

Možnosti solubilizace antioxidačních látek

Bc. Lucie Matošková

Diplomová práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Lucie Matošková
Osobní číslo: T22304
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Možnosti solubilizace antioxidantních látek

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Provedte rešerši věnovanou klasifikaci přírodních a syntetických antioxidantů, jejich vlastnostem a účinkům. Zaměřte se na možnosti zvýšení stability antioxidantních látek prostřednictvím inkorporace do různých typů nosičů a jejich vzájemné interakce.

II. Praktická část:

V praktické části připravte micelární nosiče s obsahem vybraných aktivních sloučenin s antioxidantní aktivitou. Charakterizujte jejich fyzikálně-chemické a antioxidantní vlastnosti. Zhodnoťte možnosti jejich inkorporace do vhodné kosmetické matrice. Dosažené výsledky zpracujte a stanovte závěry.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Andersen, Q. M., Markham, K. R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton CRC Taylor & Francis 2006. ISBN 0-8493-2021-6.
- [2] Malmsten, M. *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*. NY, Marcel Dekker, Inc. 2002. ISBN 0-8247-0804-0.
- [3] Flieger, J., Flieger, W. a kol. Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. *Materials* 2021, 14, 4135. doi: 10.3390/ma14154135.
- [4] Parmar, A., Singh, K., Bahadur, A. a kol. Interaction and solubilization of some phenolic antioxidants in Pluronic® micelles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011, 86, 319-326. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.04.015.
- [5] Sguizzato, M., Pepe, A., Baldissarotto, A. a kol. Niosomes for Topical Application of Antioxidant Molecules: Design and In Vitro Behavior. *Gels* 2023, 9, 107. doi: 10.3390/gels9020107.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

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

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky: Lucie Matošková

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Antioxidanty hrají zásadní úlohu při prevenci procesu stárnutí pokožky způsobeného vlivem oxidativního stresu a celkově přispívají ke zdraví lidského organismu. V rámci předložené diplomové práce byly studovány možnosti solubilizace přírodních antioxidantů, a to kyseliny gallové, quercetinu a extraktu z měsíčku lékařského. Solubilizace představuje možnost, jak zvýšit stabilitu a rozpustnost těchto látek za účelem zvýšení jejich praktické aplikovatelnosti. U vybraných kombinací surfaktantů, konkrétně Pluronic P123 a P407, Tween 80 a fosfatidylcholinu, byla vyhodnocena maximální solubilizační kapacita. Metodou hydratace tenkého filmu byly připraveny nosiče s obsahem zmíněných antioxidantů, u nichž byly následně sledovány jejich antioxidační, fyzikálně-chemické vlastnosti a podmínky uvolňování do definovaného prostředí.

Klíčová slova: antioxidant, kyselina gallová, měsíček lékařský, Pluronic, quercetin, solubilizace

ABSTRACT

Antioxidants play a crucial role in preventing skin aging caused by oxidative stress and contribute to overall human health. Within the presented diploma thesis, the possibilities of solubilizing natural antioxidants, namely gallic acid, quercetin, and *Calendula officinalis* extract, were studied. Solubilization represents a way to increase the stability and solubility of these substances, aiming to enhance their practical applicability. The maximum solubilization capacity was evaluated for selected combinations of surfactants, specifically Pluronic P123 and P407, Tween 80, and phosphatidylcholine. Carriers containing the mentioned antioxidants were prepared using the thin film hydration method, followed by monitoring their antioxidative, physicochemical properties, and release conditions into a defined environment.

Keywords: antioxidant, *Calendula officinalis*, gallic acid, Pluronic, quercetin, solubilization

Tímto bych chtěla poděkovat především své vedoucí diplomové práce doc. Ing. Janě Sedlaříkové, Ph.D. za její cenné rady, odborné vedení, čas, který mi věnovala během psaní celé práce, a především bych chtěla poděkovat za její neskutečnou trpělivost a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Martině Poláškové, Ph.D. za zprostředkování a pomoc při provádění testu DSC a paním laborantkám za jejich ochotu a pomoc při provádění experimentální části práce.

V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině, blízkým a přátelům za podporu a trpělivost během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 ANTIOXIDANTY	11
1.1 KLASIFIKACE ANTIOXIDANTŮ	12
1.1.1 Přírodní antioxidanty.....	13
1.1.2 Syntetické a přírodně-identické antioxidanty.....	15
1.2 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH LÁTEK S ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITOU.....	16
1.2.1 Quercetin	16
1.2.2 Kyselina gallová.....	17
1.2.3 Měsíček lékařský.....	18
1.3 TESTOVÁNÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	18
2 ENKAPSULACE	22
2.1 LIPOZOMY	25
2.2 LIPIDOVÉ NANOČÁSTICE.....	26
2.3 POLYMERNÍ ČÁSTICE A MICELY	26
3 SOLUBILIZACE	28
3.1 HODNOCENÍ SOLUBILIZAČNÍHO PROCESU	31
4 SOUČASNÝ STAV STUDOVANÉ PROBLEMATIKY	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
5 CÍLE PRÁCE	37
6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POSTUPY	38
6.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	38
6.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	38
6.3 SOLUBILIZAČNÍ KAPACITA.....	39
6.3.1 Příprava zásobních roztoků	39
6.3.2 Stanovení kritické micelární koncentrace	40
6.3.3 Příprava pracovních roztoků směsí surfaktantů	40
6.3.4 Sestrojení kalibračních křivek	40
6.3.5 Solubilizace aktivních látek do směsných micel.....	41
6.4 ENKAPSULACE ANTIOXIDANTŮ DO VYBRANÝCH NOSIČŮ.....	42
6.4.1 Příprava nosičů.....	42
6.4.2 Měření zeta potenciálu	44
6.4.3 Měření velikosti částic	44
6.4.4 Stanovení antioxidační aktivity	44
6.4.5 Stanovení enkapsulační účinnosti	45
6.4.6 Kinetika uvolňování antioxidantů z nosičů.....	45
6.4.7 Diferenciální skenovací kalorimetrie	47

6.5	PŘÍPRAVA KRÉMOVÝCH FORMULACÍ S OBSAHEM AKTIVNÍCH LÁTEK.....	47
6.5.1	Stanovení antioxidační aktivity.....	48
6.5.2	Stabilita krémových formulací.....	48
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	49
7.1	MICELÁRNÍ PARAMETRY NOSNÝCH SYSTÉMŮ.....	49
7.2	SOLUBILIZAČNÍ KAPACITA.....	50
7.3	CHARAKTERISTIKA NOSIČŮ S ANTIOXIDANTY	61
7.3.1	Zeta potenciál a velikost částic	61
7.3.2	Antioxidační aktivita	65
7.3.3	Enkapsulační účinnost.....	65
7.3.4	Test uvolňování antioxidantů.....	66
7.3.5	Diferenciální skenovací kalorimetrie	71
7.4	CHARAKTERISTIKA KRÉMOVÝCH FORMULACÍ.....	72
7.4.1	Antioxidační aktivita	72
7.4.2	Stabilitní studie.....	74
	ZÁVĚR	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	79
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	92
	SEZNAM OBRÁZKŮ	94
	SEZNAM TABULEK.....	96

ÚVOD

Antioxidanty hrají podstatnou roli při ochraně organismu před oxidačním stresem, proto je z hlediska dlouhodobého zdraví důležité zajistit jejich dostatečný příjem. Přítomnost antioxidantů je důležitá také v přípravcích pro péči o pleť, jelikož vlivem UV záření a jiných fyzikálních a chemických vlivů dochází k předčasnému stárnutí pokožky, které se projevuje vznikem vrásek a suchostí. I z tohoto důvodu je v posledních letech kladen důraz na použití antioxidantů při každodenní péči o pleť. Ze strany spotřebitelů je však stále větší poptávka po přírodních složkách, což v případě antioxidantů představuje značný problém, jelikož velké množství těchto látek je ve vodě nerozpustných. Z tohoto důvodu jsou antioxidanty enkapsulovány do různých typů nosičů, které zajistí jejich lepší rozpustnost, stabilitu a dlouhodobé uvolňování při aplikaci na požadovaném místě určení.

Jednou z možností jejich enkapsulace je solubilizace do micelárních agregátů, které vznikají nad kritickou micelární koncentrací jednotlivých surfaktantů a jejich směsí. Pro tyto účely je v posledních letech atraktivní aplikace biokompatibilních surfaktantů, které poskytnou dostatečnou ochranu po aktivní látce a zároveň nejsou toxické pro organismus ani životní prostředí. V tomto ohledu se jako perspektivní ukázaly neionické kopolymery typu Pluronic či jejich kombinace s jinými surfaktanty.

Cílem předložené diplomové práce bylo ověřit solubilizační kapacitu vybraných směsných micelárních systémů na bázi Pluronicu P123, P407, Tweenu 80 a fosfatidylcholinu a z nich pak připravit nosiče pro inkorporaci přírodních antioxidantů – kyseliny gallové, quercetinu a extraktu z měsíčku lékařského. Připravené nosiče byly následně charakterizovány s důrazem na antioxidační a enkapsulační aktivitu a podmínky uvolňování solubilizovaných antioxidačních látek do prostředí. Možnost potenciálního kosmetického využití byla ověřena na krémových formulacích prostřednictvím pilotní stabilitní studie.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ANTIOXIDANTY

Oxidační reakce patří mezi klíčové procesy probíhající v organismu, umožňují získávat energii z živin a udržovat základní životní funkce. Jedná se především o buněčné dýchání, citrátový cyklus nebo různé detoxikační mechanismy. Při buněčném dýchání dochází ke štěpení glukózy na pyruvát, který je následně oxidován v citrátovém cyklu. Pomocí beta-oxidace jsou mastné kyseliny vzniklé rozkladem tuků oxidovány na acetyl-CoA, který dále vstupuje do citrátového cyklu. Během citrátového cyklu následně dochází k oxidaci uhlíkových atomů a vzniku redukováných kofaktorů ($\text{NADH} + \text{H}^+$ a FADH_2) [1]. Oxidační reakce jsou taktéž důležité při detoxikaci organismu, jaterní buňky obsahují enzymy, které oxidují cizorodé látky, aby mohly být lépe vyloučeny z těla.

Při oxidačních reakcích vznikají volné radikály, které mohou různými způsoby narušovat vnitřní homeostázu organismu. Mohou vznikat při jakémkoliv stresu organismu nebo mohou vznikat vlivem prostředí (např. smog, kouření nebo UV záření). Tyto faktory pak mohou ovlivnit např. funkčnost kůže, s čímž souvisí její následné poruchy – dermatitida, nádory, vrásky nebo akné [2].

Důsledkem oxidačních reakcí jsou v závislosti na místě výskytu různé projevy. Významné problémy se mohou objevit v potravinářském průmyslu, kde v důsledku oxidačních mechanismů dochází ke znehodnocení potravin a snížení jejich výživové kvality. K oxidaci jsou náchylné především potraviny obsahující tuky a oleje. Při této reakci dochází k tvorbě primárních oxidačních produktů – hydroperoxidů a následně sekundárních oxidačních produktů, které mohou způsobit žluklý zápach i chuť. Se stejným problémem se lze setkat také v kosmetických přípravcích, ve kterých jsou obsaženy látky tukového charakteru, které právě nejčastěji podléhají oxidačnímu působení. Dochází tak k již zmíněným změnám v sensorických vlastnostech a znehodnocení přípravků. Při oxidačních reakcích vznikají často toxické látky, které mohou způsobovat vznik různých onemocnění, může docházet k poškození nebo dokonce smrti dané buňky [3], [4].

Oxidační reakce mohou probíhat za různých podmínek a rozdílnými mechanismy. Mezi ty nejčastější patří autooxidace vzdušným kyslíkem, oxidace singletovým kyslíkem, termální oxidace, oxidace těžkými kovy nebo oxidace katalyzované enzymy [3].

Za účelem zpomalení či zastavení oxidačních reakcí jsou v potravinářství, kosmetice i farmacii využívány antioxidanty. Ty se mohou vyskytovat přirozeně ve složkách, které jsou v daných produktech využívány, avšak ve většině případů jsou přidávány během

zpracování produktu. Tyto látky, ať už jsou použity v kosmetice či potravinářství, musí splňovat několik kritérií – musí být netoxické, účinné při nízkých koncentracích, stabilní a levné [3].

V literatuře lze nalézt různé definice antioxidačních látek. Halliwell a Gutteridge definovali antioxidant jako jakoukoliv látku, která, je-li přítomna v nízké koncentraci ve srovnání s oxidovaným substrátem, významně zpomaluje nebo inhibuje oxidaci daného substrátu. Později v roce 2007 Halliwell tvrzení upravil a definoval antioxidant jako jakoukoliv látku, která zpomaluje, zabraňuje nebo odstraňuje oxidační poškození cílové molekuly [5]. Obecně lze říci, že antioxidanty jsou sloučeniny nebo systémy, které jsou schopny interagovat s volnými radikály, a tím ukončit oxidační reakci dříve, než dojde k poškození dané molekuly [6].

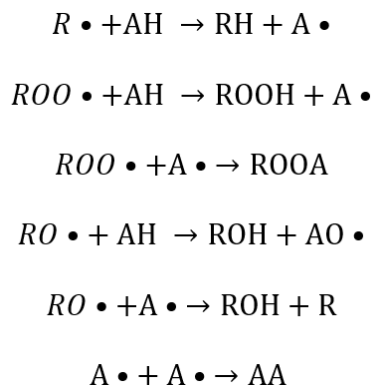
1.1 Klasifikace antioxidantů

Nejčastěji se antioxidanty klasifikují podle jejich původu a podle mechanismu účinku.

Podle mechanismu účinku lze antioxidanty dělit na:

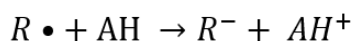
1. primární antioxidanty,
2. sekundární antioxidanty,
3. enzymatické antioxidanty,
4. vychytávače kyslíku,
5. chelatační (maskující) činidla.

Primární antioxidanty jsou často látky fenolového typu. Tyto antioxidanty mohou fungovat třemi různými způsoby. První z možností je vazba volných radikálů nebo přerušení řetězce. V případě přenosu vodíkového atomu antioxidant reaguje s vysoce reaktivním lipidovým radikálem a peroxy radikálem, přenesení vodíkového atomu na lipidový řetězec, který se stane stabilnějším a vznikne radikál antioxidantu, který je však stabilnější oproti lipidovému (peroxy) radikálu. Obecně primární antioxidanty vykazují vyšší afinitu k peroxy radikálům než samotným lipidům. Průběh reakce lze znázornit níže uvedenými rovnicemi (Obr. 1) [4].



Obrázek 1 Schéma průběhu antioxidační reakce [4]

Další možností působení primárních antioxidantů je přenos samotného elektronu. V tomto případě je elektron předán volnému radikálu, který přechází do stabilnější formy aniontu, zatímco antioxidant se nachází ve formě kationtu, který je také méně reaktivní. Průběh reakce popisuje následující rovnice (Obr. 2) [4].



Obrázek 2 Schéma přenosu elektronu [4]

Poslední z možností působení primárních antioxidantů je chelatace kovů, kdy kovy mohou působit jako katalyzátory a prooxidanty v oxidačních reakcích. Antioxidanty pomocí navázání kovových iontů vytváří stabilní komplexy, čímž zamezují jejich reakcím.

Sekundární antioxidanty rozkládají primární produkty oxidace – hydroperoxydy – na stabilní, konečné produkty [4] a vycytávače kyslíku reagují přímo s kyslíkem, který mohou odebrat do uzavřeného systému.

Podle původu lze antioxidanty dělit na přírodní a syntetické, někdy se lze setkat i s další skupinou, tzv. přírodně identickými antioxidanty.

1.1.1 Přírodní antioxidanty

Mezi nejběžnější a nejbohatší zdroje antioxidantů patří ovoce, zelenina, koření, bylinky, ale také mořské řasy. Zejména ovoce a zelenina jsou doporučovány nejen kvůli obsahu antioxidačních látek (vitaminu C a E), ale také látek minerálních [7]. Přírodní antioxidanty se nejčastěji dělí do dvou hlavních skupin – enzymatické a neenzymatické antioxidanty. Do skupiny enzymatických antioxidantů lze zařadit superoxid dismutázu, glutathion peroxidázu nebo glutathion reduktázu. Skupina neenzymatických antioxidantů je mnohem

obsáhlejší a může se dále dělit na polyfenoly, minerální látky (selen, zinek, měď...), vitaminy a terpenoidy [7], [8].

Vitaminy

Jedná se o skupinu strukturně složitějších organických sloučenin, které jsou nezbytné pro lidské zdraví. Jejich nedostatek může zapříčinit širokou škálu onemocnění, proto je důležité tyto látky přijímat v potravě či je doplňovat v podobě potravinových doplňků. Vitaminy lze klasifikovat do dvou skupin, a to na rozpustné ve vodě a rozpustné v tucích. Mezi vitaminy rozpustné ve vodě patří např. vitamin B nebo C, mezi zástupce vitaminů rozpustných v tucích patří vitaminy A, D, E, K [9].

Vitamin E je často popisován jako skupina molekul rostlinného původu (tokochromanoly), do které patří 8 vitaminů – čtyři tokoferoly a čtyři tokotrienoly. Nejvíce rozšířenou formou je α -tokoferol, který by podle některých odborníků měl jako jediný nést název vitamin E. Zdrojem tohoto vitaminu mohou být různá semena (slunečnicová), ovoce (maliny, kiwi), zelenina (kapusta, rajče, paprika), ořechy (arašídy) nebo luštěniny (fazole). Nedostatek vitaminu E je spojován se srdečními problémy, cukrovkou, mozkovou mrtvicí či Parkinsonovou chorobou. Tokoferol je využíván nejen v kosmetice a farmacii, ale také v potravinářství jako konzervant lipidů v potravinách nebo jako doplněk stravy [9], [10].

Vitamin C, též kyselina askorbová, působí jako primární antioxidant. Jedná se o esenciální látku, což znamená, že jej organismus musí přijímat z potravy, jelikož není schopen si jej sám syntetizovat. Významnou vlastností je jeho schopnost přeměňovat železo na formu snadno stravitelnou ve střevech. Díky vitaminu C dochází k syntéze některých neurotransmiterů, důležitou roli hraje při tvorbě kolagenu a jeho přítomnost v organismu je důležitá pro syntézu serotoninu. Mezi zdroje vitaminu C patří především ovoce (jahody, ananas, citrusy) a zelenina (zelí, petržel, rajčata, fenykl či špenát) [9]. Kyselina askorbová může reagovat se superoxidem, hydroxylovými i peroxylovými radikály a singletovým kyslíkem [11].

Vitamin A získávaný z živočišných zdrojů je znám jako retinoid, zatímco rostlinná forma je známa jako provitamin A karotenoidů. Jeho dostatek v organismu je nezbytný pro zrak, růst a vývoj buněk a je důležitý kvůli jeho antioxidační aktivitě. Vitamin A lze získat z mrkve, sladkých brambor, špenátu, dýně, vajec a nachází se také v kuřecím, hovězím a jehněčím mase. Vitamin A patří mezi primární antioxidanty a v některých případech je účinnějším antioxidantem než tokoferol [9], [12].

Polyfenoly

V případě polyfenolů se jedná o širokou skupinu látek, sekundární metabolity rostlin, s antioxidačními, cytotoxickými, protinádorovými a protizánětlivými vlastnostmi. Jejich struktura je tvořena nejméně jedním aromatickým kruhem, na kterém jsou navázány jedna či více hydroxylových skupin. Právě počet a poloha hydroxylových skupin ovlivňuje antioxidační aktivitu těchto látek. Jejich mechanismus účinku je různý – mohou působit jako chelatační činidla, vychytávače reaktivních forem kyslíku či jako primární antioxidanty. Jejich zdroji mohou být víno, káva, rýže, ale především ovoce a zelenina [13], [14]. Polyfenoly lze dále členit do dvou velkých skupin, a to na nonflavonoidy a flavonoidy.

Nonflavonoidy jsou látky odvozené od kyseliny skořicové, stilbeny (např. resveratrol, který je v posledních letech hojně studován) nebo látky odvozené od kyseliny fenolové (kyselina gallová, kurkuminoidy, lignany). Strukturu flavonoidů tvoří dva aromatické kruhy, které jsou spojeny řetězcem tvořeným třemi uhlíky. Flavonoidy se dále dělí do podskupin na flavonoly (quercetin), flavanoly, flavanony a flavony, flavanony, isoflavony a anthokyaniny [8], [15], [16]. Díky jejich pozitivním vlastnostem nacházejí flavonoidy uplatnění ve farmaceutických, potravinových, léčivých a kosmetických přípravcích [17].

Terpenoidy

Terpenoidy jsou látky odvozené od izoprenu, proto jsou také známé pod pojmem izoprenoidy. Dělí se na základě jejich uhlíkového řetězce na monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny a polyterpeny. Monoterpeny a seskviterpeny jsou hlavními složkami esenciálních olejů, které v rostlinách zastávají různé funkce (repelentní účinek proti hmyzu nebo zvýšení termotolerance rostlin) [18]. Tetraterpeny jsou širokou skupinou, do které se řadí karotenoidy, které se vyskytují jako pigmenty v mnoha rostlinách. Karotenoidy lze dále dělit na karoteny (obsahují pouze atomy uhlíku a vodíku) a xantofyly (obsahují alespoň jednu funkční skupinu obsahující kyslík). Nevýhodou použití karotenoidů je jejich nestabilita na světle, což představuje problém při jejich skladování [18], [19].

1.1.2 Syntetické a přírodně-identické antioxidanty

V poslední době je na výrobce z oblasti kosmetického, farmaceutického a potravinářského průmyslu vyvíjen nátlak, aby byly syntetické antioxidanty nahrazeny přírodními alternativami. Obecně však lze říci, že syntetické antioxidanty vykazují konstantní

antioxidační aktivitu a jedná se o „čistější“ látky (neměly by zde být žádné nežádoucí složky) a jejich výroba je levnější v porovnání se získáváním přírodních antioxidantů. Na druhou stranu však musí tyto látky splňovat různá kritéria bezpečnosti a netoxicity, která jsou před uvedením na trh kontrolována příslušnými úřady. Určitou možností náhrady syntetických antioxidantů jsou přírodně-identické látky, které spojují vlastnosti syntetických a přírodních variant, tj. jsou levné, a zároveň vykazují dostatečnou aktivitu a stabilitu [20].

Nejnámějšími zástupci syntetických antioxidantů jsou butylhydroxy toluen (BHT), butylhydroxy anisol (BHA), terc-butyl hydrochinon (TBHQ), galláty a soli kyseliny askorbové. BHT a BHA jsou od roku 1954 nejpoužívanějšími antioxidanty v potravinářství. Podle studií chronické toxicity bylo prokázáno, že ve vyšších dávkách může BHT působit jako nádorový promotor [21], [22]. TBHQ může být v kosmetice využíván i jako antioxidant, nejčastěji ve rtěnkách, očních stínech, parfémeh nebo přípravcích osobní péče [23].

1.2 Charakteristika vybraných látek s antioxidační aktivitou

Níže budou více popsány přírodní látky s antioxidační aktivitou, které byly použity v praktické části této diplomové práce.

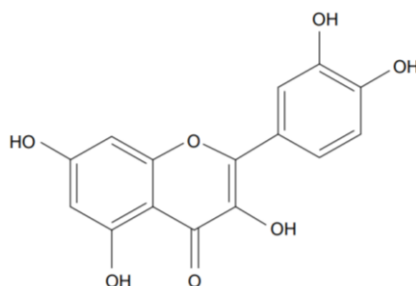
1.2.1 Quercetin

Quercetin je běžně se vyskytující antioxidant patřící do skupiny flavonoidů, chemicky se jedná o 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon (Obr. 3). Jeho název je odvozen od *quercetum* (oak forest) a je používán od roku 1857 [24]. Quercetin se řadí mezi primární antioxidanty, je schopen přenášet ze své struktury vodíkové atomy a přenášet je na volné radikály, čímž je stabilizuje [25]. Přirozeně se vyskytuje v mnoha rostlinách, ovoci a zelenině. Kromě antioxidační aktivity vykazuje další farmakologické vlastnosti, mezi ty nejvýznamnější patří protirakovinné či protizánětlivé. Nevýhodou quercetinu je jeho nerozpustnost ve vodě a špatná biologická dostupnost, což limituje jeho potencionálně široké využití [26].

Z potravin přijímá denně běžný člověk v rozmezí 5–40 mg quercetinu, ten je po vstřebání metabolizován ve střevě a játrech. V plazmě se jeho koncentrace pohybuje v řádech nanomolů, avšak při stravování se potravinami bohatými na quercetin může koncentrace vzrůst řádově až tisíckrát. Quercetin má citronově žlutou až zelenou barvu, je nerozpustný ve studené vodě, do určité míry je rozpustný v horké vodě a velmi dobře se rozpouští

v alkoholu. Quercetin se běžně v přírodě vyskytuje ve formě etherů, sulfátů a hlavně glykosidů, a právě glykosylace zvyšuje jeho hydrofilitu, stabilitu a biologickou dostupnost [17].

Díky jeho vlastnostem je využíván k prevenci a léčbě některých onemocnění, mezi které patří například rakovina (prsů, tlustého střeva, prostaty, vaječnicků), kardiovaskulární onemocnění, chronické záněty, obezita, astma nebo alergie. Jeho širší využití je však stále omezeno kvůli špatné rozpustnosti ve vodě a jeho nestabilitě [25].



Obrázek 3 Struktura quercetinu [26]

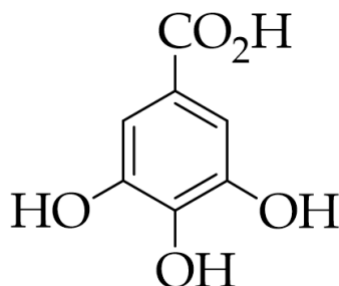
1.2.2 Kyselina gallová

Kyselina gallová, chemicky 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina (struktura viz Obr. 4), je přírodní látka spadající mezi polyfenoly. Byla objevena roku 1787 Carlem Wilhelmem Scheelem [27]. Kyselina gallová se přirozeně vyskytuje v různých druzích ořechů, zeleném čaji, červeném víně, chmelu, ale také v dubové kůře. Přirozeně se vyskytuje ve dvou formách – jako volná molekula nebo jako součást tříslovin. Čistá kyselina gallová se vyskytuje ve formě krystalického bezbarvého prášku, její soli a estery jsou označovány jako galláty. Může působit jako chelatační činidlo, např. s železem je schopna tvořit komplex v rozmezí pH 3 až 9, kdy se zvyšujícím se pH roste stupeň chelatace [28].

Její rozpustnost ve vodě je nízká, naopak v alkoholu a etheru je rozpustná dobře. Taje při teplotě cca 250 °C, přičemž se přeměňuje na oxid uhličitý a pyrogallol nebo 1,2,3-trihydroxybenzen, jež jsou následně využívány v laboratořích při výrobě azobarviv, fotografických vývojek nebo k absorpci kyslíku [27].

Kyselina gallová vykazuje mnoho terapeutických vlastností, mezi které patří antioxidační, antimikrobní, antivirová, protirakovinná a protizánětlivá aktivita [29]. Díky těmto charakteristikám je využívána v potravinářství a kosmetice, kde působí jako antioxidant a zabraňuje tak oxidačním procesům, které by způsobily znehodnocení daného výrobku a dále také v barvicím průmyslu jako součást některých druhů inkoustů [27], [30], [31].

Stejně jako samotná kyselina gallová, i její deriváty, např. lauryl gallát, propyl gallát, oktyl gallát nebo tetradecyl gallát působí jako antioxidační činidla, jsou tedy vhodné jako přídatné látky v potravinářství či kosmetice [32].



Obrázek 4 Struktura kyseliny gallové [31]

1.2.3 Měsíček lékařský

Léčivé rostliny jako zdroje farmakologických molekul hrají nezastupitelnou roli v oblasti tradiční medicíny, jejíž historie sahá daleko do historie, stejně jako historie lidstva. Rod *Calendula* obsahuje přibližně 25 jednoletých nebo víceletých druhů, nejznámější z nich je *Calendula officinalis*, tedy měsíček lékařský [33].

Měsíček lékařský je kvetoucí aromatická bylina patřící do čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*). Co se týká chemického složení, měsíček obsahuje různé aktivní složky, mezi nejvýznamnější patří karotenoidy, flavonoidy, fenolové kyseliny, chinony a kumariny [34]. Díky těmto látkám vykazuje rozmanitou škálu biologických vlastností – antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální, gastroprotektivní nebo hepatoprotektivní [35]. Farmakologické výzkumy *in vitro* potvrzují, že výtažky měsíčku lékařského vykazují antivirové a antigenotoxické vlastnosti [34].

V tradiční medicíně je měsíček díky svým vlastnostem využíván v různých formách k léčbě ran, oparů, jizev, omrzlin či některých popálenin. Dále má význam při gastrointestinálních onemocněních, gynekologických obtížích nebo při poranění kůže. Ve formě tinktur nebo suspenzí je topicky aplikován v bylinkářství při léčbě akné, zmírnění zánětů nebo ke zklidnění podrážděné tkáně, nálev z měsíčku je používán na ošetření bodnutí od včel [34], [35].

1.3 Testování antioxidační aktivity

Pro zhodnocení schopnosti antioxidantů neutralizovat volné radikály a chránit buňky před oxidativním stresem lze v literatuře nalézt velké množství metod. Tato skutečnost souvisí

s tím, že nízkomolekulární antioxidanty působí různými mechanismy – nejčastěji se jedná o přímou reakci s volnými radikály nebo reakci s přechodnými kovy. Díky tomu mohou být metody rozděleny do dvou hlavních skupin, a to na metody hodnotící redoxní vlastnosti látek a metody hodnotící schopnost eliminovat volné radikály. Některé z metod spadající do těchto skupin budou popsány níže [36].

Nejnámějšími metodami pro stanovení antioxidační aktivity jsou TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), DPPH (difenyl pikrylhydrazyl), CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity), kalorimetrické stanovení fenolických a polyfenolických antioxidantů *in vitro* (Folin-Ciocalteu) a FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Při těchto postupech jsou využívány především syntetické volné radikály, které jsou však odlišné od volných radikálů nacházejících se v lidském těle, což může vést ke snížení přesnosti vyhodnocení. Údaje získané různými metodami je složité vzájemně porovnávat, což dále omezuje jejich následnou interpretaci [37].

Do skupiny metod založených na eliminaci radikálů je řazena metoda TEAC (využívající ABTS = 2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonát)) a metoda využívající DPPH, kdy radikály jsou v reakční směsi buď generovány, nebo jsou do ní přidávány. Z chemického hlediska se jedná o radikály syntetické (DPPH, ABTS^{•+}) nebo kyslíkové (hydroxylový, peroxylový) [36].

V případě metody TEAC je výsledná antiradikálová aktivita testovaného vzorku srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Testování probíhá na základě schopnosti vzorků (látek) zhaset syntetický kation-radikál ABTS^{•+}, proto je tato metoda známá spíše pod názvem ABTS. Antioxidanty zhasějící radikál ABTS^{•+} jsou donory vodíku a jejich antioxidační aktivita se sleduje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra ABTS^{•+} (734 nm). ABTS^{•+} je v reakční směsi generován oxidací samotného ABTS. Oxidace je prováděna pomocí systému ABTS/H₂O₂/peroxidasa nebo ABTS/methmyoglobin/H₂O₂. Nejčastěji je antioxidant přidáván do systému již obsahující vzniklý ABTS^{•+}, avšak je možné použít postup, při kterém je antioxidant přidáván do reakční směsi při generování ABTS^{•+}. Výsledky metody jsou vyjádřeny porovnáním standardního množství syntetického Troloxu – milimolární koncentrace Troloxu má antioxidační kapacitu odpovídající 1 mM roztoku testovaného vzorku. Obecně lze říci, že metoda TEAC odráží relativní schopnost antioxidantů (donující elektron či vodík) vyladit kation ABTS ve srovnání se schopností Troloxu. Stanovení antioxidační

aktivity pomocí této metody je relativně jednoduché a rychle proveditelné s širokým uplatněním [36], [38].

Další postup, zavedený Goldsmithem a Rennem v roce 1922, využívá stabilní volné radikály DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl). Roztok DPPH má tmavě fialovou barvu a nejvyšší absorpenci vykazuje při vlnové délce 517 nm. Při reakci s látkou, která odevzdá atom vodíku (antioxidant), dochází ke vzniku redukované formy DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazin, ke změně z fialové barvy roztoku na žlutou, a současně ke snížení absorpance. Pokles absorpance je úměrný množství oxidovaného DPPH v roztoku. Změna barvy roztoku je sledována spektrofotometricky buď po uplynutí daného času (nejčastěji 30 minut při určité teplotě ve tmě), nebo může být prováděna v kinetickém režimu. Tento test může být prováděn také na mikrotitračních destičkách. Reakci je možné také modifikovat, s využitím metody elektronové spinové rezonance (ESR) či HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). U detekce HPLC se hodnotí pík radikálu DPPH, což je výhodné v případě, že jsou testovány barevné vzorky, jelikož se zde zbarvení vzorků eliminuje. Antioxidační aktivitu testovaného vzorku měřenou touto metodou lze vypočítat dle vztahu 1 [4], [36], [39].

$$AA\% = \frac{(Abs_{kontrola} - Abs_{vzorek})}{Abs_{kontrola}} \cdot 100 \quad (1)$$

Do skupiny metod založených na eliminaci radikálů je řazena také metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), při níž jsou v systému generovány kyslíkové radikály a je sledována schopnost testovaného vzorku zpomalit či úplně zastavit radikálovou reakci. Pro generaci peroxylových radikálů se využívá AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid), při generaci hydroxylových radikálů se využívá systém peroxidu vodíku s měďnatými kationty. Oba typy radikálů patří k těm nejreaktivnějším, proto metoda ORAC patří k důležitým parametrům testovaným u antioxidantů. U této metody je detekce založena na sledování úbytku fluorescence β -fykoerytrinu po ataku radikály. Vzorky jsou inkubovány po dobu 30 minut při teplotě 37 °C ve fluorescenčních trubicích, následně jsou přidány zmíněné látky potřebné ke generaci radikálů a následně dochází k měření excitace při 485 nm a emise při vlnové délce 520 nm [4], [36].

Do skupiny technik, které fungují na principu redoxní reakce, patří metoda FRAP, při které je využívána schopnost antioxidantů redukovat železité komplexy. Tyto komplexy jsou ve většině případů téměř bezbarvé, avšak po jejich redukci dochází k tvorbě barevných produktů. Existují zde však jistá omezení, měření musí probíhat při nízké hodnotě pH (3,6)

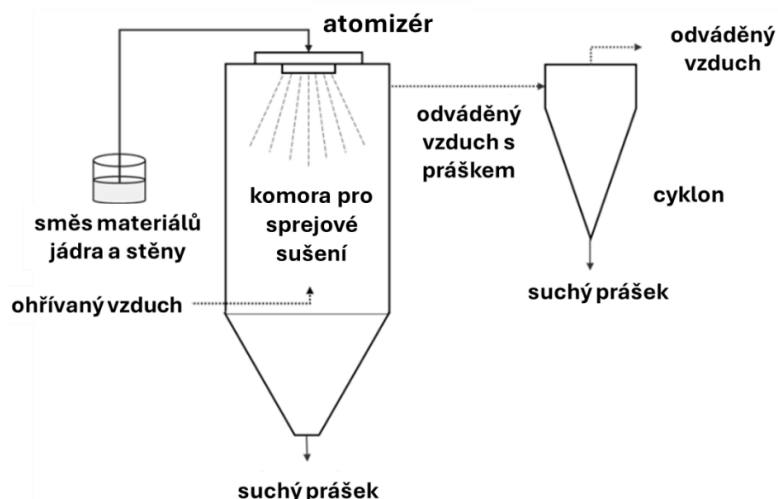
a nemohou být zachyceny polyfenolická látka, které reagují s komplexem pomalu. Sleduje se nárůst absorbance při 593 nm, což odpovídá množství komplexu Fe^{2+} , a to odpovídá antioxidační aktivitě vzorku [40], [36].

2 ENKAPSULACE

Enkapsulace je proces, při kterém jsou aktivní látky obalovány nebo uzavírány v ochranné vrstvě, obalu neboli matrici, jejíž cílem je zlepšení stability a biologické dostupnosti dané látky. Enkapsulované látky jsou chráněny před vnějšími fyzikálními a chemickými negativními vlivy (světlo, kyslík, pH, teplota), díky čemuž mohou být maskovány nežádoucí sensorické vlastnosti, jako je zápach nebo chuť. Účinnost enkapsulace je poté ovlivněna mnoha faktory, mezi které patří technika enkapsulace, vlastnosti aktivních látek a materiálů použitých k tvorbě obalu a jejich vzájemné interakce. Enkapsulace také umožňuje řízené uvolňování aktivních látek v určeném prostředí, a to i postupně v průběhu delšího časového rozmezí. Díky enkapsulaci některých aktivních látek může dojít ke zlepšení vlastností konečných produktů, jako je jejich skladování, manipulaci či použití [6], [41], [42]. Enkapsulace může být prováděna za použití různých materiálů – lipidů, proteinů, polysacharidů nebo polymerů.

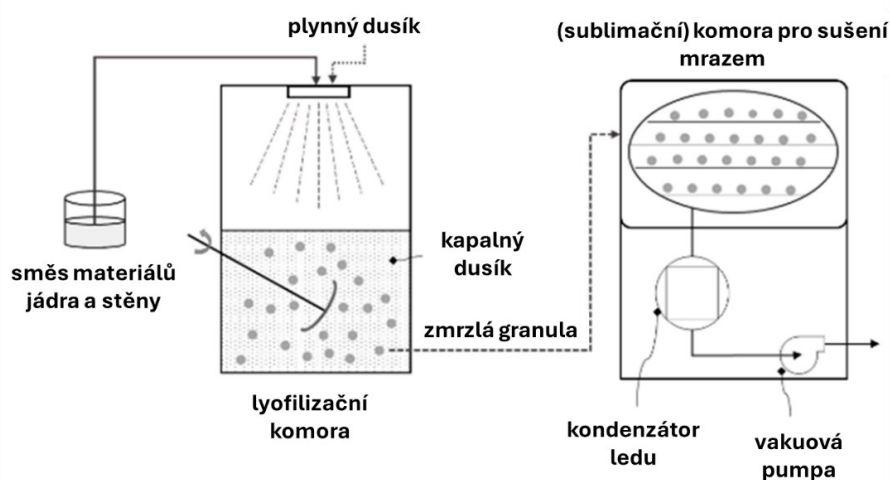
Pro enkapsulaci lze využít různé techniky, při jejichž výběru je důležité brát ohled na materiál aktivní látky, materiály tvořící kapsulu, dále jejich vlastnosti a velikost. Mezi často používané enkapsulační techniky lze zařadit sprejové sušení, lyofilizaci, extruzi, koacervaci, emulzifikace, iontovou gelaci nebo molekulární inkluzi. Některé z těchto metod budou stručně popsány v následující části diplomové práce.

Jednou z nejpoužívanějších technik enkapsulace, známou již od poloviny 20. století, je *sprejové sušení*. Tato metoda zahrnuje řadu výhod, mezi které patří především nízké náklady, dobrá výsledná kvalita konečného produktu, variabilita, co se týká výběru enkapsulovaných látek a vhodnost využití v průmyslových podmínkách. Jako enkapsulované látky lze využít minerály, vitaminy, aromata, barviva, ale i tuky a oleje, díky čemuž je tento postup využíván v potravinářství, farmacii i kosmetice. Příprava probíhá ve třech krocích. Nejprve jsou smíchány materiály pro přípravu jádra i obalu, tato směs je následně propouštěna přes trysku nebo rotující kolo rozprašovací sušičky do horké komory, kde je směs rozprašována. Dojde k vytvoření malých kapiček, čímž se zvětší jejich povrch. V dalším kroku směs přijde do kontaktu s horkým vzduchem, dochází k odpaření rozpouštědla, čímž dojde k vytvoření obalu. Posledním krokem této metody je separace vysušeného prášku, která se provádí pomocí cyklonů, které pracují na principu odstředivé síly a dochází tak k zachycení částic na dně nádoby. Schéma přípravy je znázorněno na Obr. 5. Nevýhodou této techniky je omezené použití materiálu pro přípravu obalu kapsle [42], [43].



Obrázek 5 Schéma enkapulace pomocí sprejového sušení [upraveno dle 42]

Lyofilizace je další často používanou metodou enkapulace (Obr. 6). Materiál je v tomto případě zmrazen za vzniku ledových krystalů, které dále sublimují ve vakuových komorách. Zbytková voda je redukována sekundárním sušením neboli desorpcí. Sublimace ledových krystalů má za následek vznik porézní strukturu, která poté zajišťuje dobré rehydratační vlastnosti produktu nacházejícího se ve formě prášku. Lyofilizace patří mezi relativně jednoduché metody enkapulace, co se týče provedení. Je vhodná pro enkapulaci aromatických a těkavých sloučenin, a také bioaktivních látek, jelikož vzorky nejsou vystavovány vysokým teplotám, jako je tomu v případě metody sprejového sušení. Mezi nevýhody lyofilizace patří delší doba provádění a vyšší náklady [42], [44].

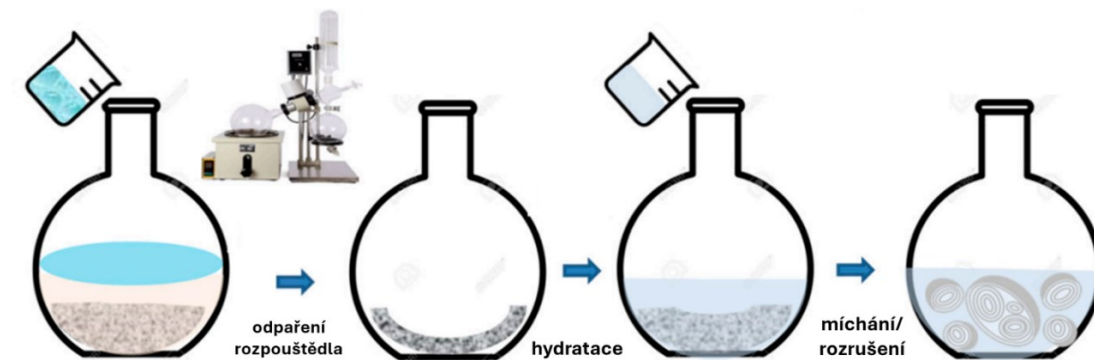


Obrázek 6 Schéma enkapulace metodou lyofilizace [upraveno dle 42]

Další enkapsulační technikou je *extruze* neboli vytlačování. Principem je vytlačování polymerního roztoku obsahující aktivní látku přes štěrbinu (trysku) do želírujícího roztoku. Velikost výsledných kapslí závisí na průměru injekčních trysek a rychlosti průtoku roztoku. Jako obalový materiál je často využíván alginát sodný a kapsle jsou tvořeny v roztoku chloridu vápenatého. Mezi benefity extruzní techniky lze zařadit snadné provedení i v laboratorních podmínkách, dlouhá doba uchovávání kapslí, široké spektrum složek, které může být enkapsulováno. Mezi nevýhody patří omezené množství materiálů na tvorbu obalu a také větší velikost a porozita vyrobených kapslí, což urychluje difúzi aktivní látky do prostředí [42], [43].

Emulzifikace je metoda vhodná pro enkapsulaci látek rozpustných v oleji, mezi které patří karotenoidy, rostlinné steroly či jiné tuky. Jak již vyplývá z názvu, základem je příprava emulze, která se skládá ze dvou nemísitelných kapalin, přičemž jedna z kapalin je rozptýlena ve druhé ve formě kapiček. Pro správné provedení této techniky je důležitá přítomnost emulgátoru, aby došlo k mísení obou kapalin. Enkapsulované aktivní látky mohou být v kapalně nebo práškové formě v případě, že se dále podrobí sušení [42].

Nejstarší, nejběžnější a nejjednodušší metodou pro přípravu multilamelárních vezikul (MLV) i jiných nosičů je metoda *hydratace tenkého filmu* (Obr. 7). Pro získání homogenní směsi jsou hlavní složky rozpuštěny v organickém rozpouštědle (ethanol, chloroform nebo směs chloroformu a methanolu). Po rozpuštění složek je rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce při určité teplotě (45–60 °C) a při konstantních otáčkách, tím dojde k vytvoření tenkého filmu. Konečná fáze spočívá v hydrataci vytvořeného filmu, která probíhá při vyšší teplotě a vzorek může být třepán nebo vložen do ultrazvukové lázně. V případě lipidových nosičů je konečná suspenze ponechána přes noc při teplotě 4 °C [45].

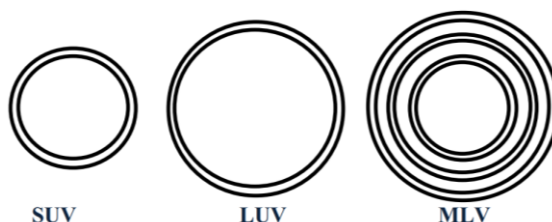


Obrázek 7 Schéma metody hydratace tenkého filmu [upraveno dle 45]

2.1 Lipozomy

Lipozomy byly popsány už v polovině 60. let minulého století a v kosmetickém průmyslu byly využívány firmou Christian Dior – Capture™. V současnosti lipozomy nacházejí uplatnění nejen v kosmetice, ale například i v potravinářství, nebo farmacii. Jedná se o sférické částice tvořené lipidovými membránami, které mohou být jednovrstvé či vícevrstvé. Základní součástí membrány jsou amfifilní látky, často fosfolipidy, podstatnou část tvoří fosfatidylcholin (též lecitin) a jeho směsi se zbytky různě dlouhých mastných kyselin. Ve své struktuře mohou obsahovat i jiné fosfolipidy, např. fosfatidyletanolamin, sfingomyelin či fosfatidylglycerol. Za účelem snížení fluidity membrány je přidáván také cholesterol. Lipozomální agregáty dosahují průměru od 20 nm až do několika μm . Jelikož jsou membrány tvořeny amfifilními lipidy, jejich struktura je podobná membránám biologickým. Hydrofilní části směřují na vnější stranu membrány a jsou schopny enkapsulovat látky hydrofilní, naopak do lipofilní části lipidů jsou schopny uzavřít látky hydrofobní povahy, tyto pak představují vnitřní vrstvu membrány. Do pozornosti vědců se lipozomy dostaly díky jejich nízké toxicitě, biokompatibilitě, biologické odbouratelnosti, relativně snadné přípravě a delší době cirkulace v lidském organismu a schopnosti prodloužit životnost přípravků s jejich obsahem. Existují ovšem také nevýhody spojené s využitím lipozomů, mezi které patří rychlé uvolnění inkorporovaných hydrofobních látek do prostředí, což limituje jejich aplikovatelnost právě pro enkapsulaci hydrofobních molekul. Obecně jsou klasifikovány 4 základní typy lipozomů, a to malé a velké unilamelární vezikuly (SUV a LUV), velké multilamelární vezikuly (MLV) a velké oligolamelární vezikuly (Obr. 8) [6], [46].

Na základě lipozomů byly vyvinuty další systémy, mezi které patří niosomy, transferosomy, etosomy a dendrosomy [6].



Obrázek 8 Struktura lipozomů [upraveno dle 47]

2.2 Lipidové nanočástice

Lipidové nanočástice lze definovat jako nanoemulze O/V (olej ve vodě), kdy naproti klasické emulzi O/V je v případě pevných lipidových nanočástic (SLN) kapalný olej nahrazen pevným lipidem nebo směsí pevných a kapalných lipidů v případě nanostrukturovaných lipidových nosičů (NLC). SLN byly vyvinuty na počátku devadesátých let, jsou složeny z pevného lipidu, který je dispergován ve vodném prostředí a v některých případech bývají stabilizovány pomocí surfaktantu. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 40 až 1000 nm. Naproti tomu NLC jsou tvořeny kombinací pevných a kapalných lipidů v různých poměrech. SLN vykazují široké spektrum benefitů, jsou netoxické a biologicky odbouratelné, vykazují velký povrch, vysokou enkapsulační účinnost, řízené a cílené uvolňování. Díky lipofilní povaze jsou schopny inkorporovat širokou škálu látek nerozpustných ve vodě [48], [6]. NLC vykazují méně uspořádanou strukturu, avšak jsou schopny inkorporovat vyšší množství aktivní látky, jelikož tato může být umístěna mezi řetězci mastných kyselin, mezi lipidovými dvojvrstvami, ale také v neuspořádaných částech lipidové matrice. Ve srovnání s SLN jsou nanostrukturované lipidové nosiče také schopny zajistit pomalejší uvolňování aktivní látky [6].

2.3 Polymerní částice a micely

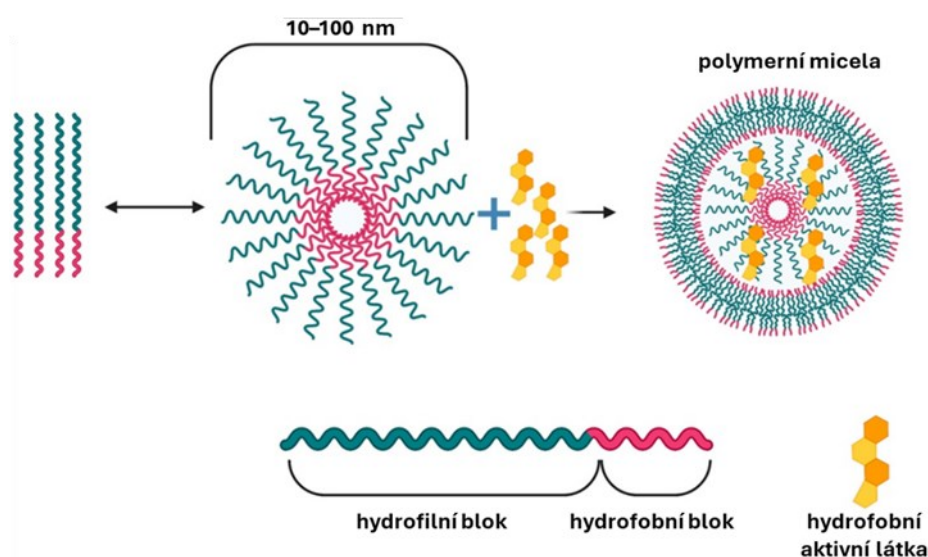
Pro inkorporaci účinných aktivních látek jsou používány také nanočástice a mikročástice. Aktivní látky jsou v těchto systémech zachyceny uvnitř jádra (nanokapsle) nebo jsou rozptýleny v obalu částice (nanosféry). V literatuře lze nalézt různé definice těchto částic, podle některých autorů by se jejich velikost měla pohybovat v rozmezí 1 až 100 nm, podle jiných v rozmezí 1 až 1000 nm, díky této velikosti jsou schopny překonávat biologické (kožní) bariéry. Jedním z hlavních důvodů tvorby polymerních částic je vytvoření ochranné bariéry pro aktivní látky, kdy se předpokládá, že tato bariéra bude chránit před vlhkostí, pH, světlem, kyslíkem a dalšími faktory v prostředí. Materiálů pro přípravu polymerních částic je široká škála, a to od přírodních (izolovány z rostlin, hub, řas, bakterií, živočichů) až po syntetické (často modifikace a zlepšení vlastností přírodních polymerů), přičemž jejich výběr je závislý na aplikaci částic, zvolené inkorporované látce, mechanismu uvolňování, prostředí a výrobních nákladech [48], [6].

Micely jsou běžně definovány jako struktury, které jsou tvořeny samouspořádáním amfifilních molekul (surfaktantů) nad kritickou micelární koncentrací (CMC). Pro micely je typické uspořádání, kdy jádro je tvořeno hydrofobními částmi molekul a vnější obal

naopak hydrofilními částmi. Někdy je možné se setkat s reverzními nebo inverzními micelami, které mají uspořádání opačné, tedy že hydrofobní části směřují do prostředí a hydrofilní jsou uzavřeny v jádře. Polymerní micely jsou systémy o velikosti 10–100 nm, které vznikají samouspořádáním amfifilních bloků (di- nebo tri-) nebo roubovaných kopolymerů nad hodnotou CMC (Obr. 9). Oproti klasickým micelám mají polymerní micely nižší hodnotu CMC a bývají stabilnější. Díky své struktuře mohou polymerní micely enkapsulovat jak lipofilní látky (uvnitř hydrofobního jádra), tak látky hydrofilní (v hydrofilním obalu) [49].

Polymery pro přípravu polymerních micel mohou být přírodní i syntetické. Vlivem rozvoje polymerizačních technik lze připravovat kopolymery s různou strukturou a různými vlastnostmi, díky tomu lze pak také připravovat polymerní micely o různé velikosti, vlastnostech a mechanismu uvolňování enkapsulovaných látek [49]. Pro přípravu polymerních micel jsou nejčastěji používány PEG, dextran – jako hydrofilní polymery, PLA a PLGA jako hydrofobní polymery, nebo se používají amfifilní kopolymery, tvořeny poly(ethylen oxidem) a poly(propylen oxidem). Poslední typ polymeru je využíván nejčastěji a ve farmacii a kosmetice je znám pod názvem Pluronic či Poloxamer [50].

Polymerní micely vykazují mnoho výhod oproti micelám tvořených klasickými povrchově aktivními látkami, mezi tyto výhody patří vyšší stabilita, lepší přizpůsobivost, vyšší solubilizační (enkapsulační) kapacita, netoxičnost a řízené uvolňování enkapsulované látky [51].

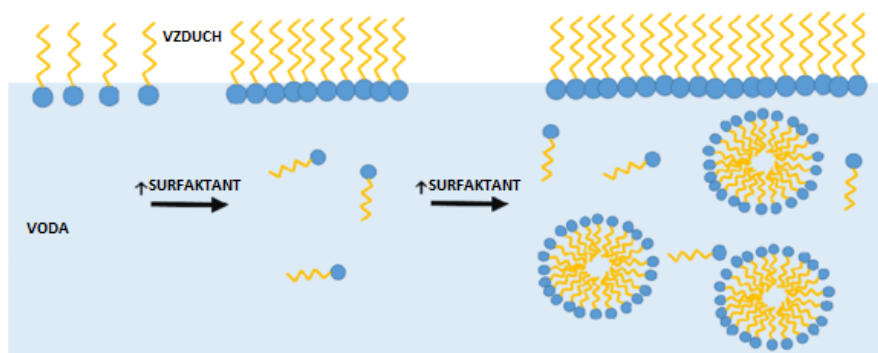


Obrázek 9 Schéma tvorby polymerní micely z blokového kopolymeru [upraveno dle 52]

3 SOLUBILIZACE

Aktivní látky mohou být enkapsulovány také prostřednictvím solubilizace do micelárních agregátů, která byla také předmětem praktické části této práce.

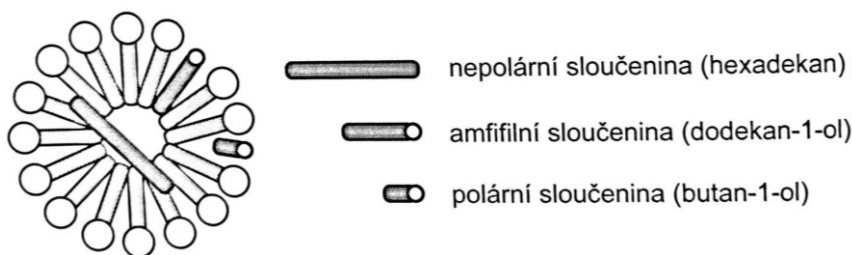
Surfaktanty neboli povrchově aktivní látky jsou nízkomolekulární až středně molekulární sloučeniny, které ve své struktuře obsahují alespoň jednu lyofobní a jednu lyofilní skupinu. V případě, že jsou surfaktanty rozpuštěny ve vodném prostředí, lze říct, že ve své struktuře obsahují hydrofobní a hydrofilní skupiny. Hydrofobní část, jak již vyplývá z názvu, je obecně dobře rozpustná v oleji, ale špatně rozpustná ve vodě. Naproti tomu hydrofilní (někdy také polární část) je rozpustná ve vodě, ale nerozpustná v oleji [53], [54].



Obrázek 10 Proces micelizace ve vodném prostředí [upraveno dle 55]

Solubilizace je jev, při kterém dochází k inkorporaci látky (solubilizátu), která je v čistém disperzním prostředí nerozpustná, do agregátů tvořených solubilizačním činidlem (Obr. 11). Daný jev je také znám pod pojmem micelární solubilizace, a to z toho důvodu, že k němu dochází v roztocích, v nichž jsou přítomny micely. Proces tvorby micel je znázorněn na Obr. 10. Solubilizace může proběhnout různými mechanismy, v případě nepolárních látek dochází k jejich rozpouštění v jádře micely. Polárně-nepolární látky jsou v micelách rozmístěny tak, že jejich hydrofobní část (např. uhlovodíkový řetězec) směřuje směrem dovnitř micely, a naopak část hydrofilní směřuje do vodné fáze – tento děj je nazýván komicelizace. Polární látky jsou solubilizovány na povrchu micel či v jejich těsné blízkosti (Obr. 11). Všechny tyto případy se týkaly micel, které jsou tvořeny klasickými ionickými povrchově aktivními látkami. V případě neionických surfaktantů, které jsou často tvořeny polyoxyethylenovými skupinami, jsou molekuly solubilizované látky rozprostřeny v okrajových částech micel a pravděpodobně zde tvoří vodíkové vazby s kyslíkem. Vzhledem k tomu, že solubilizát je zabudován do micely, dochází tak ke

zvětšení objemu hydrofobního jádra. Micela je pak tvořena větším počtem molekul povrchově aktivních látek, což vede ke zvětšení její hmotnosti [56], [57].



Obrázek 11 Micelární solubilizace [56]

Proces micelizace je v literatuře popisován dvěma základními modely. V prvním z nich – modelu působení hmoty – se předpokládá, že micely a samotné monomery jsou druhem chemické rovnováhy. Ve druhém modelu – fázové separace – jsou micely považovány za fázi novou, která vzniká při a nad kritickou teplotou a při vyšší koncentraci micel. V obou případech jsou tedy k popisu micelizace využívány klasické termodynamické přístupy. V případě, že předpokládáme, že koncentrace volného surfaktantu v přítomnosti micel je konstantní a rovná se hodnotě kritické micelární koncentrace (CMC), lze pro výpočet volné micelizační energie ΔG_m využít vztah (2) [58]:

$$\Delta G_m = RT \ln CMC \quad (2)$$

kde:

R – univerzální plynová konstanta

T – termodynamická teplota

CMC – kritická micelární koncentrace

Charakter molekuly PAL předurčuje širokou škálu a variabilitu vlastností, které souvisejí s adsorpcí na rozhraních a „samouspořádání“ v roztoku. Povrchové napětí vzniká v důsledku nerovnováhy přitažlivých mezimolekulárních interakcí na povrchu kapaliny. Molekuly v povrchové vrstvě obsadí celý povrch, nad nimi se nevyskytují žádné jiné molekuly, a proto jsou přitahovány zpět do objemu. Tato nerovnováha vytváří přebytek energie na povrchu ve srovnání s objemem (volná povrchová energie), což vede ke smrštění povrchu kapaliny, a tím se zmenšuje exponovaná plocha povrchu. V případě, že je PAL v roztoku v nízkých koncentracích, adsorpce voda–vzduch je spontánní proces. Výsledkem je vznik monovrstvy, která mění volnou povrchovou energii. Pro kvantitativní popis adsorpce PAL na rozhraní se zavádí veličina Γ , která je definována jako koncentrace

PAL v povrchové vrstvě. Gibbsova adsorpční rovnice (3) popisuje změnu povrchového napětí s koncentrací ve vztahu k množství adsorbovaném na povrchu.

$$\Gamma = \frac{-1}{mRT} \left(\frac{d\gamma}{d \ln C} \right) \quad (3)$$

kde:

m – počet adsorbujících molekul

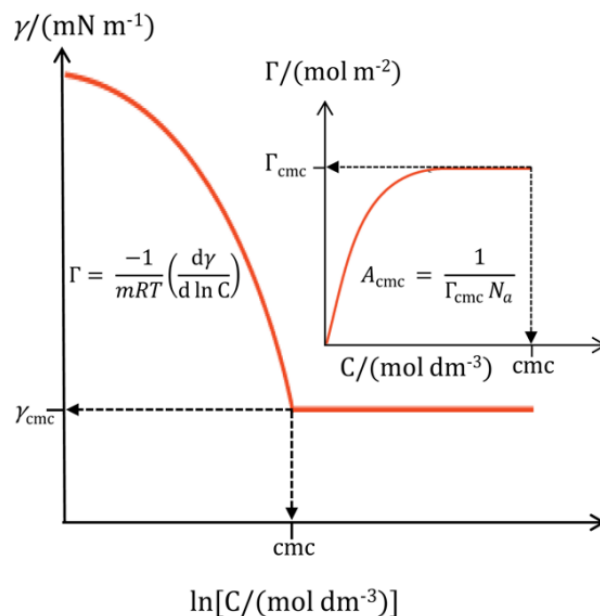
R – ideální plynová konstanta

T – termodynamická teplota

γ – povrchové napětí

C – koncentrace PAL

Na Obr. 12 je znázorněn vztah mezi povrchovým napětím a adsorpcí PAL na rozhraní, v závislosti na koncentraci. Z grafu je patrné, že v oblasti pod CMC dochází k výraznému snižování povrchového napětí, kdy se molekuly PAL adsorbují na rozhraní vzduch–voda. Tento jev je doprovázen významnou adsorpcí, která se ustaluje právě v oblasti tvorby micel, kdy je rozhraní molekulami PAL nasyceno, přičemž povrchové napětí se od tohoto momentu již výrazně nemění [59].



Obrázek 12 Závislost povrchového napětí a adsorpce na koncentraci PAL v roztoku [59]

Veličina A_{cmc} (Obr.7) udává plochu jedné molekuly PAL na rozhraní vzduch–voda při dosažení CMC (Rovnice 4) [59].

$$A_{cmc} = \frac{1}{\Gamma_{cmc} N_a} \quad (4)$$

kde:

Γ – koncentrace surfaktantu na rozhraní

N_a – Avogadrova konstanta

3.1 Hodnocení solubilizačního procesu

Proces solubilizace lze hodnotit prostřednictvím stanovení maximální solubilizační kapacity, za využití vztahu mezi rozpustností aktivní látky v roztoku micel a koncentrací povrchově aktivní látky (PAL) (5):

$$S_{tot} = S_w + kC_{surf} \quad (5)$$

kde:

C_{surf} – koncentrace surfaktantu ($C_{PAL} - CMC$)

k – molární solubilizační kapacita

Molární solubilizační kapacita udává počet molů rozpuštěné aktivní látky, které je možné solubilizovat jedním molem micelární PAL. Lze ji získat ze směrnice grafu závislosti rozpustnosti solubilizátu na koncentraci PAL nebo pomocí vztahu níže (6):

$$k = \frac{S_{tot} - S_w}{C_{surf}} \quad (6)$$

Dále je možno stanovit rozdělovací koeficient micela-voda, který je definován jako poměr množství aktivní látky ve vodě (C_w) a v micelle (C_M) (7):

$$P = \frac{C_M}{C_w} \quad (7)$$

Z termodynamického hlediska může být solubilizace považována za normální rozdělení aktivní látky mezi micelou a vodnou fází a volnou solubilizační energii (ΔG_S^0) lze pak vypočítat dle vztahu (8):

$$\Delta G_S^0 = -RT \ln P \quad (8)$$

kde:

ΔG_S^0 – volná solubilizační energie

R – univerzální plynová konstanta

T – termodynamická teplota

P – rozdělovací koeficient

Záporná hodnota ΔG_S^0 udává, že aktivní látka v monomerním stavu putuje na rozhraní voda-vzduch a jedná se o spontánní proces, který je zprostředkován hydrofobními interakcemi. Čím více je hodnota ΔG_S^0 negativní, tím snadněji dochází k solubilizaci [60], [61].

4 SOUČASNÝ STAV STUDOVANÉ PROBLEMATIKY

Rozpustnost léčiv a dalších aktivních látek ve vodě je velmi důležitá, zejména při jejich perorálním podávání, kdy po rozpuštění v gastrointestinální tekutině dochází k absorpci ze střev vede ke zlepšení jejich biologické dostupnosti. Bohužel až 80 % účinných farmaceutických látek, mezi něž patří také antioxidanty, vykazuje špatnou rozpustnost ve vodě [62].

Syntetické i rostlinné antioxidanty, které zahrnují flavonoidy, terpenoidy, alkaloidy, různé éterické oleje, se využívají k udržení redoxní homeostázy lidského těla. Tyto sloučeniny vychytávají volné radikály nebo mají schopnost chelatovat kovy, které jsou schopny generovat volné radikály. Bylo prokázáno, že při nedostatku antioxidantů v těle, a tedy při redoxní nerovnováze, dochází k častějším virovým onemocněním, či poškození tkání, na buněčné úrovni pak dochází k poškození DNA, lipidů i proteinů [63].

Problémem nejen přírodních antioxidantů je jejich hydrofobní povaha, a s tím související špatná rozpustnost ve vodě. Z těchto důvodů existuje mnoho studií zabývajících se možnostmi enkapsulace antioxidantů do různých typů nosičů, pro zlepšení jejich rozpustnosti a možnosti dodávání na určité místo působení. Mezi oblíbené flavonoidy patří také již zmíněný quercetin, jehož vlastnosti a účinky na lidské zdraví jsou v posledních letech častým tématem různých výzkumů.

Davarnejad a spol. [64] ve svém experimentu enkapsulovali quercetin do micelárního systému tvořeného Pluronicem P407 (F-127) v kombinaci s Tweenem 80, který byl využit pro možnost zvýšení obsahu aktivní látky v hydrofobním jádru a pro zlepšení propustnosti různých aktivních látek přes biologické membrány. Micelární systémy byly připraveny metodou hydratace tenkého filmu a byly charakterizovány z hlediska účinnosti enkapsulace, morfologie, velikosti částic a povrchových vlastností. Dále bylo zkoumáno uvolňování aktivní látky z micel a cytotoxická aktivita. Enkapsulace quercetinu byla prokázána pomocí FTIR spektroskopie. Pomocí metody DLS (dynamický rozptyl světla) byla stanovena velikost směsných micel na 22,1 nm a průměrná hodnota zeta potenciálu $-7,63$ mV. Dále bylo testováno kumulativní uvolňování aktivní látky do prostředí, a to ze směsných micel ve srovnání s volným quercetinu v roztoku PBS pufru. Zde byl patrný výrazný rozdíl, kde uvolňování volné aktivní látky bylo ukončeno během 12 hodin, zatímco ze směsných micel byla aktivní látka uvolňována postupně v průběhu 120 hodin, což naznačuje potenciál tohoto systému pro řízené podávání léčiva. Cytotoxicita směsi

byla testována *in vitro* na buňkách karcinomu prsu (MCF-7). Bylo prokázáno, že směsné micely s obsahem quercetinu vykazují vyšší cytotoxicitu ve srovnání s volným quercetinem, což poukazuje na možné využití systému při cíleném podávání léčiva při léčbě rakoviny prsu.

Rathod a kol. [63] se ve své studii zabývali možnostmi enkapsulace quercetinu do micelárních nanonosičů na bázi neionického α -tocopheryl polyethylen glykol 100 sukcinátu. Ačkoliv se ve struktuře quercetinu nacházejí volné hydroxylové skupiny, vykazuje tato látka hydrofobní charakter. Výzkum prokázal, že inkorporací quercetinu do micel došlo k více než 200násobnému zvýšení rozpustnosti quercetinu a také ke zlepšení jeho foto a teplotní stability. Mezi další výhody jeho solubilizace do micel byla zmíněna také ochrana před žaludečními šťávami při perorálním podávání nebo lepší penetrace do těla, aniž by došlo k narušení buněčné integrity (např. při dermálním podání). Dále autoři odkazují na možnost zlepšení farmakokinetiky pomocí micel, které by mohlo být dále dle této studie využito při dodávání protirakovinných léků a jejich kombinací s quercetinem, kterou zmiňují autoři Tiwari [65] a Zhao [66] ve svých článcích. Obecně bylo touto studií prokázáno, že různé techniky nanoformulací mohou zlepšit solubilizaci a cílené dodání quercetinu, dále dochází ke zlepšení jeho stability, permeability a dostupnosti.

Solubilizace quercetinu do micel na bázi Tetratonicu T904 (hvězdicový blokový kopolymer ethylenoxidu a propylenoxidu) byla předmětem studie autorů Tiwari a kol. [67]. Pomocí rozptylových a spektrálních technik byl sledován vliv různých faktorů, jako je teplota, koncentrace kopolymeru a iontová síla, na proces solubilizace. Bylo prokázáno, že rozpustnost quercetinu se zvyšuje přímo úměrně s velikostí micelárních agregátů. Pomocí NMR metody (spektroskopie nukleární magnetické rezonance) bylo zjištěno, že quercetin je soustředěn na okrajích hydrofobního jádra micel.

Další možností enkapsulace antioxidantů se zabývali autoři Sguizzato a kol. [2], kteří studovali gely na bázi xantanové gumy a Poloxameru 407 pro transport kyseliny gallové a ferulové enkapsulovaných v niosomech. Niosomy na bázi Spanu 20 nebo Tweenu 20, byly vyrobeny přímou hydratační metodou, kde vodnou fázi tvořil boritanový pufr nebo roztok Poloxameru 188. Bylo prokázáno, že uvolňování antioxidantů z niosomálních gelů závisí na typu interakcí mezi antioxidanty, neionickou PAL a zahušťovadlem. V případě ferulové kyseliny v přítomnosti Tweenu 20 byla *in vitro* difuze primárně ovlivněna typem vezikulárního systému, zatímco v případě kyseliny gallové hrála klíčovou roli hydrofilní

povaha zahušťovadla. Ve většině případů nebyly prokázány žádné iritační účinky připravených systémů pro topické aplikace.

Al-Samydai a kol. [68] se ve své studii zabývali enkapsulací kyseliny gallové a quercetinu do nanolipozomálních nosičů, která byla provedena metodou hydratace tenkého filmu. Nanočástice byly tvořeny HSPC:cholesterol:DSPE/PEG2000 (fosfolipidy ze sójových bobů:cholesterol:1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanolamin-*N*-[methoxy(polyethylenglykol)-2000]) v poměru 65:30:5 a koncentrace aktivní látky byla vždy 2 mg/ml. Částice byly charakterizovány pomocí Zetasizeru, morfologie částic byla analyzována prostřednictvím rastrovacího elektronového mikroskopu a enkapsulační účinnost a obsah léčiva byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Dále byla testována cytotoxicita proti rakovinným buňkám prsu (MCF-7), buňkám rakoviny plic (A549) a kolorektálnímu karcinomu (HT-29) a v neposlední řadě byla testována jejich antimikrobní aktivita. Výsledky prokázaly, že kyselina gallová vykazovala lepší enkapsulační účinnost než quercetin. Výsledky cytotoxicity prokázaly, že směsná formulace a samotný quercetin ve srovnání s jejich nanolipozomální formou nevykazovaly žádné výrazné zlepšení účinnosti proti rakovinným buňkám prsu a kolorektálnímu karcinomu, avšak u kyseliny gallové došlo po enkapsulaci k mírnému zlepšení. Naproti tomu v případě směsné formulace a kyseliny gallové došlo ke zlepšení cytotoxicity v nanolipozomální formě proti rakovinným buňkám plic. Lze tedy říci, že enkapsulaci aktivních látek do nanolipozomálních systémů je možné zvýšit nebo snížit cytotoxicitu aktivní látky v závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech této látky a typu rakovinných buněk. Nanolipozomální formy kyseliny gallové a quercetinu vykazují lepší antibakteriální účinnost proti grampozitivním bakteriím.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

- zhodnocení solubilizační kapacity směsných micelárních agregátů na bázi Pluronicu, Tweenu a fosfolipidu
- příprava nosičů na bázi amfifilních sloučenin
- enkapsulace aktivních látek do připravených nosičů
- charakterizace fyzikálně-chemických a antioxidačních vlastností
- zhodnocení vlivu inkorporace aktivních látek do kosmetické matrice

6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POSTUPY

6.1 Použité chemikálie

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lachema N.P. Brno, ČR

DPPH, Aldrich, Německo

Ethanol 96%

Extrakt z měsíčku lékařského, Nature store, ČR

Fosfatidylcholin, Millipore, Indie

Hydrogenfosforečnan disodný, Aldrich, Německo

Chlorid draselný, IPL, ČR

Krémový základ, Fagron a.s., Olomouc, ČR

Kyselina gallová, Roth

NaCl, IPL, ČR

Pluronic 123, Sigma, USA

Pluronic 407, Sigma, USA

Quercetin, Roth

Tween 80, Sigma Aldrich, USA

6.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy VWR

Bateriový pH metr CPH 51 s kombinovanou pH elektrodou HC 103

Dialyzační membrána MWCO: 12-14 kD, Spectra Por

Filtr CA 0,22 µm, Millex®GS

Laboratorní sklo (pipety, odměrné baňky, odměrné válce, kádinky, nálevky, misky)

Magnetické míchadlo Heidolph Instruments MR 1000

Mikropipety Eppendorf research plus

Odparka vakuová Hei-VAP Advantage s membránovou vývěvou bezolejovou PC20

Odstředivka Hettich, EBA 20

Reometr BROOKFIELD DV – III ULTRA se spindlem SC4-18

Spektrometr Nikolet 6700

Tenziometr EasyDyne Krüs

Ultrazvuková lázeň KAITEK K-10LE

Vortex Biosan typ V-1 plus

Zetasizer Nano series přístroj pro měření intenzity rozptylu světla

6.3 Solubilizační kapacita

6.3.1 Příprava zásobních roztoků

Pro měření bylo připraveno 25 ml roztoku každého surfaktantu, tj. Pluronic 407 (P407), Pluronic 123 (P123) nebo Tweenu 80 (T80) o koncentraci 1 mmol/l navážením daného množství s přesností na 0,0001 g vypočítané podle rovnice (8). Pro přípravu směsi PC/P407 byl připraven ještě roztok P407 o koncentraci 0,004 mmol/l a roztok fosfatidylcholinu (PC) koncentraci 0,6 mmol·l⁻¹ (každý o objemu 25 ml).

$$m = c \cdot M \cdot V \quad (9)$$

kde:

m – navažovaná hmotnost surfaktantu [g]

M – molární hmotnost surfaktantu [g · mol⁻¹]

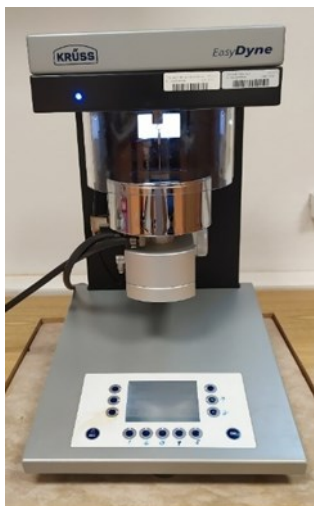
c – koncentrace roztoku [mol · l⁻¹]

V – objem roztoku [l]

Zásobní roztok směsi P407/T80, resp. P407/P123 v poměru 1:1 a výsledné koncentraci 1 mmol·l⁻¹ byl připraven smícháním 25 ml roztoku P407 o koncentraci 1 mmol·l⁻¹ a 25 ml roztoku T80 (resp. P123) o koncentraci 1 mmol·l⁻¹ do 50 ml odměrné baňky. Zásobní roztok směsi PC/P407 v poměru 10:1 a výsledné koncentraci 0,3 mmol·l⁻¹ byl připraven smícháním 25 ml roztoku P407 o koncentraci 0,004 mmol·l⁻¹ a 25 ml roztoku PC o koncentraci 0,6 mmol·l⁻¹.

6.3.2 Stanovení kritické micelární koncentrace

Kritická micelární koncentrace nosných systémů byla stanovena pomocí měření povrchového napětí. K měření byl použit tenziometr EasyDyne Krüs (Obr. 13) a metoda Wilhelmyho destičky. Připravená směs byla převedena do misky tenziometru a po ustálení hladiny a Wilhelmyho destičky bylo provedeno měření povrchového napětí při teplotě 25 ± 3 °C.



Obrázek 13 Tenziometr EasyDyne Krüs

6.3.3 Příprava pracovních roztoků směsí surfaktantů

Pracovní roztoky směsi P407/T80, P407/P123 a PC/P407 v poměru 1:1 o koncentraci od $0,01 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ do $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (od $0,015 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ do $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro směs PC/P407) byly připraveny pipetováním potřebného množství zásobního roztoku směsi do 25 ml odměrných baněk. Dané množství bylo vypočítáno pomocí zředovací rovnice (10).

$$c_1V_1 = c_2V_2 \quad (10)$$

kde:

c_1 – koncentrace zásobního roztoku [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]

V_1 – pipetovaný objem zásobního roztoku [ml]

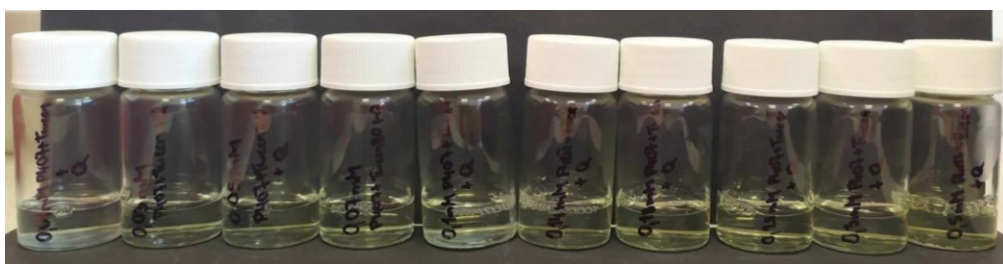
c_2 – koncentrace pracovního roztoku [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]

V_2 – objem pracovního roztoku [25 ml]

6.3.4 Sestrojení kalibračních křivek

Za účelem stanovení solubilizovaného množství bylo nutno provést kalibraci pro dané aktivní látky. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky aktivních látek o koncentraci

1 mmol·l⁻¹ ve směsi ethanol:voda v poměru 1:1. Ze zásobního roztoku byly dále připraveny kalibrační roztoky v koncentračním rozmezí od 0,01 mmol·l⁻¹ do 0,5 mmol·l⁻¹ (Obr. 14). Připravené vzorky byly měřeny na UV-VIS spektrofotometru při dané vlnové délce (286 nm kyselina gallová (GA), 375 nm quercetin (Q), 420 nm extrakt z měsíčku (M)) a z výsledných hodnot absorbance byla stanovena kalibrační přímka.

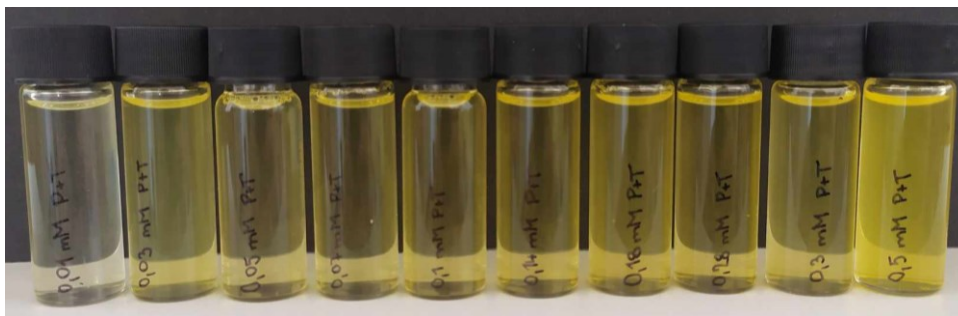


Obrázek 14 Kalibrační roztoky quercetinu

6.3.5 Solubilizace aktivních látek do směsných micel

Do zkušavky bylo naváženo cca 0,05 g (kyselina gallová, extrakt z měsíčku), resp. 0,01 g (quercetin) aktivní látky. K aktivní látce bylo přidáno 5 ml pracovního roztoku směsi P407/T80, P407/P123, resp. PC/P407 o koncentracích od 0,01 mmol·l⁻¹ do 1 mmol·l⁻¹, resp. od 0,015 mmol·l⁻¹ do 3 mmol·l⁻¹ pro směs PC/P407 připravené v kapitole 6.3.3. Tyto vzorky byly zhomogenizovány na vortexu (2 min) a umístěny na třepačku po dobu 24 hodin při 150 rpm. Po uplynutí této doby byly vzorky odstředěny na odstředivce při 6000 rpm po dobu 10 min. Následně byl supernatant odebrán do vialek (Obr. 15 a 16) a na UV-VIS spektrofotometru byla měřena absorbance při specifické vlnové délce pro jednotlivé aktivní látky. Pomocí kalibračních přímků byla vypočítána koncentrace solubilizované aktivní látky a z výsledných hodnot koncentrací aktivních látek vs. koncentrací surfaktantů byly sestrojeny solubilizační křivky, ze směrnic jednotlivých křivek byly získány hodnoty solubilizačních kapacit S pro jednotlivé systémy.

Solubilizace byly prováděny ve třech různých prostředích – při laboratorní teplotě (25 ± 2 °C), v inkubátoru při 37 °C a v prostředí 1 M NaCl.



Obrázek 15 Solubilizační řada P407/T80 s měsíčkem



Obrázek 16 Solubilizační řada P407/P123 s quercetinem

6.4 Enkapsulace antioxidantů do vybraných nosičů

6.4.1 Příprava nosičů

Směsné micelární systémy byly připraveny vždy v daném poměru jednotlivých komponent navážením příslušného množství (Tab. 1), přidáním 20 ml destilované vody a následným rozpuštěním (míchání na magnetickém míchadle po dobu 30 minut při laboratorní teplotě).

V případě směsí s aktivními látkami bylo postupováno obdobně, s tím rozdílem, že k naváženým surfaktantům bylo přidáno dané množství aktivní látky. Dále bylo přidáno 20 ml ethanolu a směs byla homogenizována na magnetickém míchadle po dobu minimálně 30 minut do kompletního rozpuštění. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce při 40 °C a 50 rpm (Obr. 17). Po odpaření rozpouštědla došlo k vytvoření tenkého filmu na dně odpařovací baňky (Obr. 18) a vzorky byly ponechány ve tmě po dobu 24 hodin. Po této době bylo ke vzorkům přidáno 10 ml destilované vody, baňka byla vložena do kádinky s vodou, která byla umístěna do ultrazvukové lázně na dobu minimálně 30 minut. Takto připravené vzorky byly přelity do vialek a uchovány v lednici pro další testování.



Obrázek 17 Odparka Heidolph se zpětným chladičem a se vzorkem



Obrázek 18 Vzorek směsi P407/T80/M při přípravě metodou tenkého filmu

Tabulka 1 Složení jednotlivých nosičů

Nosný systém	Množství aktivní látky % hm.		
	Quercetin (Q)	Kyselina gallová (GA)	Extrakt z měsíčku (M)
133 mg P407 + 67 mg P123	0,05	0,5	0,5
100 mg P407 + 100 mg Tween 80	0,05	0,5	0,5
100 mg PC + 10 mg P407	0,05	0,5	0,5

6.4.2 Měření zeta potenciálu

Zeta potenciál byl měřen při teplotě 25 ± 2 °C na přístroji Zetasizer Nano series (Obr. 19). Do kyvety bylo napipetováno 6 µl vzorku a 3 ml dvakrát filtrované destilované vody, která byla připravena pomocí stříkačkového filtru VWR o velikosti pórů 0,2 µl. Výsledné hodnoty byly průměrem ze tří měření.

6.4.3 Měření velikosti částic

Velikost částic byla měřena při teplotě 25 ± 2 °C na přístroji Zetasizer Nano series. Do kyvety bylo napipetováno 0,5 ml vzorku, ke kterému byly přidány 3 ml dvakrát filtrované destilované vody, která byla připravena stejně jako v případě měření zeta potenciálu. Výsledné hodnoty byly průměrem ze tří měření.



Obrázek 19 Zetasizer Nano series

6.4.4 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita připravených systémů byla stanovena metodou DPPH pomocí UV-VIS spektrofotometru. Do vialek bylo napipetováno 200 µl vzorku, ke kterému byly přidány 2 ml 0,1 mM roztoku DPPH v 96% ethanolu. Takto připravený vzorek byl inkubován ve tmě při 25 °C po dobu 30 minut. Následně byla stanovena absorbance vzorků pomocí UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 517 nm. Jelikož byl pro stanovení použit 0,1 mM roztok DPPH v ethanolu, jako reference byl použit 96% ethanol. Antioxidační aktivita byla stanovena jako úbytek absorbance v %, barevná změna je patrná na Obr. 20, vztah pro výpočet je uveden níže (11):

$$AA = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{DPPH}}} \cdot 100 [\%] \quad (11)$$

kde:

AA – antioxidační aktivita [%]

A_{DPPH} – absorbance 0,1 mM DPPH

A_{vzorek} – absorbance testovaného vzorku



Obrázek 20 Vzorky při stanovení antioxidační aktivity

6.4.5 Stanovení enkapsulační účinnosti

Pro stanovení enkapsulační účinnosti daných systémů byly použity speciální zkumavky s filtrem, do kterých byly napipetovány 2 ml vzorku a 2 ml vodného ethanolického roztoku v poměru 1:1. Zkumavky se vzorky byly vloženy do odstředivky na 10 minut při 5000 rpm. Ze zkumavky byly následně odebrány 2 ml supernatantu a na spektrofotometru byla měřena absorbance při dané vlnové délce. Z hodnot absorbance byla vypočítána enkapsulační účinnost dle vztahu (12). Výsledky jsou průměrem ze dvou měření.

$$EE = \left(1 - \frac{AL_{volná}}{AL_{původní}}\right) \cdot 100 \text{ [%]} \quad (12)$$

kde:

EE – množství enkapsulované aktivní látky [%]

$AL_{volná}$ – koncentrace aktivní látky po odstředění [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]

$AL_{původní}$ – původní koncentrace aktivní látky [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]

6.4.6 Kinetika uvolňování antioxidantů z nosičů

Ze vzorků připravených v bodě 6.4.1 bylo vždy odebráno 5 ml a převedeno do dialyzačních membrán (12–14 kD), které byly následně vloženy do uzavíratelných lahví (Obr. 21), do kterých bylo vloženo míchadlo a přidáno 25 ml PBS pufru (pH 7,3) s obsahem 0,5% hm. T80 pro lepší rozpustnost, složení pufru je uvedeno v Tab. 2. Směsi byly uchovávány ve tmě a míchány při 300 rpm a laboratorní teplotě. V určitých časových intervalech (1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 120, 144, 168, 192 a 216 hod od přípravy) byly

odebírány 2 ml roztoku PBS s uvolněnou aktivní látkou do mikrozkuvek Eppendorf a do lahví se vzorky byly přidány 2 ml čerstvého PBS pufru. U vzorků uchovaných v mikrozkuvkách byla měřena absorbance pomocí UV-VIS spektrofotometru, při vlnových délkách stanovených při přeměření absorpčního spektra aktivní látky v prostředí PBS (284 nm pro GA, 378 nm pro Q, 420 nm pro M).

Z jednotlivých absorbancí byla vypočítána pomocí kalibrační rovnice koncentrace uvolněné aktivní látky v prostředí a výsledná hodnota byla přepočtena na kumulativní množství v %. Výsledné množství uvolněné aktivní látky bylo vyneseno jako závislost na čase. Release test byl u všech vzorků proveden 2×.

Release test byl vyhodnocen pomocí kinetiky prvního řádu (Rovnice 13) a pomocí regrese zpracované metodou nejmenších čtverců. Pro výpočet byl použit podprogram Řešitel v programu Microsoft Excel 365 [69].

$$c_{REL} = c_{MAX} \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (13)$$

kde:

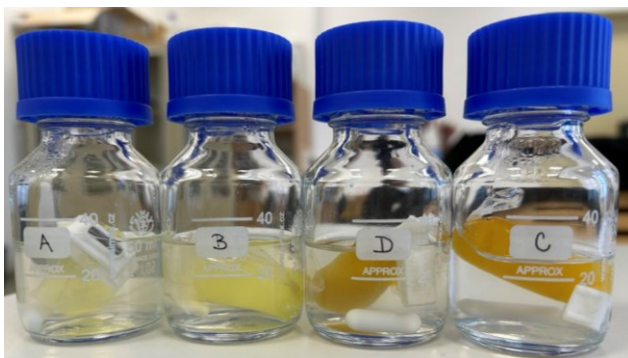
c_{REL} – koncentrace aktivní látky, která byla uvolněna v čase t

c_{MAX} – teoretická maximální koncentrace aktivní látky

k – rychlostní konstanta (čas potřebný k dosažení c_{MAX})

Tabulka 2 Složení fosfátového pufru

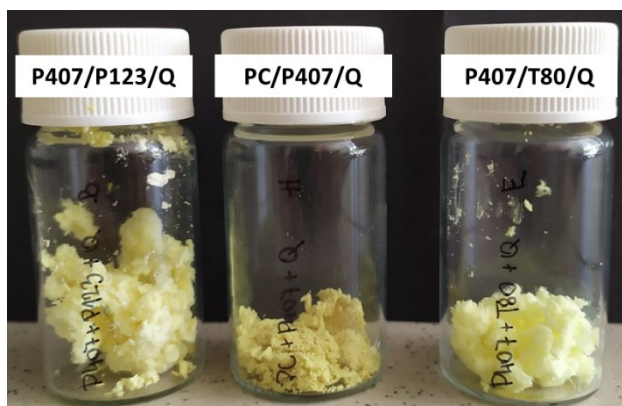
	molekulová hmotnost [g·mol⁻¹]	navážka [g]	koncentrace [mol·l⁻¹]
Chlorid sodný	58,44	8,00	0,1370
Chlorid draselný	74,55	0,20	0,0027
Hydrogenfosforečnan disodný	141,96	1,44	0,0100
Dihydrogen fosforečnan draselný	136,09	0,245	0,0018



Obrázek 21 Vzorky pro test uvolňování antioxidantních látek

6.4.7 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) byla provedena na zařízení Mettler Toledo DSC 700/1 (USA). Teplotní rozsah byl $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $+300\text{ }^{\circ}\text{C}$, rychlost ohřevu byla $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ při atmosféře N_2 . Pro tento experiment byly použity lyofilizované vzorky (Obr. 22), jejich navážky byly přibližně 5 mg. Výsledky byly vyhodnoceny od prvního zahřívacího cyklu vzorků.



Obrázek 22 Vzorky systémů s quercetinem po lyofilizaci

6.5 Příprava krémových formulací s obsahem aktivních látek

Pro přípravu krémových formulací byl použit již připravený krémový základ od dodavatele Fagron a.s. (složení dle INCI: *Paraffinum liquidum*, *Paraffinum solidum*, *Alcohol cetylstearylicus*, *Slovasol*, *Carbomerum*, *Trolaminum*, *Methylparabenum*, *Propylparabenum*, *Propylenglycolum*, *Aqua purificata*), kterého bylo naváženo přibližně 20 g do vialky, dále bylo přidáno 0,5 ml vzorku fosfatidylcholinu a P407 s aktivní látkou připravených v bodě 6.4.1 a směs byla důkladně promíchána.

6.5.1 Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity krémových formulací byla použita, stejně jako v případě charakterizace samotných nosičů, metoda DPPH. Do vialek bylo naváženo přibližně 0,5 g dané formulace, ke které byly přidány 2 ml 0,1 mM roztoku DPPH v ethanolu. Pro odebrání roztoku z vialky byla použita stříkačka s nasazovací injekční jehlou, aby bylo zabráněno zachycení krému a do kyvety byl roztok převeden pomocí stříkačky a filtru VWR o velikosti pórů 0,2 μ l. Následně byla u vzorků měřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 517 nm.

6.5.2 Stabilita krémových formulací

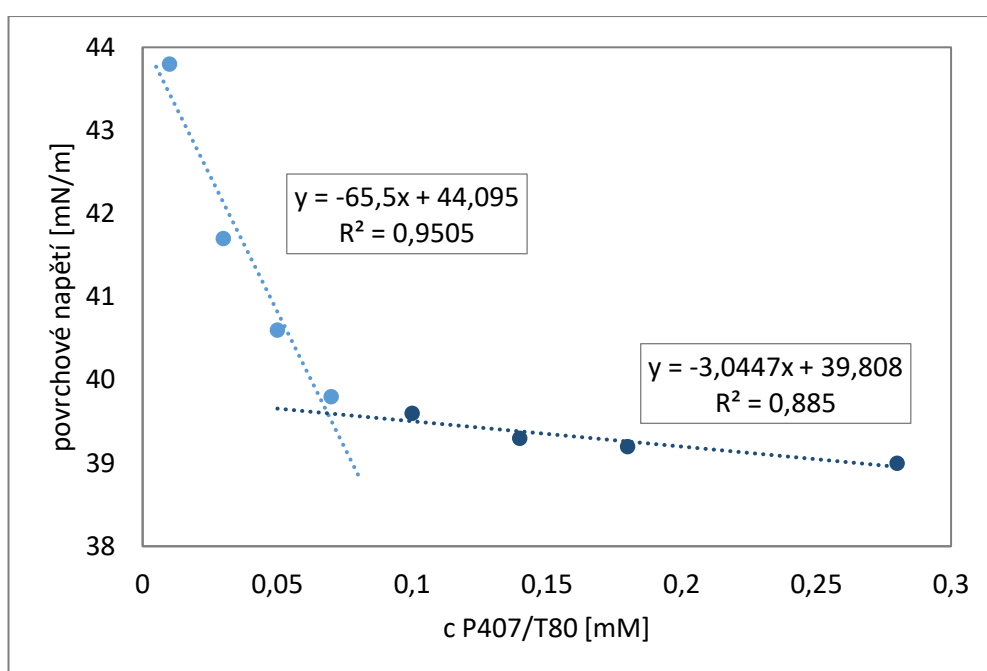
Na stanovených formulacích byla měřena viskozita ihned po přípravě a po 4 týdnech od přípravy. Pro stanovení byl použit viskozimetr Brookfield DV-III Ultra se spindlem LV4, čas měření byl 2 minuty a hodnota viskozity byla měřena každých 10 sekund při 2 rpm. Výsledné hodnoty viskozity jsou potom stanoveny jako průměr z 11 hodnot.

Polovina vzorků byla během této doby ponechána při laboratorní teplotě ve tmě, druhá polovina vzorků byla uložena v inkubátoru při teplotě 45 °C. Na vzorcích byla také hodnocena změna barvy ihned po přípravě a po 4 týdnech od přípravy.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Micelární parametry nosných systémů

Je známo, že pro většinu praktických aplikací surfaktantů, tedy i pro procesy solubilizace a enkapsulace, hraje klíčovou roli jejich kritická micelární koncentrace (CMC). Hodnota CMC byla stanovena pomocí měření povrchového napětí metodou Wilhelmyho destičky. Získané hodnoty povrchového napětí byly následně vyneseny do grafu jako závislost na koncentraci daného systému. Hodnoty CMC byly vyhodnoceny z průsečíků směrnic jednotlivých částí grafů. Vzorový graf pro výpočet hodnoty CMC je uveden na Obr. 23.



Obrázek 23 Závislost povrchového napětí na koncentraci směsi P407/T80

Vzorový výpočet CMC z průsečíků směrnic je znázorněn vztahem uvedeným níže (14).

$$-65,5x + 44,095 = -3,0447x + 39,808$$

$$44,095 - 39,808 = -3,0447x + 65,5x$$

$$x = 0,068 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \quad (14)$$

V Tab. 3 jsou uvedeny hodnoty kritické micelární koncentrace (CMC), minimálního povrchového napětí γ_{min} , Gibbsovy micelizační energie ΔG_m , koncentrace surfaktantů na rozhraní Γ a hodnota plochy připadající na jednu molekulu surfaktantu, nesoucí označení a .

Tabulka 3 Micelární parametry nosných systémů

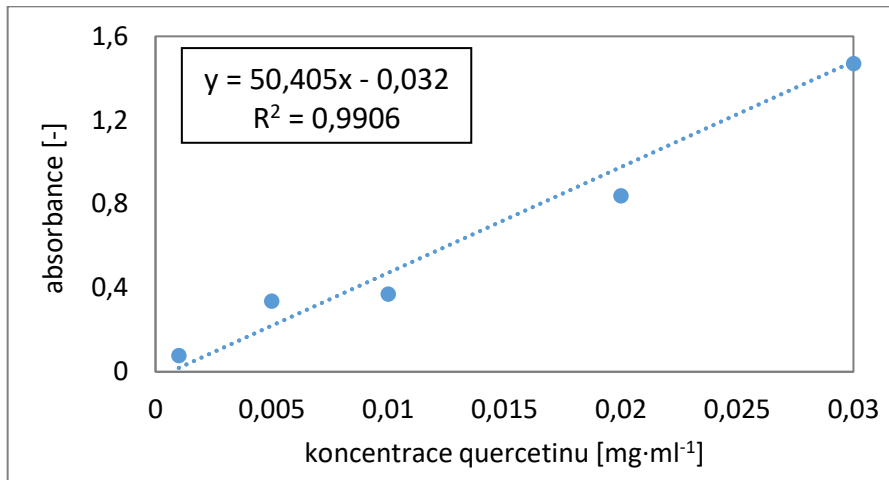
vzorek	CMC [mmol·l ⁻¹]	ΔG _m [kJ·mol ⁻¹]	Γ [·10 ⁻⁵ mol·m ⁻²]	a [nm ²]	γ _{min} [mN·m ⁻¹]
P407/P123	0,01	-28,1	22,9	0,73	33,9
P407/T80	0,07	-23,7	2,6	6,28	37,8
PC/P407	0,29	-20,2	3,6	4,65	38,0

Jak je patrné z Tab. 3, nejnižší hodnotu CMC vykazoval systém P407/P123, a to 0,01 mmol·l⁻¹, stejně tak zde byla naměřena nejnižší hodnota povrchového napětí (33,9 mN·m⁻¹). Gibbsova micelizační energie patří mezi důležité parametry sloužící pro hodnocení termodynamiky micelizačního procesu. Čím zápornějších hodnot dosahuje, tím snadněji dochází k tvorbě micel. Nejnižší hodnota ΔG_m, a to -28,1 kJ·mol⁻¹, byla opět získána u systému na bázi dvou poloxamerů. Zároveň zde byla zaznamenána největší adsorpce na rozhraní Γ a nejmenší plocha, kterou zaujímal jedna molekula surfaktantu, což indikuje těsnější uspořádání povrchově aktivních molekul v micelárních agregátu. Směsný systém P407/P123 byl studován také autory Jindal a kol. [70], kteří hodnotili micelizační parametry pomocí fluorescenční spektrofotometrie, které byly v porovnání s našimi výsledky nižší, a to jak v případě Gibbsovy micelizační energie (-39,55 kJ·mol⁻¹), tak kritické micelární koncentrace (která činila okolo 0,006 %hm. v porovnání s námi získanou přepočítanou CMC 0,011 %hm.). Ve studii [71] Čirin byla stanovena hodnota CMC pro Pluronic P407 na 0,049 mmol·l⁻¹, pokud se podíváme na námi stanovené hodnoty CMC u jednotlivých směsí, je zde patrné, že v případě směsi dvou Pluroniců došlo k synergickému efektu, čímž došlo ke snížení CMC na 0,01 mmol·l⁻¹. V případě systému P407/T80 však nebyl tento trend potvrzen.

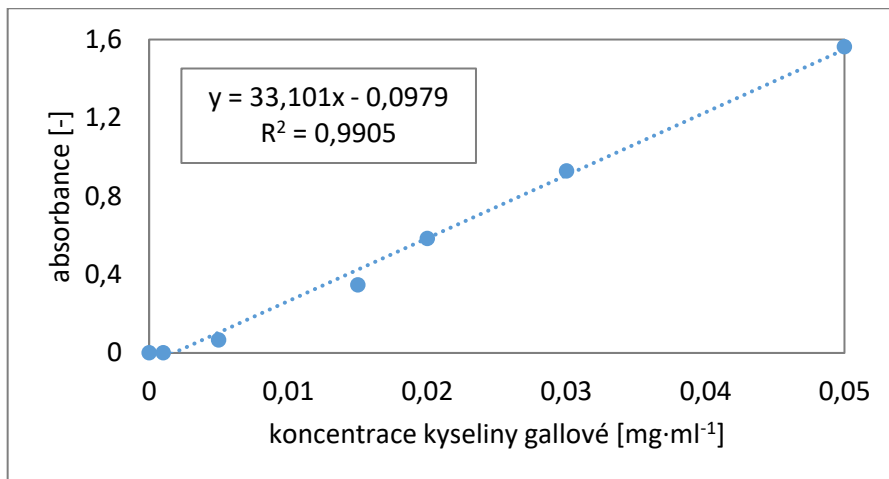
7.2 Solubilizační kapacita

Solubilizační kapacita testovaných směsných systémů byla hodnocena pomocí UV-VIS spektroskopie. Proměřením absorpčního spektra dané látky byla stanovena vhodná vlnová délka při nejvyšší naměřené absorbanci (286 nm pro kyselinu gallovou, 375 nm pro quercetin a 420 nm pro extrakt z měsíčku lékařského). Dále byla provedena kalibrace na každou aktivní látku, a to ve vodném roztoku ethanolu v poměru 1:1 pro quercetin a kyselinu gallovou, a v roztoku ethanolu pro měsíček. Pomocí rovnic kalibračních přímek (viz Obr. 24–26) byly následně vypočítány koncentrace aktivních látek.

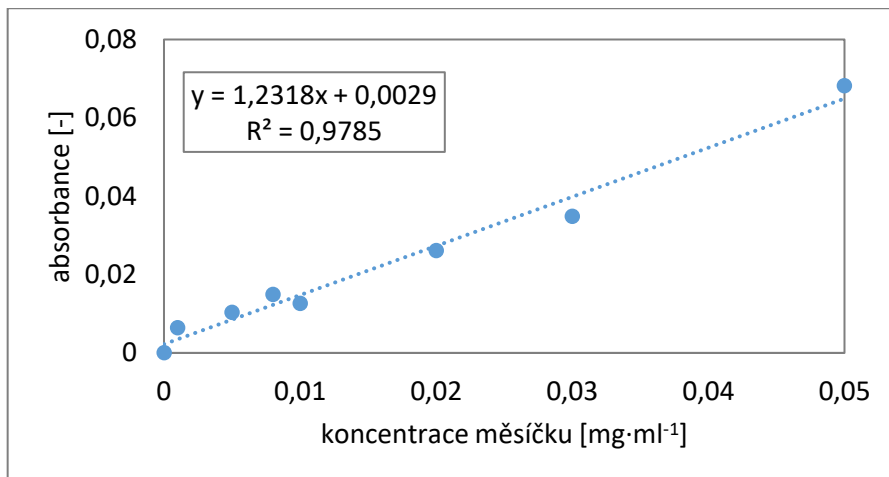
Solubilizace byla prováděna při laboratorní teplotě ($25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$), při $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ a při laboratorní teplotě v prostředí NaCl (iontová síla $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).



Obrázek 24 Kalibrační přímka pro quercetin



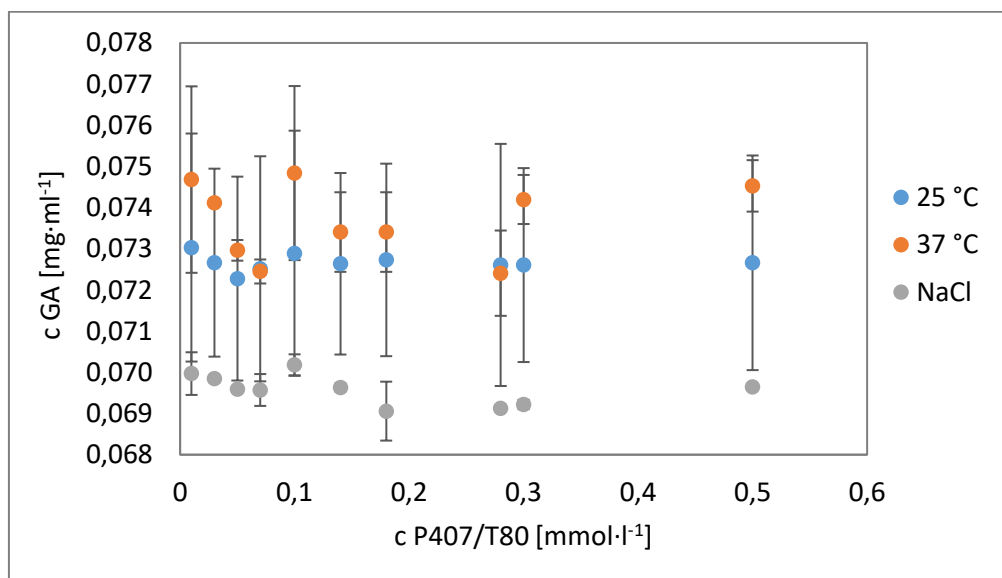
Obrázek 25 Kalibrační přímka pro kyselinu gallovou



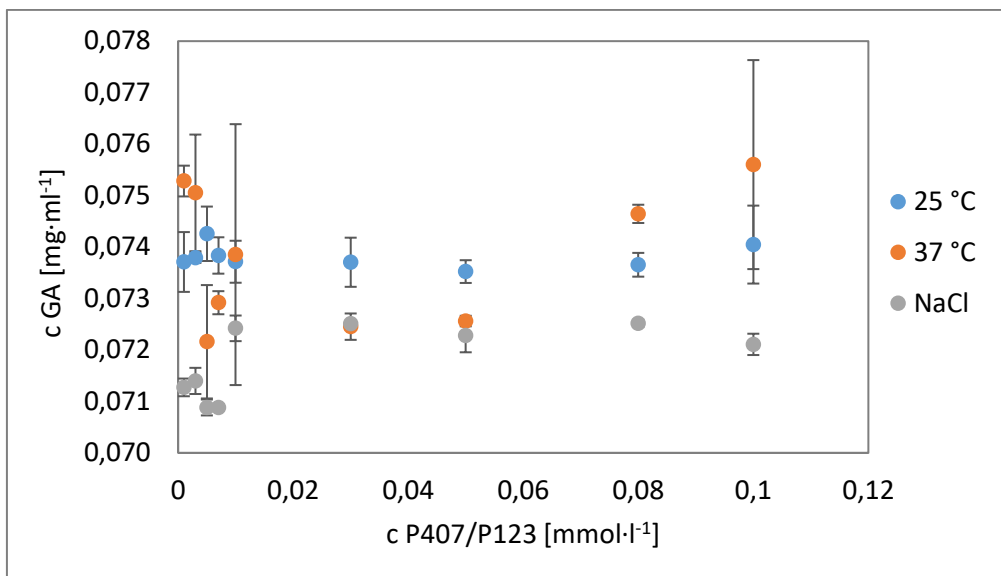
Obrázek 26 Kalibrační přímka pro extrakt měsíčku

Dle teorie lze očekávat, že solubilizační křivka bude od oblasti CMC narůstat, a to z toho důvodu, že v přítomnosti micelárních agregátů se bude solubilizace aktivních látek díky micelám významně usnadňovat. Na Obr. 27 a 28 jsou znázorněny solubilizační křivky směsných systémů na bázi P407/T80 a P407/P123 s obsahem kyseliny gallové. Jak je vidět, hodnoty kolísají ve velmi malém rozmezí (od cca 0,070 do 0,075 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a není zde patrný žádný významnější nárůst ani v oblasti nad CMC. Přestože neionické tenzidy vykazují silnou teplotní citlivost, nebyly u našich vzorků prokázány výrazné rozdíly v solubilizačních křivkách měřených při laboratorní a zvýšené teplotě.

Vzhledem k tomu, že kyselina gallová je obecně lépe rozpustná ve vodě než zbylé dvě testované aktivní látky (tj. quercetin a měsíček), lze předpokládat, že přítomnost micelárních agregátů měla v tomto případě zanedbatelný význam. Přítomnost kyseliny gallové však byla v připravených systémech prokázána díky zvýšené antioxidační aktivitě a testům enkapsulační účinnosti.

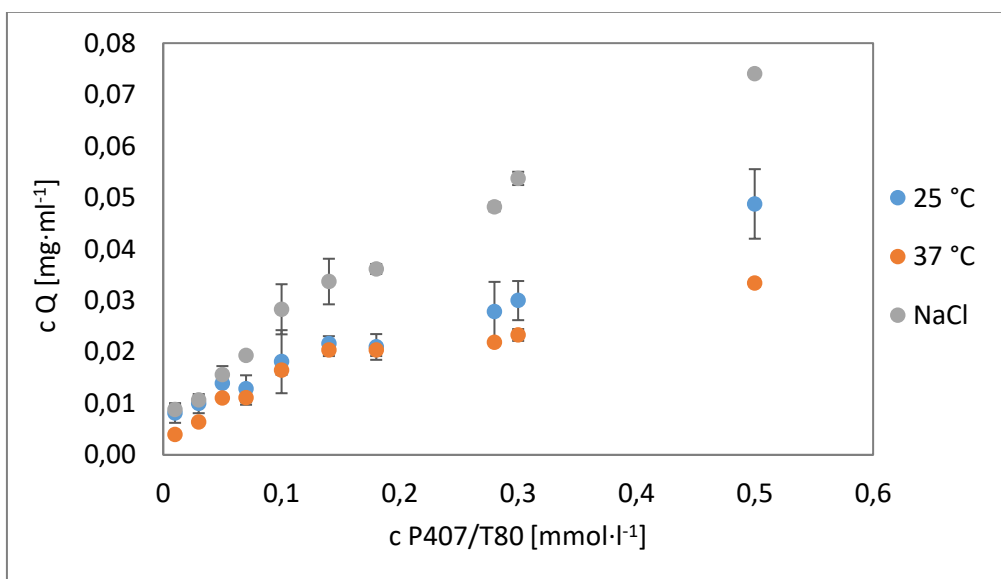


Obrázek 27 Solubilizační křivky GA v roztoku P407/T80

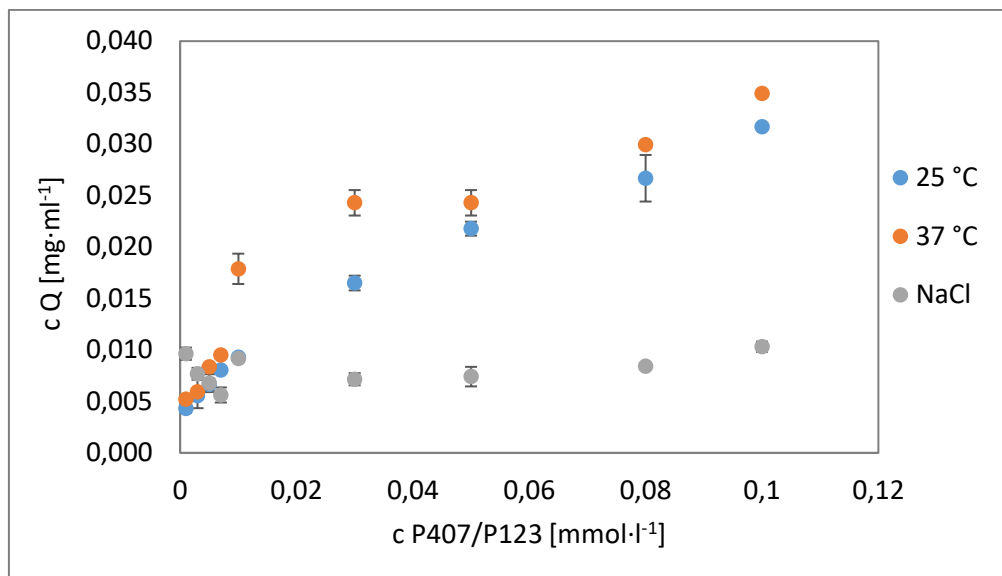


Obrázek 28 Solubilizační křivky GA v roztoku P407/P123

Solubilizační křivky směsí P407/T80 a P407/P123 s obsahem quercetinu jsou znázorněny na Obr. 29 a 30. U obou křivek je již patrný rostoucí trend, s výraznějším zvýšením nad hodnotami CMC (tj. $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro P407/P123 a $0,07 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro P407/T80). Opět zde nebyl prokázán významnější vliv teploty na solubilizační kapacitu. Na druhou stranu se projevil vliv iontové síly, ovšem zatímco v případě systému P407/T80 došlo k podpoření solubilizace, u vzorku P407/P123 byly naopak získány nejnižší hodnoty solubilizovaného quercetinu. Tato skutečnost by opět mohla být přisouzena umístění quercetinu v jednotlivých směsných micelárních agregátech, jak je zmíněno ve studii [72].



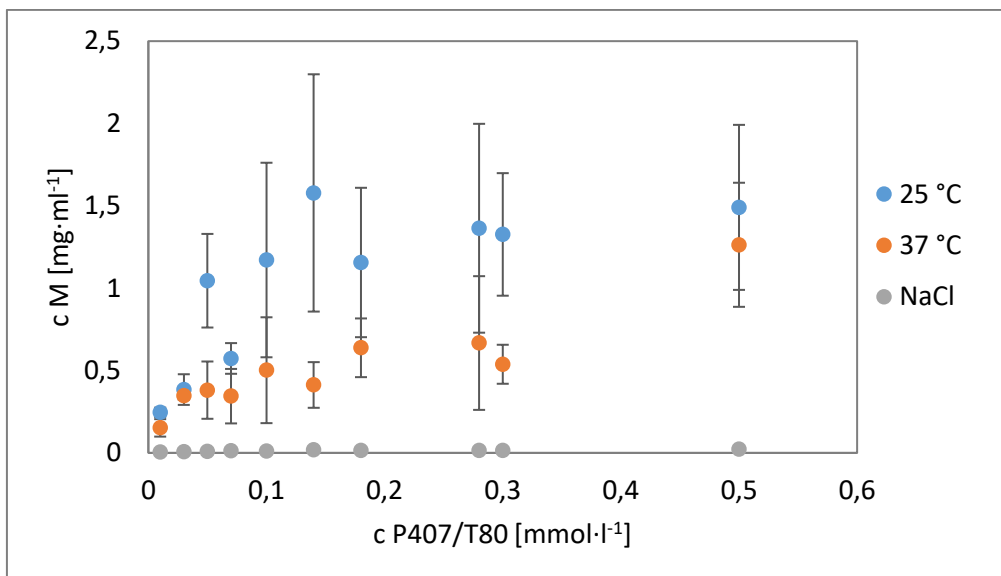
Obrázek 29 Solubilizační křivky Q v roztoku P407/T80



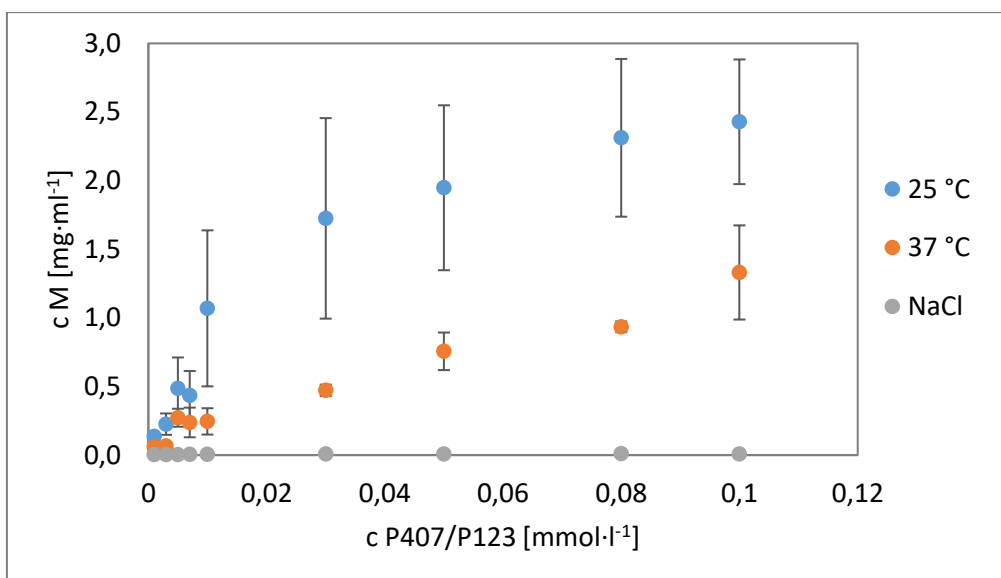
Obrázek 30 Solubilizační křivky Q v roztoku P407/P123

Solubilizační křivky pro extrakt z měsíčku lékařského v jednotlivých roztocích jsou patrné na Obr. 31–32. Nejvyšší množství bylo enkapsulováno při laboratorní teplotě u systému P407/P123 (2,43 mg·ml⁻¹). Zvýšení teploty na 37 °C vedlo ke snížení solubilizační kapacity obou směsných micelárních systémů. V přítomnosti NaCl došlo k výraznému snížení detekovaného solubilizovaného množství měsíčku, a to na 0,004–0,02 mg·ml⁻¹.

Z výsledků je zřejmé, že téměř ve všech případech došlo v prostředí zvýšené iontové síly k omezení solubilizační schopnosti, což může být způsobeno umístěním aktivní látky v micelárních systémech. Ve studii [72] Seedher a kol. zmiňují, že pokud se aktivní látka nachází ve vnější části micel, přítomnost solí, tj. prostředí zvýšené iontové síly, významně omezilo rozpustnost aktivní látky. Díky rozpustnosti v prostředí NaCl lze tak odhadnout umístění aktivní látky v micely.

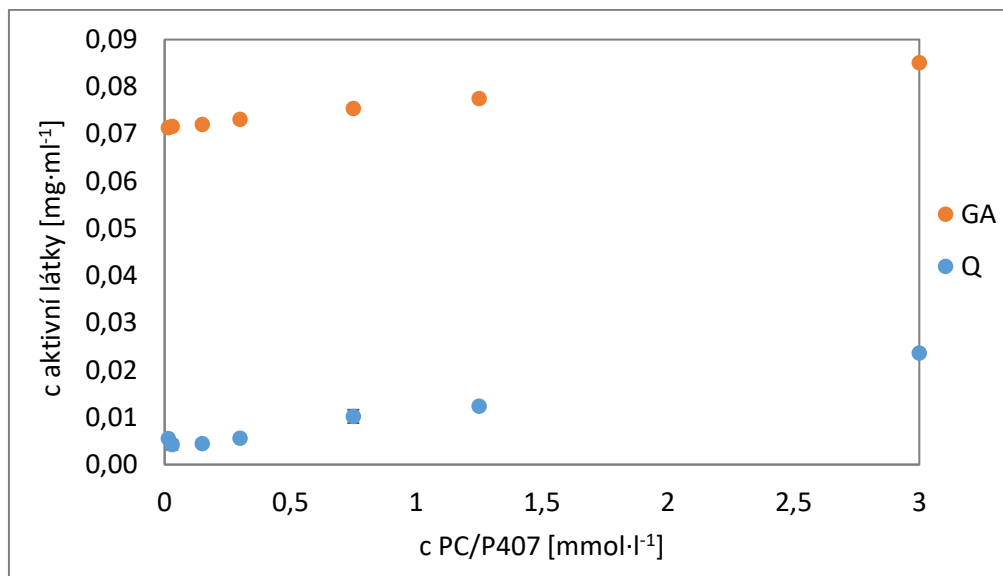


Obrázek 31 Solubilizační křivky M v roztoku P407/T80



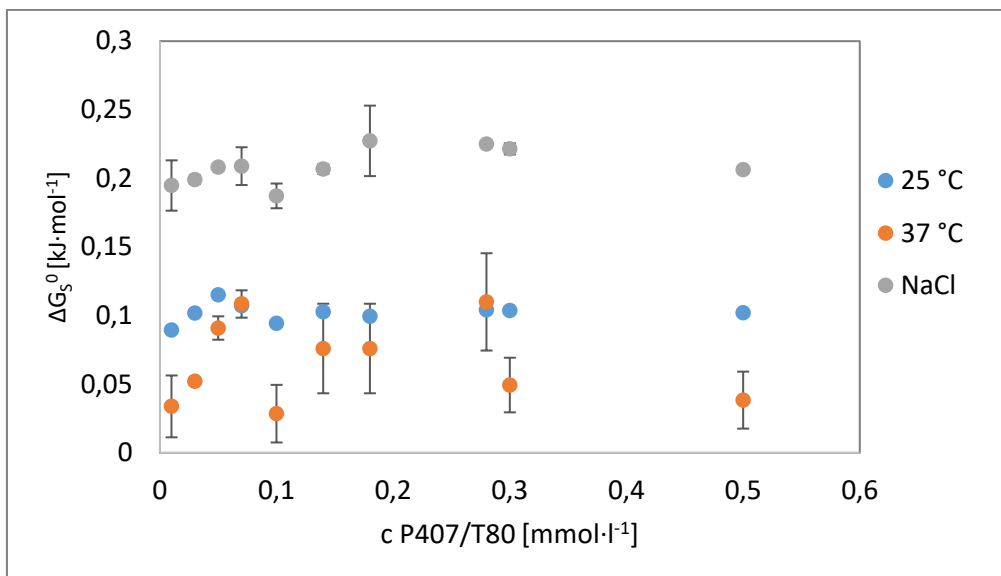
Obrázek 32 Solubilizační křivky M v roztoku P407/P123

Na Obr. 33 jsou znázorněny solubilizační křivky quercetinu a kyseliny gallové v roztoku PC/P407. U obou křivek je patrný mírně rostoucí trend se zvyšující se koncentrací roztoku a při porovnání obou aktivních látek je vidět, že k solubilizaci většího množství došlo v případě kyseliny gallové. Pro měsíček lékařský nebylo testování provedeno z důvodu náročnosti přípravy vzorků.

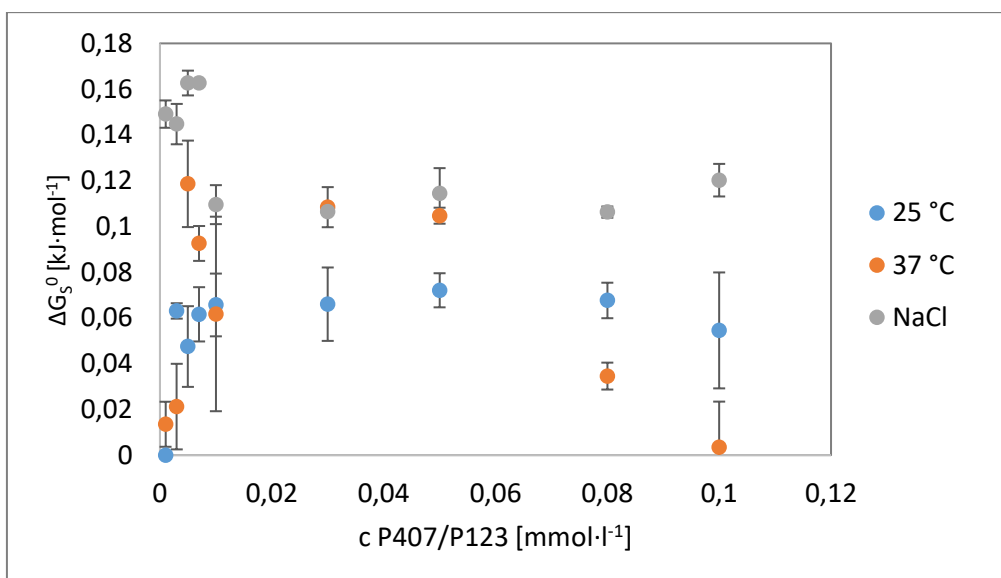


Obrázek 33 Solubilizační křivky Q a GA v roztoku PC/P407

Na Obr. 34–39 jsou znázorněny závislosti Gibbsovy volné solubilizační energie (ΔG_s^0) vypočítané dle Rovnice 8 na koncentraci směsi surfaktantů při obou testovaných teplotách a také v prostředí NaCl a na Obr. 40 potom závislost ΔG_s^0 na koncentraci PC/P407 při laboratorní teplotě. ΔG_s^0 vyjadřuje energii přenosu 1 molu aktivní látky do micelární fáze. Záporné hodnoty ΔG_s^0 dokládají, že solubilizace aktivní látky do micely je spontánní proces, zatímco kladné hodnoty mohou poukazovat na omezenou schopnost daného surfaktantu tvořit micely. Lze předpokládat, že kladných hodnot může být dosaženo i v případě, že potenciální solubilizát vykazuje dobrou rozpustnost v daném prostředí, tudíž má solubilizace takové látky do micel menší význam. Tento jev se prokázal v případě experimentů s kyselinou gallovou. Z grafů na Obr. 34 a 35 zobrazujících výsledky solubilizace v systémech neionických surfaktantů P407/P123, resp. P407/T80 je patrné, že ΔG_s^0 se pohybuje v mírně kladných hodnotách, a to v celém rozsahu sledovaných koncentrací a při všech testovaných podmínkách. Ve studii [73] Singla a kol. získali kladné hodnoty solubilizační energie v případě micel na bázi Pluronicu F68 při 37 a 45 °C, což by mohlo být způsobeno právě neschopností tohoto surfaktantu tvořit micely při dané teplotě a koncentraci.

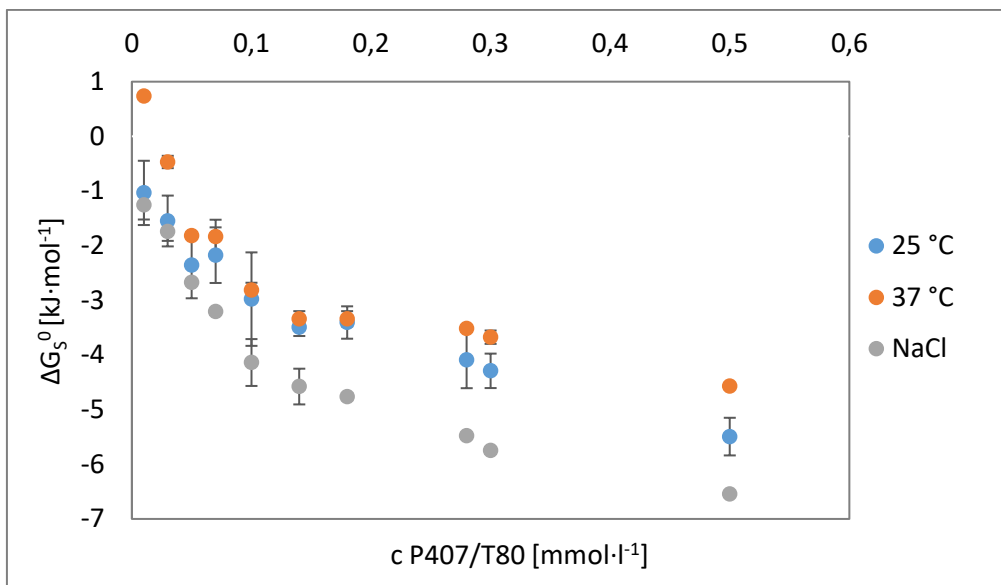


Obrázek 34 Gibbsova volná energie solubilizace GA v systému P407/T80

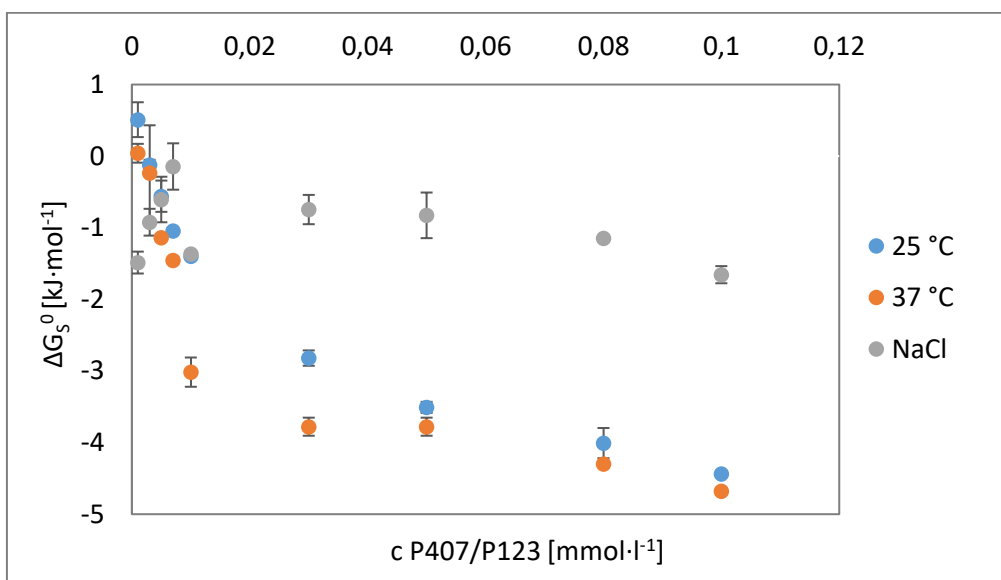


Obrázek 35 Gibbsova volná energie solubilizace GA v systému P407/P123

Na Obr. 36 a 37 jsou znázorněny ΔG_s^0 v závislosti na koncentraci směsi P407/P123 při solubilizaci Q. Zde, na rozdíl od systémů obsahujících GA, bylo dosaženo záporných hodnot, které postupně klesaly s rostoucí koncentrací směsi surfaktantů. Nejméně spontánní byl proces prokázán v prostředí NaCl u systému P407/P123, což je v souladu s Obr. 30. Na druhou stranu, vliv iontové síly měl příznivý vliv na solubilizaci quercetinu do systému P407/T80, kdy hodnoty ΔG_s^0 dosahovaly nejnižších hodnot.

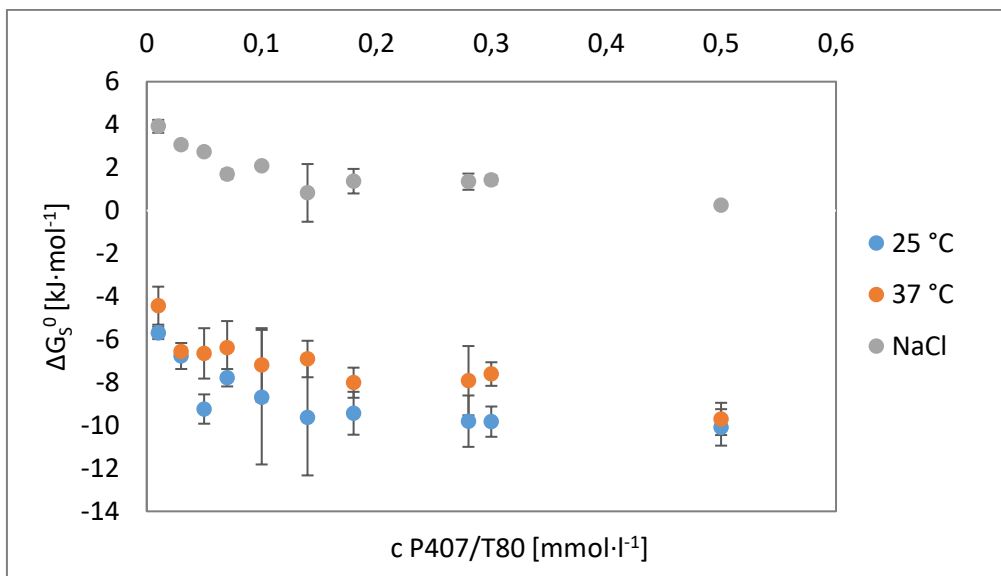


Obrázek 36 Gibbsova volná energie solubilizace Q v systému P407/T80

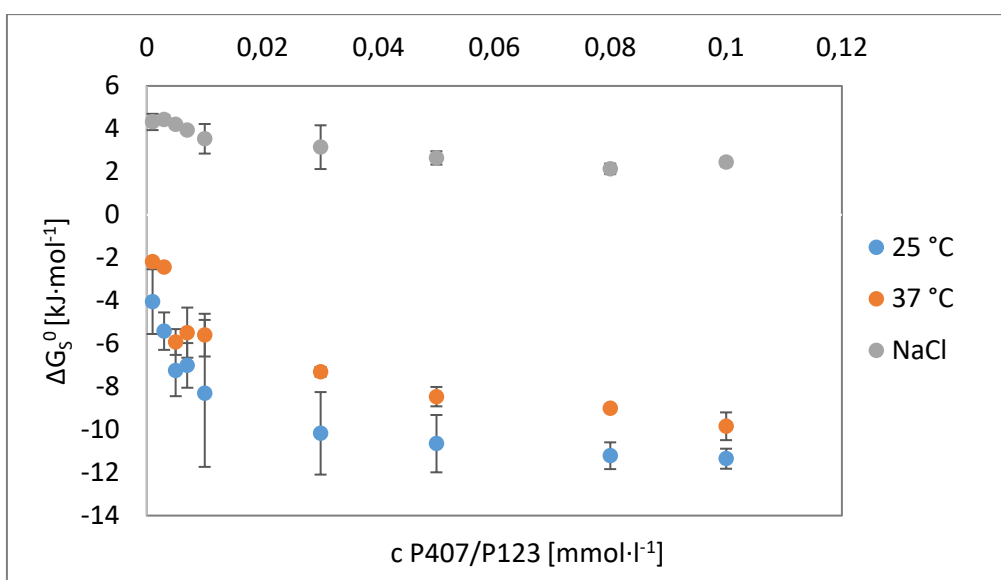


Obrázek 37 Gibbsova volná energie solubilizace Q v systému P407/P123

V případě systémů s obsahem měsíčku (Obr. 38 a 39) byla potvrzena skutečnost, že proces solubilizace probíhal spontánně ve vodném prostředí při laboratorní i zvýšené teplotě, zatímco v prostředí NaCl byl výrazně omezený.

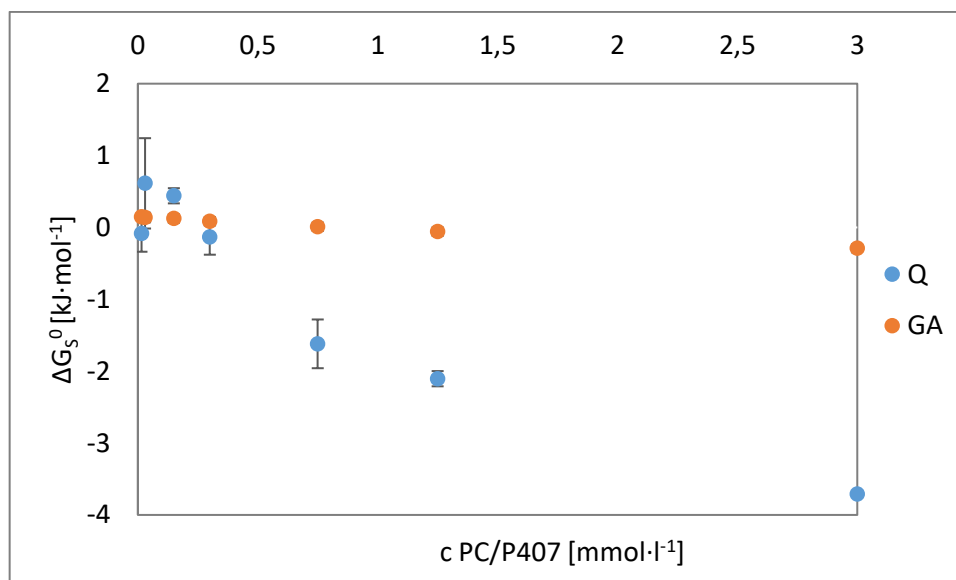


Obrázek 38 Gibbsova volná energie solubilizace M v systému P407/T80



Obrázek 39 Gibbsova volná energie solubilizace M v systému P407/P123

V případě systému PC/P407 s quercetinem a kyselinou gallovou je z Obr. 40 patrné, že se hodnoty ΔG_s^0 v případě GA pohybovaly okolo nulové hodnoty, zatímco v případě Q nebyl proces solubilizace spontánní, avšak při zvyšující se koncentraci PC/P407 došlo ke snížení hodnot ΔG_s^0 a solubilizace tak probíhala samovolně.



Obrázek 40 Gibbsova volná energie solubilizace GA a Q v systému PC/P407

V Tab. 4 jsou shrnuty solubilizační kapacity (S) pro jednotlivé nosiče při laboratorní teplotě (25 °C), při 37 °C a v prostředí NaCl. Co se týká hodnot získaných při laboratorní teplotě, nejvyšší solubilizační kapacita byla stanovena u systémů P407/P123 a P407/T80 s měsíčkem lékařským, avšak z důvodu jeho konzistence docházelo k praktickým problémům při manipulaci a navažování, což mohlo ovlivnit výsledky stanovení. Nejnížší hodnoty byly stanoveny u systémů P407/P123 a PC/P407 s kyselinou gallovou.

Zvýšená teplota měla, pravděpodobně z důvodu neionického charakteru použitých surfaktantů, na solubilizační schopnosti spíše nepříznivý vliv, s výjimkou vzorku P407/P123/GA. Nejvyšší hodnoty byly opět stanoveny u systému P407/P123 s měsíčkem, nejnižší potom u systému P407/T80 s kyselinou gallovou.

V prostředí NaCl došlo ke změnám solubilizačních kapacit v závislosti na konkrétním nosiči a aktivní látce. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo v případě vzorku P407/T80 s quercetinem, zatímco nejnižší hodnoty vykazoval tentýž systém s obsahem měsíčku. U vzorků s extraktem měsíčku byl pozorován výrazný pokles solubilizační kapacity v porovnání s experimentem v destilované vodě.

V případě směsí P407/T80/GA a PC/P407/M při 25 °C a vzorku P407/T80/GA při zvýšené iontové síle nejsou hodnoty solubilizační kapacity v tabulce uvedeny z důvodu značného kolísání hodnot solubilizační křivky. U vzorků s fosfatidylcholinem byla stanovena solubilizační kapacita pouze při laboratorní teplotě, přičemž hodnoty byly nejnižší ve srovnání s ostatními nosnými systémy.

Tabulka 4 Maximální solubilizační kapacita při různých podmínkách

nosný systém	25 °C	37 °C	NaCl
P407/P123/Q	0,270 ± 0,012	0,280 ± 0,003	0,015 ± 0,003
P407/T80/Q	0,078 ± 0,009	0,054 ± 0,000	0,135 ± 0,002
PC/P407/Q	0,006 ± 0,000	–	–
P407/P123/GA	0,004 ± 0,003	0,042 ± 0,020	0,011 ± 0,000
P407/T80/GA	–	0,003 ± 0,002	–
PC/P407/GA	0,005 ± 0,000	–	–
P407/P123/M	20,476 ± 0,521	11,617 ± 2,348	0,060 ± 0,001
P407/T80/M	2,421 ± 0,984	1,880 ± 0,493	0,002 ± 0,002
PC/P407/M	–	–	–

– nebylo stanoveno

7.3 Charakteristika nosičů s antioxidanty

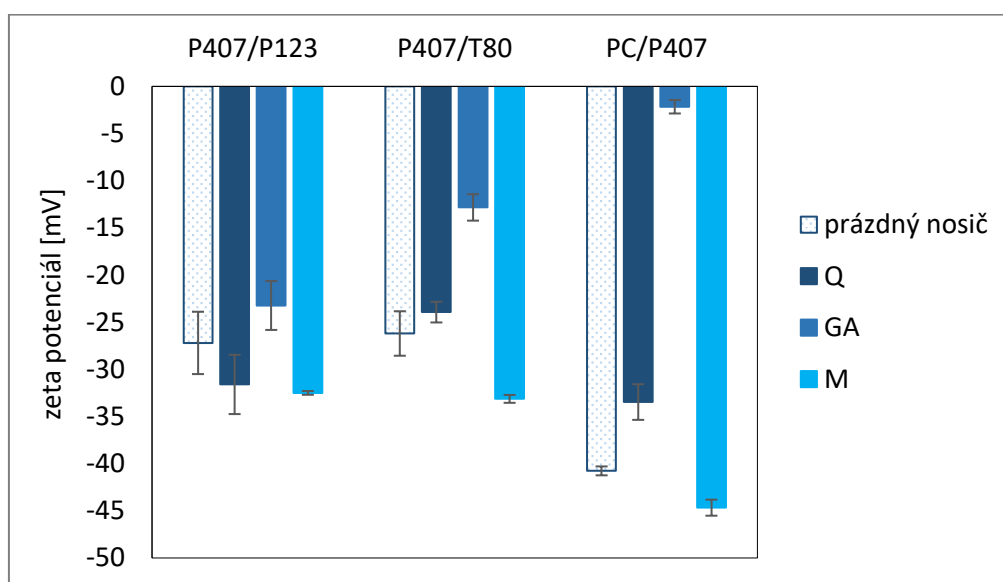
7.3.1 Zeta potenciál a velikost částic

U připravených nosičů byl měřen zeta potenciál, a to za účelem ověření potenciálního vlivu elektrostatických sil na jejich stabilitu. Hodnota pH všech systémů se pohybovala v rozmezí 4–5,5. Obecně platí, že pokud se hodnoty zeta potenciálu pohybují nad hodnotou +30 mV nebo pod hodnotou –30 mV, lze předpokládat, že tyto systémy jsou elektrostaticky stabilní. Avšak v případě, že se hodnota zeta potenciálu pohybuje v rozmezí 0 ± 10 mV, dochází k výraznému poklesu stability z důvodu větší tendence k agregaci částic [74].

Jak je patrné z Obr. 41, přestože byly pro přípravu nosičů použity neionické surfaktanty, byly překvapivě získány záporné hodnoty zeta potenciálu okolo –26 mV. Ve studii [75] byl hodnocen zeta potenciál Pluronicu P84, F127 a P84, hodnoty u těchto systémů byly stejně jako v našem případě záporné, v rozmezí –3 až –10 mV. Záporné hodnoty poukazují na odpudivé interakce mezi jednotlivými micelami, což brání k jejich agregaci a zajišťuje jejich stabilitu. Ve studii [70] byl měřen stejný systém ve stejném poměru surfaktantů, který byl připraven stejnou metodou jako v našem případě, tedy hydratací tenkého filmu,

avšak získaná hodnota zeta potenciálu byla 0,51 mV, což je výrazně odlišná hodnota než v našem případě, avšak není zcela jasné, čím by mohl být tento jev způsoben. Negativní hodnoty zeta potenciálu zůstaly zachovány i po inkorporaci aktivních látek, přičemž nejnižší náboj vykazovaly všechny systémy s obsahem měsíčku lékařského. Nižší hodnoty byly naměřeny také u P123/P407 a P407/T80 v přítomnosti quercetinu, a to více než -30 mV. Největší podíl elektrostatické stabilizace lze předpokládat u směsí na bázi fosfatidylcholinu a poloxameru, kde hodnoty zeta potenciálu dosahovaly hodnot okolo -40 mV, pouze v případě nosiče s obsahem kyseliny gallové byly hodnoty výrazně méně záporné (blíží se k nule). Zeta potenciál u směsných micel s obsahem GA a fosfatidylcholinu o různých koncentracích byl měřen také ve studii [76]. Při nejvyšším obsahu fosfatidylcholinu byly hodnoty zeta potenciálu nejnižší ($-8,69$ mV), zatímco při snižování obsahu PC došlo ke zvětšení záporné hodnoty na $-20,7$ mV. Tento jev může být způsoben odpudivými náboji, které zaručují vyšší stabilitu systémů.

Gururaj [77] připravili a charakterizovali částice na bázi Pluronicu F68 s kyselinou gallovou, u nichž naměřili zeta potenciál $-4,42$ mV, tj. srovnatelná hodnota s námi měřeným vzorkem PC/P407/GA. Ostatní směsi s kyselinou gallovou vykazovaly hodnoty zeta potenciálu $-23,2$ mV v případě dvou poloxamerů a $-12,8$ mV v případě P407/T80.



Obrázek 41 Zeta potenciál připravených systémů

Dalším sledovaným parametrem byla velikost částic. Co se týká samotných micel bez aktivní látky, největší částice byly naměřeny u systémů tvořených fosfatidylcholinem a P407. Tento jev bylo možno očekávat vzhledem k molekulární struktuře

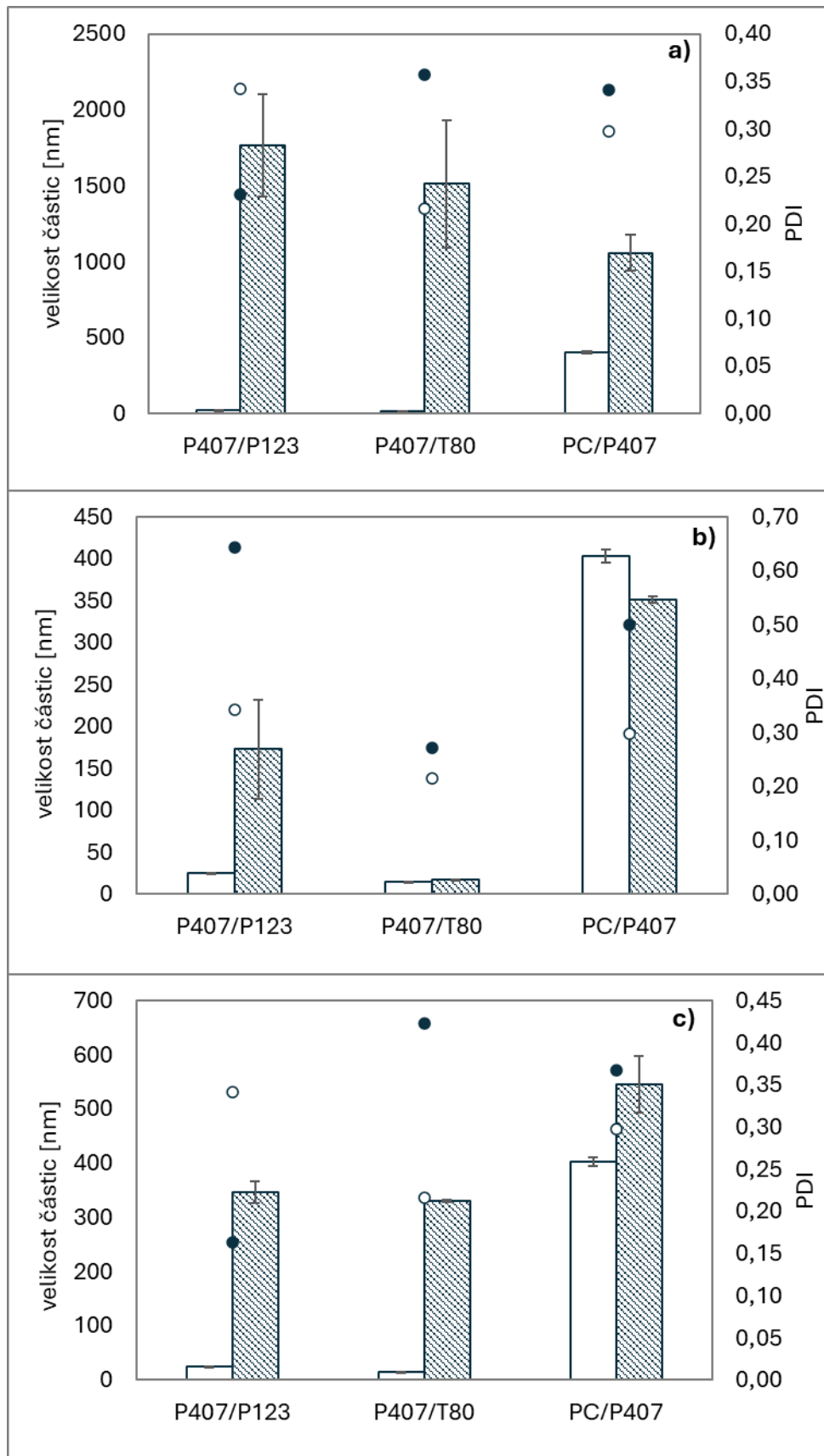
fosfatidylcholinu a také faktu, že je schopen tvořit lipozomy, které vykazují větší velikost než klasické micelární agregáty. V případě vzorku P407/P123 byla získána velikost 25,4 nm s indexem polydisperzity 0,342, což koresponduje s výsledky uvedenými autory studie [70], kteří u částic připravených ze stejných Poloxamerů naměřili velikost 23,77 nm s indexem polydisperzity 0,253.

Pokud jde o micely s inkorporovanou aktivní látkou, je patrné, že největší částice byly naměřeny u nosičů s obsahem quercetinu, konkrétně nejvyšších hodnot (1767 nm) bylo dosaženo v případě systémů s obsahem dvou poloxamerů (Obr. 42). Co se týká částic obsahujících kyselinu gallovou, velikost se pohybovala v rozsahu 17–351 nm. Srovnáme-li tato zjištění s výsledky získanými ve studii [77], kde byly částice tvořeny pouze jedním typem kopolymerního surfaktantu (F68) s kyselinou gallovou o průměrné velikosti 617,2 nm, jsou všechny námi připravené směsné nosiče podstatně menší.

Srovnáme-li další dvě aktivní látky, kyselinu gallovou a extrakt z měsíčku, největší částice byly prokázány u systému na bázi fosfatidylcholinu (Obr. 42 b) a c)). Velikost částic je mimo jiné závislá i na typu inkorporované aktivní látky (AL), tj. její polaritě, a také molekulové hmotnosti, která je v případě quercetinu téměř 2× větší ($302 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) než v případě kyseliny gallové ($170 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Zhao a kol. [78] se ve své studii zabývali solubilizací kurkuminu do směsných micel na bázi směsi Pluronicu P123 a P68. Zatímco prázdné agregáty vykazovaly velikost 23,4 nm, tj. podobná hodnota jako u našich vzorků, tak následkem enkapsulace kurkuminu došlo ke zvětšení micel na 68,2 nm.

Index polydisperzity (PDI) udává míru heterogenity vzorků na základě velikosti částic, čím vyšší hodnota, tím je distribuce velikosti částic větší. V případě našich vzorků se hodnota PDI pohybovala v rozmezí od 0,163 do 0,644, přičemž v důsledku solubilizace AL došlo ve většině případů k jeho zvýšení, s výjimkou vzorků P407/P123 s quercetinem a měsíčkem.



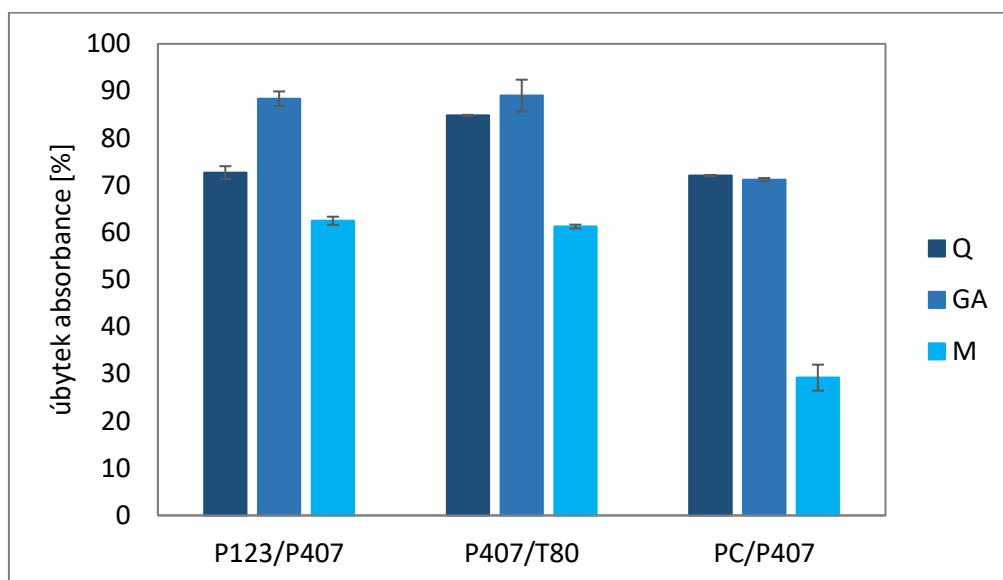
Obrázek 42 Velikost částic (□ prázdných systémů, ■ systémů s AL) a indexy polydisperzity (○ prázdných systémů, ● systémů s AL) – s Q (a), GA (b), M (c)

7.3.2 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita připravených nosičů byla stanovena pomocí metody zhášení stabilních radikálů DPPH a byla vyhodnocena jako úbytek absorbance (AA%) oproti referenci, kterou reprezentoval 0,2 mM roztok DPPH v 96% ethanolu.

Z výsledků v grafu (Obr. 43) je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly nosiče P407/P123 a P407/T80 s obsahem kyseliny gallové, přičemž zjištěné úbytky absorbance obou vzorků jsou srovnatelné (89 %). Podobně vysoká hodnota (94 %) byla zjištěna autory Gururaj a kol. [77] u micely F68 s kyselinou gallovou. Úbytky absorbancí směsí s quercetinem se pohybovaly od 72 % do 84 %, v závislosti na typu nosného systému. Ve studii [79] byla stejnou metodou DPPH získána hodnota % úbytku absorbance směsného micelárního na systému na bázi Poloxamerů P123/F88 vyšší, a to téměř 96 %. U agregátů s obsahem měsíčku byly zjištěny hodnoty okolo 62 % v případě neionických směsí (P407/P123 a P407/T80) a 29 % u nosiče PC/P407.

Bez ohledu na typ aktivní látky byla nejnižší antioxidační aktivita sledována u nosičů na bázi fosfatidylcholinu. Vzhledem k odlišné molekulární struktuře a ionicitě PC lze očekávat jiné uspořádání v micelárním agregátu, které by se mohlo projevit ve vytvoření stabilnější matrice, což bylo také prokázáno pomocí metody DSC (Obr. 50).

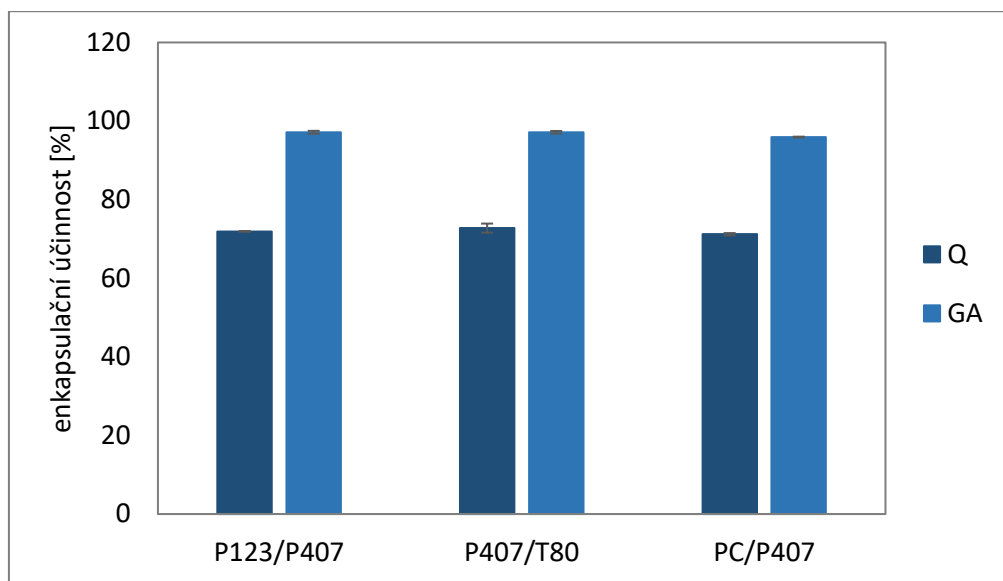


Obrázek 43 Antioxidační aktivita systémů s aktivními látkami

7.3.3 Enkapsulační účinnost

Vyhodnocení enkapsulační účinnosti bylo provedeno měřením absorbancí pomocí UV-VIS spektroskopie při stanovené vlnové délce (286 nm GA, 375 nm Q, 420 nm M).

Jak je patrné z grafu na Obr. 44, nejvyšší enkapsulační účinnost (97 %) vykazují vzorky s obsahem kyseliny gallové, které jsou srovnatelné bez ohledu na typ nosiče. Agregáty s aktivní látkou quercetin vykázaly enkapsulační účinnost okolo 72 %, což je pouze o něco nižší výsledek, než ve studii Pool a kol. [80], kteří enkapsulovali quercetin do polymerních nanočástic s účinností $79,84 \pm 2,5$ %. Na základě výsledků dané studie se předpokládá, že část množství quercetinu mohla zůstat v neenkapsulované formě ve vodné fázi.



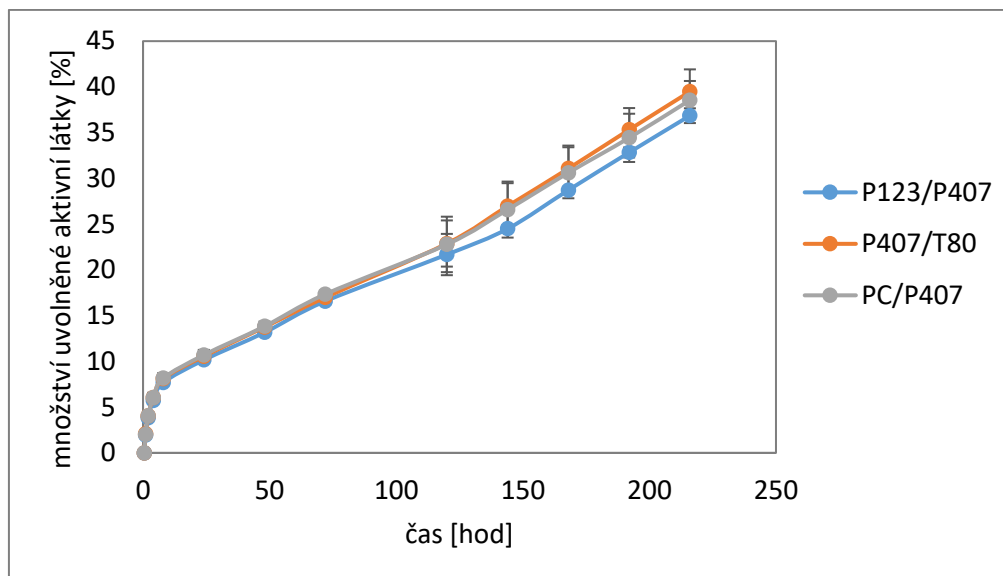
Obrázek 44 Enkapsulační účinnost systémů s aktivními látkami

Nosiče s měsíčkem nejsou zahrnuty v grafu, jelikož nebylo možné měřením absorbancí získat relevantně kvantifikovatelné výsledky, přestože z vizuálního pozorování bylo patrné, že se extrakt podařilo do micelárního roztoku solubilizovat.

7.3.4 Test uvolňování antioxidantů

Testování uvolňování antioxidačních aktivních látek z nosných systémů bylo prováděno pomocí dialyzační metody *in vitro* v prostředí PBS pufru s obsahem T80.

Na Obr. 45, 47 a 48 jsou znázorněny závislosti množství uvolněné látky na čase pro jednotlivé aktivní látky (GA, Q, M). V případě uvolňování kyseliny gallové (Obr. 45) není patrný žádný výrazný rozdíl mezi jednotlivými nosiči. Ve všech případech byl zaznamenán rychlejší nárůst uvolněného množství v prvních 10 hodinách testu, po němž následoval pozvolnější trend. Po 216 hodinách došlo k uvolnění přibližně 39 % kyseliny gallové do prostředí, což připravené nosiče předurčuje k využití spíše pro postupné a dlouhodobé uvolňování.



Obrázek 45 Množství uvolněné kyseliny gallové v závislosti na čase

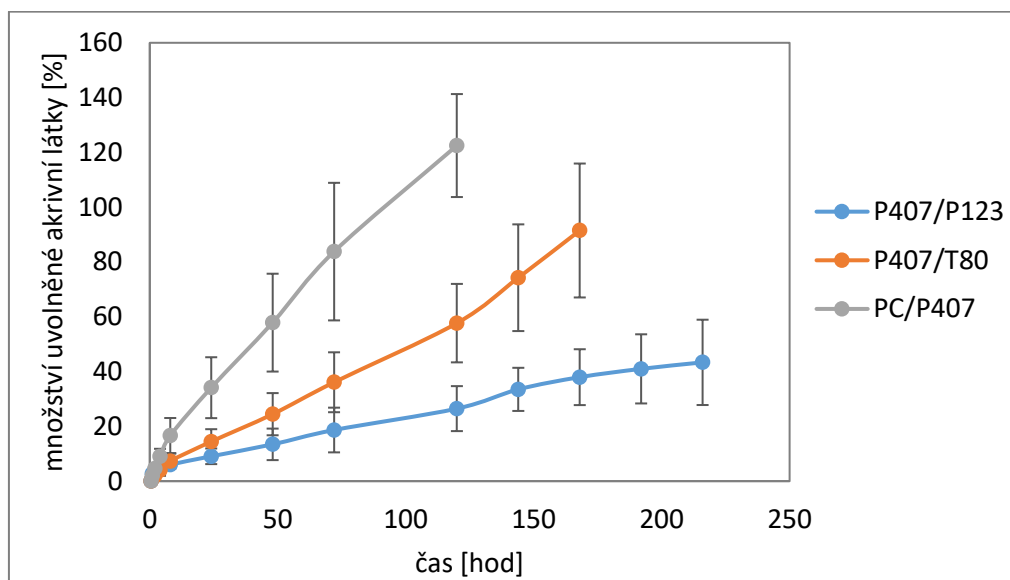
Při testu uvolňování kyseliny gallové docházelo k významnějším barevným změnám uvolňovacího media, jak je patrné z Obr. 46. Tyto změny mohly být způsobeny přítomností různých solí v PBS pufru a jejich interakcí s GA. Podobný trend byl pozorován také ve studii [81], kde bylo zjištěno, že ke změně barvy roztoku kyseliny gallové dochází v závislosti na ionizaci jejích protonů.



Obrázek 46 Vzorky s GA ihned po přípravě (a) a po 24 hodinách testu uvolňování (b)

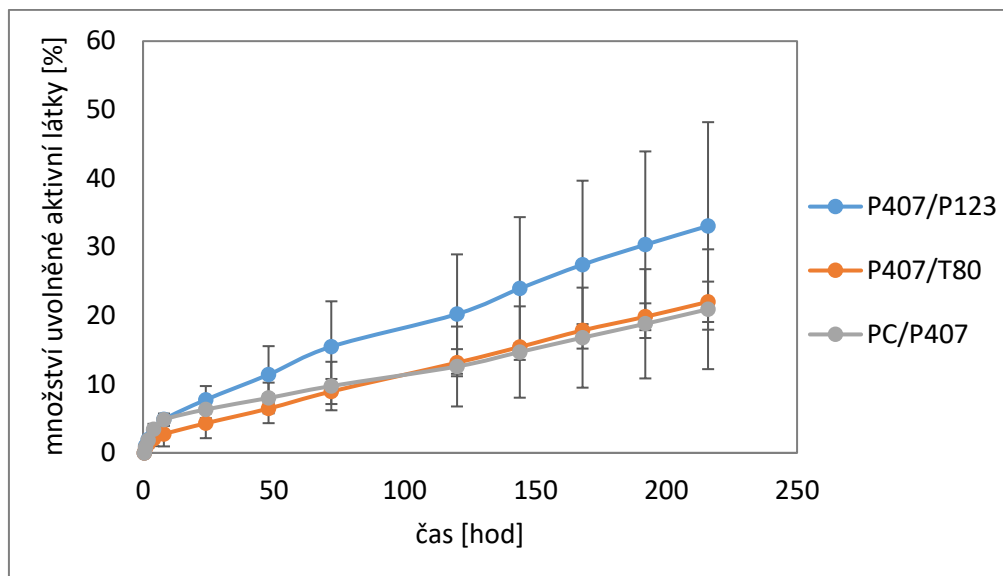
Výsledky testu uvolňování quercetinu jsou znázorněny na Obr. 47. Na rozdíl od výše diskutované GA je zde již patrný rozdíl mezi jednotlivými nosiči. Zatímco u systému dvou poloxamerů docházelo k velmi pozvolnému procesu uvolňování (po uplynutí 216 hodin bylo uvolněno 43 % aktivní látky), v případě systému P407/T80 došlo po 168 hodinách k uvolnění více než 91 % quercetinu. Nejrychlejší kinetika byla pozorována u nosiče PC/P407, kdy již po 120 hodinách bylo uvolněno veškeré množství aktivní látky. Lze tedy konstatovat, že pro dlouhodobé a pomalejší uvolňování quercetinu je nejvhodnější využít systém dvou poloxamerů.

Ve studii [82] Lu a kol. sledovali *in vitro* uvolňování quercetinu ze směsných micel taurocholátu sodného/Pluronicu P123 (ST/P123) v prostředí simulované žaludeční tekutiny (SGF, pH 1,2) a simulované střevní tekutiny (SIF, pH 6,8). V prostředí SGF bylo během 2 hodin uvolněno 29,20 %, v SIF během 24 hodin 78,56 %. Uvolňování quercetinu ze směsných micel P123/F88 v prostředí o pH 7,4 (tj. stejné jako v případě našeho testování), bylo provedeno ve studii [79], kde po 12 hodinách bylo ze směsných micel uvolněno 30 % quercetinu, na konci studie bylo uvolněno 60 %. Podobně jako v případě našeho experimentu bylo tedy pozorováno pomalejší uvolňování.



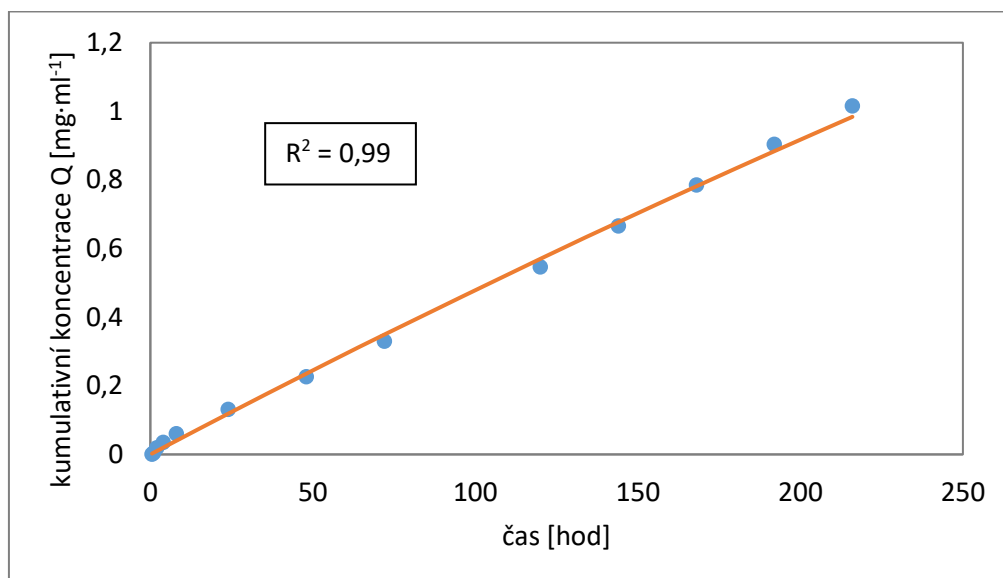
Obrázek 47 Množství uvolněného quercetinu v závislosti na čase

V případě vzorků s extraktem z měsíčku lékařského (Obr. 48) byl trend uvolňování u všech systémů téměř identický. V porovnání s předchozími dvěma aktivními látkami se měsíček uvolňoval nejvíce pozvolna, po 216 hodinách došlo k uvolnění 20 % (v případě systémů PC/P407 a P407/T80) a 33 % v případě systému P407/P123.



Obrázek 48 Množství uvolněného měsíčku v závislosti na čase

Kinetika uvolňování použitých antioxidantů z připravených nosičů byla hodnocena pomocí rovnice prvního řádu (viz Rovnice 13). Vzorový příklad proložení závislosti množství detekovaného quercetinu na čase je patrný na Obr. 49. Teoretická maximální koncentrace uvolněné aktivní látky, korelační koeficienty a rychlostní konstanty, které byly stanoveny pomocí výše zmíněné rovnice, jsou pro jednotlivé systémy a aktivní látky uvedeny v Tab. 5–7.



Obrázek 49 Závislost kumulativní koncentrace uvolněného quercetinu ze systému PC/P407 na čase proložená fitovaným modelem dle Rovnice 13

Z Tabulky 5 je patrné, že teoretická maximální koncentrace uvolněné kyseliny gallové se pohybuje v rozmezí 2,3–2,6 g·mol⁻¹. Rychlostní konstanty dosahovaly hodnot od okolo 6·10⁻³ h⁻¹, přičemž nejnižší rychlost uvolňování byla stanovena u směsi P407/T80.

U quercetinu (Tab. 6) byly zaznamenány větší rozdíly ve vypočítané maximální teoretické koncentraci, což je v souladu s Obr. 47. Zatímco v případě dvou kopolymerů P407/P123 byla zjištěna hodnota 0,35 g·mol⁻¹, u nosiče P407/T80 bylo teoretické uvolněné množství téměř 20x vyšší (6,65 g·mol⁻¹). U systému PC/P407 dosahovala teoretická maximální hodnota necelých 5 g·mol⁻¹. Co se týká rychlostních konstant, nejnižší hodnota byla, podobně jako v případě GA, zaznamenána u směsi na bázi P407/T80, hodnoty však byly výrazně nižší.

U extraktu z měsíčku lékařského (Tab. 7) se teoretická koncentrace pohybovala v rozmezí 1,8 až 2,4 g·mol⁻¹. Experimentálně stanovené množství na konci testu, tj. po 216 hodinách, činilo 1,65 g·mol⁻¹ ze směsi P407/P123, 1,43 mg/ml ze systému P407/T80 a 1,05 g·mol⁻¹ v případě PC/P407. Co se týká rychlostních konstant, byl potvrzen trend jako u předchozích dvou aktivních látek, a tedy že nejvíce pozvolné je uvolňování ze směsných micel P407/T80. Nejvyšší rychlost uvolňování byla zaznamenána u systémů s fosfatidylcholinem (7,2·10⁻³ h⁻¹).

S ohledem na získané koeficienty determinace r^2 lze použitý model rovnice kinetiky 1. řádu vyhodnotit jako vyhovující pro sledování kinetiky uvolňování antioxidantů z připravených nosičů.

Tabulka 5 Konstanty získané pomocí matematického modelu popisující uvolňování GA

vzorek	c_{\max} [g·mol ⁻¹]	r^2	$-k \cdot 10^{-3}$ [h ⁻¹]
P407/P123/GA	2,29 ± 0,00	0,98 ± 0,00	6,3 ± 0,3
P407/T80/GA	2,64 ± 0,40	0,98 ± 0,01	5,6 ± 0,8
PC/P407/GA	2,38 ± 0,15	0,98 ± 0,00	6,2 ± 0,9

Tabulka 6 Konstanty získané pomocí matematického modelu popisující uvolňování Q

vzorek	c_{\max} [g·mol ⁻¹]	r^2	$-k \cdot 10^{-3}$ [h ⁻¹]
P407/P123/Q	0,35 ± 0,15	0,98 ± 0,02	4,3 ± 0,4
P407/T80/Q	6,65 ± 0,49	0,99 ± 0,01	0,6 ± 0,2
PC/P407/Q	4,91 ± 0,95	0,99 ± 0,00	1,3 ± 0,5

Tabulka 7 Konstanty získané pomocí matematického modelu popisující uvolňování M

vzorek	c_{\max} [g·mol ⁻¹]	r^2	$-k \cdot 10^{-3}$ [h ⁻¹]
P407/P123/M	2,39 ± 2,30	0,99 ± 0,01	4,5 ± 0,1
P407/T80/M	2,21 ± 1,45	0,99 ± 0,00	3,7 ± 1,7
PC/P407/M	1,78 ± 2,57	0,98 ± 0,01	7,2 ± 0,4

7.3.5 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je analytická metoda, která se využívá v oblasti termické analýzy. Principem DSC je sledování teplotních změn, které se odehrávají ve vzorku v reakci na kontrolovaně se měnící teplotu. Při fázových změnách jako je tání, skelné přechody, krystalizace nebo chemické reakce, dochází ke změnám tepla, čímž dochází k odchýlkám v teplotním profilu a na DSC křivce se objevují charakteristické píky.

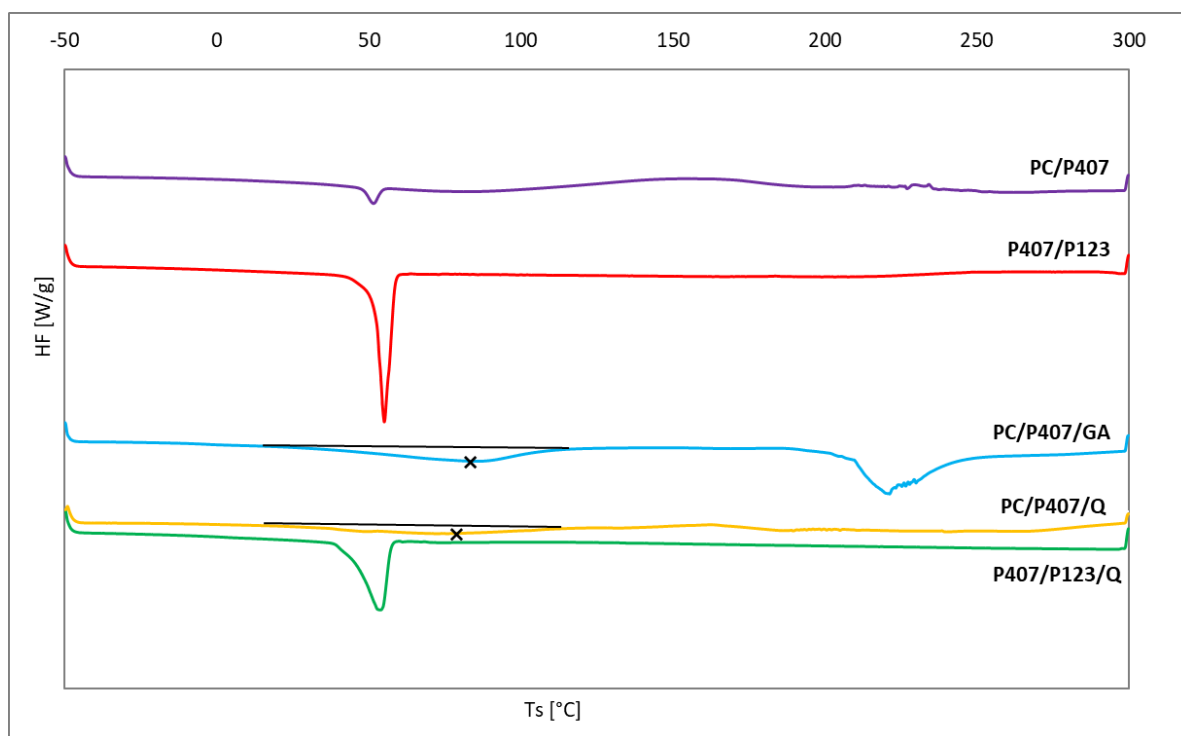
Měřením DSC (Obr. 50) u našich vzorků byl potvrzen prioritní charakter nosné matrice, tedy Pluroniců a fosfatidylcholinu. Zvýšená tepelná stabilita systému, a tedy vyšší odolnost vůči rozpadu nosiče (posun píku do vyšších teplot) byly pozorovány u směsí s PC. U systémů obsahující aktivní látky nebyly prokázány píky odpovídající čistým antioxidantním látkám, avšak vzhledem k vykázané antioxidantní aktivitě těchto systémů lze předpokládat, že došlo k jejich inkorporaci do daného nosiče.

Pomocí DSC byla stanovena teplota tání quercetinu na 132,3 °C, shodný výsledek byl naměřen také ve studii [80], kde jej autoři enkapsulovali do polymerních částic na bázi kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA). Podobně jako v naší studii, zde nebyly DSC měření odhaleny patrné píky, které by odpovídaly čistým antioxidantům, což by mohlo naznačovat inkorporaci aktivní látky do matrice daného nosiče. Měření ve zmíněné studii [80] také prokázalo posun teploty skelného přechodu polymeru a autoři se

domnívají, že je to způsobeno interakcemi mezi částicemi a aktivní látkou. Analogický systém, tj. PLGA a quercetin, byl předmětem studie [83], kde po inkorporaci quercetinu do PLGA nanočástic došlo k vymizení píku odpovídající samotnému quercetinu.

Na Obr. 50 je u všech systémů obsahující P407 patrný pík v oblasti okolo 50 až 56 °C (konkrétně 51,5 °C pro PC/P407; 55,0 °C pro P407/P123 a 53,7 °C pro P407/P123/Q) odpovídající právě tomuto surfaktantu, což indikuje jeho přítomnost v krystalickém stavu. Podobně ve studii [84] byl u Pluronicu 407 prokázán endotermický pík při 55 °C, odpovídající jeho teplotě tání.

V případě volné kyseliny gallové byl patrný pík v oblasti okolo 110 °C a 260 °C (teplota tání), v systému PC/P407 však došlo k vymizení píku v oblasti okolo 260 °C, což naznačuje inkorporaci antioxidantu do agregátu. Stejný trend byl pozorován ve studii [85], kde byla prokázána možná chemická vazba fenolové –OH skupiny kurkuminu s polární částí fosfatidylcholinu, který tvořil nosnou matici.



Obrázek 50 DSC termogramy pro jednotlivé formulace

7.4 Charakteristika krémových formulací

7.4.1 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita byla měřena ihned po přípravě formulací a dále pak po 4 týdnech skladování při laboratorní a zvýšené teplotě. Jak je vidět v Tab. 8, výrazně nejvyšší

antioxidační aktivitu vykazovaly formulace s kyselinou gallovou po přípravě, a to více než 86 a 90 %. Po dané době skladování však u těchto vzorků došlo k poklesu antioxidační aktivity, a to zhruba na 50 %.

Výrazně nižší aktivita (od 1 do 18 %) pak byla prokázána u formulací s obsahem quercetinu. Na druhou stranu u těchto vzorků došlo v průběhu času ke zvýšení hodnot úbytku absorbance. Podobný trend byl pozorován také ve studii [86], kdy u krémů bez obsahu aktivní látky došlo ke zvýšení antioxidační aktivity po 180 dnech z 1,85 na 8,12 %, v případě krému s obsahem extraktu z divokého jablka došlo po 180 dnech k nárůstu z 19,25 na 36,67 %.

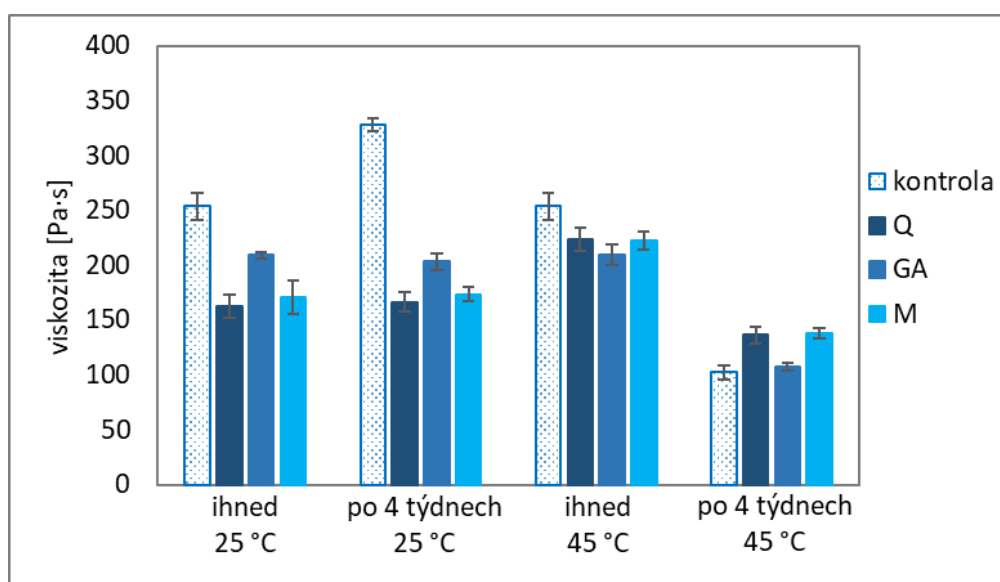
Nejnižší antioxidační aktivita byla stanovena u krémů s obsahem měsíčku lékařského, tato hodnota byla velice podobná výsledku změřenému pro samotný krémový základ bez aktivní látky. Lze také konstatovat zvýšení antioxidační aktivity u krému uchovaného při laboratorní teplotě, zatímco u vzorku uchovaného při vyšší teplotě nebyla po 4 týdnech stanovena žádná aktivita ve zhášení DPPH radikálů. Zajímavým zjištěním je zvýšení antioxidační aktivity v případě námi testovaného kontrolního vzorku (samotného krémového základu bez AL) po uplynutí stanovené doby 4 týdnů. V krémové formulaci dodávané společností Fagron a.s. je kromě okluziv, rozpouštědel, konzervantů a PAL obsažen i Trolamin, který může podle studie [87] vykazovat antioxidační vlastnosti a mohl by tedy být odpovědný za nárůst naměřené hodnoty.

Tabulka 8 Antioxidační aktivita formulací s obsahem systémů s aktivní látkou

vzorek	AA ihned po přípravě [%]	AA po 4 týdnech od přípravy [%]
krémový základ	4,64	28,99
PC/P407/GA labT	86,79	53,37
PC/P407/GA 45 °C	90,99	47,02
PC/P407/Q labT	17,94	36,24
PC/P407/Q 45 °C	14,61	28,52
PC/P407/M labT	5,55	33,99
PC/P407/M 45 °C	5,32	0,00

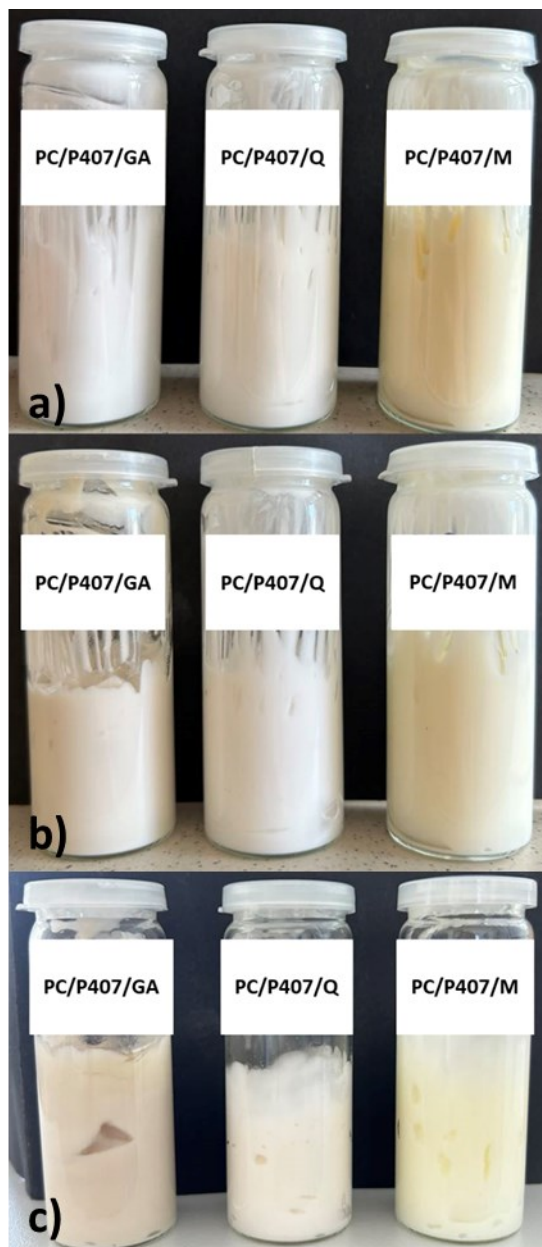
7.4.2 Stabilitní studie

V rámci hodnocení fyzikální stability formulací s obsahem nosičů s antioxidanty bylo provedeno vizuální hodnocení a měření viskozity, s ohledem na různé podmínky skladování. Jako kontrolní vzorek byl použit samotný krémový základ bez systému s aktivní látkou. Jak je patrné z grafu (Obr. 51), u vzorků skladovaných při laboratorní teplotě nedošlo po 4 týdnech téměř k žádným výrazným změnám, pouze u kontrolního vzorku bylo zaznamenáno zvýšení viskozity z 230 Pa·s na 330 Pa·s. V případě vzorků uložených 4 týdny v inkubátoru při teplotě 45 °C došlo k poklesu viskozity, u formulace s kyselinou gallovou se hodnota viskozity snížila o více než 50 % a v případě formulací s quercetinem a extraktem z měsíčku o více než 60 %.



Obrázek 51 Zhodnocení vlivu teploty a času na viskozitu formulací PC/P407

Dále byla u těchto formulací sledována také barevná změna v čase. V případě vzorků s obsahem kyseliny gallové uchovaných při laboratorní teplotě došlo ke změně z bílé barvy na světle béžovou, přičemž tento jev byl ještě více patrný u krému skladovaného při vyšší teplotě. U vzorku s obsahem quercetinu nebyla po dané době skladování viditelná žádná výrazná barevná změna, bez ohledu na teplotu skladování. Co se týká formulací s extraktem z měsíčku, došlo ke zvýraznění žlutého zbarvení, a to jak při 25, tak při 45 °C (Obr. 52). Lze říci, že připravené formulace jsou stabilní, jelikož u žádné z nich nedošlo k oddělení jednotlivých fází.



Obrázek 52 Krémové formulace ihned po přípravě (a) a po 4 týdnech skladování při laboratorní teplotě (b) a teplotě 45 °C (c).

ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo zhodnotit možnosti solubilizace přírodních antioxidačních látek do micelárních systémů na bázi kopolymerních i běžných micel, konkrétně Pluroniců, Tweenu 80 a fosfatidylcholinu. Tyto látky byly následně využity pro přípravu nosičů s inkorporovanými antioxidanty quercetinem, kyselinou gallovou a extraktu z měsíčku lékařského. U připravených vzorků byly testovány nejen fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je velikost částic, zeta potenciál, povrchové napětí, antioxidační aktivita, ale také enkapsulační účinnost a kinetika uvolňování aktivní látky.

První část práce byla zaměřena na stanovení micelizačních parametrů výchozích amfifilních materiálů. Kritické micelární koncentrace stanovené při 25 °C se pohybovaly v rozmezí od 0,01 mmol·l⁻¹ do 0,29 mmol·l⁻¹. Z výsledných hodnot CMC byl prokázán synergický efekt systému dvou Pluroniců P407/P123, jelikož došlo ke snížení kritické micelární koncentrace oproti samotným surfaktantům. Dále byla stanovena Gibbsova micelizační energie, plocha připadající na jednu molekulu surfaktantu a adsorpce molekul na rozhraní. U všech systémů byly hodnoty Gibbsovy micelizační energie výrazně záporné (v rozmezí od -20 do -28 kJ·mol⁻¹), což poukazuje na spontánní proces tvorby micel. Nejvyšší koncentrace surfaktantu na rozhraní byla stanovena u směsi P407/P123 (23·10⁻⁵ mol·m⁻²).

U připravených micelárních směsí s obsahem aktivních látek byla stanovena solubilizační kapacita, která se pohybovala od 0,002 do 20,476, v závislosti na konkrétním nosiči a okolních podmínkách. Nejvyšší solubilizační kapacita byla stanovena u vzorku P407/P123/Q při teplotách 25 a 37 °C. V případě systémů s obsahem kyseliny gallové vykazovala nejvyšší solubilizační kapacitu směs P407/P123 při 37 °C. Pozitivní vliv NaCl na systémy byl zaznamenán pouze v případě P407/T80 s enkapsulovaným quercetinem. V rámci hodnocení solubilizačních účinků byla dále stanovena Gibbsova volná solubilizační energie, která vyjadřuje energii přenosu 1 molu aktivní látky do micely, přičemž v případě záporných hodnot se jedná o proces spontánní. Zatímco u vzorků se solubilizovaným quercetinem a měsíčkem bylo dosaženo záporných hodnot v téměř celém rozmezí koncentrací surfaktantů, u směsí s kyselinou gallovou neměla solubilizace do micel významnější vliv, což se projevilo hodnotami kladnými.

Surfaktanty, u nichž byla otestována solubilizační kapacita, byly využity v další části práce pro přípravu nosičů antioxidantů, které byly dále charakterizovány. Co se týká zeta

potenciálu, ten potvrdil elektrostatickou stabilizaci všech micelárních agregátů s obsahem quercetinu a měsíčku (rozmezí od -27 do -44 mV). V případě systémů s obsahem kyseliny gallové byly získané hodnoty výrazně méně záporné, především u systémů P407/T80 a PC/407. Velikost částic se po inkorporaci aktivní látky do micel zvýšila a hodnoty se pohybovaly v širokém rozmezí od 17 nm v případě P407/T80/GA až po 1777 nm u směsi P407/P123/Q.

Nosiče bez i s inkorporovanými aktivními látkami byly analyzovány také pomocí metody DSC. V případě systému PC/P407 byla prokázána vyšší odolnost matrice vůči rozpadu nosiče, avšak u směsí s obsahem aktivních látek nebyly touto metodou prokázány píky odpovídající čistým látkám. Jejich přítomnost však byla prokázána významnou antioxidační aktivitou u všech připravených systémů, nejvyšší hodnoty vykazovaly vzorky s obsahem kyseliny gallové (cca 90 %). Enkapsulační účinnost se pohybovala mezi 71–97 %, přičemž nejvyšších hodnot bylo dosaženo u vzorku P407/T80/GA.

Další parametr, který hraje významnou roli u nosičů s obsahem aktivních látek, zahrnuje podmínky, za jakých jsou tyto aktivní látky uvolňovány do prostředí. Výsledky testování našich vzorků, které probíhalo ve fosfátovém pufru o pH 7,3, prokázaly postupné uvolňování vyhovující kinetickému modelu dle rovnice 1. řádu. U vzorků s obsahem kyseliny gallové došlo po 216 hodinách k uvolnění přibližně 40 % aktivní látky. V případě quercetinu byly zaznamenány větší rozdíly mezi jednotlivými nosiči. Nejrychlejší uvolnění bylo pozorováno u systému PC/P407, zatímco nejvíce pozvolné bylo uvolnění v případě systému P407/P123.

Za účelem zhodnocení možnosti využití připravených aktivních nosičů v kosmetických přípravcích, byly vybrány vzorky PC/P407 se všemi třemi aktivními látkami inkorporovány do dodaného krémového základu. U těchto vzorků byly provedeny stabilitní testy v čase při laboratorní a zvýšené teplotě, které prokázaly pouze mírné barevné změny u vzorků s obsahem měsíčku a kyseliny gallové. U vzorků skladovaných při vyšší teplotě došlo ke snížení viskozity, a to průměrně z 200 na 130 Pa·s. Co se týká antioxidační aktivity, nejvyšší hodnoty vykazovaly vzorky s obsahem kyseliny gallové, což korespondovalo s výsledky samotných nosných systémů.

Na závěr lze shrnout, že se podařilo solubilizovat vybrané antioxidanty a jednoduchou technikou připravit účinné aktivní nosiče na bázi amfifilních struktur. S ohledem na dosažené výsledky lze za optimální považovat systémy s obsahem quercetinu, u nichž byl prokázán nezanedbatelný vliv micelárních agregátů na podporu solubilizační účinnosti.

Navíc z nich připravené nosiče byly elektrostaticky stabilní a vykazovaly významnou antioxidační aktivitu. Uvolňování quercetinu do prostředí probíhalo postupně a řízeně v závislosti na konkrétním nosiči. Také krémové formulace s obsahem quercetinu vykazovaly dobrou stabilitu a relativně dobrou antioxidační aktivitu. Vzhledem k biokompatibilitě nosných materiálů by připravené nosiče mohly nalézt uplatnění jako složky kosmetických nebo farmaceutických formulací pro řízené uvolňování aktivních látek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠTĚPÁNKOVÁ, Šárka. *Obecná biochemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2020. ISBN 978-80-7560-342-5
- [2] SGUIZZATO, Maddalena; PEPE, Alessia; BALDISSEROTTO, Anna; BARBARI, Riccardo; MONTESI, Leda et al. Niosomes for Topical Application of Antioxidant Molecules: Design and In Vitro Behavior. Online. *Gels*. 2023, vol. 9, no. 2, s. 1–16. ISSN 2310-2861. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/gels9020107> [cit. 2024-03-20].
- [3] KAŠPÁRKOVÁ, Věra. *Chemie a technologie tuků II*. Online. Zlín: Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/EntityDisplayTab.aspx?id=18> [cit. 2023-09-28].
- [4] SEHWAG, Sneha a DAS, Madhusweta. Antioxidant Activity: An Overview. Online. *Research & Reviews: Journal of Food Science & Technology*. 2013, vol. 3, no. 2, s. 1–10. ISSN 2278–2249. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/264368106_Antioxidant_Activity_An_Overview [cit. 2023-09-28].
- [5] CAROCHO, Márcio a FERREIRA, Isabel C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Online. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, vol. 51, s. 15–25. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021> [cit. 2023-09-17].
- [6] COSTA, Raquel a SANTOS, Lúcia. Delivery systems for cosmetics – From manufacturing to the skin of natural antioxidants. Online. *Powder Technology*. 2017, vol. 322, s. 402–416. ISSN 00325910. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.07.086> [cit. 2023-09-17].
- [7] ANWAR, Haseeb; HUSSAIN, Ghulam a MUSTAFA, Imtiaz. Antioxidants from Natural Sources. Online. In: SHALABY, Emad a AZZAM, Ghada Mostafa (ed.). *Antioxidants in Foods and Its Applications*. InTech, 2018. s. 3–28. ISBN 978-1-78923-378-0. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.75961> [cit. 2023-10-31].

- [8] LEE, Yunna a IM, Eunok. Regulation of miRNAs by Natural Antioxidants in Cardiovascular Diseases: Focus on SIRT1 and eNOS. Online. *Antioxidants*. 2021, vol. 10, no. 3, s. 1–29. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox10030377> [cit. 2023-10-31]
- [9] OLUBUKOLA SINBAD, Olorunnisola; FOLORUNSHO, Ajayi Ayodeji; OLABISI, Okeleji Lateef; ABIMBOLA AYOOLA, Oladipo a JOHNSON TEMITOPE, Emorioloye. Vitamins as Antioxidants. Online. *Journal of Food Science and Nutrition Research*. 2019, vol. 2, no. 3, s. 214–235. ISSN 26421100. Dostupné z: <https://doi.org/10.26502/jfsnr.2642-11000021> [cit. 2023-10-31].
- [10] GALLI, Francesco; BONOMINI, Mario; BARTOLINI, Desirée; ZATINI, Linda; REBOLDI, Gianpaolo et al. Vitamin E (Alpha-Tocopherol) Metabolism and Nutrition in Chronic Kidney Disease. Online. *Antioxidants*. 2022, vol. 11, no. 5, s. 1–19. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox11050989> [cit. 2023-10-31].
- [11] KEHRER, J.P.; ROBERTSON, J.D. a SMITH, C.V. Free Radicals and Reactive Oxygen Species. Online. *Comprehensive Toxicology*. 2010, no. 1, s. 277–307. ISBN 9780080468846. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7> [cit. 2023-11-09].
- [12] PALACE, Vince P; KHAPER, Neelam; QIN, Qining a SINGAL, Pawan K. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. Online. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, vol. 26, no. 5–6, s. 746–761. ISSN 08915849. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00266-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00266-4) [cit. 2023-11-10].
- [13] VUOLO, Milena Morandi; LIMA, Verena Silva a MARÓSTICA JUNIOR, Mário Roberto. Phenolic Compounds. Online. *Bioactive Compounds*. 2019, s. 33–50. ISBN 9780128147740. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5> [cit. 2023-11-11].
- [14] WYPYCH, George. *Handbook of Antioxidants*. ChemTec Publishing, 2020. ISBN 978-1-927885-60-4.
- [15] DE LIMA CHERUBIM, Débora Jackeline; BUZANELLO MARTINS, Cleide Viviane; OLIVEIRA FARIÑA, Luciana a DA SILVA DE LUCCA, Rosemeire Aparecida. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. Online.

- Journal of Cosmetic Dermatology*. 2020, vol. 19, no. 1, s. 33–37. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.13093> [cit. 2023-11-11].
- [16] IBRAHIM ALZAND, Kutaiba a ABDALKARIM MOHAMEDB, Mohamed. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Antioxidant activity. Online. *Journal of Pharmacy Research*. 2012, vol. 5, no. 8, s. 4013–4020. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/320957444_Flavonoids_Chemistry_Biochemistry_and_Antioxidant_activity [cit. 2023-11-11].
- [17] NAIDU, Nikita; BIYANI, Dr. Dinesh; UMEKAR, Dr. Milind a BURLEY, Vaishnavi. An Overview of a Versatile Compound: Quercetin. Online. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2021, vol. 69, no. 1, s. 248–257. ISSN 0976044X. Dostupné z: <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2021.v69i01.036> [cit. 2023-11-14].
- [18] GRASSMANN, J. Terpenoids as Plant Antioxidants. Online. *Plant Hormones*. 2005, no. 72, s. 505–535. ISBN 9780127098722. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72015-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72015-X) [cit. 2023-11-11].
- [19] GUTIÉRREZ-DEL-RÍO, Ignacio; LÓPEZ-IBÁÑEZ, Sara; MAGADÁN-CORPAS, Patricia; FERNÁNDEZ-CALLEJA, Luis; PÉREZ-VALERO, Álvaro et al. Terpenoids and Polyphenols as Natural Antioxidant Agents in Food Preservation. Online. *Antioxidants*. 2021, vol. 10, no. 8, s. 1–33. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox10081264> [cit. 2023-11-11].
- [20] STOIA, Mihaela a OANCEA, Simona. Low-Molecular-Weight Synthetic Antioxidants: Classification, Pharmacological Profile, Effectiveness and Trends. Online. *Antioxidants*. 2022, vol. 11, no. 4, s. 1–28. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox11040638> [cit. 2023-11-12].
- [21] ATTA, Emad M; MOHAMED, Nawal H. a ABDELGAWAD, Ahmed A. M. Antioxidants: an overview on the natural and synthetic types. Online. *European Chemical Bulletin*. 2017, vol. 6, no. 8, s. 365–375. ISSN 20635346. Dostupné z: <https://doi.org/10.17628/ecb.2017.6.365-375> [cit. 2023-11-20].
- [22] Final Report on the Safety Assessment of BHT. Online. *International Journal of Toxicology*. 2002, vol. 21, no. 2, s. 19–94. ISSN 1091-5818. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10915810290096513> [cit. 2023-11-12].

- [23] PATRICK, E; JUBERG, D.R; O'DONOGHUE, J a MAIBACH, H.I. Depigmentation with tert-Butyl Hydroquinone using Black Guinea Pigs. Online. *Food and Chemical Toxicology*. 1999, vol. 37, no. 2–3, s. 169–175. ISSN 02786915. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(98\)00127-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(98)00127-6) [cit. 2023-11-12].
- [24] QI, Weidong; QI, Wanxiang; XIONG, Dongwei a LONG, Miao, Quercetin: Its Antioxidant Mechanism, Antibacterial Properties and Potential Application in Prevention and Control of Toxipathy. Online. *Molecules*. 2022, vol. 27, no. 19. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27196545> [cit. 2023-09-26].
- [25] RASHIDI, Zahra; KHOSRAVIZADEH, Zahra; TALEBI, Ali; KHODAMORADI, Kajal; EBRAHIMI, Reyhane et al. Overview of biological effects of Quercetin on ovary. Online. *Phytotherapy Research*. 2021, vol. 35, no. 1, s. 1–17. ISSN 0951-418X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ptr.6750> [cit. 2023-11-14].
- [26] PATRA, Arjun; SATPATHY, Swaha; SHENOY, Anitha; BUSH, Jason; KAZI, Mohsin et al. Formulation and evaluation of mixed polymeric micelles of quercetin for treatment of breast, ovarian, and multidrug resistant cancers. Online. *International Journal of Nanomedicine*. 2018, vol. 13, s. 2869–2881. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S153094> [cit. 2023-09-26].
- [27] SCHAECHTER, Moselio. *Encyclopedia of microbiology*. 3rd ed. London: Academic Press, 2009. ISBN 978-012-3739-445.
- [28] MASOUD, Mamdouh S.; HAGAGG, Sawsan S.; ALI, Alaa E. a NASR, Nessma M. Synthesis and spectroscopic characterization of gallic acid and some of its azo complexes. Online. *Journal of Molecular Structure*. 2012, vol. 1014, s. 17–25. ISSN 00222860. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.01.041> [cit. 2023-11-15].
- [29] SGUIZZATO, Maddalena; VALACCHI, Giuseppe; PECORELLI, Alessandra; BOLDRINI, Paola; SIMELIÈRE, Fanny et al. Gallic acid loaded poloxamer gel as new adjuvant strategy for melanoma: A preliminary study. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020, vol. 185, s. 1–11. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110613> [cit. 2023-11-15].

- [30] FERRETTI, Adele; SABATINI, Francesca a DEGANO, Ilaria. A Model Iron Gall Ink: An In-Depth Study of Ageing Processes Involving Gallic Acid. Online. *Molecules*. 2022, vol. 27, no. 23, s. 1–17. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27238603> [cit. 2024-03-22].
- [31] LUZI, Francesca; PANNUCCI, Elisa; SANTI, Luca; KENNY, José Maria; TORRE, Luigi et al. Gallic Acid and Quercetin as Intelligent and Active Ingredients in Poly(vinyl alcohol) Films for Food Packaging. Online. *Polymers*. 2019, vol. 11, no. 12, s. 1–20. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym11121999> [cit. 2023-11-15].
- [32] KAHKESHANI, Niloofar; FARZAEI, Fatemeh; FOTOUHI, Maryam; SHAGHAYEGH ALAVI, Seyedeh; BAHRAMSOLTANI, Roodabeh et al. Pharmacological effects of gallic acid in health and disease: A mechanistic review. Online. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2019, vol. 22, no. 3, s. 225–237. Dostupné z: <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2019.32806.7897> [cit. 2023-11-15].
- [33] ABDELWAHAB, Siddig Ibrahim; TAHA, Manal Mohamed Elhassan; TAHA, Sarah Mohamed Elhassan a ALSAYEGH, Abdulrahman Ahmed. Fifty-year of Global Research in *Calendula Officinalis* L. (1971–2021): A Bibliometric Study. Online. *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*. 2022, vol. 2, no. 4, s. 1–10. ISSN 27723712. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccmp.2022.100059> [cit. 2023-11-19].
- [34] ASHWLAYAN, Vrish Dhvaj; KUMAR, Amrish; VERMA, Mansi; GARG, Vipin Kumar a GUPTA, SK. Therapeutic Potential of *Calendula officinalis*. Online. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*. 2018, vol. 6, no. 2, s. 149–155. ISSN 23796367. Dostupné z: <https://doi.org/10.15406/ppij.2018.06.00171> [cit. 2023-11-19].
- [35] BRAGUETO ESCHER; CARDOSO BORGES; SOUSA SANTOS; MENDANHA CRUZ; BOSCACCI MARQUES et al. From the Field to the Pot: Phytochemical and Functional Analyses of *Calendula officinalis* L. Flower for Incorporation in an Organic Yogurt. Online. *Antioxidants*. 2019, vol. 8, no. 11, s. 1–20. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox8110559> [cit. 2023-11-19].

- [36] PAULOVÁ, Hana; BOCHOŘÁKOVÁ, Hana a TÁBORSKÁ, Eva. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Online. *Chemické Listy*. 2004, roč. 1, č. 98, s. 174–179. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf [cit. 2024-03-01].
- [37] BRAININA, Khiena; STOZHKO, Natalia a VIDREVICH, Marina. Antioxidants: Terminology, Methods, and Future Considerations. Online. *Antioxidants*. 2019, vol. 8, no. 8, s. 2–8. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox8080297> [cit. 2024-03-01].
- [38] ANTOLOVICH, Michael; PRENZLER, Paul D.; PATSALIDES, Emilios; MCDONALD, Suzanne a ROBARDS, Kevin. Methods for testing antioxidant activity. Online. *The Analyst*. 2002, vol. 127, no. 1, s. 183–198. ISSN 00032654. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/b009171p> [cit. 2024-03-07].
- [39] FLIEGER, Jolanta; FLIEGER, Wojciech; BAJ, Jacek a MACIEJEWSKI, Ryszard. Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. Online. *Materials*. 2021, vol. 14, no. 15, s. 1–54. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma14154135> [cit. 2024-03-07].
- [40] FIDLER, Martin a KOLÁŘOVÁ, Lenka. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. Online. *Chemické Listy*. 2009, č. 103, s. 232–235. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_03_232-235.pdf [cit. 2024-03-08].
- [41] KOUASSI, Marie-Carole; GRISEL, Michel a GORE, Ecaterina. Multifunctional active ingredient-based delivery systems for skincare formulations: A review. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022, vol. 217, s. 1–20. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112676> [cit. 2024-03-11].
- [42] GRGIĆ, Josipa; ŠELO, Gordana; PLANINIĆ, Mirela; TIŠMA, Marina a BUCIĆ-KOJIĆ, Ana. Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. Online. *Antioxidants*. 2020, vol. 9, no. 10, s. 1–35. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox9100923> [cit. 2024-01-30].
- [43] ŘEPKA, David; KURILLOVÁ, Antónia; MURTAJA, Yousef a LAPČÍK, Lubomír. Application of Physical-Chemical Approaches for Encapsulation of Active Substances in Pharmaceutical and Food Industries. Online. *Foods*. 2023,

- vol. 12, no. 11, s. 1–17. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods12112189> [cit. 2024-03-12].
- [44] PUDZIUVELYTE, Lauryna; MARKSA, Mindaugas; SOSNOWSKA, Katarzyna; WINNICKA, Katarzyna; MORKUNIENE, Ramune et al. Freeze-Drying Technique for Microencapsulation of *Elsholtzia ciliata* Ethanolic Extract Using Different Coating Materials. Online. *Molecules*. 2020, vol. 25, no. 9, s. 1–16. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25092237> [cit. 2024-03-08].
- [45] LOMBARDO, Domenico a KISELEV, Mikhail A. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. Online. *Pharmaceutics*. 2022, vol. 14, no. 3, s. 1–49. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543> [cit. 2024-03-13].
- [46] HADAŠOVÁ, Eva. Lipozomální léčivé formy. Online. *Remedia*. 2006, roč. 16, č. 4, s. 433–437. ISSN 0862-8947. Dostupné z: <https://www.remédia.cz/rubriky/klinicka-farmakologie-a-farmacie/lipozomalni-lekove-formy-1030/> [cit. 2023-10-12].
- [47] ANDRA, Veera Venkata Satya Naga Lakshmi; PAMMI, S. V. N.; BHATRAJU, Lakshmi Venkata Krishna Priya a RUDDARAJU, Lakshmi Kalyani. A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents. Online. *BioNanoScience*. 2022, vol. 12, no. 1, s. 274-291. ISSN 2191-1630. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12668-022-00941-x> [cit. 2024-03-20].
- [48] KYRIAKOUDI, Anastasia; SPANIDI, Eleni; MOURTZINOS, Ioannis a GARDIKIS, Konstantinos. Innovative Delivery Systems Loaded with Plant Bioactive Ingredients: Formulation Approaches and Applications. Online. *Plants*. 2021, vol. 10, no. 6, s. 1–56. ISSN 2223-7747. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants10061238> [cit. 2024-03-12].
- [49] SINANI, Genada; DURGUN, Meltem Ezgi; CEVHER, Erdal a ÖZSOY, Yıldız. Polymeric-Micelle-Based Delivery Systems for Nucleic Acids. Online. *Pharmaceutics*. 2023, vol. 15, no. 8, s. 1–31. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082021> [cit. 2024-03-19].

- [50] NEGUT, Irina a BITA, Bogdan. Polymeric Micellar Systems—A Special Emphasis on “Smart” Drug Delivery. Online. *Pharmaceutics*. 2023, vol. 15, no. 3, s. 1–49. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030976> [cit. 2024-03-19].
- [51] AHMAD, Zaheer; SHAH, Afzal; SIDDIQ, Muhammad a KRAATZ, Heinz-Bernhard. Polymeric micelles as drug delivery vehicles. Online. *RSC Adv*. 2014, vol. 4, no. 33, s. 17028–17038. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C3RA47370H> [cit. 2024-03-19].
- [52] KAUSHIK, Neha; BORKAR, Shweta B.; NANDANWAR, Sondavid K.; PANDA, Pritam Kumar; CHOI, Eun Ha et al. Nanocarrier cancer therapeutics with functional stimuli-responsive mechanisms. Online. *Journal of Nanobiotechnology*. 2022, vol. 20, no. 1, s. 1–23. ISSN 1477-3155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01364-2> [cit. 2024-03-19].
- [53] FARN, Richard J. *Chemistry and Technology of Surfactants*. Blackwell Publishing, 2006. ISBN 978-14051-2696-0.
- [54] MALMSTEN, Martin. *Surfactants and polymers in drug delivery*. Drugs and the pharmaceutical sciences. New York: Marcel Dekker, 2002. ISBN 08-247-0804-0.
- [55] DANTAS, T. N. C.; SANTANNA, V. C.; SOUZA, T. T. C.; LUCAS, C. R. S.; DANTAS NETO, A. A. et al. Microemulsions and nanoemulsions applied to well stimulation and enhanced oil recovery (EOR). Online. *Brazilian Journal of Petroleum and Gas*. 2019, vol. 12, no. 4, s. 251–265. ISSN 19820593. Dostupné z: <https://doi.org/10.5419/bjpg2018-0023> [cit. 2023-12-01].
- [56] ŠMIDRKAL, Jan. *Tenzidy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2020. ISBN 978-80-7592-056-0.
- [57] BARTOVSKÁ, Lidmila a ŠIŠKOVÁ, Marie. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [58] MYERS, Drew. *Surfactant science and technology*. 3rd ed. Hoboken: Wiley, c2006. ISBN 978-0471680246.

- [59] CZAJKA, Adam; HAZELL, Gavin a EASTOE, Julian. Surfactants at the Design Limit. Online. *Langmuir*. 2015, vol. 31, no. 30, s. 8205–8217. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00336> [cit. 2024-02-06].
- [60] EZEALISIJ, Kenneth E.; MBAH, Chika J. a OSADEBE, Patience O. Aqueous Solubility Enhancement of Mirtazapine: Effect of Cosolvent and Surfactant. Online. *Pharmacology*. 2015, vol. 6, no. 10, s. 471–476. ISSN 2157-9423. Dostupné z: <https://doi.org/10.4236/pp.2015.610049> [cit. 2024-01-29].
- [61] PARMAR, Arpan; SINGH, Kulbir; BAHADUR, Anita; MARANGONI, Gerrard a BAHADUR, Pratap. Interaction and solubilization of some phenolic antioxidants in Pluronic® micelles. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, vol. 86, no. 2, s. 319–326. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.015> [cit. 2024-01-29].
- [62] BUDIMAN, Arif; RUSDIN, Agus a AULIFA, Diah Lia. Current Techniques of Water Solubility Improvement for Antioxidant Compounds and Their Correlation with Its Activity: Molecular Pharmaceutics. Online. *Antioxidants*. 2023, vol. 12, no. 2, s. 1–37. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox12020378> [cit. 2024-03-20].
- [63] RATHOD, Sachin; ARYA, Shristi; KANIKE, Shirisha; SHAH, Shailesh A.; BAHADUR, Pratap et al. Advances on nanoformulation approaches for delivering plant-derived antioxidants: A case of quercetin. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022, vol. 625, s. 1–15. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122093> [cit. 2024-03-20].
- [64] DAVARNEJAD, Reza; LAYEGHY, Kiyana; SOLEYMANI, Meysam a AYAZI, Arvin. Encapsulation of Quercetin in a Mixed Nanomicellar System to Enhance its Cytotoxicity against Breast Cancer Cells. Online. *Chemical Engineering and Technology*. 2022, vol. 45, no. 6, s. 1100–1105. ISSN 0930-7516. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ceat.202200025> [cit. 2024-04-01].
- [65] TIWARI, Sanjay. Mannosylated Constructs as a Platform for Cell-Specific Delivery of Bioactive Agents. Online. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2018, vol. 35, no. 2, s. 157–194. ISSN 0743-4863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2018020313> [cit. 2024-04-01].

- [66] ZHAO, Jing; LIU, Juan; WEI, Tuo; MA, Xiaowei; CHENG, Qiang et al. Quercetin-loaded nanomicelles to circumvent human castration-resistant prostate cancer in vitro and in vivo. Online. *Nanoscale*. 2016, vol. 8, no. 9, s. 5126–5138. ISSN 2040-3364. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C5NR08966B> [cit. 2024-04-01].
- [67] TIWARI, Sanjay; SINGH, Kulbir; MARANGONI, Gerrard D. a BAHADUR, Pratap. Amphiphilic star block copolymer micelles in saline as effective vehicle for quercetin solubilization. Online. *Journal of Molecular Liquids*. 2022, vol. 345, s. 1–7. ISSN 01677322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118259> [cit. 2024-04-29].
- [68] AL-SAMYDAI, Ali; AL QARALEH, Moath; AL AZZAM, Khaldun M.; MAYYAS, Amal; NSAIRAT, Hamdi et al. Formulating co-loaded nanoliposomes with gallic acid and quercetin for enhanced cancer therapy. Online. *Heliyon*. 2023, vol. 9, no. 6, s. 1–12. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17267> [cit. 2024-04-05].
- [69] MERCHAN, Martha; SEDLARIKOVA, Jana; SEDLARIK, Vladimir; MACHOVSKY, Michal; SVOBODOVA, Jitka et al. Antibacterial polyvinyl chloride/antibiotic films: The effect of solvent on morphology, antibacterial activity, and release kinetics. Online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010, vol. 118, no. 4, s. 2369–2378. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.32185> [cit. 2024-03-31].
- [70] JINDAL, Neha a MEHTA, S.K. Nevirapine loaded Poloxamer 407/Pluronic P123 mixed micelles: Optimization of formulation and in vitro evaluation. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015, vol. 129, s. 100–106. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.030> [cit. 2024-04-11].
- [71] ČIRIN, Dejan; KRSTONOŠIĆ, Veljko a POŠA, Mihalj. Properties of poloxamer 407 and polysorbate mixed micelles: Influence of polysorbate hydrophobic chain. Online. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2017, vol. 47, s. 194–201. ISSN 1226086X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.11.032> [cit. 2024-04-18].

- [72] SEEDHER, Neelam a KANOJIA, Mamta. Micellar Solubilization of Some Poorly Soluble Antidiabetic Drugs: A Technical Note. Online. *AAPS PharmSciTech*. 2008, vol. 9, no. 2, s. 431–436. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9057-5> [cit. 2024-04-22].
- [73] SINGLA, Pankaj; SINGH, Onkar; SHARMA, Shagun; BETLEM, Kai; ASWAL, Vinod K. et al. Temperature-Dependent Solubilization of the Hydrophobic Antiepileptic Drug Lamotrigine in Different Pluronic Micelles—A Spectroscopic, Heat Transfer Method, Small-Angle Neutron Scattering, Dynamic Light Scattering, and in Vitro Release Study. Online. *ACS Omega*. 2019, vol. 4, no. 6, s. 11251–11262. ISSN 2470-1343. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00939> [cit. 2024-04-24].
- [74] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana; JANALÍKOVÁ, Magda; RUDOLF, Ondřej; PAVLAČKOVÁ, Jana; EGNER, Pavlína et al. Chitosan/Thyme Oil Systems as Affected by Stabilizing Agent: Physical and Antimicrobial Properties. Online. *Coatings*. 2019, vol. 9, no. 3, s. 1–18. ISSN 2079-6412. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/coatings9030165> [cit. 2024-03-22].
- [75] KAUR, Jaspreet; SINGLA, Pankaj a KAUR, Inderpreet. Labrasol mediated enhanced solubilization of natural hydrophobic drugs in Pluronic micelles: Physicochemical and in vitro release studies. Online. *Journal of Molecular Liquids*. 2022, vol. 361, s. 1–9. ISSN 01677322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119596> [cit. 2024-04-18].
- [76] MARTÍ, Meritxell; MARTÍNEZ, Vanessa; LIS, Manuel J.; VALLDEPERAS, Josep; DE LA MAZA, Alfons et al. Gallic acid vehiculized through liposomes or mixed micelles in biofunctional textiles. Online. *The Journal of The Textile Institute*. 2013, vol. 105, no. 2, s. 175–186. ISSN 0040-5000. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00405000.2013.833690> [cit. 2024-04-25].
- [77] GURURAJ, Deepika a VEERICHETTY, Veerabhuvaneshwari. Comparative study on in vitro release kinetics of Gallic acid β Cyclodextrin complex and Gallic acid Pluronic loaded films. Online. *Materials Today: Proceedings*. 2022, vol. 59, s. 1155–1162. ISSN 22147853. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.03.183> [cit. 2024-04-08].

- [78] ZHAO, Liyan; DU, Jianchao; DUAN, Yuwei; ZANG, Ya'ni; ZHANG, Huaisong et al. Curcumin loaded mixed micelles composed of Pluronic P123 and F68: Preparation, optimization and in vitro characterization. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, vol. 97, s. 101–108. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.04.017> [cit. 2024-04-08].
- [79] PATEL, Hemil S.; SHAIKH, Sofiya J.; RAY, Debes; ASWAL, Vinod K.; VAIDYA, Foram et al. Formulation, Solubilization, and In Vitro Characterization of Quercetin-Incorporated Mixed Micelles of PEO-PPO-PEO Block Copolymers. Online. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2022, vol. 194, no. 1, s. 445–463. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03691-w> [cit. 2024-04-11].
- [80] POOL, Hector; QUINTANAR, David; FIGUEROA, Juan de Dios; MARINHO MANO, Camila; BECHARA, J. Etelvino H. et al. Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles. Online. *Journal of Nanomaterials*. 2012, vol. 2012, s. 1–12. ISSN 1687-4110. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2012/145380> [cit. 2024-04-09].
- [81] LI, Si; TANG, Weiwei; SHI, Peng; LI, Mengya; SUN, Jie et al. A New Perspective of Gallic Acid on Calcium Oxalate Nucleation. Online. *Crystal Growth & Design*. 2020, vol. 20, no. 5, s. 3173–3181. ISSN 1528-7483. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c00044> [cit. 2024-04-11].
- [82] LU, Zhen; BU, Cuiping; HU, Weicheng; ZHANG, Hui; LIU, Mengrui et al. Preparation and in vitro and in vivo evaluation of quercetin-loaded mixed micelles for oral delivery. Online. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2018, vol. 82, no. 2, s. 238–246. ISSN 0916-8451. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1419852> [cit. 2024-04-10].
- [83] ANWER, Md. Khalid; AL-MANSOOR, Mohammed A.; JAMIL, Shahid; AL-SHDEFAT, Ramadan; ANSARI, Mohammad Nazam et al. Development and evaluation of PLGA polymer based nanoparticles of quercetin. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, vol. 92, s. 213–219. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.002> [cit. 2024-04-09].

- [84] MATLOUB, Azza A.; ABOUSAMRA, Mona M.; SALAMA, Alaa H.; RIZK, Maha Z.; ALY, Hanan F. et al. Cubic liquid crystalline nanoparticles containing a polysaccharide from *Ulva fasciata* with potent antihyperlipidaemic activity. Online. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018, vol. 26, no. 2, s. 224–231. ISSN 13190164. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.12.007> [cit. 2024-04-09].
- [85] NAIR, Rajesh Sreedharan; BILLA, Nashiru; MOOI, Lim Yang a MORRIS, Andrew P. Characterization and ex vivo evaluation of curcumin nanoethosomes for melanoma treatment. Online. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2022, vol. 27, no. 1, s. 72–82. ISSN 1083-7450. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10837450.2021.2023568> [cit. 2024-04-09].
- [86] NEŠIĆ, I.; STOJILJKOVIĆ, D.; SAVIĆ, S.; TASIĆ-KOSTOV, M. a TADIĆ, V. Stability, antioxidant activity, in vivo safety and efficacy of creams with standardized wild apple fruit extract: a comparison of conventional and biodegradable emulsifiers. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. 2019, vol. 41, no. 3, s. 300–310. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ics.12537> [cit. 2024-04-24].
- [87] HIGGINS, Clare L.; FILIP, Sorin V.; AFSAR, Ashfaq a HAYES, Wayne. Synthesis, characterisation, and performance evaluation of tri-armed phenolic antioxidants. Online. *Tetrahedron Letters*. 2020, vol. 61, no. 28, s. 1–6. ISSN 00404039. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.152127> [cit. 2024-05-04].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonát)
BHA	butylhydroxy anisol
BHT	butylhydroxy toluen
CMC	kritická micelární koncentrace
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DLS	dynamický rozptyl světla
DPPH	difenylpikrylhydrazyl
ESR	elektronová spinová rezonance
FADH ₂	flavinadenindinukleotid
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GA	kyselina gallová
HSPC	fosfolipidy z hydrogenovaných sójových bobů
LUV	velké unilamelární vezikuly
M	extrakt z měsíčku lékařského
MLV	multilamelární vezikuly
mM	mmol·l ⁻¹
NLC	nanostrukturované lipidové nosiče
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
P123	Pluronic 123
P407	Pluronic 407
PBS	fosfátový pufr
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
Q	quercetin

SLN	pevné lipidové nanočástice
SUV	malé unilamelární vezikuly
TBHQ	terc-butyl hydrochinon
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
T80	Tween 80

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma průběhu antioxidační reakce [4]	13
Obrázek 2 Schéma přenosu elektronu [4]	13
Obrázek 3 Struktura quercetinu [26]	17
Obrázek 4 Struktura kyseliny gallové [31]	18
Obrázek 5 Schéma enkapsulace pomocí sprejového sušení [upraveno dle 42].....	23
Obrázek 6 Schéma enkapsulace metodou lyofilizace [upraveno dle 42]	23
Obrázek 7 Schéma metody hydratace tenkého filmu [upraveno dle 45]	24
Obrázek 8 Struktura lipozomů [upraveno dle 47]	25
Obrázek 9 Schéma tvorby polymerní micely z blokového kopolymeru [upraveno dle 52]	27
Obrázek 10 Proces micelizace ve vodném prostředí [upraveno dle 55].....	28
Obrázek 11 Micelární solubilizace [56].....	29
Obrázek 12 Závislost povrchového napětí a adsorpce na koncentraci PAL v roztoku [59]	30
Obrázek 13 Tenziometr EasyDyne Krüs	40
Obrázek 14 Kalibrační roztoky quercetinu	41
Obrázek 15 Solubilizační řada P407/T80 s měsíčkem	42
Obrázek 16 Solubilizační řada P407/P123 s quercetinem	42
Obrázek 17 Odparka Heidolph se zpětným chladičem a se vzorkem.....	43
Obrázek 18 Vzorek směsi P407/T80/M při přípravě metodou tenkého filmu	43
Obrázek 19 Zetasizer Nano series	44
Obrázek 20 Vzorky při stanovení antioxidační aktivity	45
Obrázek 21 Vzorky pro test uvolňování antioxidačních látek.....	47
Obrázek 22 Vzorky systémů s quercetinem po lyofilizaci	47
Obrázek 23 Závislost povrchového napětí na koncentraci směsi P407/T80	49
Obrázek 24 Kalibrační přímka pro quercetin	51
Obrázek 25 Kalibrační přímka pro kyselinu gallovou.....	51
Obrázek 26 Kalibrační přímka pro extrakt měsíčku	51
Obrázek 27 Solubilizační křivky GA v roztoku P407/T80.....	52
Obrázek 28 Solubilizační křivky GA v roztoku P407/P123.....	53
Obrázek 29 Solubilizační křivky Q v roztoku P407/T80	53
Obrázek 30 Solubilizační křivky Q v roztoku P407/P123.....	54
Obrázek 31 Solubilizační křivky M v roztoku P407/T80.....	55
Obrázek 32 Solubilizační křivky M v roztoku P407/P123	55
Obrázek 33 Solubilizační křivky Q a GA v roztoku PC/P407	56
Obrázek 34 Gibbsova volná energie solubilizace GA v systému P407/T80	57

Obrázek 35 Gibbsova volná energie solubilizace GA v systému P407/P123	57
Obrázek 36 Gibbsova volná energie solubilizace Q v systému P407/T80	58
Obrázek 37 Gibbsova volná energie solubilizace Q v systému P407/P123	58
Obrázek 38 Gibbsova volná energie solubilizace M v systému P407/T80	59
Obrázek 39 Gibbsova volná energie solubilizace M v systému P407/P123.....	59
Obrázek 40 Gibbsova volná energie solubilizace GA a Q v systému PC/P407	60
Obrázek 41 Zeta potenciál připravených systémů	62
Obrázek 42 Velikost částic (□ prázdných systémů, ■ systémů s AL) a indexy polydisperzity (○ prázdných systémů, ● systémů s AL) – s Q (a), GA (b), M (c)	64
Obrázek 43 Antioxidační aktivita systémů s aktivními látkami	65
Obrázek 44 Enkapsulační účinnost systémů s aktivními látkami.....	66
Obrázek 45 Množství uvolněné kyseliny gallové v závislosti na čase	67
Obrázek 46 Vzorky s GA ihned po přípravě (a) a po 24 hodinách testu uvolňování (b)	67
Obrázek 47 Množství uvolněného quercetinu v závislosti na čase	68
Obrázek 48 Množství uvolněného měsíčku v závislosti na čase	69
Obrázek 49 Závislost kumulativní koncentrace uvolněného quercetinu ze systému PC/P407 na čase proložená fitovaným modelem dle Rovnice 13	69
Obrázek 50 DSC termogramy pro jednotlivé formulace	72
Obrázek 51 Zhodnocení vlivu teploty a času na viskozitu formulací PC/P407	74
Obrázek 52 Krémové formulace ihned po přípravě (a) a po 4 týdnech skladování při laboratorní teplotě (b) a teplotě 45 °C (c).	75

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Složení jednotlivých nosičů	43
Tabulka 2 Složení fosfátového pufru	46
Tabulka 3 Micelární parametry nosných systémů	50
Tabulka 4 Maximální solubilizační kapacita při různých podmínkách	61
Tabulka 5 Konstanty získané pomocí matematického modelu popisující uvolňování GA ..	70
Tabulka 6 Konstanty získané pomocí matematického modelu popisující uvolňování Q	71
Tabulka 7 Konstanty získané pomocí matematického modelu popisující uvolňování M ...	71
Tabulka 8 Antioxidační aktivita formulací s obsahem systémů s aktivní látkou	73