


# Pickeringovy emulze pro enkapsulaci kurkuminu

Bc. Berenika Kočí

---

Diplomová práce  
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2019/2020

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

Jméno a příjmení: Bc. Berenika Kočí  
Osobní číslo: T180020  
Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Technologie tuků, detergentů a kosmetiky  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Pickeringovy emulze pro enkapsulaci kurkuminu

### Zásady pro vypracování

#### I. Teoretická část

V teoretické části zpracujete literární rešerši na zadané téma. Věnujte se stručně emulzím, jejich typům, vlastnostem, přípravě a charakterizaci. Hlavní pozornost soustřeďte na emulze stabilizované částicemi nanokrystalické celulózy (CNC) a na možnost jejich použití při enkapsulaci bioaktivních látek, konkrétně kurkuminu.

#### II. Praktická část

V praktické části připravte emulze stabilizované kombinací CNC a kaseinátu sodného (CAS) s obsahem kurkuminu. Stanovte vliv formulace na velikost emulzních kapek, enkapsulační efektivitu a stabilitu připravených systémů. Pro charakterizaci připravených emulzí zvolte a použijte vhodné metody. Stanovte základní biologické vlastnosti připravených emulzí. Získané výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

### Seznam doporučené literatury:

1. McClements, D. J., Nanoparticle- and microparticle-based delivery systems: encapsulation, protection and release of active compounds. 2014, Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 978-1-4822-3316-2.
2. Ngwabebhoh, F. A., Erdagi, S. I., Sevinc, I., Yildiz, U.: Pickering emulsions stabilized nanocellulosic-based nanoparticles for coumarin and curcumin nanoencapsulations: *In vitro* release, anticancer and antimicrobial activities. *Carbohydrate Polymers*. 2018, 201, 317?328,
3. Marto, J., Ascenso, A., Simoes, S., Almeida, A. J., Ribeiro H. M.: Pickering emulsions: challenges and opportunities in topical delivery, *Expert Opinion in Drug Delivery*. 2016, 13 (8), 1093-1107
4. Araiza-Calahorra, A., Akhtar, M., Sarkar, A.: Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology*. 2018, 71, 155-169.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

---

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

---

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

Ve Zlíně dne 20. února 2020

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Cílem diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši, která sloužila jako podklad pro zpracování praktické části. Rešerše se věnuje kurkuminu jako aktivní látce, která nese potenciál uplatnění v oblasti kosmetiky či farmacie. Další část je věnována kosmetickým vehikulům vhodným jako nosiče lipofilního kurkuminu. Zvláště je kladen důraz na Pickeringovy emulze stabilizované kaseinátem sodným a částicemi nanokrystalické celulózy. Kurkuminové Pickeringovy emulze jsou následně v praktické části práce připraveny metodou layer-by-layer a charakterizovány pomocí měření velikosti emulzních kapek laserovou difrakcí, stanovení indexu krémování a vizuálního hodnocení stability. Tyto emulze jsou základem pro přípravu emulzních gelů, které jsou následně studovány v kontextu transdermální penetrace kurkuminu *in vitro*.

Klíčová slova: Pickeringovy emulze, kurkumin, kaseinát sodný, nanocelulóza.

## **ABSTRACT**

The aim of the diploma thesis was to describe Pickering emulsions applicable for encapsulation of curcumin and elaborate literary search, which served as a basis for work done in the experimental part of the thesis. Initially it focused on curcumin as an active substance for applications in cosmetics or pharmacy. In the next step, cosmetic vehicles suitable for carrying lipophilic curcumin were discussed. Particular emphasis was put on Pickering emulsions stabilized with sodium caseinate and nanocrystalline cellulose. In the experimental part of the thesis, Pickering emulsions containing curcumin were prepared using the layer-by-layer technique, and were characterized by measuring the size of emulsion droplets by laser diffraction, determination of the creaming index, and visual assessment of their stability. These curcumin-containing emulsions were used for the preparation of emulsion gels, which were subsequently studied in the context of transdermal penetration of curcumin *in vitro*.

Keywords: Pickering emulsion, curcumin, sodium caseinate, cellulose nanocrystals.

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé práce doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. nejen za čas, který věnovala všem společným konzultacím, trpělivost, s jakou k celé práci přistupovala, ale i za to, že mi byla motivací a inspirací během celého mého studia. Taktéž bych chtěla vyjádřit velké díky Ing. Lucii Urbánkové za ochotu a pomoc při provádění experimentální části práce. Poděkování patří také kolektivu laboratoře 533 a 535.

Děkuji rodičům a partnerovi za podporu, trpělivost a pochopení nejen během psaní této práce, ale i během celého studia.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 KURKUMIN</b> .....	<b>11</b>
1.1 SLOŽENÍ .....	11
1.2 VLASTNOSTI.....	12
1.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti .....	13
1.2.2 Biologické vlastnosti .....	14
1.2.3 Zdravotní nezávadnost a bezpečnost kurkuminu .....	18
1.3 DALŠÍ PRAKTICKÉ VYUŽITÍ.....	18
<b>2 ENKAPSULACE KURKUMINU</b> .....	<b>20</b>
2.1 EMULZE.....	20
2.1.1 Klasifikace.....	20
2.1.2 Emulgátory .....	23
2.1.3 Enkapsulace kurkuminu v emulzích typu O/V .....	24
2.2 LIPOSOMY .....	25
2.2.1 Klasifikace liposomů dle jejich struktury a velikosti.....	26
2.3 PICKERINGOVY EMULZE .....	26
2.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti Pickeringových emulzí a částic .....	27
2.3.2 Typy částic .....	29
2.3.3 Nanokurkumin jako stabilizátor Pickeringových emulzí.....	30
<b>3 CELULÓZOVÉ NANOKRYSTALY A KASEINÁT JAKO STABILIZÁTORY PICKERINGOVÝCH EMULZÍ</b> .....	<b>32</b>
3.1 CELULÓZOVÉ ČÁSTICE .....	32
3.1.1 Celulózové nanokrystaly (CNC).....	33
3.1.2 Emulze stabilizované pomocí CNC .....	34
3.2 KASEINÁTY .....	35
<b>4 CHOVÁNÍ STABILIZÁTORŮ PICKERINGOVÝCH EMULZÍ NA ROZHRANÍ OLEJ-VODA</b> .....	<b>37</b>
4.1 LAYER-BY-LAYER POSTUP (LBL).....	37
<b>5 EMULZNÍ GELY</b> .....	<b>41</b>
5.1 GELY.....	41
5.2.1 Gely plněné emulzními částicemi .....	42
5.2.2 Částicové emulzní gely .....	42
5.2.3 Emulzní gely na bázi Pickeringových emulzí.....	42
<b>6 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>43</b>
<b>7 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>45</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>46</b>

<b>8</b>	<b>MATERIÁLY A PŘÍSTROJE</b> .....	<b>47</b>
8.1	MATERIÁLY .....	47
8.2	PŘÍSTROJE .....	47
<b>9</b>	<b>POSTUP PRÁCE</b> .....	<b>49</b>
9.1	PŘÍPRAVA VODNÝCH DISPERZÍ CAS A CNC.....	49
9.2	VÝBĚR VHODNÉHO OLEJE PRO PŘÍPRAVU PICKERINGOVÝCH EMULZÍ A MĚŘENÍ MEZIPOVRCHOVÉHO NAPĚTÍ .....	49
9.3	PŘÍPRAVA OLEJOVÉ FÁZE EMULZÍ S OBSAHEM KURKUMINU .....	50
9.3.1	Stanovení koncentrace kurkuminu v oleji pomocí UV-VIS spektrofotometrie .....	50
9.4	PŘÍPRAVA PICKERINGOVÝCH EMULZÍ.....	51
9.5	CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH EMULZÍ.....	52
9.5.1	Měření velikosti částic .....	52
9.5.2	Stabilita emulze a index krémování (CI) .....	53
9.6	PŘÍPRAVA EMULZNÍCH GELŮ .....	53
9.7	CHARAKTERIZACE EMULZNÍCH GELŮ .....	53
9.7.1	Stanovení množství oleje uvolněného z emulzních gelů po sušení .....	53
9.7.2	Redispergace emulzních gelů.....	54
9.7.3	Stanovení transdermální absorpce <i>in vitro</i> .....	54
<b>10</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>57</b>
10.1	STANOVENÍ MEZIPOVRCHOVÉHO NAPĚTÍ MEZI OLEJOVOU FÁZÍ A DISPERZEMI CAS A CNC .....	57
10.2	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE OLEJOVÉ FÁZE S KURKUMINEM .....	60
10.3	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE EMULZÍ .....	62
10.3.1	Preformulační studie .....	62
10.3.2	Studie I .....	64
10.3.3	Studie II.....	77
10.4	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE EMULZNÍCH GELŮ.....	80
10.4.1	Studie I .....	80
10.4.2	Studie II.....	83
10.5	TRANSDERMÁLNÍ PENETRACE <i>IN VITRO</i> .....	86
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>92</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>94</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>108</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>109</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>112</b>



## ÚVOD

Kurkuma patří mezi velmi známá a hojně využívaná koření. Látka zajišťující jasně žlutou barvu kurkumy a její antioxidační, protizánětlivé a jiné žádoucí vlastnosti, je nazývána kurkumin. Kurkumin je dostupný nejčastěji ve formě prášku, který je získáván z oddenku kurkumy. Z důvodu své lipofility a rychlé degradace v biologickém prostředí, je vhodné pro tuto aktivní látku využít tzv. delivery systému, čili cíleného transportu látky využívaného nejčastěji ve farmacii či v kosmetice. Jako vhodné nosiče kurkuminu se nabízí disperzní systémy, které jsou schopny zapouzdřit kurkumin do své lipofilní fáze. Pickeringovy emulze jsou emulzní systémy stabilizované částicemi, což přináší některé výhody oproti běžným emulzím stabilizovaným povrchově aktivními látkami. Stabilizace emulzí pomocí kaseinátu sodného a nanokrystalů celulózy, kterých je využito v této diplomové práci, je založena na metodě layer-by-layer, tedy na adsorpci jednotlivých vrstev stabilizujících částic na emulzní kapky. Tento postup nejen že umožňuje stabilizaci emulzních kapek a brání rozpadu emulze, ale je také schopen chránit aktivní látky v emulzních kapkách před oxidací či dehydratací. Takto připravené emulze poskytují základ pro přípravu emulzních gelů, které svojí formou vybočují ze zažitých představ o gelech. Jedná se o pevné, ale zároveň měkké formulace nesoucí ve svém obsahu enkapsulovanou aktivní látku, tedy kurkumin.

Experimentální část diplomové práce se zaměřuje na přípravu Pickeringových emulzí stabilizovaných kaseinátem sodným a nanokrystalů celulózy. V olejové fázi tyto emulze nesou rozpuštěný kurkumin, který slouží nejen jako aktivní látka, ale také jako další součást systému, která může ovlivnit výsledné fyzikálně-chemické vlastnosti připravených emulzí a emulzních gelů. Z připravených emulzí byly následně získány emulzní gely obsahující kurkumin, jehož transdermální penetrace byla testována *in vitro* na vzorcích prasečí kůže pomocí Franzových difuzních komůrek.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KURKUMIN

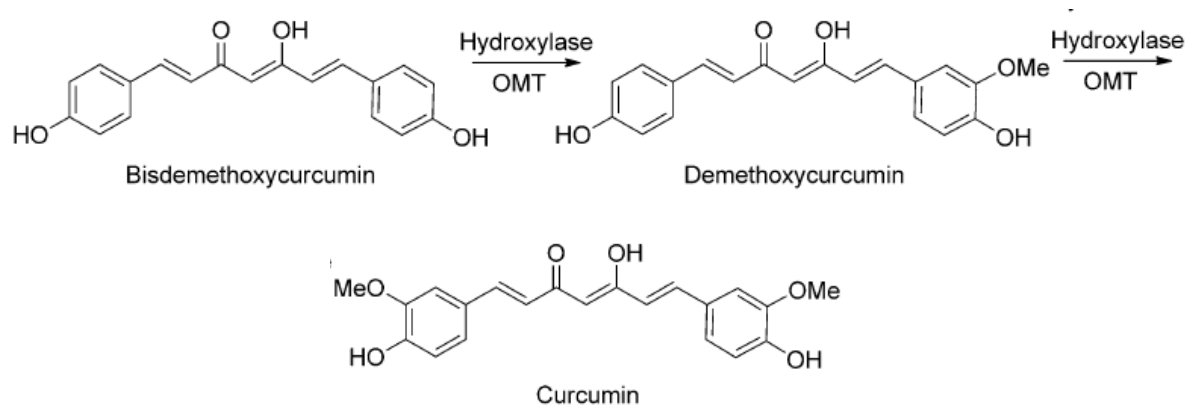
Kurkuma, označovaná také jako indický šafrán, je koření patřící do čeledi zázvorovitých. [1] Jedná se o tradiční surovinu, jejíž oddenek (Obrázek 1) je využíván zejména v asijské kuchyni. Její pěstování je tedy typické zejména pro subtropické oblasti (Indii, Thajsko, Indonésii, Čínu a jiné). [2] Z důvodu své typické chuti a výrazné žluté barvy však rychle našla uplatnění i v jiných oblastech světa. Dlouho byla kurkuma považována pouze za přísadu používanou v oblasti gastronomie, ve 20. století však byly postupně prokázány její pozitivní účinky na lidský organismus, což má za následek skupina látek nazývaných jako kurkuminoidy. [3,1]



Obrázek 1: Oddenek kurkumy. [5]

### 1.1 Složení

Nejčastěji se s kurkumou potkáme ve formě prášku, který obsahuje přibližně 5 % esenciálních olejů a pryskyřic, které jsou zastoupeny hlavně seskviterpeny, a 3–5 % kurkuminoidů. [3,4] Největší podíl ze skupiny kurkuminoidů (50–60 %) tvoří kurkumin, spektrum kurkuminoidů je však velmi pestré. Dalšími zástupci kurkuminoidů jsou nejčastěji deriváty kurkuminu – demethoxykurkumin, bisdemethoxykurkumin, cyklokurkumin,  $\alpha$ -turmeron a jiné.



Obrázek 2: Tři typičtí zástupci skupiny kurkuminoidů. [3]

Kurkumin byl poprvé izolován v roce 1815, avšak jeho struktura byla popsána až o sto let později. Kurkuma obsahuje tři kurkuminové analogy – diferuloylmethan (tvoří přibližně 77 %), demethoxykurkumin (18 %) a bisdemethoxykurkumin (15 %), které vzájemně působí synergicky (Obrázek 2). [2]

Druhý a třetí zmíněný analog, strukturně 4-hydroxycinnamoyl(feuroyl)-methan a bis-(4-(hydroxycinnamoyl)methan, patří mezi diarylheptanoidy a jsou zástupci fenolických pigmentů, které přisuzují kurkumě žluto-oranžovou barvu. Tyto pigmenty se pro další použití získávají extrakcí pomocí organických rozpouštědel a následnou krystalizací. [3,5]

Biosyntéza kurkuminu je mnohostupňový proces, který začíná přeměnou aminokyseliny L-fenylalaninu na *p*-coumaroyl-CoA za přítomnosti vhodných enzymů. Avšak názory na další cestu syntézy kurkuminu v kurkumě se u jednotlivých autorů mírně liší. [3] Po prvním kroku následně vzniká přeměnou vznikajícího bisdemethoxykurkuminu a demethoxykurkuminu kurkumin, za což je zodpovědný enzym hydroxyláza spolu s O-methyltransferázou. Kita a kolektiv tvrdí, že tato cesta je upřednostňována. [6,7] Druhou a snadnější cestu vzniku popisuje Ramirez-Ahmuda a kolektiv ve své publikaci. Kurkumin je syntetizován napřímo bez nutnosti závěrečné hydroxylace. [8]

## 1.2 Vlastnosti

Oblast, ve které se lze s kurkuminem setkat, je velmi široká. Tradičně se používá v gastronomii a Ajurvédě [2], která přinesla základní poznatky k tomu, aby byly účinky kurkuminu ověřeny objektivními vědeckými metodami.

### 1.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

S kurkuminem se nejčastěji setkáme ve formě žluto-oranžového prášku bez zápachu. Prášková forma kurkuminu je získávána ze sušených oddenků kurkumy. Komerčně dostupný prášek však neobsahuje pouze kurkumin, ale taktéž jeho výše zmíněné deriváty v různém zastoupení. Získání čistého kurkuminu v krystalické podobě je finančně velmi nákladné. [2,3]

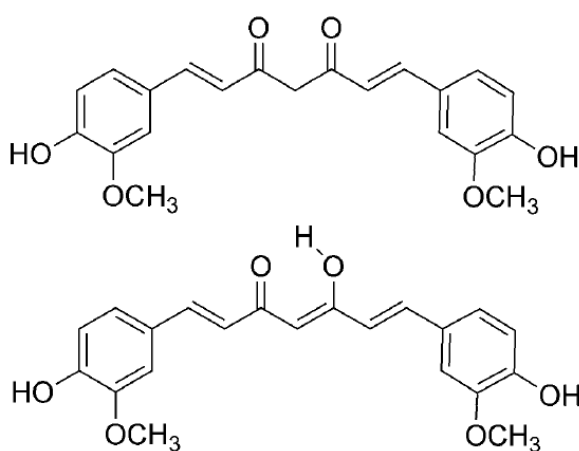
Kurkumin lze nalézt pod sumárním vzorcem  $C_{21}H_{20}O_6$ , jeho molární hmotnost je 368,68 g/mol, obsahuje ze všech svých analogů nejvíce uhlíku, vodíku a má tedy i nejvyšší molární hmotnost. Patří mezi hydrofobní látky (rozpuštěnost ve vodě je pouhých 11 ng/ml při pokojové teplotě) [9], rozpouští se v acetonu, dichlormethanu, chloroformu, kyselině octové či etanolu, ve kterém i slabě fluoreskuje. [4] Vhodné je také kurkumin rozpouštět v olejích. [10] Špatnou rozpustnost molekuly způsobuje přítomnost dvou alkoxy skupin, avšak v případě zvýšení alkality vodného roztoku, je možné kurkumin částečně rozpouštět i v polárních rozpouštědlech. [9,11]

Z chemického hlediska lze kurkumin zařadit mezi nenasycené  $\beta$ -diketony. V tomto případě se jedná o dvě molekuly kyseliny ferulové propojené methylenovým můstkem. Keto vazby  $C=O$  a konjugované dvojně vazby kurkuminu jsou místem, kde dochází k absorpci záření, a jeho molekuly jsou tedy chromofory. [3]

Tauomerizace kurkuminu je způsobena přítomností vodíkových vazeb a je silně ovlivňována pH prostředí. Žlutý pigment kurkuminu je stálý v neutrálním a kyselém prostředí ( $pH > 1$ ), což zapříčiňuje keto forma molekuly, která se chová jako elektronový akceptor, v zásaditém prostředí se jeho barva rychle mění na tmavě červenou až vínovou, což je způsobeno deprotonací funkčních skupin a změnou v enol formu (Obrázek 3, Obrázek 4). [12,13] Kurkuminu lze tímto přičíst vlastnosti acidobazického indikátoru. Vliv na tautomerii má také druh rozpouštědla – v nepolárních rozpouštědlech se kurkumin objevuje pouze v enol formě, a to z důvodu intramolekulárních interakcí, v polárních v diketo formě. [14]



Obrázek 3: Vliv pH na zbarvení kurkuminu (zleva: čerstvá kurkuma, kurkuma při nízkém pH, kurkuma v zásaditém pH a čistý kurkumin). [13]



Obrázek 4: Struktura kurkuminu v keto a enol formě.

Stabilita a degradace kurkuminu je závislá na pH prostředí. V kyselé oblasti (pH 1–6) nedochází k disociaci hydroxylových skupin a molekula je degradována pozvolna. V prostředí organismu (pH  $\pm 7$ ) je jeho stabilita minimální a během třiceti minut dochází k 90% degradaci. [5] Vhodným řešením tohoto problému může být enkapsulace molekuly kurkuminu do vhodného nosiče. Nabízí se například možnost usazení do fosfolipidových liposomů či inkluze do hydrofobních kavit cyklodextrinů. [9,11]

Mezi základní produkty rozkladu kurkuminu patří kyselina ferulová, vanilin a feruloylmethan. [5] Ani u jednoho z uvedených produktů nebyla potvrzena zdravotní závadnost. Vanilin je látkou povolenou a často používanou v potravinářství, kyselinou ferulovou můžeme nalézt v kosmetice. [15]

### 1.2.2 Biologické vlastnosti

V prvních dvou třetinách 20. století byly publikace spojené s tematikou kurkuminu poměrně sporadické, avšak v posledních třiceti letech se množství publikací výrazně

zvýšilo. Důvodem je zjištění vysoké biologické aktivity této molekuly v organismu. Již pohledem na strukturu molekuly se dají odvodit některé z jejích základních vlastností, jako je např. antioxidační schopnost, od níž se odvíjí i další možnosti využití kurkuminu jako aktivní léčebné látky. Potenciál ve využití kurkuminu v této oblasti je obrovský, a to zejména z důvodu minimálních nežádoucích účinků na organismus.

V oblasti chronických onemocnění se aplikace kurkuminu zvažuje u lidí s neurologickým nálezem, jako je Alzheimer či Parkinson, či při léčbě některých typů rakoviny a cukrovky typu 2. U autoimunitních onemocnění by se kurkumin mohl uplatnit při léčbě roztroušené sklerózy nebo revmatoidní artritidy. [16] V této kapitole budou shrnuty vybrané účinky kurkuminu dle jednotlivých preklinických i klinických studií.

### **Kurkumin jako antioxidant**

Fenolická povaha molekuly přináší velké možnosti uplatnění kurkuminu jako antioxidantu. Látky s antioxidační aktivitou mají schopnost přeměnit volné kyslíkové radikály na nereaktivní molekuly. Nejpodstatnější částí molekuly jsou v tomto případě fenolické OH skupiny, která stojí za možností poskytnout vodík. Kurkumin je schopen touto cestou nejen vychytávat vznikající volné radikály, ale také regulovat aktivitu enzymů s oxidační aktivitou, kam spadají například lipooxygenázy. [10,16]

Studie srovnávající antioxidační kapacitu kurkuminu a jeho analogu demethoxykurkuminu uvedla, že kurkumin vykazuje za stejných podmínek daleko vyšší schopnost potlačit peroxidaci lipidů v mikrozomech (frakce vzniklá při dělení buněčného materiálu centrifugací) než jeho analog. To je způsobeno nepřítomností fenolického vodíku v kurkuminovém analogu. Dle studie kurkumin poskytuje vodík 1800krát snadněji než demethoxykurkumin. [10]

Kurkumin je schopen reagovat s azidovými, haloperoxylovými, glutathionovými či některými halogenovými radikály, a to formou elektronového přenosu. V roce 1999 byla provedena srovnávací studie mezi antioxidační aktivitou kurkuminu a  $\alpha$ -tokoferolu, který patří mezi nejvyužívanější a nejdostupnější přírodní antioxidanty. K provedení byla použita pulzní radiolýza, která je schopna zachytit reakci volných radikálů v rámci mili- či nanosekund. Jako metoda byla zvolena schopnost inhibovat peroxidaci lipidů v liposomech indukovaná železnato-askorbátovým systémem pomocí kurkuminu. Výsledkem byla hodnota  $IC_{50}$  (v  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), která odpovídá množství antioxidantu potřebného k 50% inhibici nežádoucí reakce. Zjištěné hodnoty  $IC_{50}$  jsou následující: pro kurkumin

$1,30 \pm 0,13 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , pro  $\alpha$ -tokoferol  $12,53 \pm 0,85 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Z uvedených hodnot lze konstatovat, že antioxidační aktivita kurkuminu ve vztahu k pozastavení peroxidace lipidů je téměř desetkrát vyšší. [17]

### **Protizánětlivý účinek kurkuminu**

Kurkumin je řazen mezi pleiotropní molekuly. Tyto molekuly jsou schopny svým působením vyvolat účinek v různých oblastech organismu. Kurkumin je schopen modulovat zánětlivou odpověď a potlačit aktivitu enzymů podílejících se na zánětlivé reakci. Mezi nevýznamnější interakce můžeme zařadit snižování aktivity cyklooxygenás-2 a lipooxygenás, dále inhibuje účinek zánětlivých cytokinů a některých typů interleukinů. [13,18]

Studie *in vitro* popisují mechanismus účinku kurkuminu na inhibici cytokinů tak, že během tohoto procesu dochází k regulaci aktivity transkripčních faktorů uložených v buňkách makrofágů a monocytů (produkce specifických proteinů), čímž dochází k potlačení exprese cytokinových genů. Mezi další mechanismy jeho působení patří tzv. down-regulation, během které dochází ke snížení množství specifických receptorů na povrchu buňky. Během tohoto mechanismu je kurkumin schopen ovlivnit produkci signálních proteinů (například kinázy C), což vede k pozitivnímu snížení produkce zánětlivých cytokinů. [18]

### **Antikancerogenní účinek**

Možnost využití kurkuminu v léčbě rakoviny se zdá být poměrně vzdálená, avšak preklinické studie vkládají do této molekuly velký potenciál. Léčba by ve většině případů opět vycházela z vynikajícího antioxidačního účinku kurkuminu a možné uplatnění by kurkumin našel např. v léčbě nádorů prostaty, prsu, slinivky břišní, tenkého i tlustého střeva či dalších. [13] Další variantou se zdá být využití kurkuminu jako chemoterapeutika, které bude cíleně vyvolávat apoptózu rakovinotvorných buněk. [19] Dá se tedy předpokládat, že kurkumin by mohl přispět nejen ke stabilizaci stávajícího stavu, ale taktéž likvidaci nežádoucích buněk. [13]

### **Antidiabetický účinek**

*Diabetes mellitus* typu 2 (DM2) je chronické metabolické onemocnění charakteristické insulinovou rezistencí. Tento stav je částečně léčitelný, avšak pojí se s ním další přidružené problémy jako je neuropatie, retinopatie a vaskulární poškození. [20] Typická terapie u této choroby spočívá v podávání bazálního inzulínu, avšak s touto léčbou souvisí časté nežádoucí účinky. Z tohoto důvodu je snaha odborné společnosti nalézt další možnost



léčby v zejména přírodních látkách, jejichž vedlejší účinky na pacientovo zdraví jsou minimální. [16]

Principem působení kurkuminu ve vztahu k DM2 je jeho schopnost působit na regeneraci  $\beta$ -buněk slinivky břišní, k čemuž opět dopomohou antioxidační vlastnosti kurkuminu. Dle různých autorů je kurkumin schopen v organismu snižovat množství volných radikálů, které omezují funkci  $\beta$ -buněk, a taktéž je schopen zabránit cytokinům ve vyvolání indukované smrti  $\beta$ -buněk, čímž dochází k omezení funkce pankreatu. [21,22]

### **Účinky ve vztahu ke kůži**

Kosmetice nejbližší část lidského těla je kůže. Kůže je orgán s ochrannou funkcí a je nejdůležitější bariérou mezi vnitřním a vnějším prostředím. Vnějšími faktory je neustále namáhána a z tohoto důvodu je potřeba chránit i ji samotnou. Již v osmdesátých letech dvacátého století byly vedeny studie s cílem objasnit působení kurkuminu na kůži ve vztahu ke keratózám, kožním karcinomům či psoriáze. [13]

Studie z roku 1987 popisuje léčbu 62 pacientů s rakovinovými kožními lézemi pomocí etanolového extraktu kurkumy či 1% kurkuminové masti. Tato externa byla bezpečná a nevykazovala žádné vedlejší účinky. U pacientů byl zaznamenán výrazně nižší oděr lézí a jejich vyšší suchost. Téměř u všech pacientů byl zaznamenán pokles svědivosti, avšak tento parametr je značně subjektivní a nelze jej objektivně hodnotit. [13]

Psoriáza patří mezi autoimunitní zánětlivá a recidivující onemocnění kůže projevující se porušenou diferenciací keratinocytů. [23] Klinická studie z roku 2000 popisuje postup léčby čtyř skupin probandů s tímto onemocněním. Pro desetičlennou skupinu byl připraven gel obsahující 1 % kurkuminu, další ze skupin nebyla léčena, třetí skupina byla léčena pouze léčivem obsahující analog vitamínu D3 a kontrolní skupina psoriázou postižena nebyla. Následně byla nepřímě hodnocena aktivita fosforylázové kinázy, která ovlivňuje migraci a proliferaci buněk. Aktivita fosforylázové kinázy byla nejnižší u pacientů bez onemocnění, k největšímu poklesu došlo právě při použití kurkuminového gelu v průběhu 3–8 týdnů. [24] V roce 2016 byla provedena placebo studie u lidí trpících psoriázou v pokožce hlavy. Kurkuminové tonikum bylo skupině pacientů podáváno po dobu devíti týdnů, kontrolní skupina aplikovala tonikum bez aktivní látky. Po devíti týdnech došlo k výraznému zlepšení stavu a snížení erytému ve srovnání s kontrolní skupinou. [25]

Photoaging je výsledkem působení UVA záření, volných radikálů a jimi vyvolanými záněty. Za pevnost a napětí v kůži vděčíme zejména zdravé a funkční dermis, která se

skládá z kolagenních a elastinových vláken, které jsou produkovány fibroblasty. [23] Ve studii z roku 2018 byl kurkumin použit jako ochrana fibroblastů během působení UVA záření. Výsledkem bylo potvrzení jeho schopnosti bránit fibroblasty proti UVA záření a taktéž snížení množství volných radikálů atakujících tyto buňky. Tuto studii můžeme pokládat za vhodný základ pro potenciální využití kurkuminu jako fotoprotekční látky. [26]

### 1.2.3 Zdravotní nezávadnost a bezpečnost kurkuminu

Kurkumin je téměř každodenně konzumován v oblastech jižní a východní Asie v množství až 2,5 g denně, což odpovídá přibližně 100 mg kurkuminu. [3] Dle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) je kurkumin řazen mezi povolené přídatné látky potravin a lze jej nalézt pod celosvětově platným kódem E 100. V roce 2010 bylo EFSA vypracováno Vědecké stanovisko k přehodnocení kurkuminu (E 100) jako přídatné látky potravin, kde byly sumarizovány nejnovější informace týkající se jeho bezpečnosti. [27]

Podle Světové zdravotnické organizace a Organizace pro výživu a zemědělství byla již v roce 2004 stanovena průměrná denní dávka (ADI z angl. average daily intake) kurkuminu. 0,3 mg/kg kurkuminu tudíž i při dlouhodobém užívání nezpůsobí zdravotní problémy. Dávka, při které ještě nebyl pozorován nežádoucí účinek (NOAEL z angl. no observed adverse effect level), je téměř stokrát vyšší než ADI (250–300 mg/kg). Kurkumin nepatří mezi kancerogenní látky a taktéž byly vyloučeny jeho genotoxické účinky. [16,27] Jako jediný popsany nežádoucí efekt při dlouhodobém užívání je mírná iritace zažívacího traktu a v některých případech se objevila kontaktní dermatitida. [16]

## 1.3 Další praktické využití

Kurkumový prášek je po staletí hojně využíván zejména v buddhisticky založených zemích během oslav či svateb. Ženy tento prášek užívají v alkalizované formě, což pomáhá k jeho vínovému zabarvení. V severní části Indie byl kurkumin taktéž tradičně používán jako ochrana proti slunečnímu záření bez znalosti jakýchkoliv souvislostí. [1] Nepřímé fotoprotekční vlastnosti kurkuminu byly sice potvrzeny, avšak kurkumin jako samostatný UV protektant nebyl v žádné z publikací doporučen.

Kurkumin je řazen mezi přídatné potravinářské látky, kategorie potravinářská barviva a lze jej najít pod označením E100 a názvem přírodní žluť. [28] V potravinách je využíváno jeho žluté barvy k barvení potravin obsahující vejce, jelikož věrně napodobuje barvu

vaječných žloutků. Kurkuma je samostatně používána jako koření a také je užívána ve formě prášku či tobolek jako potravinový doplněk pro lepší trávení.

V kosmetice se kurkumin taktéž objevuje zejména jako barvivo, které je na seznamu povolených barviv pro kosmetiku Přílohy IV Nařízení Evropského Parlamentu a Rady 1223/2009. Na kosmetických obalech jej můžeme naléznout pod označením CI 75300 (z angl. colour index). S kurkumou je možné se potkat ve vlasové kosmetice jako doplňující barvivo při barvení vlasů. Maceráty kurkumy v olejích lze použít jako masážní či pleťové oleje. Po průzkumu českého i zahraničního trhu lze konstatovat, že s kurkumou je pojí nejčastěji přírodní výrobky a bio kosmetika.

## 2 ENKAPSULACE KURKUMINU

Vzhledem k popsané biologické aktivitě kurkuminu je snaha tuto molekulu aplikovat do organismu v co nejméně upraveném stavu. To však znemožňuje její vysoká lipofilita, nízká absorpce, rychlá degradace a rychlé vyloučení z těla. Vhodnou možností k překonání těchto překážek se zdá být enkapsulace molekuly do tzv. nosiče, který je schopen zajistit stabilitu molekuly během použití a její vhodné dodání na místo určení. Mezi tyto systémy se řadí emulze, liposomy, Pickeringovy emulze, host-hostitelské supramolekulární systémy či hydrogely.

### 2.1 Emulze

Disperzní systém složený z dvou kapalných a vzájemně nemísitelných látek je označován jako emulze. Emulzi dále tvoří disperzní prostředí a dispergovaná látka. Polární, tak i nepolární látky mohou zastupovat obě z těchto rolí. Dle definice UIPAC jsou tyto systémy složeny z částic o velikosti 1–100  $\mu\text{m}$ . [29,30] V závislosti na této skutečnosti jsou emulze tříděny do jednotlivých kategorií (viz. Kapitola 1.1). Emulze jsou typickými zástupci kosmetických přípravků vhodných pro péči o pleť, avšak s emulzemi se můžeme setkat i v oblasti potravinářství, farmacie či výroby polymerů. [30]

#### 2.1.1 Klasifikace

Klasifikace emulzí je založena na několika kritériích, mezi které patří např. složení emulze, velikost částic a jejich stabilita. Od těchto charakteristik se zásadně odvíjí zejména barva a vzhled připravených systémů.

##### 2.1.1.1 Polarita emulze

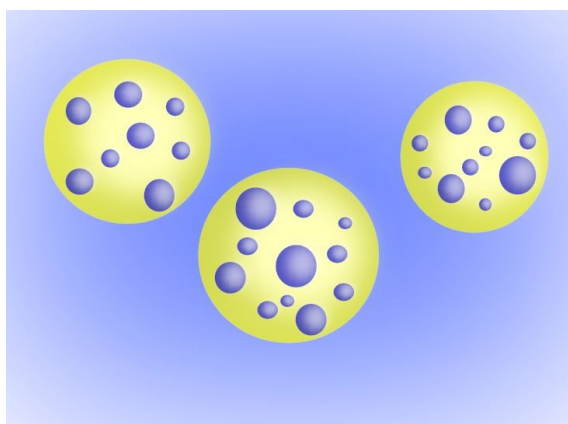
Emulze, jejichž disperzním prostředím je voda či vodný roztok a jejichž dispergovanou fází zastupuje nepolární složka, jsou označovány jako emulze oleje ve vodě (O/V) nebo jako emulze přímé. [31]

U nepřímých emulzí (V/O) dochází k dispergaci vodných kapek do méně polární disperzní fáze. [31]

S oběma typy se můžeme setkat v běžné praxi. Přímé emulze jsou většinou vhodnými hydratačními prostředky a jsou řešením pro aplikaci aktivních látek nerozpustných v polárním prostředí. Zároveň lze tímto mechanismem chránit enkapsulované aktivní látky

proti nepříznivému vlivu vnějších podmínek (oxidační působení, změny pH, nežádoucí interakce aktivní látky s disperzním prostředím).

Můžeme se setkat i se složitějšími systémy, ve kterých tvoří disperzní podíl taky emulze. Tyto systémy jsou označovány jako složené emulze a připravovány jsou dvoustupňovou emulgací. Emulze jsou následně děleny do dvou skupin a to: O/V/O, kdy částice vodné fáze obsahující kapičky oleje jsou obklopeny další olejovou fází. V opačném případě (V/O/V) dochází k umístění kapiček vody do kapek oleje, které jsou obklopeny vodnou fází (Obrázek 5). [31]



Obrázek 5: Příklad složené emulze typu V/O/V. [31]

### 2.1.1.2 Velikost dispergovaných částic

Dle rozměru části jsou emulze kategorizovány do tří tříd (Tabulka 1):

Tabulka 1: Rozměry, vzhled a termodynamické chování jednotlivých tříd emulzí. [32]

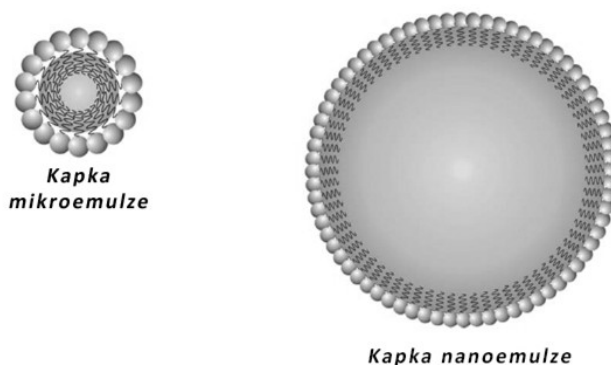
	velikost částic	vzhled	termodynamická stabilita
<b>makroemulze</b>	> 400 nm	mléčné	nestabilní
<b>mikroemulze</b>	10–100 nm	neprůhledné	stabilní
<b>nanoemulze</b>	100–400 nm	transparentní	nestabilní

Velikost částic emulze silně ovlivňuje jejich fyzikálně-chemické chování. Výše uvedené rozměry částic jsou stanoveny pouze orientačně a dle jednotlivých autorů se mohou lišit.

Makroemulze jsou termodynamicky nestabilní z důvodu velkého rozměru dispergovaných kapek. Tyto emulze vznikají spontánně běžným promícháním těchto fází. Během několika málo sekund však dochází k opětovné agregaci částic a následné sedimentaci či krémování. Na tuto skutečnost však nemá vliv pouze velikost částic, ale také viskozita jednotlivých fází a hustota kapiček. [28]

Mikroemulze jsou termodynamicky stabilní v rozmezí určených podmínek a z tohoto důvodu jsou v kosmetice často používanou emulzní formulací. Velikost jejich kapek je obvykle v rozmezí 10–50 nm (Obrázek 6) a ke stabilizaci systému je zapotřebí emulgátoru, tak i tzv. kosurfaktantu. Mikroemulze své uplatnění nachází v rámci osobní hygieny. [33]

Zástupci velmi nestabilních systémů jsou nanoemulze, jejichž nerovnovážné uspořádání vede ke spontánnímu rozpadu (Oswaldovu zrání). Ke stabilizaci je nutné využít povrchově aktivní látky s poměrně vysokou koncentrací. Tímto způsobem je možné nanoemulze stabilizovat na dobu nezbytně nutnou pro jejich následnou aplikaci. Nanoemulze mají největší potenciál využití v oblasti farmacie a biomedicíny. [33,34]



Obrázek 6: Kapička oleje u mikroemulze a nanoemulze stabilizovaná emulgátorem. [33]

### 2.1.1.3 *Stabilita emulzí*

Některé z emulzí vznikají spontánně a spontánně se také rozpadají. Na tento proces má vliv několik důležitých faktorů, které je potřeba si při přípravě emulzí uvědomovat. K nestabilitě připravených emulzí přispívá rozdílná viskozita jednotlivých fází, velikost mezipovrchového napětí na rozhraní olej-voda, způsob přípravy emulze či vliv vnějších podmínek (vibrace, odpar disperzní fáze, aj.). [32]

Zvýšením viskozity kontinuální fáze lze docílit snížení frekvence srážek kapiček, které by jinak mohly růst na úkor menších, což by vedlo k urychlenému rozpadu emulze.

Mezi čtyři základní možnosti rozpadu emulze se řadí krémování a sedimentace, ke kterým dochází z důvodu působení gravitační síly, a flokulace a koalescence, při kterých dochází k agregaci částic. [31]

Mezi zvláštní typy emulzí patří tzv. kritické emulze. Tyto emulze jsou tvořeny dvěma omezeně mísitelnými kapalinami při teplotě blízké kritické teplotě rozpouštěcí. Při této teplotě je mezifázové napětí velmi nízké a k dispergaci stačí pouze prostý pohyb molekul. Existence těchto emulzí silně závisí na teplotě. [31]

### 2.1.2 Emulgátory

U koncentrovanějších emulzí není možné spoléhat při stabilizaci emulze pouze na elektrický náboj. Do emulze je v tomto případě přidávána třetí fáze – emulgátor. Jedná se o molekulu, která napomáhá vzniku emulze a její následné stabilizaci. [35] Emulgátor funguje na principu adsorpce na fázovém rozhraní, která vede k následné tvorbě souvislého a elastického filmu kolem emulzních kapiček. Tímto dojde ke snížení hodnoty mezifázového napětí a zároveň se zabrání opětovnému shlukování dispergovaných kapiček. Podmínkou pro tuto funkci je rozpustnost emulgátoru v jedné z fází tvořící emulzi. [31]

Molekula emulgátoru má amfifilní charakter, část molekuly je hydrofilní a druhá část je lipofilní. Je nutné si však uvědomit, že ne každá molekula amfifilní povahy je automaticky emulgátorem. [34]

Emulgátory se tradičně dělí do tří skupin:

1. asociativní koloidy – do této skupiny řadíme mýdla a smáčedla
2. makromolekulární koloidy – které jsou dále děleny mezi hydrofilní (želatina, škrob, dextry) a lipofilní (asfalt, kaučuk)
3. práškovité emulgátory – jejichž typickou vlastností je nerozpustnost, ale zároveň částečné smáčení oběma fázemi. Mezi hydrofilní prášky jsou řazeny například alkalické sírany železa, niklu či síran olovnatý, lipofilními zástupci jsou uhelný prach nebo jodid rtuťnatý. [33]

### 2.1.3 Enkapsulace kurkuminu v emulzích typu O/V

Pro dodání kurkuminu do prostředí, které je složeno zejména z vody, se jako vhodný systém jeví přímé emulze. Důležitou roli při přípravě těchto emulzí hraje nejen charakter použitého oleje, ve kterém bude kurkumin rozpouštěn, ale i vnější podmínky (teplota, doba inkubace), které mohou rozpustnost kurkuminu výrazně usnadnit. Kurkumin je běžně dostupný v krystalickém stavu, a proto je nutné jej před přípravou emulzního systému předem dispergovat do olejové fáze. Disperzní schopnost oleje je v literatuře označována jako nosnost oleje a závisí na molekulové hmotnosti a polaritě nosného oleje a fyzikálních podmínkách. [36]

Dle studie z roku 2012 má molekulová hmotnost oleje výrazný vliv na rozpustnost kurkuminu. U triacylglycerolů (TAG) obsahujících ve své molekule kratší řetězce je množství atomů kyslíku na jednotku hmotnosti vyšší než u TAG s dlouhými řetězci. U TAG s kratšími řetězci dochází tudíž častěji k dipól-dipól interakcím, což výrazně a pozitivně ovlivňuje rozpustnost kurkuminu. Tento typ TAG je schopen rozpouštět vyšší množství kurkuminu na svůj objem ve srovnání s oleji, které obsahují TAG s dlouhými řetězci. [37] Tomuto odpovídá i Tabulka 2, která přináší srovnání rozpustnosti kurkuminu ve vybraných typech olejů. Tato teorie byla potvrzena Joungem a jeho výzkumným týmem [38] a též v roce 2017 Ma a kolektivem, kteří se zabývali srovnáním rozpustnosti kurkuminu v TAG obsahujících střední délku řetězce a v rostlinných olejích typu: řepkového, lněného či slunečnicového. [39]

Tabulka 2: Rozpustnost kurkuminu ve vybraných rostlinných olejích. [36]

typ oleje	rozpustnost [µg/ml]	vnější podmínky
<b>kokosový</b>	100	60 °C/10 min + 20 min sonikace
<b>olivový</b>	80	60 °C/10 min + 20 min sonikace
<b>kukuřičný</b>	70	60 °C/10 min + 20 min sonikace
<b>sójový</b>	7380	laboratorní teplota / 48 hod

Vyšší teplota pozitivně ovlivňuje schopnost rozpouštět kurkuminové krystaly, jelikož kinetická energie dodaná do systému je teoreticky schopna destabilizovat pevné krystaly a zároveň umožňuje rozpouštědlo do těchto krystalů snadněji pronikat. [40] Vhodnou metodou pro sledování schopnosti oleje rozpouštět kurkumin je UV-VIS spektrofotometrie, kterou ve své studii z roku 2015 využili i Zou a kol., kteří se zabývali rozpustností kurkuminu v kukuřičném oleji. Bylo potvrzeno, že jeho rozpustnost s teplotou



rostla, jelikož zákal testovaného oleje při nejvyšší teplotě rozpouštění (100 °C) byl téměř nulový. Po ochlazení na výchozí teplotu (25 °C) byl však zákal oleje stále nízký, což naznačuje, že i po ochlazení zůstává kurkumin v oleji stále rozpuštěn. [41] Toto chování lze přisoudit McClementsově teorii, která říká, že pokud koncentrace kurkuminu nedosáhne v roztoku koncentrace přesycení, kurkumin z roztoku ve formě krystalů nevypadává. [40]

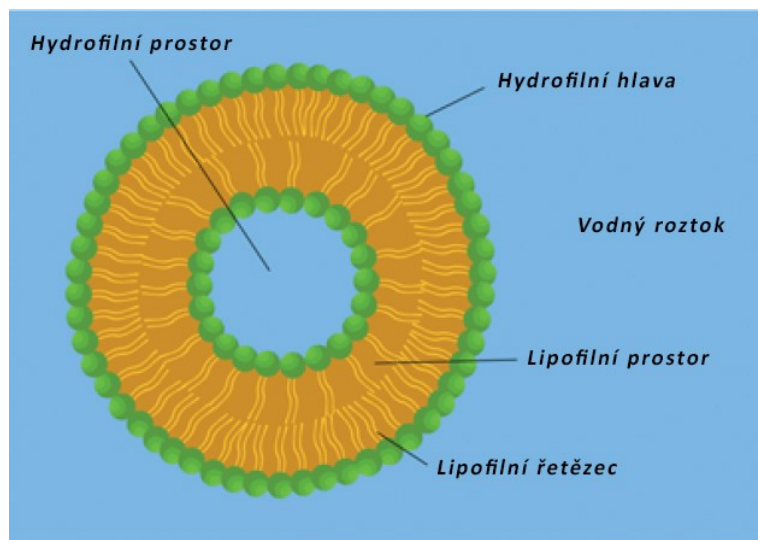
Ke stabilizaci běžných emulzí je využíváno povrchově aktivních látek. Molekula kurkuminu je sice hydrofobní, ale i přesto obsahuje některé polární skupiny, které jsou schopny reagovat s hydrofilními skupinami emulgátorů. Mezi polární jsou řazeny enolické a fenolické skupiny, které jsou schopny elektrostaticky interagovat s kladným nábojem kationicko-neionických složených micel (např. dodecylethyldimethylammonium bromid). Řetězce obsahující methylenovou skupinu naopak reagují s nepolárními částmi micel. [42]

Jelikož je terapeutických účinků kurkuminu dosahováno při jeho vyšším množství, je nutné znát účinnost enkapsulace. Kvantitativně se např. získává z měření hmotnosti kurkuminu zachyceného v systému v poměru k celkovému přidanému kurkuminu. Hodnoty se následně uvádějí v procentech. [40] Často používanou metodou pro stanovení množství enkapsulovaného kurkuminu je rovněž spektrofotometrie v UV-VIS oblasti.

## 2.2 Liposomy

Sférické útvary, jejichž kritický agregační parametr nabývá hodnot větších nebo rovných  $2/3$ , ale zároveň menších než 1, jsou označovány jako liposomy. Jedná se o vezikuly složené z dvojvrstvy fosfolipidů (případně v kombinaci s cholesterolem), kde hydrofilní hlavy jsou orientovány po vnějším i vnitřním obvodu a vnitřní dvojvrstva je tvořena nepolárními řetězci (Obrázek 7). Díky této membráně nedochází k úniku vodného objemu zevnitř liposomu. Velkou výhodou těchto útvarů je schopnost enkapsulace aktivních látek jak lipofilní, tak hydrofilní povahy. [43]

Pomocí liposomů je možné snadněji dodávat aktivní látky dermální cestou, zároveň však snížit jejich absorpci v systému, a lze je považovat za kosmeceutika, která svým chováním kombinují účinek kosmetický a farmaceutický. Dvojvrstvá membrána je za určitých podmínek schopna fúze s buněčnou membránou, čímž dochází k cílenému uvolnění aktivní substancí. [43]



Obrázek 7: Popis struktury liposomu v polárním prostředí. [44]

### 2.2.1 Klasifikace liposomů dle jejich struktury a velikosti

Fosfolipidy díky své amfifilní povaze vytváří v roztoku velké multilamelární útvary. Pro vytvoření menších struktur je nutné dodržet specifické podmínky. Mezi nejmenší struktury patří malé unilamelární liposomy (SUV z angl. small unilamellar vesicles) s průměrem přibližně 25–50 nm. Až stokrát větší jsou velké unilamelární vezikuly (LUV) a mezi největší s průměrem 500–10 000 nm patří velké multilamelární vezikuly (LMV). [44]

S velikostí připravených vezikul souvisí zejména jejich způsob aplikace. SUV jsou útvary s nižší stabilitou a jejich kavita je většinou příliš malá pro enkapsulace vybraného léčiva/aktivní látky. Avšak je důležité myslet i na to, že s rostoucím průměrem klesá schopnost průniku liposomů skrz *stratum corneum*. Z tohoto důvodu své největší uplatnění našly velké unilamelární vezikuly. [44]

### 2.3 Pickeringovy emulze

Jak již bylo zmíněno v minulé kapitole, ke stabilizaci systému skládajícího se z dvou vzájemně nemísitelných kapalin je nutné využít ještě fáze třetí - emulgátoru. Nejběžněji jsou emulze stabilizovány molekulami s amfifilní povahou, avšak jsou známy metody, kdy lze mezifázové rozhraní emulze stabilizovat pomocí částic. Tyto částice mohou být jak organické (různé typy biopolymerů), tak anorganické. Výhoda těchto emulzí, tzv. Pickeringových emulzí, spočívá v absenci surfaktantů, které jsou vedle vonných látek a konzervantů jedny z nejčastějších kožních iritantů.

### 2.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti Pickeringových emulzí a částic

Pickeringovy emulze byly poprvé oficiálně popsány před víc jak stoletím mužem, po němž jsou pojmenovány. [45] Připravené systémy jsou stabilizované částicemi o průměru 200  $\mu\text{m}$  a menšími a obecně se doporučuje, aby částice měly menší velikost než je velikost kapiček připravované emulze (některé studie doporučují, aby průměr částic byl o jeden řád menší než je velikost kapiček, v dalších studiích se však rozdíl zdá být zanedbatelný). [46] Takto malé částice mají schopnost se adsorbovat na rozhraní mezi fázemi a zabránit jevům nestabilizujícím emulze. [47]

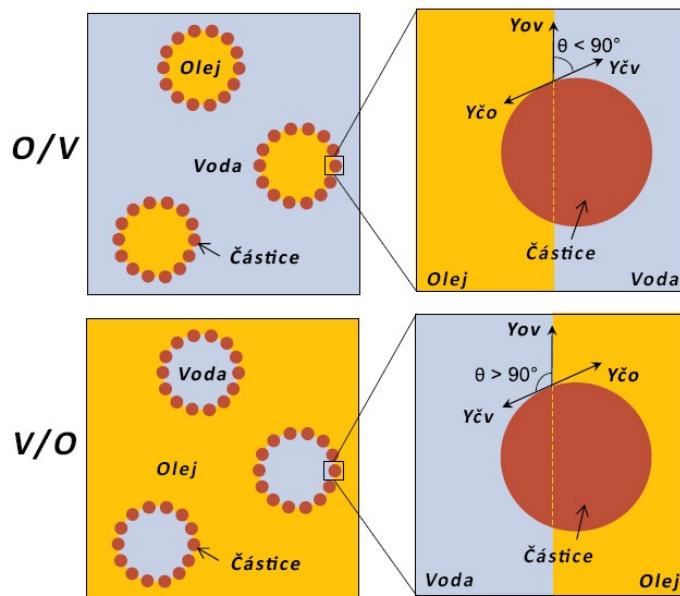
Mechanismus působení částic byl objasněn na základě termodynamických zákonitostí a je založen na přítomnosti sterické bariéry vytvořené pomocí částic adsorbovaných na mezifázovém rozhraní. Tento systém je schopný stabilizovat všechny typy jednoduchých emulzí, i ty složené. Za ekvivalent hodnoty HLB, která je rozhodující při aplikaci surfaktantů v emulzích, se u Pickeringových emulzí dá označit úhel smáčení. Obě tyto veličiny totiž označují relativní afinitu částic k jednotlivým fázím. Typ emulze je poté řízen alternativou k Brancoftovu pravidlu – Frinclovým pravidlem.

Avšak to, zda se vytvoří přímý či nepřímý typ emulze je významně závislé na smáčivosti použité částice. Úhel smáčení je definován Youngovou rovnicí:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{co} - \gamma_{cv}}{\gamma_{ov}} \quad (1)$$

kde  $\gamma_{co}$  odpovídá hodnotě mezifázového napětí mezi částicí a olejovou fází,  $\gamma_{cv}$  mezi částicí a vodou a  $\gamma_{ov}$  mezi olejem a vodou. [46]

Ta fáze, která částici smáčí lépe, se stává spojitou a druhá se stává dispergovanou (Obrázek 8). Emulze typu O/V vznikají za předpokladu, že úhel smáčení mezi všemi třemi fázemi (voda-olej-emulgátor) je menší než  $90^\circ$ . Naopak, pokud je potřeba stabilizovat emulzi V/O, úhel smáčení musí být vyšší než  $90^\circ$ . K získání co nejstabilnějšího systému je vhodné, aby se úhly smáčení příliš nelišily od  $90^\circ$ . Pro přípravu složené emulze je nutné použít dva typy částic. [47]



Obrázek 8: Úhel smáčení u Pickeringových emulzí typu O/V a V/O. [46]

Na stabilitu Pickeringových emulzí má vliv nejen typ a velikost stabilizujících částic, ale také jejich koncentrace, složení a poměr olejové a vodné fáze a proces emulgace. Z Youngovy rovnice však vyplývá, že úhel smáčení je přímo ovlivněn charakterem oleje použitého při přípravě emulze. Při zachování ostatních parametrů v konstantním stavu může povaha oleje stabilitu emulze výrazně ovlivnit. [46]

Jednou z těchto vlastností je viskozita oleje. Vysoká viskozita zabraňuje rovnoměrné difuzi částic a snižuje rychlost jejich adsorpce. Při použití oleje s nižší viskozitou došlo za stejných podmínek k významnému nárůstu objemu emulgovaného oleje. [48]

Velikost částic je dalším důležitým parametrem vedoucím k destabilizaci Pickeringových emulzí. Volná energie adsorpce charakterizuje energii, kterou by bylo potřeba dodat, aby byly částice schopny opustit mezifázový prostor. U částic, které mají stejnou hodnotu úhlu smáčení, avšak rozdílnou velikost, se Gibbsova adsorpční energie zvyšuje s velikostí částice. Gibbsovu energii může taktéž ovlivnit hodnota mezifázového napětí, avšak tato změna není tak významná v porovnání s velikostí částic. U všech zmíněných případů je však adsorpční energie vyšší než energie tepelná, což z energetického hlediska vede k nevratnému ukotvení částic na rozhraní. [49] Pickeringovy emulze proto patří k disperzním systémům s vysokou koloidní stabilitou.

### 2.3.2 Typy částic

Částice stabilizující emulze se mohou lišit jak původem, velikostí, tak i svým tvarem. Žádná z těchto kombinací není univerzální, a proto je potřeba při přípravě Pickeringových emulzí brát v potaz všechny faktory ovlivňující emulzi i její následnou aplikaci.

#### 2.3.2.1 Tvar a rigidita částic

První Pickeringovy emulze byly připraveny pomocí sférických částic, ale zanedlouho poté byly použity i částice ve tvaru tyčinek, elipsoidů, vláknitých klubek, krychlí či polokoulí. [46]

Stability emulzí bylo tedy dosaženo pomocí nesférických částic, avšak mechanismy této stabilizace doposud nejsou zcela objasněny. Zvýšení účinnosti adsorpce na rozhraní lze docílit použitím částic, které jsou schopny se mírně deformovat (například nanokrystaly celulózy či mikrogely). Jejich výhoda spočívá ve flexibilitě vůči kapičkám oleje. Taktéž měkkost částic může (ve srovnání s velmi rigidními strukturami) přispět k lepší adsorpci. Způsob uspořádání částic na rozhraní fází je totiž základem úspěchu pro vytvoření stabilní emulze. [50,51]

V této kapitole budou následně charakterizováni vybraní zástupci částic vhodných pro Pickeringovu stabilizaci.

#### **Oxid křemičitý**

Silika (hydratovaný oxid křemičitý) je příkladem přírodní anorganické látky, která je těžena ze žuly nebo pískovce. Je běžně dostupná a snadno modifikovatelná. V základním stavu je oxid křemičitý silně hydrofilní a má tendence stabilizovat emulze typu O/V z důvodu přítomnosti hydroxylových skupin navázaných na atomech křemíku. Toto lze upravit změnou pH, koncentrace solí či povrchovou modifikací. Hydrofobně modifikovaný oxid přednostně stabilizuje emulze typu V/O. Z tohoto důvodu jsou připravovány cílené modifikace oxidu křemičitého. [46]

#### **Chitosan**

Chitosan je lineární polysacharid připravovaný deacetylací chitinu. Díky přítomnosti amino a hydroxylových skupin je biokompatibilní a biologicky rozložitelný. Pro přípravu Pickeringových emulzí se používá zesíťovaná forma chitosanu. Úspěšnost síťování závisí na pH prostředí, ve kterém reakce probíhá. Obvykle se můžeme setkat s chitosanem síťovaným pomocí glutaraldehydu, tripolyfosfátu sodného či dichlormethanu. K vytvoření

Pickeringových emulzí je možné použít chitosan ve spojení s jinými částicemi. [52] V roce 2015 byla publikována studie týkající se stabilizace emulzí komplexem polystyrenových a chitosanových částic. Bylo potvrzeno, že tento komplex emulzi stabilizuje lépe ve srovnání se stabilitou při použití pouze jedné z komponent. Avšak, poměr mezi jednotlivými komponenty musel být vhodně zvážen, jelikož při nízké koncentraci chitosanových částic docházelo k flokulaci částic polystyrenu. [53]

### **Zein**

Protein zein je získáván extrakcí z kukuřice a jeho použití je spojeno s různými obory. Je ve vodě nerozpustný, což je způsobeno přítomností nepolárních aminokyselin, avšak jeho polarita se dá zvýšit změnou pH prostředí. Již v roce 2012 použili Folder a kol. zeinové částice pro stabilizaci Pickeringových emulzí, a to z důvodu hodnoty úhlu smáčení, který je při vhodném pH mezi všemi třemi fázemi blízký 90°. [346] Avšak zein není schopen emulze stabilizovat ve svém isoelektrickém bodě. Jako vhodná se proto zdá být kombinace zeinu a kaseinátu sodného, který má amfifilní povahu a díky své povrchové aktivitě působí jako klasický emulgátor. [54]

### **2.3.3 Nanokurkumin jako stabilizátor Pickeringových emulzí**

Běžně je kurkumin v emulzních systémech považován za aktivní látku. V roce 2017 Aditya a kol. poprvé využili kurkuminové částice v nanoformě jako stabilizátor Pickeringových emulzí typu V/O. Polymorfní částice nejsou vhodnými stabilizátory Pickeringových emulzí. Za tímto účelem bylo nutné připravit amorfnní kurkuminové částice, které jsou nejen menší, ale také hydrofilnější než částice původní. Pomocí nanoionizační technologie (antisolvent precipitation) byly původní krystalické částice přeměněny a zmenšeny (téměř stonásobně) na amorfnní nanočástice, což bylo potvrzeno změnou některých fyzikálních vlastností kurkuminu, a to změnou teploty tání (z původních  $177 \pm 1$  na  $146 \pm 3$  °C) a poklesem entalpie. Výsledná velikost amorfnních kurkuminových částic byla ~220 nm. [55]

Takto upravený kurkumin byl schopen snížit mezipovrchové napětí z původních přibližně 27 na 15 mN/m (při koncentraci 0,33 mg/ml), což napomáhá nejen samotnému vytvoření emulze, ale i její lepší stabilitě. Kurkumin však sám o sobě není schopen v amorfnní formě setrávat, proto byl do emulzních systémů přidán syrovátkový protein, který je schopen zabránit opětovné krystalizaci kurkuminu. Velkou výhodou takto připravených emulzí je,

že kurkumin zde stále slouží jako biologicky aktivní částice, ale zároveň jsou ke stabilizaci emulzí uplatněny i jeho fyzikální vlastnosti. [55]

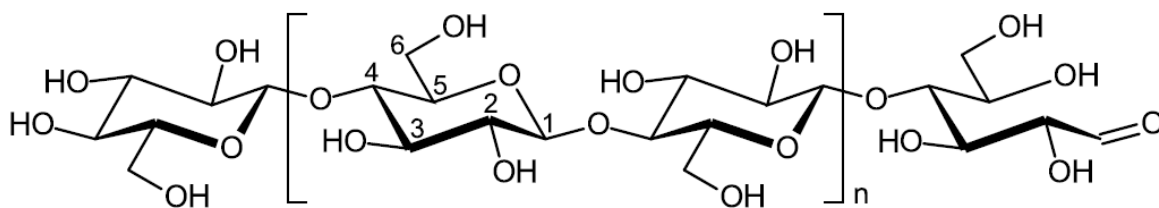
### 3 CELULÓZOVÉ NANOKRYSTALY A KASEINÁT JAKO STABILIZÁTORY PICKERINGOVÝCH EMULZÍ

Vzhledem ke skutečnosti, že jsou v diplomové práci pro přípravu Pickeringových emulzí použity částice nanokrystalické celulózy a kaseinát sodný, budou vlastnosti těchto stabilizátorů podrobněji diskutovány v následujícím textu.

#### 3.1 Celulózové částice

Celulóza patří mezi přírodní materiály. Uplatnění celulózy jako stabilizátoru emulzí je velmi slibné nejen vzhledem k jejím vynikajícím fyzikálně-chemickým vlastnostem a cenové dostupnosti, ale celulóza představuje rovněž vhodnou ekologickou variantu ke komerčním surfaktantům v době, kdy se intenzivně dbá na soulad výrobků s ekologií a udržitelností.

Celulóza se řadí mezi lineární biopolymery, které jsou nepostradatelné při syntéze buněčných struktur vyšších rostlin, které patří mezi základní zdroje tohoto materiálu (dřevo, lýko, traviny aj.). Celulózu lze však ve vyšších množstvích najít i u některých živočichů, např. u pláštěnců. Mezi nejčistší a nejbohatší zdroj celulózy patří lýko, které jí obsahuje ve své sušině 70-80 hm.%. Alternativou ke klasickým zdrojům celulózy patří celulóza připravená biotechnologickými metodami, u kterých se využívá kultur octových bakterií živících se glukózou a produkujících celulózu. [54] Základní strukturní jednotkou celulózy jsou molekuly *D*-glukózy propojené  $\beta$ -1,4-glykosidickými vazbami (Obrázek 9). Tento homopolymer je díky své stavbě chirální, hydrofilní a zároveň rozpustný ve většině organických rozpouštědel. Molekulová hmotnost je odvislá od stupně polymerace molekuly a závisí na zdroji, ze kterého je celulóza získána. [56]



Obrázek 9: Jednotky glukózy propojené  $\beta$ -1,4-glykosidickými vazbami.



Při biosyntéze jednotlivé molekuly celulózy vytváří fibrily. Každé vlákno je tvořeno asi 36 molekulami a jeho průměr je přibližně 5 nm. Poté nastává vyšší organizace do krystalických a amorfních celků o tloušťce až 20 nm, jež nazýváme mikrofibrily. Spojení mikrofibril přináší útvary pozorovatelné ve světelném mikroskopu – makrofibrily. [57]

Částice celulózy, jejichž alespoň jeden z rozměrů nepřesahuje 100 nm, jsou označovány jako nanočástice. Dle svých rozdílných vlastností, rozměrů i způsobu přípravy, jsou celulóзовé nanočástice děleny do tří základních kategorií.

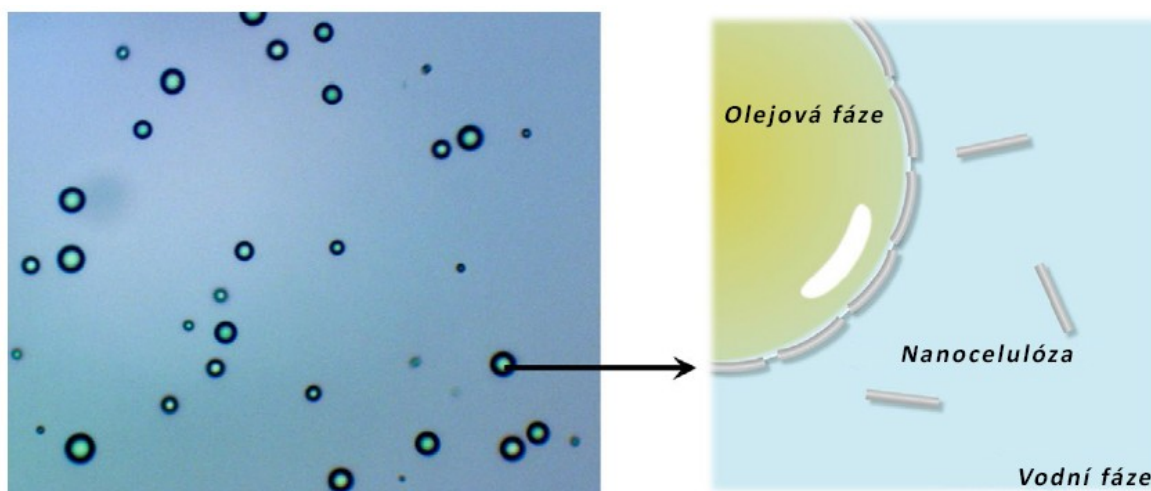
Největší částice obsahuje mikrofibrilární celulóza (MFC), jejíž vlákna mají průměr v rozmezí 10–40 nm a délku v řádu mikrometrů. Celulóзовé nanokrystaly (CNC) pak mají průměr částic v rozmezí 2–20 nm a jejich délka nepřekračuje 600 nm. Poslední jmenovanou s nejmenšími částicemi je bakteriální nanocelulóza (BNC). Obecně lze říci, že nanočástice celulózy si ponechávají původní vlastnosti celulózy jako je hydrofilita, možnost povrchové modifikace a mechanická pevnost. [56,58] Uvedené délky a průměry nanočástic se mohou lišit v závislosti na původu celulózy a metodě přípravy.

### 3.1.1 Celulóзовé nanokrystaly (CNC)

Jedná se o vysoce krystalické útvary, které jsou nejčastěji ve tvaru tyčinek. Obecně se tyto drobné částice získávají mechanickým rozrušením větších celulóзовých fibril. Výsledné parametry částic určuje zdroj celulózy a také její předúprava.

Tradiční příprava CNC spočívá v hydrolýze materiálů bohatých na celulózu, během níž dochází k rozpouštění amorfních oblastí, zatímco krystalická oblast zůstává zachována. Pro kyselou hydrolýzu je využíváno minerálních kyselin (např. kyselina sírová či chlorovodíková). Tuto metodu popsal již ve 40. letech minulého století Rånby a kol. [59] Mezi další, a často energeticky výhodnější úpravy, lze zařadit oxidaci pomocí 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO), fosforylaci či enzymatickou hydrolýzu. [60] Přípravou pomocí peroxodisíranu amonného lze získat karboxylovanou CNC, která na svém povrchu nese karboxylové skupiny. [61]

Nanokrystalům celulózy je přisuzován částečný amfifilní charakter. Povrch tyčinky či vlákna je hydrofilní, avšak okraje vodu odpuzují. Z tohoto vyplývá, že CNC budou primárně stabilizovat emulze typu olej ve vodě (Obrázek 10). [62]



Obrázek 10: Orientace CNC v emulzi typu olej ve vodě. [60]

### 3.1.2 Emulze stabilizované pomocí CNC

Emulze tohoto typu jsou nejčastěji připravovány smícháním oleje a vodné disperze obsahující CNC, při čemž dochází k adsorpci krystalů na rozhraní olej-voda a stabilizaci produktu. Právě hydrofobní okraje jsou zodpovědné za smáčivost téměř zcela hydrofilní částice olejem. [62]

Mechanismus stabilizace emulzí typu O/V pomocí kombinace CNC a celulóзовých mikrokrystalů (CMC) studovali např. Meirelles a kol. V této studii byla taktéž posuzována změna vlastností CNC při různém způsobu přípravy emulze. V prvním případě byl pro přípravu použit pouze homogemizátor (metoda 1), ve druhém případě následovalo ještě použití ultrazvuku (metoda 2). Bylo zjištěno, že při použití homogemizátoru typu rotorstator v kombinaci s ultrazvukem může dojít k rozrušení krystalů a k dalšímu snížení velikosti CMC, což vede ke zvýšení stability i viskozity emulze. CNC napomohlo ke stabilizaci Pickeringovým mechanismem. Velikost dispergovaných emulzních kapek byla velmi malá a jejich distribuce bimodální. Ve srovnání s metodou 1 došlo ke 44% snížení velikosti částic. Za relevantní lze považovat i tvrzení, že ke stabilizaci emulze je nutné znát poměr koncentrací mezi olejem a CNC/CMC. Velké množství krystalů vedlo k flokulaci a následnému krémování emulze. [63]

Při použití CNC jako stabilizátoru emulzí lze očekávat jejich vysokou stabilitu vůči změnám teploty, pH či přidavku elektrolytu do emulze. Důvodem je absence povrchového náboje na CNC. [64] To však neplatí v případě karboxylované CNC, která na svém povrchu nese karboxylové skupiny.

V roce 2017 byla provedena srovnávací studie s cílem objasnit chování substituovaných a nesubstituovaných celulóзовých nanomateriálů (nativních celulóзовých fibril, fibril nesoucích náboj a krystalů CNC). Srovnávané stabilizátory byly schopny tvořit emulze bez přídavku jakéhokoliv surfaktantu, avšak náboj přítomný na nanofibrilách zajistil lepší stabilitu připravených emulzí ve srovnání s emulzemi připravenými z nenabitých částic. Ve výsledku byla stabilita emulzí lepší zejména ve vztahu ke koalescenci než flokulaci kapek emulze. [65]

Charakter substituentu na částicích často určuje její schopnost stabilizovat ten či opačný typ emulze. CNC esterifikované vinyl-acetátem jsou schopné stabilizovat systém ethyl-acetát, toluen či cyklohexan ve vodě, esterifikace vinyl-cinamátem vede ke stabilizaci pouze posledního systému. [66] Modifikace povrchu CNC je však nejčastěji prováděna za cílem vytvoření částice, která preferuje stabilizaci emulze typu V/O. Do této kategorie modifikací jsou zařazeny silylace, některé typy esterifikací či roubování polymerních částic.

### 3.2 Kaseináty

Mezi další zástupce biopolymerů patří proteiny, jejichž základní strukturní jednotku tvoří aminokyseliny. Aminokyseliny jsou vzájemně spojovány během polykondenzace, při které dochází k vytvoření kovalentní peptidové vazby mezi karboxylovou skupinou aminokyseliny a amino skupinou jiné aminokyseliny.

Každá aminokyselina obsahuje ve své molekule dvě skupiny schopné disociace. Při pH rovném izoelektrickému bodu dané aminokyseliny molekula nevykazuje žádný volný elektrický náboj. Pokud však dojde ke změně pH okolního prostředí, aminokyselina se mění v obojetný ion, který nese jak kladný, tak i záporný náboj. Proteiny je tedy možné řadit mezi látky schopné adsorbovat se na mezifázové rozhraní a ovlivňovat zde hodnotu mezifázového napětí pomocí elektrostatické či sterickej bariéry. [67]

Proteiny jsou široce využívány zejména jako potravinářské emulgátory. Do skupiny proteinů patří i kaseináty, které jsou přirozeně přítomny v savčím mléce. Jedná se o poměrně teplotně stabilní proteiny, které se objevují nejčastěji ve spojení s kalciumfosfátem ve formě kaseinových micel. Kasein se vyskytuje ve čtyřech formách –  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - a  $\kappa$ -kasein, kdy  $\alpha_{s1}$ - a  $\beta$ -kasein poskytují nejlepší emulgační účinek. [68] V emulzních formulacích se běžně používá rozpustný kaseinát sodný. Kaseináty jsou kromě emulgace schopné přispět i k lepšímu zahuštění a gelaci výsledného produktu. Ve

srovnání se syrovátkovými proteiny jsou kaseinové molekuly daleko více flexibilní. Obecně jsou cenově dostupné, je snadné je získat a jsou biologicky zcela nezávadné. [67,69] Jejich nevýhoda však spočívá při využití v systémech o pH blízké jejich izoelektrickému bodu (pI ~4,6). V rozmezí hodnot pH 4,5–5,3 dochází totiž ke koagulaci – mezi jednotlivými molekulami kaseinátů vzniká koagulační síť a kaseinát dále není schopen vykonávat funkci emulgátoru. [69,70]

V emulzích typu O/V kaseinát nepředstavuje pouze emulgátor, ale také je schopen fungovat jako enkapsulační činidlo, které chrání aktivní substanci před oxidací a degradací. [71] V roce 2003, Hu a kol. provedli studii týkající se fyzikální a oxidační stability emulzí stabilizovaných pomocí kaseinátu sodného. Oba tyto parametry dosahovaly vysokých hodnot, což bylo způsobeno schopností kaseinátů účinně stabilizovat emulzi. [72]

Kaseinát ovlivňuje i enkapsulační účinnost, která je zásadní při enkapsulaci aktivní látky v systému. Obecně platným pravidlem je, že se zvyšující se účinností enkapsulace, roste stabilita enkapsulovaných lipofilních substancí. Toto bylo potvrzeno ve studii z roku 2007, kdy při použití kaseinátu v kombinaci se sacharidy bylo dosaženo vysoké enkapsulace, která se zvyšujícím se množstvím kaseinátu ještě rostla. Enkapsulační účinnost vyšší než 95 % vedla ke vzniku dlouhodobě stabilní emulze, bohužel to však neznamená, že i ostatní parametry (oxidace aktivní látky a oleje či distribuce částic) zůstaly konstantní. [72]

## 4 CHOVÁNÍ STABILIZÁTORŮ PICKERINGOVÝCH EMULZÍ NA ROZHRAŇÍ OLEJ-VODA

Znalost vlastností stabilizátorů používaných pro přípravu Pickeringových emulzí je předpokladem dalšího rozvoje pokročilých enkapsulačních postupů, při kterých mohou být využívány kombinace dvou i více různých typů stabilizátorů, ať už to jsou polymery, částice nebo klasické surfaktanty. K těmto postupům patří komplexace, ko-adsorpce a technika „vrstvení stabilizátorů“ (layer-by-layer), která je využita v této diplomové práci.

### 4.1 Layer-by-layer postup (LBL)

Na počátku devadesátých let minulého století byla společností Gero Dechcer představena nová metoda přípravy disperzních systémů spočívající v pokrytí částic polymerními povlaky. [73] Tento postup je založen na principu adsorpce, kdy je pevná částice či emulzní kapka obklopena více vrstvami polyelektrolytu či nanomateriálu tvořících okolo částice film založený na elektrostatických interakcích. Kromě elektrostatických interakcí se na procesu podílejí Van der Waalsovy síly, vodíkové můstky a kovalentní interakce. Obalením částice dochází k cílené změně některých vlastností např. lze modifikovat způsob uvolňování léčiva, zvýšit poločas rozpadu částice, zlepšit fyziologickou dostupnost a stabilitu. LBL systém je vhodný jak pro hydrofilní, tak i lipofilní částice. [74] Později se ukázalo, že LBL technologii je možné aplikovat nejen na pokrytí pevných částic, ale i na přípravu emulzních systémů.

Základní atributy Pickeringových emulzí jsou spojeny s minimálním množstvím částic potřebných k přípravě emulzí o daných parametrech a s co nejmenší dosažitelnou velikostí kapiček (za daných podmínek). [67] Při přípravě Pickeringových emulzí typu O/V je důležité, aby částice stabilizující emulzi byly schopny velmi rychlé adsorpce na rozhraní olej-voda, kde na kapičce oleje vytvoří ochrannou vrstvu. Pokud by proces adsorpce byl pomalý, docházelo by ke vzniku větších kapiček oleje obalených částicemi, což by mohlo vést k rozpadu emulze. Mezi jednotlivými typy částic, které jsou v přípravě a stabilizaci emulzí využívány, existují značné rozdíly ve schopnosti adsorbovat se na rozhraní. Proto nelze očekávat stejnou velikost olejových kapiček u emulzí, které byly sice připraveny za stejných podmínek, avšak byl využit jiný typ částic. [75,76] Z tohoto důvodu je velmi vhodné najít ideální kombinaci dvou různých emulgátorů, které společně splňují požadavky pro vytvoření stabilní emulze.

Ochranná vrstva částic naadsorbovaná na rozhraní olej-voda zabraňuje nežádoucí agregaci dvěma způsoby:

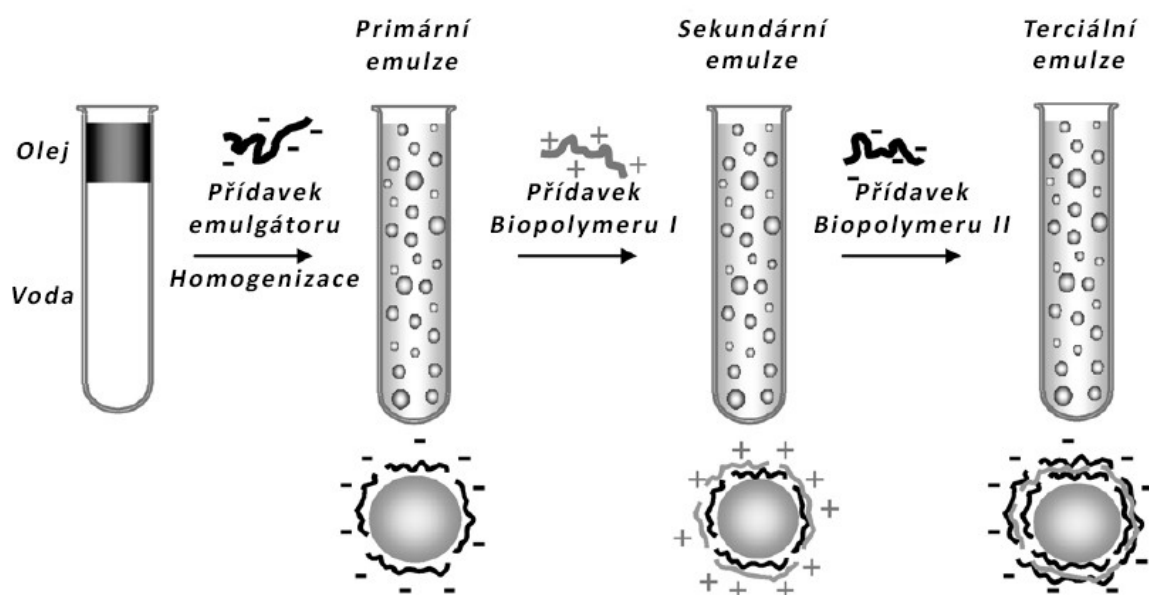
1. Elektrostatické odpudivé interakce mezi dispergovanými kapičkami jsou závislé na iontové síle roztoku, typu rozpouštědla či na hustotě povrchového náboje. Čím vyšší je hustota povrchového náboje a nižší iontová síla roztoku, tím silnější jsou odpudivé interakce. Charakter částic, které jsou adsorbovány na rozhraní, je schopen ovlivnit hustotu náboje a jeho závislost na pH prostředí. Při použití proteinu jako emulgátoru se velikost náboje na kapičce pohybuje v kladných hodnotách při nízkém pH a v záporných hodnotách při vysokém pH. Proteiny je obecně vhodné použít jako částice schopné zabránit agregaci, jelikož jsou velmi citlivé na pH prostředí. K elektrostatickému odpuzování dochází pouze v oblastech pod a nad hodnotou jejich izoelektrického bodu. [75,76,77]
2. Sterická bariéra a její účinnost je částečně ovlivněna schopností adsorpce emulzních částic na kapičku a tloušťkou naadsorbované vrstvy. Čím je kapička lépe obalena, tím je efektivita bariéry vyšší. Mezi vhodné emulgátory zabraňující agregaci kapiček pomocí sterické bariéry patří polysacharidy. Podpořit účinnost sterické bariéry lze zvýšením tloušťky vrstvy, čehož lze dosáhnout opakovanou adsorpcí a vytvořením vícevrstvého systému. [75,77]

Z informací uvedených v bodě 1 a 2 je zřejmé, že nabité biopolymery jsou schopny adsorpce na povrchy jiných nabitých částic, které však nesou opačný náboj. Mezi zástupce vhodných koloidních částic a biopolymerů lze tedy zařadit proteiny, jejichž náboj je závislý na pH okolního prostředí. Uplatnění najdou taktéž celulózové nanočástice, zejména ty nesoucí na svém povrchu karboxylovou či sulfátovou skupinu, zeolitové krystaly a uhlíkové nanotrubky. [74,75]

Komplexy emulgátorů jsou tvořeny kombinací dvou amfifilních látek. Mezi nejznámější patří komplex mezi proteiny a polysacharidy, surfaktanty a polysacharidy a surfaktanty a proteiny. LBL postup zahrnuje využití částic s ionizovatelnými skupinami, které se navzájem liší, a tudíž elektrostaticky přitahují. Tímto způsobem vzniká vícevrstvý systém, který má ve výsledku většinou opačný náboj než původní emulze. Výsledné obalené kapičky jsou stabilnější a vykazují lepší funkční vlastnosti. [78]

U komplexu protein-polysacharid má každá z částic svoji roli. Amfifilní protein ukotvuje celý komplex k olejové kapičce a hydrofilní polysacharid vyčnívá do vodné fáze

a usnadňuje nejen smáčení částice, ale také zabraňuje agregaci kapiček pomocí sterické bariéry. Obecně se dá postup přípravy těchto emulzí popsat následovně (Obrázek 11): v prvním kroku dochází k homogenizaci olejové a vodné fáze, kdy olejové kapičky jsou obklopeny emulgátorem rozpuštěným ve vodné fázi – vzniká primární emulze, jejíž vlastnosti ovlivňují charakter celého komplexu. Následně dochází pomocí přitažlivých sil k adsorpci druhé vrstvy, která obsahuje opačně nabitě částice, a vzniká sekundární emulze, jejíž olejové kapičky jsou obaleny dvěma vrstvami. Tento postup je možné opakovat do té doby, než počet naadsorbovaných vrstev odpovídá zamýšleným vlastnostem systému [78,79]



Obrázek 11: Příprava emulze a vznik LBL systému. [78]

Zajímavostí je, že při přípravě emulze se může využít částic a polyelektrolytů, které nesou souhlasný náboj. Tyto částice se však nepřitahují a proto je nutné pozměnit pH prostředí, čím získáme částice s opačným nábojem. Tento jev je označován jako polyelektrolytická adsorpce. Tohoto lze využít při použití proteinů jako emulgátorů. Proteiny jsou rovnoměrně dispergovány v kontinuální fázi a při změně pH jsou schopny zajistit rovnoměrnou adsorpci. [78]

Vlastnosti celého komplexu jsou určovány první naadsorbovanou vrstvou ve vícevrstevném systému. Každý emulgátor má totiž jiné elektrické vlastnosti, což ovlivňuje vytvořené rozhraní. Kaseináty mají tendenci tvořit silné mezifázové vrstvy, které jsou odolné vůči záhřevu. [78]

Emulze stabilizované LBL systémem nachází velké uplatnění v oblasti potravinářství. Je nutné, aby potravinářské emulze byly stabilní a odolné vůči dalšímu technologickému zpracování či transportu a skladování. Emulze se v potravinářském průmyslu často přeměňují na práškové systémy, které se následně snadněji využívají. Nejčastěji se k získání práškové formy používá sušení, rozprašování či vymrazování (lyofilizace). Důležitou vlastností připravených prášků je jejich opětovná schopnost redispergace ve vodném prostředí, čehož lze dosáhnout přidáním kryoprotektantů (sacharidů či polyolů) do původní emulze. Kryoprotektant je naadsorbován na LBL systém a chrání kapičky tuku během dehydratace. [78]

Studie z roku 2005 poukazuje na lepší finální vlastnosti připravených sušených emulzí, jejichž kapičky byly obaleny komplexem lecitin-chitosan, ve srovnání s kapičkami, které byly obaleny pouze lecitinem. Jako kryoprotektant byl pro tuto studii vybrán maltodextrin a sušení probíhalo rozprašováním a vymrazováním. [80]

Ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu jsou emulze využívány jako systémy s cíleným uvolňováním aktivní látky. Využití klasických jednovrstevných systémů je často limitováno z důvodu malé tloušťky vrstvy obklopující kapičky oleje. U LBL systému je možné pečlivým výběrem komponent ovlivňovat vlastnosti naadsorbované vrstvy, jako je její tloušťka, náboj či propustnost. Řízené uvolňování aktivní látky pak závisí na charakteru první naadsorbované vrstvy a celkovém počtu vrstev v komplexu. [78]



## 5 EMULZNÍ GELY

### 5.1 Gely

Koloidní disperze tvořené trojrozměrnou sítí, která prostupuje celým disperzním podílem, jsou označovány jako gely. Spojité je v tomto případě nejen disperzní prostředí, ale také disperzní podíl, jehož částice nejsou schopny samostatného pohybu v disperzním prostředí. I když je disperzní prostředí kapalné, mají gely z důvodu tohoto uspořádání tuhý charakter. [31]

Lyogely jsou tvořeny kapalným disperzním prostředím a jsou nejběžnějšími zástupci gelů. Jsou řazeny mezi reversibilní gely, po vysušení zmenšují svůj objem a jsou schopny opětovně kapalinu přijmout pomocí bobtnání. Takto se chovají zejména makromolekulární gely a označují se jako xerogely. Ireversibilní gely po vysušení zachovávají svůj původní objem jako původní lyogely, jejich struktura je však porézní. Po vysušení jsou schopny malé množství kapaliny přijmout, avšak lyogel z nich nelze opětovně získat. Vznikají gelací lyofobních solů. [31]

Mezi hlavní důvody použití gelů je jejich poměrně snadná příprava a následné praktické použití, čeho se využívá zejména v oblasti kosmetického průmyslu. Gely tvoří součást řady výrobků pečující či vlasové kosmetiky a setkáváme se také s nimi v oblasti spotřební chemie. V oblasti farmacie je velmi využívána i výroba gelových kapslí. Nevýhoda použití gelů spočívá v jejich stárnutí, kdy u produktů, které nejsou v termodynamické rovnováze, dochází ke smršťování původní struktury a část kapaliny z gelu vytéká. [31]

### 5.2 Emulzní gely

Koloidní systém může existovat ve formě emulze i gelu. Emulzní gel je měkká, ale zároveň pevná směs, která vzniká propojením obou zmíněných forem. Emulzní gel může vzniknout propojením gelu, který je naplněn emulzními kapičkami, kdy výsledné reologické vlastnosti jsou dány charakterem původního gelu. Druhým typem emulzního gelu je částicový emulzní gel. Emulzní kapičky se navzájem přibližují, ale nedochází k jejich splnutí ve větší kapky. Reologie těchto gelů je založena na vlastnostech sítě, která vznikla během agregace částic, např. proteinů, které kapičky obklopují. [81]

### 5.2.1 Gely plněné emulzními částicemi

Gelové matrice plněné emulzními částicemi (z angl. emulsion-filled gels) patří mezi systémy často využívané v potravinářství. Emulzní částice tvoří aktivní nebo neaktivní komponentu emulzního gelu v závislosti na schopnosti ovlivnit vlastnosti gelové matrice. Aktivní plniva jsou připojena ke gelové matici a přispívají k její pevnosti, zatímco neaktivní plniva mají ke gelu nízkou afinitu. [82]

Tyto emulzní gely jsou připravovány dvěma způsoby. Je možné vložit připravenou emulzi přímo do gelové fáze nebo pre-gelačního polymerního roztoku, který je následně podroben gelaci. Gelace polymerního roztoku může být stimulována změnou vnitřního prostředí (změnou pH, teploty nebo iontovou silou roztoku). Emulzní gely obsahující polymerní roztok mají schopnost lépe zadržovat vodu díky tvorbě kompaktnější sítě. [82]

### 5.2.2 Částicové emulzní gely

Částicové emulzní gely využívají cíleného shlukování kapiček, v němž agregované částice tvoří souvislou trojrozměrnou síť. Reologie těchto gelů je závislá na síle interakcí mezi emulzními kapičkami a na jejich deformaci, která je určena tlakem uvnitř kapičky. Pokud je agregace a gelace silná, jedná se o nevratný děj. [82]

### 5.2.3 Emulzní gely na bázi Pickeringových emulzí

Pickeringovy emulze mohou být převedeny v gely, tak jako emulze stabilizované běžnými surfaktanty.

Výroba těchto gelů spočívá v přípravě emulze typu O/V, do jejíž disperzní fáze je buď přidáno gelotvorné činidlo, nebo je využito centrifugace, během níž dochází k agregaci emulzních kapiček a zakoncentrování emulze. Další možností, jak podpořit přípravu emulzních gelů, představují 1) zahřívání celého systému, které je vhodné při přidavku syrovátkových proteinů či proteinů z vaječného žloutku, 2) okyselení či enzymatické ošetření, které je vhodné pro emulze obsahující kaseinát sodný či sójové proteiny a konečně 3) sušení připravených emulzí. Stabilita takto připravených gelů roste se zvyšujícím se pokrytím olejových kapiček proteiny. [81]

Pickeringovy emulze mohou být, kromě proteinů, stabilizovány i polysacharidy. K přípravě těchto gelů je nejčastěji používán škrob, který nejen, že napomáhá Pickeringovy emulze stabilizovat, ale také je schopen po zahřátí vytvořit trojrozměrnou síť a podpořit gelaci. [83]

## 6 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Jelikož se kurkumin v biologickém prostředí velmi špatně vstřebává a rychle degraduje, nabízí se možnost jeho použití především pro topické aplikace na postiženou pokožku. Nosné systémy obsahující kurkumin nesmí pokožku iritovat, musí být kosmeticky přijatelné, netoxické a měly by podporovat penetraci kurkuminu do kůže. Jako vhodná vehikula se zde nabízí masti, které svojí lipofilní povahou zajišťují pro kurkumin vhodné prostředí. Masti však na pokožce tvoří neprodyšný film, který nenapomáhá ke správnému hojení poškozené tkáně. Další možností je využití gelů obsahujících kurkumin, které jsou zároveň schopny kůži částečně hydratovat.

V roce 2008 byly výzkumným týmem Nikunjana a kol. připraveny kurkuminové gely, ve kterých byl nosičem kurkuminu ethanol a jako gelotvorná činidla byla využita hydroxypropylcelulóza a karbopol. Gely taktéž obsahovaly menthol, jelikož je známo, že terpeny jsou vhodné pro zvýšení penetrace aktivních látek do kůže a jsou při nízkých koncentracích minimálně perkutánně dráždivé. Tato studie vedla k závěru, že gely jsou vhodnými nosiči kurkuminu, které se mohou uplatnit při léčbě zánětlivých ložisek na kůži. [84]

Kurkumin je v topických aplikacích využíván z důvodu své schopnosti inaktivovat v kůži aktivitu fosforylázové kinázy, která je spouštěčem zánětlivých procesů. V roce 2017 byl gel obsahující kurkumin uveden do klinické praxe a použit při léčbě popálenin a opařenin. Kinázový enzym je aktivován do 5 minut od poškození kůže, proto je důležité gel na kůži podat co nejrychleji. Probandi účastníci se jmenované studie utrpěli zranění na obličeji a rukou, a rány jim byly gelem ošetřovány každou hodinu. Gel jednoznačně napomohl ke zmírnění erytému, tvorby puchýře i otoku. V tomto případě se kurkumin podílel nejen na inhibici enzymů a tudíž zpomalení zánětlivého procesu, ale také indukoval apoptózu poškozených buněk, což napomohlo k rychlejšímu obnovení kůže. [85]

Literární rešerše provedena na základě dostupné odborné literatury ukázala, že problematika emulzních gelů obsahujících kurkumin nebyla do této doby intenzivně studována. Existuje pouze několik vědeckých publikací, mezi které patří například studie z roku 2017, v níž byly připravovány emulzní gely obsahující kurkumin, xanthanovou gumu a syrovátkový protein. Takto připravené gely splňovaly i po 30 denním skladováním stabilitu a vykazovaly dobré texturní vlastnosti. Na základě výsledků práce se zvažuje jejich následné využití v oblasti potravinářství. [86]

Obliba využití kurkuminu v různých disperzních systémech neustále stoupá. Emulzní gely obsahující kurkumin a možnost ovlivnění vlastností těchto gelů po přidavku kurkuminu se tudíž zdá být slibným námětem pro další výzkum.

## 7 CÍL PRÁCE

Prvním cílem diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši na téma Pickeringových emulzí a jejich použití pro enkapsulace kurkuminu. Teoretická část práce je zaměřena na charakteristiku a využití kurkuminu jako aktivní substance, dále pak na popis kosmetických emulzí se zaměřením na emulze stabilizované částicemi nanokrystalické celulózy (CNC) a kaseinátu sodného a z nich připravené emulzní gely. Teoretická část slouží jako podklad pro následnou praktickou část práce.

Úkolem praktické části diplomové práce bylo připravit emulze stabilizované částicemi CNC a kaseinátem sodným, ve kterých olejová fáze obsahovala rozpuštěný kurkumin, a z těchto emulzí připravit vysušením emulzní gely. Dalším cílem pak bylo emulze i emulzní gely charakterizovat a určit vliv kurkuminu, složení emulzí a metody jejich přípravy na vlastnosti těchto systémů. Práce si rovněž kladla za cíl provést základní charakterizaci studovaných systémů ve vztahu k možnému využití v kosmetice a farmacii.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 8 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

### 8.1 Materiály

Materiály, které byly použity při přípravě Pickeringových emulzí a emulzních gelů jsou uvedeny v následujícím seznamu:

- Olivový olej extra virgin nefiltrovaný (vzorek A: Ill Grezzo 100 % Italian, vzorek B: Costa d'Oro Biologico, vzorek C: DM Bio Natives Olivenol Extra) z obchodní sítě ČR
- Kaseinát sodný (Sigma Aldrich)
- Celulóзовé nanokrystaly, CNC (Cellulforce, Kanada)
- Vodná disperze nanocelulózy a kaseinátu sodného v koncentracích 0,2; 0,3 a 0,5 % - připraveno v laboratoři UTB
- Demineralizovaná voda (Millipore filtrační systém)
- Kurkumin (Sigma Aldrich)
- Chlorid sodný (NaCl)
- Ethylester kyseliny octové (Sigma Aldrich)
- Receptorová kapalina pro stanovení transdermální penetrace o složení:
  - Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Biosera)
  - Polyoxyethylen (20) oleyl ether 1,5 % (Brij 98, Sigma Aldrich)
  - Gentamycin sulfát 0,05 % (HiMedia Laboratories)

### 8.2 Přístroje

Vedle běžného laboratorního vybavení bylo při charakterizaci produktu využito i přístrojů jako:

- Laboratorní váhy (EW 420-3NM, Kern)
- Analytické váhy (BA 110 S, Sartorius)
- Magnetické míchadlo (MR Hei-Standard, Heidolph)
- Optický tenziometr Attensio Theta (Biolin, Finsko)

- Ultrazvukový sonikátor (UP 400St, Heilscher – novější typ, Fakulta technologická; UP 400St, Heilscher – starší typ zařízení, Centrum polymerních systémů)
- Laserový analyzátor částic (Mastersizer 3000, Malvern, UK)
- UV-VIS spektrofotometr (V-750, Jasco)
- Laboratorní centrifuga (EBA 20, Hettich)
- Míchadlo Vortex (Biosan, V-1 plus)
- Přístroj pro stanovení transdermální absorpce (SES GmbH Analysysteme, Německo)
- MPA stanice se sondou Tewametr (Courage + Khazaka electronic GmbH, Německo)



## 9 POSTUP PRÁCE

### 9.1 Příprava vodných disperzí CAS a CNC

Vodná disperze kaseinátu sodného (CAS) byla připravena rozpuštěním jeho vypočítaného a naváženého množství v demineralizované vodě. Disperze byla po dobu čtyř hodin míchána na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě a poté uskladněna v chladničce. Vzhledem k tendenci kaseinátu podléhat mikrobiální degradaci byla čerstvá disperze připravena vždy na začátku každého týdne, ve kterém probíhaly laboratorní práce.

Vodná disperze nanokrystalů celulózy (CNC) byla připravena obdobným způsobem, avšak po čtyřhodinovém míchání byl roztok navíc třikrát po sobě sonikován po dobu jedné minuty při amplitudě 60 %.

### 9.2 Výběr vhodného oleje pro přípravu Pickeringových emulzí a měření mezipovrchového napětí

Pro přípravu Pickeringových emulzí byl, jako nosná olejová fáze pro kurkumin, zvolen olivový olej. Výběr oleje se soustředil na oleje nefiltrované, u kterých se předpokládá, že obsahují vyšší množství fosfolipidů, které mohou přispět k lepší emulgaci i vyšší stabilitě připravených produktů. Byly zakoupeny tři typy olivového nefiltrovaného oleje, u nichž byla postupně měřena hodnota mezipovrchového napětí mezi olejovou a vodnou fází. Měření bylo provedeno pomocí optického tenziometru metodou visící kapky. Obrázek kapky byl zaznamenán pomocí digitální fotografie a mezipovrchové napětí bylo získané iteračním proložením tvaru kapky Young-Laplaceovou rovnicí. Kapky oleje o objemu 60  $\mu\text{l}$  byly vytvořeny pomocí jehly z nerezové oceli o průměru 0,718 mm a byly postupně vypouštěny do vody či vodné disperze CNC nebo CAS.

První měření vedlo ke zjištění hodnoty mezipovrchového napětí mezi olejem a demineralizovanou vodou, následovalo měření mezi olejem a disperzí CAS v koncentračním rozmezí 0,01–1 %. Tyto CAS disperze byly filtrovány, jelikož ani po čtyřhodinovém rozpouštění nebyl CAS dokonale rozpuštěn a přítomné agregáty rušily stanovení.

Obdobně bylo mezipovrchové napětí měřeno pro olej a vodnou disperzi CNC, avšak toto měření nebylo možné spolehlivě provést z důvodu nestability přisedlé kapky oleje.

Poslední měření spočívalo ve stanovení hodnoty mezipovrchového napětí mezi olejovou kapkou a kombinací disperzí CAS a CNC (Tabulka 3). Disperze byly vzájemně kombinovány tak, že do květy ke 2 ml 0,2% roztoku CAS bylo přidáno takové množství vodné disperze CNC, aby byla koncentrace CNC v CAS v rozmezí 0,01–0,2 %. Totéž bylo provedeno pro kombinaci CAS ve vodném roztoku CNC.

Tabulka 3: Množství CNC a CAS v jednotlivých kombinacích při stanovení mezipovrchového napětí jejich směsí.

2 ml 0,2% CAS + x CNC									
x [obj. %] CNC	0,010	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125	0,150	0,175	0,200
x [ $\mu$ l] 1% CNC	20	50	100	150	200	250	300	350	400
2 ml 0,2% CNC + x CAS									
x [obj. %] CAS	0,010	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125	0,150	0,175	0,200
x [ $\mu$ l] 1% CAS	20	50	100	150	200	250	300	350	400

### 9.3 Příprava olejové fáze emulzí s obsahem kurkuminu

Jak bylo nalezeno v literatuře, rozpustnost kurkuminu v oleji byla 1 mg na 1 ml oleje. Do skleněné vialky bylo naváženo přibližně 20 mg kurkuminu a 20 g vybraného olivového oleje. Tato vialka byla následně zahřívána na 60 °C po dobu 10 minut. Po této době byla směs 2,5 minuty sonikována při 60% amplitudě na ledové lázni. V literatuře bylo doporučováno směs oleje a kurkuminu sonikovat přibližně 20 minut, avšak z důvodu velkého zahřevu oleje během sonikace a jeho náchylnosti k degradaci byla tato doba zkrácena. Následně byla směs 10 minut centrifugována (2000 ot/min), jelikož se nikdy nepodařilo rozpustit celé navážené množství kurkuminu. Odstředěný kurkumin zůstal usazen na stěnách zkumavek a olej s rozpuštěným kurkuminem byl slit do čistých vialek.

Kurkumin byl připravován během celé práce opakovaně a to z důvodu možnosti interakce mezi olejem a kurkuminem či degradace kurkuminu.

#### 9.3.1 Stanovení koncentrace kurkuminu v oleji pomocí UV-VIS spektrofotometrie

Na základně platnosti Lambert-Beerova zákona lze snadno odvodit závislost absorbance roztoku na koncentraci absorbující složky. Pro stanovení množství rozpuštěného

kurkuminu v oleji bylo využito UV-VIS spektrofotometru. Pro rozpouštění kurkuminu byl zvolen ethylacetát, ve kterém je nejen kurkumin, ale i olivový olej dobře rozpustný.

Nejprve bylo proměřeno spektrum samotného rozpouštědla, poté bylo proměřeno spektrum ethylacetátu obsahující 0,005 % rozpuštěného kurkuminu. Nejvyšší hodnota absorbance byla naměřena při vlnové délce 416 nm. Při této vlnové délce byly proměřeny i ostatní body kalibrační křivky, kdy ethylacetát obsahoval 0,001–0,005 % kurkuminu.

Tento postup byl následně zvolen i při práci s metanolem jako rozpouštědlem kurkuminu. Nejvyšší hodnota absorbance však byla naměřena při vlnové délce 418 nm a s touto pracovní vlnovou délkou byly následně proměřeny ostatní vzorky.

Připravená kalibrační křivka, jejíž koeficient spolehlivosti byl 0,998, byla základem pro stanovení reálného množství kurkuminu v olivovém oleji. V tomto případě bylo z připravené olejové fáze odebíráno 0,5 ml oleje s kurkuminem do odměrné baňky a doplněno do 100 ml rozpouštědlem. Tento vzorek byl následně proměřen při 416 nm a získaná hodnota absorbance byla dosazena do rovnice kalibrační přímky.

#### 9.4 Příprava Pickeringových emulzí

Princip přípravy emulzí spočívá ve společné ultrazvukové sonikaci olejové a vodné fáze. Emulzní poměr o/v byl 20/80, kdy byly nejprve do vialek naváženy 2 g oleje s kurkuminem a poté, dle cesty přípravy, byly přidávány vodné disperze CAS a/nebo CNC. Pro zvýšení stability emulzí bylo přidáno stanovené množství 1M chloridu sodného.

Emulze byly připraveny třemi cestami, které jsou podrobně popsány v publikaci [87] a schematicky znázorněny v Tabulce 4.

První cesta přípravy (R1) spočívala ve smíchání všech komponent, tedy ke 2 g olejové fáze byly odpipetovány 4 ml 0,2% (0,3; 0,5%) roztoku kaseinátu, 4 ml roztoku 0,2% (0,3; 0,5%) CNC a 50  $\mu$ l 1M roztoku NaCl. Sonikace celé směsi probíhala jednu minutu. Celková koncentrace částic v emulzi tak činila 0,2 % (0,3; 0,5 %) v závislosti na koncentraci výchozích použitých disperzí.

U druhé cesty (R2) byly ke 2 g olejové fáze přidány 3 ml 0,2% (0,3; 0,5%) roztoku kaseinátu a tato směs byla sonikována po dobu jedné minuty. Poté bylo ke směsi odpipetováno 5 ml 0,2% (0,3; 0,5%) roztoku CNC a 50  $\mu$ l 1M NaCl a sonikace probíhala dalších 20 sekund. Celková koncentrace částic v emulzi tak činila 0,2 % (0,3; 0,5 %) v závislosti na koncentraci výchozích použitých disperzí.

Poslední cesta (R3) spočívá v přidání 3 ml 0,2% (0,3; 0,5%) roztoku CNC a 50 µl 1M roztoku NaCl ke 2 g olejové fáze, následované minutovou sonikací. Poté bylo do směsi přidáno 5 ml 0,2% (0,3; 0,5%) disperzního roztoku kaseinátu a celá směs podrobena 20 sekundové sonikaci. Celková koncentrace částic v emulzi tak činila 0,2 % (0,3;0,5 %) v závislosti na koncentraci výchozích použitých disperzí.

Tabulka 4: Schéma přípravy a složení jednotlivých typů emulzí.

	výchozí komponenty	1. sonikace	přídavek	2. sonikace
<b>R1</b>	2 g olejové fáze	60 s	bez přídavku	
	4 ml 0,2% CAS			
	4 ml 0,2% CNC			
	50 µl 1M NaCl			
<b>R2</b>	2 g olejové fáze	60 s	5 ml 0,2% CNC	20 s
	3 ml 0,2% CAS		50 µl 1M NaCl	
<b>R3</b>	2 g olejové fáze	60 s	5 ml 0,2% CAS	20 s
	3 ml 0,2% CNC			
	50 µl 1M NaCl			

## 9.5 Charakterizace připravených emulzí

### 9.5.1 Měření velikosti částic

Emulzní systémy byly charakterizovány analyzátozem velikosti částic Mastersizer 3000, který je schopen stanovit velikost a distribuci velikostí emulzních kapek v rozmezí desítek nanometrů až několika milimetrů. Přístroj pracuje na principu metody laserové difrakce. Měření emulzních systémů probíhá v disperzi, tzv. mokrou cestou za použití automatizované jednotky „Hydro“, díky níž je vzorek dopraven do měřící cely. Jednotka obsahuje také míchadlo (bylo nastaveno na 2200 ot/min) a ultrazvuk, které zajišťují homogenitu vzorku během měření. Měření probíhalo v demineralizované vodě, kterou byla cela před měřením vždy naplněna, a bylo třikrát opakováno. Zadané parametry analýzy byly následující: absorbance emulzních kapek byla nastavena na hodnotu 0,001, index lomu na 1,421 a teplota měření na 25 °C

Sledovaným parametrem byla hodnota D(4,3), která vyjadřuje objemově vážený průměr emulzních kapek v  $\mu\text{m}$  a distribuce velikostí emulzních kapek.

### 9.5.2 Stabilita emulze a index krémování (CI)

Stabilita emulze byla hodnocena vizuálně, index krémování byl stanoven následující rovnicí (2) [88]:

$$CI = \frac{h_{krém}}{h_{celková}} \cdot 100 [\%] \quad (2)$$

kde  $h_{krém}$  značí výšku krémovací vrstvy emulze [mm] a  $h_{celková}$  odpovídá celkové výšce připravené emulze [mm]. Stabilita emulzí byla sledována ihned, 24 hodin, 4 dny, 1 týden, 2 týdny a měsíc po přípravě.

## 9.6 Příprava emulzních gelů

Výše připravené emulze byly buď skladovány za laboratorní teploty ve vialkách ke stanovení dalších charakteristik, anebo byly dále použity k přípravě emulzních gelů. Tato příprava probíhala centrifugací emulzí, pomocí které došlo k rychlému oddělení vodného séra a emulzní vrstvy.

Emulze byly centrifugovány 3 minuty při 6000 otáčkách/min. Odstředěná emulzní vrstva byla opatrně ze zkumavky odebrána a přenesena na předem zváženou Petriho misku. Vybrané emulze byly vloženy do teflonových forem umístěných na Petriho misce, které zajišťovaly stálý tvar gelu při vysychání emulze. Emulzní gely byly sušeny při laboratorní teplotě po dobu 5–7 dní.

## 9.7 Charakterizace emulzních gelů

### 9.7.1 Stanovení množství oleje uvolněného z emulzních gelů po sušení

Schopnost gelu udržet ve své struktuře olej byla stanovena na základě množství oleje uvolněného z emulzního gelu po jeho vysušení. Emulzní vrstva vzniklá centrifugací Pickeringovy emulze byla vložena na předem zváženou Petriho misku a následně byla stanovena hmotnost misky včetně emulzní vrstvy. Po vysušení emulzní vrstvy a vzniku gelu byla opět Petriho miska s gelem zvážena. Následně byl z misky odstraněn emulzní gel a byla zvážena Petriho miska s uvolněným olejem.

Tímto bylo zjištěno množství uvolněného oleje ( $m_o$ ).

Hodnotu charakterizující množství uvolněného oleje RO (released oil) lze získat z rovnice (3):

$$RO = \frac{m_o}{m_{GEL+O}} \cdot 100 [\%] \quad (3)$$

kde  $m_{GEL+O}$  je hmotnost vysušené emulzní vrstvy (g), která byla získána centrifugací.

### 9.7.2 Redispergace emulzních gelů

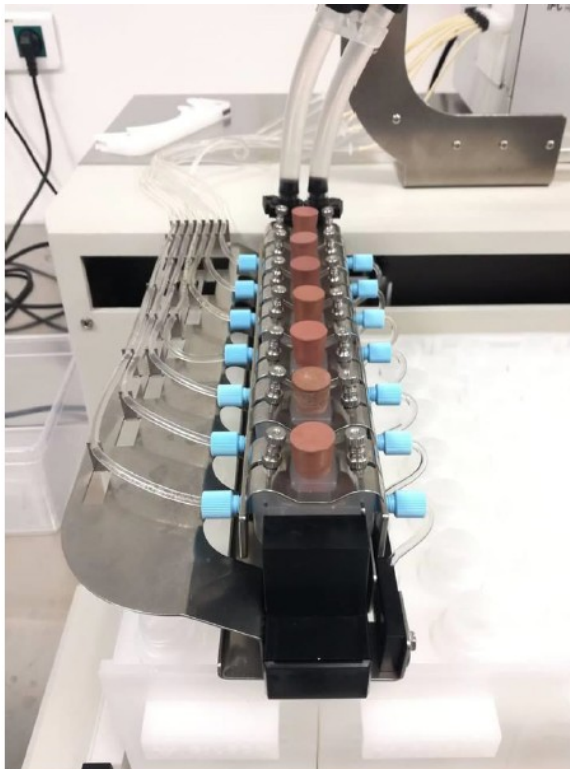
Emulzní gely o hmotnosti přibližně 0,2 g byly vloženy do Eppendorfových vial, do kterých byl přidán 1 ml vybraného dispergačního média. V prvním případě šlo o redispergaci v roztoku surfaktantu TWEEN 20 o koncentraci 0,1 a 0,01 mol/l. Následovala redispergace v demineralizované vodě a vodném roztoku CAS o koncentraci 0,1 a 0,01 mol/l. Po uzavření byly zkumavky promíchány na míchadle Vortex po dobu 10 s a ponechány při laboratorní teplotě. Úspěšnost redispergace byla po měsíci a půl hodnocena vizuálně.

### 9.7.3 Stanovení transdermální absorpce *in vitro*

Prostup enkapsulovaného kurkuminu kožním modelem byl stanoven pomocí transdermální absorpce *in vitro*. Ušní boltce prasete domácího, jehož kůže byla pro dané testování použita, byly uchovávány při  $-20$  °C v mrazničce a před použitím byly šetrně rozmrazeny. Kůže z vnitřní strany ucha prasete byla oholena a odřezána od chrupavky. Během toho nesměla být kůže nijak poraněna, což by vedlo ke zkreslení výsledků. Takto připravený vzorek kůže obsahoval všechny vrstvy *epidermis* i *dermis*. Vzorky o velikosti 2,2 x 2 cm byly podrobeny měření transepidermální ztráty vody (TEWL), kdy výsledná hodnota TEWL nesměla přesáhnout 15 g/m<sup>2</sup>h, čímž byla zajištěna homogenita vzorků a zároveň byly vyloučeny vzorky kůže, jejichž bariérová funkce nebyla zcela v pořádku. Tloušťka kožních vzorků byla na 3 místech změřena pomocí mikrometru.

Aparatura pro stanovení transdermální absorpce *in vitro* se skládala ze sedmi za sebou uložených Franzových komůrek (Obrázek 12), k nimž byly připojeny přívodné a odvodné hadičky na receptorovou kapalinu, jejíž průtok byl nastaven na hodnotu 0,1 ml/min. V systému byla pomocí vodního čerpadla udržována konstantní teplota o hodnotě 32 °C (teplota povrchu kůže). Na vrchní část Franzových komůrek byly uloženy vzorky kůže rohovou vrstvou nahoru, spodní část kůže byla po celou dobu experimentu v kontaktu

s receptorovou kapalinou. Vzorky kůže byly 30 minut ponechány adaptaci na dané podmínky a následně na ně byly položeny připravené vzorky emulzních gelů o hmotnosti ~0,35 g. Penetrace probíhala 24 hodin.



Obrázek 12: Aparatura s Franzovými komůrkami ke stanovení transdermální absorpce. [89]

Následující den byla komůrka otevřena a byly připraveny následující vzorky. Emulzní gel obsahující kurkumin uložený na povrchu kůže během experimentu uvolnil část enkapsulovaného oleje, který byl pomocí mikropipety opatrně odsán a rozpuštěn v 1 ml metanolu a označen jako vzorek 0. Část komůrky, která byla ve styku se vzorkem kůže, byla opláchnuta receptorovou kapalinou, čím byl získán k následné analýze vzorek 1. Zbylý gel byl se vzorku kůže odstraněn a vložen do Eppendorfovy vialky s 1 ml metanolu a označen jako vzorek 2. V místě aplikace gelu byl z kůže vystřížen terčík, který byl podroben strippování (viz dále). Zbytek kůže po vystřížení terčíku byl rozstříhán na malé kousky a označen jako vzorek 3. Stripování bylo provedeno následujícím způsobem: lepicí páskou byly opakovaně odstraňovány vrstvy *stratum corneum* první strip z terčíku byl označen jako vzorek 4, druhý strip jako vzorek 5, třetí a čtvrtý strip společně jako vzorek 6. Vzniklé stripy byly ukládány do Eppendorfových zkumavek s methanolem. Po

strippování následovalo oddělení *epidermis* (vzorek 7) od *dermis* (vzorek 8), čehož bylo dosaženo pomocí vytvoření puchýře, který vzniknul přiložením vzorku kůže na horký povrch plochy vařiče. Puchýř obsahující *epidermis* byl pinzetou sloupnut z *dermis*. Receptorová kapalina z Franzových komůrek pak zastupuje vzorek 9.

Analýza výše zmíněných vzorků, a tedy schopnost kurkuminu procházet jednotlivými vrstvami kůže, probíhala pomocí UV-VIS spektrofotometrie při vlnové délce 418 nm proti methanolu (kap. 9.3.1).

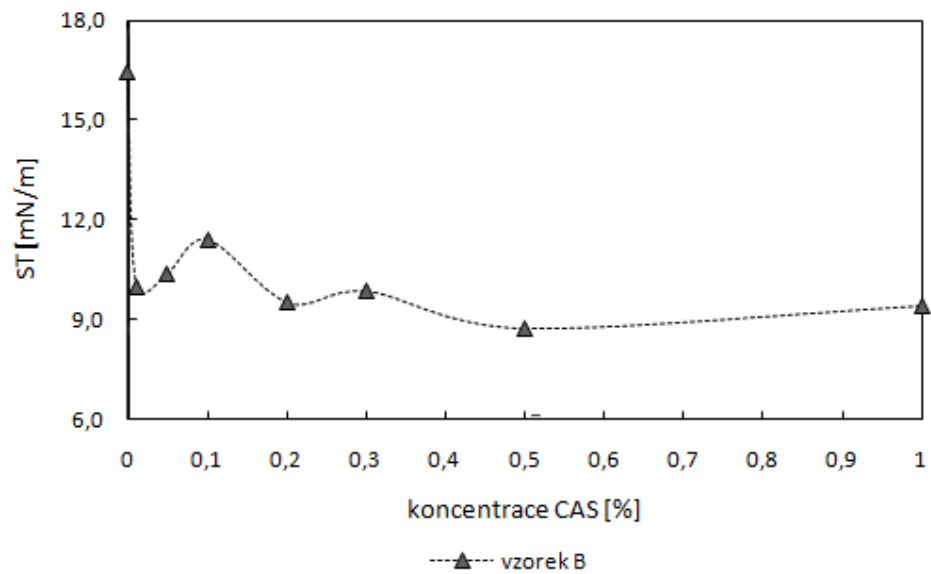


## 10 VÝSLEDKY A DISKUSE

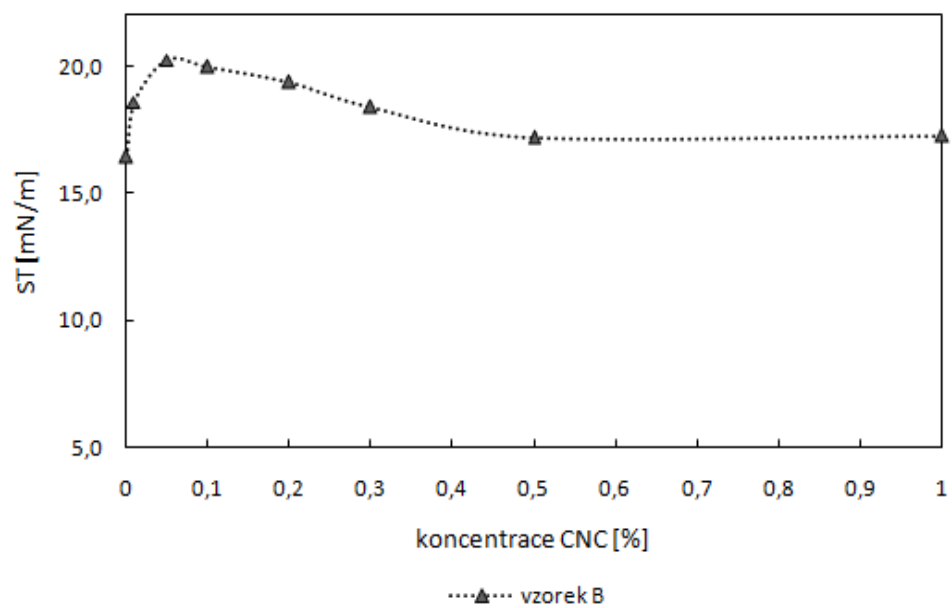
### 10.1 Stanovení mezipovrchového napětí mezi olejovou fází a disperzemi CAS a CNC

V prvním kroku experimentální části bylo provedeno hodnocení tří typů olivových nefiltrovaných olejů na základě měření mezipovrchového napětí (ST, z angl. surface tension) mezi oleji a disperzemi CAS, CNC a jejich směsmi.

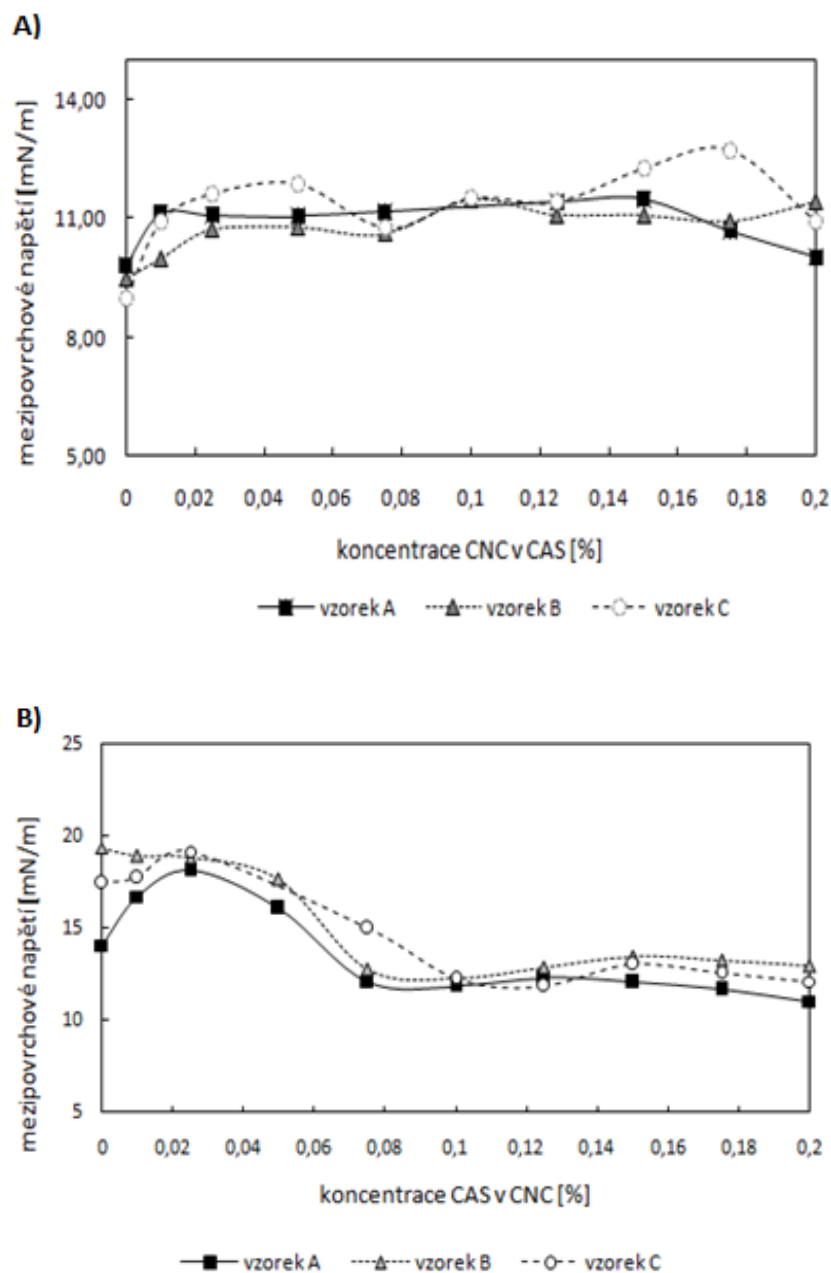
Proměření olejů v disperzích samostatných částic probíhalo v koncentračním rozsahu přídavek 0,01–1 % CAS nebo CNC. Hodnoty mezipovrchového napětí v závislosti na koncentraci částic v disperzi CAS jsou uvedeny na Obrázek 13. Lze na něm pozorovat chování námi zvoleného typu olivového oleje, které bylo v disperzích CAS a CNC (Obrázek 14) zcela odlišné. Disperze CAS, jejíž koncentrace byla pouhých 0,01 %, dokázala výrazně snížit ST z původních 16,4 mN/m (měřeno v demineralizované vodě), na hodnotu 9,95 mN/m. S rostoucí koncentrací CAS pak hodnota ST mírně kolísala, avšak poté se ustálila na hodnotě ~10 mN/m. Průběh měření ST mezi olejem a disperzí CNC vykazoval opačný trend a v tomto případě nedošlo v přítomnosti CNC částic k žádnému poklesu hodnoty ST oproti počáteční hodnotě mezipovrchového napětí stanoveného v demineralizované vodě. Tímto měřením lze tedy potvrdit, že molekuly CAS vykazují povrchovou aktivitu, která při přípravě emulzí hraje klíčovou roli a zajišťuje dostatečné snížení ST pro vznik stabilního emulzního systému. Naproti tomu částice CNC povrchově aktivní nejsou a budou tedy stabilizovat emulze Pickeringovým mechanismem.



Obrázek 13: Mezipovrchové napětí na rozhraní olej-disperze CAS. Závislost na koncentraci disperze CAS.



Obrázek 14: Mezipovrchové napětí na rozhraní olej-disperze CNC. Závislost na koncentraci disperze CNC.



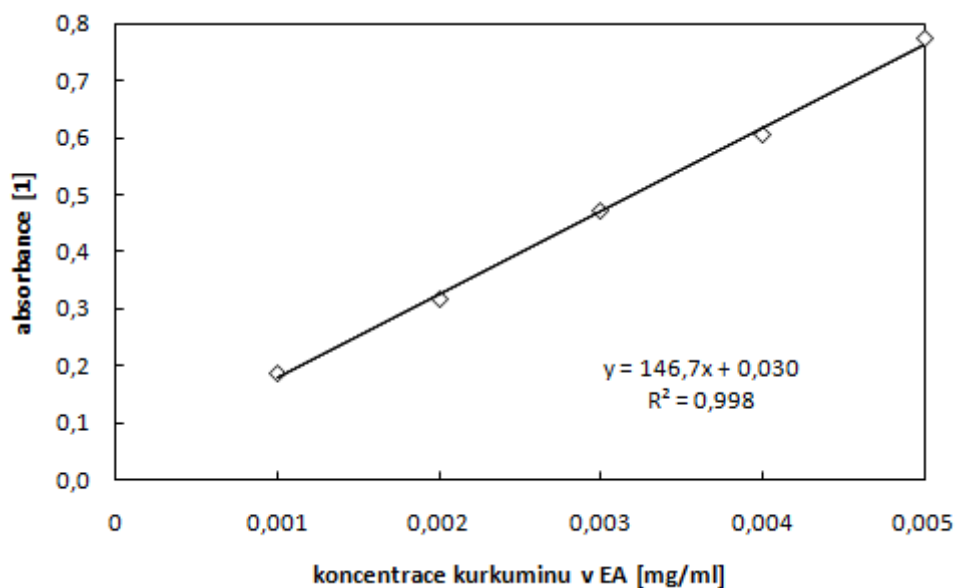
Obrázek 15: Závislost mezipovrchového napětí na koncentraci disperzí. A) 0,2 % CAS + CNC B) 0,2 CNC % + CAS. Stanoveno pro tři různé typy olivového oleje.

V případě měření ST mezi olejem a kombinací disperzí CAS a CNC vykazovaly závislosti rovněž rozdílný charakter. Po přidavku CNC do disperze CAS (Obrázek 15 A) nedocházelo k výrazným změnám hodnot ST, avšak v opačném případě, tedy po přidavku CAS do CNC disperze lze na Obrázku 15 B pozorovat významný pokles ST způsobený přítomností CAS. Při koncentraci 0,075 % CAS v CNC disperzi došlo u všech tří testovaných olejů k poklesu hodnot ST, který však zůstal se vzrůstající koncentrací CAS

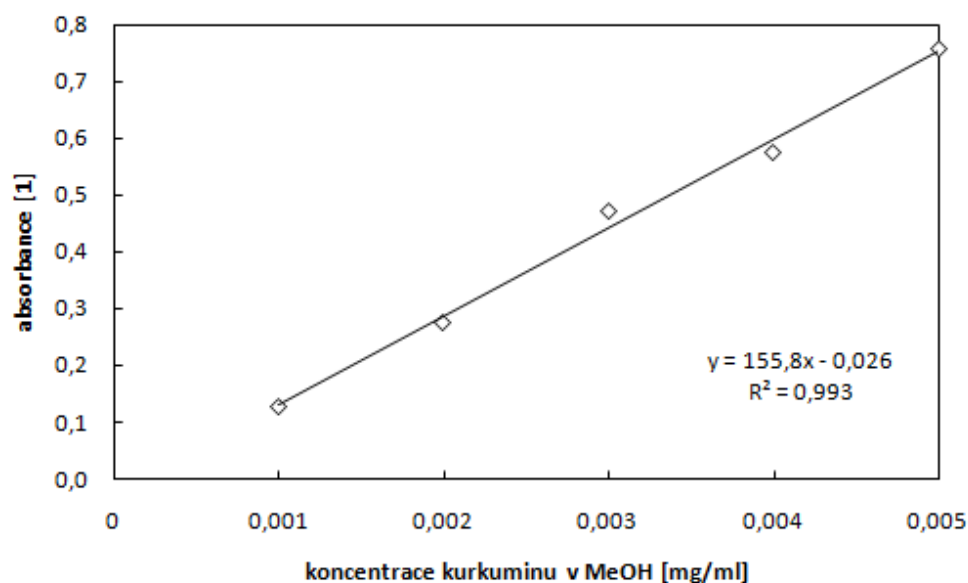
konstantní. Toto zjištění potvrzuje povrchovou aktivitu CAS, která byla prokázána a dokumentována na Obrázku 13. Obdobné závěry o vlivu CAS a CNC na mezipovrchové napětí byly publikovány pro systém s hexadekanem jako olejovou fází i v práci Pindřáková a kol. [87]

## 10.2 Příprava a charakterizace olejové fáze s kurkumínem

Olejová fáze byla připravena způsobem pospaným v kapitole 9.3. Následně bylo nutné ověřit rozpustnost kurkuminu v olivovém oleji, což bylo provedeno pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Analýza byla provedena ve dvou systémech, a to po rozpuštění kurkuminu v ethylacetátu (EA; Obrázek 16) a methanolu (MeOH; Obrázek 17). I když v obou systémech byly výsledky stanovení uspokojivé, byl z praktických důvodů pro další práci zvolen MeOH. Methanol sice není schopen zcela rozpouštět olivový olej, avšak kurkumin v něm byl zcela rozpustný.



Obrázek 16: Kalibrační křivka kurkuminu rozpuštěného v EA.

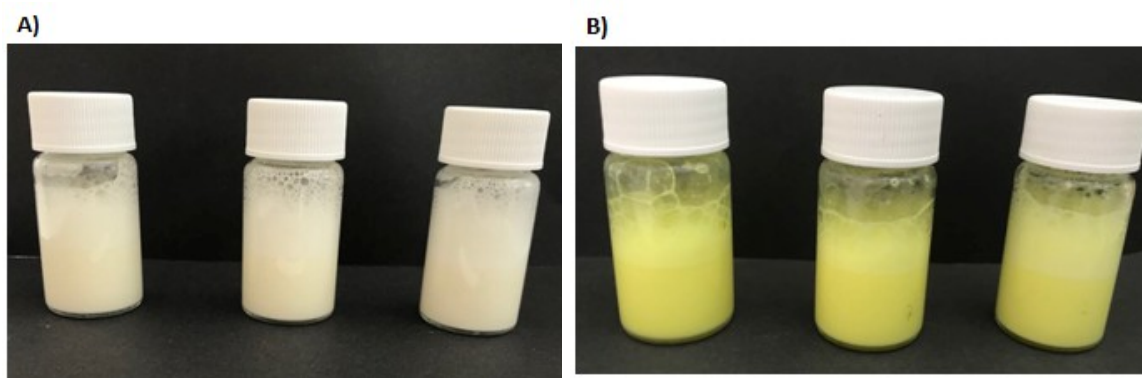


Obrázek 17: Kalibrační křivka kurkuminu rozpuštěného v MeOH.

Měření absorpance u připravených vzorků olejové fáze s kurkuminem probíhalo vždy třikrát a její průměrná hodnota byla následně použita v rovnici regrese pro zjištění reálného množství kurkuminu v olejové fázi. Skutečné množství kurkuminu rozpuštěného v olivovém oleji stanovené pomocí spektrometrie se pohybovalo v rozmezí 4–7 mg kurkuminu na 20 ml olejové fáze. Z toho je zřejmé, že nedošlo k rozpuštění veškerého naváženého množství kurkuminu, které činilo 20 mg na 20 ml oleje. Ztráty byly nejčastěji způsobeny manipulací vzorku při rozpouštění a zahřívání, např. jeho zachycením na stěnách vialek, kdy nerozpuštěný kurkumin byl následně z olejové fáze odstraněn pomocí centrifugace.

### 10.3 Příprava a charakterizace emulzí

Při přípravě Pickeringových emulzí byly využity tři cesty (způsoby) přípravy popsané v kapitole 9.4. Emulze byly připravovány jak s olejovou fází bez kurkuminu, tak i s kurkuminem (Obrázek 18) a s celkovou koncentrací stabilizujících částic 0,2; 0,3 a 0,5 %. V pozdější fázi experimentu byly emulze připravovány pouze s kurkuminem a množstvím částic 0,3 a 0,5 %.



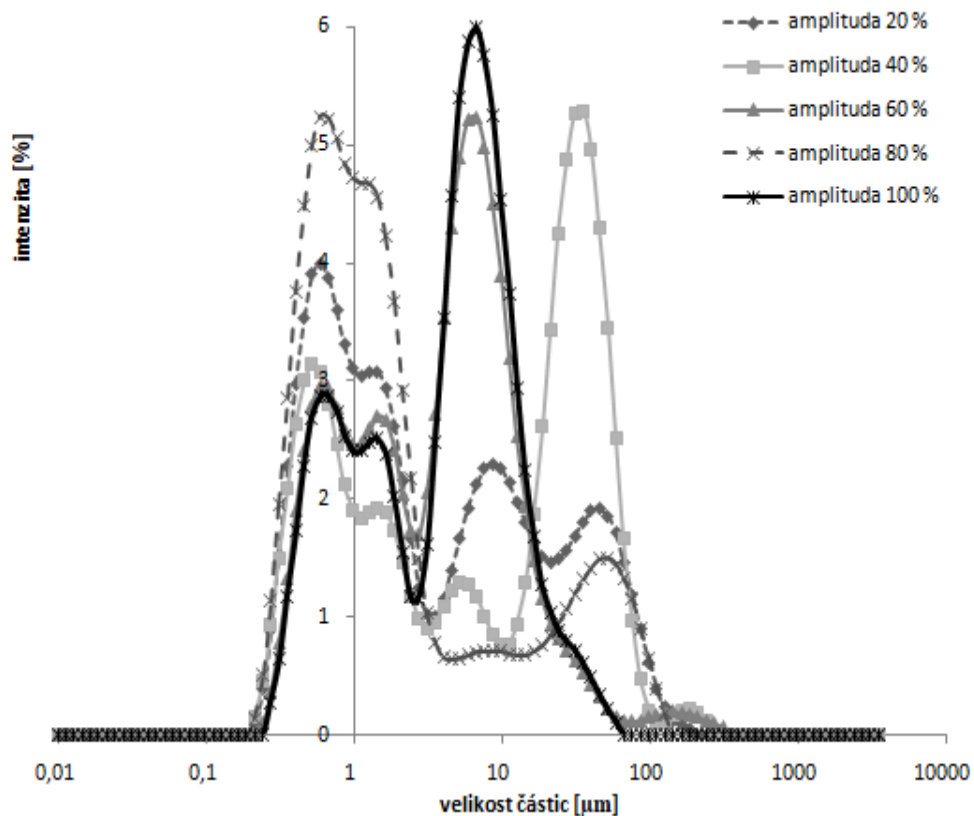
Obrázek 18: Emulze s olejovou fází A) bez a B) s kurkuminem. Celková koncentrace CNC+CAS částic zleva 0,2; 0,3 a 0,5 % pro každou sérii emulzí.

#### 10.3.1 Preformulační studie

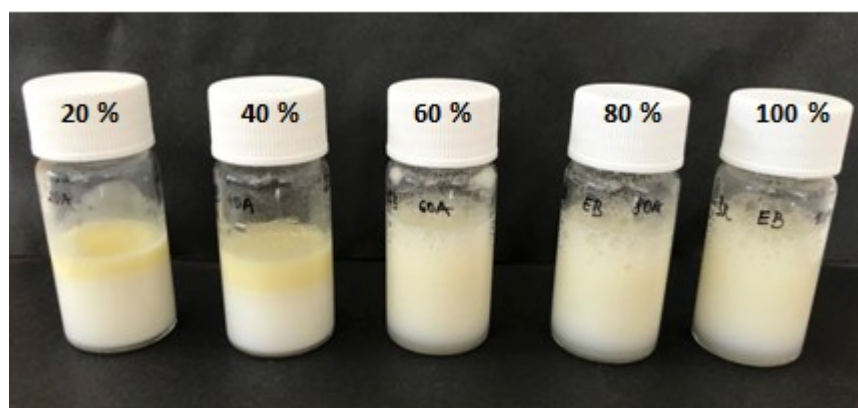
Úkolem této studie bylo najít vhodnou hodnotu amplitudy sonikace, díky níž lze získat stabilní emulze s co nejmenší velikostí částic. Byla testována hodnota amplitudy od 20 % do 100 % a u těchto emulzí byla následně měřena velikost částic, jejíž hodnota je průměrem tří opakování po 20 cyklech (Tabulka 5). Pro tuto studii byla zvolena pouze cesta přípravy emulzí R1.

Tabulka 5: Velikost částic připravených emulzí D (4,3) v závislosti na použité amplitudě.

amplituda [%]	D (4,3) [ $\mu\text{m}$ ]	směrodatná odchylka
20	13,5	0,7
40	20,1	1,5
60	8,5	0,8
80	10,5	0,2
100	6,9	0,1



Obrázek 19: Distribuční křivky velikostí emulzních kapek připravených sonikací při různé amplitudě.



Obrázek 20: Fotografie emulzí 3 hodiny po přípravě (hodnota amplitudy je označena na víčku).

Porovnání výsledků z měření velikosti kapek a vizuálního srovnání připravených emulzí vedlo k závěru, že pro přípravu dalších vzorků emulzí bude zvolena amplituda 100 % (Obrázek 19). Takto připravená emulze totiž vykazovala poměrně úzkou distribuci velikostí kapek s průměrnou hodnotou  $D(4,3) \sim 7 \mu\text{m}$  a i tři hodiny po přípravě nevykazovala tvorbu agregátů, krémování ani rozpad. Při použití nižších amplitud byla

distribuce kapek velmi široká a ihned po přípravě některé z testovaných emulzí vykazovaly známky rozpadu dokumentované přítomností olejových kapek, což je zcela nežádoucí.

### 10.3.2 Studie I

#### 10.3.2.1 Velikost emulzních kapek

Emulze zahrnuté ve Studii I byly připraveny pomocí sonikátoru UP 400St, Heilscher (novější typ) s amplitudou 100 %, která byly zvolena na základě preformulační studie (kap.10.3.1). Velikost kapek připravených emulzí mohla být ovlivněna nejen cestou přípravy (R1, R2, R3), ale i celkovým množstvím stabilizujících částic CNC a CAS v emulzi. Svoji roli zde může sehrát i přítomnost kurkuminu rozpuštěného v olejové fázi. Tato část studie se rovněž zaměřila na srovnání chování emulzí, které obsahovaly zvolený typ olivového oleje bez a s přítomností kurkuminu. Výsledky stanovení hodnot D (4,3) jsou souhrnně uvedeny v Tabulce 6.

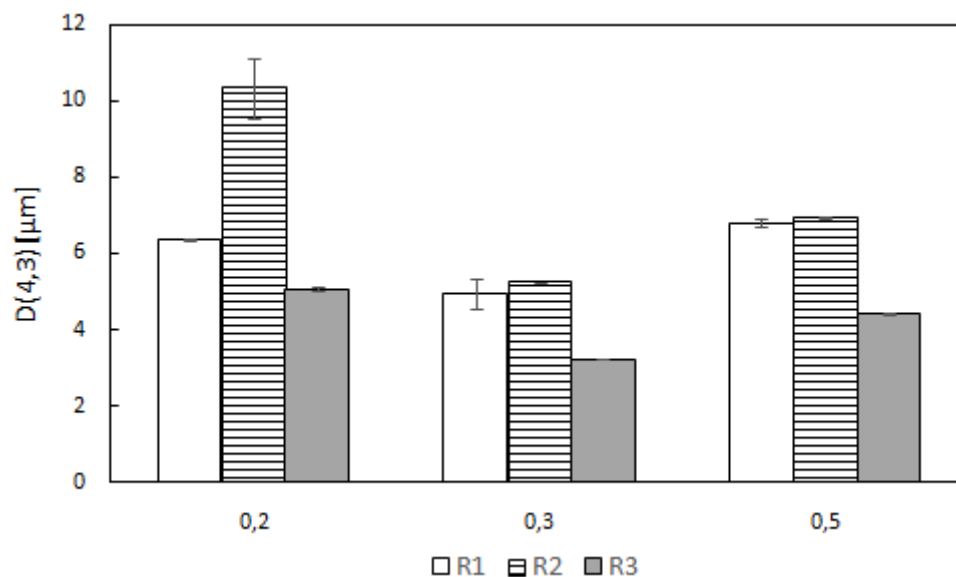
Tabulka 6: Průměrná velikost kapek u vzorků emulzí připravených různými cestami R1, R2, R3 vyjádřená jako D (4,3) a směrodatná odchylka (SD) měření. K značí emulze s obsahem kurkuminu.

koncentrace CNC+CAS	D (4,3) ± SD [μm]	koncentrace CNC+CAS	D (4,3) ± SD [μm]
Cesta přípravy R1			
<b>0,2</b>	6,4 ±0,1	<b>K 0,2</b>	4,5 ±0,1
<b>0,3</b>	5,0 ±0,4	<b>K 0,3</b>	6,0 ±0,2
<b>0,5</b>	6,8 ±0,1	<b>K 0,5</b>	4,1 ±0,1
Cesta přípravy R2			
<b>0,2</b>	10,3 ±0,8	<b>K 0,2</b>	6,2 ±0,1
<b>0,3</b>	5,2 ±0,1	<b>K 0,3</b>	6,4 ±0,4
<b>0,5</b>	6,9 ±0,1	<b>K 0,5</b>	3,9 ±0,1
Cesta přípravy R3			
<b>0,2</b>	5,1 ±0,1	<b>K 0,2</b>	4,3 ±0,1
<b>0,3</b>	3,2 ±0,1	<b>K 0,3</b>	3,9 ±0,1
<b>0,5</b>	4,4 ±0,1	<b>K 0,5</b>	2,9 ±0,1

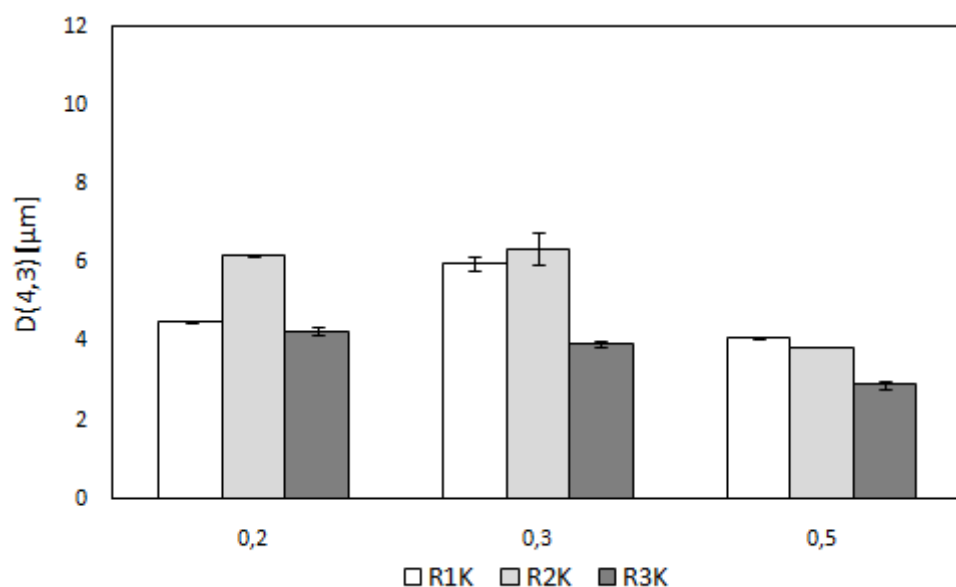
Na následujících grafech (Obrázek 21) lze nalézt závislosti, které znázorňují velikost kapek D (4,3) vztažené k cestě přípravy emulzí a celkovému množství stabilizujících částic CAS a CNC. Emulze, kde je cesta přípravy doplněná označením K obsahují v olejové fázi kurkumin.



A)



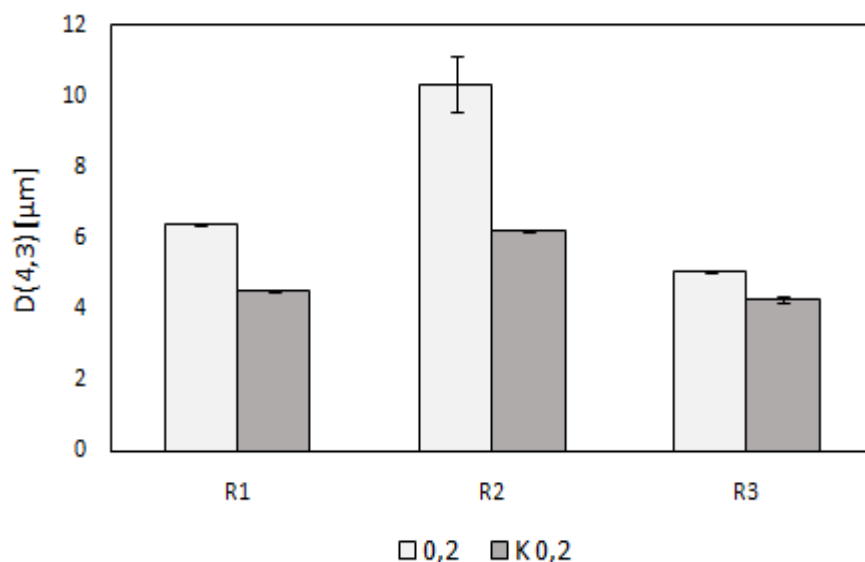
B)



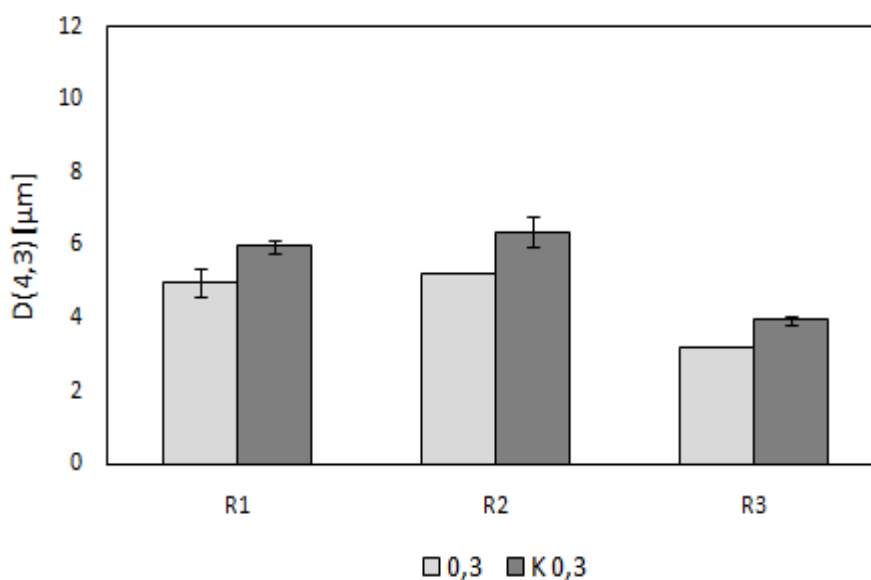
Obrázek 21: Vliv cesty přípravy (R1, R2, R3) a celkového množství stabilizujících částic (0,2; 0,3; 0,5%) na velikost emulzních kapek u emulzí A) bez kurkuminu, B) s kurkuminem.

Na výše uvedeném Obrázku 21 lze názorně vidět korelaci mezi cestou přípravy a velikostí emulzních kapek. Největší emulzní kapky měly emulze připravené cestou R2, naopak nejmenší se podařilo připravit cestou R3. Při přípravě emulze je tedy vhodné nejprve provést Pickeringovu stabilizaci pomocí částic a až poté snížit mezipovrchové napětí pomocí vhodné povrchově aktivní látky. Z obrázku je rovněž zřejmé, že velikost kapek

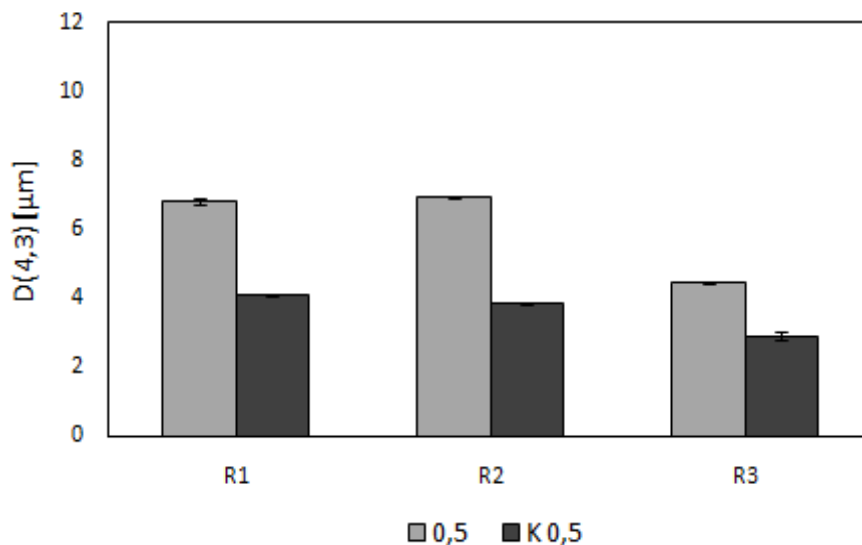
emulzí s kurkuminem byla menší než u emulzí, ve kterých kurkumin přítomný nebyl. Vliv kurkuminu při přípravě emulze na její vlastnosti je možno zaznamenat rovněž na Obrázku 22, 23 a 24. I na Obrázku 21 lze pozorovat změnu ve velikosti kapek u emulzí připravených cestou R1 a R3 u všech tří koncentrací částic, pouze emulzí z R2 došlo k mírnému nárůstu v průměrné velikosti emulzních kapek.



Obrázek 22: Vliv kurkuminu (K) v olejové fázi na velikost emulzních kapek v emulzích s celkovým obsahem částic 0,2 %.



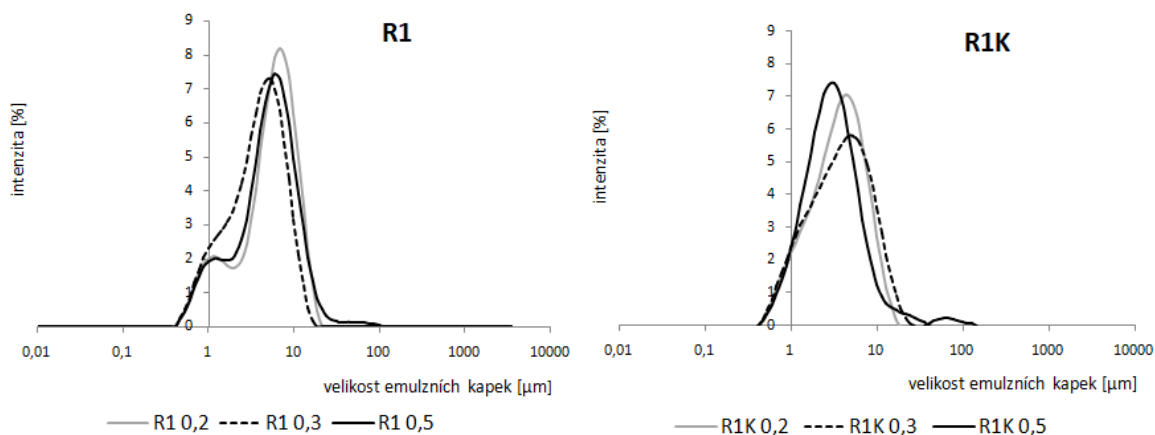
Obrázek 23: Vliv kurkuminu (K) v olejové fázi na velikost emulzních kapek v emulzích s celkovým obsahem částic 0,3 %.

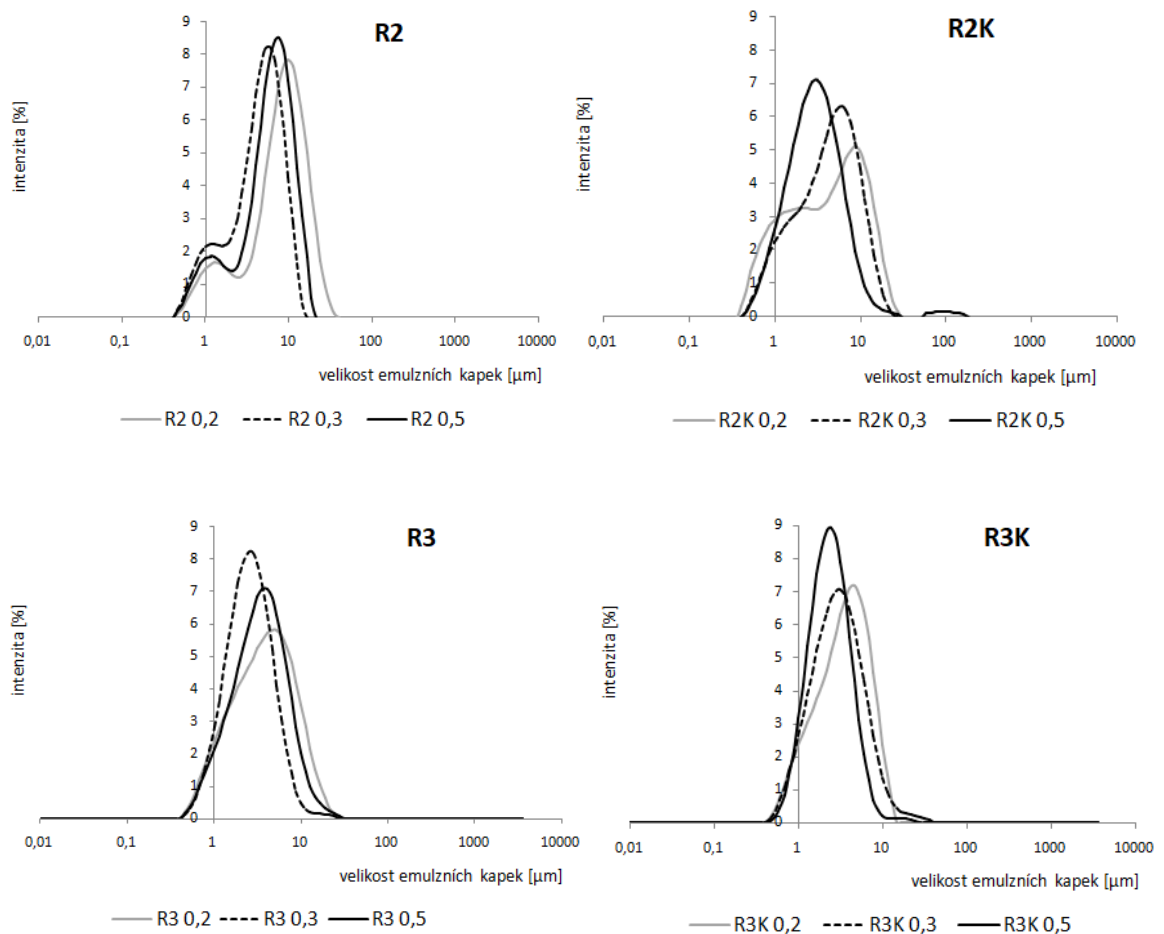


Obrázek 24: Vliv kurkuminu (K) v olejové fázi na velikost emulzních kapek v emulzích s celkovým obsahem částic 0,5 %.

Emulze připravené cestou R1 a R3 obsahující ve své olejové fázi kurkumin a 0,2 nebo 0,5 % stabilizujících částic vykazují menší průměrnou velikost emulzních kapek ve srovnání s emulzemi stejného charakteru avšak bez kurkuminu. Největší rozdíl mezi průměrnou velikostí emulzních kapek byl zaznamenán u cesty R2 obsahující 0,2 a 0,5 % částic. Zcela opačný vývoj byl zaznamenán u emulzí s obsahem částic 0,3 %. V této situaci došlo po přidání kurkuminu k mírnému nárůstu velikosti emulzních kapek.

O vlivu sledovaných parametrů na vlastnosti emulzí vypovídají nejen hodnoty  $D(4,3)$ , ale i distribuční křivky, které jsou uvedeny na Obrázku 25.



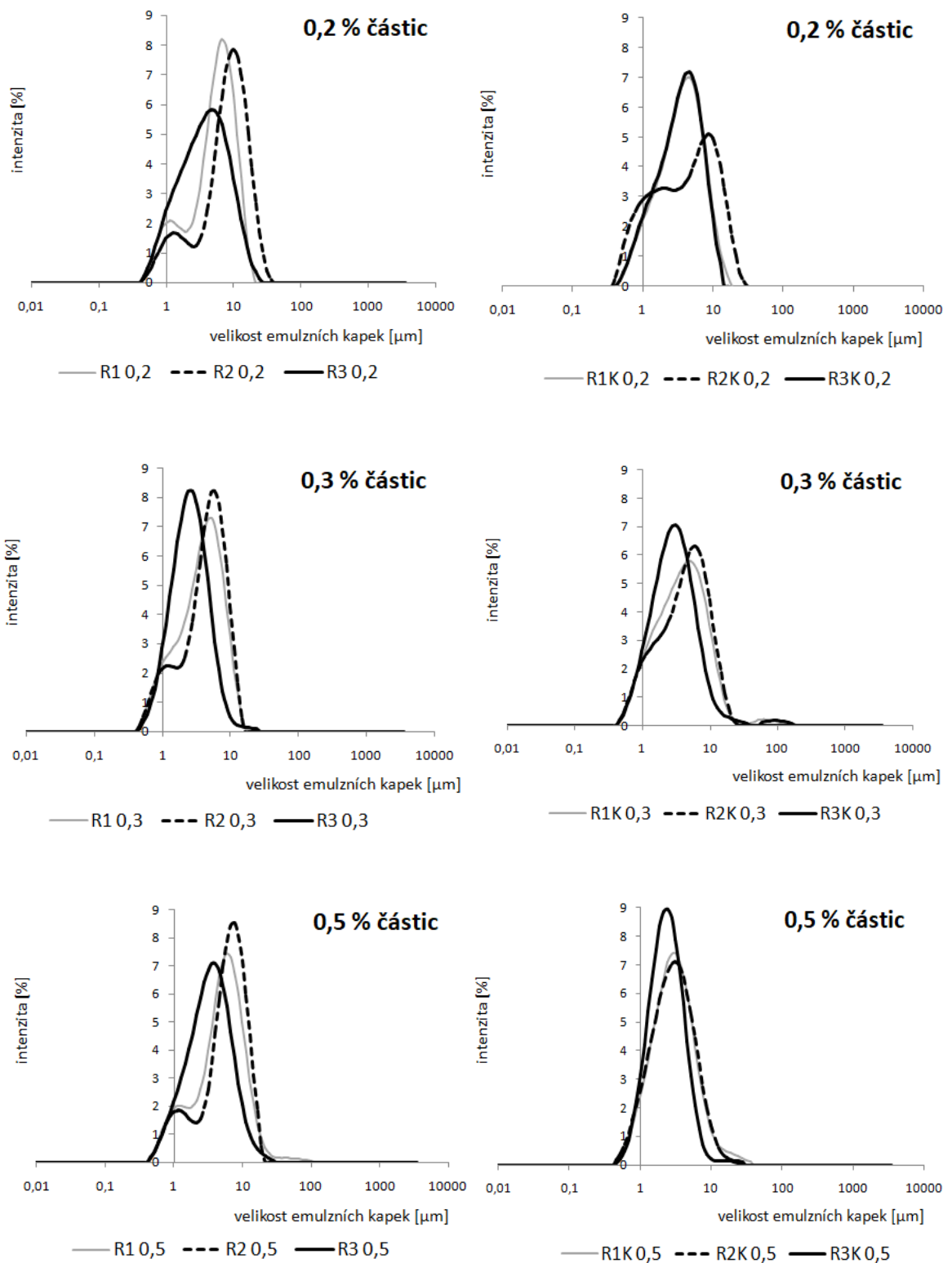


Obrázek 25: Distribuce velikosti kapek emulzí připravených cestami R1, R2 a R3: srovnání emulzí stabilizovaných různou celkovou koncentrací částic CAS + CNC. Písmeno K označuje emulze s kurkuminem.

Z porovnání jednotlivých distribučních křivek lze vyvodit obdobné závěry jako z hodnot  $D(4,3)$ , které byly diskutovány výše. Lze opět pozorovat odchylky v průběhu křivek v závislosti na množství stabilizujících částic, cestě přípravy či přítomnosti kurkuminu. U emulzí obsahujících v olejové fázi kurkumin s koncentrací částic 0,5 % byl zřejmý posun k menším velikostem kapek. U těchto emulzí dosahovaly kapky průměru nejčastěji mezi 2–4 μm. Velikost kapek u emulzí se stejným obsahem částic, avšak bez kurkuminu, byla téměř dvojnásobná.

Při pozorování těchto křivek nelze opomenout, že u emulzí připravených cestou R1 a R2 bez kurkuminu vykazovaly distribuční křivky bimodální charakter, což svědčí o přítomnosti dvou populací emulzních kapek. Monomodální chování vykazuje pouze distribuční křivka emulzí připravených cestou R3 bez kurkuminu. Chování emulzí s obsahem kurkuminu je odlišné, bimodální distribuce je pozorována pouze u emulzí

připravených cestou R2, a to ještě s obsahem stabilizujících částic 0,2 a 0,3 %. Pokud bylo ke stabilizaci použito nejvyšší množství částic, tedy 0,5 %, distribuční křivka je monomodální, stejně jako u všech ostatních emulzí připravených cestami R1 a R3. Z tohoto pozorování lze učinit závěr, že přítomnost kurkuminu v olejové fázi ovlivňuje emulgaci a následně i velikost emulzních kapek, což potvrzuje i studie z roku 2015, v níž byly připravovány mikroemulze obsahující kurkumin. [93]



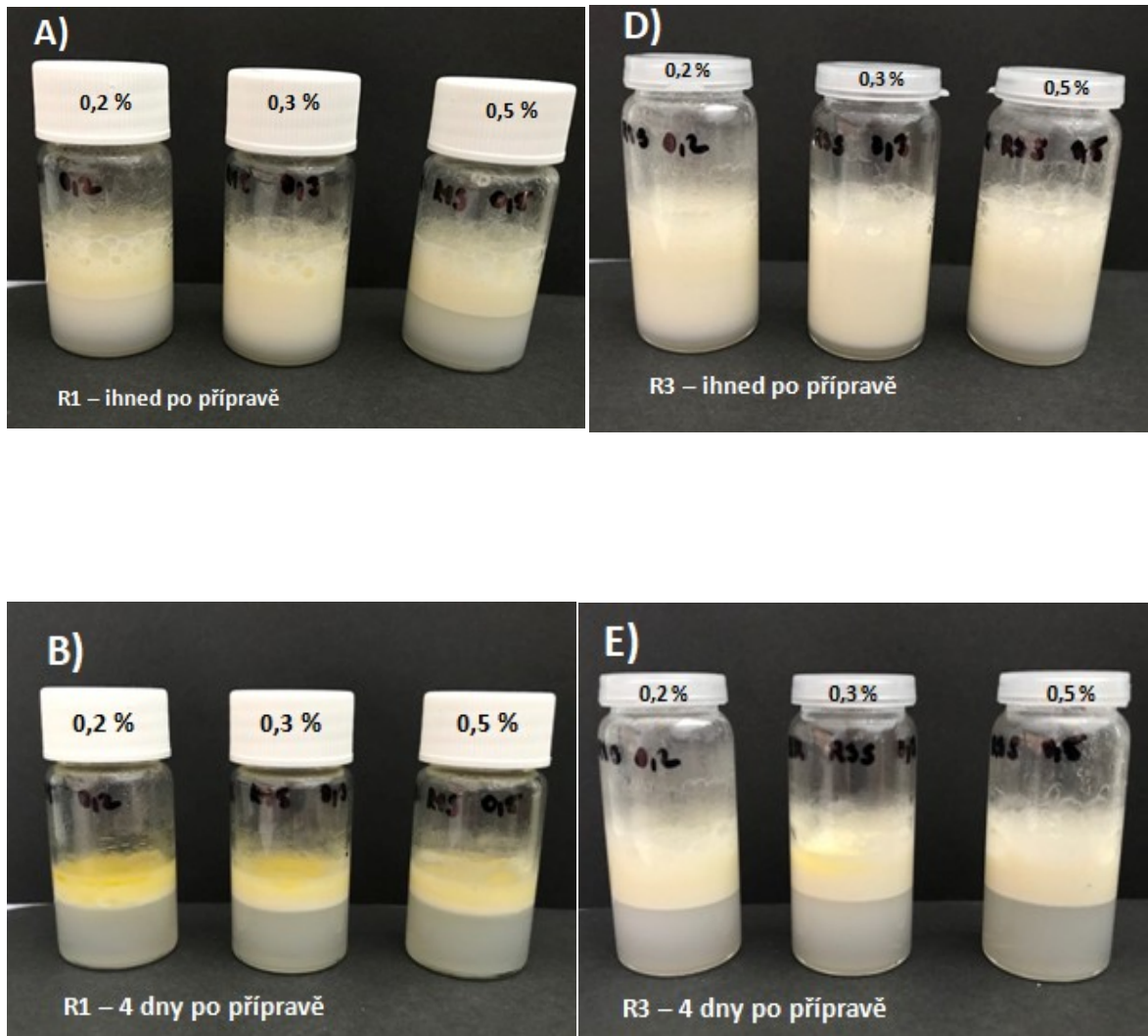
Obrázek 26: Distribuce velikosti kapek v připravených emulzích vztažená k cestě přípravy. V levém sloupci jsou znázorněny distribuce kapek bez kurkuminu a v pravém s kurkuminem.

Pokud srovnáme jednotlivé cesty přípravy emulzí, distribuční křivka cesty R3 se liší od ostatních dvou křivek zaznamenaných pro emulze připravené cestou R1 a R2. Křivka emulze R3 má ve všech případech monomodální charakter, distribuce emulzí připravených cestami R1 a R2 bez kurkuminu mají typicky bimodální charakter, který se u emulzí s kurkuminem se zvyšujícím se obsahem částic vytrácí.

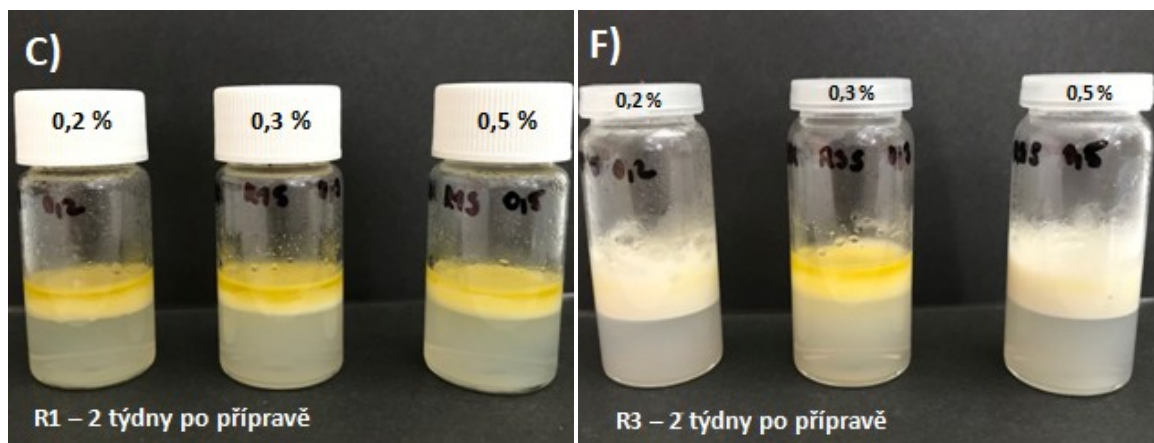
Po srovnání všech získaných dat z měření velikosti kapek je zřejmé, že nejnižší průměrnou velikost emulzních kapek shledáváme u emulzí připravených cestou R3, což je ještě víc zřetelné v přítomnosti kurkuminu v olejové fázi.

### 10.3.2.2 Stabilita emulzí

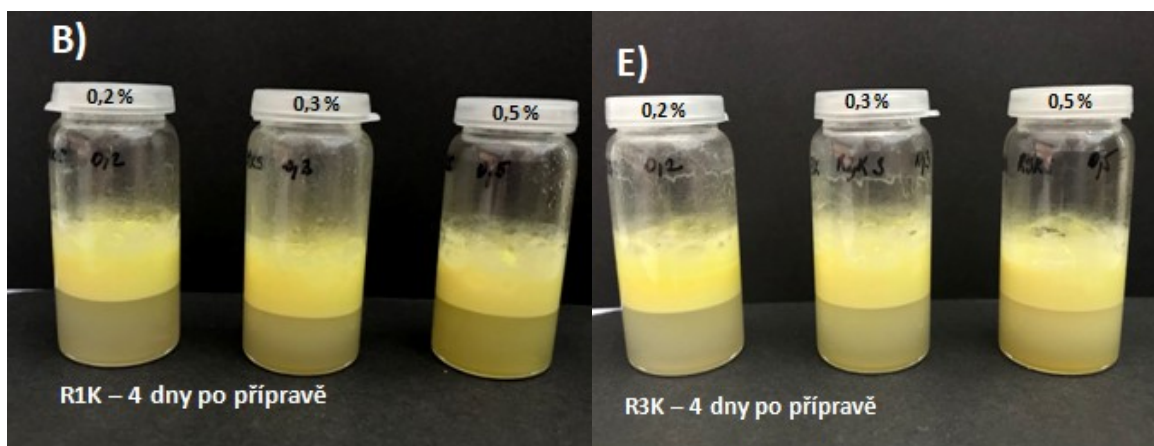
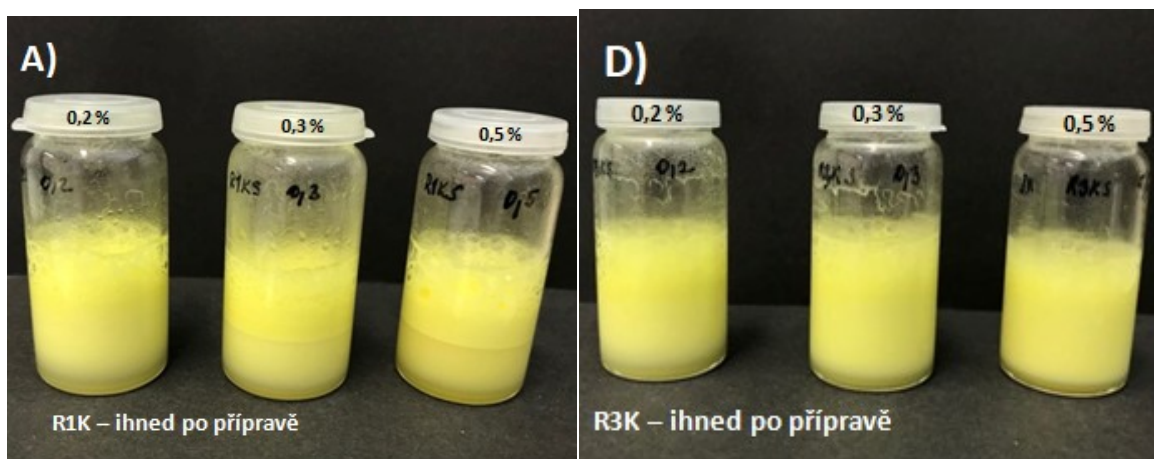
U výše připravených emulzí byla následně hodnocena jejich stabilita a index krémování (CI). Stabilita byla posuzována vizuálně a dokumentována fotograficky. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 27 a 28. Pro vizuální prezentaci stability byly pro přehlednost zvoleny emulze připravené cestami R1 a R3, chování emulzí připravených cestou R2 je diskutováno v textu.

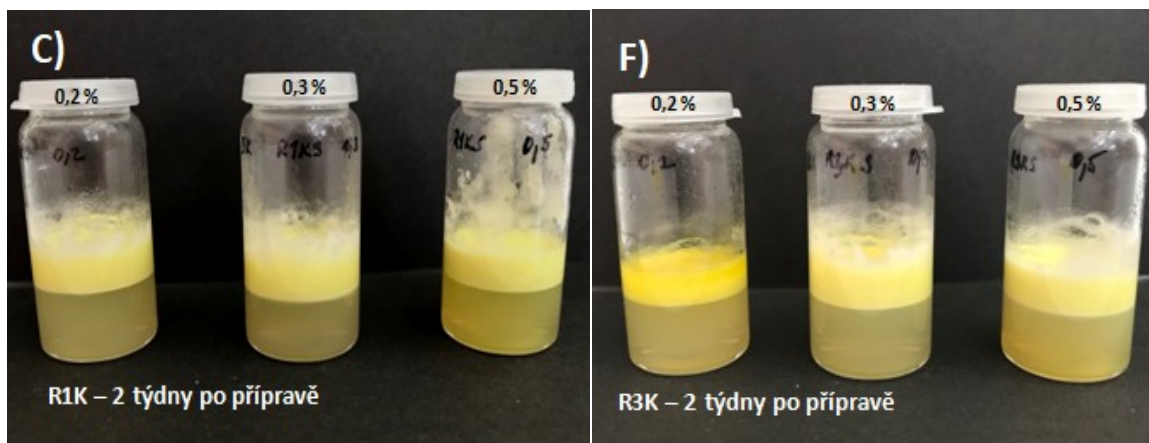






Obrázek 27: Emulze připravené cestou R1 a R3 bez kurkuminu ihned, 4 dny a 2 týdny po přípravě. Množství stabilizujících částic je uvedeno v obrázku.





Obrázek 28: Emulze připravené cestou R1 a R3 s kurkuminem ihned, 4 dny a 2 týdny po přípravě. Množství stabilizujících částic je uvedeno v obrázku.

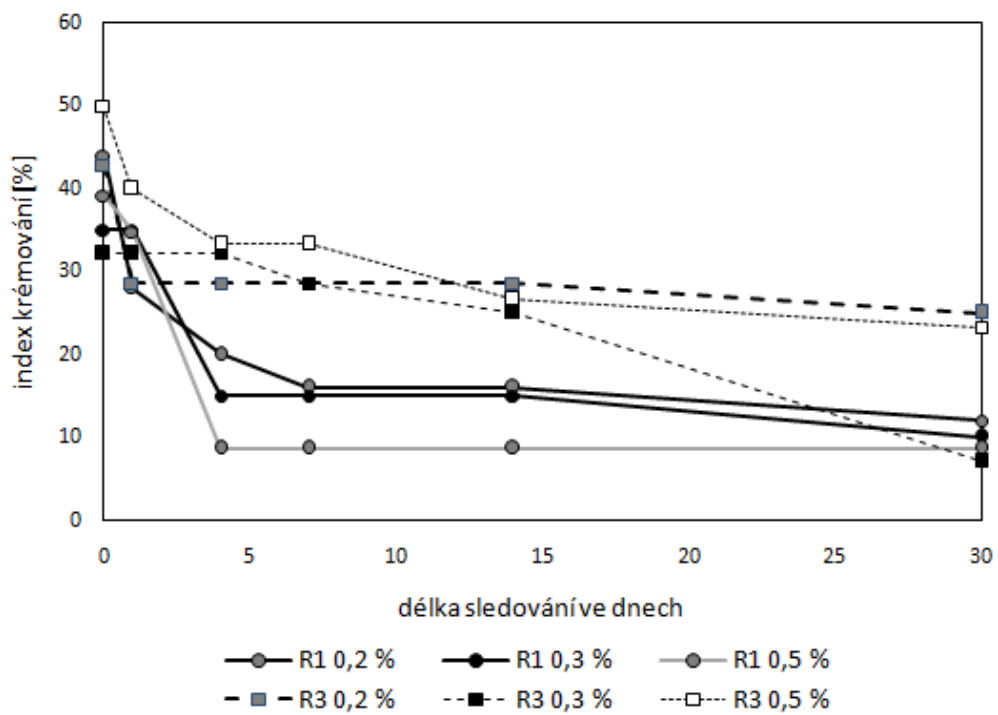
Na jednotlivých fotografiích (Obrázek 27 a 28) lze pozorovat postupné oddělení emulzní vrstvy a séra během sledování jejich stability. U emulzí řady R1 bez kurkuminu došlo k uvolňování oleje z emulze již po 4 dnech, což se však nestalo v případě emulzí stejného typu obsahujících kurkumin. Tyto emulze ani po dvou týdnech nejevily známky uvolňování oleje, zatímco u emulzí bez kurkuminu nastal v tuto dobu celkový rozpad. Emulze řady R3 jsou charakterizovány lepší stabilitou, což lze usoudit nejen z fotografií, ale také z Tabulky 7, která obsahuje hodnoty indexu krémování (CI). Uvolnění oleje z emulze lze zaznamenat po dvou týdnech od přípravy těchto emulzí a objevovalo se zejména u emulzí s obsahem stabilizujících částic menším než 0,5 %.

Indexem krémování lze zhodnotit proces rozpadu emulze v čase a matematicky potvrdit vizuální hodnocení stability. K výpočtům v Tabulce 7 byla využita rovnice (2).

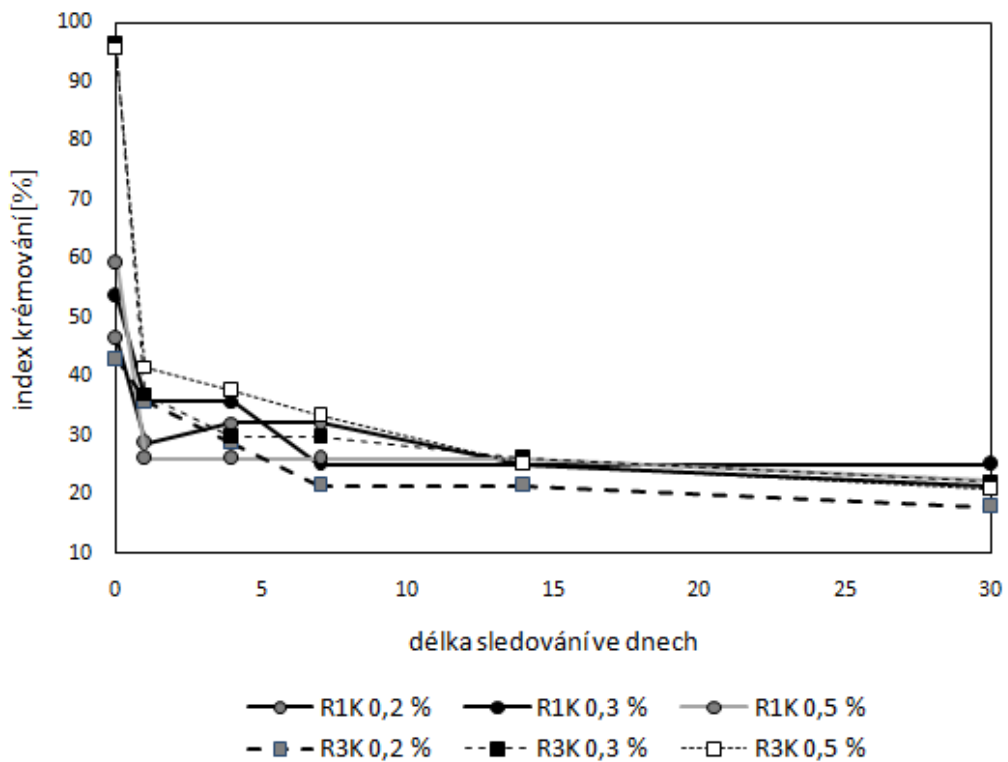
Tabulka 7: Změna hodnoty indexu krémování emulzí (cesty přípravy R1, R2, R3) stabilizovaných různým množstvím částic v čase. Symbol K značí emulze s obsahem kurkuminu.

index krémování [%]						
	po přípravě	24 hodin	4 dny	1 týden	2 týdny	1 měsíc
<b>R1 0,2</b>	44,0	28,0	20,0	16,0	16,0	12,0
<b>R1 0,3</b>	35,0	35,0	15,0	15,0	15,0	10,0
<b>R1 0,5</b>	39,1	34,8	8,7	8,7	8,7	8,7
<b>R2</b>						
<b>R2 0,2</b>	56,5	43,5	21,7	17,4	17,4	0,0
<b>R2 0,3</b>	65,2	30,4	17,4	17,4	17,4	0,0
<b>R2 0,5</b>	51,9	22,2	18,5	18,5	18,5	0,0
<b>R3</b>						
<b>R3 0,2</b>	42,9	28,6	28,6	28,6	28,6	25,0
<b>R3 0,3</b>	32,1	32,1	32,1	28,6	25,0	7,1
<b>R3 0,5</b>	50,0	40,0	33,3	33,3	26,7	23,3
<b>R1K</b>						
<b>R1K 0,2</b>	46,4	28,6	32,1	32,1	25,0	21,4
<b>R1K 0,3</b>	53,6	35,7	35,7	25,0	25,0	25,0
<b>R1K 0,5</b>	59,3	25,9	25,9	25,9	25,9	22,2
<b>R2K</b>						
<b>R2K 0,2</b>	61,5	53,8	38,5	38,5	38,5	34,6
<b>R2K 0,3</b>	53,6	53,6	46,4	32,1	28,6	25,0
<b>R2K 0,5</b>	58,6	44,8	31,0	27,6	27,6	20,7
<b>R3K</b>						
<b>R3K 0,2</b>	42,9	35,7	28,6	21,4	21,4	17,9
<b>R3K 0,3</b>	96,3	37,0	29,6	29,6	25,9	22,2
<b>R3K 0,5</b>	95,8	41,7	37,5	33,3	25,0	20,8

Po srovnání hodnot z Tabulky 7 se zdá být změna CI spjata spíše s cestou přípravy a přítomností kurkuminu než s konečnou koncentrací částic v emulzi, což lze pozorovat i na Obrázku 29 a 30.



Obrázek 29: Změna indexu krémování v závislosti na čase u emulzí bez kurkuminu v olejové fázi.



Obrázek 30: Změna indexu krémování v závislosti na čase u emulzí s kurkuminem v olejové fázi.

U emulzí bez kurkuminu lze pozorovat rozdíl ve stabilitě emulzí v závislosti na cestě jejich přípravy. Cesta přípravy R2 není v grafu znázorněna, jelikož po měsíci od přípravy došlo k úplnému rozpadu emulze (Tabulka 7). Při srovnání stability emulzí připravených cestou R1 a R3 lze pozorovat významný rozdíl a emulze typu R3 se jeví jako nejstabilnější. Emulze s kurkuminem vykazují v případě cesty přípravy R1 a R3 vyšší odolnost vůči krémování v porovnání se stejným typem emulzí bez kurkuminu. Přítomnost kurkuminu taktéž stírá rozdíl mezi cestami přípravy R1 a R3.

### 10.3.3 Studie II

Vzhledem ke skutečnosti, že emulzní gely připravené z emulzí ze Série I (kapitola 10.3.2) nevykazovaly očekávané chování a docházelo k jejich rozpadu (viz další diskuse v kapitole 10.4.1.1), byla připravena další série emulzí, při jejíž výrobě bylo použito jiné sonikační zařízení a byly modifikovány parametry sonikace, které byly definovány jako možná příčina nestability emulzí i gelů.

Tyto gely byly, na základě další krátké preformulační studie, připravovány na sonikačním zařízení UP 400St, Heilscher (starší typ) při amplitudě 60 %. Cesty přípravy jednotlivých emulzí či jejich složení nebylo nijak změněno.

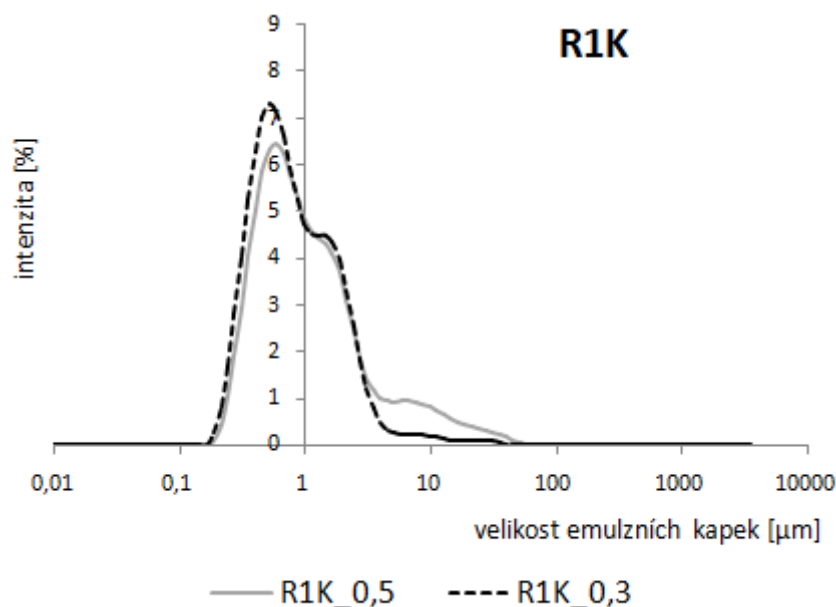
#### 10.3.3.1 Velikost emulzních kapek

Velikost emulzních kapek u vzorků připravených ve Studii II byla rovněž měřena pomocí laserové difrakce jako u Studie I, a to ihned po přípravě emulzí. Na základě výsledků ze Studie I (Tabulka 7: ) byly z této druhé série vyloučeny emulze s koncentrací částic 0,2 %, které vykazovaly nejhorší stabilitu.

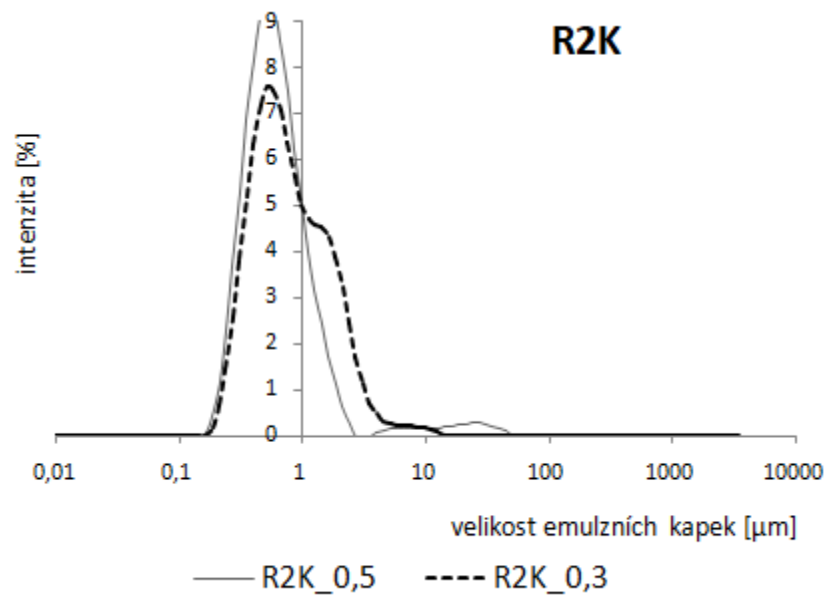
Pro ověření opakovatelnosti zvoleného postupu a formulací, byly postupem R1, R2 a R3 připraveny tři sady emulzí s kurkuminem v olejové fázi, jejichž velikosti kapek jsou shrnuty v Tabulce 8.

Tabulka 8: Průměrná velikost kapek u vzorků emulzí připravených cestami R1, R2 a R3 vyjádřená jako D (4,3) a směrodatná odchylka (SD) měření. K značí emulze s obsahem kurkuminu.

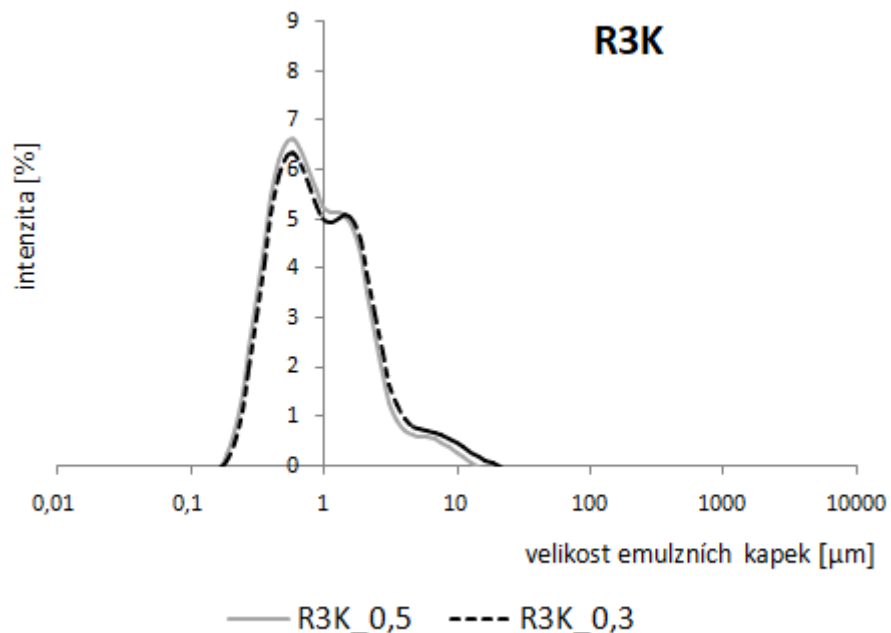
D (4,3) ± SD [μm]			
	1. sada emulzí	2. sada emulzí	3. sada emulzí
<b>R1K 0,3</b>	1,3 ±0,1	1,3 ±0,1	1,1 ±0,1
<b>R1K 0,5</b>	2,4 ±0,1	2,5 ±0,2	0,77 ±0,1
<b>R2K 0,3</b>	1,1 ±0,1	1,1 ±0,1	1,0 ±0,1
<b>R2K 0,5</b>	1,3 ±0,1	2,4 ±0,1	4,0 ±0,3
<b>R3K 0,3</b>	1,6 ±0,1	1,4 ±0,1	1,7 ±0,1
<b>R3K 0,5</b>	1,3 ±0,1	1,6 ±0,1	1,8 ±0,1



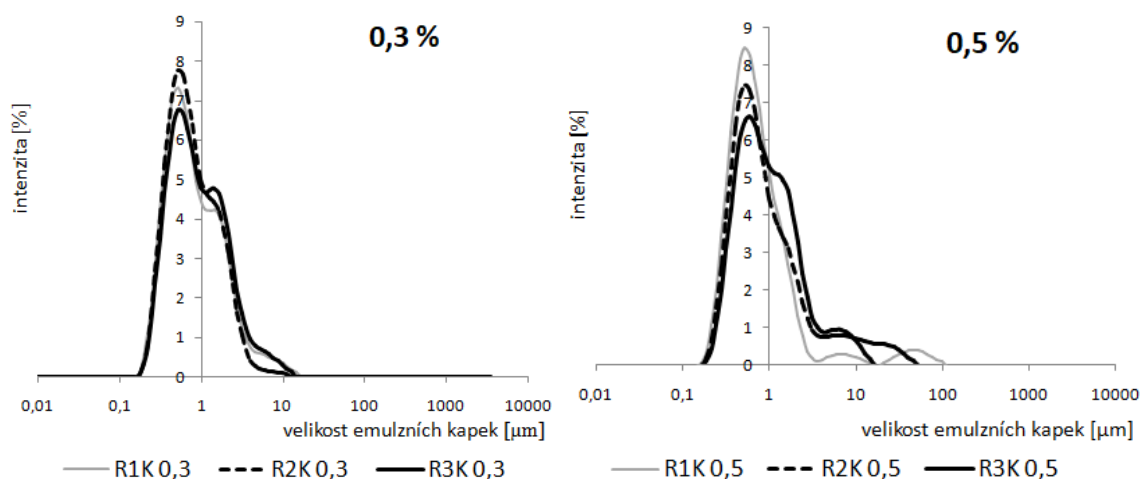
Obrázek 31: Distribuce velikosti kapek emulzí připravených cestou R1: srovnání emulzí stabilizovaných různou celkovou koncentrací částic CAS + CNC. Písmeno K označuje emulze s kurkuminem.



Obrázek 32: Distribuce velikosti kapek emulzí připravených cestou R3: srovnání emulzí stabilizovaných různou celkovou koncentrací částic CAS + CNC. Písmeno K označuje emulze s kurkuminem.



Obrázek 33: Distribuce velikosti kapek emulzí připravených cestou R3: srovnání emulzí stabilizovaných různou celkovou koncentrací částic CAS + CNC. Písmeno K označuje emulze s kurkuminem.



Obrázek 34: Distribuce velikosti kapek emulzí obsahujících stejné množství stabilizujících částic CAS + CNC: srovnání emulzí připravených různou cestou přípravy.

Z důvodu podobnosti průměrných hodnot velikosti emulzních kapek, jsou na Obrázku 31 až 33 ilustrovány pouze distribuční křivky 1. sady emulzí připravené cestou R1, R2 a R3. Ve srovnání s emulzemi ze Studie I je velikost emulzních kapek ve Studii II menší a je možné pozorovat i menší rozdíly mezi jednotlivými formulacemi a vlivem cesty přípravy. Tomu by mělo odpovídat i zlepšení stability připravených emulzí. Stabilita či index krémování však u emulzí ze Studie II nebyl posouzen.

## 10.4 Příprava a charakterizace emulzních gelů

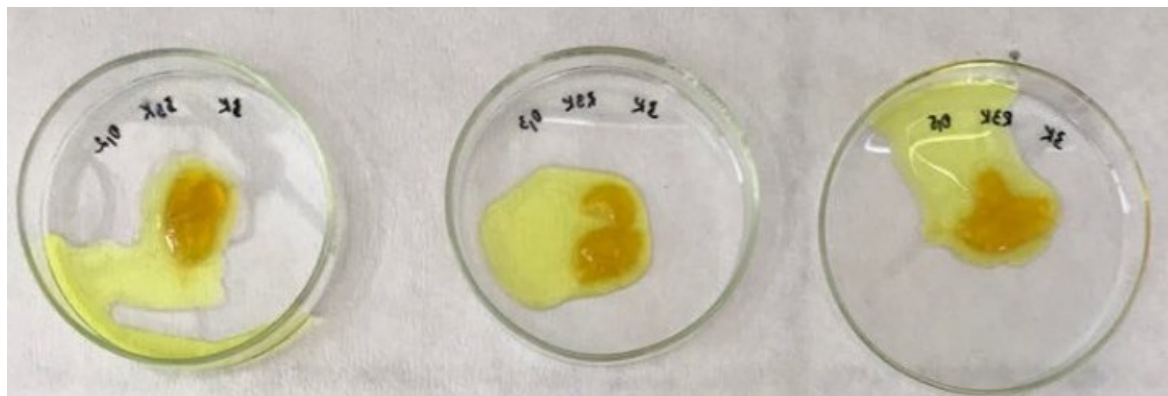
Emulzní gely byly připravovány z předem připravených emulzí, které byly podrobeny centrifugaci, a byla z nich odebrána koncentrovaná emulzní vrstva. Ta byla následně vysušena. Sušení probíhalo při laboratorní teplotě po dobu jednoho týdne. Postup sušení byl hodnocen vizuálně (vysušený gel ztratil zákal) a vážením (hmotnost gelu se dále neměnila).

### 10.4.1 Studie I

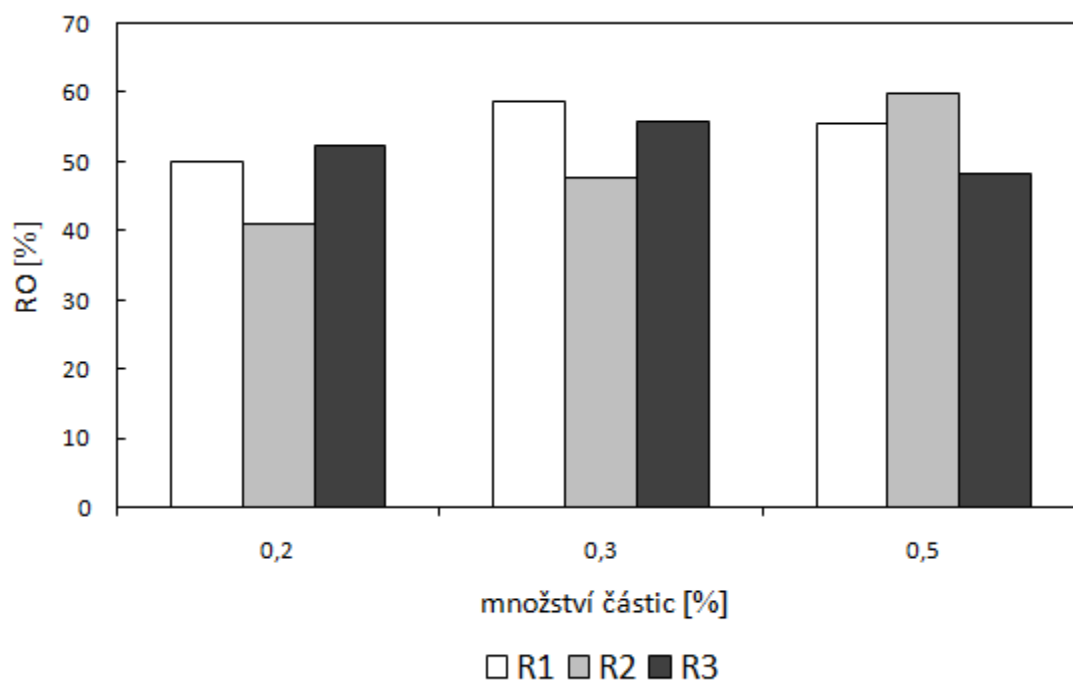
#### 10.4.1.1 Stanovení množství oleje uvolněného z emulzních gelů

Parametr RO (released oil) popisující množství uvolněného oleje po sušení emulzního gelu vyjadřuje schopnost gelu zachytit a stabilizovat ve své struktuře olej. Čím nižších hodnot RO nabývá, tím lze emulzní gel považovat za stabilnější ve smyslu schopnosti udržet olej. Chování emulzních gelů ze Studie I po vysušení je dokumentováno na Obrázku 35 až 37.

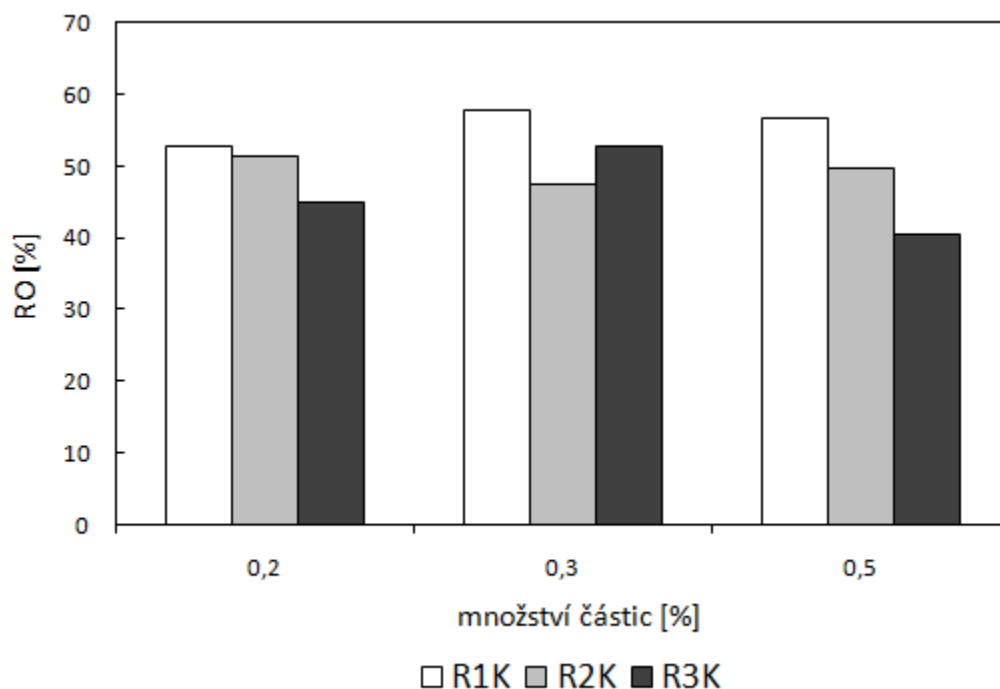




Obrázek 35: Připravené emulzní kurkuminové gely Série I cestou přípravy R3 s olejem uvolněným po sušení (obsah částic v původní emulzi zleva 0,2, 0,3 a 0,5 %).



Obrázek 36: Vliv cesty přípravy (R1, R2, R3) a množství stabilizujících částic na množství uvolněného oleje z gelů bez kurkuminu.



Obrázek 37: Vliv cesty přípravy (R1, R2, R3) a množství stabilizujících částic na množství uvolněného oleje z gelů s kurkuminem.

Hodnoty RO, tedy množství uvolněného oleje vzhledem k hmotnosti vysušeného gelu u vzorků připravených v Sérii I, se vzájemně příliš nelišily. Z těchto výsledků tedy nebylo možné jednoznačně určit, jestli emulze připravené rozdílnými cestami s celkovým různým obsahem částic ovlivňují následně vlastnosti gelů. Taktéž nebyl u těchto vzorků pozorován významný rozdíl mezi gely bez a s kurkuminem (Obrázek 36 a 37). Připravené emulzní gely nebyly po vysušení schopny zachovat požadovaný tvar, což lze pozorovat na Obrázku 35. Z Obrázku 35 je rovněž patrné značné množství uvolněného oleje. Vzorkem, který vykazoval v této sérii nejlepší vlastnosti, byl gel připravený cestou R3 v přítomnosti 0,5 % stabilizujících částic obsahující olej s kurkuminem, jehož hodnota RO byla 40 %. V této souvislosti je potřeba poznamenat, že pokud by množství oleje bylo vztaženo k jeho původnímu množství použitému při přípravě emulzí, tedy 2 g činí množství uvolněného oleje pro tento vzorek 29 %.

Z tohoto důvodu byla provedena již zmíněná Studie II, ve které byly emulze připravovány jiným typem ultrazvukového sonikátoru. Tento přístroj z Centra polymerních systémů UTB nemá schopnost automatické regulace výkonu a výkon si uživatel před začátkem práce volí vždy sám. Tato skutečnost by mohla ovlivnit nejen množství uvolněného oleje z emulzních gelů, ale také velikost částic či stabilitu emulzí.

#### *10.4.1.2 Redispergace emulzních gelů*

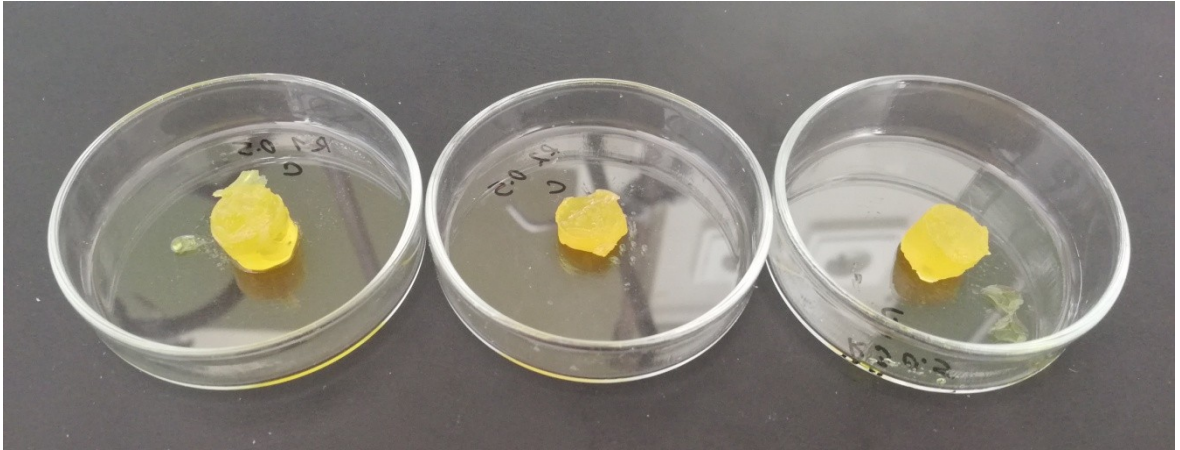
Hodnocení redispergace emulzních gelů probíhalo vizuálně a v rámci této studie bylo provedeno u cesty přípravy emulze R1, R2 i R3 a koncentrací částic 0,2, 0,3, a 0,5 %. Mezi nežádoucí jevy, které byly během redispergace gelů pozorovány, patřilo uvolnění oleje z gelu či nemožnost jeho dispergace. Jako redispergační prostředí byly kromě demineralizované vody využity disperze kaseinátu sodného a roztok TWEEN 20, které obsahují povrchově aktivní molekuly a mohly by tak snížením mezifázového napětí přispět k redispergaci a následnému dosažení žádaného stavu, tedy emulze.

V demineralizované vodě byla redispergace úspěšná u gelu připraveného cestou R1 s obsahem 0,5 % částic a R3 obsahující 0,3 % částic. V roztoku TWEEN 20 o koncentraci 0,1 mol/l byl opět redispergován gel připravený cestou R3 obsahující 0,3 % a také gel připravený stejnou cestou s 0,5 % částic. U všech ostatních vzorků došlo k postupnému uvolňování oleje či původní gel nebylo možno opětovně dispergovat. Totéž platilo pro gely obsahující kurkumin. Žádný z těchto gelů nebyl úspěšně redispergován.

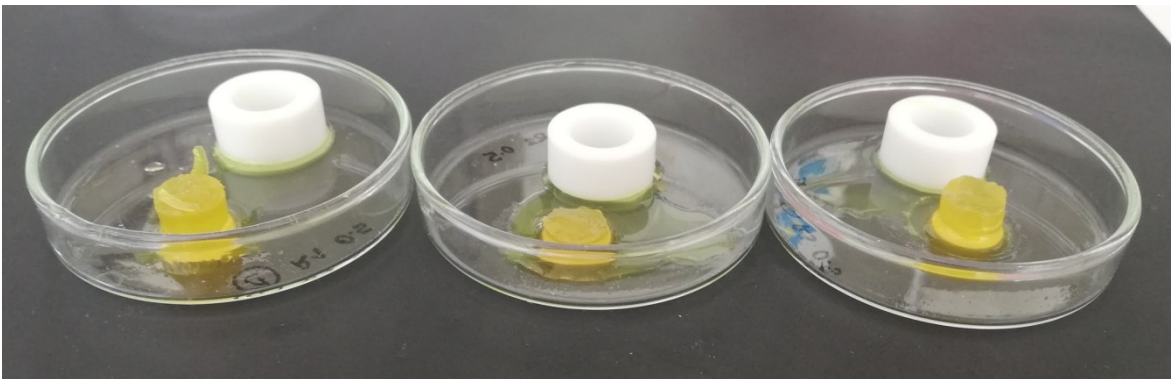
V další fázi výzkumu by redispergace emulzních gelů mohlo být dosaženo modifikací formulace emulzí, a to přidávkem polymerního stabilizátoru do vodné fáze emulzí před jejich vysušením, či lyofilizací emulzí za přítomnosti vhodných kryoprotektantů.

#### **10.4.2 Studie II**

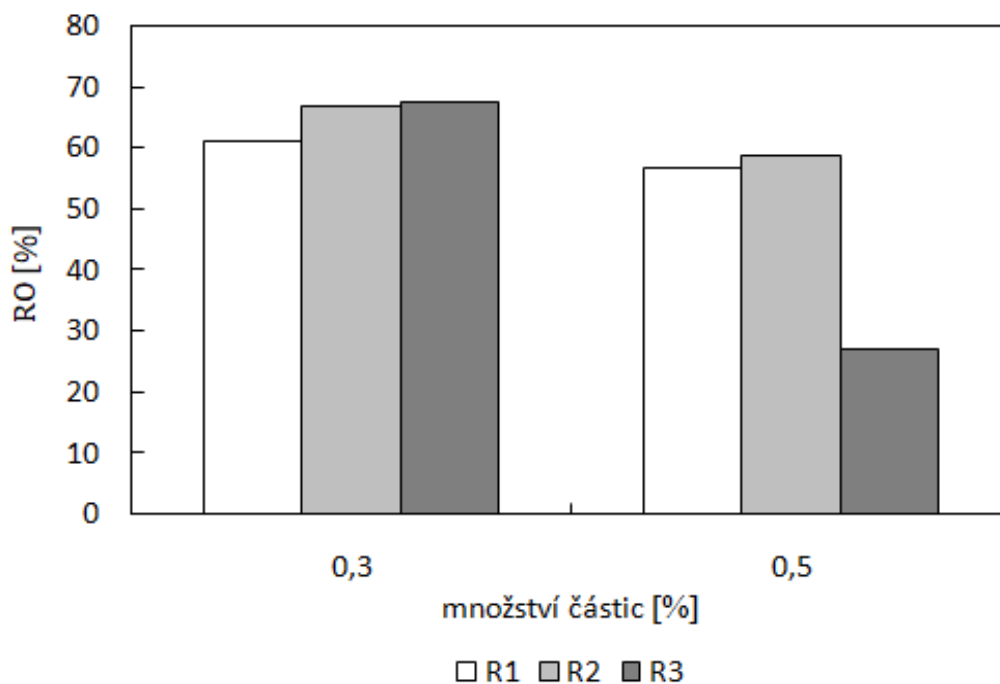
V rámci Studie II byly připraveny gely stejným způsobem jako gely ze Studie I, tedy vysušením koncentrované části emulzí získané centrifugací. K přípravě byly využity emulze s charakteristikami popsány v kap. 10.3.3 této práce, tedy s menší velikostí emulzních kapek. Gely byly připraveny do teflonových formiček, které napomáhaly udržet tvar výsledného gelu. Vzhled připravených gelů je znázorněn na Obrázku 38 a množství uvolněného oleje během sušení gelu je znázorněno na Obrázku 39.



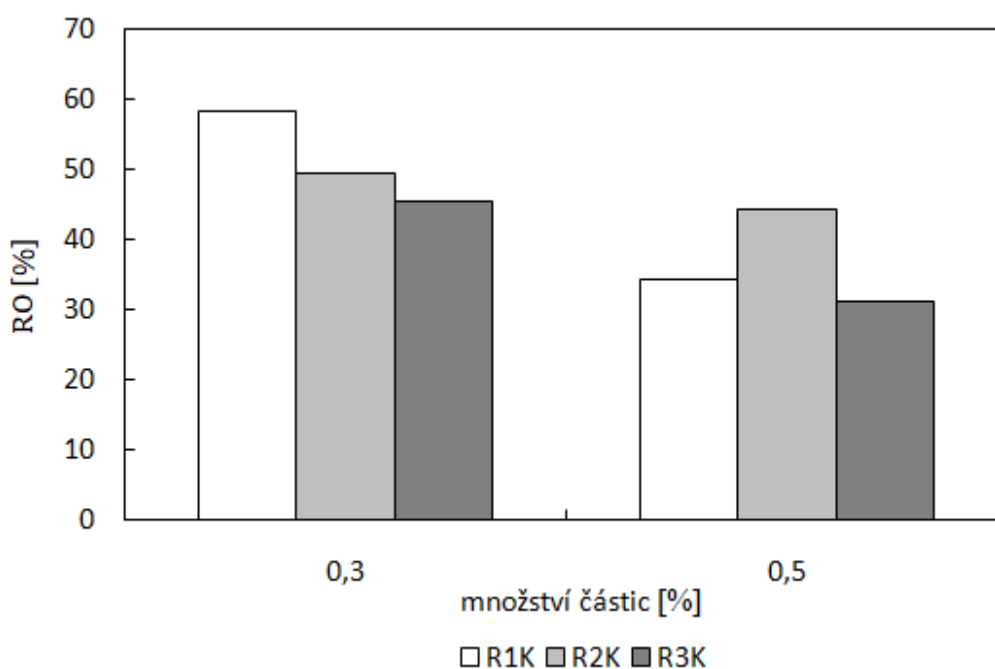
Obrázek 38: Emulzní gely připravené pomocí teflonových formiček. První gel zleva byl připraven cestou R1, prostřední R2 a poslední cestou R3. Všechny uvedené gely obsahují 0,5 % částic.



Obrázek 39: Uvolněný olej při sušení emulzních gelů. První gel zleva byl připraven cestou R1, prostřední R2 a poslední cestou R3. Všechny uvedené gely obsahují 0,5 % částic.



Obrázek 40: Vliv cesty přípravy (R1, R2, R3) a množství stabilizujících částic na množství uvolněného oleje z gelů bez kurkuminu.



Obrázek 41: Vliv cesty přípravy (R1, R2, R3) množství stabilizujících částic na množství uvolněného oleje z gelů s kurkuminem.

Gely připravené ve Studii II uvolňovaly méně oleje než gely připravené ve Studii I, což bylo zřejmě způsobeno menšími emulzními kapkami, které byly obsaženy ve výchozích emulzích. Takto připravené gely byly po vysušení stabilní a měly homogenní texturu.

Obrázek 40 a 41 dokumentuje, že množství uvolněného oleje závisí jak na cestě přípravy, tak i na množství stabilizujících částic. Množství uvolněného oleje (RO) bylo hodnoceno u všech tří sad emulzí připravených ve Studii II a ve srovnání se Studií I bylo nižší. Hodnota RO klesala s rostoucím množstvím stabilizujících částic v emulzi, gely s obsahem 0,5 % částic byly pevné a mohly být dále použity v další práci zaměřené na jejich charakterizaci. Jako vhodnější způsob přípravy se dle výsledků uvedených na Obrázku 41 jeví cesta R3, jelikož gely připraveny touto metodou uvolnily pouze 30 % oleje, vzhledem k celkové hmotnosti vysušeného gelu.

### 10.5 Transdermální penetrace *in vitro*

Cílem odborné společnosti je nahrazení testů na zvířatech biologickými alternativními modely. Stanovení transdermální penetrace *in vitro* za použití prasečí kůže testování přináší vhodnou alternativu k hodnocení akutní toxicity na zvířatech. Koncept 3R byl popsán již v roce 1992 a zastupuje moderní alternativní postupy, které zahrnují nahrazení („replacement“), redukci („reduction“) a vylepšení („refinement“) zaběhlých postupů. [90]

Sledování transdermální penetrace kurkuminu enkapsulovaného v Pickeringových emulzích bylo studováno i v rámci této diplomové práce. Před aplikací oleogelů na prasečí kůži, použitou při zjišťování schopnosti kurkuminu penetrovat kůži, byla jejich homogenita sledována měřením transepidermální ztráty vody (TEWL) a měřením tloušťky daného vzorku. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 9. K testování nebyly použity vzorky s hodnotou TEWL > 15 g/m<sup>2</sup>h.

Tabulka 9: Hodnota TEWL a tloušťka kůže použité pro stanovení transdermální penetrace kurkuminu z gelů připravených cestou R1, R2 a R3.

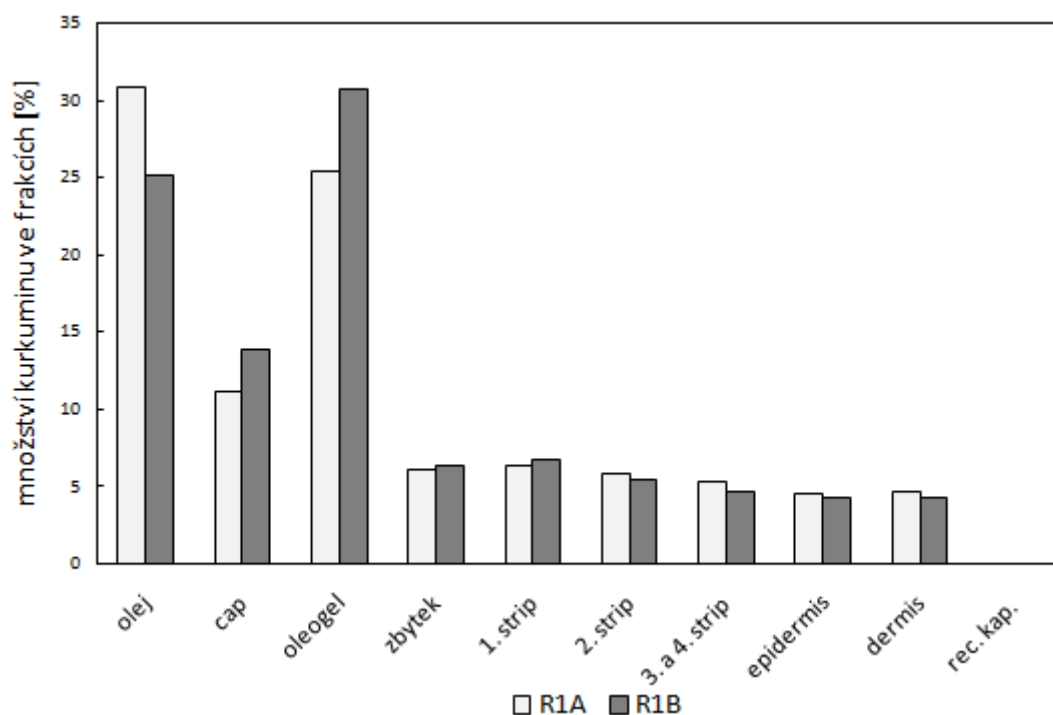
vzorek oleogelu	TEWL kůže [g/m <sup>2</sup> h]	tloušťka kůže [mm]
<b>R1 A</b>	12,0	1,90
<b>R1 B</b>	8,1	1,26
<b>R2 A</b>	10,2	1,22
<b>R2 B</b>	9,5	1,50
<b>R3 A</b>	9,5	1,40
<b>R3 B</b>	11,7	1,13

Receptorová kapalina, jejíž základ tvořil fosfátový pufr, který simuloval přirozené prostředí lidského těla, obsahovala 1,5 % Brij 98 (polyethylenglykol hexadecylether), který

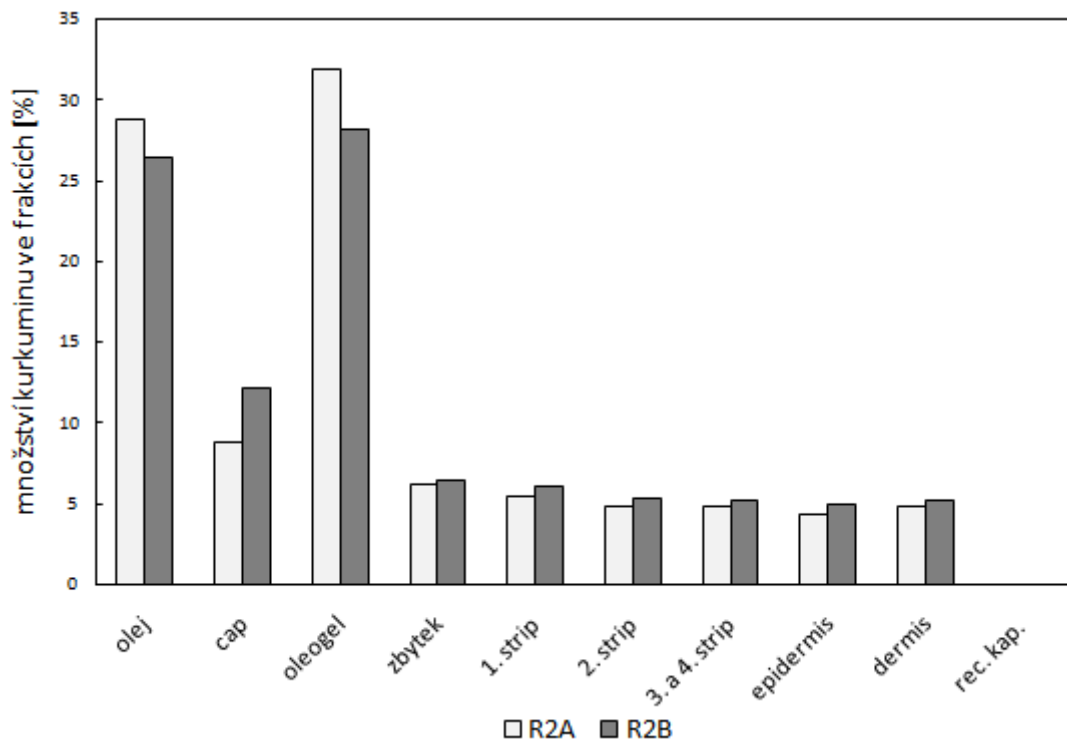
je řazen mezi povrchově aktivní látky a napomáhal průchodu lipofilního kurkuminu kožní bariérou, a 0,05 % gentamycinu sloužícího jako antibakteriální přísada. Uvedené složení receptorové kapaliny je v literatuře [92] doporučeno pro stanovení transdermální penetrace lipofilních látek s cílem, co nejvíce zobjektivnit dané měření.

Testovány byly pouze emulzní gely ze Studie II obsahující kurkumin, stabilizované 0,5 % částic a připravené všemi třemi cestami přípravy. Gely s obsahem 0,5 % částic byly obecně pevné a nedrolivé a bylo možné je pro experiment použít. Pro stanovení byl vždy jeden vzorek gelu rozdělen na dvě části o přibližně stejné hmotnosti. Pouze v případě vzorku připraveného cestou R1 bylo nutné použít vzorky ze dvou rozdílných sad, jelikož hmotnost získaného emulzního gelu byla v porovnání s cestou R2 a R3 menší.

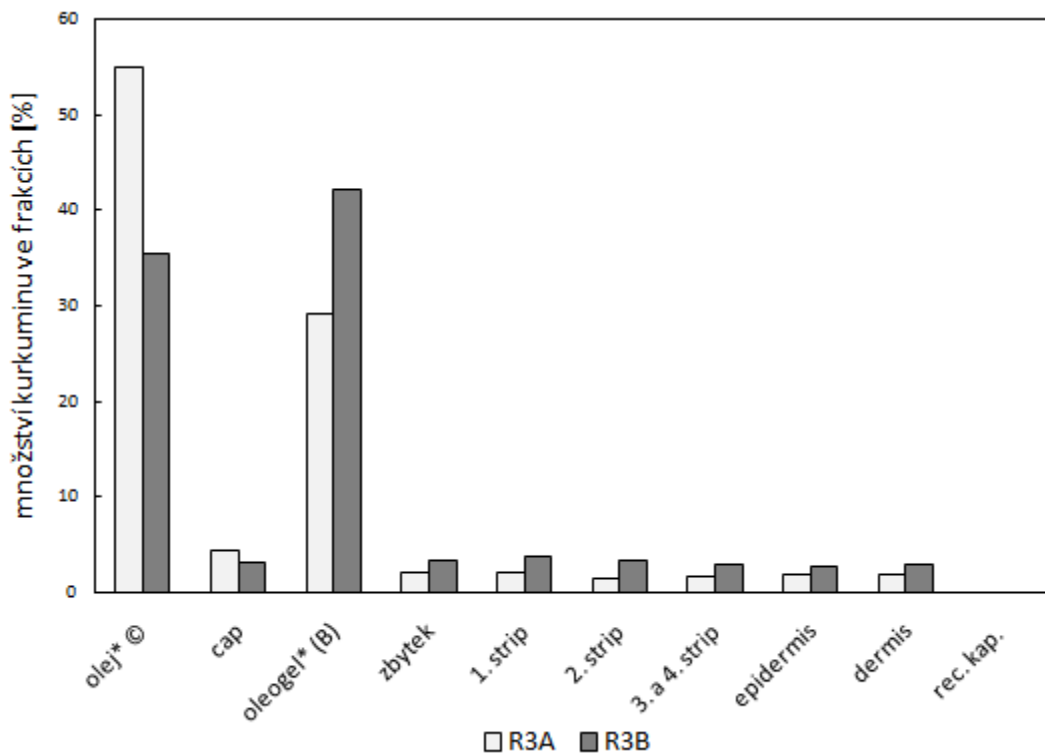
Označení množství kurkuminu ve frakcích [%] na ose y odpovídá procentuálnímu zastoupení kurkuminu v jednotlivých frakcích vztaženému k celkové koncentraci kurkuminu ve všech frakcích.



Obrázek 42: Množství kurkuminu ve frakcích vzorků kůže. Použití emulzního gelu připraveného cestou R1 (dvě stanovení).



Obrázek 43: Množství kurkuminu ve frakcích vzorků kůže. Použití emulzního gelu připraveného cestou R2 (dvě stanovení).



Obrázek 44: Množství kurkuminu ve frakcích vzorků kůže. Použití emulzního gelu připraveného cestou R3 (dvě stanovení).



Dle hodnot z Tabulky 9 lze konstatovat, že prasečí kůže použitá k testování transdermální penetrace kurkuminu se nacházela v dobrém stavu a výsledek studie tedy není nijak zkreslen rozdílnou kvalitou jednotlivých kožních vzorků. Při srovnání výsledků z Obrázků 40 až 42 je patrné, že největší procentuální zastoupení kurkuminu zůstalo v oleji uvolněném v průběhu experimentu z gelu a v původním emulzním gelu umístěném na kožním vzorku. Toto se týká všech gelů, avšak na výše uvedených obrázcích lze pozorovat rozdíly v jejich chování v závislosti na cestě přípravy emulzního gelu. V případě gelů, které byly připravené cestou R1 a R2, zůstalo přibližně 60 % kurkuminu enkapsulováno v oleogelu a v oleji, který se uvolnil na povrchu kožního vzorku. Zbylé množství kurkuminu bylo k dispozici pro následnou penetraci. V oleogelu a uvolněném oleji vzorku gelu připraveného cestou R3 pak zůstalo více než 75 % kurkuminu. Z výsledků je zřejmé, že nejpomalejší penetrace kurkuminu byla pozorována pro gely z emulzí připravené cestou R3. To je poněkud překvapivé, protože tyto gely současně uvolnily po aplikaci na kožní vzorek nejvíce oleje. Lze proto spekulovat, že částice CAS, které se primárně nacházejí v gelu mezi emulzními kapkami a částice CNC uvolněné rozpadem emulzních kapek, mohou tvořit na povrchu kůže ochrannou vrstvu, která zpomaluje průnik oleje.

U všech šesti vzorků byl kurkumin následně absorbován do všech vrstev kůže kromě receptorové kapaliny (vzorek 9), což vypovídá o skutečnosti, že v reálné situaci by nedošlo k penetraci kurkuminu do lymfatického systému.

Nežádoucí se zdá být taktéž absorpce kurkuminu do oblasti *dermis*, která je bohatá na krevní řečiště. Z Nařízení Evropského Parlamentu a Rady 1223/2009 týkající se kosmetických přípravků plyne, že tyto přípravky nesmí ovlivňovat fyziologické pochody v organismu a cílem je pouze péče o svrchní část kůže. [91] Absorpce kurkuminu do hlubších vrstev pokožky je tedy zcela nežádoucí při aplikaci kurkuminu jako kosmetické substance, avšak lipofilita kurkuminu by mohla této situaci zabránit.

Tabulka 10: Koncentrace kurkuminu ve všech frakcích a návratnost zachyceného kurkuminu.

	<b>celková koncentrace kurkuminu ve všech frakcích [mg/ml]</b>	<b>návratnost [%]</b>
<b>R1 A</b>	0,046	31
<b>R1 B</b>	0,054	45
<b>R2 A</b>	0,053	42
<b>R2 B</b>	0,050	52
<b>R3 A</b>	0,106	93
<b>R3 B</b>	0,082	109

V Tabulce 10 jsou uvedeny hodnoty návratnosti kurkuminu po provedení experimentu vzhledem k jeho nanesenému množství. Dle pokynu Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) č. 428 zabývajícího se testování chemikálií metodou *in vitro*, by se měla hodnota návratnosti pohybovat v rozmezí hodnot  $100 \pm 10$  %. [92] Toto splňuje pouze emulzní gel připravený cestou R3 v obou stanoveních. Návratnost u ostatních gelů se pohybovala v rozmezí 30–50 %.

Vhodná cesta dopravy kurkuminu do organismu je při jeho použití stěžejní, jelikož rychlost degradace kurkuminu ve fyziologickém prostředí je velká. Z tohoto důvodu byly studovány možnosti aplikace kurkuminu orální či injekční cestou. Transdermální penetrace kurkuminu je výzvou, kterou se v posledních letech snaží odborná společnost zdolat. Kurkumin musí být uložen ve vhodném nosiči, který je schopen do kůže penetrovat a následně cíleně kurkumin v kůži uvolnit. Požadavky na penetraci se však liší v závislosti na oboru, ve kterém je kurkumin používán. Dermatologie či farmaceutický průmysl budou nejčastěji požadovat hlubokou penetraci kurkuminu, kosmetické přípravky budou pečovat pouze o nejsvrchnější části kůže.

Mezi lipofilní vehikula, která již byla využita pro enkapsulaci kurkuminu a následnou transdermální penetraci, lze zařadit mikroemulze, liposomy či ethosomy. [93, 94] Studie z roku 2015 popisuje mikroemulze typu V/O, které byly využity jako transportní systém při kožní penetraci a permeaci. U emulzních systémů existuje korelace mezi velikostí emulzních kapek a úspěšností penetrace, proto je nutné, aby velikost kapek emulzí sloužících jako základ pro přípravu emulzních gelů byla konstantní. Nevýhodou při použití

mikroemulzí jako transportních systémů při kožní penetraci se zdá být přítomnost vodné fáze v emulzi, jejíž přítomnost je však emulzních gelů eliminována. [93]

Použití Pickeringových emulzí se zdá být velmi vhodnou volbou pro následnou transdermální penetraci, jelikož zde dochází k vyloučení surfaktantů, které jsou velmi často zodpovědné za kožní iritaci. Gely jsou schopné během aplikace na postižené místo zastupovat kromě funkce transportního systému i funkci hydrofilního filmu, v případě emulzních gelů funkci okluziv. Gely obsahující kurkumin jsou schopny penetrace až do *dermis*, čehož by mohlo být využíváno zejména při cílené aplikaci kurkuminu do hlubších vrstev kůže, případně do krevního oběhu.

## ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala tematikou kurkuminu a možnostmi jeho uplatnění zejména v oblasti kosmetiky, dermatologie a farmakologie. Druhou, neméně důležitou tematikou, se staly Pickeringovy emulze stabilizované kaseinátem sodným a celulózovými nanokrystaly. Olejová fáze emulze se zdá být vhodná pro uchování lipofilního kurkuminu, který je zároveň emulzí chráněn před rychlou degradací v organismu nebo vlivem okolního prostředí. Vybrané emulze se následně staly podkladem pro přípravu emulzních gelů, jejichž schopnost uvolňovat enkapsulovaný kurkumin byla testována pomocí transdermální penetrace *in vitro*.

Cílem práce bylo porovnat jednotlivé typy emulzí a vliv kurkuminu na charakter připravených systémů. Emulze byly během experimentální studie připravovány opakovaně třemi různými cestami přípravy (R1, R2, R3) s různým množstvím stabilizujících částic (0,2, 0,3 a 0,5 %). Taktéž byly připravovány sady emulzí s olejovou fází s kurkuminem i bez něj.

Prvním krokem experimentální části byl výběr vhodného oleje pro olejovou fázi emulze. Byly testovány tři vzorky nefiltrovaných olivových olejů, ve kterých lze kurkumin rozpouštět. Mezipovrchové napětí mezi olejem a vodnými disperzemi kaseinátu sodného a nanokrystalů celulózy vypovídá o schopnosti těchto částic ovlivnit proces tvorby emulze. Kaseinát sodný je schopen i ve velmi nízké koncentraci snížit povrchové napětí mezi olejem a vodou, naopak nanokrystaly celulózy nejevily žádnou povrchovou aktivitu.

Emulze byly připravovány ultrazvukovou sonikací. V preformulační studii bylo zjištěno, že nejlepší stability, nejmenší průměrné velikosti emulzních kapek a nejužší distribuce emulzních kapek dosahovaly emulze připravené při amplitudě 100 %, která pak byla použita i pro přípravu následujících systémů.

Měřením pomocí laserové difrakce bylo zjištěno, že velikost emulzních kapek závisí zejména na cestě přípravy emulze a přítomnosti kurkuminu v olejové fázi. Cesta přípravy R3 napomáhala vzniku menších emulzních kapek, což značí, že je vhodné nejprve provést Pickeringovu stabilizaci pomocí celulózových nanokrystalů a až poté do systému přidat povrchově aktivní látku, v našem případě kaseinát sodný, který sníží mezipovrchové napětí a přispěje ke stabilizaci vytvořeného systému. Emulze obsahující kurkumin v olejové fázi vykazovaly menší emulzní kapky ve srovnání s emulzemi bez kurkuminu. V tomto případě

je proto možné konstatovat, že kurkumin neslouží pouze jako aktivní látka dodávaná do organismu, ale má i technologický vliv na přípravu a fyzikálně-chemické vlastnosti emulzí.

Hlavním požadavkem, vzhledem ke kvalitě připravených emulzí, je jejich následná stabilita. V tomto případě byla stabilita hodnocena nejen vizuálně, ale i pomocí indexu krémování. U emulzí připravených cestou přípravy R2 došlo k úplnému rozpadu a nelze je tedy považovat za stabilní systémy. U systémů R1 a R3 bylo dosaženo částečné stability po dobu jednoho měsíce, která se však výrazně zlepšila po přidání kurkuminu do olejové fáze.

Dalším krokem byla příprava emulzních gelů vysušením zakoncentrované emulzní vrstvy dané emulze získané centrifugací. Důležitým hodnotícím parametrem při přípravě emulzních gelů bylo množství uvolněného oleje během sušení. Emulzní gely ze Studie I však nevykazovaly korelaci s charakteristikami, které byly hodnoceny u výchozích emulzí. Nebyl zde pozorován ani vliv množství stabilizujících částic, ani cesty přípravy emulzí či přítomnosti/absence kurkuminu na množství uvolněného oleje.

Z tohoto důvodu byly v další studii připraveny výchozí emulze na jiném sonikačním zařízení, kdy vlastnosti získaných emulzních gelů korelovaly s parametry původních emulzních systémů. Hodnota RO (uvolněný olej z gelu po sušení) klesala s rostoucím množstvím stabilizujících částic v gelu a nejnižších hodnot nabývala u gelů z emulzí připravených cestou R3. Tyto emulzní gely byly pevné, ale zároveň měkké a byly vhodné pro další manipulaci.

Závěrečným cílem experimentální práce bylo stanovit penetraci kurkuminu do kůže. Testování probíhalo pomocí Franzových komůrek *in vitro* na prasečí kůži a koncentrace kurkuminu v jednotlivých kožních vzorcích byla stanovena spektrofotometricky. Po zpracování výsledků bylo zřejmé, že kurkumin byl detekován ve všech vrstvách kůže vyjma receptorové kapaliny. Návratnost kurkuminu byla nejvyšší u gelů připravených cestou přípravy R3 a pohybovala se v rozmezí stanovených OECD v Pokynu pro testování chemikálií č. 428.

Diplomová práce potvrdila, že na přípravu, stabilitu a vlastnosti Pickeringových emulzí, a z nich připravených emulzních gelů, mají vliv jak cesta přípravy emulzí (R1, R2, R3), tak i množství stabilizujících částic (0,2, 0,3, a 0,5 %) a přítomnost/absence kurkuminu. Tyto výsledky slouží jako podklad pro další výzkumnou práci, která se zaměří se na stanovení širšího spektra biologických vlastností kurkuminových emulzních gelů a na důkladné prozkoumání transdermální penetrace kurkuminu do kůže a jeho stability.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] SCARTEZZINI, P. a E. SPERONI. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2000, **71**(1), 23-43 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00213-0. ISSN 03788741. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874100002130>
- [2] AGGARWAL, B.B., C. SUNDARAM, N. MALANI, H. ICHIKAWA. Molecular Targets and Therapeutical Use of Curcumin in Health and Disease. Springer Science + Business Media, USA. 2007. ISBN 0387464018.
- [3] ESATBEYOGLU, T., P. HUEBBE, I.M.A. ERNST, D. CHIN, A.E. WAGNER a G. RIMBACH. Curcumin-From Molecule to Biological Function. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2012, **51**(22), 5308-5332 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.1002/anie.201107724. ISSN 14337851. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201107724>
- [4] AGRAWAL, D. K. a P. K. MISHRA. Curcumin and its analogues: potential anticancer agents. *Medicinal research reviews* [online]. 2010, **30**(5), 818-60 [cit. 2019-12-029]. DOI: 10.1002/med.20188. ISSN 10981128. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/med.20188>
- [5] WANG, Y.J., M.H. PAN, L.I. LIN, Y.S. HO, J.K. LIN a kol. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1997, **15**(12), 1867 - 1876 [cit. 2020-01-02]. DOI: 10.1016/S0731-7085(96)02024-9. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708596020249?via%3Dihub>
- WATSON, K., D.R. WILSON. Medical News Today: The positive and negative health effects of turmeric [online]. Brighton, UK, 2012. [cit. 2019-12-29]
- [6] KATSUYAMA, Y., T. KITA, N. FUNA a S. HORINOUCI. Curcuminoid Biosynthesis by Two Type III Polyketide Synthases in the Herb *Curcuma longa*. *Journal of biological chemistry* [online]. 2009, **284**(17), 11160-11170 [cit. 2019-12-29]. ISSN 00219258. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsagr&an=edsagr.US201301619626&scope=site>

- [7] KATSUYAMA, Y., S. HORINOUCI a T. KITA. Identification and characterization of multiple curcumin synthases from the herb *Curcuma longa*. *FEBS Letters* [online]. 2009, **583**(17), 2799 - 2803 [cit. 2019-12-30]. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.07.029. ISSN 00145793. Dostupné z: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2009.07.029>
- [8] TIMMERMANN, B. N. a D. R. GANG. Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry* [online]. 2006, **67**(18), 2017-29 [cit. 2020-04-09]. ISSN 00319422. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&an=16890967&scope=sit e>
- [9] TØNNESEN, H.H., M. MÁSSON a T. LOFTSSON. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2002, **244**(1), 127-135 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00323-X. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851730200323X?via%3Dihub>
- [10] PRIYADARSINI, K.I., D.K. MAITY, G.H. NAIK, M.S. KUMAR, M.K. UNNIKRISHNAN, J.G. SATAV a H. MOHAN. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2003, **35**(5), 475-484 [cit. 2020-01-015]. DOI: 10.1016/S0891-5849(03)00325-3. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584903003253?via%3Dihub>
- [11] MOHAMED, S.A., O.A.M. AL-BAR, R.M. EL-SHISHTAWY a A.R. AL-NAJADA. Chemical modification of curcumin: Solubility and antioxidant capacity. *International Journal of Food Properties* [online]. 2017, **20**(3), 718 - 724 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1080/10942912.2016.1177545. ISSN 15322386. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=0&sid=cf99955d-cf1b-4fe9-ba65-947abe81c838%40pdc-v-sessmgr02&bdata=Jmxhbmc9Y3Mmc210ZT11ZHMtbG12ZQ%3d%3d#AN=edselc.2-52.0-84991032547&db=edselc>
- [12] JOVANOVIĆ, S.V., S. STEENKEN, C.W. BOONE a M.G. SIMIĆ. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *Journal of the American Chemical*

*Society* [online]. 1999, **121**(41), 9677 - 9681 [cit. 2020-01-02]. DOI: 10.1021/ja991446m. ISSN 00027863. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja991446m>

[13] GOEL, A., A.B. KUNNUMAKKARA a B.B. AGGARWAL. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2008, **75**(4), 787-809 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.08.016. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295207005758?via%3Dihub>

[14] MANOLOVA, Y., V. DENEVA, L. ANTONOV a kol. The effect of the water on the curcumin tautomerism: A quantitative approach. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2014, **132**, 815-820 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1016/j.saa.2014.05.096. ISSN 13861425. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386142514008889>

[15] ZDUŇSKA, K., A. DANA, A. KOLODZIEJCZAK a H. ROTSZTEJN. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacology* [online]. 2018, **31**(6), 332-336 [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.1159/000491755. ISSN 16605527.

[16] MENG, B., J. LI a H. CAO. Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Curcumin on Diabetes Mellitus and its Complications. *CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN* [online]. 2013, **19**(11), 2101-2113 [cit. 2020-01-09]. ISSN 13816128. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edswsc&an=000316456600011&scope=site>

[17] M. KHOPDE, S., K.I. PRIYADARSINI, P. VENKATESAN a M.N.A. RAO. Free radical scavenging ability and antioxidant efficiency of curcumin and its substituted analogue. *Biophysical Chemistry* [online]. 1999, **80**(2), 85 - 91 [cit. 2020-01-22]. DOI: 10.1016/S0301-4622(99)00070-8. ISSN 03014622. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301462299000708?via%3Dihub>

[18] ABE, Y., S. HASHIMOTO a T. HORIE. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacological research* [online]. 1999, **39**(1), 41-7 [cit. 2020-01-21]. ISSN 10436618. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&an=10051376&scope=sit>  
e



[19] SHARMA, R.A., A.J. GESCHER a W.P. STEWARD. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer* [online]. 2005, **41**(13), 1955-1968 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.1016/j.ejca.2005.05.009. ISSN 09598049. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804905004776>

[20] RYBKA, J. Diabetes mellitus – komplikace a přidružená onemocnění. Grada publishing a.s., Praha **2007**. 320 s. ISBN 978-80-247-1671-8.

[21] MEGHANA, K., G. SANJEEV a B. RAMESH. Curcumin prevents streptozotocin-induced islet damage by scavenging free radicals: A prophylactic and protective role. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2007, **577**(1), 183-191 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.09.002. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014299907009764?via%3Dihub>

[22] KANITKAR, M., K. GOKHALE, S. GALANDE a R.R. BHONDE. Novel role of curcumin in the prevention of cytokine-induced islet death in vitro and diabetogenesis in vivo. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2008, **155**(5), 702 - 713 [cit. 2020-01-11]. DOI: 10.1038/bjp.2008.311. ISSN 00071188. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=10bbc3cc-1bd0-483f-8bb6-8c0d539fbd1c%40pdc-v-sessmgr03>

[23] ROCKEN, M., M. SCHALLER, E. SATTLER, W. BURGDORF. Kapesní atlas dermatologie. Grada Publishing, a.s., 2018. ISBN 978-80-271-0106-1.

[24] HENG, M.C.Y., M.K. SONG, J. HARKER a M.K. HENG. Drug-induced suppression of phosphorylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by clinical, histological and immunohistochemical parameters. *British Journal of Dermatology* [online]. 2000, **143**(5), 937 - 949 [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2000.03767.x. ISSN 00070963. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069500>

[25] BAHRAINI, P., M. RAJABI, G. SARAFIAN, P. MANSOURI, Z. AZIZIAN a R. CHALANGARI. Turmeric tonic as a treatment in scalp psoriasis: A randomized placebo-control clinical trial. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2018, **17**(3), 461 - 466 [cit. 2020-01-22]. DOI: 10.1111/jocd.12513. ISSN 14732165. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=52636ba7-2c13-483c-b4a2-0cc4255795c7%40pdc-v-sessmgr01>

- [26] LIU, X., R. ZHANG, H. SHI, C. XU, X. LI, Y. LI a A. TAHA. Protective effect of curcumin against ultraviolet A irradiation-induced photoaging in human dermal fibroblasts. *Molecular Medicine Reports* [online]. 2018, **17**(5), 7227 - 7237 [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.3892/mmr.2018.8791. ISSN 17913004. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=38112404-eb59-49d3-b15f-23751c18981a%40pdc-v-sessmgr05>
- [27] European Food Safety Authority. Scientific Option on the re-evaluation of curcumin (E 100) as a food additive. *EFSA Journal* [online], 8. 1679 (2010). Dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1679>
- [28] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. In: EUR-Lex [online]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008R1333-20160525&from=CS>
- [29] ROGOŠIĆ, M. Terminology of Polymers and Polymerization Processes in Dispersed Systems (IUPAC Recommendations 2011). *Kemija u Industriji* [online]. 2012, **61**(07-08), 361-381 [cit. 2020-01-15]. ISSN 00229830. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsdoj&an=edsdoj.07f3e735261747478c813d6409bd838f&scope=site>
- [30] Modern Aspects of Emulsion Science; B.P. Binks (Ed.); The Royal Society of Chemistry, London, 1999, XII+430 pages, ISBN 0-85404-439-6 @\$79.00. *Carbohydrate Polymers* [online]. 1999, **40**(2), 159-159 [cit. 2020-01-15]. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edo&an=ejs2840161&scope=site>
- [31] BARTOVSKÁ L., M. ŠIŠKOVÁ. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav [online]. Praha : VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2020-03-24]. ISBN 80-7080-579-X. Dostupné z: [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-80-7080-579-X/pages-img/199.html>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/199.html)
- [32] KREJČÍ, J. Chemie a technologie tenzidů a detergentů, distanční text. CEPAC Morava, Projekt OP RLZ. Opatření 3.2-0309. Dostupný z vlastních zdrojů.
- [33] McCLEMENTS, D.J. Nanoemulsion versus microemulsion: terminology, differences and similarities. *Soft Matter* [online]. **2012**, **8**, 1719 [cit. 2020-01-18]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/f959/41904f676ad6c8f504b9c068d53f68922f44.pdf>

- [34] NASTITI, C.M.R.R., T. PONTO, E. ABD, J.E. GRICE, H.A.E. BENSON a M.S. ROBERTS. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. *Pharmaceutics* [online]. 2017, **9**(4), 37-61 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.3390/pharmaceutics9040037. ISSN 19994923. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=f6ca9a96-9b0a-473d-a4e4-688d66a0a2d6%40pdc-v-sessmgr03>
- [35] VACLAVIK, V.A., E.W. CHRISTIAN. Essentials of Food science. New York, USA: Springer Science + Bussines Media, **2008**. ISBN 978-0-387-69939-4.
- [36] ARAIZA-CALAHORRA, A., M. AKHTAR a A. SARKAR. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility. *Trends in Food Science* [online]. **2018**, **71**, 155-169 [cit. 2020-02-11]. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.11.009. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417304387?via%3Dihub>
- [37] AHMED, K., Y. LI, D.J. MCCLEMENTS a H. XIAO. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food chemistry* [online]. 2012, **132**(2), 799-807 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.039. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611016207?via%3Dihub>
- [38] JOUNG, H.J., CHOI, M.J., KIM, J.T., PARK, S.H., PARK, H.J. a G. SHIN. Development of Food-Grade Curcumin Nanoemulsion and its Potential Application to Food Beverage System: Antioxidant Property and In Vitro Digestion. *Journal Of Food Science* [online]. 2016, **81**(3), N745 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1111/1750-3841.13224. ISSN 00221147. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26807662>
- [39] MA, P., Q. ZENG, K. TAI, X. HE, Y. YAO, X. HONG a F. YUAN. Preparation of curcumin-loaded emulsion using high pressure homogenization: Impact of oil phase and concentration on physicochemical stability. *LWT* [online]. **2017**, **84**, 34-46 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.04.074. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817303018?via%3Dihub>
- [40] MCCLEMENTS, D.J. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Advances in Colloidal and Interface Science* [online]. 2012, **174**, 1-30 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.cis.2012.03.002. ISSN

00018686.

Dostupné

z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868612000358?via%3Dihub>

[41] ZOU, L., W. LIU, C. LIU, H. XIAO a D.J. MCCLEMENTS. Utilizing Food Matrix Effects To Enhance Nutraceutical Bioavailability: Increase of Curcumin Bioaccessibility Using Excipient Emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. **2015**, **63**(7), 2052-2062 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1021/jf506149f. ISSN 00218561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf506149f>

[42] KUMAR, A., G. KAUR, S. K. KANSAL, G. R. CHAUDHARY a S. K. MEHTA. (Cationic plus nonionic) mixed surfactant aggregates for solubilisation of curcumin. *Journal of Chemical Thermodynamics* [online]. **2016**, **93**, 115-122 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.jct.2015.09.027. ISSN 00219614. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021961415003572?via%3Dihub>

[43] JASPART, S., G. PIEL, L. DELATTRE a B. EVRARD. Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterisation, drug release and applications. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2005, **2**(1), 75-87 [cit. 2020-02-15]. ISSN 17425247. Dostupné z:

<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edo&an=ejs7557451&scope=site>

[44] DE LEEUW, J., H.C. DE VIJLDER, P. BJERRING a H.A.M. NEUMANN. Liposomes in dermatology today. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology* [online]. 2009, **23**(5), 505-516 [cit. 2020-02-20]. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2009.03100.x. ISSN 09269959. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19175703>

[45] PICKERING, Spencer Umfreville. CXCVI.—Emulsions. *Journal of the Chemical Society, Transactions* [online]. **1907**, **91**, 2001-2021 [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.1039/CT9079102001. ISSN 03681645.

[46] ALBERT, C., M. BELADJINE, N. TSAPIS, E. FATTAL, F. AGNELY a N. HUANG. Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE* [online]. **2019**, **309**, 302-332 [cit. 2020-01-29]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.07.003. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365919303906?via%3Dihub>

- [47] YANG, Y, Z. FANG, X. CHEN, W. ZHANG, Y.XIE, Y.CHEN, Z. LIU a W. YUAN. An Overview of Pickering Emulsions: Solid-Particle Materials, Classification, Morphology, and Applications. *FRONTIERS IN PHARMACOLOGY* [online]. 2017, **8** [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.3389/fphar.2017.00287. ISSN 16639812. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5440583/>
- [48] FOURNIER, C.O., L. FRADETTE a P. A. TANGUY. Effect of dispersed phase viscosity on solid-stabilized emulsions. *Chemical Engineering Research* [online]. **2009**, **87**(4), 499-506 [cit. 2020-01-29]. DOI: 10.1016/j.cherd.2008.11.008. ISSN 02638762. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=e66beb9c-869e-4cc4-8356-b4777a44d318%40pdc-v-sessmgr05>
- [49] BINKS, B.P., T.S. HOROZOV. Colloidal Particles at Liquide Interfaces. Cambridge University Press, **2006**. 518s. ISBN 0521848466.
- [50] DESHMUKH, O.S., D. VAN DEN ENDE, M. C. STUART, F. MUGELE a M. H. G. DUIITS. Hard and soft colloids at fluid interfaces: Adsorption, interactions, assembly & rheology. *ADVANCES IN COLLOID AND INTERFACE SCIENCE* [online]. **2015**, **222**, 215-227 [cit. 2020-01-29]. DOI: 10.1016/j.cis.2014.09.003. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868614002504?via%3Dihub>
- [51] CAPRON, I. a B. CATHALA. Surfactant-free high internal phase emulsions stabilized by cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules* [online]. **2013**, **14**(2), 291 - 296 [cit. 2020-01-30]. DOI: 10.1021/bm301871k. ISSN 15257797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm301871k>
- [52] WEI, Z., C. WANG, H. LIU, S. ZOU a Z. TONG. Facile fabrication of biocompatible PLGA drug-carrying microspheres by O/W pickering emulsions. *Colloids and surfaces* [online]. **2012**, **91**, 97-105 [cit. 2020-01-30]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.10.044. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092777651100628X?via%3Dihub>
- [53] ZHANG, S., Y. ZHOU a C. YANG. Pickering emulsions stabilized by the complex of polystyrene particles and chitosan. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engeneering Aspects* [online]. **2015**, **482**, 338-344 [cit. 2020-01-30]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.06.029. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775715300480?via%3Dihub>

- [54] FENG, Y. a L. YOUNGSO. Surface modification of zein colloidal particles with sodium caseinate to stabilize oil-in-water pickering emulsion. *Food Hydrocolloides* [online]. 2016, **56**, 292-302 [cit. 2020-01-30]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.12.030. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X15301971?via%3Dihub>
- [55] ADITYA, N. P., I.E. HAMILTON a I.T. NORTON. Amorphous nano-curcumin stabilized oil in water emulsion: Physico chemical characterization. *Food Chemistry* [online]. 2017, **224**, 191-200 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.12.082. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616321033?via%3Dihub>
- [56] NECHYPORCHUK, Oleksandr, M. N. BELGACEM a J. BRAS. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products* [online]. 2016, **93**, 2-25 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.02.016. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092666901630084X?via%3Dihub>
- [57] Wüstenberg, T. Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry. 2014, Wiley-VCH: BadenWürttemberg, Germany. p. 91-142. ISBN 978-3-5276-8293-5. DOI: 10.1002/9783527682935.ch03.
- [58] KLEMM, D., F. KRAMER, S. MORITZ a kol. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angewandte Chemie* [online]. 2011, **50**(24), 5438-5466 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1002/anie.201001273. ISSN 14337851. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201001273>
- [59] Rånby, B.G. Aqueous colloidal solutions of cellulose micelles. 1949. 3(5): p. 649-650. DOI 10.3891/acta.chem.scand.03-0649 Dostupné z: <http://acta.chem.scand.org/doi/10.3891/acta.chem.scand.03-0649>
- [60] FUJISAWA, S., E. TOGAWA a K. KURODA. Nanocellulose-stabilized Pickering emulsions and their applications. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2017, **18**(1), 959-971 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1080/14686996.2017.1401423. ISSN 14686996. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5784314/>

- [61] LEUNG, A.C.W., S. HRAPOVIC, E. LAM, Y. LIU, K.B. MALE, K.A. MAHMOUD a J.H.T. LUONG. Characteristics and properties of carboxylated cellulose nanocrystals prepared from a novel one-step procedure. *Small* [online]. 2011, **7**(3), 302 - 305 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1002/smll.201001715. ISSN 16136810. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/smll.201001715>
- [62] TARIMALA, S. a L.L. DAI. Structure of microparticles in solid-stabilized emulsions. *Langmuir* [online]. 2004, **20**(9), 3492 - 3494 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1021/la036129e. ISSN 07437463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la036129e>
- [63] DIAS MEIRELLES, A.A., A.L. RODRIGUES COSTA a R.L. CUNHA. The stabilizing effect of cellulose crystals in O/W emulsions obtained by ultrasound process. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL* [online]. 2020, **128** [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108746. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996919306325?via%3Dihub>
- [64] KARGAR, M., K. FAYAZMANESH, M. ALAVI, F. SPYROPOULOS a I.T. NORTON. Investigation into the potential ability of Pickering emulsions (food-grade particles) to enhance the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid And Interface Science* [online]. 2012, **366**(1), 209-215 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.09.073. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021979711012185?via%3Dihub>
- [65] GESTRANIUS, M., P. STENIUS, E. KONTTURI, J. SJOBLÖM a T. TAMMELIN. Phase behaviour and droplet size of oil-in-water Pickering emulsions stabilised with plant-derived nanocellulosic materials. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2017, **519**, 60-70 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.04.025. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775716302576?via%3Dihub>
- [66] MIYAMOTO, H., D.M. REIN, K. UEDA, C. YAMANE a Y. COHEN. Molecular dynamics simulation of cellulose-coated oil-in-water emulsions. *Cellulose* [online]. 2017, **24**(7), 2699-2711 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1007/s10570-017-1290-1. ISSN 09690239. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10570-017-1290-1>
- [67] McClements, D.J. Food emulsions: principles, practice and techniques. Third Edition. CRC Press, New York, 2015. ISBN 978-1-4987-2669-6.

- [68] DICKINSON, E. Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* [online]. 1999, **15**(2), 161-176 [cit. 2020-03-09]. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edswsc&an=000082433200005&scope=site>
- [69] JANŠTOVÁ, B., L. VORLOVÁ a kol. Technologie mléka a mléčných výrobků [elektronická skripta]. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 141s. Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-637-7.
- [70] ALLEN, K.E., E. DICKINSON a B. MURRAY. Acidified sodium caseinate emulsion foams containing liquid fat: A comparison with whipped cream. *Food science and technology* [online]. 2006, **39**, 225-234 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.02.004. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643805000228?via%3Dihub>
- [71] AMINE, C., J. DREHER, T. HELGASON a T. TADROS. Investigation of emulsifying properties and emulsion stability of plant and milk proteins using interfacial tension and interfacial elasticity. *Food Hydrocolloids* [online]. 2014, **39**, 180-186 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.01.001. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X14000058?via%3Dihub>
- [72] HU, M., D.J. MCCLEMENTS a E.A. DECKER. Lipid Oxidation in Corn Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Casein, Whey Protein Isolate, and Soy Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, **51**(6), 1696-1700 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1021/jf020952j. ISSN 00218561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf020952j>
- [73] DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* [online]. 1997, **277**(5330), 1232-1237 [cit. 2020-03-10]. ISSN 00368075. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsjsr&an=edsjsr.2892480&scope=site>
- [74] EROKHIM, V., M.K. RAM a O. YAVUZ. The New Frontiers of Organic and Composite Nanotechnology. Elsevier, The Netherlands, 2008. ISBN 978-0-0804-5052-0.
- [75] MCCLEMENTS, D.J. Reduced-Fat Foods: The Complex Science of Developing Diet-Based Strategies for Tackling Overweight and Obesity. *Advances in Nutrition* [online].



2015, 6(3), 338S [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.3945/an.114.006999. ISSN 21618313.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4424772/>

[76] ISRAELACHVILI, J.N. *Intermolecular and Surface Forces: Third Edition*. 2011, 1 - 676. DOI: 10.1016/C2011-0-05119-0. ISBN 9780123919274.

[77] MCCLEMENTS, D.J. a C.E. GUMUS. Natural emulsifiers - Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloidal and Interface Science* [online]. 2016, **234**, 3-26 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.cis.2016.03.002. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868616300380?via%3Dihub>

[78] GUZEY, D. a D.J. MCCLEMENTS. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloidal and Interface Science* [online]. 2006, **128**, 227-248 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.cis.2006.11.021. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868606002004?via%3Dihub>

[79] OSTRANDER, J., A. MAMEDOV a N. KOTOV. Two modes of linear layer-by-layer growth of nanoparticle-polyelectrolyte multilayers and different interactions in the layer-by-layer deposition. *Journal of the American Chemical* [online]. 2001, **123**(6), 1101-1110 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1021/ja0029578. ISSN 00027863. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja0029578>

[80] KLINKESORN, U., P. SOPHANODORA, P. CHINACHOTI, D.J. MCCLEMENTS a E.A. DECKER. Increasing the oxidative stability of liquid and dried tuna oil-in-water emulsions with electrostatic layer-by-layer deposition technology. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2005, 53(11), 4561-4566 [cit. 2020-03-23]. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsagr&an=edsagr.US201301005644&scope=site>

[81] DICKINSON, E. Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food hydrocolloids* [online]. 2012, **28**(1), 224-241 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.12.017. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11003419?via%3Dihub>

- [82] FARJAMI, T. a A. MADADLOU. An overview on preparation of emulsion-filled gels and emulsion particulate gels. *Trends in Food Science* [online]. 2019, **86**, 85-94 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.02.043. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224418302279?via%3Dihub>
- [83] MAREFATI, A., M. BERTRAND, M. SJÖÖ a kol. Storage and digestion stability of encapsulated curcumin in emulsions based on starch granule Pickering stabilization. *Food Hydrocolloids* [online]. 2016, 309-320 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.08.043. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16304027?via%3Dihub>
- [84] PATEL, N.A., N.J. PATEL a R.P. PATEL. Formulation and Evaluation of Curcumin Gel for Topical Application. *Pharmaceutical Development and Technology* [online]. 2009, **14**(1), 80-89 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1080/10837450802409438. ISSN 10837450. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18821270>
- [85] HENG, M.. Phosphorylase Kinase Inhibition Therapy in Burns and Scalds. *BioDiscovery* [online]. 2017, **20**(1-16), 1-16 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.3897/biodiscovery.20.e11207. ISSN 20502966. Dostupné z: <https://biodiscovery.pensoft.net/article/11207/>
- [86] GEREMIAS-ANDRADE, I.M., N.P.D.B.G. SOUKI a kol. Rheological and mechanical characterization of curcumin-loaded emulsion-filled gels produced with whey protein isolate and xanthan gum. *LWT* [online]. 2017, **86**, 166-173 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.07.063. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817305637?via%3Dihub>
- [87] PINĎÁKOVÁ, L., V. KAŠPÁRKOVÁ a R. BORDES. Role of protein-cellulose nanocrystal interactions in the stabilization of emulsion. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2019, **557**, 196 - 206 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/j.jcis.2019.09.002. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021979719310318?via%3Dihub>
- [88] WAHLGREN, M., BERGENSTAHL, B., NILSSON, L., & RAYNER, M. Formulation of Emulsions. In *Engineering Aspects of Food Emulsification and Homogenization* (2015). Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 9781466580435.

- [89] ŠTENCLOVÁ, T. Příprava a charakterizace liposomů s obsahem bioaktivních látek. Zlín, 2019. Diplomová práce. Univerzita Tomáš Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Ústav technologie tuků, kosmetiky a detergentů.
- [90] RUSSELL, W.M.S. & R.L. BURCH. The principles of humane experimental technique. Special ed. South Mimms, Potters Bar, Herts, England: Universities Federation for Animal Welfare, 1992. ISBN 0900767782.
- [91] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. In: EUR-Lex [online]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=CS>
- [92] OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 428: Skin absorption: In Vitro Method. Dostupné ze dne 13. dubna 2004. In: OECD iLibrary [online]. Dostupné z: [https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method\\_9789264071087-en#page1](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method_9789264071087-en#page1)
- [93] SINTOV, A. C. Transdermal delivery of curcumin via microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **481**(1-2), 97-103 [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.02.005. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0378517315000903?via%3Dihub>
- [94] ZHAO, Y., C.LU, Y. ZHANG, et al. Selection of high efficient transdermal lipid vesicle for curcumin skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **454**(1), 302-309 [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.06.052. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0378517313005619?via%3Dihub>
- [95] PRIYA, P., R. MOHAN RAJ, V. VASANTHAKUMAR a V. RAJ. Curcumin-loaded layer-by-layer folic acid and casein coated carboxymethyl cellulose/casein nanogels for treatment of skin cancer. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2020, **13**(1), 694-708 [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.1016/j.arabjc.2017.07.010. ISSN 18785352.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

DM2	<i>Diabetes mellitus</i> typu 2
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ADI	průměrná denní dávka
TAG	triacylglycerol
UV-VIS	ultrafialovo-viditelné
SUV	malé unilamelární vezikuly
LUV	velké unilamelární vezikuly
LMV	velké multilamelární vezikuly
O/V	emulze typu olej ve vodě
V/O	emulze typu voda v oleji
MFC	mikrofibrilární celulóza
CNC	nanokrystalická celulóza
BNC	bakteriální nanocelulóza
CMC	celulózové mikrokrystaly
LBL	layer-by-layer metoda
CAS	disperze kaseinátu sodného
EE	enkapsulační účinnost
CI	index krémování
ST	mezipovrchové napětí
EA	ethylacetát
MeOH	methanol
RO	uvolněný olej

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Oddenek kurkumy. [5] .....	11
Obrázek 2: Tři typičtí zástupci skupiny kurkuminoidů. [3].....	12
Obrázek 3: Vliv pH na zabarvení kurkuminu (zleva: čerstvá kurkuma, kurkuma při nízkém pH, kurkuma v zásaditém pH a čistý kurkumin). [13].....	14
Obrázek 4: Struktura kurkuminu v keto a enol formě. ....	14
Obrázek 5: Příklad složené emulze typu V/O/V. [31] .....	21
Obrázek 6: Kapička oleje u mikroemulze a nanoemulze stabilizovaná emulgátorem. [33]	22
Obrázek 7: Popis struktury liposomu v polárním prostředí. [44] .....	26
Obrázek 8: Úhel smáčení u Pickeringových emulzí typu O/V a V/O. [46].....	28
Obrázek 9: Jednotky glukózy propojené $\beta$ -1,4-glykosidickými vazbami. ....	32
Obrázek 10: Orientace CNC v emulzi typu olej ve vodě. [60].....	34
Obrázek 11: Příprava emulze a vznik LBL systému. [78].....	39
Obrázek 12: Aparatura s Franzovými komůrkami ke stanovení transdermální absorpce. [89].....	55
Obrázek 13: Mezipovrchové napětí na rozhraní olej-disperze CAS. Závislost na koncentraci disperze CAS.....	58
Obrázek 14: Mezipovrchové napětí na rozhraní olej-disperze CNC. Závislost na koncentraci disperze CNC. ....	58
Obrázek 15: Závislost mezipovrchového napětí na koncentraci disperzí. A) 0,2 % CAS + CNC B) 0,2 CNC % + CAS. Stanoveno pro tři různé typy olivového oleje. ....	59
Obrázek 16: Kalibrační křivka kurkuminu rozpuštěného v EA. ....	60
Obrázek 17: Kalibrační křivka kurkuminu rozpuštěného v MeOH.....	61
Obrázek 18: Emulze s olejovou fází A) bez a B) s kurkuminem. Celková koncentrace CNC+CAS částic zleva 0,2; 0,3 a 0,5 % pro každou sérii emulzí.....	62
Obrázek 19: Distribuční křivky velikostí emulzních kapek připravených sonikací při různé amplitudě. ....	63
Obrázek 20: Fotografie emulzí 3 hodiny po přípravě (hodnota amplitudy je označena na víčku). ....	63
Obrázek 21: Vliv cesty přípravy (R1, R2, R3) a celkového množství stabilizujících částic (0,2; 0,3; 0,5%) na velikost emulzních kapek u emulzí A) bez kurkuminu, B) s kurkuminem. ....	65
Obrázek 22: Vliv kurkuminu (K) v olejové fázi na velikost emulzních kapek v emulzích s celkovým obsahem částic 0,2 %. ....	66
Obrázek 23: Vliv kurkuminu (K) v olejové fázi na velikost emulzních kapek v emulzích s celkovým obsahem částic 0,3 %. ....	66
Obrázek 24: Vliv kurkuminu (K) v olejové fázi na velikost emulzních kapek v emulzích s celkovým obsahem částic 0,5 %. ....	67

- Obrázek 25: Distribuce velikosti kapek emulzí připravených cestami R1, R2 a R3: srovnání emulzí stabilizovaných různou celkovou koncentrací částic CAS + CNC. Písmeno K označuje emulze s kurkuminem. .... 68
- Obrázek 26: Distribuce velikosti kapek v připravených emulzích vztažená k cestě přípravy. V levém sloupci jsou znázorněny distribuce kapek bez kurkuminu a v pravém s kurkuminem. .... 70
- Obrázek 27: Emulze připravené cestou R1 a R3 bez kurkuminu ihned, 4 dny a 2 týdny po přípravě. Množství stabilizujících částic je uvedeno v obrázku. .... 73
- Obrázek 28: Emulze připravené cestou R1 a R3 s kurkuminem ihned, 4 dny a 2 týdny po přípravě. Množství stabilizujících částic je uvedeno v obrázku. .... 74
- Obrázek 29: Změna indexu krémování v závislosti na čase u emulzí bez kurkuminu v olejové fázi. .... 76
- Obrázek 30: Změna indexu krémování v závislosti na čase u emulzí s kurkuminem v olejové fázi. .... 76
- Obrázek 31: Distribuce velikosti kapek emulzí připravených cestou R1: srovnání emulzí stabilizovaných různou celkovou koncentrací částic CAS + CNC. Písmeno K označuje emulze s kurkuminem. .... 78
- Obrázek 32: Distribuce velikosti kapek emulzí připravených cestou R3: srovnání emulzí stabilizovaných různou celkovou koncentrací částic CAS + CNC. Písmeno K označuje emulze s kurkuminem. .... 79
- Obrázek 33: Distribuce velikosti kapek emulzí připravených cestou R3: srovnání emulzí stabilizovaných různou celkovou koncentrací částic CAS + CNC. Písmeno K označuje emulze s kurkuminem. .... 79
- Obrázek 34: Distribuce velikosti kapek emulzí obsahujících stejné množství stabilizujících částic CAS + CNC: srovnání emulzí připravených různou cestou přípravy. .... 80
- Obrázek 35: Připravené emulzní kurkuminové gely Série I cestou přípravy R3 s olejem uvolněným po sušení (obsah částic v původní emulzi zleva 0,2, 0,3 a 0,5 %). .... 81
- Obrázek 36: Vliv cesty přípravy (R1, R2, R3) a množství stabilizujících částic na množství uvolněného oleje z gelů bez kurkuminu. .... 81
- Obrázek 37: Vliv cesty přípravy (R1, R2, R3) a množství stabilizujících částic na množství uvolněného oleje z gelů s kurkuminem. .... 82
- Obrázek 38: Emulzní gely připravené pomocí teflonových formiček. První gel zleva byl připraven cestou R1, prostřední R2 a poslední cestou R3. Všechny uvedené gely obsahují 0,5 % částic. .... 84
- Obrázek 39: Uvolněný olej při sušení emulzních gelů. První gel zleva byl připraven cestou R1, prostřední R2 a poslední cestou R3. Všechny uvedené gely obsahují 0,5 % částic. .... 84
- Obrázek 40: Vliv cesty přípravy (R1, R2, R3) a množství stabilizujících částic na množství uvolněného oleje z gelů bez kurkuminu. .... 85
- Obrázek 41: Vliv cesty přípravy (R1, R2, R3) množství stabilizujících částic na množství uvolněného oleje z gelů s kurkuminem. .... 85
- Obrázek 42: Množství kurkuminu ve frakcích vzorků kůže. Použití emulzního gelu připraveného cestou R1 (dvě stanovení). .... 87

- Obrázek 43: Množství kurkuminu ve frakcích vzorků kůže. Použití emulzního gelu připraveného cestou R2 (dvě stanovení)..... 88
- Obrázek 44: Množství kurkuminu ve frakcích vzorků kůže. Použití emulzního gelu připraveného cestou R3 (dvě stanovení)..... 88

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Rozměry, vzhled a termodynamické chování jednotlivých tříd emulzí. [32]....	21
Tabulka 2: Rozpustnost kurkuminu ve vybraných rostlinných olejích. [36].....	24
Tabulka 3: Množství CNC a CAS v jednotlivých kombinacích při stanovení mezipovrchového napětí jejich směsí. ....	50
Tabulka 4: Schéma přípravy a složení jednotlivých typů emulzí. ....	52
Tabulka 5: Velikost částic připravených emulzí D (4,3) v závislosti na použité amplitudě. ....	62
Tabulka 6: Průměrná velikost kapek u vzorků emulzí připravených různými cestami R1, R2, R3 vyjádřená jako D (4,3) a směrodatná odchylka (SD) měření. K značí emulze s obsahem kurkuminu. ....	64
Tabulka 7: Změna hodnoty indexu krémování emulzí (cesty přípravy R1, R2, R3) stabilizovaných různým množstvím částic v čase. Symbol K značí emulze s obsahem kurkuminu. ....	75
Tabulka 8: Průměrná velikost kapek u vzorků emulzí připravených cestami R1, R2 a R3 vyjádřená jako D (4,3) a směrodatná odchylka (SD) měření. K značí emulze s obsahem kurkuminu. ....	78
Tabulka 9: Hodnota TEWL a tloušťka kůže použité pro stanovení transdermální penetrace kurkuminu z gelů připravených cestou R1, R2 a R3. ....	86
Tabulka 10: Koncentrace kurkuminu ve všech frakcích a návratnost zachyceného kurkuminu. ....	90



