

Enkapsulace aktivních látek s využitím protein-polysacharidových komplexů

Sabina Botková

Bakalářská práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Sabina Botková**
Osobní číslo: **T19023**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Enkapsulace aktivních látek s využitím protein-polysacharidových komplexů**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši na zadané téma. Zaměřte se na charakterizaci vybraných biopolymerů, jejich vlastnosti a využití jako nosičů aktivních látek. Dále se věnujte přípravě komplexů a jejich využití pro enkapsulaci aktivních látek.
2. V praktické části se věnujte přípravě protein-polysacharidových komplexů, charakterizujte je dostupnými metodami. Získané výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] DEVI, N., SARMAH, M., KHATUN, B. and MAJI, T.K., 2017. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, pp. 136-145.
- [2] ZHANG, Q., ZHOU, Y., YUE, W., QIN, W., DONG, H. and VASANTHAN, T., 2021. Nanostructures of protein-polysaccharide complexes or conjugates for encapsulation of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 109, pp. 169-196.
- [3] SEMENOVA, M., 2017. Protein-polysaccharide associative interactions in the design of tailor-made colloidal particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 28, pp. 15-21.
- [4] CORTÉS-MORALES, E.A., MENDEZ-MONTEALVO, G. and VELAZQUEZ, G., 2021. Interactions of the molecular assembly of polysaccharide-protein systems as encapsulation materials. A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, pp. 102398.

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

Datum zadání bakalářské práce: **25. února 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se v teoretické části zabývá systémy, které jsou vhodné pro enkapsulaci aktivních látek. Zabývá se rovněž interakcemi mezi proteiny a polysacharidy, u kterých je možný vznik komplexů. Dále jsou charakterizovány i aktivní látky vhodné pro enkapsulaci do komplexů. V rámci experimentální části byly připraveny komplexy chitosan/kaseinát sodný a chitosan/hydrolyzát sójového proteinu s obsahem aktivní látky (curcumin). Byly sledovány fyzikálně–chemické vlastnosti jednotlivých biopolymerů a komplexů, jako je zeta potenciál, velikost části a mikrostruktura komplexů.

Klíčová slova: enkapsulace, chitosan, kaseinát sodný, curcumin, protein, polysacharid, komplex.

ABSTRACT

In the theoretical part, this bachelor thesis deals with systems that are suitable for encapsulation of active substances. It also deals with interactions between proteins and polysaccharides where complex formation is possible. Active substances suitable for encapsulation into complexes are also characterized. In the experimental part, complexes of chitosan / sodium caseinate and chitosan / soy protein hydrolysate containing active substance (curcumin) were prepared. Physico-chemical characteristics of individual biopolymers and complexes were monitored, such as zeta potential, size and microstructure of complexes.

Keywords: encapsulation, chitosan, sodium salt of casein, curcumin, protein, polysaccharide, complex.

Ráda bych tímto poděkovala mé vedoucí Ing. Lucii Urbánkové, Ph. D. za odborné rady, připomínky, vstřícnost, ale také za čas a trpělivost, jenž mi věnovala při tvorbě bakalářské práce.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 ENKAPSULACE	11
1.1 ENKAPSULAČNÍ SYSTÉMY.....	12
1.1.1 Micely	13
1.1.2 Inkluzní komplexy	13
1.1.3 Emulze a nanoemulze	14
1.1.4 Protein – polysacharidové komplexy	14
1.2 ENKAPSULAČNÍ METODY.....	15
1.2.1 Mechanické procesy.....	15
1.2.2 Fyzikálně – chemické procesy	16
1.3 ENKAPSULACE AKTIVNÍCH LÁTEK.....	18
1.3.1 Aktivní látky.....	18
2 INTERAKCE PROTEIN – POLYSACHARID	22
2.1 KOMPLEXY.....	23
2.2 KONJUGÁTY	24
2.3 VHODNÉ PROTEINY A POLYSACHARIDY PRO VZNIK KOMPLEXŮ	25
2.3.1 Proteiny	25
2.3.2 Polysacharidy	26
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
4 CÍLE PRÁCE	30
5 MATERIÁLY A METODY	31
5.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY	31
5.2 POMŮCKY A POUŽITÉ ZAŘÍZENÍ	31
5.3 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH A PRACOVNÍCH ROZTOKŮ	32
5.3.1 Příprava 1M a 0,1M roztoku hydroxidu sodného	32
5.3.2 Příprava 1M a 0,1 M roztoku kyseliny chlorovodíkové	32
5.3.3 Příprava zásobních disperzí biopolymerů	32
5.4 ÚPRAVA PH A VIZUÁLNÍ POZOROVÁNÍ	33
5.5 PŘÍPRAVA KOMPLEXŮ	33
5.6 MĚŘENÍ ZETA POTENCIÁLU	33
5.7 VELIKOST ČÁSTIC.....	34
5.8 MIKROSKOPIE	35
5.8.1 Konfokální mikroskop	35
5.8.2 Optická mikroskopie	35

6	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
6.1	CHARAKTERIZACE BIOPOLYMERŮ	36
6.1.1	Kaseinát sodný	36
6.1.2	Chitosan	37
6.1.3	Sojový proteinový hydrolyzát	39
6.1.4	Vizuální pozorování	39
6.2	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE KOMPLEXŮ	40
6.2.1	Vliv pH na komplexaci	40
6.2.2	Vliv množství biopolymerů na komplexaci	42
6.3	ENKAPSULACE CURCUMINU DO KOMPLEXU	48
6.3.1	Mikrostruktura komplexů	51
	ZÁVĚR	53
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK	65

ÚVOD

Enkapsulace se používá již více než 60 let, avšak v poslední době je stále více studována. Dříve se používala enkapsulace aktivního materiálu pouze pro potravinářský a farmaceutický průmysl, oblast použití se však rozrostla a techniky enkapsulace se používají v mnoha dalších odvětvích. Například ve farmaceutickém průmyslu jsou běžně zkoumány procesy inkorporace různých léčivých látek a vitamínů do polymerních kapslí. V kosmetice pak jde především o zabudování hydratačních, vonných a antioxidačních aktivních složek.

Enkapsulace aktivních složek kosmetiky a produktů osobní péče se stala velmi oblíbenou, atraktivní a technologicky proveditelnou metodou. Přestože je použití systémů pro lokální podávání látek v kosmetice slibnou aplikační oblastí, zbývá toho ještě v různých metodách enkapsulace mnohé objasnit. Je třeba provést další výzkumy, aby bylo možné lépe porozumět materiálovým modifikacím, jejich účinkům a přechodům v každé fázi, od přípravy až po jeho konečnou lokální aplikaci.

Ve farmaceutickém průmyslu se především používá mikroenkapsulace, která umožňuje ochranu léčiva před okolním prostředím, stabilizuje citlivé látky, eliminuje nekompatibility či maskuje nepříjemné chutě. Hraje důležitou roli jako systém podávání léků s cílem zlepšit biologickou dostupnost konvenčních léků a minimalizovat vedlejší účinky.

Jelikož však jeden postup nemusí zajistit vyšší účinnost enkapsulace, je výhodnější využít kombinace různých technik. Nejvíce byly prozkoumány kombinace biopolymerů, které umožňují identifikovat nejdůležitější fyzikálně-chemické parametry řídící tvorbu komplexů, jako je například pH či iontová síla.

V této práci byly připraveny a charakterizovány protein-polysacharidové komplexy na bázi kaseinát-chitosan pro enkapsulaci curcuminu. Cílem bylo vybrat vhodný poměr proteinu a polysacharidu pro enkapsulaci a sledovat fyzikálně-chemické vlastnosti jednotlivých komplexů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

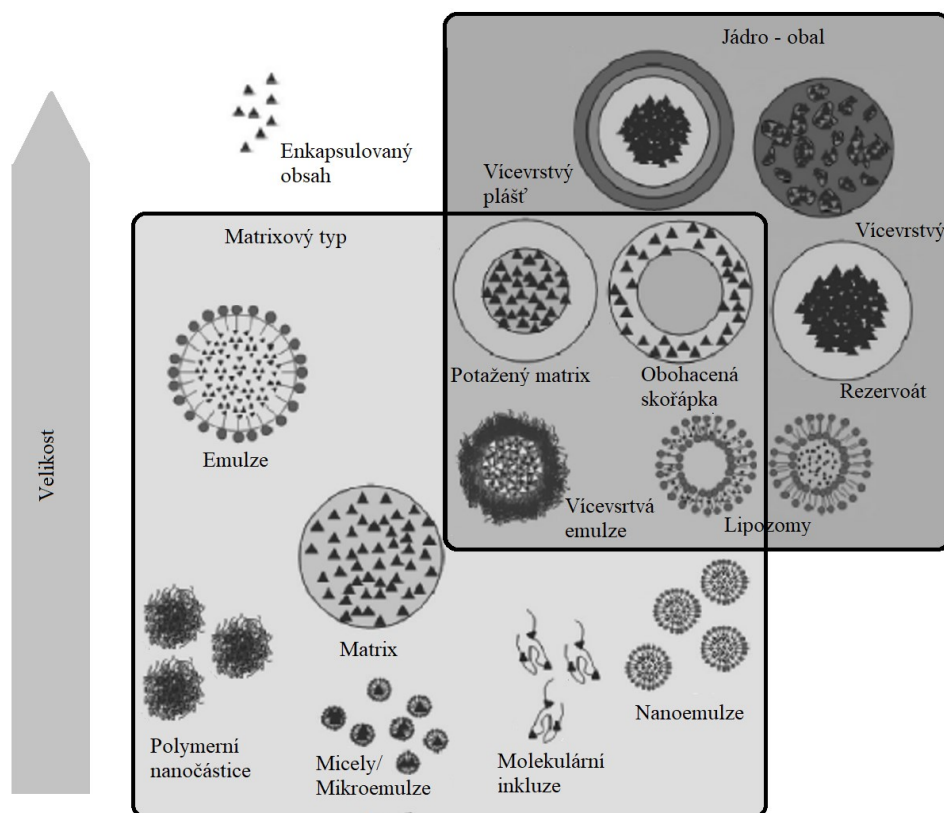
1 ENKAPSULACE

Enkapsulace je definována jako metoda pro zapouzdření pevných, plyných nebo kapalných látek do uzavřených částic, které uvolňují svůj obsah za specifických a kontrolovatelných podmínek. Produkované částice mají obvykle průměry od několika nanometrů až po milimetry. Tato metoda je rozšířená v nejrůznějších průmyslových aplikacích, jako jsou farmaceutické, zemědělské, lékařské a potravinářské, přičemž je široce používána při enkapsulaci esenciálních olejů, barviv, aromat, sladidel, mikroorganismů a dalších. Vývoj enkapsulace se datuje od 50. let minulého století, kdy se prvně vyráběly mikroenkapsulovaná barviva. [1,2,3]

Obecně se částice skládá z jádra a obalu, kde jádro je tvořeno aktivní látkou a obal sekundárním materiálem. Aktivní látky mohou být látky různého charakteru např. vitamíny, antioxidanty, probiotika, enzymy, přírodní extrakty apod. Sekundární materiál se nachází ve formě pevné látky, kapiček nebo plynových bublin. Často se enkapsulace využívá z důvodu nízké stability zmíněných aktivních látek v prostředí, například při jejich zpracování či skladování. Kapsle struktury jádra a obalu mohou mít různé tvary, jako jsou koule nebo mikrokapsle. Mohou také být jednojádrové, vícejádrové, matrixové a mnohočetné. [2,4]

1.1 Enkapsulační systémy

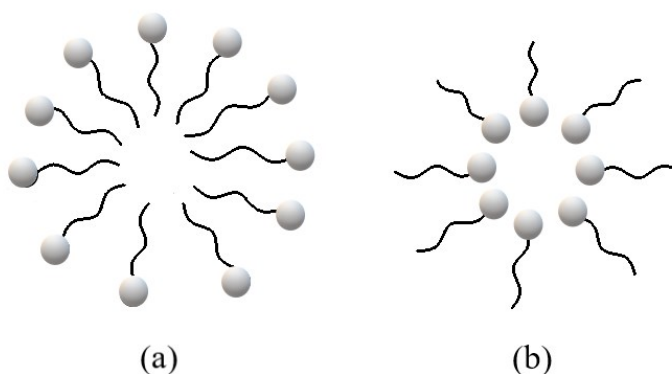
Systémy pro enkapsulaci bioaktivních sloučenin mohou mít různé konfigurace a struktury v závislostech na materiálech, výrobním procesu a disperzním médiu. Konečná klasifikace enkapsulovaných systémů je obtížná. Základním rozdělením může být klasifikace na matrixový typ a typ jádro-obal, viz Obr. 1. U matrixového typu je enkapsulovaný obsah více či méně rovnoměrně rozptýlen v enkapsulačním materiálu a obecně je přítomen také na povrchu matrixu. Zatímco systém typu jádro-obal se vyznačuje vnější membránou, která zcela zakrývá jádro obsahující bioaktivní sloučeniny, jež nejsou v přímém kontaktu s vnějším prostředím. V ideálním případě by měl být materiál obalu schopen omezit difúzi enkapsulovaného obsahu, který je v produktu. Jako materiály vhodné pro vytvoření obalu se nejčastěji používají různé vosky, tuky či látky biopolymerní povahy, jako jsou proteiny a polysacharidy. Enkapsulační systémy mohou být dále klasifikovány podle matrixového typu jako molekulární inkluze, konjugační komplexy, protein–polysacharidové komplexy, micely, mikroemulze, polymerní částice, emulze a nanoemulze. [1]



Obr. 1: Klasifikace hlavních enkapsulačních systémů pro bioaktivní sloučeniny [1]

1.1.1 Micely

Micely vznikají spontánní agregací amfifilních molekul v rozpouštědle při koncentraci vyšší, než je kritická micelární koncentrace (CMC). Pokud koncentrace povrchově aktivní látky zůstává nad CMC, jsou micely termodynamicky stabilní vůči rozpadu. Amfifilní molekuly jsou povrchově aktivní látky, jejichž molekula je tvořena ze dvou částí, a to hydrofilní hlavičky a hydrofobního řetězce. Dále je můžeme dělit na klasické a inverzní, viz Obr. 2.



Obr. 2: Struktura a) klasické micely v polárním prostředí a b) inverzní micely v nepolárním prostředí

Pokud jde o použití micel v kosmetice, je jejich použití významné při péči o pleť. Amfifilní povaha se využívá pro jemnější a hydratační čisticí prostředky na obličej. Micely na povrchu pleti obklopi nečistotu a odstraní ji. Tento způsob čištění se vyhýbá používání drsných chemických a čisticích prostředků, které mohou pokožku vysušovat. [5,6,7]

1.1.2 Inkluzní komplexy

Inkluzní komplexy jsou naopak založeny na sterické a hydrofobní interakci hydrofobních částí polysacharidového řetězce. Například amylosa je schopna tvořit komplex s konjugovanou kyselinu linolovou díky své šroubovicové molekulární struktuře, jejíž molekuly mohou vytvářet sterické a hydrofobní interakce se sloučeninami jako například volné mastné kyseliny. Inkluzní komplexy jsou však účinnější, pokud je struktura polysacharidu kruhová, jako je tomu u cyklodextrinů. Cyklodextriny jsou přirozeně se vyskytující cyklické oligosacharidy odvozené od škrobu se šesti, sedmi nebo osmi glukózovými zbytky sestavenými do kruhu, které se skládají z charakteristické vnější hydrofilní a vnitřní hydrofobní části. Díky své struktuře mohou cyklodextriny ve vnitřní dutině pojmout nepolární molekuly, které mají afinitu ke specifickým vlastnostem dutiny.

Začlenění bioaktivních molekul do cyklodextrinů může významně zvýšit jejich rozpustnost ve vodě. [1]

1.1.3 Emulze a nanoemulze

Emulze jsou heterogenní disperzní systémy, které vznikají dispergováním vzájemně nemísitelných kapalin. Nanoemulze jsou emulze s extrémně malými kapičkami o velikosti v rozmezí 20–200 nm, zatímco klasické emulze se vyznačují vyšší velikostí kapiček, která může dosahovat až 1 μm . Nanoemulze se jeví jako průhledné nebo transparentní s namodralým Tyndsallovým efektem, což je rozptyl světla běžně pozorovaný u všech koloidních disperzí. Ve srovnání s běžnými emulzemi jsou kapičky o nanorozměrech kineticky stabilnější, a to má za následek nižší tendenci nanoemulzí ke krémování, sedimentaci, flokulaci nebo koalescenci. Nanoemulze se obvykle získávají mechanicky, a to jak za použití vysokoenergetických metod (např. homogenizace vysokým smykem, vysokotlaké homogenizátory nebo ultrazvukové generátory), tak nízkoenergetických emulgačních metod, jako je metoda fázové inverze (PIT). [1]

Vzhledem k technologickým výhodám a dostupnosti výrobních metod se v posledních desetiletích rozšířilo použití nanoemulzí v potravinářství, kosmetice a farmacii. V kosmetice se používají především pro zajištění správného rozptýlení a následného vstřebání účinných látek do kůže. [8,9]

1.1.4 Protein – polysacharidové komplexy

Komplexy proteinů a polysacharidů většinou vznikají na základě elektrostatických interakcí mezi opačně nabitými makromolekulami. Aby se dále snížila volná energie systému, tyto rozpustné komplexy dále agregují, dokud jejich velikost a povrchové vlastnosti nevedou ke vzniku nerozpustných komplexů. Poté dojde k makroskopickému rozdělení fází kapalina – kapalina. V termodynamické rovnováze vzniká dvoufázový systém, který se skládá z koacervátové fáze koexistující s fází bohatou na rozpouštědlo sub fází. [10]

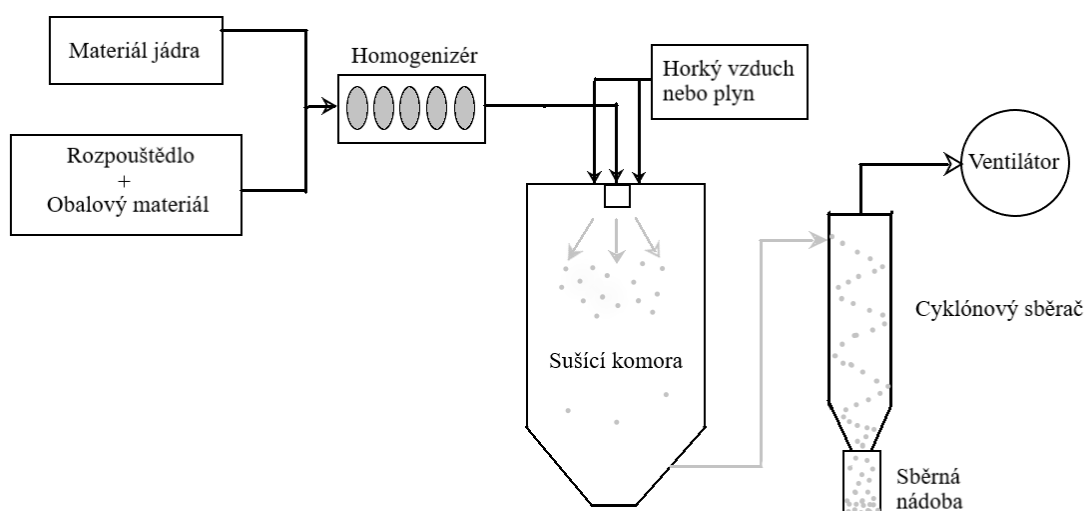
1.2 Enkapsulační metody

Pro proces enkapsulace bylo navrženo několik technik, avšak neexistuje žádná specifická metoda, která by mohla být považována za standardní a vhodnou pro různé účinné látky a enkapsulované systémy. Pro výběr správné techniky jsou důležité klíčové aspekty, které je třeba analyzovat, jako je typ a vlastnosti jádra, obalový materiál, navrhovaná aplikace a vlastnosti konečného systému. Velikost, tvar a vnitřní struktura částic se značně liší v závislosti na zvoleném způsobu výroby. Nejběžnější enkapsulační techniky jsou např. sprejové sušení, lyofilizace, potahování částic při fluidizaci, koacervace, odpařování rozpouštědla, mezifázová polymerace, emulgace, inkluzní komplexace, elektrosprejový systém a extruze. Při enkapsulaci by měla být zvolena metoda nákladově efektivní a také snadno rozšířitelná. [11]

Výroba enkapsulačních systémů může být obecně prováděna mechanickými procesy založenými na přístupu shora dolů (top-down), to znamená, že dochází k rozrušení větších systémů na částice nebo kapičky homogenních velikostí s požadovanými vlastnostmi, nebo na fyzikálně-chemických procesech založených na přístupu zdola nahoru (bottom-up) k sestavování molekulárních stavebních bloků do strukturovaných systému (tj. mikroemulze a některé biopolymerní nanočástice). Menší systémy jsou obvykle matrixového typu, jako jsou nanoemulze, micely, mikroemulze a molekulární komplexy. [1]

1.2.1 Mechanické procesy

Při enkapsulaci se používají mechanické procesy, jako například sprejové sušení, lyofilizace, mletí částic na nanočástice, vysokotlaká homogenizace a další. Sprejové sušení patří mezi nejstarší a nejrozšířenější techniky používané při výrobě enkapsulovaných látek. Účinná látka v nosiči je dispergována, emulgována či rozpuštěna a následně roztržena sprejováním. Dále se vytvoří malé kapičky, které se suší horkým cirkulujícím vzduchem, jak můžeme pozorovat na Obr. 3. Velikost částic se běžně pohybuje od 1 do 50 mikrometrů. Účinnost enkapsulace je ovlivněna různými parametry procesu, včetně viskozity, povrchového napětí roztoku, rozpustnosti jádra, vstupní teploty vzduchu, proudění vzduchu a vlhkosti. Hlavní výhody této techniky je její jednoduchost, flexibilita, rychlá výroba a nízké provozní náklady. [12]



Obr. 3: Princip sprejového sušení

Tato bakalářská práce je ale zaměřena především na enkapsulaci s využitím fyzikálně-chemických procesů, které jsou dále popsány podrobněji.

1.2.2 Fyzikálně – chemické procesy

Submikronové systémy lze také vyrábět pomocí fyzikálně-chemických procesů založených na přístupech zdola nahoru (bottom-up). Dochází ke spontánní asociaci molekul nebo k většímu budování bloků kolem bioaktivních sloučenin. Proces lze kontrolovat pomocí různých faktorů jako je teplota, koncentrace, pH a iontová síla systému. [13]

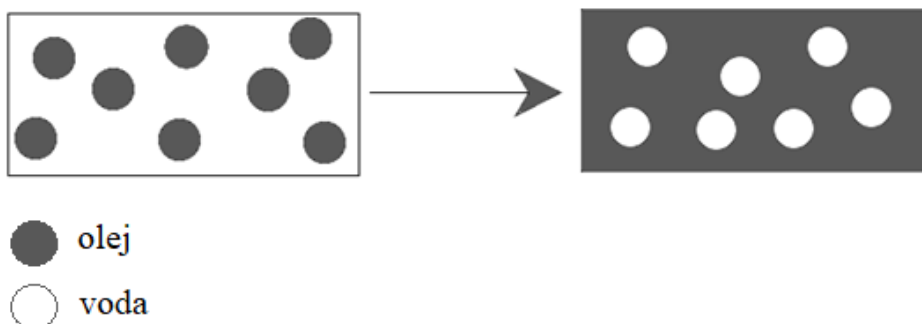
Obecně je výroba enkapsulovaných systémů přístupem zdola nahoru (bottom-up) založena na rozpouštění bioaktivní sloučeniny ve vhodném organickém rozpouštědle s následným vysrážením, přidáním látky, ve které rozpustná není, a v přítomnosti stabilizátorů, jako jsou povrchově aktivní látky nebo hydrokoloidy. [14, 15]

1.2.2.1 Fázová inverze (PIT)

Pokud dojde ke změně podmínek, které stabilizují emulzi určitého typu, může dojít k inverzi fází, kdy emulze daného typu olej ve vodě (O/V) přechází na emulzi opačného typu, a to voda v oleji (V/O), nebo naopak (Obr. 4). Příčinou může být buď fyzikální změna nebo chemická reakce, převádějící tenzid na látku stabilizující opačný typ emulze. [16]

U neionických povrchově aktivních látek lze změny chování tenzidu dosáhnout změnou teploty. Při nízkých teplotách je objem hydratované hlavičky povrchově aktivních látek větší než objem hydrofobního řetězce, což podporuje tvorbu O/V emulzí. Zatímco při vysokých

teplotách je objem dehydratované hlavičky povrchově aktivní látky menší než objem hydrofobního řetězce, což podporuje tvorbu emulzí V/O. [17]



Obr. 4: Fázová inverze emulze typu O/V na V/O

1.2.2.2 Fázová separace

Fázová separace je jednoduchá technika, kterou lze aplikovat na syntetické nebo přirozeně se vyskytující materiály. Základní princip fázové separace zahrnuje využití rozdílných rozpustností dvou nebo více polymerů tak, že se separují do příslušných rozpouštědel. [18]

1.2.2.3 Koacervace

Je relativně jednoduchý přístup k výrobě systému typu obal-jádro, který využívá metodu fázové separace. Je založena na elektrostatických interakcích emulze a vytváří mikrokapsle, jež jsou odolné vůči vlhkosti a zahřívání. V podstatě je koacervace proces separace ve vodné fázi, který začíná disperzí nebo emulgací enkapsulovaného obsahu ve vodném roztoku primárního biopolymeru jako je například arabská guma. Následně se systém smíchá s dalším vodným roztokem sekundárního enkapsulačního biopolymeru, který má opačný náboj než primární. Podpoří se tak tvorba komplexů. Kvůli strukturní složitosti koacervátů jsou jejich typické velikosti v mikrometrickém rozsahu. [19,20,21]

1.2.2.4 Metoda layer-by-layer

Metoda layer-by-layer umožňuje výrobu vícevrstevných kapslí a emulzí. Spočívá ve spontánním nanášení stabilizačních vrstev biopolymerů na rozhraní částic nebo kapiček emulze poháněných elektrostatickou přitažlivostí mezi templátovými částicemi a kapkami emulze. Dochází zejména ke spontánnímu usazování první vrstvy nabitého polyelektrolytu kolem primárních systémů s opačným nábojem, čímž vzniká sekundární vrstva. [1]

1.3 Enkapsulace aktivních látek

V kosmetickém průmyslu hrají důležitou roli delivery systémy a mikrokapsle. Nabízejí ideální nosný systém pro účinné látky, který umožňuje řízené a cílené uvolňování, izolaci, ochranu účinných látek, lepší stabilitu, účinnost, bezpečné podávání, maskování zápachu a také zlepšení textury a vizuálního vzhledu různých kosmetických přípravků. Technologie enkapsulace se používá k dodávání aktivních látek kontrolovanou rychlostí, spolu se zvýšenou účinností a bezpečností. V těchto odvětvích se neustále hledají nové a neotřelé systémy, které by bezpečně začlenily nové látky anebo citlivé účinné látky do kosmetických přípravků. Mikroenkapsulace se již ve farmaceutickém průmyslu používá, ale nové systémy by mohly rozšířit možnosti využití pro podávání léčiv a vést k novým zajímavým výsledkům. Například enkapsulace a postupné uvolňování vakcíny poskytuje delší stimulaci imunitního systému. Kromě vakcín byla enkapsulace a její postupné uvolňování použito také u dalších léčiv, jako jsou bioaktivní sloučeniny, proteiny, DNA a kmenové buňky. [4,22]

Správná volba materiálu obalu je zásadní v závislosti na použití, jelikož ovlivňuje účinnost enkapsulace a stabilitu mikrokapslí. Mezi faktory, které je třeba vzít v úvahu při výběru materiálu obalu patří toxicita, biokompatibilita, stabilita, viskozita, mechanické vlastnosti, kompatibilita mezi účinnou látkou a materiálem stěny, uvolňování účinné látky z vehikula do kůže, zvýšená penetrace účinné látky do rohové vrstvy, zamýšlená velikost částic a mikroskopické vlastnosti povrchu mikročástic. Vzhledem k tomu, že většina materiálů nemá všechny požadované vlastnosti, se běžně používá kombinace různých obalových materiálů. Ty lze vybrat ze široké škály přírodních a syntetických polymerů. Mezi nejčastěji používané obalové materiály v kosmetice patří polysacharidy (gumy, škroby, celulózy, cyklodextriny a chitosan), proteiny (želatina, kasein a sójové proteiny), lipidy (vosky, parafín a oleje) a syntetické polymery (PVC). Dále to mohou být anorganické materiály jako jsou křemičitany, jíly a polyfosfáty. [22]

1.3.1 Aktivní látky

Polysacharidové a proteinové komplexy jsou ideálním materiálem pro enkapsulaci účinných látek. Nosiče na bázi polysacharid-proteinového komplexu jsou velmi univerzální a mohou být použity k enkapsulaci, skladování a dodávání aktivních látek. Mnoho faktorů, jako například vlastnosti a parametry enkapsulovaného materiálu, rychlost míchání, poměr jádra a obalu, vlastnosti proteinů a polysacharidů, charakteristika aktivní látky, rychlost

přidávání biopolymeru při komplexaci, rychlost zesíťování a chlazení významně ovlivňují konečné vlastnosti komplexu polysacharid-protein. [23]

Vhodná enkapsulovaná aktivní látka je klíčová pro správnou funkčnost během zamýšlené aplikace. Mezi aktivní látky, které se v kosmetice nejčastěji enkapsulují patří vitamíny, flavonoidy a curcumin,

1.3.1.1 Vitamíny

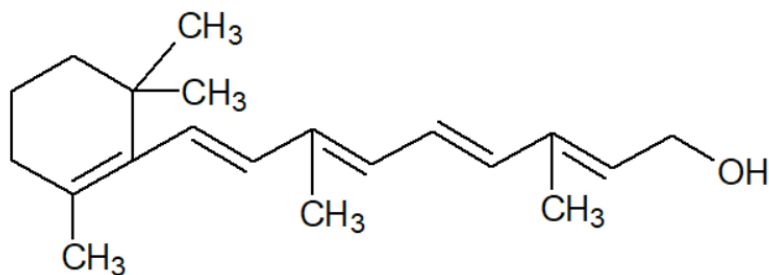
Vitamíny jsou nízkomolekulární látky, které působí jako katalyzátory v biochemických reakcích a taktéž se podílejí na správném fungování organismu. Lidský organismus není schopen produkovat dostatek vitaminů, proto je nucen je získávat z potravy.

Vitamíny můžeme rozdělit do dvou skupin, rozpustných ve vodě a rozpustných v tucích. Mezi vitamíny, které se rozpouští ve vodě řadíme například vitamin B a C. Dále mezi vitamíny rozpustné v tucích řadíme vitamín A, D, E a K. Mnoho vitaminů se vyznačuje také výbornými antioxidačními účinky, například vitamíny A, B₅, C nebo E.

Vitamíny rozpustné v tucích mají mnoho přínosů pro zdraví. Jsou citlivé na oxidaci, takže jejich enkapsulace může představovat vhodný způsob, jak zachovat jejich vlastnosti během skladování a zvýšit jejich fyziologickou účinnost. Enkapsulace také snižuje potenciální výskyt hypervitaminózy a vedlejších účinků. [24,25]

Vitamín A

Retinol neboli vitamín A (Obr. 5) se používá v kosmetice pro topickou aplikaci (krémy, pleťová séra a přípravky proti stárnutí). Působí jako antioxidant a zlepšuje vzhled suché nebo poškozené pokožky, a obnovuje její pružnost. Retinol je brán jako účinný prostředek pro snižování známek předčasného stárnutí pleti. Přidává se hlavně do anti-agingových produktů a funguje také jako exfoliant. Pomáhá odstraňovat staré kožní buňky a stimuluje tvorbu nových kolagenových vláken. Napomáhá vyrovnat pH pokožky, snižuje velikost pórů, činí pokožku hladší a zářivější, má schopnost hlubokého proniknutí do kožních vrstev. [22, 26]



Obr. 5: Chemický vzorec retinolu

Vitamin B₅

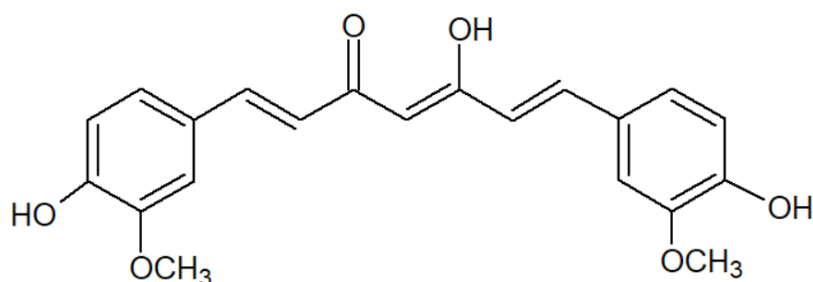
Vitamin B₅ nebo také kyselina pantotenová se vyskytuje ve všech tkáních těla. Má základní význam pro řadu enzymů, které se podílejí na metabolismu sacharidů a cukrů, produkci glukokortikoidů a pohlavních hormonů. Slouží jako prekurzor koenzymu A, který se podílí na metabolických procesech v lidském organismu. V kosmetice a produktech osobní péče lze kyselinu pantotenovou nalézt v hydratačních krémech, produktech pro péči o pleť, vlasových kondicionérech, šamponech a sprejích na vlasy, stejně jako v produktech pro denní líčení, jako jsou oční stíny, rtěnky a řasenky. [26,27]

Vitamin E

Vitamin E neboli tokoferol je důležitý antioxidant rozpustný v tucích, který se v dermatologii používá již více než 50 let. Je důležitou složkou mnoha kosmetických produktů. Chrání pokožku před různými škodlivými vlivy slunečního záření tak, že působí jako lapač volných radikálů. Experimentální studie naznačují, že vitamin E má protinádorové a fotoprotektivní vlastnosti. [28,29]

1.3.1.2 Curcumin

Curcumin (Obr. 6) je jednou z hlavních látek v oddenku kurkumy. Vyznačuje se významnými léčivými a terapeutickými účinky. V kosmetice se používá kvůli jeho antioxidačním a protizánětlivým účinkům na pokožku. Působí proti stárnutí, vráskám i pro regeneraci pokožky. Může vést k lepšímu vzhledu pokožky. Curcumin lze použít také jako barvivo v produktech pro péči o nehty a rty. Enkapsulace curcuminu může zvýšit jeho účinnost, zajistit lepší penetraci a udržet pokožku hydratovanou. [30,31]



Obr. 6: Chemický vzorec curcuminu

1.3.1.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou skupina přírodních látek s proměnlivou fenolickou strukturou, které se nachází v ovoci, zelenině, obilí, kůře, kořenech, stoncích, květech, čaji i víně. Tyto přírodní produkty jsou známé svými blahodárnými účinky na zdraví. Flavonoidy jsou nyní považovány za nepostradatelnou složku v řadě nutraceutických, farmaceutických, lékařských a kosmetických aplikací.

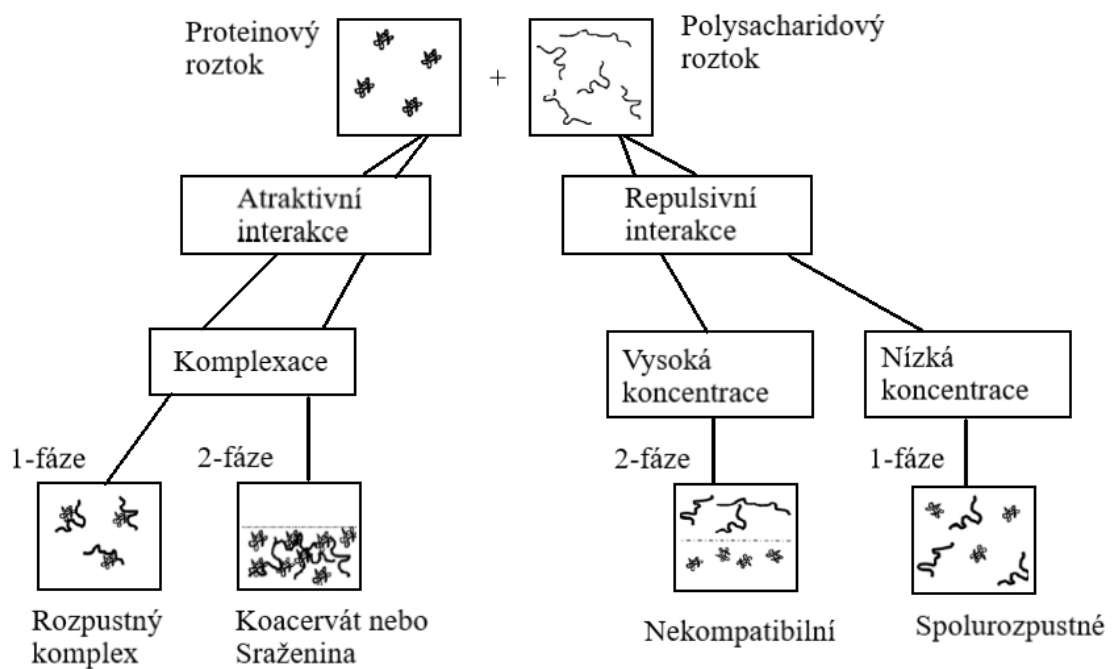
Vykazují pozoruhodné spektrum biologických aktivit, zejména ty antioxidační, které zachycují volné radikály. Ty jsou hlavní příčinou vrásek způsobených UV zářením a dalšími faktory. Proto může být jejich enkapsulace slibným a účinným přírodním řešením proti vráskám. [32,33]

2 INTERAKCE PROTEIN – POLYSACHARID

Proteiny a polysacharidy jsou přírodní biopolymery, které jsou používány jako funkční přísady. V mnoha z těchto aplikací jsou protein-polysacharidové směsi využívány pro stabilizaci disperzí. Proteiny jsou známé svou povrchovou aktivitou, která jim umožňuje hrát hlavní roli při formování a stabilizaci emulzí a pěn kombinací elektrostatických a stérických mechanismů. Dlouhodobá stabilita může být dále zvýšena použitím polysacharidů ke kontrole reologie disperzní fáze, čímž zpomalují separaci fází. Ke stabilizaci a výsledné struktuře tak mohou přispívat jak proteiny, tak polysacharidy. Z toho je zřejmé, že mísení těchto biopolymerů má synergický účinek. [34]

Molekuly proteinů a polysacharidů mohou vzájemně interagovat prostřednictvím kovalentních i nekovalentních vazeb. Kovalentní vazby poskytují specifickou, silnou a v podstatě nevratnou vazbu, vznikají tzv. konjugáty Maillardova typu. Tyto konjugáty, produkované suchým ohřevem směsi dvou druhů biopolymerů, mohou zlepšit špatnou rozpustnost proteinů, koloidní stabilitu a mezifázovou funkčnost proteinů (při pH blízkém izoelektrickému bodu a při vysoké koncentraci elektrolytů). Na druhou stranu, proteinové a polysacharidové molekuly mohou vzájemně reagovat prostřednictvím fyzikálních nekovalentních interakcí za vzniku komplexů. Komplexace je tedy výsledkem slabých nespécifických a nekovalentních interakcí jako jsou elektrostatické, Van der Waalsovy či hydrofobní interakce nebo také vodíkové vazby mezi proteiny a polysacharidy. U nabitých polysacharidů je příspěvek elektrostatických interakcí převládající. Typické jsou silné elektrostatické komplexy tvořené směsí kladně nabitých proteinů a záporně nabitého polysacharidu. Slabší reverzní komplexy mají tendenci vznikat mezi aniontovými polysacharidy a proteiny nesoucí téměř nulový celkový náboj nebo čistý záporný náboj. Tedy při úpravě pH anebo iontové síly vodné fáze, se síla interakcí může mezi proteinem a polysacharidem podstatně lišit. [34]

Při smíchání proteinů a polysacharidů může nastat jedna z možností na Obr. 7. Jestliže je roztok velmi zředěný směr bude stabilní. Pokud dochází ke zvyšování koncentrace biopolymerů může nastat buď asociace anebo segregace. Přitažlivé interakce mezi proteinem a polysacharidem mohou vést k tvorbě rozpustných či nerozpustných komplexů. Tvorba nerozpustných komplexů vede k jevu fázové separace nazývané koacervace. Vznikající nerozpustný komplex je elektricky neutrální a v závěru sedimentuje. Elektrostatické komplexy vznikají mezi pozitivně nabitým proteinem a negativně nabitým polysacharidem. [34]

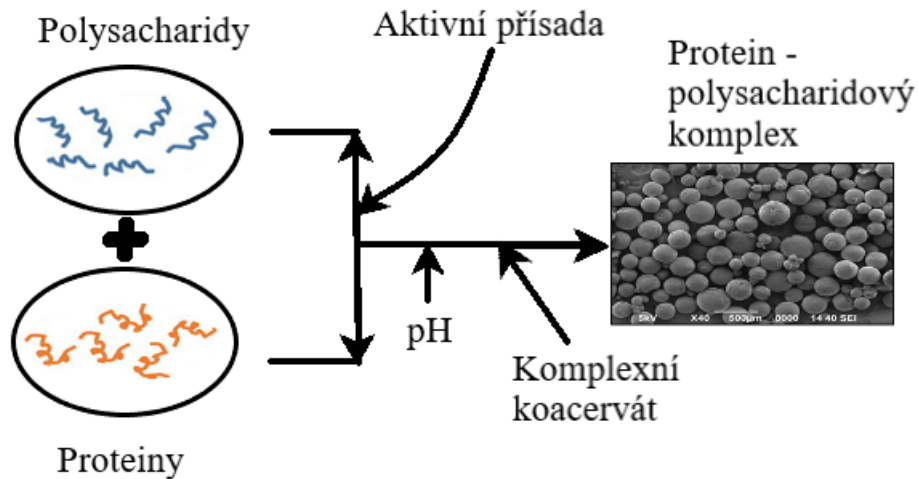


Obr. 7: Schématické znázornění druhů strukturních uspořádání zúčastněných molekul, které se mohou objevit, když jsou proteiny a polysacharidy smíchány dohromady [35]

2.1 Komplexy

Komplexy protein-polysacharid většinou pocházejí z elektrostatické interakce mezi opačně nabitými makromolekulami. Se snižováním volné energie systému mohou tyto rozpustné komplexy dále agregovat, dokud jejich velikost a povrchové vlastnosti nevedou k nerozpustnosti. Poté dochází k makroskopické fázové separaci kapalina-kapalina. Tvorba elektrostatických komplexů a koacervátů mezi proteiny a polysacharidy se přirozeně vyskytuje v několika živých systémech a spouští různé biologické funkce v tzv. příbuzných biopolymerních systémech. V případě silných polyelektrolytů tvorba protein-polysacharidového komplexu je poháněna především příznivým snížením celkové volné elektrostatické energie systému v důsledku uvolňování protiiontů při tvorbě komplexu. Pro slabší polyelektrolyty je příznivější snížení entalpie v důsledku elektrostatické přitažlivosti představující hnací sílu pro tvorbu komplexů. Dalším důsledkem elektrostaticky řízené tvorby komplexů je několik fyzikálně-chemických parametrů, které ovlivňují celkový a místní náboj protein-polysacharidu. Především pH, iontové síly, poměr proteinu k polysacharidu a celková koncentrace biopolymeru. Některé další

parametry můžou také ovlivnit tvorbu komplexů, jako například molekulová hmotnost, hustota náboje, míchání, tlak nebo teplota. [10, 36]



Obr. 8: Interakce protein – polysacharid [37]

2.2 Konjugáty

Konjugáty jsou produkty vzniklé glykosylací proteinů sacharidy prostřednictvím Maillardovy reakce. Maillardova reakce využívá kovalentní vazbu mezi skupinou redukujících sacharidů a aminoskupinou proteinu. Tato reakce nevyžaduje další chemikálie, protože k ní dochází přirozeně za kontrolovatelných podmínek teploty, času, pH a vlhkosti. Kromě toho roste zájem o modifikaci proteinů pro různé průmyslové aplikace.

Konjugáty protein-polysacharidů připravené přirozeně se vyskytující reakcí, bez použití jakýkoli chemikálií, jsou užitečné jako nové funkční biopolymery s vynikajícími emulgačními, antioxidačními a antimikrobiálními vlastnostmi pro různé aplikace. [38,39]

2.3 Vhodné proteiny a polysacharidy pro vznik komplexů

2.3.1 Proteiny

Proteiny jsou vysokomolekulové látky tvořené aminokyselinami spojenými kovalentní peptidovou vazbou do řetězce. Jsou to nejužitečnější makromolekuly v živých organismech a mají životně důležité funkce ve všech biologických procesech. Fungují jako katalyzátory, transportují a ukládají kyslík, vytvářejí pohyb, přenášejí nervové impulsy, poskytují mechanickou podporu, imunitní ochranu a také řídí růst a diferenciaci.

V současné době byly publikovány různé studie využívající proteiny, živočišného i rostlinného původu, jak pro stabilizaci emulzních systémů, tak například pro tvorbu komplexů. Konkrétně se používají například proteiny jako pšeničný protein, mléčný protein, syrovátkový protein a želatina, a to v různých aplikacích, jako je mikroenkapsulace různých složek a podávání léčiv. [23]

2.3.1.1 Sójový protein

Sója je jedním z nejdůležitějších zdrojů rostlinných bílkovin a je především známá pro svou širokou škálu zemědělských, potravinářských a průmyslových aplikací a také pro zdraví. S postupným objevováním výhod a dalších aplikací zájem o proteiny ze sójových bodů neustále roste. Sójové proteiny se v potravinách pro zvířata a lidi používají několika způsoby, jako je kojenecká výživa, mouka, proteinové koncentráty a izoláty. V organické kosmetice se používají sójové boby, které nebyly geneticky modifikované. Povolené množství v přírodní kosmetice je s koncentrací do 5 %. Díky vysokému obsahu aminokyselin je velmi oblíbenou přísadou výrobků pro péči o pleť a vlasy. Revitalizuje kožní mechanismy, udržuje kvalitativní funkce epidermu a stimuluje tvorbu kolagenu, keratinu a elastinu. Zaceluje i velmi poškozené vlasy, zlepšuje jejich vzhled a texturu, obnovuje je a vyživuje. Dále má výbornou schopnost udržet dostatečnou vlhkost pleti, vyplnit vrásky a minimalizovat nerovnosti pleti. [40]

2.3.1.2 Kasein

Kasein je živočišný protein tvořící až 80 % mléčné bílkoviny. Je významným zdrojem vápníku, fosfátů či aminokyselin. V kosmetice je významný především jako zahušťovadlo a stabilizátor. Může se rovněž používat k úpravě vlasů a jako kondicionér. Disponuje antistatickými účinky. [41]

2.3.2 Polysacharidy

Polysacharidy jsou molekuly obsahující dlouhé řetězce monosacharidů spojených glykosidovými vazbami. Mohou být jak rostlinného a živočišného, tak mikrobiálního původu. Obecně se v jejich molekule vyskytuje velký počet reaktivních funkčních skupin, s různým chemickým složením a širokým rozsahem molekulové hmotnosti. Tyto rozdíly definují jejich rozmanitost ve vlastnostech a struktuře. Různé deriváty polysacharidů lze připravit chemickou modifikací různých reaktivních skupin přítomných na jejich řetězcích. Často jsou nerozpustné ve vodě a obecně amorfni povahy. V závislosti na struktuře mají odlišné fyzikální a chemické vlastnosti než jejich monosacharidové jednotky. Polysacharidy mají lineární až rozvětvenou strukturu zahrnující strukturální polysacharidy, jako je celulóza a chitin, a také zásobní polysacharidy, jako je škrob a glykogen. Při komplexní koacervaci polysacharidů a proteinů se široce používá celulóza, chitosan, karagenan a arabská guma, přičemž jsou některé charakterizovány v následujícím textu. [23]

2.3.2.1 Chitosan

Chitosan je deacetylovaná forma chitinu. K chitinu se při vysoké teplotě 100–160 °C přidává zásada, aby se odstranily N-acetylové skupiny. Výsledný deacetylovaný chitin s různými stupni deacetylace se nazývá chitosan, který je rozpustný v kyselém prostředí. Chitosan je tedy přírodní polymer složený z N-acetyl-D-glukosaminových a D-glukosaminových zbytků spojených dohromady β (1→4) glykosidovými vazbami. Je hlavní složkou buněčných stěn a hub a je také základním materiálem bezobratlých živočichů. Pochází většinou z živých organismů, jako jsou želvy, krevety, krabi a hmyz, ale může být také syntetizován nebiologicky prostřednictvím polymerace katalyzované chitinázou. Chitosan a chitin mají mnoho vynikajících vlastností včetně biokompatibility, biologické rozložitelnosti, netoxicity a absorpčních vlastností, a proto mohou být široce používány v různých oblastech, jako je biomedicína, zemědělství, úprava vody, kosmetika, potraviny a enkapsulace. [23]

V kosmetickém průmyslu se užívá především pro výrobu krémů jak na ruce a tělo, tak na obličej. Mají především pokožku udržet hydratovanou, měkkou a také zajišťuje transport aktivních látek. V medicíně je využíván pro výrobu vatových tamponů a bandáží. Další využití a funkce jsou shrnuty v následující tabulce 1.

Tab. 1: Přehled využití chitosanu [42]

Využití	Aplikace	Funkce
Kosmetický průmysl	Krémy na obličej, krémy na ruce a tělo, lak na nehty, make-up, pasty na zuby, koupelová kosmetika	Udržení vlhkosti pokožky, hydratace, změkčení, transport aktivních látek
Medicína	Vatové tampony, bandáže	Zubní plak, hojení popálenin, transport léčiv, inhibice nádorového bujení
Potravinářský průmysl	Stabilizátor barev, konzervant, krmivová přísada	Regulátor viskozity, prodloužení trvanlivosti
Další využití v průmyslu	Papírenský průmysl, zemědělský průmysl, úprava vody	Povrchová úprava papírů a fotografických papírů, čištění a filtrace vod, flokulace/koagulace bílkovin, barviv, aminokyselin, ochranné povlaky rostlin, řízené uvolňování pesticidů

2.3.2.2 *Arabská guma*

Arabská guma je přírodní guma získaná ze stromu akácie. Skládá se ze směsi polysacharidů s frakcemi 90–99 % arabinogalaktanu a 1 % glykoproteinu. Arabská guma je žlutá pryskyřičná hmota, která se zejména používá pro její emulgační vlastnosti. Rovněž funguje jako stabilizátor a vykazuje antioxidační aktivitu. V kosmetice ji lze nalézt především v produktech péče o tělo, pleť, vlasy, ale také v dekorativní kosmetice. [23]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Nedávné výzkumy v oblasti interakcí protein-polysacharidů poskytly mnoho nových poznatků o jejich fázovém chování, reologii a interakcích. Kromě toho je mnohem lépe známa struktura a kinetika fázové separace komplexů a koacervátů. Podle výzkumu Schmitt a kol. [43] se ukázalo, že tyto systémy vykazují velmi zajímavé vlastnosti. To by mohlo vést k velmi slibným novým strukturám s dobrou stabilitou a skladováním. Mohou být použity protein-polysacharidové komplexy a koacerváty jako transportní systémy pro bioaktivní látky nebo sensitivní molekuly.

Curcumin má vysoce příznivé biologické a farmakologické účinky, nicméně má omezené použití kvůli své nízké rozpustnosti a citlivosti na světlo. Protein-polysacharidové komplexy můžou účinně zabudovat léčiva rozpustná v lipidech a zvýšit tak jejich stabilitu a dávkovatelnost ve vodných roztocích. Ve studiích Fan a kol. [44] použili polymerní matici izolátu sójového proteinu a fukoidanu, do které byl enkapsulován curcumin prostřednictvím elektrostatických interakcí za kyselých a neutrálních podmínek. Fukoidan byl schopný účinně stabilizovat agregaci nanočástic sójového proteinu, i když se nacházel v blízkosti isoelektrického bodu. Nanočástice vytvořily díky elektrostatické přitažlivosti, vodíkové vazbě a hydrofobnímu působení strukturu jádro–obal, která měla dobrou odolnost vůči solím, teplu a také dlouhodobou skladovací stabilitu. Curcuminem se dále zabývali i ve studiích Chen a kol., kteří navrhli přípravu nového systému pro enkapsulaci resveratrolu a curcuminu. Curcumin s resveratrolelem měli při společném použití synergické účinky, ale bylo náročné je společně enkapsulovat v tradičních aplikačních vehikulech, kvůli jejich rozdílné molekulární polaritě. Proto byly vyvinuty nanokomplexy curcumin-zein-resveratrol-chitosan, kde byly zkoumány jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. [59]

Další výzkum prováděl Yuan a kol., kteří zkoumali komplexní koacervaci izolovaného sójového proteinu (SPI) s chitosanem (CHIT) a dále pak mikroenkapsulaci oleje z mořských řas. Údaje o zeta potenciálu nasvědčují tomu, že optimální pH komplexu CHIT:SPI bylo okolo hodnoty pH 6 v poměru 6:0,125 g · g⁻¹. Reologické a mikrostrukturní měření ukázalo, že koacerváty SPI:CHIT měly viskoelastické chování pevné látky s vysoce propojenými gelovými síťovými strukturami. Mikrokapsle koacervátu SPI:CHIT s olejem z mořských řas vykazovaly pokročilou účinnost enkapsulace a zlepšenou oxidační stabilitu ve srovnání s kapslemi se samostatným SPI. [58]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši na téma Enkapsulace aktivních látek s využitím protein-polysacharidových komplexů. Teoretická část se zaměřuje na charakteristiku enkapsulačních systémů a metod, dále pak na aktivní látky a vybrané proteiny a polysacharidy.

V experimentální části bylo za úkol připravit jednotlivé roztoky s různým zastoupením protein – polysacharidových biopolymerů, které jsou schopny tvořit komplexy. Poté vybrat nejvhodnější pH a poměr míchání biopolymerů k enkapsulaci curcuminu. Následně pak sledovat jejich fyzikálně – chemické vlastnosti a schopnost enkapsulace curcuminu.

5 MATERIÁLY A METODY

5.1 Použité chemikálie a materiály

- Hydrolyzát sójového proteinu (SPH) – Sigma-Aldrich
- Chitosan (CHIT) – Sigma-Aldrich, střední molekulární hmotnost, Island
- Kaseinát sodný (CAS) – Sigma-Aldrich
- Hydroxid sodný (NaOH) - PENTA
- Kyselina chlorovodíková (HCl) – mikroCHEM,
- Kyselina octová – 99 %, PENTA
- Ethanol – PENTA
- Curcumin – Sigma-Aldrich, z Curcuma longa

5.2 Pomůcky a použité zařízení

- Analytické váhy (Sartorius)
- Magnetické míchadlo (Heidolph)
- Bateriový pH metr CPH 51 s kombinovanou elektrodou HC 103
- Detektor intenzity rozptylu světla ZETASIZER Nano Series ZS 90 (Malvern)
- Kyvety pro měření zeta-potenciálu DTS1070, kyvety plastové
- Mikropipety Eppendorf reaserch plus
- Stříkačkové mikrofiltry 1,2 μ m
- Mikroskop Fluoview FV3000
- Mikroskop optický – Olympus CX21
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

5.3 Příprava zásobních a pracovních roztoků

5.3.1 Příprava 1M a 0,1M roztoku hydroxidu sodného

Bylo připraveno 200 ml 1M roztoku navážením 8 g NaOH a smícháním s destilovanou vodou. Poté se připravilo 100 ml 0,1M NaOH smícháním 10 ml 1M NaOH a doplnění destilovanou vodou po rysku ve 100ml odměrné baňce. Tyto roztoky NaOH byly využity pro úpravu pH.

5.3.2 Příprava 1M a 0,1 M roztoku kyseliny chlorovodíkové

Bylo připraveno 200 ml 1M roztoku HCl odpipetováním 17,66 ml HCl (35 %) a jejím doplněním destilovanou vodou po rysku v odměrné baňce. Dále bylo připraveno 100 ml 0,1M roztoku HCl, a to smícháním 10 ml 1M HCl a doplněním destilovanou vodou po rysku. Tyto roztoky HCl byly využity pro úpravu pH.

5.3.3 Příprava zásobních disperzí biopolymerů

Pro přípravu komplexů byly použity vybrané biopolymery, konkrétně sójový proteinový hydrolyzát (SPH), kaseinát sodný (CAS) a chitosan (CHIT). Z daných biopolymerů byla jako první vytvořena zásobní disperze daného biopolymeru o koncentraci 1 % (w/v). Zásobní disperze SPH a CAS byla připravena smícháním 1 g SPH (popřípadě CAS) a doplněním destilované vody ve 100ml odměrné baňce po rysku. Dále byla vytvořená disperze míchána po dobu 4 hodin na magnetické míchačce.

Pro přípravu zásobní disperze chitosanu byl zvolen odlišný způsob přípravy kvůli jeho nerozpustnosti při neutrálním pH. Zásobní roztok chitosanu byl připraven smícháním 1 g chitosanu a doplněním 0,1M kyselinou octovou do 100ml odměrné baňky. Vytvořená disperze se nechala zahřívat na 50 °C po dobu 30 minut a dále se také míchala 4 hodiny na magnetické míchačce do kompletního rozpuštění chitosanu.

5.4 Úprava pH a vizuální pozorování

Ze zásobních disperzí biopolymerů (1 %) byly připraveny naředěním destilovanou vodou disperze s koncentrací 0,1 %. Tyto disperze byly nejdříve přefiltrovány přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 1,2 μm a následně u nich bylo upraveno pH pomocí roztoků HCl a NaOH na hodnoty v rozmezí pH 2–8, popřípadě 2–7. Měření probíhalo pomocí bateriového pH metru s kombinovanou pH elektrodou. Takto upravené disperze biopolymerů byly využity jak pro přípravu komplexů, tak pro pozorování vizuálních změn v chování jednotlivých biopolymerů při dané hodnotě pH. Tyto změny byly zaznamenány do podoby fázových diagramů.

5.5 Příprava komplexů

Pro přípravu komplexů byla připravena 0,1% disperze biopolymerů s různým pH (viz. kap. 5.4). Nejdříve byly vybrány vzájemné kombinace biopolymerů pro přípravu komplexů (CAS:CHIT, SPH:CHIT). Tyto biopolymery (při daném pH) byly smíchány v příslušných poměrech (100:1, 20:1, 10:1, 2:1, 1:1, 1:5, 1:10). Tím byla získána řada vzorků, u kterých byly pozorovány vizuální změny a vznik komplexů.

Podobným způsobem byly připraveny komplexy pro enkapsulaci curcuminu. V tomto případě byl jako první rozpuštěn curcumin v ethanolu (2 mg/ml). Curcumin v ethanolu (1 ml) byl následně přidán do 20 ml CAS, směs se nechala po dobu 30 min míchat ve tmě, aby bylo zabráněno degradaci curcuminu světlem. Následně se protein (CAS) s curcuminem použil pro přípravu komplexů stejným způsobem, jak je popsáno výše.

5.6 Měření Zeta potenciálu

Zeta potenciál (ZP) je výraz pro elektrokinetický potenciál v koloidních systémech. Z teoretického hlediska je zeta potenciál rozdíl potenciálů mezi mobilním disperzním médiem a stacionární vrstvou disperzního média připojenou k dispergované částici. Každá částice je na povrchu obklopena elektrickou dvojvrstvou, která je tvořena vnější a vnitřní částí. Vnitřní vrstvu tvoří silně navázané ionty, zatímco vnější je tvořena ionty volnými. Pokud dojde k pohybu částic, ionty se začnou pohybovat společně s částicí. Potenciál, nacházející se na této hranici se nazývá zeta potenciál. Nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje zeta potenciál je pH média. Mezi dalšími faktory patří iontová síla, koncentrace jakýchkoli přísad a teplota. Význam zeta potenciálu spočívá v tom, že jeho hodnota může souviset s krátkodobou a dlouhodobou stabilitou daného systému. Jestliže je

hodnota zeta potenciálu větší než ± 30 mV je daný systém považován za elektrostaticky stabilní. [45]

Měření zeta potenciálu bylo provedeno přístrojem ZETASIZER Nano series ZS 90. Vzorky pro měření ZP byly připraveny následujícím způsobem. Z připravené disperze SPH (0,1 %) bylo pipetováno 300 μ l vzorku o daném pH. Kyveta pro měření zeta potenciálu byla pomocí injekční stříkačky naplněna připraveným vzorkem. Měření bylo zopakováno při různém pH v rozsahu hodnot 2–8. Obdobným způsobem byl proměřen zeta potenciál při různých pH i pro ostatní biopolymery (CAS a CHIT), vzorky byly připraveny podle Tab. 2, tak aby byla dodržena dostatečná kvalita vzorku pro stanovení zeta potenciálu. Zeta potenciál připravených komplexů byl rovněž proměřen, disperzí připraveného komplexu byla naplněna kyveta a poté vložena do přístroje. Všechna měření byla provedena při teplotě 25 °C ve třech opakováních.

Tab. 2: Měření zeta potenciálu v závislosti na pH

Polymery	Voda s pH	Roztok polymeru
SPH	0 ml	300 μ l
CAS	4 ml	500 μ l
CHIT	0 ml	500 μ l

Naměřené hodnoty zeta potenciálu lze využít pro výpočet síly elektrostatické interakce (SEI) podle Yuan a kol. [58]. Sílu elektrostatické interakce mezi opačně nabitými polyelektrolyty lze odhadnout podle následující rovnice (1):

$$SEI (mV^2) = |ZP_1 \times ZP_2| \quad (1)$$

Kde ZP_1 a ZP_2 jsou naměřené ζ -potenciály obou polymerů při každém pH.

5.7 Velikost částic

Velikost částic je velmi důležitým parametrem pro charakterizaci koloidů a lze změřit pomocí přístroje Zetasizer. Tato technika je založena na dynamickém rozptylu světla, který je znám také pod názvem kvazi-elastický rozptyl světla. Ze světelného zdroje dopadá na částice světlo, které se pohybují Brownovým pohybem. Částice jsou nestacionární a dochází tak k fluktuaci intenzity rozptýleného světla. [41]

Z připravených vzorků (biopolymery s upraveným pH/připravené komplexy) byl pipetován 1 ml do polystyrenové kyvety s uzávěrem. Měření proběhlo pomocí přístroje ZETASIZER nano series ZS 90 metodou laserové difrakce. Pro měření byly zadány následující parametry: index lomu polysacharidu $n=1,33$; index lomu proteinu $n=1,45$; index lomu disperzního prostředí $n=1,33$. Měření probíhalo pod detekčním úhlem 90° a při teplotě 25°C ve třech opakováních.

5.8 Mikroskopie

5.8.1 Konfokální mikroskop

Zdroj světla u konfokální mikroskopu je laser, který přes bodovou clonu a objektiv osvětluje preparát. Stejným objektivem následně prochází i světlo odražené. Paprsky procházející dichroickým zrcadlem pokračují k bodové cloně, kde dojde k odfiltrování světla z jiných rovin. Poté paprsky vstupují do fotonásobiče, kde jsou zesíleny a detekovány. [42]

Komplexy s curcuminem byly pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu FLUOVIEW FV3000. Na podložní sklíčko bylo napipetováno 10 μl vzorku komplexu CAS:CHIT v poměru 5:1 s curcuminem, vzorek byl přiklopen krycím sklíčkem. Zobrazení komplexu bylo možné díky enkapsulovanému curcuminu. Komplex byl pozorován při zvětšení 10x. Pořízené fotografie byly následně upravovány ve softwaru ImageJ.

5.8.2 Optická mikroskopie

Optický mikroskop se používá k pozorování předmětů, které okem nelze spatřit. Jeho součástí je optická soustava, osvětlovací soustava a mechanické zařízení. Optický mikroskop zvětšuje zorný úhel, který svírá okrajové paprsky předmětu zobrazeného na sítnici. Pakliže se zvětší zorný úhel, zvýší se schopnost odlišit od sebe dva body. Objektiv je spojná soustava čoček, která je umístěna blíže pozorovanému předmětu. [43]

Komplexy a jejich mikrostruktura byla pozorována pomocí optického mikroskopu Olympusu CX21. Na podložní sklíčko se napipetovalo 10 μl vzorku komplexu a následně bylo překryto krycím sklíčkem. Komplexy byly pozorovány při zvětšení 40x. Pořízené fotografie byly následně upravovány pomocí softwaru ImageJ.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

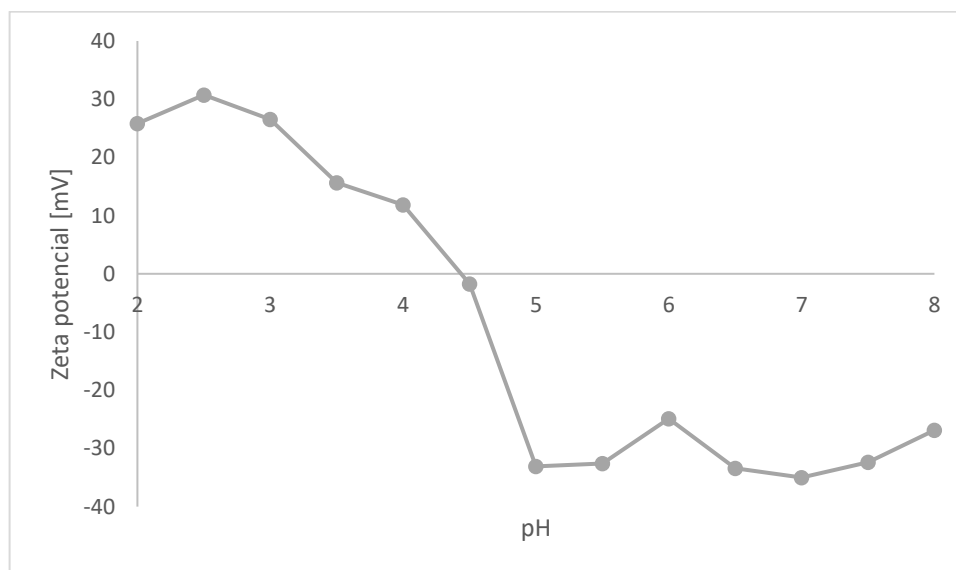
6.1 Charakterizace biopolymerů

6.1.1 Kaseinát sodný

Kasein je hlavní bílkovina v mléce savců, skládá se ze směsi čtyř flexibilních kaseinů (α_{S1} , α_{S2} , β a κ). V čisté formě je to amorfni bílá pevná látka, bez chuti a zápachu, zatímco komerční typ je nažloutlý s příjemnou vůní. Kasein se obvykle získává kyselým srážením mléka, takto získaný kasein je ale ve vodě nerozpustný. Rozpustný kasein – kaseinát – se získává rozptýlením kyselého kaseinu v alkalickém roztoku, nejčastěji se používá hydroxid sodný. [44,45]

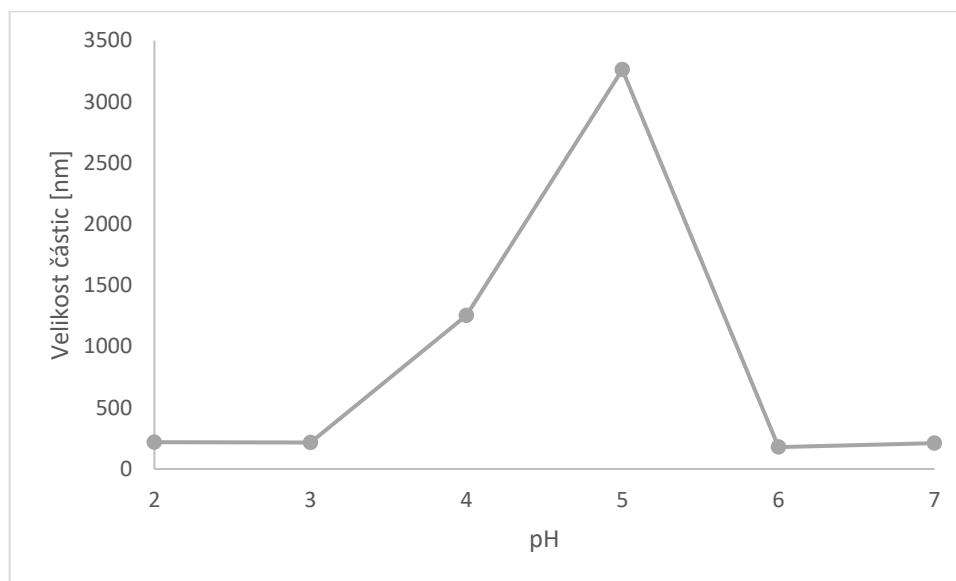
Disperze CAS byla přefiltrována a v jednotlivých vzorcích bylo upraveno pH na hodnoty v rozmezí 2–8. U těchto vzorků bylo pomocí přístroje ZETASIZER proměřen ZP kaseinátu a jeho velikost částic v závislosti na pH.

Podle Obr. 9 je zřejmé, že CAS v závislosti na pH prokazuje ZP v rozsahu +30 až -35 mV v rozmezí pH 2–8, nicméně při pH 4–5 ztrácí své elektrostatické repulsní síly a jeho ZP dosahuje nulových hodnot, tato hodnota pH se uvádí jako isoelektrický bod (pI). Isoelektrický bod je definován jako hodnota pH, při kterém má protein nulový náboj, jeho pohyblivost v elektrickém poli je nulová. [46] Podle studií Sarode a kol. [47] byl stanovený isoelektrický bod pro kasein při pH 4,6, v tomto bodě je i nejméně rozpustný.



Obr. 9: Závislost zeta potenciálu CAS na pH

Měření ZP odpovídá i měření velikosti částic CAS. CAS v závislosti na pH dosahuje velikosti částic v rozmezí 178–3262 nm. Nejmenší velikosti dosahuje při pH 2–3 a 6–7 a to 178 nm, při tomto pH dochází k elektrostatickému odpuzování jednotlivých proteinových molekul. Při pH 5 v okolí pI CAS nastává výrazná změna velikosti částic CAS. V tomto pH se snižují elektrostatické repulsní síly, náboj částic se blíží nule, a kvůli těmto jevům dochází k agregaci částic.

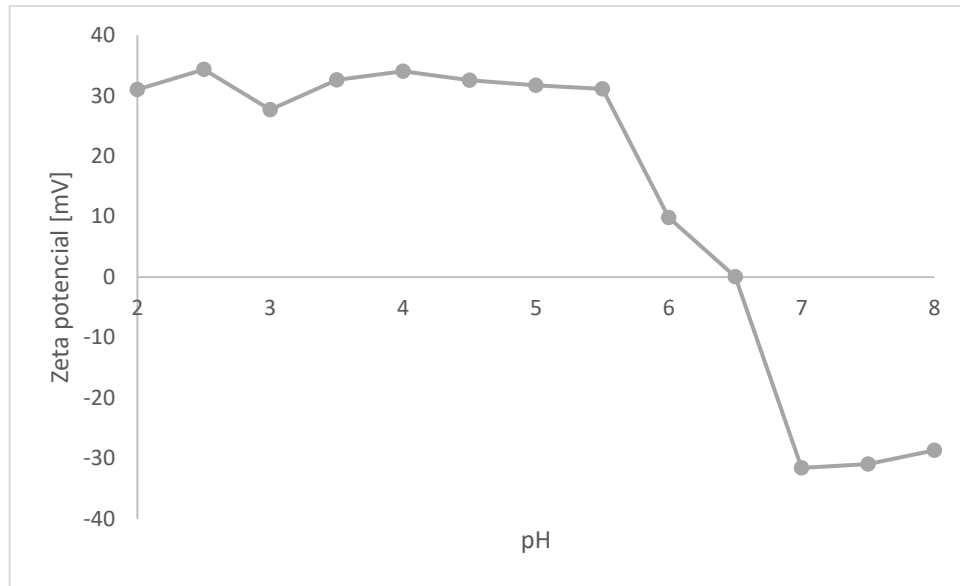


Obr. 10: Závislost velikosti částic CAS na pH

6.1.2 Chitosan

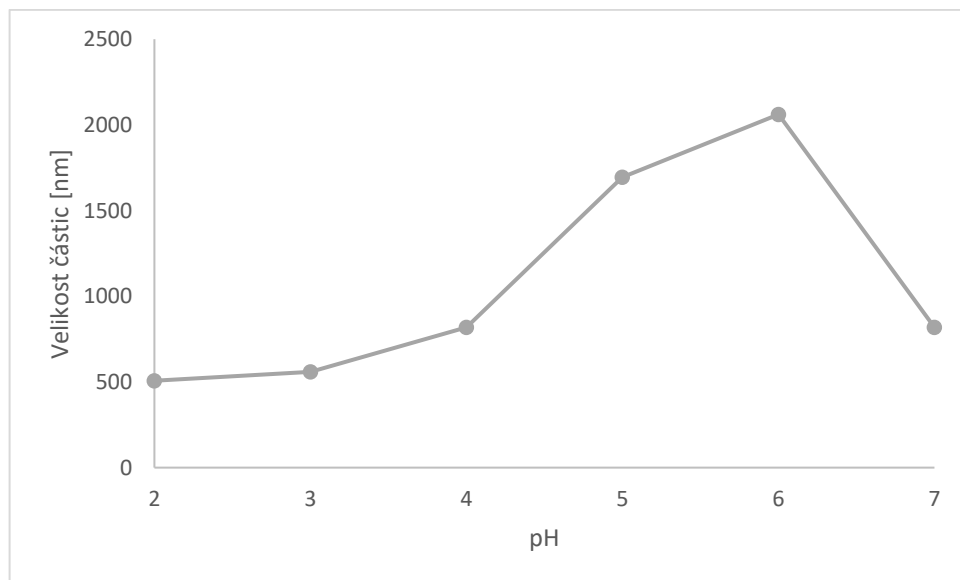
Chitosan je polysacharid, který se hojně vyskytuje v přírodě. Hlavní charakteristikou je jeho stupeň acetylace a molekulová hmotnost. Ty mají určitý vliv na funkční vlastnosti chitosanu, od jeho rozpustnosti a schopnosti vytvářet různé materiály až po biologickou rozložitelnost. [48]

Jako předchozí biopolymer i chitosan byl nejdříve přefiltrován a bylo upraveno pH v rozmezí 2–8. Po změření ZP pomocí Zetasizeru můžeme na Obr. 11 pozorovat, že CHIT nese pozitivní náboj v rozmezí hodnot pH 2–6,5, avšak při pH 6–7 ZP nabývá nulových hodnot, což odpovídá pI chitosanu. Můžeme sledovat pokles ZP, který je způsoben deprotonací aminoskupin se zvyšujícím se pH. Podle výzkumu Mateescu a kol. [49] je isoelektrický bod chitosanu přibližně při pH 7.



Obr. 11: Závislost zeta potenciálu CHIT na pH

U CHIT velikost částic v závislosti na pH dosahuje hodnot v rozmezí 506–2261 nm. Nejmenší velikosti však dosahuje při pH 2 a to 506,9 nm, při tomto pH dochází k elektrostatickému odpuzování polysacharidových molekul. U pH 6 CHIT nastává změna velikosti částic. U tohoto pH se snižují elektrostatické repulsní síly, náboj částic se blíží k nule, a kvůli těmto jevům dochází opět k agregaci částic.

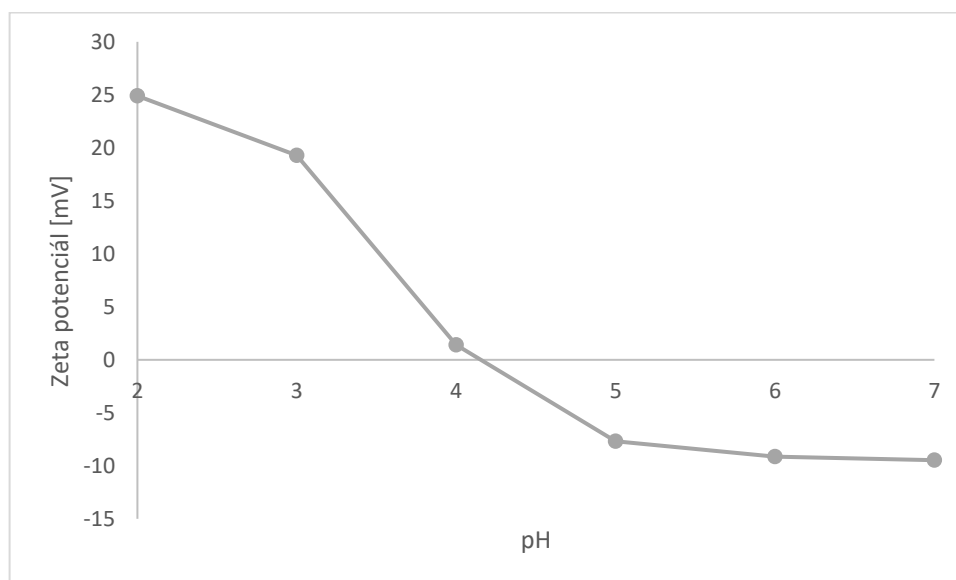


Obr. 12: Závislost velikosti částic CHIT na pH

6.1.3 Sojový proteinový hydrolyzát

Sójový protein se používá v různých odvětvích. V jeho isoelektrickém bodě jeho funkčnost, stejně jako u ostatních proteinů, klesá. Horax a kol. optimalizoval hydrolyzáty sójového proteinu při kyselých hodnotách. Při pH 3 se rozpustnost zvýšila na 75 % a zlepšily se emulgační vlastnosti. [50]

Stejně jako u CHIT a CAS byl u SPH stejným postupem změřen ZP. Z naměřených výsledků (Obr. 13) je zřejmé, že isoelektrický bod SPH lze pozorovat v okolí hodnoty pH 4. Tato hodnota se shoduje i podle studií Wang a kol. [51], kteří stanovovali mezifázovou reologii a pěnové vlastnosti sójového proteinu a hydrolyzátu v kyselém stavu. Jelikož jsou hodnoty ZP v použitém rozsahu pH záporné a molekuly SPH se díky tomu vzájemně odpuzují, předpokládáme, že nedochází u SPH v použité oblasti pH k agregaci. Velikost částic se však u tohoto biopolymeru z časových důvodů neměřila.

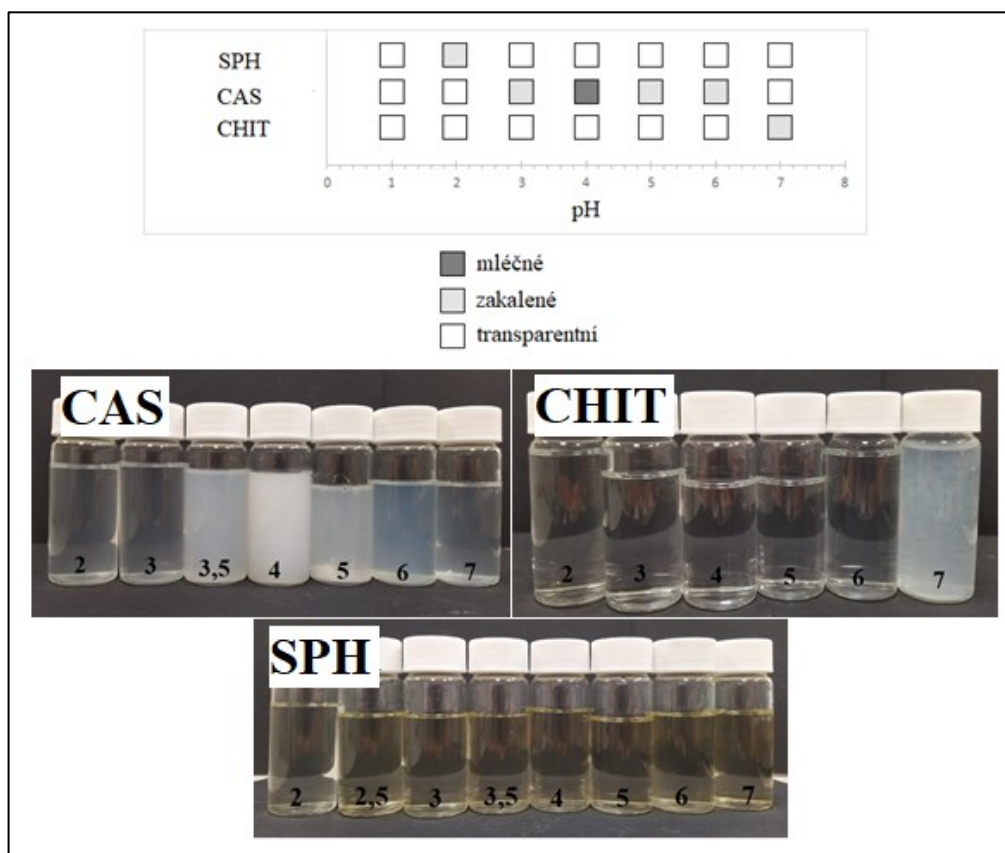


Obr. 13: Závislost zeta potenciálu SPH na pH

6.1.4 Vizuální pozorování

Obrázek 14 zobrazuje fázové diagramy CHIT, CAS a SPH jako funkci pH. Jednotlivé vzorky biopolymerů byly nechány po dobu 2 hod stát a poté bylo hodnoceno jejich fázové chování vizuálním pozorováním. Byly hodnoceny jako mléčné, zakalené anebo transparentní. Z fázového diagramu je zřejmé, že u SPH a CHIT nedochází k fázové separaci v širokém rozmezí pH, s výjimkou u CHIT při pH 7, kde byla patrná fázová separace. To odpovídá i zjištěním z měření zeta potenciálu. Fázové chování CAS bylo odlišné od CHIT a SPH, kdy v okolí pI CAS ($\sim 4,6$), konkrétně mezi pH 4 a 5 nastala fázová separace tohoto proteinu. Při

těchto hodnotách se CAS stává nerozpustným, směrem k nižším a vyšším hodnotám pH se jeho rozpustnost zvyšuje a stává se transparentním.



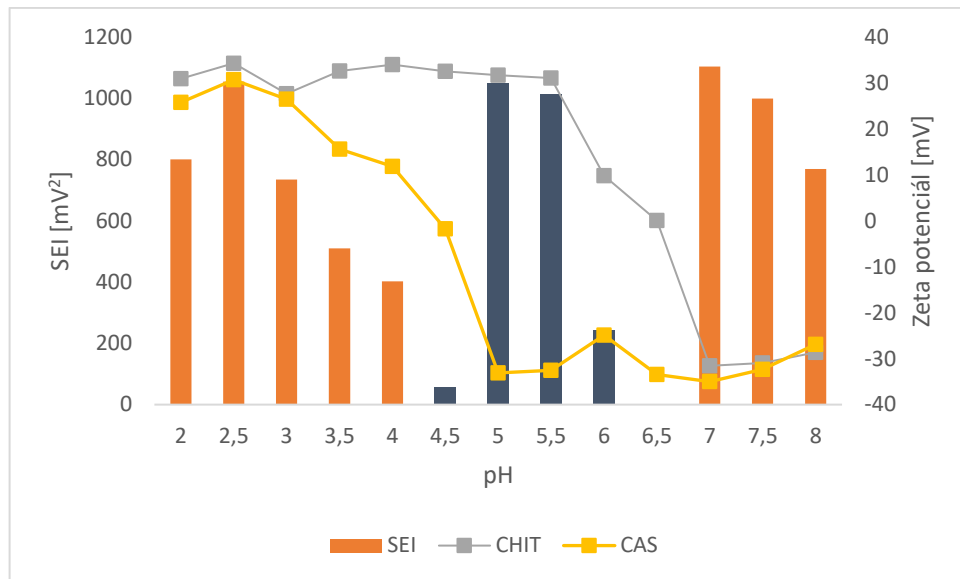
Obr. 14: Fázový diagram SPH, CAS a CHIT

6.2 Příprava a charakterizace komplexů

6.2.1 Vliv pH na komplexaci

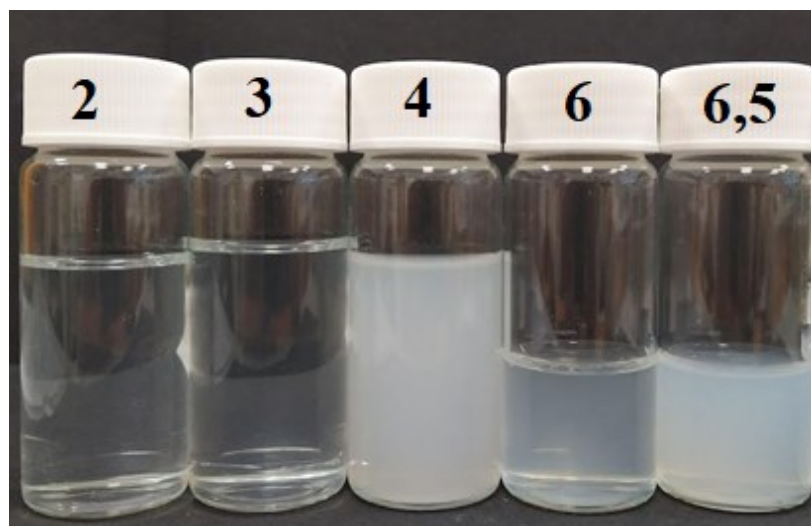
Vznik komplexu mezi CAS:CHIT a SPH:CHIT je řízeno převážně elektrostatickými interakcemi. Síla elektrostatické interakce mezi nabitými polyelektrolyty může být vypočítána podle rovnice (1).

Výsledky SEI (Obr. 15) ukázaly, že pravděpodobnost interakce mezi CHIT a CAS je maximální při pH 7 a minimální při pH 6,5. Nicméně je důležité si uvědomit, že do pH 4 jsou CAS i CHIT kladně nabité, od pH 7 jsou nabitě záporně, takže v těchto oblastech dochází k silné elektrostatické repulzi. Ke vzniku komplexu proto může dojít v rozmezí pH 4,5–6,5.



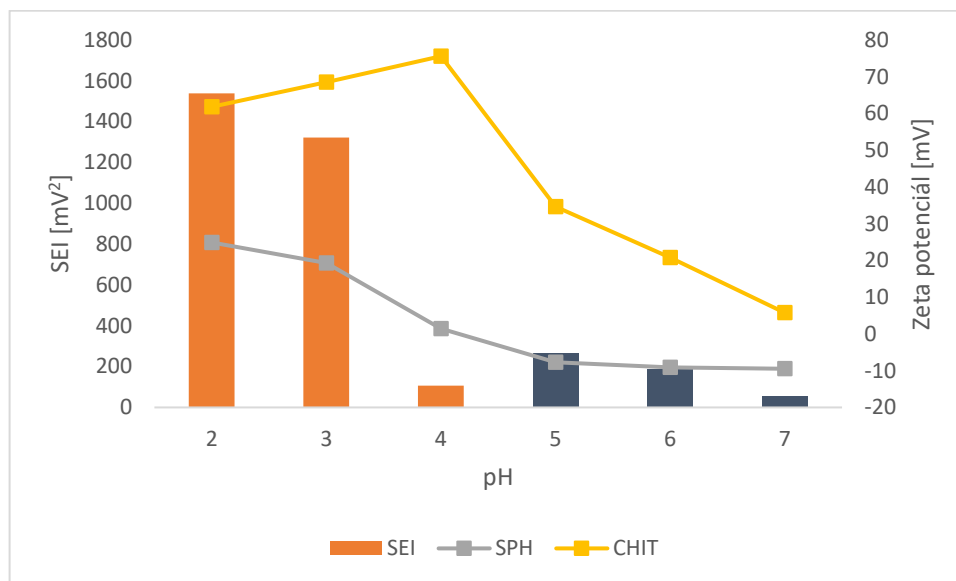
Obr. 15: Závislost SEI a zeta potenciálu CAS:CHIT na pH

Pro sledování vlivu pH na vznik komplexu byl vybrán poměr biopolymerů 1:1. Na Obr. 16 lze pozorovat elektrostatické interakce mezi CAS a CHIT. U pH 2 a 3 můžeme vidět transparentní roztoky, kdy po smíchání CAS a CHIT dochází k elektrostatické repulzi mezi CAS a CHIT. Mléčné zakalení u pH 4 je pravděpodobně způsobeno nízkou rozpustností CAS, protože ten se nachází ve svém izoelektrickém bodě. Nad pI CAS již dochází ke vzniku komplexu, a proto bylo rozhodnuto, že komplexy budou připravovány při pH 6 a 6,5.



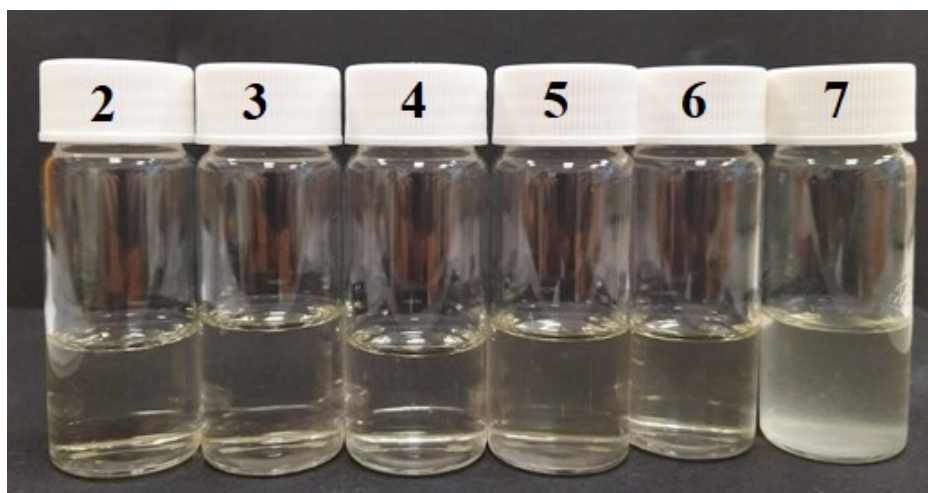
Obr. 16: Míchání CAS s CHIT v poměru 1:1 při pH 2–6,5

Dále podle výsledků SEI (Obr. 17) můžeme pozorovat, že interakce mezi CHIT a SPH je maximální při pH 2 a minimální při pH 7. Jelikož však jsou do pH 4 kladně nabitě, nedochází ke komplexaci. Ta může nastat až v rozmezí pH 5–7.



Obr. 17: Závislost SEI na zeta potenciálu SPH:CHIT

Opět byl vybrán po vlivu pH na vznik komplexu poměr 1:1. Na následujícím Obr. 18 lze pozorovat řadu SPH:CHIT, kde výraznější zakalení je pouze u pH 7. To je ale dáno pouze chováním CHIT v tomto pH. Komplexy tedy nevznikají.



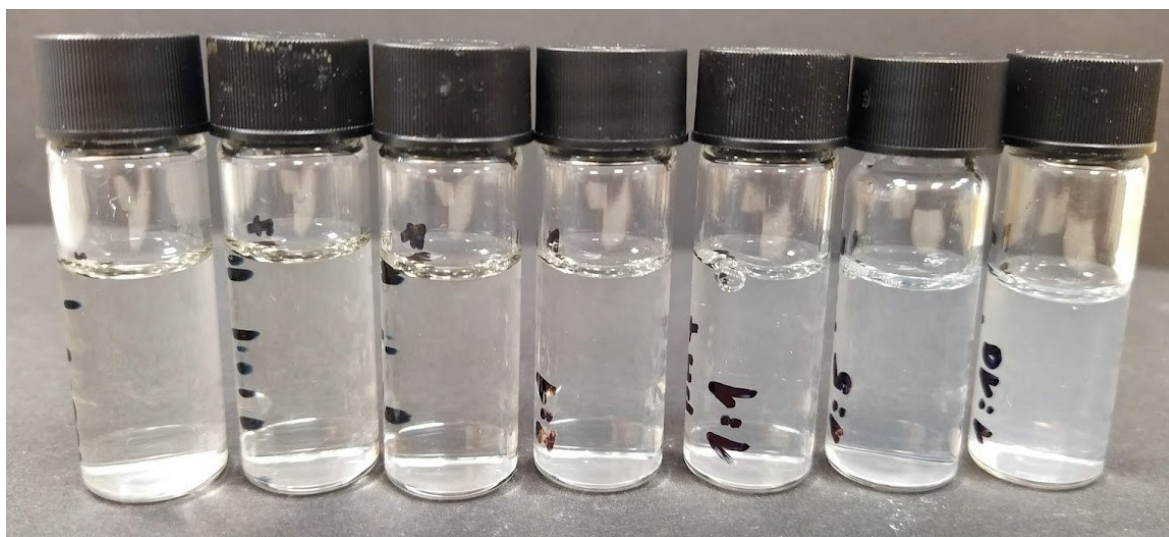
Obr. 18: Míchání SPH s CHIT v poměru 1:1 při pH 2–7

6.2.2 Vliv množství biopolymerů na komplexaci

Po hodnotě pH je dalším důležitým parametrem pro vznik komplexů poměr jednotlivých biopolymerů, protože poměr polysacharidu k proteinu ve směsi ovlivňuje rovnováhu náboje, a tak i komplexaci. Z tohoto důvodu byl vznik komplexů sledován při různých poměrech (100:1, 20:1, 10:1, 2:1, 1:1, 1:5, 1:10), s cílem najít nejvhodnější poměr biopolymerů

pro enkapsulaci. Byly pozorovány interakce mezi biopolymery v jednotlivých poměrech a tvorba rozpustných komplexů.

Nejdříve byla sledována komplexace mezi SPH a CHIT při pH 7 (Obr. 19). Avšak u těchto biopolymerů nebyly pozorovány žádné vizuální změny, což značí, že ke komplexaci mezi SPH a CHIT nedochází, kvůli nedostatečné elektrostatické interakci. V tomto okamžiku mohou SPH s CHIT tvořit rozpustné komplexy, zejména prostřednictvím hydrofobních interakcí a vodíkových vazeb, jak bylo prokázáno také ve studiích Fan a kol. [57], kde se pokusili enkapsulovat curcumin pomocí sójového proteinu a fukoidanu, kdy jejich náboj při pH 7 byl negativní. Jelikož však ke komplexaci nedošlo, bylo rozhodnuto, že biopolymery SPH a CHIT nebudou pro enkapsulaci curcuminu vhodné.



Obr. 19: SPH:CHIT; pH 7; zleva v poměrech 100:1, 20:1, 10:1, 2:1, 1:1, 1:5, 1:10

Následně byla studována interakce mezi CAS a CHIT při pH 6 (Obr. 20). Na obrázku můžeme pozorovat výraznou elektrostatickou interakci a vznik sraženiny u poměru 2:1. Následně dochází k významné komplexaci rovněž u poměru 1:1.

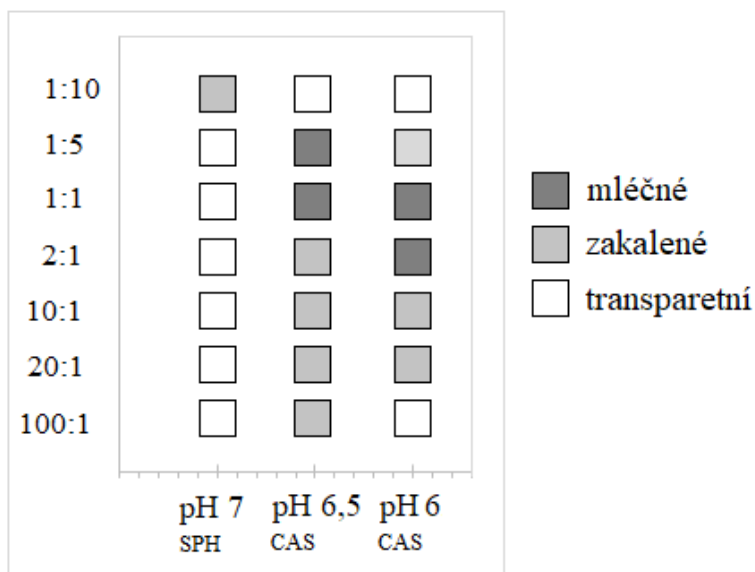


Obr. 20: CAS:CHIT pH 6, v poměrech zleva 100:1, 20:1, 10:1, 2:1, 1:1, 1:5, 1:10

Jako druhá, vhodnější hodnota pH bylo zvoleno pH 6,5. U této hodnoty pH můžeme vidět u všech poměrů (s výjimkou poměru 1:10) vznik komplexů, které hodnotíme jako rozpustné komplexy (Obr. 21). Nastala tady změna, kdy po smíchání původně transparentního CAS a CHIT došlo k mírnému zakalení směsi, což může být známkou interakce mezi CAS a CHIT. Podle vizuálního pozorování můžeme říct, že největší změna nastala u poměru 1:5 a 1:1, kdy jsou vialky téměř mléčné. Oproti pH 6 však nevznikly žádné sraženiny.



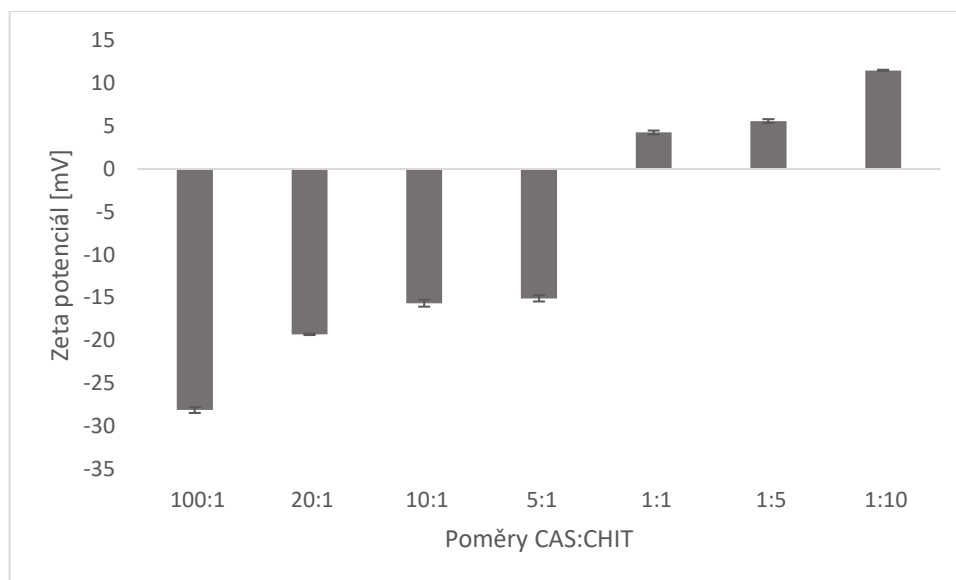
Obr. 21: CAS:CHIT pH 6,5; zleva v poměrech 100:1, 20:1, 10:1, 2:1, 1:1, 1:5, 1:10



Obr. 22: Fázový diagram

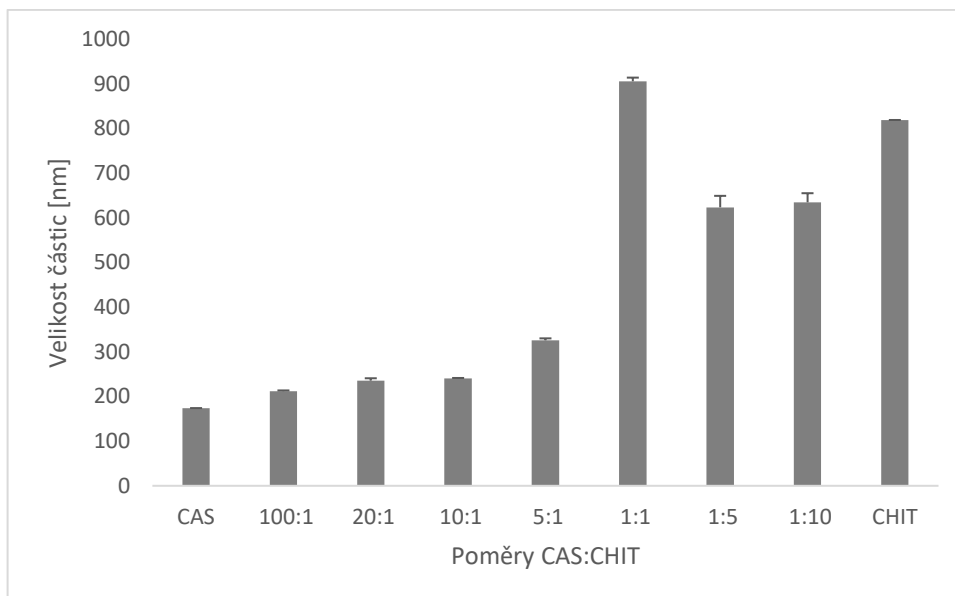
Pro přehled fázového chování komplexů byl vytvořen fázový diagram (Obr. 22), kde lze pozorovat, jak se biopolymery chovají v jednotlivých poměrech a kdy tvoří největší interakce a sraženiny.

U jednotlivých komplexů CAS:CHIT při pH 6,5 byl také dále změřen zeta potenciál. Jak můžeme pozorovat z Obr. 23, zeta potenciál se pohybuje v rozmezí +11,5 až -28,1 mV. Zeta potenciál směsí se mění z negativních hodnot na pozitivní s rostoucím množstvím CHIT ve směsi. U poměrů s nízkým obsahem CHIT převažuje negativní náboj CAS nad hodnotou ZP komplexu. Obdobně, komplexy nesou kladný náboj, pokud je CHIT v nadbytku. Pouze u poměru CAS:CHIT 1:1 spolu dva opačně nabité biopolymery interagují a dochází k neutralizaci jejich nábojů ve směsi (ZP 4,26 mV), ztrácí tedy své elektrostatické repulsní síly.



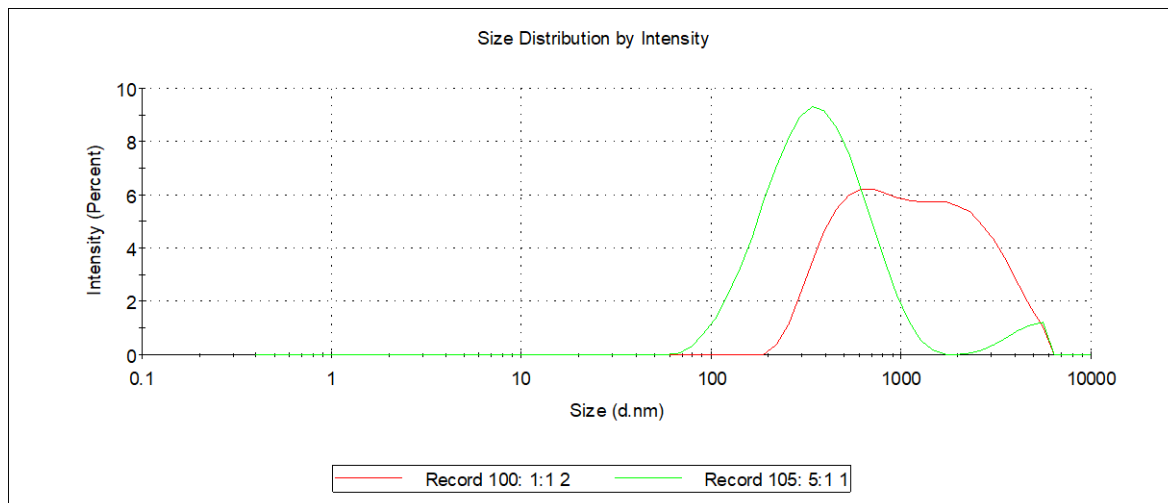
Obr. 23: Zeta potenciál komplexů při pH 6,5

U komplexů byla také změřena velikost částic, kterou můžeme pozorovat na Obr. 24. U komplexů, kde je větší množství CAS jsou částice značně menší (212, 235, 240 nm), což odpovídá velikosti čistého CAS (174 nm), a naopak se zvyšujícím se množstvím CHIT se velikost zvyšuje. Největší velikost částic komplexu lze pozorovat u poměru 1:1, kde dosahuje hodnoty 907 nm. Obecně platí, že poměr polysacharidu k proteinu ve směsi ovlivňuje jejich komplexační chování, jak už bylo zmíněno dříve. Směšovací poměr (1:1) se nachází v kritické oblasti. To znamená, že opačně nabitě biopolymery vzájemně silně interagují a vyvolají neutralizaci náboje jejich směsi, což má za následek snížení elektrostatické odpudivé síly a zvětšení velikosti polymeru, jak potvrzují předchozí studie Yuan a kol. [58]



Obr. 24: Velikost částic komplexu při pH 6,5

Na Obr. 25 je znázorněno srovnání distribuce částic komplexu CAS:CHIT 5:1 a 1:1, které potvrzuje, že komplex 1:1 má větší velikost částic než komplex 5:1. Nicméně, oba tyto komplexy byly vybrány jako nejvhodnější pro enkapsulaci curcuminu.



Obr. 25: Distribuce částic komplexu CAS:CHIT 5:1 a 1:1

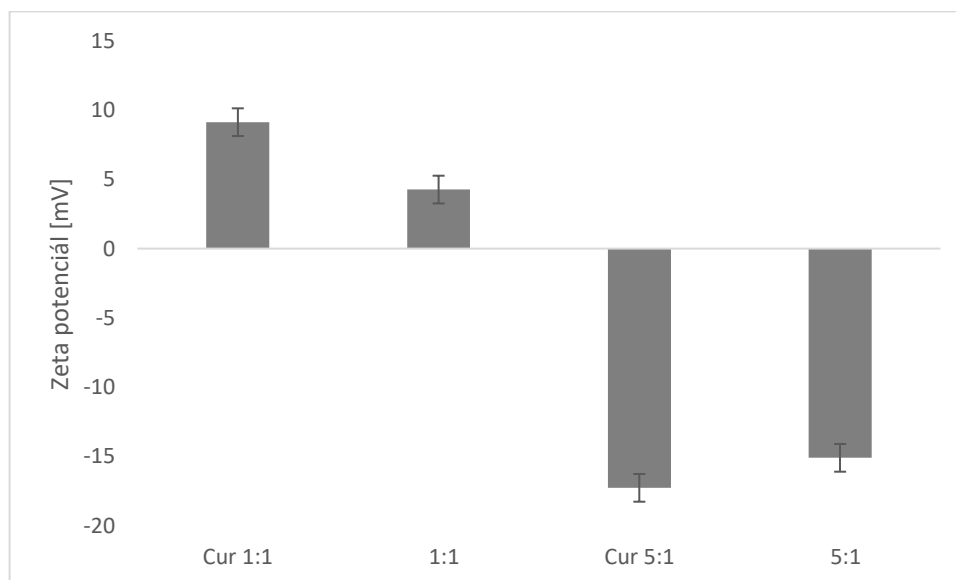
6.3 Enkapsulace curcuminu do komplexu

Cílem přípravy a charakterizace komplexů bylo nalézt systém s vhodnými vlastnostmi pro enkapsulaci curcuminu. Pro tyto účely byly zvoleny poměry 5:1 a 1:1. Enkapsulace byla provedena tak, že se curcumin rozpustil v ethanolu, a následně byl přidán k příslušnému proteinu (CAS-Cur). Takto upravený protein s curcuminem byl následně charakterizován, kdy byl opět proměřen zeta potenciál a velikost částic. U ZP můžeme pozorovat, že po přidání curcuminu k proteinu se ZP snížil, a stejně tak se i mírně snížila velikost částic.

Tab. 3: Zeta potenciál a velikost částic CAS s a bez curcuminu

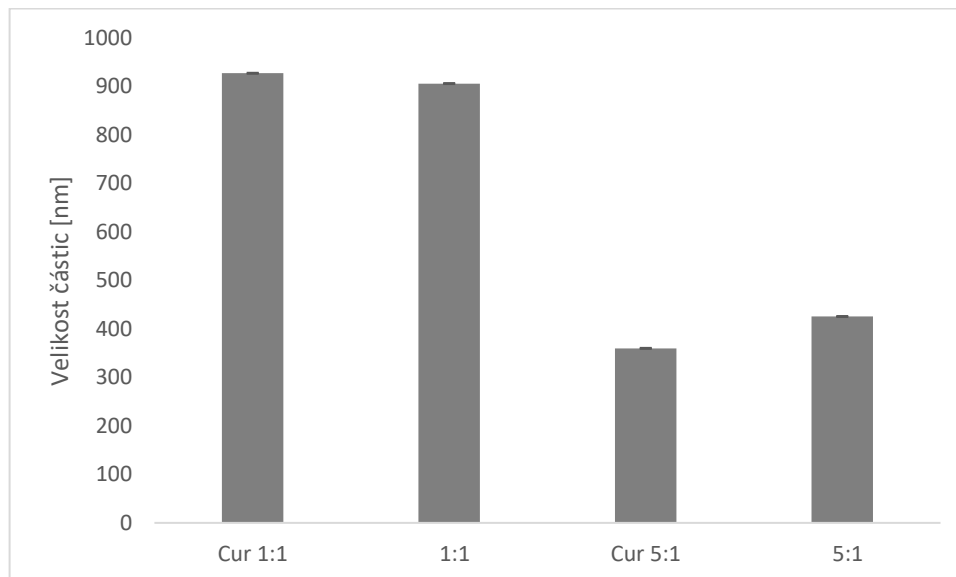
	velikost částic [nm]	ZP [mV]
CAS-Cur	135,0 ± 1,6	-52,9 ± 1,05
CAS	194,6 ± 1,5	-33,4 ± 2,1

CAS s curcuminem se následně použil pro přípravu komplexu s enkapsulovaným curcuminem v poměrech CAS:CHIT 5:1 a 1:1. Nejdříve se opět změřil zeta potenciál (Obr. 26), který u komplexu 5:1 s curcuminem mírně klesl na -17,3 mV, kdežto u komplexu 1:1 se zvýšil na hodnotu 9,1 mV.



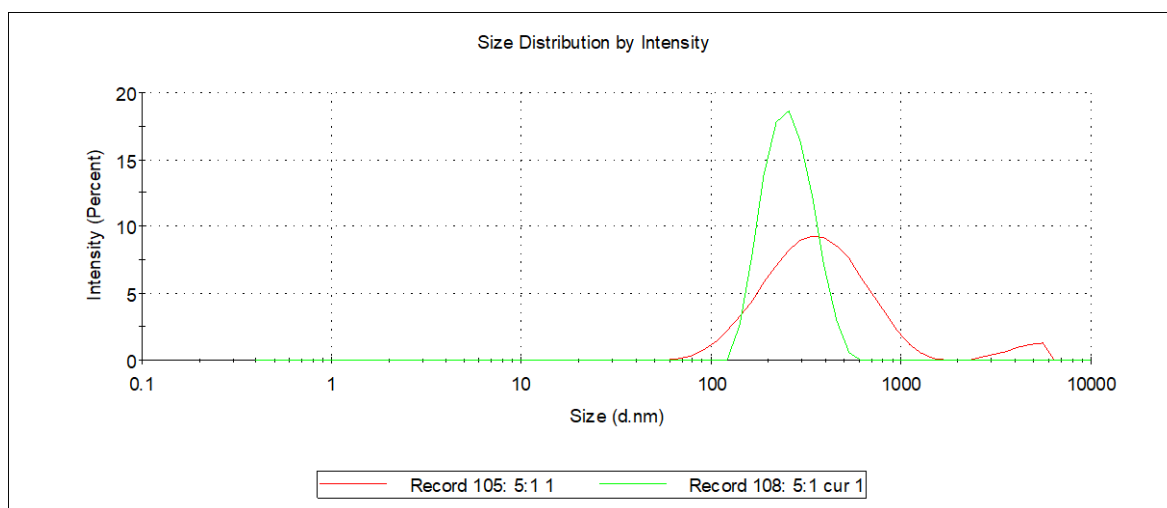
Obr. 26: Zeta potenciál CAS s CHIT v různých poměrech

U komplexů s enkapsulovaným curcuminem byla dále změřena i velikost částic (Obr. 27). Z grafu je zřejmé, že enkapsulace curcuminu velikost částic komplexu ovlivňuje minimálně.



Obr. 27: Velikost částic CAS s CHIT v různých poměrech

I přes minimální rozdíl ve velikosti částic komplexu bez a s curcuminem, můžeme rozdíl mezi komplexy pozorovat při srovnání distribučních křivek (Obr. 28). Příkladem distribuce částic je srovnání mezi komplexem 5:1 bez curcuminu a s enkapsulovaným curcuminem.



Obr. 28: Distribuce částic CAS:CHIT v poměru 5:1 s a bez curcuminu

Na následujícím obrázku (Obr. 29) je možné sledovat vzniklý komplex s enkapsulovaným curcuminem. První vialka zleva je CAS s cur a CHIT v poměru 5:1, kde můžeme pozorovat výrazné sraženiny, které vznikly vlivem času agregací komplexu. V druhé vialce (napravo) v poměru 1:1 lze také pozorovat enkapsulaci curcuminu do komplexu. Agregáty komplexů

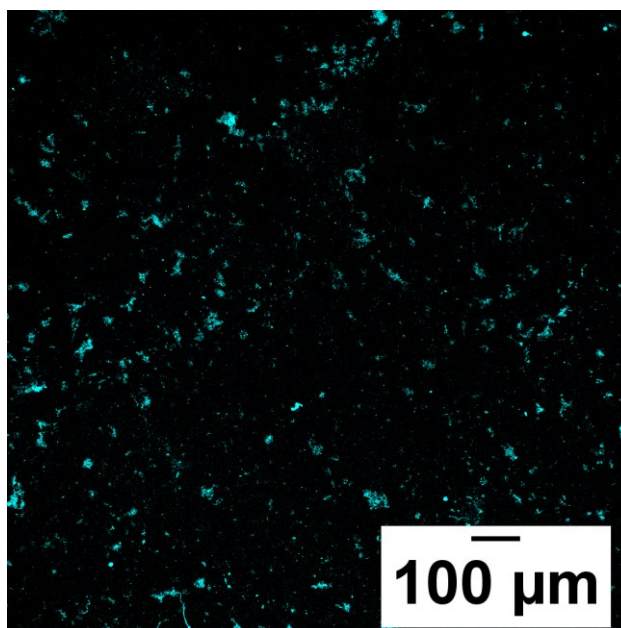
s enkapsulovaným curcuminem můžeme pozorovat na stěnách vialky. Co se týče vizuálních změn první vialka v poměru 5:1 je značně žlutější oproti druhé v poměru 1:1.



Obr. 29: CAS-Cur:CHIT 5:1, 1:1

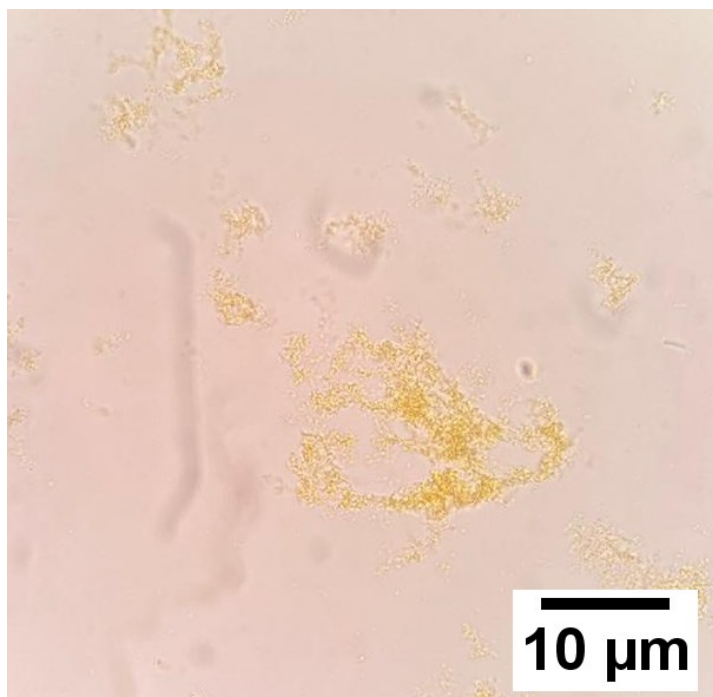
6.3.1 Mikrostruktura komplexů

Kromě vizuálního pozorování, byly komplexy sledovány i mikroskopicky, konkrétně jejich mikrostruktura. Nejdříve byl použit konfokální mikroskop FLUOVIEW FV3000 pro ověření enkapsulace curcuminu do komplexu. Na Obr. 30 je viditelné, že příprava komplexu s curcuminem byla úspěšná (modré agregáty komplexu s curcuminem), nicméně u komplexu CAS:CHIT 5:1 docházelo s postupujícím časem k výrazné agregaci a tím i ke zvýšení velikosti částic.



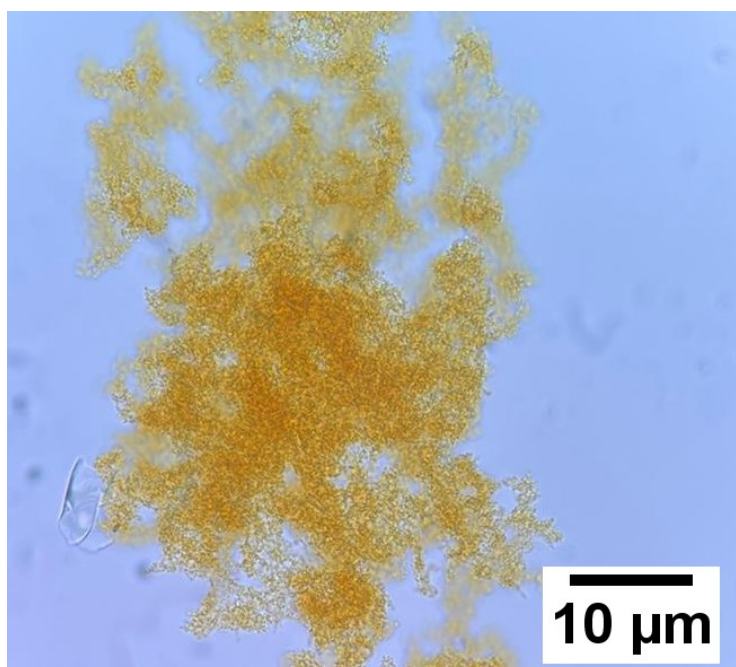
Obr. 30: Enkapsulace curcuminu v poměru 5:1, zvětšení 10x

Mikrostruktura komplexů byla sledována i pomocí optického mikroskopu, kde lze rovněž pozorovat komplexy s enkapsulovaným curcuminem. U komplexu CAS:CHIT 1:1 při zvětšení 40x (Obr. 31) můžeme pozorovat větší i menší částice komplexu jejichž struktura je oproti komplexu 5:1 jemnější. Žlutá barva částic svědčí o úspěšném zachycení curcuminu do komplexu.



Obr. 31: Enkapsulace curcuminu v poměru 1:1 při zvětšení 40x

Na Obr. 32 je zobrazena mikrostruktura komplexu 5:1, která je oproti CAS:CHIT 1:1 výraznější, což je způsobeno výše zmiňovanou agregací tohoto komplexu.



Obr. 32: Enkapsulace curcuminu v poměru 5:1 při zvětšení 40x

ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo studium enkapsulace povrchově aktivních látek pomocí protein-polysacharidových komplexů. Komplexy byly tvořeny kaseinátem sodným (CAS) a hydrolyzovaným sójovým proteinem (SPH) jako proteinová složka a chitosanem (CHIT), jakožto složka polysacharidová. Aktivní látkou, která byla použita k enkapsulaci byl curcumin.

Vliv různých poměrů jednotlivých biopolymerů a aktivní látky na fyzikálně-chemické vlastnosti připravených systémů byl sledován pomocí měření zeta potenciálu, velikosti částic a síly elektrostatické interakce v závislosti na různém pH. Následně byla sledována mikrostruktura a enkapsulace curcuminu pomocí různých mikroskopů.

Díky měření zeta potenciálu, kdy byly zjištěny isoelektrické body a velikosti částic jednotlivých biopolymerů, bylo vybráno nejvhodnější pH pro enkapsulaci. Jak po vizuální stránce, tak i po výpočtu síly elektrostatických interakcí, bylo zvoleno u biopolymerů CAS:CHIT pH 6 a 6,5, zatímco u SPH:CHIT pH 7. Dále byl velmi důležitý vhodný poměr pro komplexaci. Po pozorování jednotlivých fyzikálně-chemických vlastností byl vybrán jako nejvhodnější poměr pro enkapsulaci curcuminu poměr CAS:CHIT 1:1 a 5:1 (pH 6,5). U SPH:CHIT komplexace nenastala, a proto byly tyto biopolymery pro enkapsulaci vyhodnoceny jako nevhodné. V posledním kroku byly úspěšně připraveny částice komplexu CAS:CHIT jako nosiče kurkuminu.

Závěrem lze shrnout, že došlo k úspěšnému zaenkapsulování aktivní látky do CAS:CHIT systémů s curcuminem. Byl ovšem prokázán zásadní vliv použitých biopolymerů. Vzhledem k biokompatibilitě výchozích materiálů by připravené komplexy mohly být využívány v kosmetické či farmaceutickém průmyslu za účelem transportu aktivních látek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MISHRA, Munmaya. *Handbook of Encapsulation and controlled release*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2015. ISBN 978-1-4822-3234-9.
- [2] NEDOVIC, Viktro et al. *An overview of encapsulation technologies for food applications* [online]. Serbia: Prodecia Food Science, 2011, s. 1806-1815 [cit. 2021-11-11]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002665>
- [3] DA SILVA, Pablo Teiceira et al. *Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology* [online]. Food Technology, 2014 [cit. 2021-11-11]. DOI: 10.1590/01038478cr20130971. Dostupné z: <https://www.scielo.br/j/cr/a/r4rk9YNPLZBqqn8tsJLrD8g/?format=html&lang=en>
- [4] SONAWANE, Sirish. H., Bharat A. BHANVASE a Manickam SIVAKUMAR. *Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery system* [online]. Elsevier, 2020. [cit. 2021-11-11]. DOI: 10.1016/C2018-0-05369-4. ISBN 978-0-12-819363-1. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128193631/encapsulation-of-active-molecules-and-their-delivery-system#book-info>
- [5] LETCHFORD, Kevin a Helen BURT. *A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: Micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes* [online]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007 [cit. 2021-12-3]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2006.11.009. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17196803/>
- [6] ANANTHAPADMANAB AN, K et al. *Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the technology of mild cleansing* [online]. Dermatologic Therapy, 2004 [cit. 2021-12-05]. DOI: 10.1111/j.1396-0296.2004.04s1002.x. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14728695>
- [7] RANGEL-YAGUI, Carloata O. et al. *Micellar solubilization of drugs* [online]. Brazil: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2005, s. 65-147 [cit. 2021-12-05]. Dostupné z:

- https://www.researchgate.net/publication/7635700_Micellar_solubilization_of_drugs
- [8] MUSAZZI, Umberto M. et al. *Emulsion versus nanoemulsion: how much is the formulative shift critical for a cosmetic product?* [online]. Drug Delivery and Translational Research, 2017, s. 414-421 [cit. 2021-12-5]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13346-017-0390-7>
- [9] SHAH, P., D. BHALODIA a P. SHELAT. *Nanoemulsion: A pharmaceutical review. Systematic Reviews in Pharmacy* [online]. Systematic Reviews in Pharmacy, 2010 [cit. 2021-12-15]. ISSN 0975-8453. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/247917697_Nanoemulsion_A_pharmaceutical_review
- [10] SCHMITT Christophe, Sylvie L. TURGEON. *Protein/ polysaccharide complexes and coacervates in food systems*. Switzerland: Department of Food Science and Technology, 2010. DOI: 10.1016/j.cis.2010.10.001
- [11] VIEIRA, Marta V., PASTRANA Lorenzo M. a FUCINOS Pablo. *Microalgae encapsulation systems for food, pharmaceutical and cosmetics applications* [online], 2020 [cit. 2021-12-15]. DOI: 10.3390/md18120644. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7765346/>
- [12] SINGH, Sachin Kumar et al. *Investigation of preparation parameters of nanosuspension by top-down media milling to improve the dissolution of poorly water-soluble glyburide* [online]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011, s. 78, 441–446 [cit. 2021-12-15]. ISSN 0939-6411, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S09396411111001159?via%3Dihub>
- [13] SANGUANSRI, Peerasak a Mary Ann AUGUSTIN. *Nanoscale materials development—A food industry perspective* [online]. Australia: CSIRO, Food Science Australia, 2006, s. 547-556 [cit. 2021-12-15]. ISBN 0924-2244. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224406001919>

- [14] ACOSTA, Edgar. *Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery* [online]. Canada: University of Toronto, 2008, s. 3-15 [cit. 2021-12-25]. DOI: 10.1016/j.cocis.2008.01.002. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029408000083>
- [15] GAO, Yan et al. *Preparation and characterization of intravenously injectable curcumin nanosuspension* [online]. Drug Delivery, 2011, s. 42-131 [cit. 2021-12-25]. DOI: 10.3109/10717544.2010.520353. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20939679/>
- [16] EGNER, Pavlína. *Kosmetické technologie* [online]. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně [cit. 2021-12-25] Dostupné z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/Services/Downloader.ashx?id=421&disposition=inline>
- [17] PATRIK, Fernandez et al. *Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion*. [online]. Germany: BASF Aktiengesellschaft, 2004, s. 53-58 [cit. 2021-12-25]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2004.09.029. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775704006326>
- [18] REIS, Rui L. *Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. Academic Press, 2019 [cit. 2021-12-25]. ISBN: 978-0-12-813700-0. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/phase-separation>
- [19] DONG, Qiu-Yue et al. *Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation* [online]. International Journal of Food Science & Technology, 2013 [cit. 2021-12-28]. ISSN 1365-2621. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/263458717_Alginate-based_and_protein-based_materials_for_probiotics_encapsulation_A_review
- [20] JYOTHI, Nvn et al. *Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency* [online]. Journal of Microencapsulation, 2010 [cit. 2021-12-28]. DOI: 10.3109/02652040903131301. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/284626317_Microencapsulation_Techniques_Factors_Influencing_Encapsulation_Efficiency_A_Review

- [21] SINGH, S. Santianath et al. *Intermolecular complexation and phase separation in aqueous solutions of oppositely charged biopolymers* [online]. India: School of Physical Sciences, 2007, s. 185-192 [cit. 2021-12-28]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2007.02.004. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813007000505#!>
- [22] BASTOS, Francisca a Lúcia SANTOS. *Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application* [online]. Journal of Microencapsulation, 2015 [cit. 2021-12-28]. DOI: 10.3109/02652048.2015.1115900 Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/284754922_Encapsulation_of_cosmetic_active_ingredients_for_topical_application_-_a_review
- [23] DEVI, Nirmala et al. *Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates* [online]. India: Department of Science and Humanities, 2016, s. 136-145 [cit. 2021-12-28]. ISSN 0001-8686. DIO: 10.1016/j.cis.2016.05.009. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868616300446?casa_token=xBgOhFh6tXwAAAAA:UiRVINqYnDnjeojqCRMVyRfXVG9TGzYrTt2H4LPIpej0vBoq1M0wLuXTqiQJfoN15PlrfSKfvQ
- [24] HLÚBIK, Pavol a Libuše OPLTOVÁ. *Vitaminy*. Praha: Grada, 2004. ISBN 8024703734.
- [25] GONNET, M., Laurent LETHUAUT a Frank BOURY. *New trends in encapsulation of liposoluble vitamins* [online]. France: INSERM U 646, 2010, 276-290 [cit. 2021-12-30]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.01.037. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910004402?casa_token=JqYagtNHdM4AAAAA:qAXWowa92rOeIfU06Xy88b3pKef4-61dE3IvnpE9AxFfiOgPyRjJSSWN3OqKhfR_2hf-a0Jfug
- [26] FARRIS, Patricia K. *Cosmeceuticals and Cosmetic Practice* [online]. USA: Tulane University School, 2014 [cit. 2021-12-30]. ISBN: 978-1-118-38483-1. Dostupné z: <https://download.e-bookshelf.de/download/0004/0695/49/L-G-0004069549-0002628989.pdf>

- [27] COSMETICS INFO. *Pantothenic Acid* [online]. U.S: Personal Care Products Council [cit. 2021-12-30]. Dostupné z: <https://www.cosmeticsinfo.org/ingredients/pantothenic-acid/>
- [28] KEEN, Mohammad Abid a Iffat HASSAN. *Vitamin E in dermatology* [online]. India: Indian Dermatology Online Journal, 2016, 311-315 [cit. 2021-12-30]. DOI: 10.4103/2229-5178.185494. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4976416/>
- [29] CASANOVA, Francisca a Lúcia SANTOS. *Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review*. Journal of Microencapsulation [online]. 2015, [cit. 2022-01-03]. DOI: 10.3109/02652048.2015.1115900. ISSN 0265–2048. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02652048.2015.1115900>
- [30] YUE, Honghua et al. *Curcumin, novel application in reversing myocardial fibrosis in the treatment for atrial fibrillation from the perspective of transcriptomics in rat model* [online]. China: Biomedicine and Pharmacotherapy, 2021 [cit. 2022-01-03]. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112522. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332221013093>
- [31] RAFIEE, Zahra et al. *Application of curcumin-loaded nanocarriers for food, drug and cosmetic purposes* [online]. Iran: Food Science and Technology, 2019, 445-458 [cit. 2021-11-11]. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.04.017. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224418308665>
- [32] PANCHE, A. N., A. D. DIWAN a S. R. CHANDRA. *Flavonoids: an overview* [online]. Cambridge: Journal of Nutritional Science, 2016 [cit. 2022-01-14]. DOI: 10.1017/jns.2016.41. Dostupné z: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-nutritional-science/article/flavonoids-an-overview/C0E91D3851345CEF4746B10406908F52>
- [33] CHUARIENTHONG, P., N. LOURITH a P. LEELAPORNPISID. *Clinical efficacy comparison of anti-wrinkle cosmetics containing herbal flavonoids* [online]. 2010

- [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.1111/j.1468-2494.2010.00522.x. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1468-2494.2010.00522.x>
- [34] PATINO, Juan Miguel Rodríguez a Ana M. R. POLOSOF. *Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces*. Food Hydrocolloids, 2011. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.023.
- [35] MCCLEMENTS, David Julian. *Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.07.003
- [36] HASEEB, Ahsan a Jamia Millia ISLAMIA. *The significance of complex polysaccharides in personal care formulations* [online]. Journal of Carbohydrate Chemistry, 2019 [cit. 2022-01-14]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/333500178_The_significance_of_complex_polysaccharides_in_personal_care_formulations
- [37] BEALER, Elizabeth et al. *Protein-Polysaccharide Composite Materials: Fabrication and Applications* [online]. Polymers, 2020 [cit. 2022-01-14]. DOI: 10.3390/polym12020464. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Complex-coacervation-process-showing-the-combination-of-protein-and-polysaccharide_fig1_339438577
- [38] ZHANG Qing et al. *Nanostructures of protein-polysaccharide complexes or conjugates for encapsulation of bioactive compounds* [online]. China: College of Food Science, 2021 [cit. 2022-01-14]. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.01.026. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224421000261>
- [39] KATO, Akio. *Maillard-type protein-polysaccharide conjugates* [online]. Developments in Food Science, 2000 [cit. 2022-01-19]. DOI: 10.1016/S0167-4501(00)80017-5. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167450100800175>
- [40] NISHINARI, K. et al. *Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification* [online]. China: Food Hydrocolloids, 2013 [cit. 2022-01-19]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.01.013. Dostupné z:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X14000319?via%3Dihub>
- [41] TRUTH IN AGING, *Hydrolyzed Casein* [online]. [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: <https://www.truthinaging.com/ingredients/hydrolyzed-casein>
- [42] GOOSEN, Mattheus F. A. *Applications of Chitin and Chitosan*. Lancaster, PA: Tech-nomic Pub., c1997. ISBN 1566764491.
- [43] SCHMITT Christophe a Sylvie L. TURGEON. *Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems*. Elsevier, 2010. DOI: 10.1016/j.cis.2010.10.001
- [44] FAN Lihong et al. *Development and characterization of soybean protein isolate and fucoïdan nanoparticles for curcumin encapsulation*. Elsevier, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.086
- [45] *Malvern Instrumental* [online]. [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/zetasizer_nanozs_manual.pdf.
- [46] HAWE, Andrea et al. *Taylor Dispersion Analysis Compared to Dynamic Light Scattering for the Size Analysis of Therapeutic Peptides and Proteins and Their Aggregates*. *Pharmaceutical Research* [online]. Springer US, 2011 [cit. 2022-02-18]. DOI: 10.1007/s11095-011-0460-3. ISSN 07248741. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21560019/>
- [47] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky, vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2006. 120 s. [cit. 2022-02-23]. ISBN 80-246-1069-8.
- [48] BENEŠ, Jiří, et al. *Základy lékařské biofyziky*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2005. 196 s. ISBN 80-246-1009-4.
- [49] BRITANNICA, *Casein* [online]. The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2021 [cit. 2022-02-23]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/casein>
- [50] WALSCH, Gary. *Proteins: Biochemistry and Biotechnology, 2nd Edition* [online]. Wiley – Blackwell, 2014 [cit. 2022-03-26]. Dostupné z: <https://www.wiley.com/en->

us/Proteins%3A+Biochemistry+and+Biotechnology%2C+2nd+Edition-p-9780470669853#author-section

- [51] SMOLUCH, M. et al. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, 2nd Edition [online]. The Crossroads, 2016, s. 63-99 [cit. 2022-03-26]. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.01.026. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444636881000057>
- [52] SARODE, A. R. et al., *Casein and Caseinate: Methods of Manufacture* [online]. Academic Press, 2016, s. 676–682 [cit. 2022-03-26]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00122-7. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472001227#!>
- [53] MENDOZA, Jaime-Lizardi et al. *Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan* [online]. 2016, s. 3-31 [cit. 2022-04-01]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802735-6.00001-X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012802735600001X>
- [54] MATEESCU, M. A., P. ISPAS-SZABO a E. ASSAAD. *Chitosan and its derivatives as self-assembled systems for drug delivery* [online]. Woodhead Publishing, 2015, s. 85-125 [cit. 2022-04-01]. ISBN 9781907568459. DOI: 10.1016/B978-1-907568-45-9.00003-2. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781907568459000032>
- [55] ANANEY-OBIRI, Daniel, Lovie G. MATTHEWS a Reza TAHERGOBARI. *Proteins From Fish Processing By-Products* [online]. US: Food and Nutritional Sciences Program, 2019, s. 163-191 [cit. 2022-04-13]. DOI: 10.1016/B978-0-12-816695-6.00006-4. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128166956000064>
- [56] WANG, Zhaojun et al. *Interfacial Rheology and Foaming Properties of Soy Protein and Hydrolysates under Acid Condition* [online]. Food Biophysics, 2021, s. 484-491 [cit. 2022-04-20]. DOI: 10.1007/s11483-021-09685-9. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11483-021-09685-9>
- [57] FAN Lihong et al. *Development and characterization of soybean protein isolate and fucoidan nanoparticles for curcumin encapsulation* [online]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 194-205 [cit. 2022-20-04]. ISSN: 0141-8130.

- DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.086. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020352508?via%3Dihub>
- [58] YUAN Yang et al. *Complex coacervation of soy protein with chitosan: Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery* [online]. 2017 [cit. 2022-04-20]. ISSN 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.08.045. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381630531X?via%3Dihub>
- [59] CHEN Shuain et al. *Fabrication, characterization, physicochemical stability of zein-chitosan nanocomplex for co-encapsulating curcumin and resveratrol* [online]. 2020 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0144-8617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116090. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720302642?via%3Dihub>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CAS	Kaseinát sodný
CAS-cur	Kaseinát sodný s curcuminem
CMC	Kritická micelární koncentrace
HCl	Kyselina chlorovodíková
CHIT	Chitosan
NaOH	Hydroxid sodný
O/V	Emulze olej ve vodě
pH	Vodíkový exponent
PIT	Fázová inverze
<i>pI</i>	Isoelektrický bod
SEI	Elektrostatická interakce
SPH	Hydrolyzát sójového proteinu
SPI	Izolovaný sójový protein
V/O	Emulze voda v oleji
ZP	Zeta potenciál

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Klasifikace hlavních enkapsulačních systémů pro bioaktivní sloučeniny [1].....</i>	12
<i>Obr. 2: Struktura a) klasické micely v polárním prostředí a b) inverzní micely v nepolárním prostředí.....</i>	13
<i>Obr. 3: Princip sprejového sušení</i>	16
<i>Obr. 4: Fázová inverze emulze typu O/V na V/O</i>	17
<i>Obr. 5: Chemický vzorec retinolu.....</i>	20
<i>Obr. 6: Chemický vzorec curcuminu</i>	21
<i>Obr. 7: Schématické znázornění druhů strukturních uspořádání zúčastněných molekul, které se mohou objevit, když jsou proteiny a polysacharidy smíchány dohromady [35]</i>	23
<i>Obr. 8: Interakce protein – polysacharid [37]</i>	24
<i>Obr. 9: Závislost zeta potenciálu CAS na pH.....</i>	36
<i>Obr. 10: Závislost velikosti částic CAS na pH.....</i>	37
<i>Obr. 11: Závislost zeta potenciálu CHIT na pH.....</i>	38
<i>Obr. 12: Závislost velikosti částic CHIT na pH.....</i>	38
<i>Obr. 13: Závislost zeta potenciálu SPH na pH.....</i>	39
<i>Obr. 14: Fázový diagram SPH, CAS a CHIT</i>	40
<i>Obr. 15: Závislost SEI a zeta potenciálu CAS:CHIT na pH.....</i>	41
<i>Obr. 16: Míchání CAS s CHIT v poměru 1:1 při pH 2–6,5.....</i>	41
<i>Obr. 17: Závislost SEI na zeta potenciálu SPH:CHIT</i>	42
<i>Obr. 18: Míchání SPH s CHIT v poměru 1:1 při pH 2–7</i>	42
<i>Obr. 19: SPH:CHIT; pH 7; zleva v poměrech 100:1, 20:1, 10:1, 2:1, 1:1, 1:5, 1:10</i>	43
<i>Obr. 20: CAS:CHIT pH 6, v poměrech zleva 100:1, 20:1, 10:1, 2:1, 1:1, 1:5, 1:10</i>	44
<i>Obr. 21: CAS:CHIT pH 6,5; zleva v poměrech 100:1, 20:1, 10:1, 2:1, 1:1, 1:5, 1:10.....</i>	44
<i>Obr. 22: Fázový diagram.....</i>	45
<i>Obr. 23: Zeta potenciál komplexů při pH 6,5</i>	46
<i>Obr. 24: Velikost částic komplexu při pH 6,5.....</i>	47
<i>Obr. 25: Distribuce částic komplexu CAS:CHIT 5:1 a 1:1</i>	47
<i>Obr. 26: Zeta potenciál CAS s CHIT v různých poměrech.....</i>	48
<i>Obr. 27: Velikost částic CAS s CHIT v různých poměrech</i>	49
<i>Obr. 28: Distribuce částic CAS:CHIT v poměru 5:1 s a bez curcuminu.....</i>	49
<i>Obr. 29: CAS-Cur:CHIT 5:1, 1:1</i>	50
<i>Obr. 30: Enkapsulace curcuminu v poměru 5:1, zvětšení 10x</i>	51
<i>Obr. 31: Enkapsulace curcuminu v poměru 1:1 při zvětšení 40x.....</i>	52
<i>Obr. 32: Enkapsulace curcuminu v poměru 5:1 při zvětšení 40x.....</i>	52

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Přehled využití chitosanu [42]</i>	<i>27</i>
<i>Tab. 2: Měření zeta potenciálu v závislosti na pH</i>	<i>34</i>
<i>Tab. 3: Zeta potenciál a velikost částic CAS s a bez curcuminu</i>	<i>48</i>