04]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/f959/41904f676ad6c8f504b9c068d53f68922f44.pdf>.

McCLEMENTS, D.J. *Protein-stabilized emulsion*. Current Opinion in Colloid & Interface Science. [online] 2004, 9, 305-313 [cit. 21-01-16]. ISSN 1359-0294. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029404000883>.

MCCLEMENTS, D.J. *Reduced-Fat Foods: The Complex Science of Developing Diet-Based Strategies for Tackling Overweight and Obesity*. Advances in Nutrition [online]. 2015, 6(3), 338S [cit. 2020-11-15]. DOI: 10.3945/an.114.006999. ISSN 21618313. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4424772>.

McClements, D.J., *Emulsion-Based Delivery Systems*, in *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. 2016, CRC Press: Boca Raton, FL. p. ISBN 978-1-4987-2668-9.

MCCLEMENTS, D.J., GUMUS, C.E., *Natural emulsifiers - Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance*. Advances in Colloidal and Interface Science [online]. 2016, 234, 3-26 [cit. 2020-11-14]. DOI: 10.1016/j.cis.2016.03.002. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868616300380?via%3Dihub>.

MCCLEMENTS, D.J., JAFARI S.M. *Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers*. A review. Advances in Colloid and Interface Science [online] 2018, 251, 55-79 [cit. 2021-01-14]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.001>.

McClements, D.J., *Nanoparticle and microparticle-based delivery systems: encapsulation, protection and release of active compounds*. ed., ed. Vol. 2014, Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 978-1-4822-3316-2.

MIERELLES, A.A.D., COSTA, A.L.R., CUNHA, R.L. Cellulose nanocrystals from ultrasound process stabilizing O/W Pickering emulsion. *International Journal of Biological Macromolecules* [online] 2020, 158, 75-84 [cit. 2021-04-02]. ISSN: 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.185>.

MIERELLES, A.A.D., COSTA, A.L.R., CUNHA, R.L. The stabilizing effect of cellulose crystals in O/W emulsions obtained by ultrasound process. *Food Research International* [online] 2020, 128 [cit. 2021-04-02]. ISSN: 0963-9969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108746>.

Mishra, M., *Overview of Encapsulation and Controlled Release*, in *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*, M. Mishra, Editor. 2015, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 3-19. ISBN 978-1-4822-3232-5.

MOHAMED, S.A., O.A.M. AL-BAR, R.M. EL-SHISHTAWY a A.R. AL-NAJADA. Chemical modification of curcumin: Solubility and antioxidant capacity. *International Journal of Food Properties* [online]. 2017, 20(3), 718-724 [cit. 2021-03-18]. ISSN 15322386. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2016.1177545>.

MWANGI W.W., HO K-W., TEY B.-T., CHAN E.-S. Effects of environmental factors on the physical stability of pickering-emulsions stabilized by chitosan particles. *Food*

Hydrocolloids. [online] 2016, 60, 543-550 [cit. 2021-02-09]. ISSN: 0268-005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.023>.

NEDOVIĆ, Viktor; KALUŠEVIĆ, Ana; MANOJLOVIĆ, Verica; PETROVIĆ, Tanja; BUGARSKI, Branko. *Encapsulation Systems in the Food Industry*. Food Engineering Series. 2013. ISSN:1571-0297.

Neutrogena [online]. Johnson & Johnson Cosumer Inc. ©2021 [cit. 2021-04-14]. Dostupné z: <https://www.neutrogena.com>.

OGAWA, S., DECKER, E.A., MCCLEMENTS, D.J. Production and Characterization of O/W Emulsion Containin Cationic Droplets Stabilized by Lecithin-Chitosan Membranes. *J.Agric. Food Chem.* [online], 2003, 51, 2806-2812 [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf020590f>.

Oxley, J., Overview of Microencapsulation Process Technologies, in *Microencapsulation in the Food Industry*. 2014, Academic Press: San Diego. ISBN 978-0-12-404568-2.

OZTURK, B., McCLEMENTS, D.J. *Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsion*. Current Opinion in Food Science. [online] 2016, 7,1-6 [cit.2021-01-14]. ISSN 2214-7993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.008>.

Pawar, K.R. and R.J. Babu, *Polymeric and Lipid-Based Materials for Topical Nanoparticle Delivery Systems*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst., 2010. 27(5): p. 419-459.

PICKERING S.U. CXVCI. – Emulsions. *Journal of the Chemical Society Transactions*. 1907, vol. 91, p. 21-221. doi: 10.1039/CT9079102001.

PINĎÁKOVÁ, L., V. KAŠPÁRKOVÁ a R. BORDES. *Role of protein-cellulose nanocrystal interactions in the stabilization of emulsion*. Journal of Colloid and Interface Science. [online]. 2019, 557, 196-206 [cit. 2020-11-03]. DOI: 10.1016/j.jcis.2019.09.002. ISSN 10957103. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021979719310318?via%3Dihub>.

Prohibited list. World Anti-Doping Agency. [online]. 2017 [cit. 2021-03-24]. Dostupné z: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2016-09-29_-_wada_prohibited_list_2017_eng_final.pdf.

PUGNALONI L.A., DICKINSON E., ETELAIE R., MACKIE A.R., WILDE P.J. Competitive adsorption of proteins and low-molecular-weight surfactants: computer simulation and microscopic imaging. *Advances in Colloid and Interface Science* [online] 2004, 107, 27-49 [cit. 2021-02-15]. ISSN: 0001-8686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.08.003>.

RAMPON. V., BROSSARD, C., MOUHOUS-RIOU, N., BOSSEAU, B., LLAMAS, G., GENOT, C. *The nature of the apolar phase influences the structure of the protein emulsifier in oil-in-water emulsions stabilized by bovine serum albumin.: A front-surface fluorescence study*. Advances in Colloid and Interface Science. [online] 2004, 108-109, 87-94 [cit. 21-01-16]. ISSN 0001-8686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.004>.

RAMSDEN W. Separation of solids in the surface-layers of solutions and 'suspensions' (observations on surface-membranes, bubbles, emulsions, and mechanical coagulation)-Preliminary account. *Proceedings of the Royal Society of London* [online]. 1904, 72(477-486), 156-164 [cit. 2021-02-06]. ISSN 0370-1662. Dostupné z: doi:10.1098/rspl.1903.0034.

RAUF, Abdur, Muhammad IMRAN, Ilkay Erdogan ORHAN a Saud BAWAZEER. Health perspectives of a bioactive compound curcumin: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2018, 74, 33-45 [cit. 2021-4-30]. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.01.016>.

REY, Louis a Joan C. MAY. *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products: (Drugs and the Pharmaceutical Sciences Book 206)*. 3rd. London: CRP Press, 2016. ISBN 1439825750.

SCHRAMM, L. L. *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2006. 463 p. Dostupné z: https://www.academia.edu/8816035/9076Emulsions_Foams_and_Suspensions_Fundamentals_and_Applications.

SONG X., PEI Y., QIAO M., MA F., REN H., ZHAO Q. Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. *Food Hydrocolloids*. [online] 2015, 45, 256-263 [cit. 2021-02-09]. ISSN: 0268-005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.007>.

SUZUKI, T., KOMATSU H. Effects of glucose and its oligomers on the stability of freeze-dried liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* [online]. 1996, 1278(2), 176-182 [cit. 2021-03-24]. ISSN: 0005-2736. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00221-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00221-9).

TADROS, Tharwat F. *Emulsion science and technology*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. ISBN 9783527325252.

TAMBLE D.E., SHARMA M.M. Factors Controlling the Stability of Colloid-Stabilized Emulsions: I. An Experimental Investigation. *Journal of Colloid and Interface Science*. [online] 1993, 157, 244-253 [cit. 2021-02-09]. ISSN: 0021-9797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/jcis.1993.1182>.

TANG, X., PIKAL, M.J. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceutikals: Practical Advice. *Pharm Res* [online]. 2004, 21, 191-200 [cit. 2021-03-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016234.73023.75>.

TARIMALA, S. a L.L. DAI. Structure of microparticles in solid-stabilized emulsions. *Langmuir* [online]. 2004, 20(9), 3492-3494 [cit. 2021-02-12]. DOI: 10.1021/la036129e. ISSN 07437463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la036129e>.

TELIS, V.R.N., *An Introduction to Biopolymer Applications in Food Engineering*, in *Biopolymer Engineering in Food Processing*. 2012, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 1-16. ISBN 978-1-4398-4494-6.

VACLAVIK, V.A., E.W. CHRISTIAN. *Essentials of Food science*. New York, USA: Springer Science + Bussines Media, 2008. ISBN 978-0-387-69939-4.

VARSHOSAZ, J., ESKANDARI, S., TABBAKHIAN, M. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. *Carbohydrate Polymers*. 2012, 88, 1157-1163 [cit.2021-04-24]. ISSN: 0144-8617. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712000719>.

VRBOVÁ, Tereza, 2001. *Víme, co jíme?, aneb; Průvodce "Ěčky" v potravinách*. Praha: EcoHouse. ISBN 80-238-7504-3.

WANG, W., CHEN, M., CHEN, G. Issues in Freeze Drying of Aqueous Solutions. *Chinese Journal of Chemical Engineering* [online]. 2012, 3, 551-559 [cit. 2021-03-22].ISSN: 1004-9541. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(11\)60218-8](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60218-8).

WANG, Wei. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2000, 203, 1-60 [cit. 2021-03-22]. ISSN: 0378-5173. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00423-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00423-3).

WU J., MA G.H., Recent studies od Pickering emulsions: Particles make the difference. *Wiley Online Library* [online] 2016, 12, 4633-4648 [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/sml.201600877>.

WU, H.-Y., SUN, C.-B., LIU, N. Effects of different cryoprotectants on microemulsion freeze-drying. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [online]. 2019, 54, 28-33 [cit. 2021-03-24]. ISSN: 1466-8564. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.12.007>.

WÜSTENBERG, T. *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry*. 2014, Wiley-VCH: BadenWürttemberg, Germany. ISBN978-3-5276-8293-5. DOI: 10.1002/9783527682935.ch03.

XIE C.-Y., MEHG S.-X., XUE L.-H., BAI R.-X., YANG X., WANG Y., QUI Z.-P., BINKS B.P., GUO T., MENG T. Light and Magnetic Dual-Responsive Pickering Emulsion Micro-Reactors. *Langmuir* [online] 2017, 33, 141389-14148 [cit- 2021-02-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03642>.

YANG Y. et al. An Overview of Pickering Emulsion: Solid-Particle Materials, Classification, Morfology and Applications. *Frontiers in Pharmacology*. [online]. 2017, 8 [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: doi.org/10.3389/fphar.2017.00287.

ZEMBYLA, Morfo, Brent S. MURRAY a Anwasha SARKAR. *Water-in-oil emulsion stabilised by surfactants, biopolymers and/or particles: a review* [online]. 2020(104) [cit. 2020-11-14]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224420305574#undfig1>.

ZHAI X., GAO J., WANG X., MEI S., ZHAO R., WU Y., et al. Inverse Pickering emulsions stabilized by carbon quantum dots: influencing factors and their application as templates.

Chemical Engineering Journal [online] 2018, 345, 209-220 [cit. 2021-02-11]. ISSN: 1385-8947. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.075>.

ZHANG, L., LUI, L., QIAN, Y., CHEN, Y. The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2008, 69(2), 750-759 [cit. 2021-03-23]. ISSN: 0939-6411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.12.003>.

ZINOVIADOU, K.G. *et al.* Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate-chitosan complexes. *International Dairy Journal* [online] 2012, 26, 94-101 [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.007>.

ZUIDAM, N.J., SHIMONI, E. *Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them*, in *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, N.J. Zuidam and V. Nedovic, Editors. 2010, Springer New York: New York, NY. p. 3-29. ISBN 978-1-4419-1008-0.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BNC	bakteriální nanocelulóza
BSA	bovine albumin serum (hovězí sérový albumin)
CAS	kaseinát sodný
CNC	krystalový nanocelulóza
GLU	glukóza
HIPE	high-internal phase emulsion
MAN	mannitol
MFC	mikrofibrilární celulóza
NaCl	chlorid sodný
O/V	emulze typu olej ve vodě
O/V/O	dvojitá emulze typu olej ve vodě v oleji
PAL	povrchově aktivní látka
pI	izoelektrický bod
PBS	Dulbeccos's Phosphate Bufferet Saline (fosfátem pufrovaný stabilizační roztok)
SACH	sacharóza
SD	směrodatná odchylka
SEM	skenovací elektronový mikroskop
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná
V/O	emulze typu voda v oleji
V/O/V	dvojitá emulze typu voda v oleji ve vodě

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Vlevo – Schematické znázornění emulzní částice V/O a její stabilizace surfaktantem/biopolymerem/pevnými částicemi. Vpravo – Znázornění kontaktního úhlu mezi třemi fázemi (částice-olej/částice-voda/olej-voda) souvisejícího s povrchovou volnou energií (Zembyla et.al, 2020).	14
Obrázek 2 Grafické znázornění stérické stabilizace vs. elektrostatické stabilizace (McClements & Jafari, 2018).	15
Obrázek 3 Adsorpce pevných částic na mezifázové rozhraní na základě smáčivosti (Abdulah et al. 2020).	23
Obrázek 4 Grafické znázornění ko-adsorpce (upraveno dle McClements & Gumus, 2016).	29
Obrázek 5 Grafické znázornění komplexace (upraveno dle McClements & Gumus, 2016).	30
Obrázek 6 Grafické znázornění postupu layer-by-layer (upraveno dle McClements & Gumus, 2016).	31
Obrázek 7 Typy kapslí – zleva: typ jádro-obal, typ matrix.	32
Obrázek 8 Strukturní vzorec kurkuminu (Zdroj: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Curcumin_structure.svg).	34
Obrázek 9 Produkty skin care s obsahem kurkuminu (Zdroj: https://vanessabratschi.com/reine-haut-dank-superfood-die-curcuma-clear-reihe-von-neutrogena/).	34
Obrázek 10 Strukturní vzorce A) D-glukóza, B) Sacharóza, C) D-mannitol.	39
Obrázek 11 Schéma přípravy emulzí; nahoře R1, uprostřed R2, dole R3.	51
Obrázek 12 Kalibrační křivka kurkuminu rozpuštěného v methanolu.	56
Obrázek 13 Emulze s olejovou fází bez kurkuminu a bez přídavku kryoprotektantu.	57
Obrázek 14 Emulze s olejovou fází s kurkuminem bez přídavku kryoprotektantu.	57
Obrázek 15 Emulze s olejovou fází s kurkuminem a přídavkem 10 % mannitolu.	58
Obrázek 16 Vliv cesty přípravy emulzí na velikost emulzních kapek (OO – olejová fáze s olivovým olejem; K – olejová fáze s olivovým olejem a kurkuminem).	60
Obrázek 17 Porovnání vlivu přídavku kryoprotektantu glukózy (GLU) a sacharózy (SACH) na velikost emulzních částic, K značí obsah kurkuminu v emulzi.	61
Obrázek 18 Distribuce velikosti emulzních kapek připravených cestami R1, R2 a R3 s přídavkem kryoprotektantu sacharózy (sach) a bez kryoprotektantu. K značí obsah kurkuminu v emulzi.	61
Obrázek 19 Distribuce velikosti emulzních kapek připravených cestami R1, R2 a R3 s přídavkem kryoprotektantu glukózy (glu). K značí obsah kurkuminu v emulzi.	62
Obrázek 20 Mikrostruktura emulzí připravených cestami R1, R2, R3 bez/s obsahem kryoprotektantů (měřítko je 50 μm).	63
Obrázek 21 Vzhled lyofilizátů z emulzí připravených cestou: zleva R1, R2, R3. OO značí olejovou fází z olivového oleje, K značí olejovou fází s přídavkem kurkuminu.	65
Obrázek 22 Vzhled lyofilizátů z emulzí připravených cestou: zleva R1, R2, R3 s přídavkem daných kryoprotektantů. K značí přítomnost kurkuminu v olejové fázi.	66
Obrázek 23 SEM analýza vybraných lyofilizátů z emulzí připravených cestou R1, R2, R2 s přídavkem kryoprotektantů, K značí přítomnost kurkuminu v olejové fázi emulze.	67
Obrázek 24 Vzhled rekonstituovaných emulzí. Zleva přídavek 10 % mannitolu, 10 % sacharózy a 10 % glukózy.	68
Obrázek 25 Kalibrační křivka kurkuminu rozpuštěného v PBS+TW 80.	69

Obrázek 26 Vliv času na uvolňování kurkuminu z lyofilizátu s ohledem na cestu přípravy emulzí (R1, R2, R3) a přidavkem kryoprotektantu. A) 10 % glukózy, B) 10 % mannitolu, C) 5 % sacharózy.	70
Obrázek 27 Porovnání závislosti celkového množství uvolněného kurkuminu na přítomnosti kryoprotektantu s ohledem na použitou cestu přípravy emulzí.	71

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Průměrná velikost emulzních kapek vyjádřená jako $D(4;3) \pm$ směrodatná odchylna SD [μm].....	59
---	----

