



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY KOMBINOVANÝCH ČÁSTIC S CHITOSANEM A JEJICH CHARAKTERIZACE S APLIKAČNÍM VYUŽITÍM

OPTIMIZATION OF COMBINED CHITOSAN PARTICLES AND THEIR CHARACTERIZATION FOR  
APPLICATION USE

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

**Bc. Tibor Netopilík**

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

**prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

**BRNO 2024**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1960/2023 Akademický rok: 2023/24  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Bc. Tibor Netopilík**  
Studijní program: Chemie přírodních látek  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

### Název diplomové práce:

Optimalizace přípravy kombinovaných částic s chitosanem a jejich charakterizace s aplikačním využitím

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Literární rešerše na dané téma (částice: rozdělení, příprava, aplikační využití, materiály; charakterizace aktivních látek pro enkapsulaci).
- 2) Optimalizace přípravy kombinovaných částic a jejich charakterizace.
- 3) Sledování stability připravených částic.
- 4) Návrh a testování vybrané aplikační formy.

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2024:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Tibor Netopilík  
student

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu  
-----

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací nanočástic pro kosmetické a potravinářské aplikace. Práce zkoumá různé metody přípravy nanočástic, včetně liposomů a chitosomů, a analyzuje jejich vlastnosti a stabilitu v různých modelových prostředích. Experimentální část zahrnuje stanovení enkapsulační účinnosti různých vitaminů pomocí HPLC a UV-VIS spektrofotometrie. Výsledky ukazují vliv různých faktorů, jako je čas, typ prostředí a způsob přípravy, na stabilitu a účinnost nanočástic. Dále je provedena optimalizace přípravy chitosomů s využitím ultrazvuku a magnetické míchačky. Byly vyvinuty kosmetické produkty obohacené o tyto nanočástice, u kterých byla provedena senzorická analýza. Tato práce přispívá k pochopení procesů přípravy nanočástic a poskytuje užitečné informace pro vývoj nových kosmetických a potravinářských produktů s vylepšenými vlastnostmi a stabilitou.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Nanočástice, liposomy, chitosomy, enkapsulace, chitosan, vitamíny, kosmetika

## **ABSTRACT**

The thesis deals with the preparation and characterization of nanoparticles for cosmetic and food applications. The thesis explores various methods of preparing nanoparticles, including liposomes and chitosomes, and analyses their properties and stability in different model environments. The experimental part includes the determination of the encapsulation efficiency of different vitamins by HPLC and UV-VIS spectrophotometry. Results show the influence of various factors such as time, type of environment and method of preparation on stability and efficiency of the nanoparticles. Furthermore, the optimization of the preparation is carried out chitosomes using ultrasound and magnetic stirrer. Cosmetic products enriched with these nanoparticles were developed and their sensory analysis was proved. This work contributes to the understanding of nanoparticle preparation processes and provides useful information for the development of new cosmetic and food products with improved properties and stability.

## **KEYWORDS**

Nanoparticles, liposomes, chitosomes, encapsulation, chitosan, vitamins, cosmetics

NETOPIILÍK, Tibor. *Optimalizace přípravy kombinovaných částic s chitosanem a jejich charakterizace s aplikačním využitím* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-04-29]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/155336>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych vyjádřil svou upřímnou vděčnost paní prof. RNDr. Ivana Márové, CSc. za příležitost pracovat na zajímavém tématu. Děkuji také Ing. Agátě Bendové za poskytnutí cenných informací, podnětných diskusí a užitečných zpětných vazeb, které přispěly k rozvoji kvality této práce. Také bych rád poděkoval rodině a přátelům, kteří mě podporovali a povzbuzovali po celou dobu psaní této práce.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
2.1. Struktura a vlastnosti liposomových nanočástic .....	8
2.1.1. Fosfolipidy .....	9
2.1.2. Cholesterol .....	9
2.1.3. Chitosan.....	10
2.1.4. Vybrané bioaktivní látky používané při enkapsulaci .....	11
2.2. Příprava liposomů.....	15
2.2.1. Metody přípravy liposomů .....	15
2.2.2. Techniky enkapsulace bioaktivních látek do nanočástic .....	16
2.2.3. Potažení nanočástic chitosanem .....	20
2.3. Princip uvolňování bioaktivních látek z nanočástic .....	21
2.4. Metody charakterizace nanočástic.....	21
2.4.1. Stanovení velikosti a distribuce částic pomocí dynamického rozptylu světla.....	21
2.4.2. Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu .....	22
2.4.3. Zobrazení struktury a morfologie pomocí elektronové mikroskopie .....	23
2.4.4. Stanovení enkapsulační účinnosti.....	23
2.5. Optimalizace přípravy chitosanových nanočástic .....	24
2.5.1. Optimalizace poměru lecitinu a cholesterolu .....	24
2.5.2. Optimalizace enkapsulace bioaktivních látek.....	24
2.5.3. Optimalizace přípravy chitosanu a jeho použití v liposomových částicích.....	24
2.5.4. Optimalizace stabilizace a metod uchování.....	25
2.5.5. Optimalizace účinnosti, biokompatibility a cíleného uvolňování .....	25
2.5.6. Optimalizace procesu uvolňování enkapsulovaných látek .....	25
2.6. Využití liposomových nanočástic .....	26
2.7. Kůže .....	27
2.7.1. <i>Epidermis</i> .....	27
2.7.2. <i>Dermis</i> .....	28
2.7.3. <i>Hypodermis</i> .....	28
2.7.4. Visioskopie .....	28
<b>3. CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>29</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>30</b>
4.1 Seznam použitých přístrojů.....	30
4.2 Seznam použitých chemikálií.....	30
4.3. Stanovení koncentrace vitamínů.....	31

4.4. Příprava nanočástic kombinovaných s chitosanem .....	34
4.4.1. Příprava liposomů.....	34
4.4.2. Příprava chitosomů.....	35
4.5. Optimalizace přípravy chitosomů.....	35
4.5.1. Optimalizace přípravy chitosanového roztoku .....	35
4.5.2. Optimalizace délky doby sonikace .....	35
4.5.3. Vliv metod ultrazvukového zpracování a míchání na magnetické míchače na stabilitu a velikost částic .....	35
4.5.4. Vliv filtrace na výsledné nanočástice .....	36
4.6. Charakterizace nanočástic .....	36
4.6.1. Stanovení velikosti, distribuce částic a zeta potenciálu.....	36
4.6.2. Stanovení enkapsulační účinnosti.....	37
4.6.3. Stanovení dlouhodobé stability .....	37
4.6.4. Stanovení dlouhodobé stability v modelových prostředích.....	38
4.6.5. Posouzení stability nanočástic po lyofilizaci.....	38
4.7. Příprava kosmetických přípravků.....	39
4.7.1. Pleťový krém .....	39
4.7.2. Hydratační gel .....	39
4.8. Testování účinků kosmetických produktů pomocí visioskopu.....	39
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>40</b>
5.1. Optimalizace přípravy chitosomů.....	40
5.1.1. Optimalizace přípravy chitosanového roztoku .....	40
5.1.2. Optimalizace délky doby sonikace .....	41
5.1.3. Vliv metod ultrazvukového zpracování a míchání na magnetické míchače na stabilitu a velikost částic .....	42
5.1.4. Vliv membránové filtrace na výsledné nanočástice .....	44
5.2. Stanovení velikosti částic a polydisperzity.....	45
5.3. Posouzení dlouhodobé stability liposomů .....	47
5.4. Stanovení enkapsulační účinnosti.....	48
5.4.1. Stanovení enkapsulační účinnosti ze supernatantu pomocí UV-VIS.....	48
5.4.2. Stanovení enkapsulační účinnosti z liposomů pomocí UV-VIS spektrofotometrie .....	50
5.4.3. Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí metody HPLC.....	50
5.5. Stanovení krátkodobého uvolňování v modelových podmínkách.....	53
5.6. Stanovení dlouhodobé stability částic v modelových prostředích.....	55
5.7. Posouzení stability připravených liposomů a chitosomů po lyofilizaci .....	58
5.8. Vizualizace nanočástic pomocí světelné mikroskopie.....	60
5.9. Návrh a výroba kosmetických produktů a jejich posouzení.....	61

5.9.1. Visioskopie .....	62
5.9.2. Senzorická analýza .....	65
5.10. Návrh využití nanočástic v potravinářství .....	66
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>68</b>
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>70</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>77</b>
<b>9. PŘÍLOHY .....</b>	<b>78</b>



# 1. ÚVOD

V moderní době nabývá nanotechnologie stále většího významu v oblasti výzkumu i aplikací. Jednou z inovativních oblastí nanotechnologie je vytváření nanočástic, zejména liposomálních nanočástic, které slouží jako nosiče pro enkapsulaci a transport různých bioaktivních látek do buněk a tkání. V této souvislosti nabývá na významu kombinace liposomálních nanočástic s chitosanem. Chitosan jako povrchově aktivní látka má schopnost interagovat s liposomálními membránami, což umožňuje vytvářet stabilní struktury a zlepšovat tak vlastnosti liposomů jako nosičů bioaktivních látek. Chitosan, jakožto derivát chitinu, poskytuje rovněž výhody z hlediska biokompatibility.

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci přípravy a charakterizaci kombinovaných částic s chitosanem, přičemž hlavním cílem je vytvoření efektivního systému pro enkapsulaci a transport bioaktivních látek, jako jsou vitamíny C, D, E, B<sub>12</sub> a kyselina hyaluronová, pomocí liposomálních nanočástic potažených chitosanem. Výzkum bude zahrnovat důkladnou analýzu vlastností těchto nanočástic včetně velikosti, morfologie, stability a uvolňování enkapsulovaných látek. Důraz je kladen nejen na teoretickou stránku, ale i na experimentální aspekty, s cílem poskytnout konkrétní postupy a výsledky s potenciálem uplatnění v různých odvětvích. Dosažení optimálního nastavení přípravy a charakterizace těchto kombinovaných částic má potenciál zlepšit účinnost a bezpečnost transportu bioaktivních látek do buněk, což může mít široké uplatnění v oblasti kosmetiky, potravinářství, medicíny a v dalších odvětvích.

V rámci kosmetiky nabízí enkapsulace možnosti pro lepší transport, penetraci a účinnost kosmetických aktivních látek, jako jsou vitamíny, peptidy nebo antioxidanty, do kůže. Tyto enkapsulované látky mohou cíleně působit na specifické problémy kůže, jako je hydratace, zlepšení elasticity nebo ochrana před škodlivými účinky UV záření. V potravinářství může enkapsulace pomoci při zlepšení stability a chuťových vlastností potravin, prodloužení trvanlivosti a ochraně aktivních složek před nepříznivými podmínkami prostředí, jako je světlo, teplota nebo vlhkost.

Tato diplomová práce se zaměřuje na zkoumání metod enkapsulace a aplikací enkapsulovaných látek v kosmetických a potravinářských produktech. Cílem je porozumění procesům enkapsulace, optimalizace vlastností enkapsulovaných látek a hodnocení účinnosti těchto aplikací v reálných podmínkách. Přínosy enkapsulace pro kosmetický a potravinářský průmysl budou podrobně prozkoumány s ohledem na aktuální vědecký výzkum a technologický pokrok.

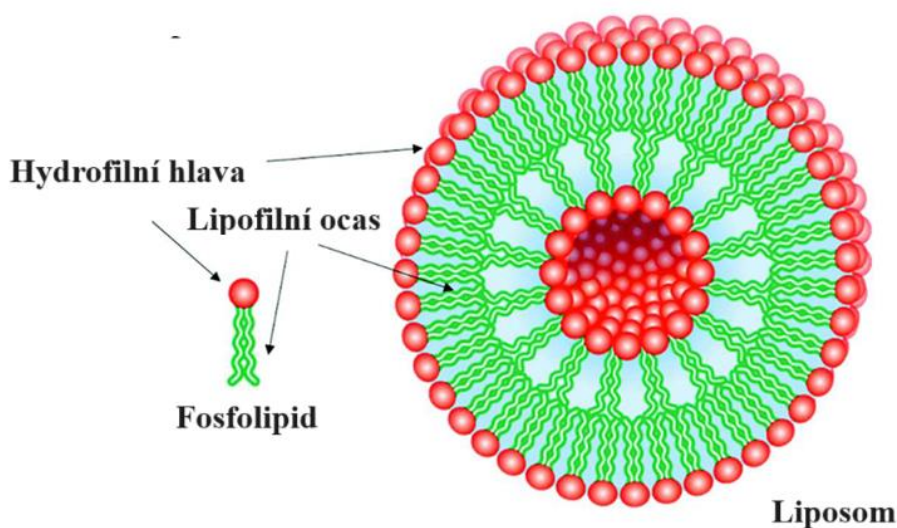
## 2. TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část se zaměřuje na detailní rozbor vlastností liposomových nanočástic kombinovaných s chitosanem, kde jsou přiblíženy složky těchto částic, včetně fosfolipidů, cholesterolu, chitosanu a vybraných bioaktivních látek pro enkapsulaci, enkapsulační techniky a možnosti aplikace těchto částic [1].

### 2.1. Struktura a vlastnosti liposomových nanočástic

Nanočástice, zejména liposomy, a různě modifikované liposomy, např. spojené s chitosanem, mají široké uplatnění v oblasti enkapsulace a cíleného uvolňování bioaktivních látek, jakožto i v oblasti aplikace zejména v kosmetice, medicíně a potravinářství. Kombinace s chitosanem zvyšuje jejich stabilitu a účinnost [1].

Liposomy jsou sférické struktury tvořené fosfolipidovou dvojvrstvou, která obklopuje vodné nebo lipofilní jádro, přičemž mohou být složeny z jedné nebo i více membrán. Struktura liposomu je vyobrazena na Obrázek 1. Charakteristickou vlastností je bifázová povaha, tedy že liposomy mají hydrofilní a hydrofobní část, což jim umožňuje enkapsulovat hydrofobní i hydrofilní látky s různou rozpustností. Základním mechanismem pro tvorbu liposomů je v podstatě hydrofilně-hydrofobní interakce mezi fosfolipidy a molekulami vody. Ve vodném médiu se fosfolipidové molekuly samy skládají do dvouvrstvé struktury. Liposomální vezikuly vznikají hydratací fosfolipidů, což jsou amfifilní molekuly, které jsou tvořeny jednou hlavní hydrofilní skupinou a dvěma hydrofobními acylovými řetězci. Uvnitř dvojvrstvy se fosfolipidové polární skupiny seřadí tak, aby vytvořily povrch přitahující vodu, zatímco jejich lipofilní řetězce směřují k sobě a vytvářejí bezvodou zónu. Při mechanickém třepání nebo zahřívání fosfolipidové dvojvrstvy liposomy kontinuálně uzavírají disperzní vodné médium a vytvářejí tak vezikulární systém [1][2][3].



Obrázek 1: Struktura liposomu [4]

Liposomy jsou kompatibilní s biologickými systémy, nezpůsobují tedy žádnou toxickou či alergickou reakci, což umožňuje bezpečné použití v medicíně a kosmetice. Velikost částic se pohybuje v rozmezí od 25 nm až 10  $\mu\text{m}$ , jsou tedy klasifikovány jako nanočástice, nebo za mikročástice vybavené schopností zapouzdřovat materiály různé povahy a polaroty [3][5]. Velikost liposomů a jejich stabilita jsou klíčovými faktory ovlivňujícími účinnost enkapsulace. Stabilita a další vlastnosti liposomů jsou značně proměnlivé v závislosti na povrchovém náboji, velikosti, složení lipidů (saturaci mastných kyselin) a způsobu přípravy. Jedinečná funkce liposomů je cílené uvolňování začleněných látek při dobře definovaných teplotách. Fosfolipidová dvojvrstva se rozpadne při teplotě přechodu fosfolipidu, což je většinou přibližně 50 °C, ale úpravou dvojité vrstvy fosfolipidu se tato teplota může lišit. Vazbou ligandu na povrch liposomů můžeme zajistit cílené uvolnění aktivní složky ve specifických tkáních nebo buňkách. Liposomy mohou být navrženy tak, aby uvolňovaly obsažené látky cíleně v určitém prostředí nebo na konkrétním místě v organismu [2][3][5].

### **2.1.1. Fosfolipidy**

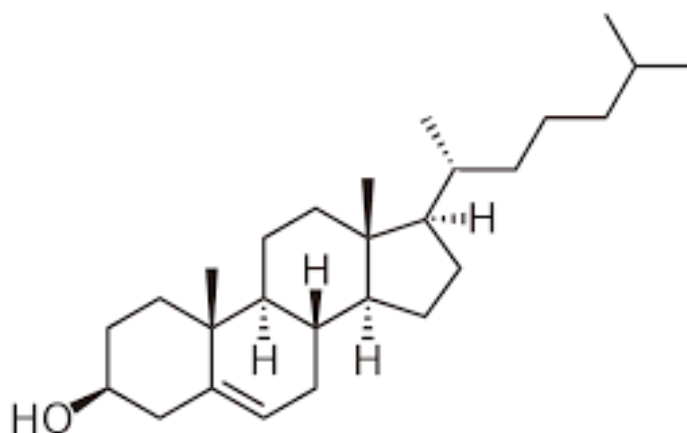
Fosfolipidy jsou základní stavební složkou fosfolipidové dvojvrstvy liposomů. Fosfolipidy se skládají z hydrofilní hlavy, obsahující glycerol a fosfát, a hydrofobních řetězců mastných kyselin, které se shlukují uvnitř liposomu, což umožňuje vytvoření stabilní membrány. Fosfolipidy zajišťují strukturální stabilitu liposomů a díky své struktuře umožňují přenášet rozpustné látky skrze liposomy, což je klíčové pro uvolňování bioaktivních látek. Fosfolipidy jsou flexibilní, což umožňuje liposomům měnit svůj tvar a adaptovat se na různé prostředí [3][6].

Nejběžněji používaný přírodní fosfolipid v liposomových nanočásticích je lecitin. Získává se ze sójových bobů a obsahuje směs fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaminu a dalších fosfolipidů. Fosfatidylcholin je důležitý pro tvorbu liposomů, má vynikající schopnost tvorby membrány. Lecitin působí jako emulgátor, umožňující liposomům uchovávat vodu a olejové látky ve stabilní formě. Lecitin zvyšuje biokompatibilitu liposomů s biologickými tkáněmi, což je klíčové pro účinné využití v kosmetice a farmaceutickém průmyslu. V liposomech zlepšuje schopnost absorpce vody a rozpustných látek, což je výhodné při transportu a uvolňování bioaktivních látek [7].

### **2.1.2. Cholesterol**

Cholesterol je organická sloučenina patřící do skupiny steroidů, přičemž chemická struktura je vyobrazena na Obrázek 2. Je nepostradatelnou složkou biomembrán i liposomových nanočástic, která má několik klíčových vlastností a funkcí. Jeho přítomnost může zlepšit stabilitu membrány liposomů a regulovat permeabilitu membrány, což má vliv na proces enkapsulace a uvolňování látek. Cholesterol má schopnost regulovat fluiditu membrány. Při vyšších teplotách zabraňuje přílišnému tekutému stavu, zatímco při nižších teplotách zabraňuje tuhnutí. Zajišťuje pevnost a stabilitu liposomových membrán, což je klíčové pro uchování tvaru a integrity nanočástic. Zlepšuje propustnost membrány pro různé látky, včetně bioaktivních látek uvnitř liposomů. Cholesterol také zabraňuje nekontrolovanému úniku látek z liposomů.

Také zvyšuje biokompatibilitu liposomů, což je důležité pro jejich interakci s buněčnými membránami [8][9].

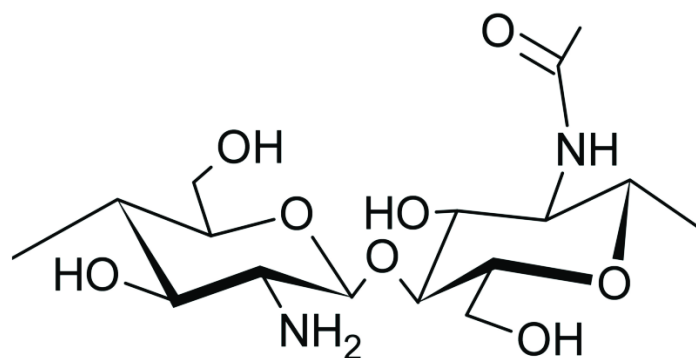


Obrázek 2: Struktura cholesterolu [9]

Cholesterol je klíčovým faktorem pro dosažení optimální stability liposomů, což je nezbytné pro uchování jejich struktury a funkcionality. Umožňuje kontrolované uvolňování bioaktivních látek z liposomů a je klíčový pro efektivní využití těchto nanočástic. Přítomnost cholesterolu zvyšuje schopnost liposomů interagovat s buňkami a tkáněmi v těle, což je důležité pro úspěšné využití v biomedicínských a kosmetických aplikacích [9].

### 2.1.3. Chitosan

Chitosan, zobrazený na Obrázek 3, je polysacharid získaný z chitinu, který se nachází v exoskeletech korýšů, měkkýšů a určitých hub. Po extrakci chitinu z biologických struktur dochází k deacetylaci, což znamená odstranění acetamidových skupin. Různé stupně deacetylace ovlivňují fyzikální a chemické vlastnosti chitosanu, klíčové pro design specifických vlastností nanočástic. V kontextu liposomových nanočástic spojených s chitosanem má tato látka několik důležitých vlastností a funkcí. Je biokompatibilní, interaguje s biologickými systémy bez nežádoucích reakcí a poskytuje benefity, jako jsou antibakteriální, léčivé a regenerační účinky [10]. Díky schopnosti rozkládat se v biologickém prostředí je chitosan vhodný pro aplikace do struktur s postupným uvolňováním látek a podporuje adhezi k povrchu buněk, což je užitečné pro cílené dodávání látek. Díky své povrchové aktivitě a interakci s lipidy zlepšuje stabilitu a biologickou dostupnost liposomových částic, což z něj činí vhodnou volbu pro modifikaci povrchu. Kladný náboj chitosanu umožňuje interakci s negativně nabitými povrchy buněk, což je klíčové pro cílenou terapii, a usnadňuje interakci s negativně nabitými částicemi a látkami. Chitosan také může vytvářet tenké filmy na povrchu liposomů, které slouží jako ochranná bariéra pro enkapsulované látky a stabilizují liposomy během skladování a transportu [11][12].



Obrázek 3: Struktura chitosanu [13]

#### 2.1.4. Vybrané bioaktivní látky používané při enkapsulaci

Enkapsulace, proces uzavření jedné látky uvnitř jiné, má v nanotechnologii široké využití. Vytváření ochranných obalů kolem bioaktivních látek přináší několik výhod, přičemž klíčovým prvkem je zajištění stability, ochrana před oxidací a možnost cíleného uvolňování. Enkapsulace není omezena na konkrétní typy látek, většina látek může být úspěšně enkapsulována. Mezi tyto látky patří vitamíny, minerály, aminokyseliny, enzymy, léčiva, peptidy, proteiny, antioxidanty a mnoho dalších, které mají pozitivní vliv na zdraví. Jedním z hlavních důvodů, proč enkapsulovat bioaktivní látky, je ochrana před škodlivými vlivy jako je světlo, kyslík nebo vlhkost. Vitamíny jako C a E jsou často enkapsulovány kvůli jejich nestabilitě ve styku s kyslíkem, což udržuje jejich účinnost dlouhodobě. Každá z těchto látek má své vlastní specifické účinky a využití v kosmetice, lékařství, potravinářství nebo farmacii [14][15].

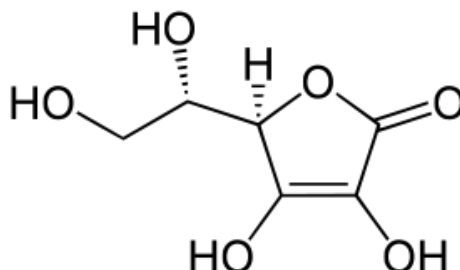
Tímto způsobem lze vytvořit inovativní produkty s vylepšenými vlastnostmi a lépe řízeným uvolňováním účinných látek. Bioaktivní látky pro enkapsulaci jsou tak klíčovým prvkem v moderním výzkumu zaměřeném na vývoj efektivních a bezpečných produktů pro podporu lidského zdraví a pohody. Enkapsulace umožňuje cílené uvolňování bioaktivních látek na specifických místech v těle. Například léčiva enkapsulovaná v liposomálních nanočásticích mohou být navržena tak, aby se uvolňovala pouze ve specifických tkáních nebo buňkách, což zvyšuje účinnost léčby a snižuje vedlejší účinky [14] [16][17].

Některé látky mají nízkou biodostupnost nebo absorpci v těle. Enkapsulace může zlepšit tyto vlastnosti tím, že látky chrání během průchodu zažívacím traktem a zajišťuje jejich správné uvolnění v těle, což maximalizuje absorpci a účinnost. Enkapsulace také umožňuje kombinaci různých druhů látek v jedné nanočástici. To otevírá dveře k vytváření komplexních produktů, jako jsou multivitaminové přípravky nebo léčiva, která obsahují více účinných látek pro synergické účinky [3][14].

Vybrané bioaktivní látky, jako jsou vitamíny C, B<sub>12</sub>, D, E a kyselina hyaluronová, jsou ideální pro enkapsulaci do liposomových nanočástic s chitosanem. Jejich chemické vlastnosti, biologický význam a schopnost interakce s lipidy činí tyto látky atraktivními pro různé aplikace [14][18].

#### 2.1.4.1. Vitamín C (kyselina askorbová)

Vitamín C, neboli kyselina askorbová, jejíž struktura je vyobrazena na Obrázek 4, je ve vodě rozpustný antioxidant a je důležitý pro syntézu kolagenu. Jeho chemická struktura obsahuje kyselinovou skupinu, což mu umožňuje působit jako redukující činidlo. Vitamín C je citlivý na světlo a kyslík, což může snižovat jeho účinnost [16].

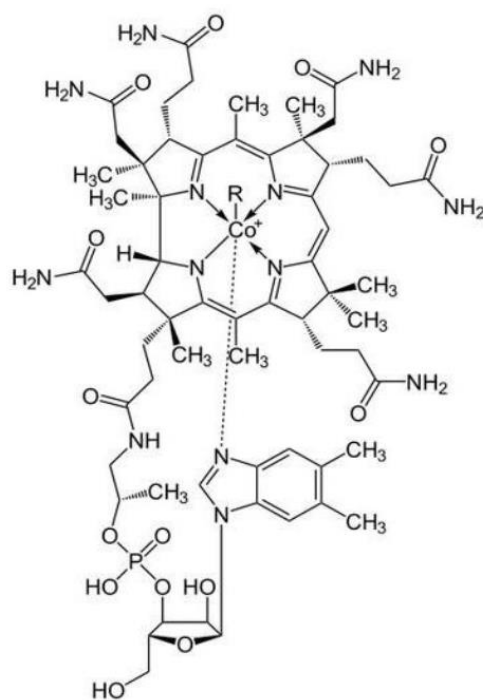


Obrázek 4: Kyselina askorbová [16]

Enkapsulace ho chrání před těmito faktory, zajišťuje jeho stabilitu a umožňuje jeho pomalé uvolňování, což zlepšuje absorpci v těle. Enkapsulovaný vitamín C je často využíván v kosmetice pro jeho schopnost podporovat produkci kolagenu a zlepšovat stav pleti. Enkapsulovaný vitamín C může být též využíván v kosmetických produktech pro ochranu pokožky před volnými radikály, to může přispět k antioxidačním a protizánětlivým účinkům. Díky svým antioxidačním účinkům chrání vitamín C tkáň a buňky před oxidačním poškozením [19]. V lékařství může být použit pro terapeutické účely, jako je léčba skorbutu a podpora imunitního systému [20][21].

#### 2.1.4.2. Vitamín B<sub>12</sub> (kobalamin)

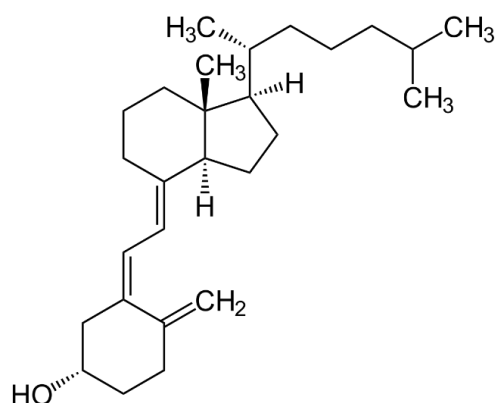
Vitamín B<sub>12</sub> je ve vodě rozpustná látka patřící mezi vitamíny skupiny B. Má komplexní strukturu, která je vyobrazena na Obrázek 5 a zahrnuje kobaltový ion. Vitamin B<sub>12</sub> je nezbytný pro tvorbu červených krvinek a normální fungování nervového systému. Vitamín B<sub>12</sub> je náchylný k degradaci při kontaktu se světlem a vzdušným kyslíkem. Enkapsulace ho chrání a zajišťuje jeho udržení ve stabilním stavu. V potravinářství může být enkapsulovaný vitamín B<sub>12</sub> použit pro obohacení potravin, jako jsou nápoje nebo potravinové doplňky, a je vhodný zejména pro pacienty s anémií nebo vegany [14] [22].



Obrázek 5: Struktura kobalaminu [22]

#### 2.1.4.3. Vitamín D (cholecalciferol)

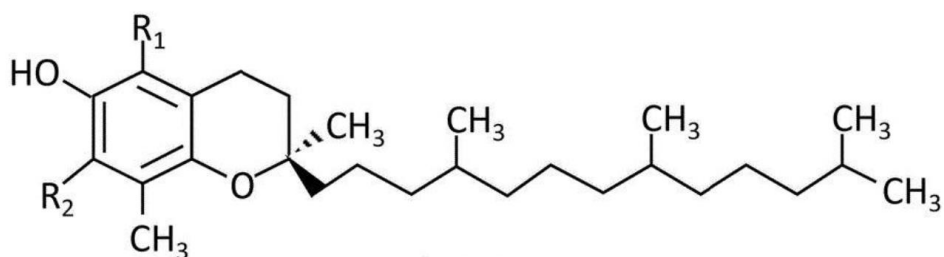
Vitamín D je rozpustný v tucích a existuje ve formě vitamínu D<sub>2</sub> (ergokalciferol) a D<sub>3</sub> (cholecalciferol), který je uveden na Obrázek 6. Je nezbytný pro metabolismus vápníku a fosforu, což hraje roli při podpoře zdraví kostí a svalů. Enkapsulace zajišťuje jeho ochranu a uvolňování v těle. Enkapsulovaný vitamín D se používá jako potravinový doplněk a může být také součástí léčebných režimů pro osoby s nedostatkem vitamínu D nebo osteoporózou. Enkapsulace vitamínu D může zlepšit jeho rozpustnost a stabilitu, což umožní efektivnější vstřebávání organismem. Enkapsulovaný vitamín D může být v potravinářství a nutraceutice využíván pro obohacení potravin, zejména pro produkty s nízkým obsahem vitamínu D [17].



Obrázek 6: Struktura cholecalciferolu [17]

#### 2.1.4.4 Vitamín E (tokoferol)

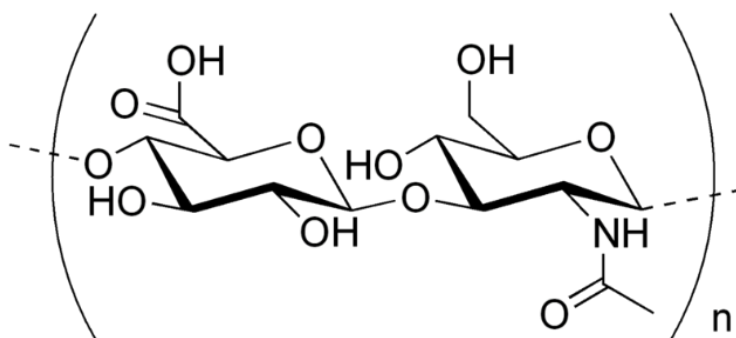
Vitamín E zahrnuje skupinu antioxidantů, se souhrnným názvem tokoferoly. Struktura tokoferolu A je uvedena na Obrázek 7. Jeho hlavním úkolem je ochrana buněk před oxidativním stresem. Vitamín E je nestabilní v kontaktu s kyslíkem. Enkapsulace vitamínu E do liposomů může prodloužit jeho stabilitu a přispět k jeho uvolňování v cílovém místě. Enkapsulovaný vitamín E se používá v kosmetických výrobcích pro péči o pleť, kde poskytuje ochranu před volnými radikály a zlepšuje zdraví kůže. Také se používá v potravinářství jako antioxidant pro prodloužení trvanlivosti potravin [15][23].



Obrázek 7: Struktura tokoferolu [15]

#### 2.1.4.5. Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je glykosaminoglykan, jehož struktura je vyobrazena na Obrázek 8. Jde o heteropolysacharid patřící do skupiny složených sacharidů. Je přirozeně přítomný v lidském těle, zejména v kůži a pojivových tkáních. Kyselina hyaluronová má schopnost vázat velké množství vody, a to ji činí vynikajícím hydratačním činidlem. Enkapsulace do lipidových nosičů umožňuje její pomalé uvolňování zlepšující její hydratační účinky. Enkapsulovaná kyselina hyaluronová se často využívá v kosmetických výrobcích pro péči o pleť, kde poskytuje hloubkovou hydrataci a podporuje pružnost kůže. Může být také součástí léčebných režimů pro regeneraci tkání nebo v oční medicíně pro léčbu tzv. suchého oka [18][24][25].



Obrázek 8: Struktura kyseliny hyaluronové



## 2.2. Příprava liposomů

Tato část se zaměřuje na procesy přípravy nanočástic, které kombinují liposomy s chitosanem, což lze považovat za klíčový krok při vývoji těchto specifických nanomateriálů [14].

Základní složky liposomů zahrnují fosfolipidy (například lecitin), cholesterol a bioaktivní látky, které budou enkapsulovány. Poměr těchto složek ovlivňuje vlastnosti liposomů. Fosfolipidy s cholesterolem a bioaktivní látkou se rozpouštějí ve vodě nebo v organickém rozpouštědle, a to v závislosti na charakteru enkapsulované látky. Cholesterol je přidán k posílení stability membrány. V případě použití tzv. metody tenkého filmu je použité organické rozpouštědlo odpařeno za vytvoření lipidového filmu. Chitosan může být přidán buď během rehydratace nebo po vytvoření liposomů [14][26][27].

### 2.2.1. Metody přípravy liposomů

Metody přípravy liposomů se zaměřují na využití různých postupů, jako je hydratace lipidového filmu, odpaření reverzní fáze, sonikace nebo extruze k dosažení optimálních vlastností a účinnosti těchto nanočástic. Tyto metody umožňují kontrolu velikosti, stabilitu a stanovení enkapsulační účinnosti liposomů pro jejich konkrétní aplikace.

#### 2.2.1.1. Hydratace lipidového filmu

Směs lipidů a cholesterolu je rozpuštěná v organickém rozpouštědle. Nejčastěji se používá chloroform nebo směs chloroformu a methanolu, přičemž obsah lipidů je obvykle 10-20 mg/ml. Avšak je možné použít i vyšší koncentrace, pokud se lipidy mají dobrou rozpustnost. Jakmile jsou lipidy důkladně rozpuštěny, rozpouštědlo se odstraní pomocí odparky a dojde k tvorbě tenkého lipidového filmu. Lipidový film musí být důkladně vysušen od organického rozpouštědla. Poté je proveden hydratační krok. Doba hydratace, intenzita míchání a tloušťka lipidové vrstvy ovlivňuje vlastnosti liposomu, jako je množství enkapsulované látky nebo velikost částic [27][28].

#### 2.2.1.2. Odpaření reverzní fáze

Stejně jako v předchozím případě je lipidový film připraven odpařením organického rozpouštědla. Poté následuje rozpuštění lipidů v další organické fázi a zavedení vodního pufu do směsi. Následné odstranění organické fáze vede k vytvoření velkých unilamelárních vezikul, které jsou tvořeny zejména vodou. Tato metoda umožňuje přípravu liposomů s vysokým poměrem prostoru vyplněného vodným roztokem ku množství lipidů. Díky vysokému procentuálnímu zastoupení ve vodě rozpustných látek jsou tyto liposomy efektivní pro enkapsulaci hydrofilních látek. Tato metoda je zejména účinná při enkapsulaci makromolekulárních látek [23][27].

### 2.2.1.3. Sonikace

Sonikace, často nazývaná ultrazvuková technika, je běžnou metodou pro výrobu malých unilamelárních vezikul o velikosti mezi 15 a 50 nm. Tato metoda využívá zvukovou energii k disperzi lipidů a dalších látek v roztoku. Sonikace může být prováděna pomocí speciálních zařízení, jako jsou sonikátory typu lázně nebo sondy. Principem sonikace je aplikace ultrazvukových vln na roztok obsahující směs fosfolipidů a cholesterolu, spolu s látkou, která má být enkapsulována. Tato směs je opatrně dispergována ultrazvukovými vlnami, což vede k vytvoření malých lipidových bublin, známých jako liposomy. Tyto liposomy mají velmi malý vnitřní objem a jsou obklopeny jednou vrstvou lipidové membrány. I když je sonikace efektivní metodou pro přípravu liposomů, je důležité mít na paměti, že reprodukce ultrazvukových podmínek může být obtížná, což může vést k určité variabilitě velikosti částic v jednotlivých sériích příprav [27].

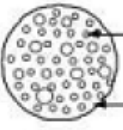
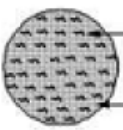

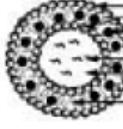
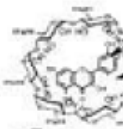
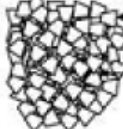
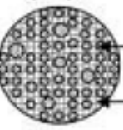

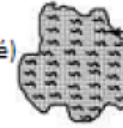
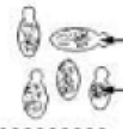
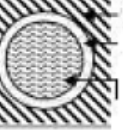
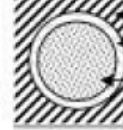
### 2.2.1.4. Extruze

Metoda vstřikování rozpouštědla je postup, při kterém se rozpouštědlo obsahující lipidovou složku vstříkuje do prostředí vodného média. Nejprve se lipidová složka rozpustí v organickém rozpouštědle, jako je ether nebo ethanol. Poté je tato směs vstříknuta do vodného prostředí. V případě etheru je obvykle nutné zahřát vodnou fázi nad teplotu varu etheru nebo pracovat za sníženého tlaku. Po vstřikování dojde k odpaření rozpouštědla, což vede k vytvoření malých unilamelárních vezikul. Stejný efekt lze dosáhnout i při vstřikování ethanolu. Zde se rozpouštědlo zředí ve velkém množství vodné fáze, což vede k poklesu jeho koncentrace pod kritickou hodnotu, přičemž spontánně dochází k formaci liposomů [27].

## 2.2.2. Techniky enkapsulace bioaktivních látek do nanočástic

Enkapsulace bioaktivních látek do nanočástic je důležitý proces, který zahrnuje kompletní obalení aktivních látek ochranným systémem. Tímto způsobem se vytváří fyzikálně-chemická bariéra, jež chrání látku před vnějšími vlivy. Tento postup má klíčový význam v moderních odvětvích jako potravinářství, kosmetika a farmacie. Jeho hlavním účelem je ochrana a stabilizace citlivých složek, jako jsou vitamíny, antioxidanty, peptidy a další, které jsou náchylné k rychlé degradaci a inaktivaci [29].

Enkapsulace těchto látek do nanočástic, jako jsou liposomy nebo jiné lipidové vezikuly, umožňuje dosažení lepší stability, biologické dostupnosti a cíleného uvolňování. Existuje mnoho technik pro enkapsulaci, včetně sušení rozprašováním, extruze, potahování ve fluidním loži, koacervace, zachycení liposomů, inkluze, komplexace a další [2][30]. Klíčovým parametrem v liposomové formulaci je obsah cholesterolu, který výrazně ovlivňuje vlastnosti a funkčnost liposomů. Zvýšený obsah cholesterolu může zlepšit stabilitu liposomů a zabránit úniku enkapsulovaných látek. Důležitou roli hraje i lecitin, přičemž liposomy formulované ze sójového lecitinu mají obvykle vyšší účinnost enkapsulace než ty z rýžového lecitinu [9]. Přehled enkapsulačních technik je vyobrazen na Obrázek 9 [2].

Enkapsulační techniky	Ilustrace charakteristik
Sprejové sušení	 <ul style="list-style-type: none"> <li>Polyfenoly</li> <li>Matrix</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>Molekula polyfenolu</li> <li>Matrix</li> </ul>
Koacervace	 <ul style="list-style-type: none"> <li>Polyfenoly</li> <li>Hydrokoloidní gelová síť</li> </ul>
Uzavření do lipozomů	 <ul style="list-style-type: none"> <li>Fosfolipidová dvojvrstva</li> <li>Ve vodě nerozpustné polyfenoly</li> <li>Ve vodě rozpustné polyfenoly</li> <li>Hydrofilní oblast</li> <li>Hydrofobní oblast</li> </ul>
Inkluze	 <ul style="list-style-type: none"> <li>Quercetin</li> <li>Hydrofobní dutina</li> <li><math>\beta</math>-cyklodextrin</li> </ul>
Kokrystalizace	 <ul style="list-style-type: none"> <li>Krystaly cukru</li> <li>Polyfenoly</li> </ul>
Nanočástice	 <ul style="list-style-type: none"> <li>Ve vodě nerozpustný polyfenol v olejové fázi</li> <li>Vodná fáze</li> </ul>
Lyofilizace	 <ul style="list-style-type: none"> <li>Polyfenoly (nerozpustné)</li> <li>Matrix</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>Polyfenoly (rozpustné)</li> <li>Matrix</li> </ul>
Enkapsulace pomocí kvasinek	 <ul style="list-style-type: none"> <li>Buňky kvasinek</li> <li>Polyfenoly</li> </ul>
Emulgace	 <ul style="list-style-type: none"> <li>Olejová fáze</li> <li>Emulgační činidlo</li> <li>Ve vodě rozpustné polyfenoly ve vodné fázi</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>Vodní fáze</li> <li>Emulgační činidlo</li> <li>V oleji rozpustné polyfenoly v olejové fázi</li> </ul>

Obrázek 9: Přehled enkapsulačních technik a struktur liposomů [2]

### 2.2.2.1 Sprejové sušení

Metoda sprejového sušení je jedním z historicky nejstarších postupů pro enkapsulaci aktivních látek. Tento proces je tak rozšířený v potravinářském průmyslu, že se někdy nepovažuje za tradiční enkapsulaci. Sprejové sušení zahrnuje rozpuštění, emulgaci nebo disperzi aktivní látky v nosiči, následované atomizací a rozprašováním směsi do horké komory. V průběhu tohoto procesu vzniká na povrchu kapky film [31].

Sprejové sušičky jsou vybaveny vysokotlakými tryskami nebo odstředivými koly, známými také jako rotační rozprašovače, které fungují při průtoku vzduchu a částic tak, aby nedocházelo k nadměrnému přehřátí. Zajistit termolabilním látkám správné podmínky je klíčové. Velikost rozprašovaných kapek závisí na vlastnostech kapaliny a tlakových ztrátách v tryskách. Kontrola teploty během procesu sušení je zajištěna nastavením vstupní teploty mezi 150-220 °C, což zabraňuje přehřátí kapky. Výstupní teplota by měla být mezi 50-80 °C, a to umožňuje sušení částic různých velikostí. Během sušení se film postupně tvoří kolem každé kapky a koncentrace aktivní látky v kapce postupně stoupá. Nakonec vzniká suchá částice [31][8].

#### 2.2.2.2. *Sprejové chlazení*

Metoda sprejového chlazení je další technologií pro výrobu částic, kde jsou aktivní látky obalené lipidy. Aktivní látka může být buď rozpuštěna v lipidové matrici, přítomna jako suchá částice nebo ve formě vodné emulze. Rozpuštěné lipidové kapky jsou vstříkovány do chladičí komory pomocí trysky, což způsobuje jejich tuhnutí a tvorbu částic. Tato metoda je velmi podobná sprejovému sušení, avšak při nižší teplotě nedochází k odpařování vody. Další atomizační metodou pro výrobu pevných lipidických částic je rotační disk [2] [31].

#### 2.2.2.3. *Vytlačování a vstřikování taveniny*

Proces vytlačování a vstřikování taveniny je další metodou enkapsulace aktivních látek, která se používá zejména u sacharidových materiálů. Tato technika spočívá v tom, že sacharidová tavenina, obsahující například sacharózu, maltodextrin, glukózový sirup nebo polyoly, je při teplotách nad 100 °C protlačována skrze otvory do skleněné formy, kde má aktivní látka omezenou pohyblivost [30][31].

Existují dva hlavní typy enkapsulace pomocí sacharidových materiálů. První typ je vstřikování taveniny, při kterém je tavenina protlačována skrz otvory a následně chlazená, čímž dochází k ztvrdnutí obalu při kontaktu s chladným prostředím nebo dehydratací pomocí rozpouštědla, jako je isopropanol nebo tekutý dusík. Velikost vytvořených částic se pohybuje mezi 200 až 2 000 µm [31]. Druhý typ je vytlačování taveniny, kde se tavenina protlačuje kontinuálně skrz extrudér s jedním nebo více šrouby. Tento proces je velmi podobný vstřikování taveniny, ale používá šrouby ve vodorovné poloze. Extrudáty vytvořené touto metodou mohou být složeny ze škrobu, maltodextrinů, modifikovaných škrobů, cukrů nebo celulósových etherů [2] [31].

#### 2.2.2.4. *Emulgace*

Další často používanou metodou je emulgace, která je ideální pro vodně rozpustné aktivní látky. Existují dvě hlavní kombinace emulzí: voda v oleji a olej ve vodě. Speciálním typem emulze je dvojitá emulze voda/olej/voda. Emulze oleje ve vodě může být následně sušena pomocí různých metod, jako je sprejové sušení pro vytvoření prášku [30][31].

#### 2.2.2.5. *Fluidní vrstva*

Fluidní vrstva, původně vytvořená pro farmaceutický průmysl, nyní proniká i do potravinářského sektoru. Princip je jednoduchý: aktivní látku suspendujeme v komoře s přesně řízenou teplotou a vlhkostí. Pak, za vysoké rychlosti, atomizujeme vnější fázi, což způsobí, že se aktivní látka obalí a vytvoří se částice. Využitelných vnějších fází je mnoho, od derivátů celulózy až po lipidy a proteiny. Tato metoda se hodí i pro tavné povlaky, jako jsou hydrogenované oleje nebo mastné kyseliny, či pro použití škrobu či maltodextrinu. Mnoho potravinářských produktů nyní obsahuje látky enkapsulované tímto způsobem, jako třeba hydrogenuhličitan sodný do pečiva nebo sůl do masa [2][31].

#### 2.2.2.6. *Lyofilizace*

Lyofilizace, metoda známá také jako sublimační sušení, je postupem pro odvodnění téměř všech termolabilních látek a aromatických složek. Tato technika byla úspěšně využita pro ve vodě rozpustné látky a přírodní aromatické látky. Lyofilizace, i když náročná s dlouhým procesem sublimace (často 20 hodin), je v zásadě jednoduchá metoda [31].

#### 2.2.2.7. *Koacervace*

Koacervace je proces, při kterém se polymerový roztok rozdělí na dvě oddělené tekuté fáze, z nichž jedna obsahuje vyšší koncentraci makromolekulárního materiálu a nazývá se koacervační fáze, zatímco druhá, řidší, je označena jako koacervační médium nebo supernatant. Existují dvě hlavní formy koacervace: jednoduchá a komplexní. Jednoduchá koacervace nastává, když dojde k fázové separaci v přítomnosti jednoho typu makromolekulární látky, na rozdíl od komplexní koacervace, kde k separaci dochází v přítomnosti dvou nebo více různě nabitých polymerů. Během obou procesů se vytvářejí malé kapky koacervátu, které se mohou shlukovat nebo spojovat, vytvářejíce oddělenou koacervovanou fázi. Pokud jsou v roztoku jádra přítomna, kapky koacervátu se kolem nich hromadí a po přidání vhodného síťovacího činidla vytvářejí stěnu koacervátů. Mícháním roztoku lze zabránit shlukování a sedimentaci kapének koacervátu. Pro zajištění stability výsledných mikročástic může být v některých případech nezbytné přidání stabilizátoru, aby nedocházelo ke koagulaci. Dokončení výroby mikročástic koacervace často vyžaduje další kroky, jako je odstranění zbytkového rozpouštědla snížením teploty a propláchnutí srážecím roztokem nebo stabilizace síťovacími činidly [31].

#### 2.2.2.8. *Kokrystalizace*

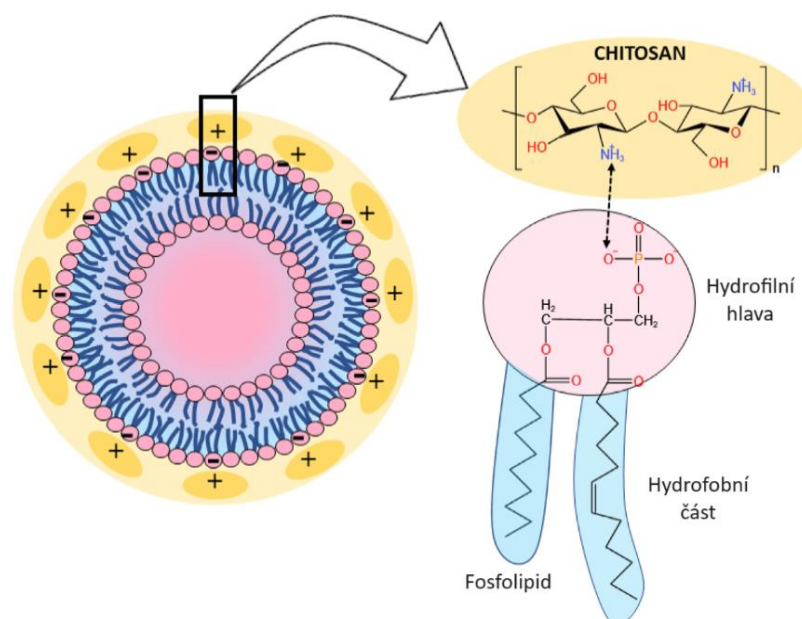
Kokrystalizace, nová metoda využívající sacharózu jako vnější fázi, která obklopuje aktivní látku, udržuje sacharózový sirup za přesycených podmínek při vyšších teplotách, aby nedocházelo k jeho krystalizaci. Poté se k sacharózovému sirupu přidá požadované množství aktivní látky a roztok začne krystalizovat. Míchání pokračuje, dokud se nezačnou vytvářet aglomeráty. Tyto zapouzdřené produkty jsou pak sušeny na požadovanou vlhkost [2] [31].

### 2.2.2.9. Uzavření do liposomů

Liposomy, uměle vytvořené biomembrány složené z fosfolipidů, hlavně lecitinu a cholesterolu, spontánně vznikají, když je lecitin rozptýlen ve vodě. Tyto struktury mají dvojvrstvu s hydrofobními řetězci směřujícími do středu a hydrofilními hlavičkami směřujícími ven. Díky této struktuře lze do liposomů enkapsulovat látky jak hydrofilní, tak lipofilní. Byly využity k přenosu vakcín, hormonů, enzymů a vitamínů. Liposomy mohou být připraveny různými způsoby, včetně etanolového vstřikování, odpařování reverzní fáze, ultrazvukového ošetření, zmrazení, sušení nebo vysokotlaké homogenizace [30][31].

### 2.2.3. Potažení nanočástic chitosanem

Připravené liposomy s enkapsulovanými látkami jsou následně potahovány chitosanem. To se provádí ponořením liposomů do kyselého chitosanového roztoku, kde chitosan vytváří ochranný obal kolem liposomů. Interakce mezi fosfolipidem a chitosanem je znázorněna na Obrázek 10. Chitosanový obal zvyšuje stabilitu liposomů v různých prostředích, včetně biologického prostředí. Chitosan může interagovat s určitými buněčnými povrchy, což umožňuje cílenou dodávku bioaktivních látek. Chitosan je biodegradovatelný, čímž nepředstavuje environmentální zátěž [32][33].



Obrázek 10: Interakce mezi fosfolipidem a chitosanem [33]

Modifikace částic chitosanem přidává další úroveň funkcionality a vlastností nanočástic, čímž se zvyšuje jejich účinnost v konkrétních aplikacích. Tímto způsobem jsou vytvořené nanočástice kombinované s chitosanem, které jsou připraveny pro aplikace v kosmetice, lékařství a dalších oblastech biomedicínského výzkumu. Tento komplexní proces zahrnuje

různé techniky a materiály, aby zajistil maximální stabilitu, účinnost a biologickou kompatibilitu [32].

Další modifikace nanočástic např. alginátem přináší možnost vylepšení vlastností nanočástic, které mohou být využity v široké škále aplikací. Tato kombinace může posílit stabilitu částic a zlepšit jejich biokompatibilitu, což je klíčové pro účinnou aplikaci v biomedicínských a farmaceutických odvětvích [34].

### **2.3. Princip uvolňování bioaktivních látek z nanočástic**

Bioaktivní látky mohou difundovat přes lipidovou membránu nanočástic do okolního prostředí. Difúze je hlavním mechanismem uvolňování, při kterém aktivní látky migrují skrz obalový materiál do okolního prostředí. Tento proces je ovlivněn koncentračním gradientem mezi vnitřní a vnější částí částic, difuzivitou látek a vlastnostmi obalového materiálu. Některé nanočástice jsou navrženy tak, aby reagovaly na změny pH nebo teploty v okolním prostředí. Při těchto změnách mohou částice měnit svou strukturu a uvolňovat bioaktivní látky. V některých případech jsou nanočástice navrženy tak, aby byly citlivé na enzymy přítomné v určitých buňkách nebo tkáních. Tyto enzymy mohou rozkládat membránu částic, uvolňující bioaktivní látky. Porozumění těmto vlastnostem a principům je zásadní pro návrh efektivních nanočástic pro enkapsulaci bioaktivních látek a jejich cílené uvolňování v biologickém prostředí [15][35].

Optimalizace uvolňování bioaktivních látek z částic zahrnuje optimalizaci vlastností částic, jako je velikost, morfologie a chemické složení, stejně jako optimalizaci podmínek prostředí, ve kterém se částice nacházejí. Správně provedená optimalizace může vést k dosažení požadovaného uvolňovacího profilu a zlepšení biologické dostupnosti a účinnosti bioaktivních látek [33][36].

### **2.4. Metody charakterizace nanočástic**

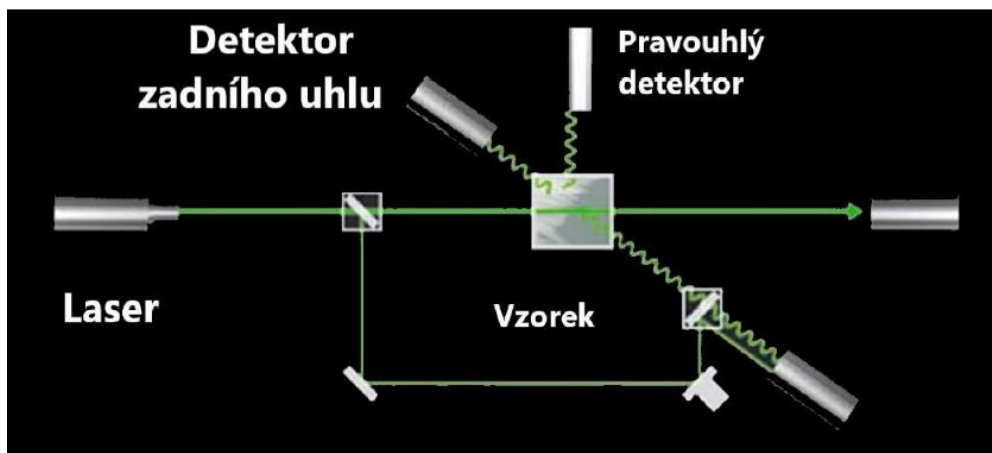
Liposomy, nanočástice složené z fosfolipidů, představují zajímavý prostředek pro efektivní transport a ochranu bioaktivních látek. Jejich vlastnosti jsou klíčové pro dosažení optimální účinnosti a stability [15].

#### **2.4.1. Stanovení velikosti a distribuce částic pomocí dynamického rozptylu světla**

Liposomy mají typicky velikost v rozmezí nanometrů, obvykle od 20 do 200 nm, avšak mohou dosahovat velikosti až 10  $\mu\text{m}$ . Tato malá velikost umožňuje snadný transport a pronikání do buněk a tkání, což je klíčové v kosmetických a farmaceutických aplikacích. Polydispersita liposomů může ovlivnit jejich biologickou dostupnost a stabilitu. Homogenní velikostní distribuce zlepšuje konzistentnost vlastností a účinnost [3].

Techniky jako DLS (dynamický rozptyl světla) umožňují měření a optimalizaci velikosti nanočástic, přičemž schéma dynamického rozptylu světla se nachází na Obrázek 11. Měří

flukuační rozptyl světla způsobený pohybem nanočástic v suspenzi. DLS poskytuje distribuci velikostí částic, od malých molekul až po větší nanočástice. DLS umožňuje hodnocení rozmanitosti velikosti částic v disperzi. Výhodou je, že se jedná o rychlou a nedestruktivní metodu. Avšak je tato metoda citlivá k aglomeracím částic [37][38].



Obrázek 11: Schéma dynamického rozptylu světla [38]

#### 2.4.2. Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu

Elektrický náboj na povrchu liposomů ovlivňuje jejich stabilitu a schopnost vzájemné odpudivosti nebo přitahování, ale také schopnost interakce s buňkami. Zeta potenciál je elektrokinetický potenciál povrchu částic v disperzním systému, což znamená, že se měří náboj a pohyblivost částic ve stabilním koloidním roztoku. Pokud mají veškeré částice systému výrazně negativní nebo pozitivní zeta potenciál, budou se navzájem odpuzovat, a naopak nebudou mít tendenci k shlukování. Repelentní síly generované vysokým zeta potenciálem brání částicím v aglomeraci. To je klíčové pro udržení homogenity a rozptylu částic v roztoku. Pokud však mají částice nízký zeta potenciál, nepůsobí na ně žádné odpudivé síly a dochází k flokulaci. Za hraniční hodnoty se považují  $-30$  mV a  $+30$  mV. Pokud je zeta potenciál mezi těmito hodnotami, pak takovéto částice považujeme za nestabilní. Pro liposomové nanočástice, jakožto důležitý parametr, zeta potenciál ovlivňuje jejich stabilitu, aglomeraci a interakce s okolním prostředím [15][37].

Zeta potenciál lze měřit různými technikami, nejčastěji elektroforetickou světelnou rozptylovou spektroskopií (ELS) nebo elektroforetickým měřením na zeta potenciálovém analyzátoru. V kosmetickém a farmaceutickém průmyslu je důležité monitorovat zeta potenciál liposomů, aby se zajistila jejich stabilita, biokompatibilita a efektivní transport bioaktivních látek [37].

Stabilita liposomů je klíčovým aspektem, který lze ovlivnit výběrem složení a optimálními podmínkami skladování. Stabilitu disperze lze sledovat měřením změn velikosti částic a zeta potenciálu během skladování při různých podmínkách (teplota, světlo). Skladovatelnost je



studována sledováním změn ve fyzikálních a chemických vlastnostech částic během určité doby skladování. Důležité jsou parametry jako změny ve velikosti, morfologii a účinnosti uvolňování během času. Tyto charakterizační aspekty jsou klíčové pro posouzení účinnosti a stability připravených nanočástic. Pomáhají v optimalizaci výrobních procesů a zajištění kvality pro praktické aplikace v oblasti kosmetiky, medicíny a dalších biomedicínských výzkumů [26].

### **2.4.3. Zobrazení struktury a morfologie pomocí elektronové mikroskopie**

Liposomy, složené z fosfolipidů, cholesterolu a bioaktivních látek, mají membránovou strukturu. Fosfolipidy, hlavní stavební bloky liposomů, mají hydrofilní a hydrofobní části, což umožňuje efektivní inkorporaci jak ve vodě rozpustných, tak i v tučných rozpustných látek. Liposomy mají vezikulární strukturu, obvykle sférického nebo oválného tvaru. Tato vezikulární struktura je ideální pro uzavírání hydrofilních a lipofilních látek uvnitř membrány. Liposomy mají biomimetickou strukturu, což znamená, že jsou podobné buněčné membráně. To umožňuje lepší interakci s biologickými systémy. Některé liposomy mohou mít více než jednu vrstvu membrány, což ovlivňuje jejich stabilitu a transportní vlastnosti. Jednovrstvá membrána může být vhodná pro specifické aplikace, jako je rychlé uvolňování látek. Struktura se může měnit v závislosti na konkrétním použití. Chitosan může být přidán jako vnější vrstva nebo povrchová modifikace nanočástic [39].

Morfologie nanočástic se zobrazuje pomocí elektronové mikroskopie. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) a transmisní elektronová mikroskopie (TEM) umožňují vizualizaci nanočástic na mikroskopické úrovni. Poskytují vysoké rozlišení a detailní informace o morfologii nanočástic. SEM produkuje 3D obrazy povrchu částic pomocí elektronů, umožňuje vizualizaci morfologie a velikosti částic. TEM produkuje 2D snímky vnitřní struktury částic tím, že elektrony prochází vzorkem. Umožňuje podrobnější pohled na vnitřní strukturu nanočástic. SEM tedy poskytuje povrchové detaily, zatímco TEM umožňuje prohlédnout strukturu uvnitř částic. Omezujícím faktorem těchto metod je potřeba speciální úpravy vzorku [39][40].

### **2.4.4. Stanovení enkapsulační účinnosti**

Enkapsulační účinnost je klíčovým parametrem pro hodnocení efektivity procesu enkapsulace, což je proces uzavírání bioaktivních látek v nosiči, jako jsou liposomy. Udává, jak velká část bioaktivní látky byla úspěšně uzavřena nebo enkapsulována v nosiči ve srovnání s celkovým množstvím této látky použitého ve výrobě. Vyšší enkapsulační účinnost naznačuje efektivnější proces enkapsulace, kde je větší část bioaktivní látky úspěšně uzavřena v nosiči. Monitoring enkapsulační účinnosti může pomoci při optimalizaci výrobních podmínek, včetně složení nosiče, času a teploty. Z ekonomického hlediska je důležité dosáhnout vysoké enkapsulační účinnosti, aby bylo dosaženo maximálního využití použité bioaktivní látky a minimalizovaly se ztráty. Enkapsulační účinnost může ovlivnit stabilitu enkapsulovaných látek a jejich uvolňování z nosiče v cílovém prostředí. Při vývoji produktů s enkapsulovanými látkami je sledování enkapsulační účinnosti klíčové pro zajištění kvality a účinnosti koncového

produktu. Enkapsulační účinnost se stanovuje ze supernatantu bez samotných liposomových částic pomocí UV-VIS spektrofotometrie nebo HPLC. HPLC umožňuje přesné stanovení koncentrace bioaktivních látek v liposomálních nanočásticích. Monitoruje proces uvolňování látek z částic v čase, což je klíčové pro kontrolované uvolňování [32].

## **2.5. Optimalizace přípravy chitosanových nanočástic**

Výběr a optimalizace metody přípravy nanočástic je klíčovým prvkem pro zajištění kvality a efektivity výsledných liposomových částic kombinovaných s chitosanem. Různé faktory, od složení po procesy, musí být pečlivě zváženy [36][41].

### **2.5.1. Optimalizace poměru lecitinu a cholesterolu**

Poměr lecitinu a cholesterolu vytváří základní strukturu liposomů. Optimalizace tohoto poměru je nezbytná pro dosažení požadovaných fyzikálních vlastností, jako je velikost, stabilita a sklon k enkapsulaci. Experimenty s různými poměry a jejich vlivem na výsledné liposomy jsou nezbytné. Experimenty na různých poměrech lecitinu a cholesterolu jsou provedeny za účelem nalezení optimálního poměru pro tvorbu stabilních liposomů. Různé poměry mohou ovlivnit strukturu, velikost a stabilitu liposomů. Optimální poměr lecitinu a cholesterolu je klíčový pro stabilitu membrány liposomů a jejich schopnost efektivně transportovat bioaktivní látky přes buněčné membrány [36].

### **2.5.2. Optimalizace enkapsulace bioaktivních látek**

Různé bioaktivní látky mohou vyžadovat specifické podmínky pro efektivní enkapsulaci. Optimalizace procesu enkapsulace zahrnuje studium vlivu faktorů, jako jsou čas, teplota a koncentrace látky, na dosažení co nejvyšší enkapsulační účinnosti. Velikost a povaha enkapsulovaných látek jsou zkoumány, aby se zjistilo, jaké typy látek jsou nejvhodnější pro enkapsulaci. Například pro hydrofilní látky jsou vhodné metody s vodnými fázemi, zatímco pro hydrofobní látky se upřednostňují liposomální membrány. Experimenty s různými koncentracemi bioaktivních látek jsou prováděny za účelem určení maximální kapacity enkapsulace a minimálního úniku látek z liposomů během přípravy [41].

### **2.5.3. Optimalizace přípravy chitosanu a jeho použití v liposomových částicích**

Optimalizace přípravy chitosanu zahrnuje kontrolu stupně deacetylace, velikosti molekul a modifikací. Při použití v liposomových částicích musí být chitosan připraven tak, aby poskytoval požadované vlastnosti pro potažení a interakci s liposomy. Různé metody deacetylace jsou zkoumány k dosažení optimálního stupně deacetylace chitosanu, což ovlivňuje jeho náboj a schopnost interakce s liposomy. Experimenty s různými technikami potažení chitosanem jsou pak provedeny za účelem získání tenkého a rovnoměrného chitosanového obalu kolem liposomů, což zajišťuje stabilitu a cílenou dodávku aktivních látek [42].

#### **2.5.4. Optimalizace stabilizace a metod uchovávání**

Stabilita liposomových nanočástic hraje klíčovou roli v jejich využití. Studie o vlivu teploty, pH a času na stabilitu liposomů jsou prováděny k určení optimálních podmínek pro uchovávání. Stabilita je klíčová pro zachování integrity a účinnosti liposomů. Různé metody uchovávání, včetně zmražení a suspenze v inertním plynu, jsou zkoumány k určení nejvhodnějších podmínek pro dlouhodobé uchovávání stability a účinnosti [15][37].

#### **2.5.5. Optimalizace účinnosti, biokompatibility a cíleného uvolňování**

Pro dosažení maximální účinnosti, biokompatibility a cíleného uvolňování je nutné sledovat a optimalizovat interakce mezi liposomy, chitosanem a bioaktivními látkami. Studie a experimenty zaměřené na tyto aspekty jsou klíčové pro dosažení požadovaných terapeutických efektů. *In vitro* a *in vivo* experimenty na buňkách a zvířatech jsou prováděny k testování účinnosti a biokompatibility nanočástic. Studie na buněčných liniích a zvířatech umožňují posoudit cytotoxicitu, účinnost uvolňování a biologické chování. Experimenty s různými cílenými transportními systémy, jako jsou ligandy nebo receptory, jsou provedeny za účelem dosažení specifického uvolňování bioaktivních látek v určitých tkáních nebo buňkách. Těmito optimalizačními kroky se zajistí, že připravené nanočástice jsou stabilní, účinné, biokompatibilní a schopné cíleně uvolňovat bioaktivní látky pro zamýšlené aplikace v kosmetice, medicíně a jiných oblastech biomedicíny [43][44].

#### **2.5.6. Optimalizace procesu uvolňování enkapsulovaných látek**

Optimalizace uvolňování aktivních látek z enkapsulovaných nanočástic je důležitým procesem, který ovlivňuje biologickou dostupnost a účinnost produktů. Existuje několik faktorů, které mohou být optimalizovány pro dosažení požadovaného uvolňovacího profilu. Volba materiálu pro konstrukci membrány může ovlivnit rychlost a rozsah uvolňování aktivních látek. Velikost a tvar nanočástic mohou ovlivnit rychlost a mechanismus uvolňování. Menší částice mají obvykle vyšší povrchovou plochu k objemu, což může zvýšit rychlost uvolňování. Chemické vlastnosti aktivních látek, jako je rozpustnost, mohou ovlivnit jejich schopnost difundovat skrz obalový materiál. Hydrofobní látky se obvykle uvolňují pomaleji než hydrofilní látky. Teplota a pH prostředí mohou ovlivnit stabilitu obalového materiálu a interakci mezi obalem a aktivními látkami, což může ovlivnit rychlost uvolňování. Některé látky mohou interagovat s obalem a ovlivnit jeho propustnost [41]. Například přítomnost surfaktantů může zvýšit permeabilitu obalu a urychlit uvolňování aktivních látek. Optimalizace uvolňování aktivních látek je komplexní proces, který vyžaduje pečlivé experimentální studie a analýzu. Správně provedená optimalizace může vést k vytvoření produktů s přesně definovaným uvolňovacím profilem a zlepšenou biologickou dostupností a účinností [45].

## **2.6. Využití liposomových nanočástic**

Aplikace liposomových nanočástic kombinovaných s chitosanem jsou rozsáhlé a nacházejí uplatnění v různých odvětvích. V dalším textu jsou shrnuty specifické aplikace v jednotlivých sektorech [46].

### **2.6.1. Aplikace v kosmetických produktech**

Nanočástice umožňují vývoj pokročilých kosmetických produktů. Enkapsulace vitamínů, antioxidantů a hydratačních látek zlepšuje jejich stabilitu a účinnost. Tyto produkty nabízejí hlubokou hydrataci, regeneraci pokožky a zlepšují celkový stav kůže. Enkapsulace specifických látek, jako je vitamín C či kyselina hyaluronová, umožňuje cílenou terapii na konkrétní oblasti pokožky. To znamená, že kosmetické produkty mohou být navrženy pro řešení konkrétních problémů, jako jsou vrásky, pigmentace nebo suchá pokožka. V kosmetice jsou liposomové nanočástice kombinované s chitosanem často využívány pro zlepšení distribuce a účinnosti kosmetických složek. Příkladem může být pleťový krém na obličej s enkapsulovaným vitamínem E a chitosanem pro regeneraci pokožky, nebo oční sérum s liposomy obsahujícími kyselinu hyaluronovou pro hydrataci a omlazení pokožky [46][47].

Liposomy jsou často začleněny do gelů a emulzí. V emulzích interagují s emulgátorem, který má podobně amfifilní vlastnosti jako liposomy. Tato interakce může vést k rozrušení struktury liposomů, což znamená, že produkty obsahující liposomy mohou po určité době skladování ztratit svou účinnost. V případě gelů jsou liposomy obvykle stabilnější, avšak samotné gely mohou pokožku spíše vysušovat. Liposomy mohou být rozloženy oxidací kyslíkem, hydrolyzou nebo se mohou spojovat do větších agregátů [48].

### **2.6.2. Aplikace v potravinářství a nutraceutice**

V potravinářství a nutraceutice slouží liposomové nanočástice jako prostředek pro zvýšení biologické dostupnosti a stability bioaktivních látek. Nanočástice mohou být využity pro enkapsulaci vitamínů, minerálů a antioxidantů aplikovaných v potravinách, a tím se vytváří tzv. funkční potraviny. To zvyšuje stabilitu těchto látek a umožňuje vytvářet funkční potraviny s přidanou hodnotou pro zdraví, jako jsou potravinové doplňky. Enkapsulace bioaktivních látek, jako jsou polyfenoly z ovoce a zeleniny, umožňuje vytvářet funkční nutraceutické výrobky. Tyto produkty nabízejí zdravotní výhody, jako jsou silné antioxidantní účinky, podporu imunitního systému a snížení zánětů. Příkladem může být potravinový doplněk s liposomy obsahujícími vitamín C pro podporu imunitního systému, či nutraceutikum s enkapsulovaným vitamínem D pro podporu zdraví kostí [3]. Také enkapsulovaný vitamín B<sub>12</sub>, který je nedostatkový ve veganské stravě, může být přidáván přímo do potravin rostlinného původu [22] [49].

### 2.6.3. Využití v medicínských aplikacích a farmacii

V oblasti medicíny se liposomové nanočástice kombinované s chitosanem uplatňují jako nosiče pro cílené a kontrolované uvolňování léčiv. Významnou aplikací v medicíně se nanočástice využívají k cílené léčbě rakoviny a dalších onemocnění. Enkapsulace léčiv umožňuje přesné doručení léčiva na postižené buňky, což zvyšuje účinnost léčby a zároveň minimalizuje vedlejší účinky. Může se jednat o liposomy s chemoterapeutiky enkapsulovanými v chitosanovém obalu pro selektivní dodání léčiv do nádorových buněk [27][46].

V oftalmologii se nanočástice využívají pro podání léčiv při očních onemocněních. Umožňují prodloužené uvolňování léčiva, čímž se snižuje potřeba častého podání očních kapek. Výrobek by byl ve formě očních kapek s liposomy a chitosanem použitelný pro zlepšení absorpce léčiv do očních tkání [46].

### 2.6.4. Další aplikace (agrární průmysl, environmentální aplikace, výzkum)

Další uplatnění liposomové nanočástice nacházejí v agrárním průmyslu. Nanočástice mohou být využity pro řízené uvolňování hnojiv a pesticidů, což zvyšuje jejich účinnost a minimalizuje negativní dopady na životní prostředí [50][51].

V environmentální oblasti se využívají pro odstraňování škodlivých látek z vody a vzduchu. Enkapsulace absorbentů do nanočástic umožňuje efektivní odstranění kontaminantů [52].

Nanočástice jsou využívány v různých výzkumných oblastech, jako jsou nanoelektronika, nanofotonika a materiálový výzkum, a to díky svým jedinečným vlastnostem a schopnostem. Tyto aplikace jsou klíčové pro budoucí technologický rozvoj [53].

Výše uvedené aplikace poukazují na široké spektrum možností využití liposomových nanočástic s chitosanem v různých odvětvích s důrazem na zlepšení účinnosti a cíleného dodávání bioaktivních látek [53][52].

## 2.7. Kůže

Kůže, která zaujímá rozlohou o ploše 1,5 - 2 m<sup>2</sup>, představuje klíčový štít mezi našim vnitřním světem a vnějším prostředím. Hraje zásadní roli v ochraně organismu před vnějšími útoky, v regulaci teploty a udržení vodní rovnováhy. Skládá se z tří hlavních vrstev: *epidermis*, *dermis* a podkoží [54][55].

### 2.7.1. Epidermis

Vnější a nejtenčí vrstva kůže je *epidermis*. Tvoří ji keratinocyty, melanocyty, Merkelovy a Langerhansovy buňky. *Epidermis* se dělí do pěti vrstev podle stavby a funkce keratinocytů. Nej povrchnější je rohová vrstva, kde jsou buňky zcela zrohovatělé a zbavené jader. Tato vrstva se pravidelně odlupuje, aby byla zachována integrita kůže. Následuje zrnitá vrstva, sestávající

z několika vrstev zploštělých buněk. Dále přecházíme k ostnitě vrstvě, kde se buňky vyznačují ostnitým tvarem. Nejhlubší vrstva, bazální vrstva, obsahuje keratinocyty s velkými jádry a je základem pro regeneraci *epidermis*. *Epidermis* se obnovuje zhruba každých 28 dní, kdy dochází k postupnému posunu buněk od bazální vrstvy ke zrohovatělé vrstvě. Tento proces je klíčový pro zachování zdravého vzhledu a funkce kůže [55][56].

### **2.7.2. Dermis**

*Dermis*, neboli škára, ležící pod *epidermis*, je střední vrstvou kůže s tloušťkou kolem 1 mm. Její hlavní funkcí je poskytovat výživu kůži a zajišťovat její pevnost a pružnost. Je složena z fibroblastů, makrofágů a dendritických buněk, obsahuje mnoho dalších struktur, včetně potních a mazových žláz, vlasových folikulů, nervových zakončení a cév. Díky této struktuře je schopna dermis plnit mnoho důležitých funkcí, od regulace teploty po reakci na vnější podněty a poskytování potřebné výživy pokožce [56].

### **2.7.3. Hypodermis**

*Hypodermis*, známá také jako podkoží, je nejhlubší vrstva kůže nacházející se pod škárou. Tvorbí značnou část tloušťky kůže a je klíčovým prvkem pro podporu a udržení celkové struktury a funkce kůže. *Hypodermis* se skládá převážně z tukové tkáně, která slouží jako izolační vrstva pro tělo a zároveň zajišťuje tepelnou regulaci. Tukové buňky (adipocyty) v podkoží ukládají energii ve formě tuku a poskytují polštářovou ochranu pro vnitřní orgány a tkáně. Další součástí podkoží jsou krevní cévy, nervy a různé typy buněk, které jsou zapojeny do metabolismu a imunitního systému. Krevní cévy v podkoží zajišťují přísun živin a kyslíku do okolních tkání a odvádějí odpadní látky z těla. Nervová zakončení v podkoží jsou zodpovědná za přenos signálů mezi kůží a centrálním nervovým systémem, což umožňuje vnímání dotyků, tepla a bolesti [56].

### **2.7.4. Visioskopie**

Diagnostika pokožky pomocí visioskopie je metoda, která umožňuje posoudit stav a vlastnosti pokožky na základě její viskoelasticity. Princip spočívá v měření odporu pokožky vůči deformaci a její schopnosti zotavit se do původního tvaru. Viskoskopie je užitečný nástroj pro posouzení hydratace, pružnosti a pevnosti pokožky, stejně jako pro monitorování účinků kosmetických produktů nebo léčebných postupů. Metoda se často využívá v dermatologii, kosmetologii a výzkumu pokožky k posouzení jejího stavu a optimalizaci péče o ni [57].

### 3. CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo připravit liposomové nanočástice kombinované s chitosanem s enkapsulovanou bioaktivní látkou. Následně probíhala optimalizace přípravy a charakterizace navržených nanočástic, včetně potenciálního aplikačního využití.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Literární rešerše na dané téma (částice: rozdělení, příprava, aplikační využití, materiály; charakterizace aktivních látek pro enkapsulaci).
- 2) Optimalizace přípravy kombinovaných částic a jejich charakterizace.
- 3) Sledování stability připravených částic.
- 4) Návrh a testování vybrané aplikační formy.

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1 Seznam použitých přístrojů**

Automatické pipety různých objemů – Discovery, Biohit (DE)

Analytické váhy (Ohaus, USA)

Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Německo)

Centrifuga – U-32 R, Boeco (DE)

Centrifuga – MiniSpin® plus, Eppendorf (DE)

Vortex - Fixed speed vortex mixer, Ohaus (USA)

HPLC – UltiMate 3000 HPLC and UHPLC Systems, Thermo Fisher Scientific (USA)

Spektrofotometr – Helios  $\gamma$ , Unicam (VB)

Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat – Verkon (ČR)

Ultrazvuk – PS 02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)

DLS analyzátor Zetasizer Nano ZS, Malvern (UK)

Lyofilizátor – BenchTop 4K ZL, VirTis

Optický mikroskop - Intraco Micro (ČR)

### **4.2 Seznam použitých chemikálií**

Lecitin (Serva, DE)

Cholesterol (Sigma Aldrich, DE)

D-(-)-Ascorbic acid (Sigma Aldrich, DE)

Cobalamin (Sigma Aldrich, DE)

Alpha-Tocopherol (Sigma Aldrich, DE)

Cholecalciferol (Sigma Aldrich, DE)

Kyselina hyaluronová, Fichema (ČR)

Chloroform pro HPLC – Lach:Ner (ČR)

Ethanol pro UV/VIS, Lach:Ner (ČR)

Chitosan, Sigma Aldrich, (UK)

Kyselina octová, p.a. Lach-Ner (ČR)

Parafin, p.a. Lach-Ner (ČR)

Glycerol, p.a. Lach-Ner (ČR)

Acetonitril pro HPLC, Chem-Lab (BE)



Kyselina octová, 98 % - Vitrum–LachNer (ČR)

Arganový olej, Fichema (ČR)

Ricinový olej, Fichema (ČR)

Emulsin, Sigma Aldrich (DE)

Cetearylalkohol, Sigma Aldrich (DE)

Phenoxyethanol, Sigma Aldrich (DE)

### 4.3. Stanovení koncentrace vitamínů

Pro stanovení koncentrace vitamínů byly využity kalibrační závislosti sestavené pro vitamíny B<sub>12</sub>, C, D a E pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Pro lipofilní vitamíny bylo také provedeno stanovení pomocí HPLC. Bohužel, nebylo možné sestavit reprodukovatelnou kalibrační závislost pro kyselinu hyaluronovou.

#### 4.3.1. Stanovení koncentrace vitamínů pomocí UV-VIS spektrofotometrie

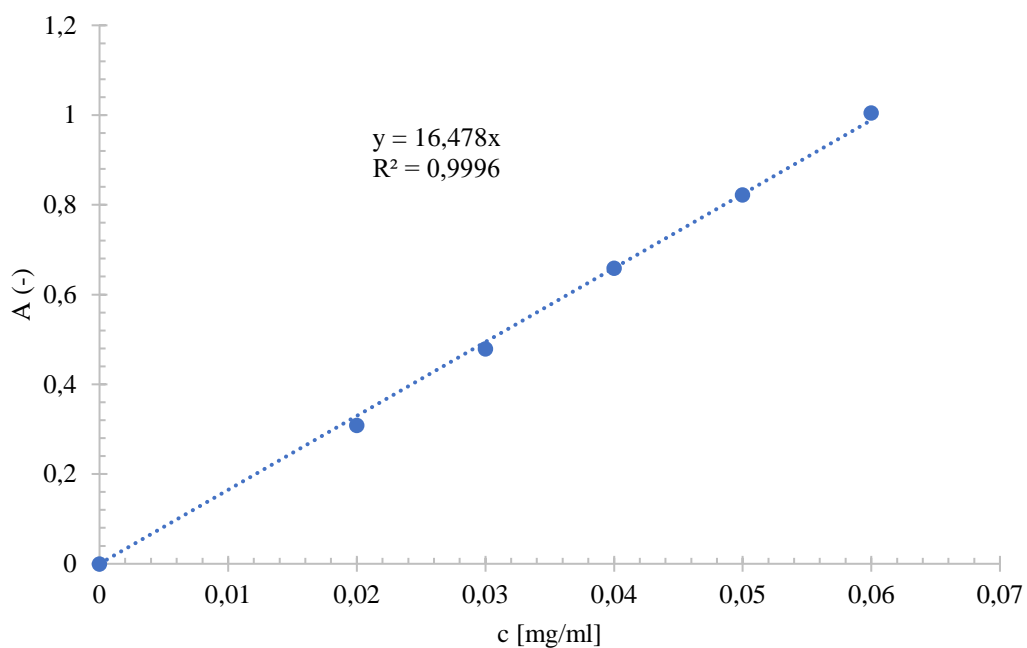
Pro stanovení koncentrace vitamínu B<sub>12</sub> byla vlnová délka měření stanovena na 360 nm, pro vitamín C na 262 nm, pro vitamín D na 264 nm a pro vitamín E na 291 nm. Tyto vlnové délky byly optimalizovány pro každý vitamín s ohledem na jejich absorpční maxima, což umožnilo přesné stanovení jejich koncentrace v analyzovaných vzorcích.

Přímá fotometrie je jednou z metod UV-VIS spektrofotometrie, která se používá k měření absorbance vzorků při určité vlnové délce. Citlivost této metody závisí na konkrétním přístroji a na koncentraci analyzované látky. V našem případě byly použity optimalizované vlnové délky pro každý vitamín s ohledem na jejich absorpční maxima, což mělo za cíl maximalizovat citlivost měření.

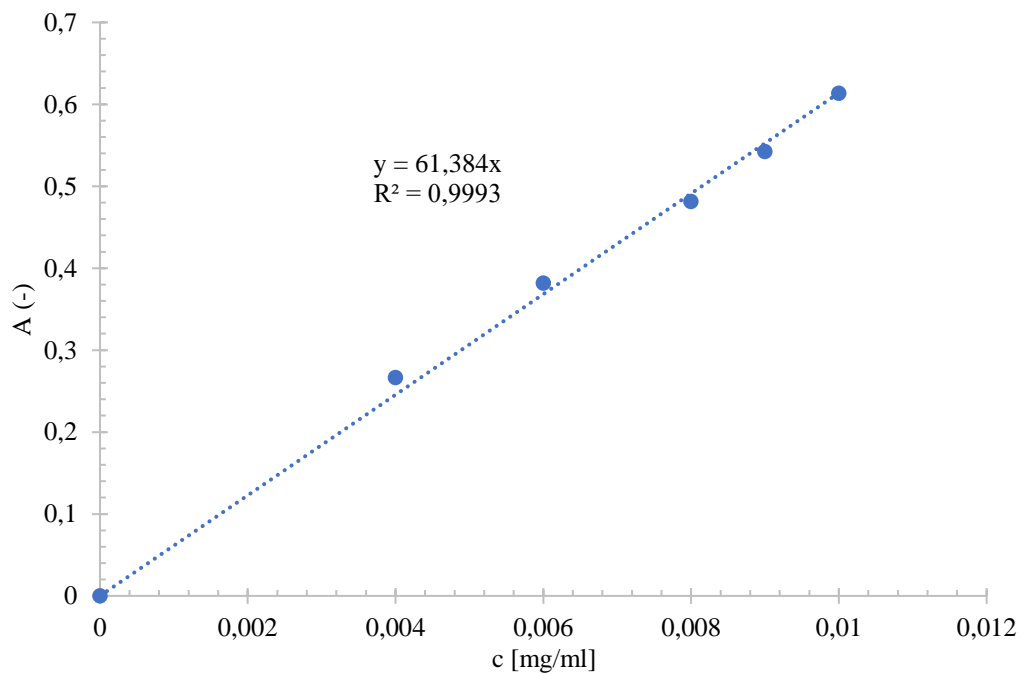
Pokud jde o interferenci, v našem experimentu jsme prováděli standardní kontrolu na možné interferující látky, které by mohly ovlivnit výsledky měření. Přestože v našem popisu metody nebyla zmínka o konkrétních interferencích, při provádění experimentů jsme se snažili minimalizovat jejich vliv a zabezpečit co nejpřesnější a spolehlivá měření.

Tabulka 1: Přehled kalibračních rovnic sestavených pomocí UV-VIS spektrofotometrie

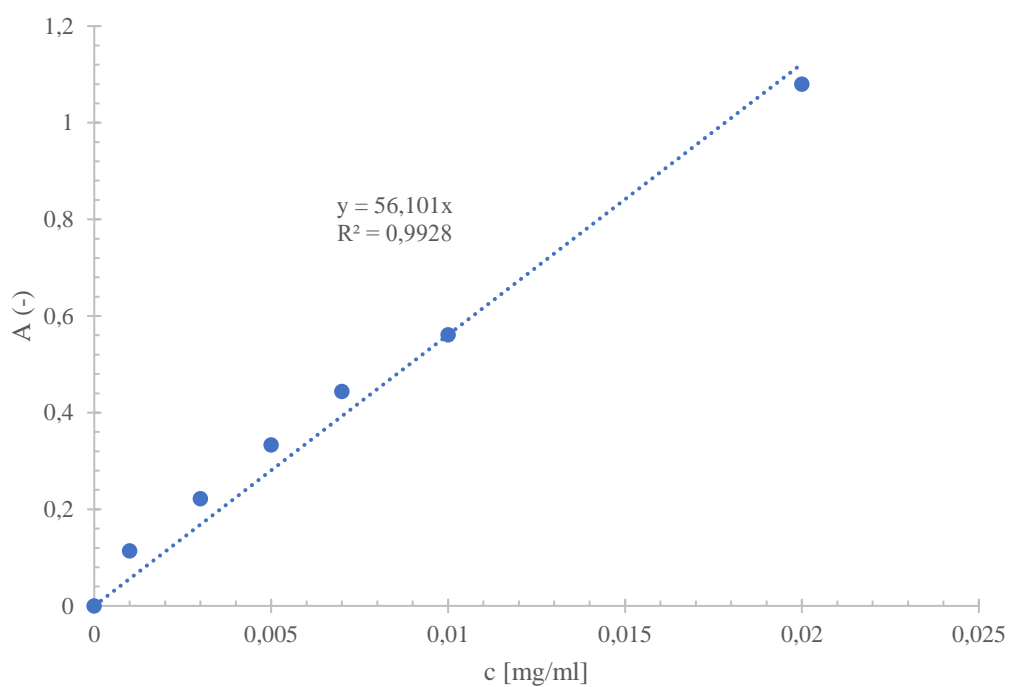
	Rovnice
Vitamín B <sub>12</sub>	$y = 16,478x$
Vitamín C	$y = 61,384x$
Vitamín D	$y = 56,101x$
Vitamín E	$y = 59,934x$



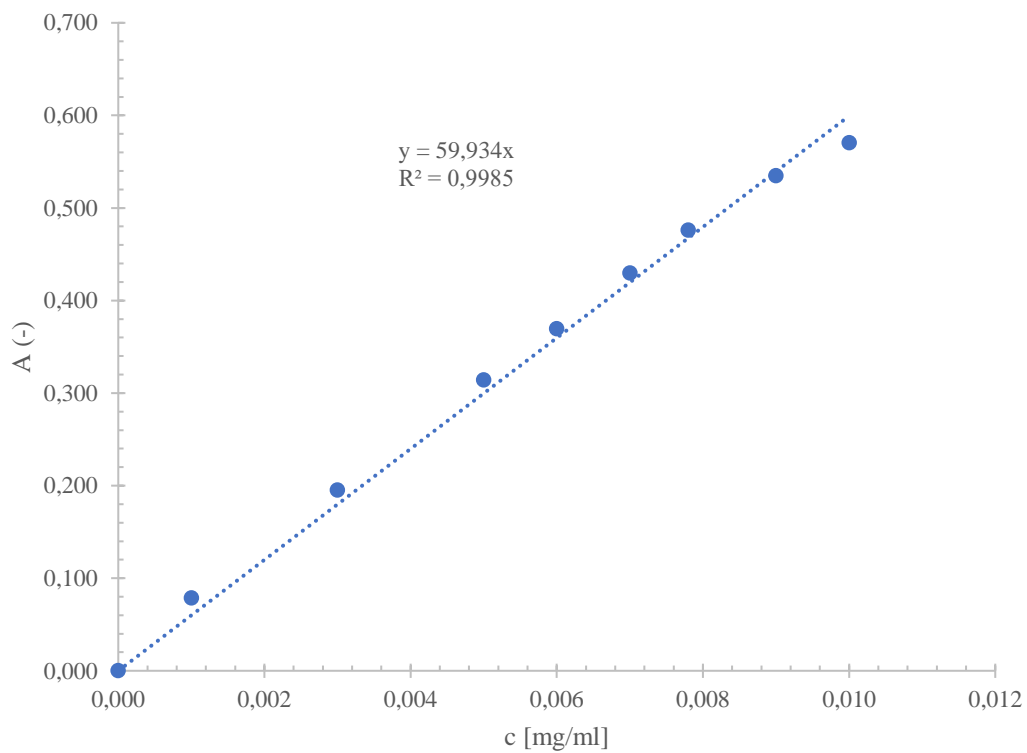
Obrázek 12: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace vitamínu B<sub>12</sub>



Obrázek 13: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace vitamínu C



Obrázek 14: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace vitamínu D



Obrázek 15: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace vitamínu E

#### 4.3.2. Stanovení koncentrace vitamínů pomocí HPLC

Metoda stanovení koncentrace vitamínů D a E pomocí HPLC je založena na oddělení a kvantifikaci těchto vitamínů v roztoku na základě jejich specifických interakcí s pevnou fází a mobilní fází v chromatografickém systému. Nejprve se vzorek obsahující vitamíny D a E rozpustí v směsi etylacetátu a acetonitrilu, poté se injektuje do chromatografického systému. V chromatografické koloně dochází k oddělení vitamínů na základě jejich různých afinit k mobilní fázi (rozpouštědlo) a pevné fázi (nosič, náplň). Vitamíny D a E se pohybují různými rychlostmi přes chromatografickou kolonu, což umožňuje jejich oddělení a identifikaci.

Analýza byla provedena na přístroji UltiMate 3000 HPLC and UHPLC Systems od společnosti Thermo Fisher Scientific, detekce byla provedena pomocí UV-VIS spektrofotometrie.

Detekce vitamínů D a E se provádí na základě jejich absorpce nebo fluorescence pomocí detektoru umístěného na výstupu chromatografického systému. Vlnová délka pro detekci vitamínu D obvykle bývá kolem 264 nm, zatímco pro vitamín E může být kolem 291 nm. Tato metoda umožňuje přesné stanovení koncentrace vitamínů D a E v analyzovaném vzorku s vysokou citlivostí a selektivitou. Metoda HPLC je popsána v publikacích v odkazu [58][59][60].

Tabulka 2: Přehled kalibračních rovnic sestavených pomocí HPLC

	Rovnice
Vitamín D	$y = 56,101x$
Vitamín E	$y = 59,934x$

#### 4.4. Příprava nanočástic kombinovaných s chitosanem

Pro přípravu nanočástic kombinovaných s chitosanem byl použit postup, který zahrnoval první krok přípravu liposomů a následné obalení těchto liposomů chitosanem.

##### 4.4.1. Příprava liposomů

V přípravě liposomů pro hydrofilní vitamíny bylo nejprve do kádinky s 10 ml vody přidáno 90 mg lecitinu, 10 mg cholesterolu a 10 mg vitamínu C nebo B<sub>12</sub>. Kádinka byla umístěna do Petriho misky, která byla naplněna studenou vodou. Tento roztok byl následně podroben sonikaci tyčovým ultrazvukem po dobu jedné minuty a chlazen vodou.

Pro liposomy s enkapsulovanými lipofilními vitamíny bylo 90 mg lecitinu, 10 mg cholesterolu a vitamínu D nebo E smícháno v 1 ml chloroformu. Tento roztok byl poté přelit do 10 ml vody a opět podroben sonikaci po dobu jedné minuty. Poté byl chloroform odpařen z roztoku pomocí magnetické míchačky s ohřevem.

#### **4.4.2. Příprava chitosomů**

K objemu 5 ml 2 % roztoku chitosanu bylo za stálého míchání postupně přikapáváno stejné množství roztoku obsahujícího liposomy. Míchání probíhalo po dobu 5 minut. Poté byl vzniklý roztok sonikován, aby se zlepšila stabilita vytvořených nanočástic. Tento postup umožňuje efektivní obalení liposomů chitosanem a vytvoření stabilních nanočástic s ochranným obalem.

#### **4.5. Optimalizace přípravy chitosomů**

Tato část diplomové práce se zabývá optimalizací přípravy chitosomů.

##### **4.5.1. Optimalizace přípravy chitosanového roztoku**

Pro optimalizaci přípravy chitosomů byly testovány různé koncentrace chitosanu (0,5 %, 1 % a 2 %). Za tímto účelem byly připraveny roztoky kyseliny octové o koncentraci 1 %, do kterých byl následně přidán chitosan v takovém množství, aby výsledný roztok dosáhl požadované koncentrace. Do těchto roztoků byly následně přidány roztoky obsahující liposomy ve stejném množství (5 ml roztoku chitosanu a 5 ml roztoku s liposomy). Připravené nanočástice byly nejprve centrifugovány po dobu 5 minut při rychlosti 6000 ot./min. Po této první fázi centrifugace byl sediment oddělen od supernatantu, který byl následně opět centrifugován, tentokrát po dobu 60 minut při rychlosti 11 000 ot./min. Po dokončení druhé fáze centrifugace byly zcentrifugované chitosomy opět odděleny. Poté byly nanočástice 100x naředěny a byly podrobeny analýze na přístroji Zetasizer, kde byla stanovena velikost a stabilita částic.

##### **4.5.2. Optimalizace délky doby sonikace**

Optimalizace délky doby sonikace byla provedena na připravených chitosomech. Chitosomy byly podrobeny sonikaci po dobu 1 minuty a 10 minut. Cílem tohoto experimentu bylo porovnat vliv délky sonikace na velikost částic a zeta potenciál. Po sonikaci byla provedena analýza velikosti částic a zeta potenciálu pomocí přístroje Zetasizer.

##### **4.5.3. Vliv metod ultrazvukového zpracování a míchání na magnetické míchače na stabilitu a velikost částic**

Pro hodnocení vlivu metod ultrazvukového zpracování a míchání na magnetické míchače na stabilitu a velikost částic byla provedena řada experimentů. Nejprve byly připraveny vzorky obsahující nanočástice, a poté byly tyto vzorky podrobeny dvěma různým metodám zpracování. První metoda zahrnovala ultrazvukové zpracování, kdy byly vzorky vystaveny ultrazvuku po dobu stanovenou v experimentálním plánu. Druhá metoda zahrnovala míchání na magnetické míchače, kde byly vzorky míchány po určitou dobu při stanovené rychlosti a teplotě. Po provedení těchto manipulací byly vzorky analyzovány za účelem stanovení jejich stability a velikosti částic. Pro analýzu stability byly použity různé techniky, jako je například

měření zeta potenciálu, zatímco pro stanovení velikosti částic byla využita metoda dynamického rozptylu světla (DLS) nebo mikroskopie.

#### **4.5.4. Vliv filtrace na výsledné nanočástice**

Pro posouzení vlivu filtrace na výsledné nanočástice byla provedena řada experimentů. Nejprve byly připraveny vzorky obsahující nanočástice různých typů. Tyto vzorky byly poté podrobeny procesu filtrace pomocí membránových filtrů nasazených na stříkačku. Filtrace probíhala pod určitým tlakem nebo gravitačně, v závislosti na konkrétních podmínkách experimentu. Po dokončení filtrace byly vzorky analyzovány za účelem stanovení jejich vlastností a kvality. Pro analýzu byly použity různé metody, včetně měření velikosti částic, distribuce velikosti, zeta potenciálu a morfologie nanočástic. Tyto analýzy umožnily posoudit vliv filtrace na stabilitu, velikost a distribuci nanočástic v daném prostředí.

#### **4.6. Charakterizace nanočástic**

Po přípravě liposomů byla stanovena jejich enkapsulační účinnost, velikost, zeta potenciál a dlouhodobá stabilita i stabilita v modelových prostředích. Také bylo sledováno krátkodobé i dlouhodobé uvolňování enkapsulovaných látek.

##### **4.6.1. Stanovení velikosti, distribuce částic a zeta potenciálu**

Pro stanovení velikosti částic liposomů a chitosomů byla provedena sériová centrifugace následovaná měřením pomocí dynamického rozptylu světla. Nejprve byly liposomy centrifugovány po dobu 5 minut při 6 000 ot./min, což vedlo k oddělení vzniklého supernatantu. Tento supernatant byl poté opět centrifugován, tentokrát po dobu 60 minut při 11 000 ot./min. Po odstranění supernatantu byly stočené liposomy rozsuspendovány v destilované vodě a důkladně promíchány. Následně byly vzorky 100x zředěny, aby bylo dosaženo optimální koncentrace pro měření. Tímto způsobem připravené vzorky byly poté analyzovány pomocí přístroje ZetaSizer, jehož fotografie je uvedena na Obrázek 16 a který využívá dynamický rozptyl světla k určení průměrné velikosti a polydisperzity částic. Poté byl na kyvetu nasazen elektrodový nástavec a roztok byl následně proměřen. Z hodnot zeta potenciálu byla stanovena stabilita částic. Za stabilní jsou považovány částice, které dosahují hodnoty zeta potenciálu vyšší jak +30 mV a nižší jak -30 mV.



Obrázek 16: ZetaSizer

#### 4.6.2. Stanovení enkapsulační účinnosti

Pro analýzu enkapsulační účinnosti nanočástic s enkapsulovanými aktivními látkami byl použit následující postup. Připravené nanočástice byly nejprve centrifugovány po dobu 5 minut při rychlosti 6 000 ot./min. Po této první fázi centrifugace byl sediment oddělen od supernatantu, který byl následně opět centrifugován, tentokrát po dobu 60 minut při rychlosti 11 000 ot./min. Po dokončení druhé fáze centrifugace byly zcentrifugované liposomy opět odděleny a koncentrace vitamínů v supernatantech i v nanočásticích byla stanovena pomocí UV-VIS spektrofotometrie, pro lipofilní vitamíny bylo použito HPLC.

#### 4.6.3. Stanovení dlouhodobé stability

Pro ověření dlouhodobé stability liposomů byly připravené vzorky uchovány ve vodném prostředí při teplotě 8 °C po dobu jednoho měsíce. Po této době byla stanovena enkapsulační účinnost a stabilita částic. Před samotnou analýzou byl vzorek centrifugován při 11 000 ot./min po dobu 60 minut a následně byl od částic oddělen supernatant. Poté byly částice 100x naředěny. Dlouhodobá stabilita částic byla poté určena opětovným měřením hodnoty ZP za použití nástavce s elektrodou na přístroji ZetaSizer.

#### **4.6.4. Stanovení postupného uvolňování bioaktivních látek**

Pro zkoumání postupného uvolňování aktivních látek z liposomů a chitosomů byly prováděny experimenty za simulovaných podmínek teploty lidského těla, konkrétně při 37 °C, v různých modelových prostředích. Postupné uvolňování aktivních látek bylo sledováno po dobu dvou hodin. Poté bylo stanoveno množství uvolněného vitamínu do vodného prostředí. Tato metodika umožnila analyzovat tempo a rozsah uvolňování vitamínů z nanočástic do vody za podmínek simulujících tělesnou teplotu.

#### **4.6.4. Stanovení dlouhodobé stability v modelových prostředích**

Pro ověření dlouhodobé stability vybraných vitamínů byly provedeny experimenty v různých modelových prostředích. Pro hydrofilní vitamíny byly zkoumány jejich koncentrace ve třech různých modelových prostředích: ve vodě, parafínu a emulzi v/o. Koncentrace vitamínů byly měřeny pomocí spektrofotometrie na různých časových intervalech (1 hodina, 24 hodin, 96 hodin a 168 hodin). Pro stanovení koncentrace bylo využito UV-VIS spektrofotometrie.

Pro lipofilní vitamíny byly provedeny podobné experimenty jako pro hydrofilní vitamíny, s tím rozdílem, že byla použita voda, glycerol a 50% glycerol jako modelová prostředí. Koncentrace vitamínů byly měřeny na stejných časových intervalech jako u hydrofilních vitamínů. Stanovení koncentrace bylo také provedeno pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Tato metoda umožňuje sledovat orientačně změny v koncentraci vitamínů v různých prostředích a posoudit jejich stabilitu v čase.

#### **4.6.5. Posouzení stability nanočástic po lyofilizaci**

Metoda posouzení stability nanočástic po lyofilizaci začíná oddělením chitosomů od supernatantu, což je prostředí kolem částic, pomocí centrifugace při rychlosti 11 000 ot./min. Tento proces zajišťuje oddělení chitosomů od přebytečného roztoku a jiných nečistot. Po oddělení byly chitosomy podrobeny lyofilizaci, což je proces odstraňování vody z materiálu zamrznutím a sublimací, čímž se získává sušený produkt.

Po lyofilizaci byly chitosomy opětovně hydratovány a 100x naředěny, aby byly připraveny k dalším analýzám. Jako další krok bylo provedeno měření zeta potenciálu pomocí přístroje Zetasizer. Tato analýza poskytuje informace o elektrickém náboji nanočástic a jejich disperzi v roztoku. Změny ve zeta potenciálu po lyofilizaci mohou naznačovat změny ve stabilitě nanočástic a jejich tendenci ke shlukování nebo aglomeraci.



## **4.7. Příprava kosmetických přípravků**

### **4.7.1. Plet'ový krém**

V kádince byly smíchány arganový a ricinový olej v poměru 1:1 o celkovém objemu 25 ml. K tomuto olejovému mixu bylo přidáno 6 g emulsinu a 3 g cetearylalkoholu. Kádinka s touto směsí byla umístěna do vodní lázně a zahřívána na teplotu 80 °C, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění všech komponentů. Poté byla do olejové fáze za stálého míchání postupně přilévána voda o celkovém objemu 80 ml. Po ochlazení emulze na pokojovou teplotu byly do ní přidány nanočástice obsahující enkapsulované vitamíny D a E. Na závěr byl k emulzi přidán konzervant phenoxyethanol pro zachování její stability.

### **4.7.2. Hydratační gel**

Do kádinky bylo nejprve naváženo 2 g kyseliny hyaluronové a 3 g glycerolu, které byly následně doplněny 95 ml vody. Směs byla umístěna na magnetickou míchačku a míchána, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění všech složek. Poté byly do směsi přidány nanočástice s enkapsulovaným vitamínem C. Nakonec byl celý přípravek ošetřen konzervantem phenoxyethanolem.

## **4.8. Testování účinků kosmetických produktů pomocí visioskopu**

Metoda testování kosmetických produktů pomocí visioskopu, známá také jako deskvamací test, začíná přípravou kůže pro testování. Deskvamace je proces, při kterém dochází k odlupování odumřelých buněk z povrchu pokožky. Tento proces je přirozený a důležitý pro udržení zdravé pokožky, protože pomáhá odstraňovat staré a poškozené buňky a umožňuje obnovu a regeneraci pokožky. Běžně se vyskytuje jako součást fyziologického procesu obnovy pokožky, ale může být také ovlivněn různými faktory, jako je například nadměrné slunění, stárnutí nebo různé kožní onemocnění. V kosmetickém kontextu se deskvamace často zkoumá a hodnotí jako indikátor zdraví pokožky a účinnosti kosmetických produktů. Změny v deskvamaci mohou naznačovat různé kožní stavy nebo reakce na používané produkty. Nejdříve je určena testovací oblast na kůži, často na vnitřní straně předloktí, která je poté pečlivě vyčištěna a připravena k aplikaci kosmetických přípravků. Před samotným testem je provedeno měření deskvamace pokožky pomocí přístroje visioskopu, abychom získali referenční hodnotu pro porovnání. Poté jsou na vybranou oblast kůže nanášeny testované kosmetické přípravky, včetně vzorků s chitosomy a bez nich, které slouží jako kontrolní skupiny. Tyto vzorky jsou označeny jako "s chitosomy" a "bez chitosomů". Po aplikaci kosmetických přípravků je opět provedeno měření deskvamace pokožky pomocí visioskopu, aby bylo možné sledovat změny v odstranění odumřelých buněk. Naměřená data jsou poté porovnána s referenčními hodnotami a také mezi sebou, aby bylo možné vyhodnotit, zda a jak testované kosmetické přípravky ovlivnily deskvamaci pokožky. Tato analýza umožňuje posouzení účinků kosmetických přípravků na odstraňování odumřelých buněk a případné změny ve vzhledu a textuře kůže.

## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1. Optimalizace přípravy chitosomů

Optimalizace zahrnuje stanovení ideální koncentrace roztoku chitosanu, posouzení vhodnosti metody přípravy pomocí magnetické míchačky nebo ultrazvuku a určení optimální doby sonikace. Tyto faktory mají klíčový vliv na vlastnosti a stabilitu nanočástic, což je zásadní pro úspěšné využití nanočástic v různých aplikacích.

#### 5.1.1. Optimalizace přípravy chitosanového roztoku

Byly připraveny chitosomy v různých koncentracích chitosanu (0,5 %; 1 % a 2 %) dle postupu popsáno v kapitole 4.5.1. Optimalizace přípravy chitosanového roztoku V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky analýzy velikosti částic a zeta potenciálu výše uvedených chitosomů.

Tabulka 3: Hodnoty velikosti a zeta potenciálu chitosomů připravené z různých koncentrací chitosanu

	Velikost (nm)			Zeta potenciál (mV)		
	0,5 %	1,0 %	2,0 %	0,5 %	1,0 %	2,0 %
Prázdné	529,9	452,2	434,0	15,7	6,1	22,4
Vitamin C	390,7	300,0	380,2	18,0	19,0	31,8
Vitamin E	511,0	475,1	553,0	13,9	16,6	28,4

Z analýzy zeta potenciálů nanočástic vyplývá, že koncentrace chitosanu ovlivňuje velikost a povrchový náboj nanočástic. U prázdných nanočástic je pozorováno snížení velikosti s rostoucí koncentrací chitosanu, což naznačuje lepší obalení liposomů a tím i menší velikost částic. Toto snížení velikosti může být způsobeno lepším zapojením chitosanu do struktury liposomů. Co se týče zeta potenciálu, u prázdných nanočástic je pozorován nejprve pokles a poté přírůstek zeta potenciálu. Poněvadž chitosan uděluje částicím kladný povrchový náboj, lze za stabilní považovat částice s povrchovým nábojem větším než +30 mV. Této hodnoty však prázdné chitosomy nedosahují.

U nanočástic obsahujících vitamín C a E jsou již pozorovány pozitivní změny v závislosti na koncentraci chitosanu. U obou vitaminů je pozorováno zvýšení určité velikosti částic zejména u částic s 2 % chitosanu, což může být způsobeno větším množstvím chitosanu na povrchu částic. Co se týče zeta potenciálu, u obou vitaminů je pozorován postupný přírůstek jeho hodnoty, přičemž největší nárůst zeta potenciálu je pozorován u koncentrace 2 %. V případě enkapsulovaného vitamínu C jsou tyto částice již plně stabilní, u vitamínu E se významně přiblížila hodnota zeta potenciálu hranici stability. Lze říci, že přídavek chitosanu do liposomů s enkapsulovanou hydrofilní i lipofilní látkou vede jednoznačně k větší stabilitě částic.

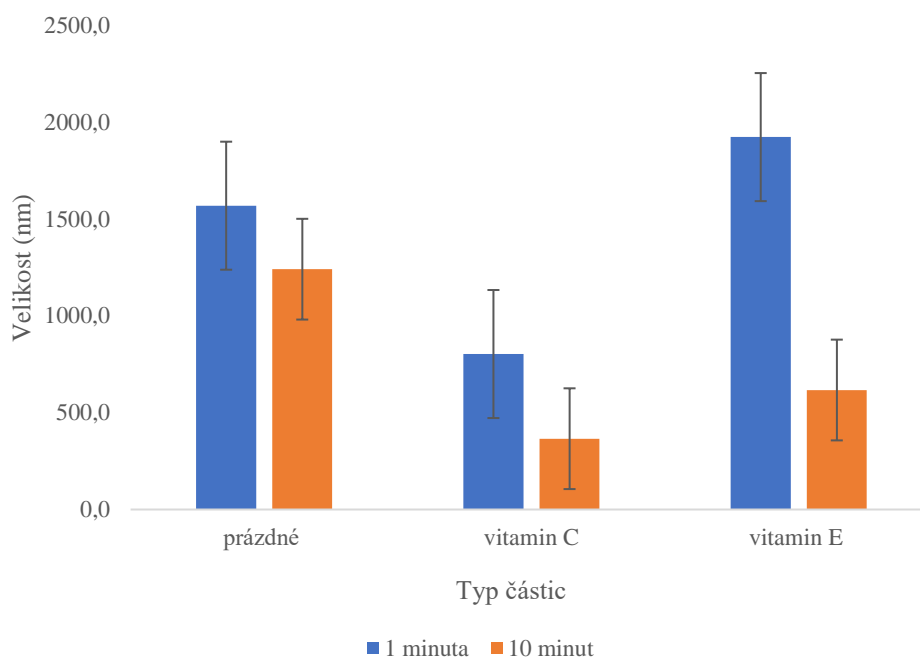
V závěru lze říci, že koncentrace 2 % chitosanu je nejvhodnější pro obalení liposomů, protože poskytuje nejstabilnější povrchový náboj. S ohledem na nízké hodnoty stability prázdných liposomů a liposomů s nižší koncentrací chitosanu lze však říci, že použitá metoda přípravy liposomů bude vyžadovat zřejmě další optimalizaci.

### 5.1.2. Optimalizace délky doby sonikace

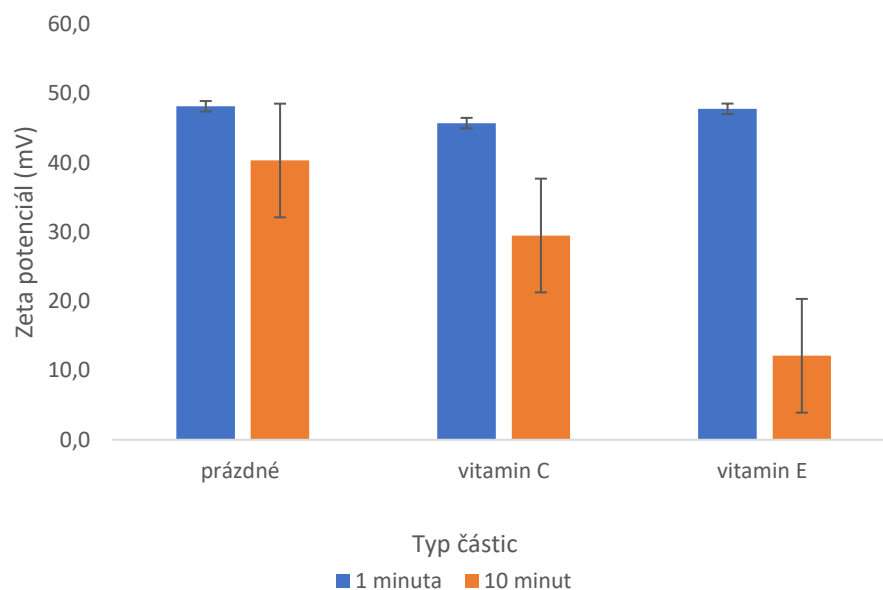
Výsledky optimalizace přípravy chitosomů pomocí ultrazvuku jsou prezentovány v grafech (obrázek 17, obrázek 18) pro velikost částic a zeta potenciál.

Z výsledků je zřejmé, že délka sonikace má významný vliv na velikost částic. U prázdných chitosomů a chitosomů s vitamínem E je pozorováno snížení velikosti částic s prodlužující se dobou sonikace. Naopak u chitosomů s vitamínem C je pozorován výrazný pokles velikosti částic již po jedné minutě sonikace, avšak další prodloužení doby na 10 minut již nedále výrazně neovlivnilo velikost částic. Zeta potenciál také vykazuje významný vliv sonikace na vlastnosti chitosomů. Dle obrázku 18 je patrné, že všechny druhy připravených liposomů s 2 % chitosanem vykazovaly dostatečnou koloidní stabilitu (vyšší než +30 mV) již po 1 minutě sonikace. Po 10 minutách sonikace došlo u všech chitosomů k poklesu zeta potenciálu, v případě částic s vitamínem E se podstatně snížila jejich stabilita.

Výsledky naznačují, že optimální doba sonikace závisí na konkrétním typu chitosomů a enkapsulovaných látkách. Je třeba brát v úvahu jak velikost částic, tak i změnu zeta potenciálu při optimalizaci procesu přípravy chitosomů. Nicméně se ukázalo, že sonikace po dobu jedné minuty je dostačující a delší doba sonikace vede ke snížení stability.



Obrázek 17: Vliv délka sonikace na velikost částic při 2 % koncentraci chitosanu



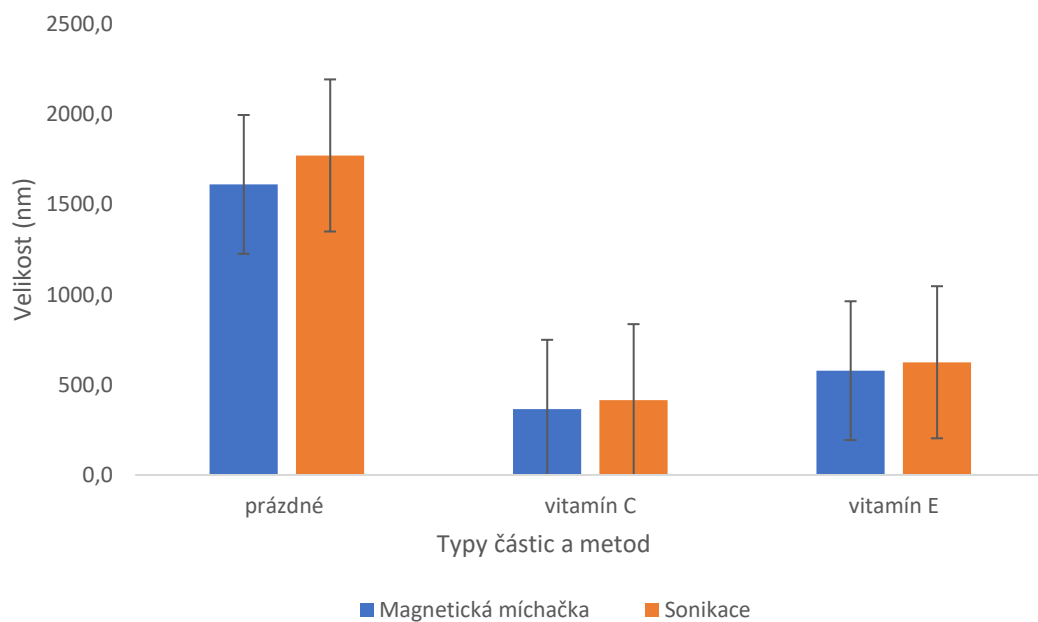
Obrázek 18: Vliv délka sonikace na zeta potenciál při 2 % koncentraci chitosanu

### 5.1.3. Vliv metod ultrazvukového zpracování a míchání na magnetické míchače na stabilitu a velikost částic

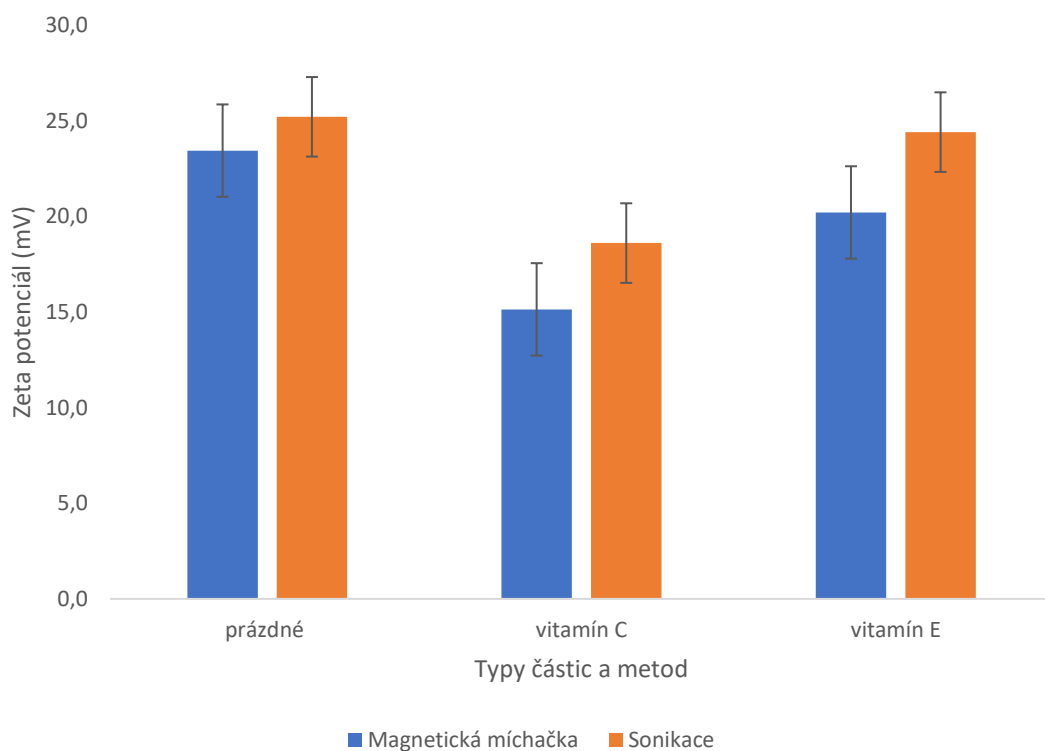
Byla také provedena optimalizace přípravy chitosomů, kdy bylo zkoumáno, jaký vliv na stabilitu a velikost částice má metoda přípravy ultrazvukem nebo na magnetické míchače. Byly použity modelové chitosomy s enkapsulovaným hydrofilním vitamínem C a lipofilním vitamínem E. Byly také vytvořeny a analyzovány prázdné chitosomy.

Z výsledků vyplývá, že metoda přípravy nanočástic má vliv na jejich stabilitu a velikost. Porovnání mezi metodami s využitím magnetické míchačky a sonikace ukazuje rozdíly v obou parametrech. U prázdných nanočástic byla zaznamenána vyšší průměrná velikost částic při použití metody sonikace než při magnetické míchače. U nanočástic obsahujících vitamín C a vitamín E byla také zjištěna o něco vyšší velikost při sonikaci ve srovnání s magnetickou míchačkou, pozorované rozdíly jsou však v rámci chyby stanovení.

Zeta potenciál je ukazatelem elektrického náboje na povrchu nanočástic a indikuje jejich stabilitu. Vyšší hodnota ZP naznačuje větší elektrostatickou odpudivou sílu mezi částicemi, což vede k větší stabilitě disperze. V případě prázdných nanočástic byl zaznamenán vyšší ZP při sonikaci než při magnetické míchače, což může naznačovat větší stabilitu částic při sonikaci. U nanočástic s vitamínem C a vitamínem E byly vyšší hodnoty ZP zjištěny při sonikaci [1][33] ve srovnání s magnetickou míchačkou, což opět naznačuje vyšší stabilitu disperze při této metodě. Lze tedy říci, že metoda sonikace může vést k menší aglomeraci a větší stabilitě nanočástic ve srovnání s magnetickou míchačkou. Celkově je však stabilita všech typů liposomů připravených v tomto experimentu nižší než v předchozím případě a nedosahuje hranice stability +30 mV.



*Obrázek 19: Porovnání velikosti nanočástic u metod přípravy magnetickou míchačkou a sonikací při 2 % koncentraci chitosanu*

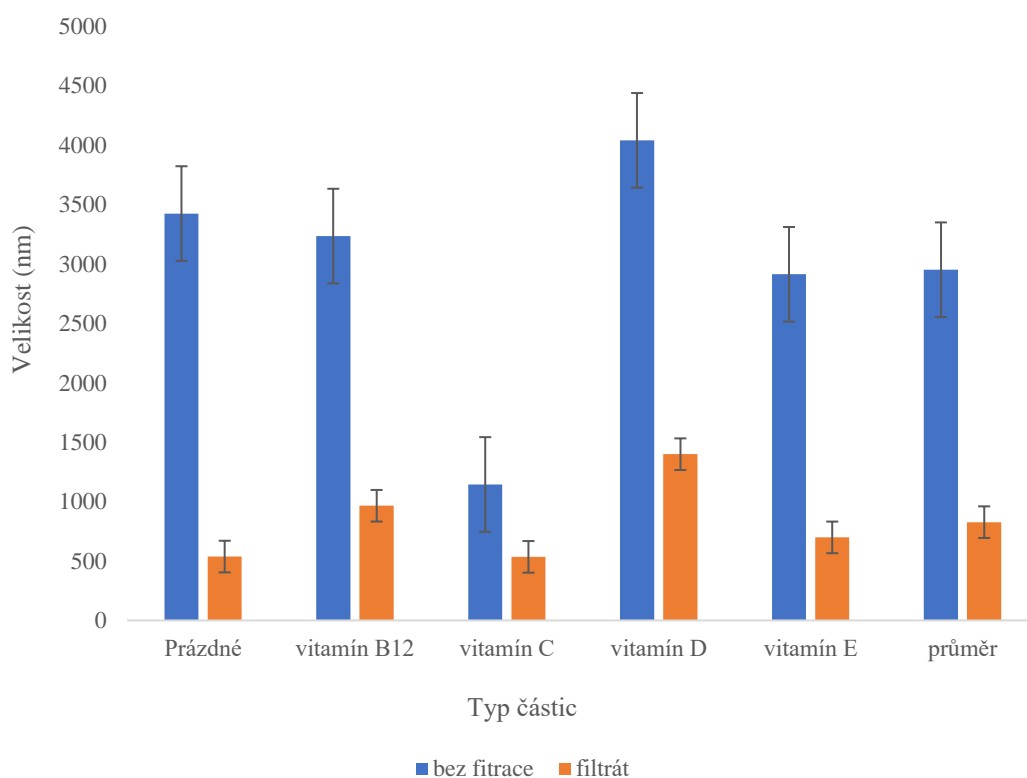


*Obrázek 20: Porovnání zeta potenciálu nanočástic u metod přípravy magnetickou míchačkou a sonikací při 2 % koncentraci chitosanu*

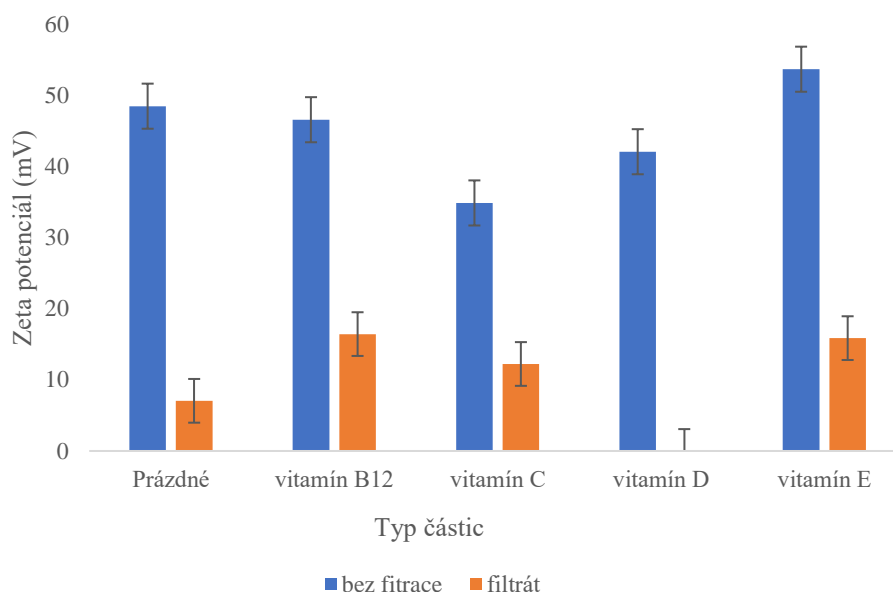
#### 5.1.4. Vliv membránové filtrace na výsledné nanočástice

Byly připraveny chitosomy dle postupu uvedený v kapitole 4.4.2. Příprava chitosomů, přičemž byly enkapsulovány vitamíny B<sub>12</sub>, C, D a E. Vliv filtrace na výsledné nanočástice byl zkoumán s ohledem na jejich velikost, polydispersitu (Pdl) a zeta potenciál (ZP). Proto představují tyto výsledky významné informace pro optimalizaci přípravy a charakterizace nanočástic. Byly použity filtry s póry o velikosti 450 nm.

Velikost částic před filtrací byla výrazně vyšší, to by mohlo svědčit o aglomeraci částic v roztoku. Po membránové filtraci došlo ke snížení velikosti částic u všech vzorků, což naznačuje, že filtrace byla účinná při odstranění větších částic. Polydispersita byla před filtrací relativně nízká, avšak po filtraci se polydispersita mírně zvýšila, což může být způsobeno selektivním odstraněním určitých částic nebo shluků. Před filtrací byl ZP u většiny vzorků poměrně vysoký, což naznačuje stabilní nábojovou povahu částic. Nicméně po filtraci došlo ke snížení zeta potenciálu u všech vzorků, to může být důsledek odstranění nábojově aktivních částic.



Obrázek 21: Vliv filtrace na výslednou velikost částic



Obrázek 22: Vliv filtrace na stabilitu částic

Filtrace může vést k narušení integrity částic, zejména pokud jsou částice velké nebo mají tendenci k agregaci. Při filtraci dochází k průchodu roztoku částicí membránou filtračního média, což může fyzikálně ovlivnit strukturu a velikost částic.

V případě, že jsou částice příliš velké nebo mají tendenci k agregaci, může dojít k mechanickému rozdrčení nebo deformaci částic během procesu filtrace. To může vést k vytvoření menších fragmentů částic nebo ke změně jejich tvaru a povrchové struktury. Důsledkem může být ztráta funkcionality částic nebo změna jejich interakcí s okolním prostředím. Například, před filtrací byly průměrné velikosti částic v rozmezí několika tisíc nanometrů, zatímco po filtraci klesly na stovky nanometrů. To naznačuje, že filtrace měla vliv na redukci velikosti částic. Tento jev může být způsoben mechanickým rozdrčením nebo deformací částic během průchodu membránou filtračního média. Vzhledem k výraznému narušení stability částic se nadále od filtrace pouští.

## 5.2. Stanovení velikosti částic a polydisperzity

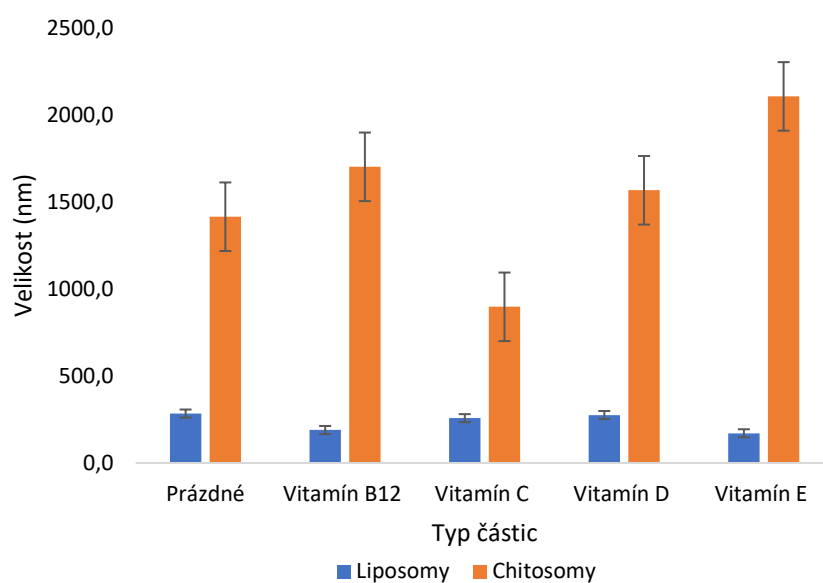
Liposomy, připravené podle popsaného postupu v kapitolách 4.4.1. Příprava liposomů a 4.4.2. Příprava chitosomů, byly analyzovány z hlediska jejich velikosti a distribuce částic. Pro charakterizaci velikosti liposomů byla použita metoda dynamického rozptylu (DLS). Liposomy byly dispergovány ve vodném roztoku a následně analyzovány. Velikostní distribuce liposomů byla vyhodnocena pomocí průměrného průměru částic ze tří měření. Tímto postupem byla zajištěna konzistentní a přesná analýza velikosti a distribuce částic, což je klíčové pro posouzení kvality a účinnosti připravených liposomů.

Data poskytují informace o průměrné velikosti liposomů a chitosomů s enkapsulovanými vitamíny B<sub>12</sub>, C, D a E. Velikost částic je klíčovým faktorem ovlivňujícím stabilitu

a biologickou aktivitu nosičů a jejich obsažených látek. Liposomy vykazují menší průměrnou velikost částic ve srovnání s chitosomy, což může být výhodné pro některé aplikace, jako je například lepší penetrace do buněk nebo tkání. Naopak chitosomy mají větší průměrnou velikost částic, to může být vhodné pro jiné aplikace, například pro dlouhodobé uvolňování. Průměrné velikosti a index polydisperzity liposomů a chitosomů (2 % chitosanu) s enkapsulovanými vitamíny jsou uvedeny v Tabulka 4 a graficky znázorněny na Obrázek 23.

Tabulka 4: Velikost částic a index polydisperzity liposomů a chitosomů s 2 % chitosanem

	Liposomy		Chitosomy	
	Velikost (nm)	PdI	Velikost (nm)	PdI
Prázdné	284,0 ± 4,8	0,263 ± 0,064	1414,3 ± 40,3	0,292 ± 0,057
Vitamín B <sub>12</sub>	189,5 ± 5,2	0,417 ± 0,020	1701,0 ± 84,4	0,136 ± 0,020
Vitamín C	257,6 ± 3,9	0,336 ± 0,006	897,0 ± 32,2	0,076 ± 0,051
Vitamín D	275,6 ± 7,4	0,353 ± 0,029	1566,3 ± 73,2	0,104 ± 0,050
Vitamín E	170,7 ± 0,8	0,135 ± 0,008	2105,3 ± 68,5	0,362 ± 0,094



Obrázek 23: Průměrná velikost liposomů a chitosomů s koncentrací chitosanu 2 %

Liposomy vykazují různé hodnoty průměrné velikosti a polydisperzity indexu (PdI) v závislosti na typu vitamínu v liposomech. Hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 4. Prázdné liposomy mají průměrnou velikost 284,0 nm s PdI 0,263, což naznačuje homogenní distribuci velikosti částic. Liposomy s vitamínem B<sub>12</sub> mají menší průměrnou velikost (189,5 nm) než prázdné liposomy, ale vyšší hodnotu PdI (0,417), což může naznačovat větší variabilitu velikosti částic. Liposomy s vitamínem C mají podobnou průměrnou velikost jako prázdné liposomy, ale nižší hodnotu PdI (0,336), což naznačuje menší variabilitu velikosti částic.



Liposomy s vitamínem D mají vyšší průměrnou velikost (275,6 nm) a s vitamínem E nižší průměrnou velikost (0,104 nm).

Chitosomy vykazují také rozdílné hodnoty průměrné velikosti a PdI. Prázdné chitosomy mají průměrnou velikost 1414 nm s PdI 0,292, což naznačuje větší rozptyl ve velikosti částic. Chitosomové částice s vitamínem B<sub>12</sub> mají větší průměrnou velikost (1701,0 nm) než prázdné chitosomy, ale nižší hodnotu PdI (0,136), což může naznačovat na menší variabilitu velikosti částic. Chitosomy s vitamínem C mají menší průměrnou velikost (897,0 nm) než prázdné, ale nižší hodnotu PdI (0,076), a může tedy vykazovat homogennější distribuci velikosti částic. Chitosomy s vitamínem D a E mají vyšší průměrnou velikost (1566,3 nm a 2105,3 nm) a vyšší hodnoty PdI (0,362) pro vitamín E, což může naznačovat na větší rozptyl ve velikosti částic, a nižší pro vitamín D (0,104).

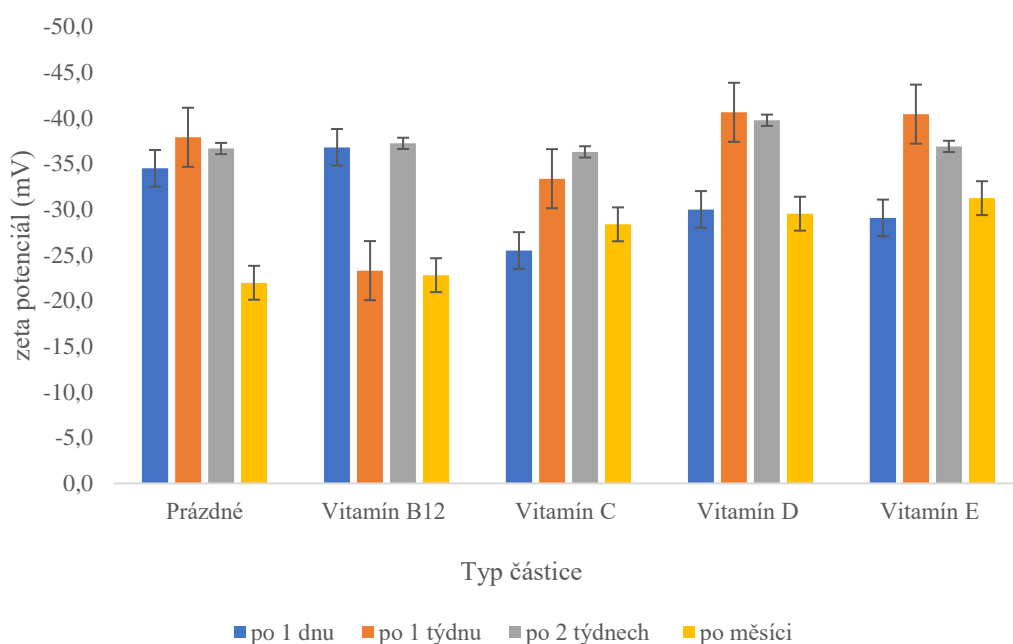
Stabilita liposomů a chitosomů je ovlivněna typem enkapsulovaného vitamínu, který může mít různý vliv na velikost a distribuci částic. Důležitým faktorem je také typ nosné látky (liposomy vs. chitosomy), který může ovlivnit stabilitu a homogenitu přípravku.

### 5.3. Posouzení dlouhodobé stability liposomů

Posouzení dlouhodobé stability liposomů (bez chitosanu) je klíčové pro zajištění účinnosti a spolehlivosti těchto nosičů látek. Jedním z důležitých faktorů, který ovlivňuje stabilitu liposomů, je zeta potenciál, který poskytuje informace o náboji a povrchovém potenciálu částic. Měření zeta potenciálu v průběhu času umožňuje sledovat změny ve stabilizaci liposomů a posoudit jejich dlouhodobou stabilitu.

Během této části experimentálního výzkumu byly liposomy podrobeny pravidelným měřením zeta potenciálu v časovém horizontu jednoho měsíce. Tímto způsobem bylo možné sledovat, jak se mění elektrický náboj a povrchový potenciál liposomů v průběhu času. Získaná data umožnila posoudit stabilitu liposomů a identifikovat případné změny, které by mohly ovlivnit jejich kvalitu a účinnost jako nosičů látek.

Z výsledků dlouhodobé stability liposomů pomocí měření zeta potenciálu v průběhu jednoho měsíce, lze pozorovat následující změny (obrázek 24). Prázdné liposomy vykazují snížení zeta potenciálu z -34,5 mV na -22,0 mV po jednom měsíci, což naznačuje mírnou změnu v jejich elektrickém náboji a stabilitě. Liposomy s enkapsulovaným vitamínem B<sub>12</sub> ukazují změny zeta potenciálu od -36,8 mV na -22,8 mV po jednom měsíci. To v obou případech naznačuje mírnou destabilizaci částic. Liposomy s vitamínem C vykazují změny zeta potenciálu od -25,5 mV na -28,4 mV po jednom měsíci, což naznačuje mírné zvýšení stability nanočástic. Liposomy s vitamínem D a E vykazují minimální změny v čase. Lze tedy usuzovat, že liposomy s enkapsulovanými lipofilními vitamíny jsou v čase více stabilní. Liposomy s kyselinou hyaluronovou (HA) vykazují stabilnější chování s menšími změnami zeta potenciálu během jednoho měsíce. Lze tedy shrnout, že liposomy vykazují určitou míru destabilizace během jednoho měsíce, což může být způsobeno různými faktory, jako je interakce s okolním prostředím nebo degradace složek v liposomech.



Obrázek 24: Hodnoty zeta potenciálu liposomů bez chitosanu v průběhu jednoho měsíce

## 5.4. Stanovení enkapsulační účinnosti

Stanovení enkapsulační účinnosti, prováděné jak ze supernatantu, tak z nanočástic, je klíčovým krokem při vývoji nanočásticových systémů pro nosiče léčivých látek či jiných bioaktivních složek. Tato metoda umožňuje kvantifikovat procentuální podíl účinné látky, která byla úspěšně enkapsulována do nosiče, jako jsou liposomy nebo chitosomy. Přesné stanovení enkapsulační účinnosti je důležité pro optimalizaci procesů výroby a pro zajištění konzistence vlastností nanočástic. Metody zahrnují spektrofotometrii a HPLC, poskytující přesné kvantitativní hodnoty enkapsulace.

### 5.4.1. Stanovení enkapsulační účinnosti ze supernatantu pomocí UV-VIS

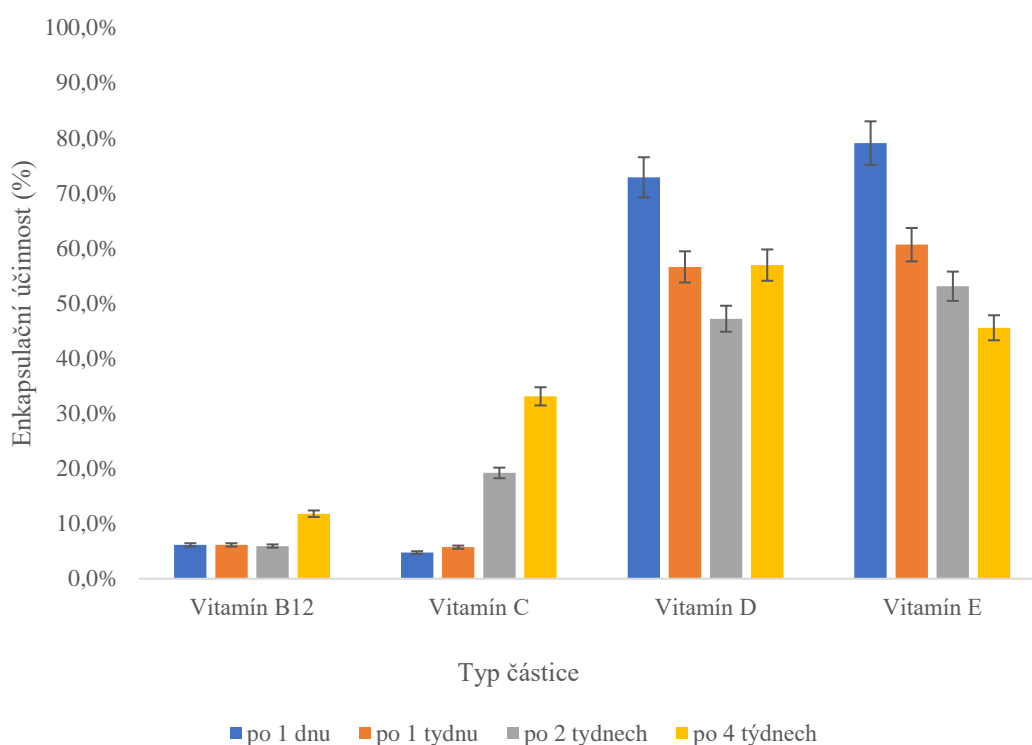
Enkapsulační účinnost (EU) liposomů byla stanovena na základě koncentrace bioaktivní látky uvolněné do supernatantu. Nejprve byl měřen celkový obsah neenkapsulované látky pomocí UV-VIS spektrofotometrie, což umožnilo získat informaci o celkovém množství látky, která nebyla obsažena uvnitř liposomů.

Následně byla zjištěna koncentrace enkapsulované látky v nanočásticích pomocí stejného analytického přístroje. Rozdíl mezi celkovým množstvím látky a množstvím neenkapsulované látky poskytl hodnotu enkapsulační účinnosti. Enkapsulační účinnost byla vypočítána jako procentuální rozdíl mezi koncentrací vitamínů před a po enkapsulaci. Tento postup umožnil kvantifikaci procentuálního podílu látky, která byla úspěšně enkapsulována do liposomálních nosičů.

Data ze spektrofotometrie ukazují enkapsulační účinnost vitamínů B<sub>12</sub>, C, D a E měřenou ze supernatantu po různých časových intervalech. Enkapsulační účinnost byla stanovena nejprve pro samotné liposomy a poté pro liposomy i chitosomy (s obsahem chitosan 2 %). Data pro stabilitu enkapsulovaných látek v liposomech jsou uvedena na Obrázek 24.

Enkapsulační účinnost vitamínu B<sub>12</sub> se zdá být relativně stabilní během čtyř týdnů, s mírným nárůstem z 6 % na 12 %. Enkapsulační účinnost vitamínu C zpočátku vzrostla z 5 % na 19 % během prvních dvou týdnů a nadále stoupla na 33 % po čtyřech týdnech. Zdá se, že nárůst enkapsulační účinnosti vitamínu B<sub>12</sub> a C během skladování není způsoben probíhající enkapsulací. Spíše je pravděpodobné, že dochází k degradaci vitamínů v roztoku mimo částice. Proto se při přepočtu zvyšuje enkapsulační účinnost v liposomech.

U vitamínů D a E je patrná opačná tendence, kde enkapsulační účinnost je nejprve po přípravě na relativně vysokých hodnotách, 72,8 % pro vitamín D a 79,1 % pro vitamín E. Poté však hodnoty postupně klesají až na hodnoty 56,9 % pro vitamín D a 45,5 % pro vitamín E, kde je pokles enkapsulační účinnosti ještě markantnější. Tato situace naznačuje, že proces enkapsulace těchto vitamínů do liposomů či chitosomů je efektivní v prvních fázích, ale s časem může docházet k jejich postupné degradaci nebo úniku z nanočástic, což vede ke snížení enkapsulační účinnosti. Enkapsulační účinnost vitamínů B<sub>12</sub>, C, D a E se mění s časem, přičemž některé částice s enkapsulovanými vitamíny jsou stabilnější než jiné. To může být důležité při plánování dlouhodobého použití těchto enkapsulovaných vitamínů v různých aplikacích.



Obrázek 25: Enkapsulační účinnost liposomů s enkapsulovanými vitamíny

### 5.4.2. Stanovení enkapsulační účinnosti z liposomů pomocí UV-VIS spektrofotometrie

Získaná data poskytují informace o enkapsulační účinnosti vitamínů D a E uvolněných z nanočástic připravených dle kapitoly 4.4.2. Příprava chitosomů Je zajímavé pozorovat rozdíly v enkapsulační účinnosti mezi supernatantem a samotnými nanočásticemi. U vitamínů D a E je enkapsulační účinnost vyšší při analýze supernatantu než při použití samotných částic. To může být zapříčiněno degradací liposomů během zpracování před analýzou, delší dobou skladování v mrazáku či během procesu lyofilizace.

*Tabulka 5: Enkapsulační účinnost stanovená z liposomů, pro srovnání i ze supernatantu ihned po přípravě*

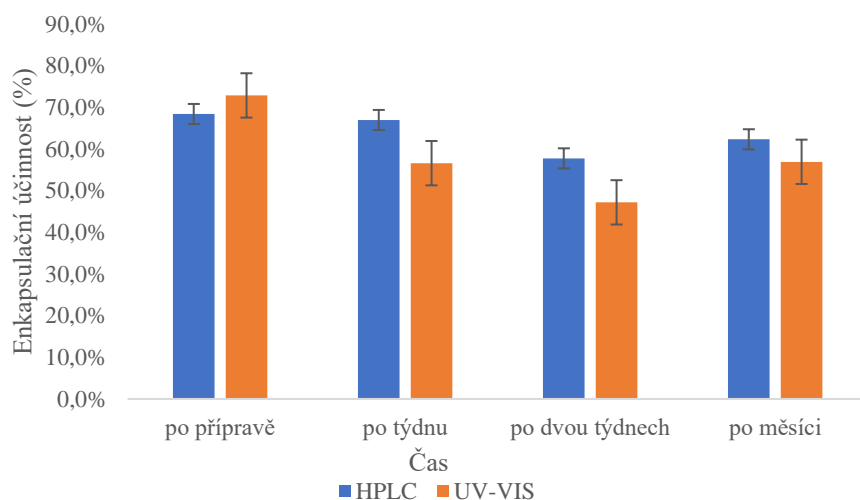
	částice	supernatant
vitamín D	8,9 %	72,0 %
vitamín E	11,7 %	79,1 %

Tato data jsou důležitá pro hodnocení účinnosti a stability připravených nanočástic, což může být klíčové pro vývoj kosmetických nebo farmaceutických produktů. Různé enkapsulační účinnosti mohou vést k různým účinkům při aplikaci těchto produktů na pokožku nebo do těla.

### 5.4.3. Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí metody HPLC

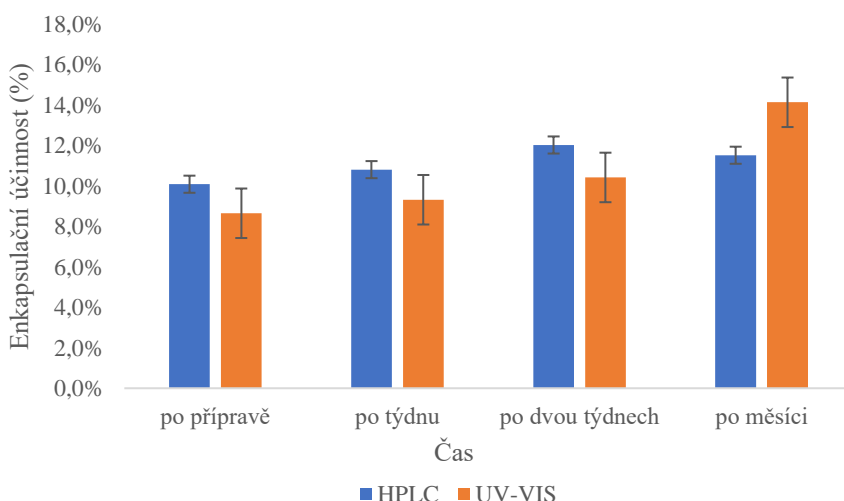
V této části byla provedena analýza enkapsulační účinnosti ze supernatantu i liposomů připravených dle postupu uvedeném v kapitole 4.4.1. Příprava liposomů s enkapsulovanými vitamíny D a E pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Pro stanovení enkapsulační účinnosti ze supernatantu byly vzorky centrifugovány za účelem oddělení supernatantu od liposomů. Vzorky byly skladovány v lednici za nepřístupu světla po dobu jednoho měsíce, přičemž bylo provedeno měření po přípravě, po jednom týdnu, po dvou týdnech a po jednom měsíci. Částice i supernatanty byly lyofilizovány a poté rozpuštěny v roztoku ethylacetátu a acetonitrilu. Následně byl obsah enkapsulovaných látek analyzován pomocí HPLC.

Výsledky enkapsulační účinnosti vitamínu D ve supernatantu (obrázek 26) ukazují, že po přípravě byla enkapsulační účinnost poměrně vysoká a podobná pro obě metody stanovení (HPLC: 68,4 %, UV-VIS: 72,8 %). Nicméně, během skladování došlo k poklesu enkapsulační účinnosti u obou metod. Tento pokles mohl být způsoben různými faktory, jako je degradace částic nebo uvolňování vitamínu D ze supernatantu. Je tedy důležité provádět další studie k identifikaci příčin tohoto poklesu a případně optimalizovat proces enkapsulace vitamínu D pro zajištění dlouhodobé stability a účinnosti produktu.



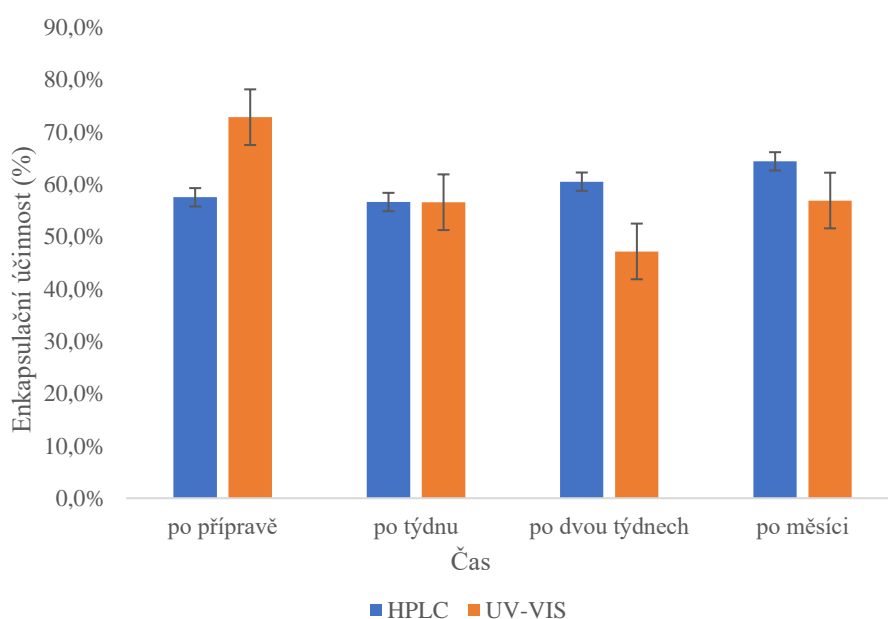
Obrázek 26: Porovnání výsledků enkapsulační účinnosti liposomů metodou HPLC a UV-VIS ze supernatantu pro vitamín D

Výsledky enkapsulační účinnosti vitamínu D z částic (obrázek 27) po přípravě ukazují, že obě metody stanovení (HPLC: 10,1 %, UV-VIS: 8,6 %) poskytly podobné výsledky. Během skladování došlo k mírnému zvýšení enkapsulační účinnosti u obou metod, přičemž v druhém týdnu a měsíci byla enkapsulační účinnost vyšší než po přípravě. Tento nárůst může naznačovat další enkapsulaci vitamínu D do částic během skladování. Nicméně, je důležité poznamenat, že výsledky mezi metodami HPLC a UV-VIS se mírně lišily. To může být způsobeno různými vlastnostmi metod a je třeba provést další zkoumání pro ověření přesnosti a spolehlivosti obou metod. HPLC poskytuje přesnější a spolehlivější výsledky než UV-VIS spektrofotometrie, avšak obě metody naznačují podobný trend klesající enkapsulační účinnosti vitamínu D s časem.



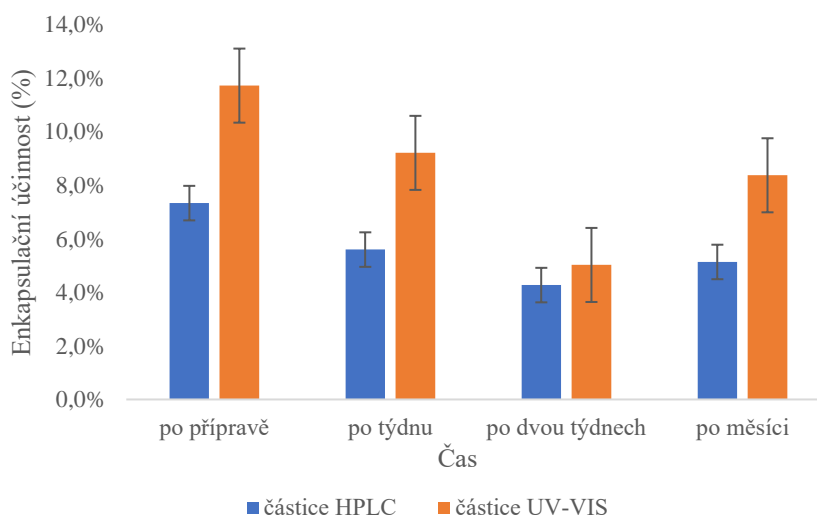
Obrázek 27: Porovnání výsledků enkapsulační účinnosti liposomů pro vitamín D metodou HPLC a UV-VIS z liposomů

Vyhodnocení dat pro vitamín E stanoven ze supernatantu (obrázek 28) naznačuje, že hodnota jeho enkapsulační účinnosti se liší v závislosti na použité metodě stanovení a časovém průběhu. Po přípravě byla enkapsulační účinnost vyšší při použití metody UV-VIS (72,8 %) než HPLC (57,5 %). Nicméně, v průběhu skladování došlo k poklesu enkapsulační účinnosti, což je pozorovatelné u obou metod. Zatímco metoda UV-VIS vykazuje nejvyšší enkapsulační účinnost po přípravě, během skladování došlo k většímu poklesu v porovnání s metodou HPLC. Tento pokles by mohl být způsoben různými faktory, jako je degradace liposomů nebo uvolňování vitamínu E z částic. Je tedy důležité brát v úvahu tyto faktory při plánování a optimalizaci procesů přípravy a skladování nanočástic obsahujících vitamín E.



*Obrázek 28: Porovnání výsledků enkapsulační účinnosti liposomů pro vitamín E metodou HPLC a UV-VIS ze supernatantu*

Výsledky enkapsulační účinnosti vitamínu E stanovené z liposomálních částic (obrázek 29) naznačují, že tento vitamín je účinně enkapsulován do částic. Po přípravě byla enkapsulační účinnost vyšší při použití metody UV-VIS (11,7 %) ve srovnání s metodou HPLC (7,3 %). Nicméně, během skladování došlo k poklesu enkapsulační účinnosti u obou metod. U obou metod byl pozorován podobný trend poklesu enkapsulační účinnosti vitamínu E po dobu skladování, což by mohl být způsoben různými faktory, jako je degradace částic nebo uvolňování vitamínu E z nich. Je tedy důležité monitorovat a řídit tyto faktory při vývoji a skladování produktů obsahujících nanočástice s enkapsulovaným vitamínem E.



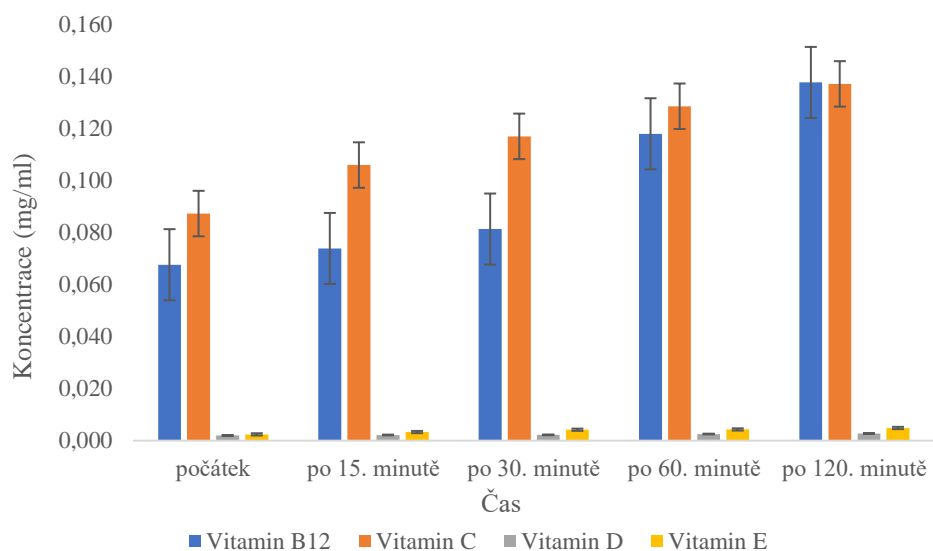
Obrázek 29: Porovnání výsledků enkapsulační účinnosti liposomů pro vitamín E metodou HPLC a UV-VIS z liposomů

Rozdíly mezi hodnotami enkapsulační účinnosti stanovenými pomocí HPLC a UV-VIS mohou mít několik příčin. HPLC a UV-VIS spektrofotometrie jsou založeny na odlišných principech. HPLC je založena na separaci látek a detekci jejich absorbance, zatímco UV-VIS spektrofotometrie měří absorbanci světla přímo v roztoku. Rozdílné vlastnosti látek mohou způsobit rozdílné odezvy těchto metod, přičemž jako citlivější metodu poskytující spolehlivější, a hlavně selektivní výsledky je třeba považovat HPLC. Také mohly nastat chyby při přípravě vzorků, jako je nedostatečné homogenizace, kontaminace nebo ztráta vzorku, mohou ovlivnit výsledky. Chyby při provádění samotné analýzy, jako je chybná kalibrace přístrojů, nepřesná manipulace s vzorky nebo nepřesnost měření, mohou vést k rozdílným výsledkům.

### 5.5. Stanovení krátkodobého uvolňování v modelových podmínkách

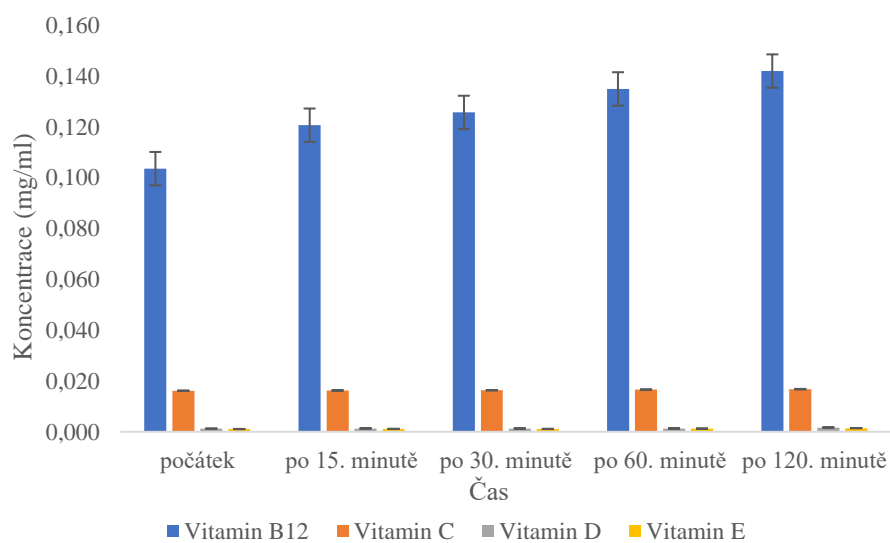
Krátkodobé uvolňování vitamínů z liposomů a chitosomů bylo sledováno v časových intervalech 15 minut, 30 minut, 60 minut a 120 minut, tedy celkově po dobu dvou hodin za simulovaných podmínek teploty lidského těla, tedy při 37 °C ve vodném prostředí.

U liposomů bylo pozorováno rychlé uvolňování zejména u hydrofilních vitamínů B<sub>12</sub> a C během prvních 15 až 30 minut (obrázek 30). To může naznačovat, že hydrofilní vitaminy se snáze uvolňují z membránových struktur, mohou i zčásti destabilizovat strukturu membrány a liposomy tak mohou být citlivější i na vnější vlivy, což vede k rychlejší degradaci a následnému uvolnění vitamínů. Uvolňování lipofilních vitamínů D a E bylo pomalejší, což může být důsledkem jejich pevnější vazby v liposomech. To je zřejmě důsledek jejich lipofilního charakteru, tudíž uvolňování lipofilních vitamínů do vodného prostředí je zanedbatelné. To by mohlo znamenat, že tyto liposomy jsou stabilnější a méně náchylné k degradaci v čase.



Obrázek 30: Krátkodobé uvolňování enkapsulovaných vitamínů z liposomů

U chitosomů bylo celkové uvolňování vitamínů nižší než u liposomů, což může být důsledkem jejich odlišné struktury a vlastností (obrázek 31). V experimentu byly testovány chitosomy s obsahem 2 % chitosanu. Chitosomy mají obvykle hustší strukturu než liposomy, a to může ovlivnit jejich schopnost uvolňovat obsažené látky. Pomalejší uvolňování hydrofilních vitamínů B<sub>12</sub> a C z chitosomů naznačuje, že tyto částice jsou méně citlivé na vnější faktory než liposomy a enkapsulované látky nemají negativní vliv na stabilitu a strukturu membránových částic. Vyšší stabilita je patrná zejména u enkapsulovaného vitamínu C v chitosomech. To může být výhodné pro dlouhodobé uvolňování aktivních látek v případě potřeby udržení konstantního účinku. U vitamínů D a E je opět uvolňování pomalejší, ale zde není tak výrazný rozdíl mezi liposomy a chitosomy.



Obrázek 31: Krátkodobé uvolňování enkapsulovaných vitamínů z chitosomů s obsahem chitosanu 2%

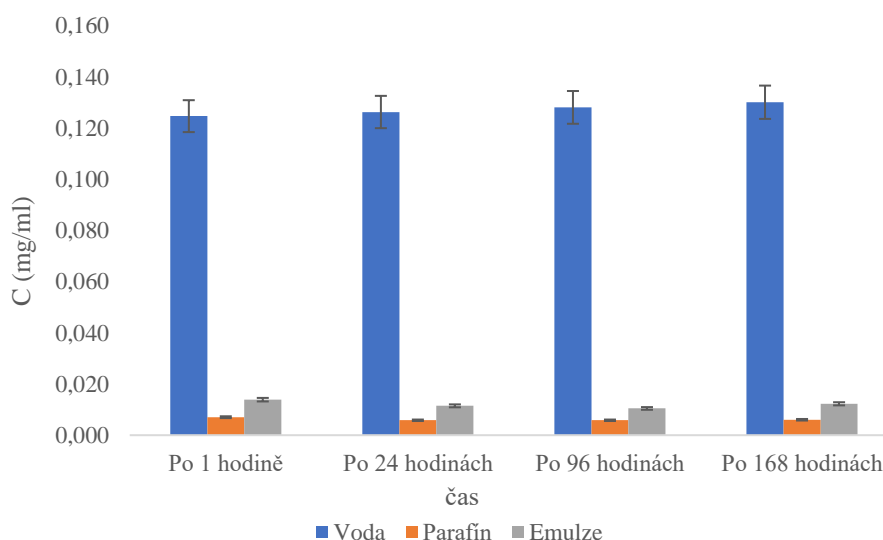


Lze tedy konstatovat, že liposomy mají tendenci rychleji uvolňovat obsažené látky, což může být vhodné pro rychlé účinky nebo aplikace vyžadující okamžité uvolnění. Na druhou stranu jsou chitosomy stabilnější a méně náchylné k degradaci, což je vhodné pro dlouhodobé aplikace, protrahované uvolňování nebo udržení stabilní úrovně účinných látek v organismu.

## 5.6. Stanovení dlouhodobé stability částic v modelových prostředích

V následující části experimentů bylo sledováno postupné uvolňování vitamínů z chitosomů (s obsahem chitosanu 2 %) do různých prostředí předpokládaných v kosmetických nebo potravinářských výrobcích, a to po dobu 1 týdne (7 dnů). Pro hydrofilní vitamíny byla testována prostředí voda, parafín a emulze, pro lipofilní vitamíny se jednalo o vodu, glycerol a 50 % glycerol.

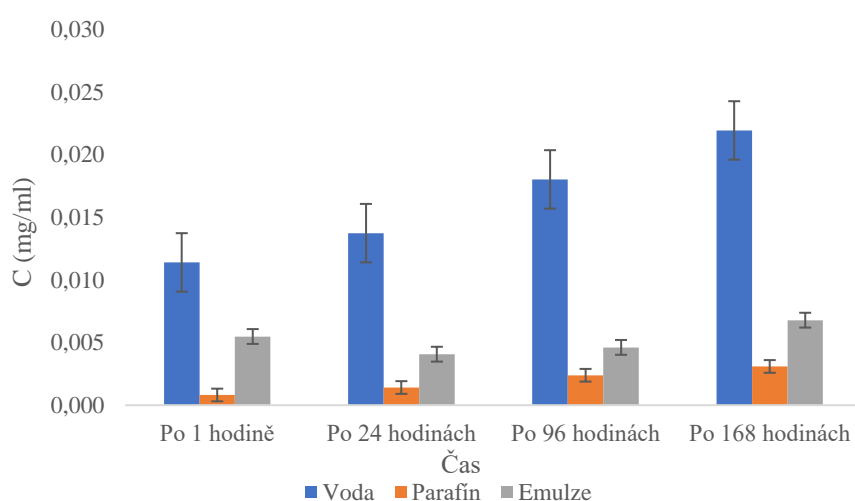
Z výsledků (obrázek 32) je patrné postupné uvolňování vitamínu B<sub>12</sub> do různých prostředí (voda, parafín, emulze) v průběhu času. Koncentrace vitamínu B<sub>12</sub> ve vodném prostředí se postupně nepatrně zvyšuje v průběhu času, což naznačuje uvolňování vitamínu z chitosomů do vodného prostředí. Tento nárůst je poměrně stabilní až do 96 hodin, kdy je pozorován o něco výraznější nárůst. Po 168 hodinách se koncentrace vitamínu B<sub>12</sub> stabilizuje na hodnotě 0,130 mg/ml, což může indikovat ustálení procesu uvolňování. V parafínovém prostředí je koncentrace vitamínu B<sub>12</sub> nižší než ve vodě, což naznačuje nižší míru uvolňování do olejového prostředí. Celkově se koncentrace vitamínu B<sub>12</sub> v průběhu času změnila jen minimálně, což naznačuje pomalé uvolňování do parafínu. V emulzním prostředí je pozorován podobný trend jako v parafínu, s nižšími koncentracemi vitamínu B<sub>12</sub> ve srovnání s vodou. Koncentrace vitamínu B<sub>12</sub> v emulzi je stabilní po celou dobu experimentu, což naznačuje poměrně nízkou míru uvolňování do tohoto prostředí.



Obrázek 32: Uvolňování vitamínu B<sub>12</sub> z chitosomů do modelových prostředí

Z výsledků uvolňování vitamínu C do různých prostředí v průběhu času (obrázek 33) lze pozorovat rozdílné chování v různých prostředí. Koncentrace vitamínu C ve vodném prostředí se postupně zvyšuje v průběhu času. Nejvyšší koncentrace je pozorována po 168 hodinách, což naznačuje pokračující uvolňování vitamínu C i po delší době.

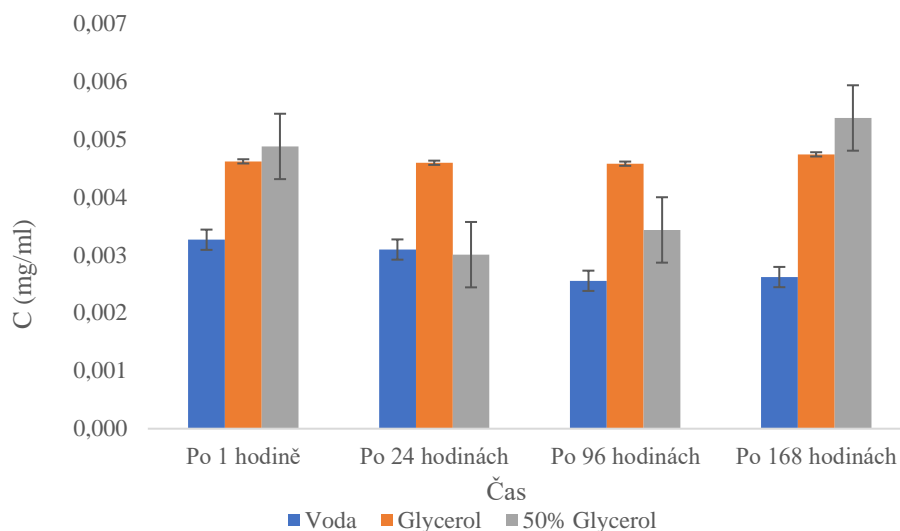
Koncentrace vitamínu C v parafínu jsou nižší ve srovnání s vodou a stabilizují se na relativně nízkých hodnotách. Postupné zvyšování koncentrace v průběhu času ukazuje na pomalejší proces uvolňování do parafínu. Podobně jako v parafínu, i v emulzi se koncentrace vitamínu C zvyšuje v průběhu času, ale stabilizuje se na nižší úrovni než ve vodě. Nejvyšší koncentrace je zaznamenána po 168 hodinách. Tyto výsledky naznačují, že vitamín C má schopnost postupně uvolňovat do různých prostředí s různými rychlostmi, což je důležité pro jeho využití v kosmetice a potravinářství.



Obrázek 33: Uvolňování vitamínu C do modelových prostředí

Uvolňování vitamínu D do různých prostředí v průběhu času bylo v modelových prostředích velmi podobné (obrázek 34). Ve vodném prostředí koncentrace vitamínu D zůstává relativně stabilní po celou dobu sledování, což naznačuje minimální nebo žádné uvolňování do vodného prostředí. Vitamín D se ve vodném prostředí nerozpouští, a je v něm stabilizován.

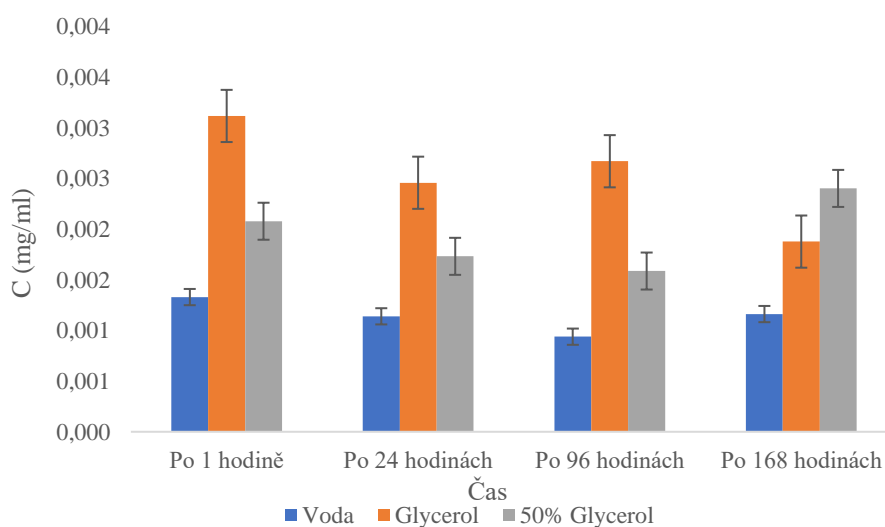
Podobně jako ve vodě, i v glycerolu zůstává koncentrace vitamínu D stabilní po celou dobu sledování. To naznačuje, že ani v glycerolu nedochází k významnému uvolňování vitamínu D. Koncentrace vitamínu D se mírně zvyšuje počáteční fázi, ale poté se stabilizuje na relativně konstantní úrovni. To naznačuje, že uvolňování vitamínu D do 50 % glycerolu je minimální nebo žádné. Výsledky naznačují, že chitosomy obsahující vitamín D jsou stabilní v testovaných prostředích a neprojevuje se významné uvolňování do vody nebo glycerolu. Tato pozorování jsou důležitá pro plánování využití vitamínu D v kosmetických nebo potravinářských produktech.



Obrázek 34: Uvolňování vitamínu D z chitosomů do modelových prostředí

Koncentrace vitamínu E zůstává stabilní po celou dobu sledování, což naznačuje minimální nebo žádné uvolňování do vodného prostředí (obrázek 35). Vitamín E není ve vodě rozpustný a je stabilizován v daném prostředí. Podobně jako ve vodě, i v glycerolu zůstává koncentrace vitamínu E relativně stabilní po celou dobu sledování. To naznačuje, že ani v glycerolu nedochází k významnému uvolňování vitamínu E. Koncentrace vitamínu E se také udržuje stabilní po celou dobu sledování v 50 % glycerolu, kdy nejsou pozorovány významné změny koncentrace vitamínu E, což naznačuje jeho minimální nebo žádné uvolňování.

Výsledky naznačují, že vitamín E je stabilní v testovaných prostředích a neprojevuje významné uvolňování do vody nebo glycerolu. Tato pozorování jsou důležitá pro plánování využití vitamínu E v kosmetických nebo potravinářských produktech.



Obrázek 35: Uvolňování vitamínu E z chitosomů do modelových prostředí

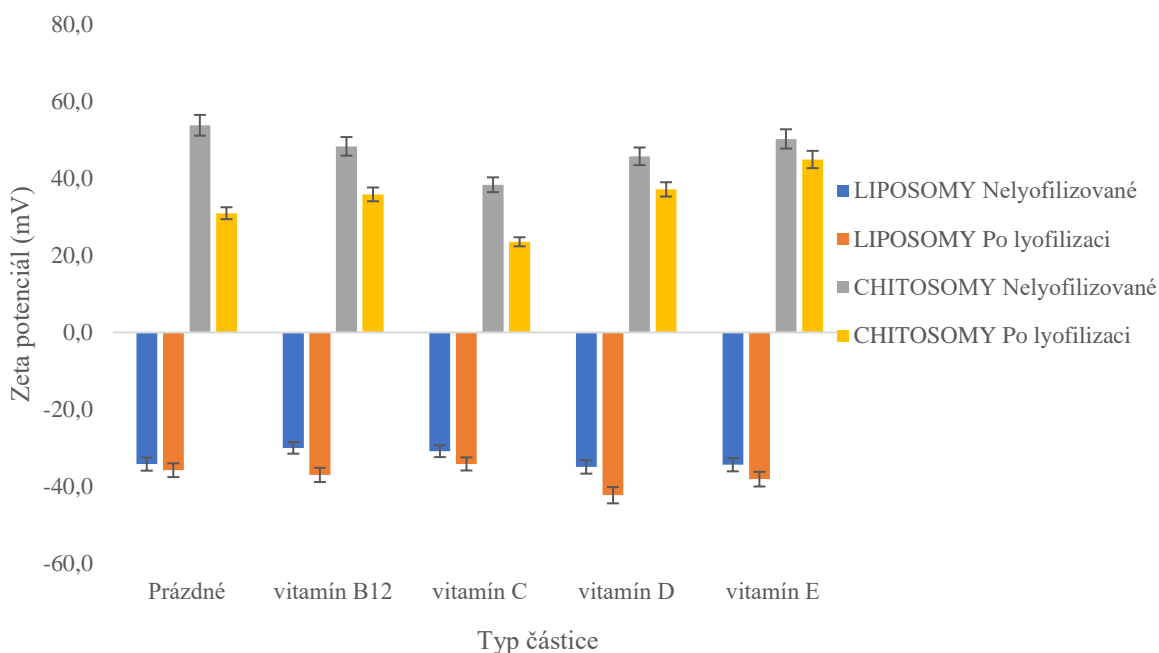
Rychlost a míra uvolňování vitamínů B<sub>12</sub>, C, D a E z chitosomů do různých prostředí se může lišit v závislosti na chemických vlastnostech těchto látek a jejich interakci s chitosanem a může být ovlivněno mnoha faktory, jako je například lipofilní nebo hydrofilní charakter prostředí. Je třeba zdůraznit, že minimální uvolňování enkapsulované složky může být v některých situacích spíše nežádoucí, je třeba důsledně zvážit, v jaké prostředí se budou částice vyskytovat, jaký má být jejich účinek a podle toho navrhnout materiál, z něhož budou částice připraveny.

## 5.7. Posouzení stability připravených liposomů a chitosomů po lyofilizaci

Data uvedená na obrázku 36 poskytují informace o zeta potenciálu nelyofilizovaných a lyofilizovaných liposomů a chitosomů s enkapsulovanými vitamíny B<sub>12</sub>, C, D a E. Zeta potenciál je měřením elektrického náboje částic a může poskytnout informace o jejich stabilitě.

Pro liposomy (zeta-potenciál má zápornou hodnotu) je vidět, že lyofilizace nijak výrazně zeta potenciál neovlivňuje, obě hodnoty jsou nižší než -30 mV, lze tedy v obou případech liposomy považovat za stabilní, jak nelyofilizované a lyofilizované nanočástice. Naopak chitosomy vykazují výraznější snížení zeta potenciálu, avšak i v tomto případě lze částice ještě považovat za stabilní. Nicméně lze konstatovat, že po lyofilizaci liposomů došlo k mírnému zvýšení stability částic.

Z toho plyne, že chitosomů dochází po lyofilizaci ke snížení stability, což je důležitý faktor pro jejich použití jako nosičů pro enkapsulaci vitamínů. Tyto výsledky mohou mít významný dopad na optimalizaci procesu výroby a výběr vhodného nosiče pro dané aplikace.



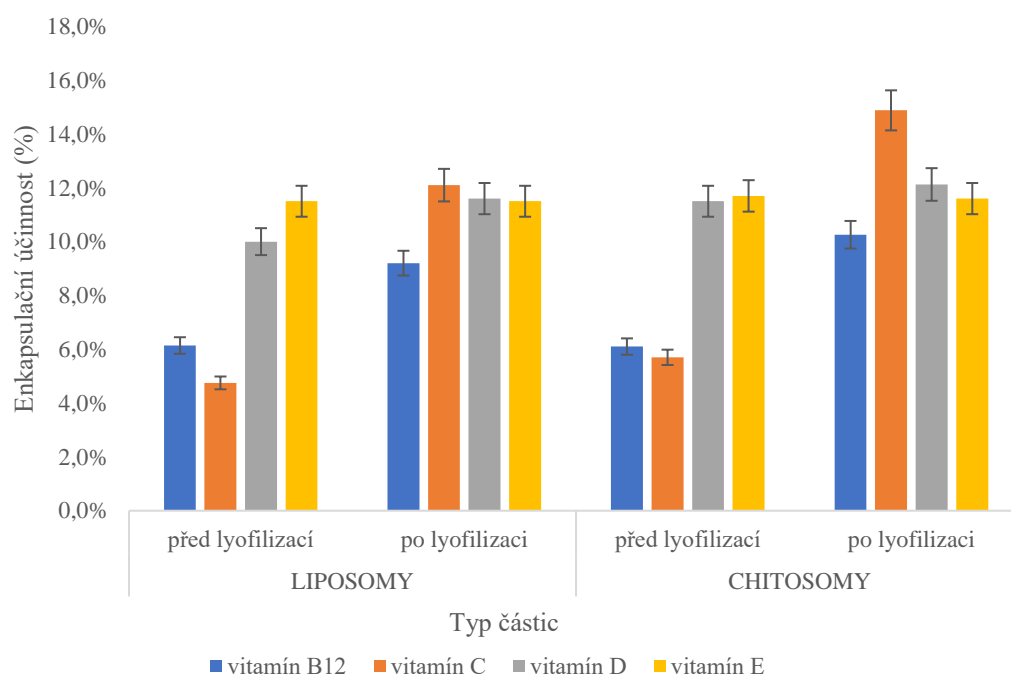
Obrázek 36: Vliv lyofilizace na stabilitu jednotlivých nanočástic s enkapsulovanými vitamíny

Výsledky naznačují, že mohlo dojít ke zvýšení enkapsulační účinnosti nanočástic, avšak lyofilizace by neměla mít na enkapsulační účinnost tak zásadní vliv jako na stabilitu částic. Ve všech případech s výjimkou vitamínu E, který vykazuje mírný pokles, výsledky ukazují mírný nárůst enkapsulační účinnosti. Tento jev naznačuje, že proces lyofilizace může mít pozitivní dopad na zachování enkapsulovaných vitamínů, což je klíčové pro stabilitu a účinnost potravinových doplňků.

Nejvýraznější nárůst enkapsulační účinnosti byl zaznamenán u vitamínu C, který se zvýšil ze 5,7 % před lyofilizací na 14,9 % po lyofilizaci (obrázek 37). To naznačuje, že lyofilizace může být účinnou metodou pro zvýšení enkapsulační účinnosti vitamínu C a tím i jeho stability v potravinových doplňcích. Vitamín B<sub>12</sub> také prokázal významný nárůst enkapsulační účinnosti po lyofilizaci, což naznačuje, že tato metoda může být účinná i pro ochranu citlivých látek jako je vitamín B<sub>12</sub>.

I když byl u vitamínu E zaznamenán mírný pokles enkapsulační účinnosti, celková změna je minimální a stále se pohybuje v relativně vysokém rozmezí. To naznačuje, že i přes tento pokles může být lyofilizace stále účinnou metodou pro zachování stability vitamínu E v potravinových doplňcích.

Lyofilizace představuje slibnou metodu pro zvýšení stability vitamínů v potravinových doplňcích, což může přispět k vyšší kvalitě a účinnosti enkapsulovaných preparátů.



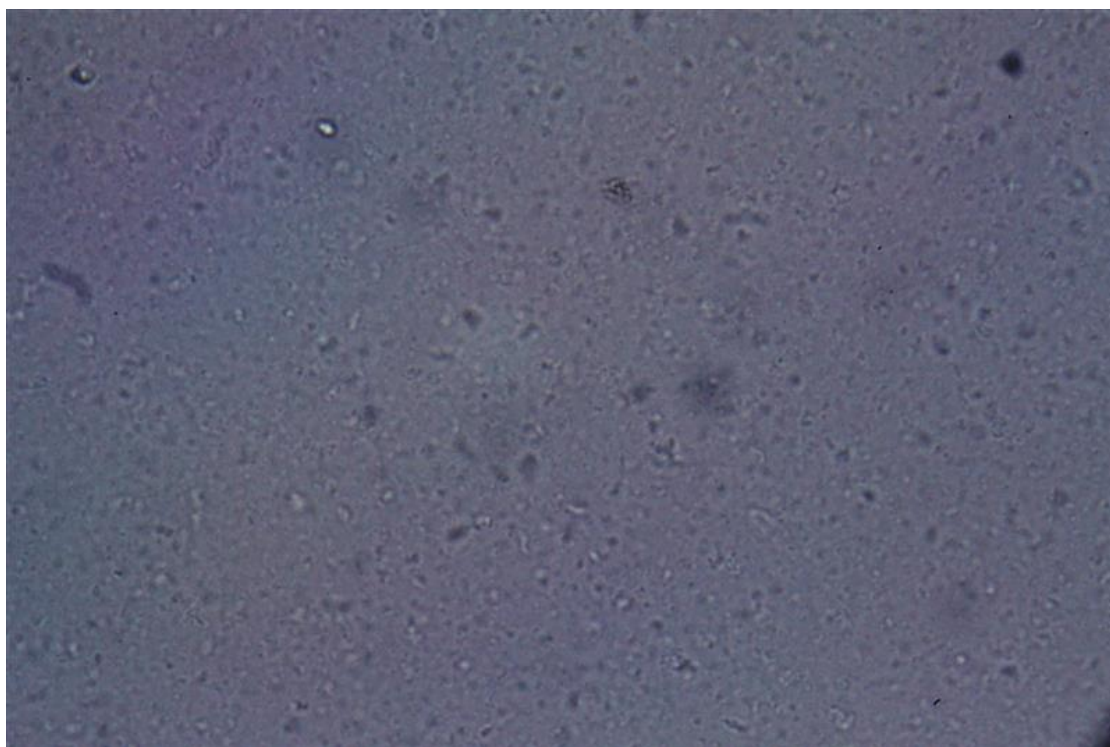
Obrázek 37: Enkapsulační účinnost nanočástic před a po lyofilizaci

## 5.8. Vizualizace nanočástic pomocí světelné mikroskopie

Vizualizace částic pod světelným mikroskopem umožňuje zkoumat jejich morfologii, velikost a distribuci. Při zvětšení 1000x jsou nanočástice relativně dobře viditelné a umožňují detailní pozorování.

Světelný mikroskop umožňuje určit velikost částic a jejich tvar, což je důležité pro pochopení jejich vlastností a chování. Distribuce částic ve vzorku může být pozorována též, což poskytuje informace o jejich homogenitě nebo heterogenitě. Pokud jsou částice interaktivní, světelný mikroskop může ukázat, jak se vzájemně ovlivňují nebo jak se organizují v prostoru. Mikroskop může odhalit přítomnost kontaminace nebo aglomerace částic, což může ovlivnit výsledky experimentu nebo vlastnosti materiálu. Při vizualizaci částic pod světelným mikroskopem je důležité dbát na optimální osvětlení a ostrost obrazu, aby byly získány spolehlivé výsledky. Chitosanové nanočástice jsou zobrazeny na Obrázek 38.

Doplnění možnosti optimalizace pomocí lepších mikroskopů, jako jsou transmisní elektronový mikroskop (TEM) a skenovací elektronový mikroskop (SEM), je významné. Tyto pokročilé mikroskopické techniky umožňují ještě detailnější zkoumání nanočástic. TEM poskytuje podrobné informace o vnitřní struktuře částic a umožňuje zobrazení na atomární úrovni. Na druhou stranu SEM umožňuje získání povrchových informací o částicích a jejich topografii. Díky těmto pokročilým metodám lze lépe porozumět struktuře a vlastnostem nanočástic, což je klíčové pro další vývoj a optimalizaci nanomateriálů pro různé aplikace.



Obrázek 38: Připravené částice snímky z optického mikroskopu (zvětšeno 1000x)

## 5.9. Návrh a výroba kosmetických produktů a jejich posouzení

Byly připraveny dva kosmetické produkty: hydratační gel a pleťový krém, oba obohacené o patřičné nanočástice. Pro kosmetické účely byly vybrány chitosomové nanočástice s enkapsulovanými vitamíny C, D a E. V obou případech byly také vyrobeny varianty přípravku bez přidání enkapsulovaných bioaktivních látek.

Lehký gel na vodní bázi (Obrázek 39) byl připraven podle postupu 4.7.2. Hydratační gel. Gel obsahuje nanočástice s enkapsulovanými lipofilními vitamíny D a E. Vitamíny D a E byly do gelu na vodní bázi zvoleny pro svůj lipofilní charakter, jelikož částice tyto vitamíny uvolňují do vodního prostředí jen velmi málo. Kromě toho gel obsahuje 2% kyseliny hyaluronové, která slouží jako síťovací činidlo, a glycerol jako humektant, který přispívá k hydrataci pokožky.



Obrázek 39: Vyrobený hydratační gel bez chitosomů (vlevo) a s chitosomy (vpravo)

Krém byl připraven podle postupu uvedeného v kapitole uvedeného 4.7.1. Pleťový krém. Krém (Obrázek 40) obsahuje směs arganového a ricinového oleje s celkovým obsahem 25 %. Tento krém je obohacen nanočásticemi s enkapsulovaným vitamínem C, který má antioxidantní vlastnosti. Vitamin C byl do krémové emulze zvolen kvůli malému uvolňování do olejové fáze. Kromě toho obsahuje krém 6 % emulsinu a 3 % cetearylalkoholu, které slouží jako emulgátory a zajišťují stabilní konzistenci krému. Oba přípravky jsou konzervovány phenoxyethanolem, aby se zabránilo růstu mikroorganismů a prodloužila se trvanlivost produktů.



Obrázek 40: Vyrobený pleťový krém bez chitosomů (vlevo) a s chitosomy (vpravo)

### 5.9.1. Visioskopie

V experimentální části této práce je visioskopie využita k posouzení účinnosti kosmetických přípravků prostřednictvím vyhodnocení deskvamace, což je proces odlupování odumřelých buněk povrchové vrstvy kůže. Visioskopická analýza umožňuje důkladné zkoumání povrchu kůže a hodnocení jejího stavu před a po aplikaci kosmetických produktů. Tato metoda poskytuje detailní informace o změnách stavu pokožky, včetně snížení deskvamace, které naznačuje zlepšení hydratace a obnovy povrchové vrstvy kůže. V této části byla visioskopie využita k objektivnímu vyhodnocení účinnosti kosmetických přípravků obsahujících různé aktivní látky a jejich vlivu na stav pokožky. Hodnoty deskvamace kůže, udávány v bezrozměrných jednotkách, byly stanoveny z předloktí jednoho dobrovolníka (muž). Hodnoty deskvamace obou přípravků jsou uvedeny v Tabulka 6.

Tabulka 6: Hodnoty deskvamace pokožky na předloktí jednoho dobrovolníka před a po použití kosmetických výrobků

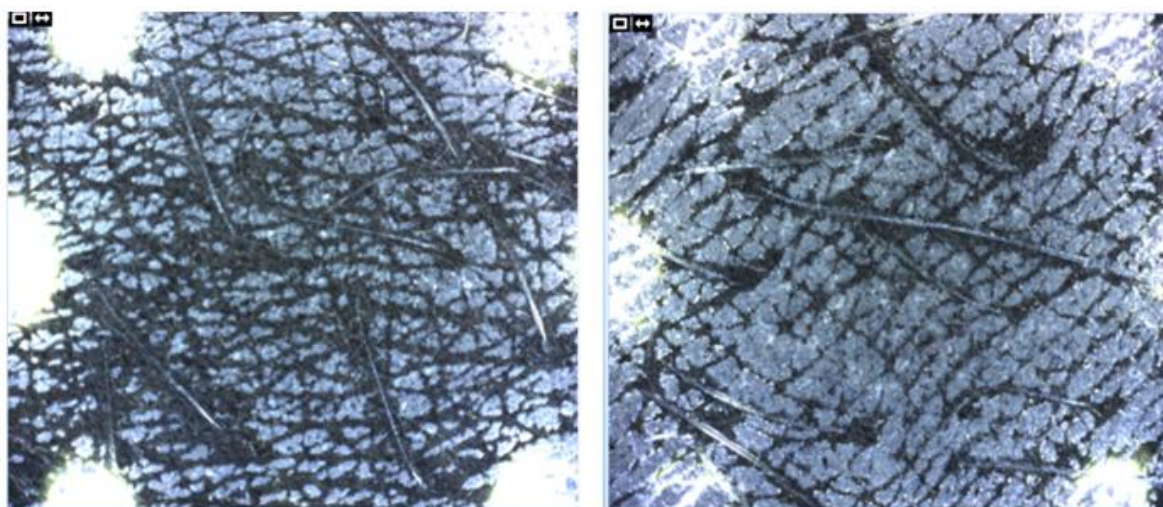
	Hodnoty deskvamace (-)	
	před použitím	po použití
Krém (blank)	55,38	52,48
Krém s částicemi C	77,04	27,26
Gel (blank)	71,08	65,86
Gel s částicemi D a E	71,71	44,41

#### 5.9.1.1. Pleťový krém

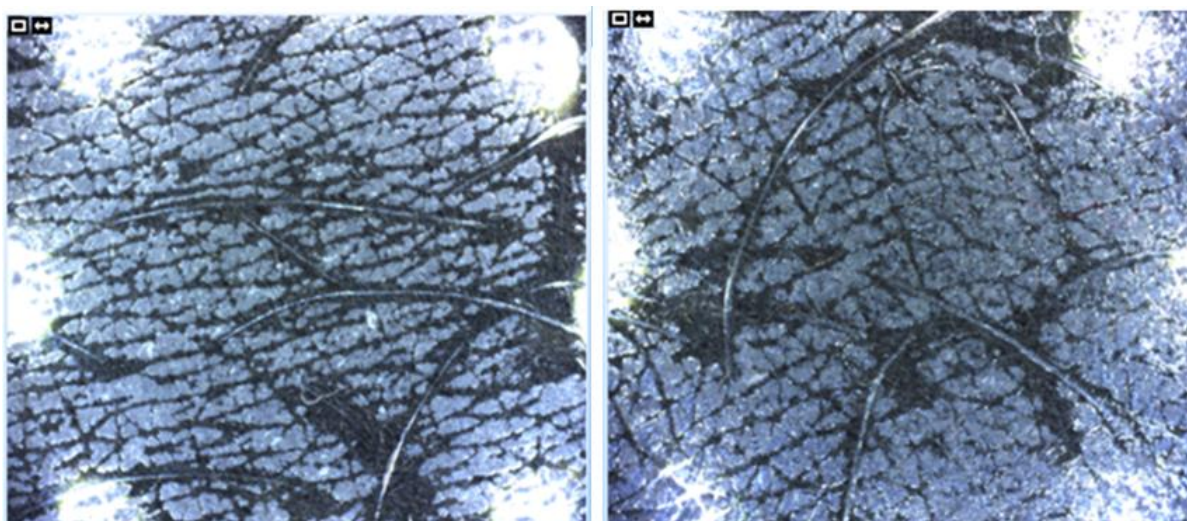
Před použitím krému deskvamace na povrchu kůže jednoho dobrovolníka dosahovala vyšších hodnot. Hodnota před použitím byla 77,04, což naznačuje potenciální problém se suchou pokožkou. Po aplikaci krému došlo ke znatelnému snížení deskvamace na 27,26, což je značný pokles. To naznačuje, že krém s vitamínem C může mít hydratační efekt a pomáhat při obnově pokožky.

Vyhodnocení deskvamace z fotografií před a po použití kosmetických přípravků lze provést porovnáním stavu pokožky na základě vizuální analýzy. Deskvamace je proces odlupování mrtvých kožních buněk povrchu pokožky a může být způsobena různými faktory, včetně chemických složek kosmetických přípravků. Na Obrázek 43 je vyobrazena pokožka předloktí, přičemž vlevo je na fotografii před použitím kosmetických přípravků zachycena pokožka ve svém přirozeném stavu. Na pravé straně fotografie je zachycena pokožka po aplikaci krému, kde je patrná vysoká míra deskvamace. Na fotografii vpravo je vyobrazena pokožka po použití krému bez obohacení chitosomy. Ve vidět jisté zlepšení, ovšem ne až tak výrazné. Na Obrázek 41 je vyobrazena pokožka před použitím krému (vlevo) a po použití krému s obsahem chitosomů s enkapsulovaným vitamínem C. Po použití tohoto přípravku je zlepšení pokožky patrnější ve srovnání s pokožkou bez použití krému, ale také ve srovnání po použití krému bez chitosomů.





*Obrázek 41: Zobrazení deskvamace pokožky na předloktí u jednoho dobrovolníka před a po použití krému bez částic*



*Obrázek 42: Zobrazení deskvamace pokožky na předloktí u jednoho dobrovolníka před a po použití krému obsahujícího částice s vitamínem C*

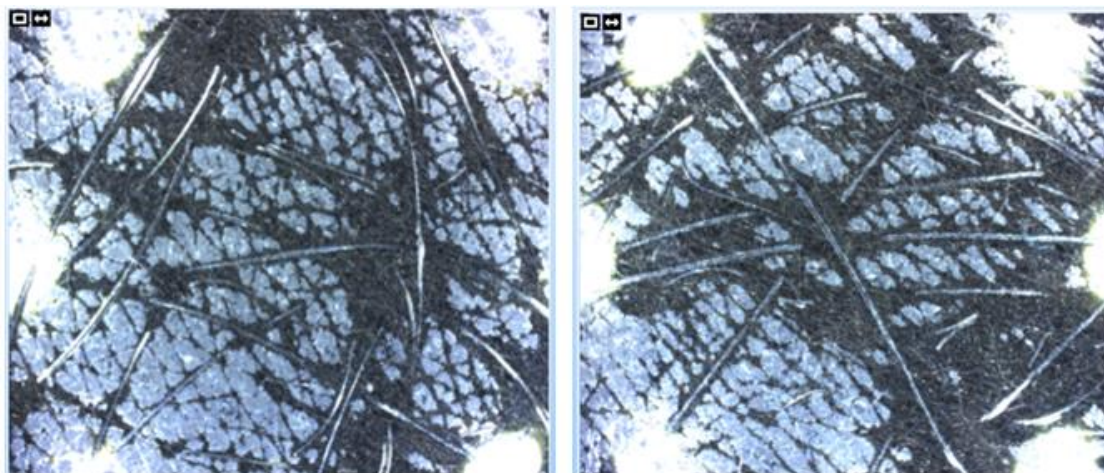
Krém s enkapsulovaným vitamínem C by mohl být účinným kosmetickým produktem pro lidi se sklonem k pigmentačním nerovnováhám, jako jsou pigmentové skvrny, jizvy po akné, jemné vrásky. Vitamín C má vlastnosti, které podporují rovnoměrnou pigmentaci a snižují tvorbu pigmentových skvrn a působí jako antioxidant. Celkově by krém s enkapsulovaným vitamínem C mohl poskytnout širokou škálu výhod pro různé typy pleti, a to od ochrany před poškozením volnými radikály až po zlepšení tónu a textury pleti. Je však důležité, aby každý jednotlivec zvážil své individuální potřeby a případně konzultoval s dermatologem, zda je použití takového produktu pro ně vhodné.

### 5.9.1.2. *Hydratační gel*

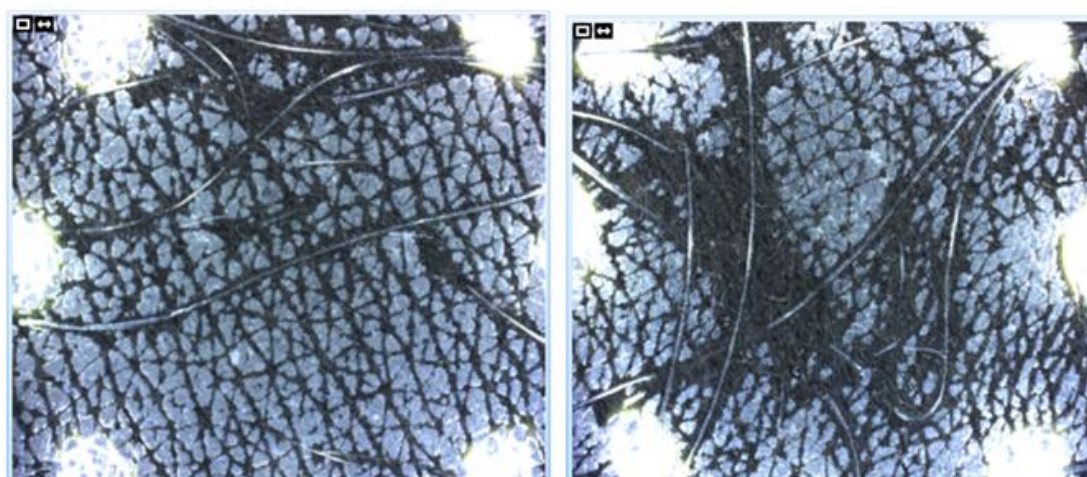
Deskvamace před použitím gelu byla poměrně vysoká (71,71) značící určitou míru suchosti kůže. Po aplikaci gelu došlo k poklesu deskvamace na 44,41, což je také značný pokles. To ukazuje, že gel s vitamíny D a E mohl také přispět k hydrataci a redukci suchosti kůže.

Na Obrázek 43 je zachycena pokožka po použití gelu bez obohacení o chitosomy (vpravo) a pro srovnání i pokožka ve svém přirozeném stavu před použitím gelu. Ze snímku je patrné, že přesto, že došlo ke nějakému zlepšení pokožky, avšak ne k nijak zásadnímu.

Stav pokožky po použití gelu s obsahem chitosomů s enkapsulovanými vitamíny D a E je zachycen na Obrázek 44 (vpravo) a pro srovnání pokožka bez použití přípravku (vlevo). Z tohoto snímku vyplývá, že po použití gelu s obsahem chitosomů vedlo k výraznějšímu zlepšení stavu pokožky.



Obrázek 43: Zobrazení deskvamace pokožky na předloktí u jednoho dobrovolníka před a použití gelu bez částic



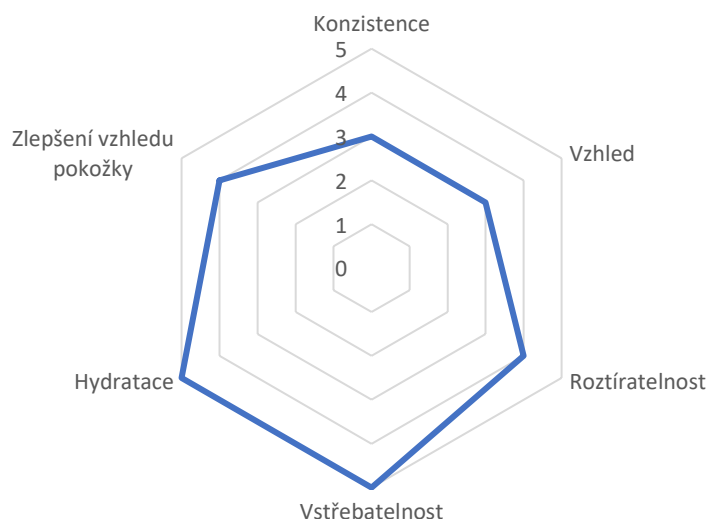
Obrázek 44: Zobrazení deskvamace pokožky na předloktí u jednoho dobrovolníka před a po použití gelu obsahujícího částice s vitamíny D a E

Hydratační gel s kyselinou hyaluronovou a enkapsulovanými vitamíny D a E mohl být prospěšný pro různé typy pleti, zejména pro ty s potřebou intenzivní hydratace, ochrany a omlazení. Je však důležité vzít v úvahu individuální potřeby pokožky a případně konzultovat s dermatologem před použitím takového produktu. Pravidelné používání gelu s kyselinou hyaluronovou a vitamíny D a E by mohlo pomoci vyhladit jemné linky a vrásky a dodat pleti mladistvý vzhled. Na snímcích z visioskopu je patrné zlepšení pleti.

Oba produkty mají potenciál k hydrataci a regeneraci pokožky, ale krém s vitamínem C možná poskytuje rychlejší a výraznější účinek. Gel s vitamíny D a E se také ukázal jako účinný, zejména pokud jde o snižování míry sucha nebo šupinatosti kůže, ale jeho účinky mohou být mírně opožděné nebo méně výrazné ve srovnání s krémem s vitamínem C.

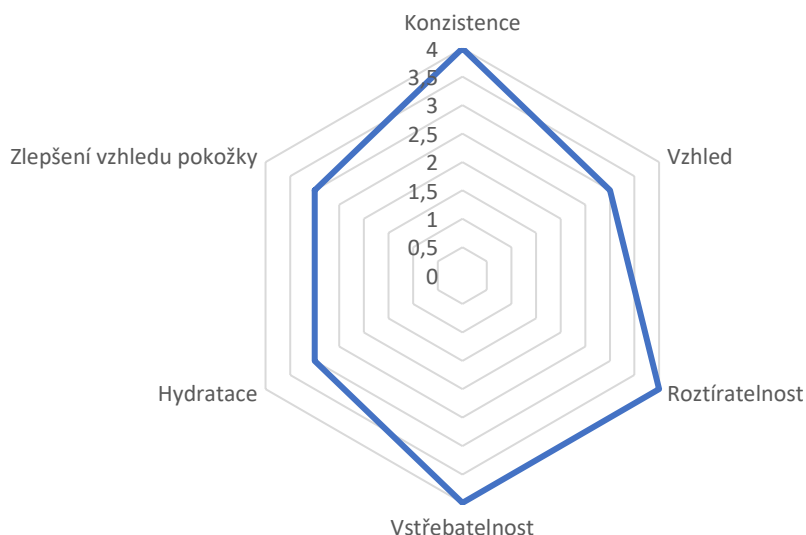
### 5.9.2. Senzorická analýza

Byla provedena také senzorická analýza dvou výše diskutovaných kosmetických produktů na pěti testovacích subjektech. Tato analýza je klíčová pro posouzení celkové kvality a přijatelnosti produktů, a to zejména z hlediska jejich vůně, textury, barvy, a dalších faktorů, které mohou ovlivnit uživatelský zážitek. Cílem je získat ucelený pohled na celkové vnímání a preference uživatelů vůči daným produktům a poskytnout zpětnou vazbu, která může být důležitá pro další vývoj a zlepšení produktů. Výsledky orientační senzorické analýzy kosmetických produktů poskytly sice předběžné, ale velmi důležité informace o jejich vlastnostech a použitelnosti z pohledu uživatelů, konkrétně souboru 5 žen ve věku 40 až 60 let. Výrobek byl bodován od 1 do 5, přičemž 5 je nejvyšší. K vyhodnocení byly použity síťové grafy, do nichž byly zaneseny průměrné hodnoty parametrů získaných u jedinců testovacího souboru.



Obrázek 45: Graf senzorické analýzy hydratačního gelu

Hydratační gel (Obrázek 45) byl hodnocen jako málo hustý s lehkým vzhledem. Respondenti také poznamenali jeho rychlou vstřebatelnost a silnou hydrataci, což přispělo k okamžitému zlepšení vzhledu pokožky. Tento produkt byl celkově hodnocen jako významně příznivý, přičemž průměrná hodnota celkového hodnocení bylo 4.



Obrázek 46: Graf senzoričké analýzy pleťového krému

Na druhé straně, pleťový krém byl vnímán jako optimálně hustý s lehkým vzhledem a vhodnou rozpustností (Obrázek 46). Jeho vstřebatelnost byla považována za optimální, ale hydratace byla hodnocena jako průměrná. Okamžité zlepšení vzhledu po použití bylo označeno jako průměrné. Průměrná hodnota z celkového hodnocení byla 3,5.

V závěru senzoričké analýzy lze říci, že hydratační gel vykazoval větší potenciál k poskytnutí výraznější hydratace a okamžitého zlepšení vzhledu než pleťový krém. Tyto informace mohou být pro výrobce kosmetických produktů cenné při optimalizaci složení a vlastností svých výrobků.

## 5.10. Návrh využití nanočástic v potravinářství

Návrh využití nanočástic s enkapsulovanými vitamíny B<sub>12</sub>, C, D a E v potravinářství představuje inovativní přístup k obohacování potravinových produktů o prospěšné látky. Tato technologie může být aplikována v různých oblastech.

Výroba funkčních potravin, obohacených o vitamíny B<sub>12</sub>, C, D a E ve formě enkapsulovaných nanočástic, by mohly poskytnout zvýšený výživový přínos a podpořit zdraví konzumentů. Nanočásticemi s enkapsulovaným vitamínem B<sub>12</sub> mohou být obohacovány potraviny jako jsou cereálie, mléčné výrobky nebo rostlinné alternativy masa, aby se zvýšil obsah tohoto důležitého vitamínu v potravinách, zejména pro skupiny vegetariánů a veganů, kteří mají tendenci k nedostatku tohoto vitamínu. Potraviny, jako jsou mléčné výrobky, cereálie nebo džusy, mohou být obohaceny o nanočástice s enkapsulovaným vitamínem D, což pomáhá

zlepšit vstřebatelnost tohoto vitamínu a poskytuje spotřebitelům lepší zdroj pro zdravé kosti a imunitní funkce. Vitamín C a E jsou důležité antioxidanty, které přispívají k ochraně buněk před oxidativním stresem a podporují zdraví imunitního systému. Jejich přítomnost ve formě enkapsulovaných nanočástic může posílit výživovou hodnotu potravin a zvýšit jejich prospěšné účinky na zdraví spotřebitelů. Využití tak otevírá nové možnosti pro vývoj potravin s vyšší výživovou hodnotou a prospěšnými účinky pro lidské zdraví. Tyto enkapsulované formy vitamínu C a E mohou být aplikovány na různé potravinářské výrobky, jako jsou cereálie, pečivo, nápoje, mléčné výrobky a další.

Výroba doplňků stravy ve formě kapslí, tablet nebo prášků obsahujících vitamíny B<sub>12</sub>, C, D a E je efektivním způsobem, jak zajistit dodávku těchto živin v případech nedostatečného příjmu potravin nebo při zvýšené potřebě v určitých obdobích. Výroba potravinových doplňků s enkapsulovanými vitamíny zahrnuje proces lyofilizace částic, tedy odstraňování vody z materiálu za nízkých teplot a nízkého tlaku, který je často využíván k zachování stability a prodloužení trvanlivosti biologicky aktivních látek, jako jsou vitamíny. V naší studii jsme prováděli posouzení stability částic po lyofilizaci, abychom zjistili, zda tento proces ovlivňuje stabilitu enkapsulovaných vitamínů. Výsledky ukázaly, že lyofilizace nijak výrazně nesnižuje stabilitu částic. Tato zjištění naznačují, že lyofilizace může být účinnou metodou pro výrobu potravinových doplňků s enkapsulovanými vitamíny, aniž by došlo k výrazné ztrátě jejich biologické aktivity nebo stability. Tato informace má zásadní význam pro potravinářský průmysl, který hledá efektivní způsoby, jak vytvářet potravinové doplňky s vysokou kvalitou a dlouhou trvanlivostí. Lyofilizace poskytuje jednoduchou a účinnou metodu pro zachování stability a biologické aktivity enkapsulovaných látek, což může vést k vývoji nových produktů s vysokou hodnotou pro spotřebitele.

## 6. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla provedena série experimentálních studií zaměřených na přípravu a charakterizaci nanočástic, konkrétně liposomů a chitosomů s enkapsulovanými vitamíny B<sub>12</sub>, C, D a E a jejich aplikace do oblasti kosmetiky a potravinářství. V kosmetickém průmyslu představují tyto nanočástice inovativní přístup k vývoji produktů, které nabízejí zvýšenou účinnost a stabilitu, a které mohou přinést významné vylepšení v oblasti péče o pleť a ochrany proti stárnutí. Jejich aplikace může zahrnovat širokou škálu produktů, od krémů a séra po oční péči a pleťové masky, přičemž každý z těchto výrobků může přinášet konkrétní výhody pro různé typy pleti a potřeby zákazníků. V potravinářském průmyslu pak nanočástice nabízejí možnost zlepšení a stabilizace potravin, zvýšení jejich nutriční hodnoty a prodloužení trvanlivosti. Mohou být použity jako potravinářské přísady v různých produktech, včetně funkčních potravin a nápojů, které poskytují zvýšenou výživnou hodnotu a zlepšují zdraví spotřebitelů.

Práce se zabývala optimalizací přípravy nanočástic pomocí různých metod, včetně ultrazvukového zpracování a míchání na magnetické míchačce. Byl proveden důkladný průzkum vlivu těchto faktorů na stabilitu a velikost nanočástic. Na základě provedených experimentů jsme potvrdili účinnost chitosanu jako obalové látky pro enkapsulaci vitamínů. Zjistili jsme, že chitosanové nanočástice mají potenciál stabilizovat vitamíny a chránit je před vnějšími vlivy, což je zásadní pro jejich udržení biologické aktivity a prodloužení trvanlivosti. Další část práce se zaměřila na stanovení enkapsulační účinnosti vitamínů B<sub>12</sub>, C, D a E ve formě liposomů. Byly použity různé analytické metody, včetně HPLC a UV-VIS spektrofotometrie, pro posouzení enkapsulační účinnosti analýzou supernatantu i vitamínů uvolněných přímo z nanočástic. Výsledky ukázaly, že hodnoty enkapsulační účinnosti se liší v závislosti na použité metodě stanovení, a tudíž metody stanovení enkapsulační účinnosti vyžadují ještě další optimalizaci, aby nedocházelo ke zkreslení experimentálních dat.

Tato diplomová práce zkoumala kromě účinnosti enkapsulace také postupné uvolňování enkapsulovaných látek do vodného prostředí, kdy byla simulována teplota lidského těla, tedy 37 °C, přičemž bylo zjištěno, že hydrofilní vitamíny přecházely do vodného prostředí mnohem snáze než lipofilní vitamíny.

Také byly připraveny dva kosmetické produkty obsahující chitosanové nanočástice, a to pleťový krém s využitím částic s enkapsulovaným vitamínem C a hydratační gel s částicemi obsahujícími vitamíny D a E. Dále byla provedena senzorická analýza vybraných kosmetických produktů a hodnocení jejich účinků na kůži. Prokázali jsme, že kosmetické přípravky obohacené chitosanovými nanočásticemi s enkapsulovanými vitamíny poskytují významné výhody pro péči o pokožku a podporu jejího zdraví. Tyto přípravky mohou přispět k hydrataci, ochraně před oxidačním stresem a podpoře regenerace pokožky.

V oblasti potravin jsme navrhli využití chitosanových nanočástic pro výrobu funkčních potravin a potravinových doplňků obohacených o vitamíny B<sub>12</sub>, C, D a E. Tyto doplňky mohou

přispět k lepšímu zdravotnímu stavu a výživě konzumentů, zejména v případech nedostatečného příjmu potravin nebo při zvýšené potřebě v určitých obdobích.

Tato diplomová práce přinesla nové poznatky o přípravě, charakterizaci a aplikacích nanočástic v kosmetickém a potravinářském průmyslu. Tyto poznatky mohou přispět k dalšímu výzkumu v oblasti nanotechnologií a využití nanočástic v moderní kosmetice a potravinářství.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] TYAGI, Rajeev K. *Liposomes: Recent Advances, New Perspectives and Applications*. IntechOpen, 2023. ISBN 1803563656. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.102167>.
- [2] FANG, Zhongxiang a BHANDARI, Bhesh. Encapsulation of polyphenols – a review. Online. *Trends in food science & technology*. 2010, roč. 21, č. 10, s. 510-523. ISSN 0924-2244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>. [cit. 2024-04-03].
- [3] GIBBS, Bernard F.; KERMASHA, Selim; ALLI, Inteaz a MULLIGAN, Catherine N. Encapsulation in the food industry: a review. Online. *International journal of food sciences and nutrition*. 1999, roč. 50, č. 3, s. 213-224. ISSN 0963-7486. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/096374899101256>. [cit. 2024-04-03].
- [4] *Structure of liposome. In: Small molecule therapeutic-loaded liposomes as therapeutic carriers: from development to clinical applications*. Online. THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. 2016. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ra/c6ra09854a>. [cit. 2019-06-15].
- [5] NEDOVIC, Viktor; KALUSEVIC, Ana; MANOJLOVIC, Verica; LEVIC, Steva a BUGARSKI, Branko. An overview of encapsulation technologies for food applications. Online. *Procedia food science*. 2011, roč. 1, s. 1806-1815. ISSN 2211-601X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>. [cit. 2024-04-03].
- [6] SZEWIECZKOVÁ, Jana. *Fosfolipidy jako základ biodegradabilních nosičových systémů*. 2013.
- [7] KUMAR, Rajiv a KATARE, Om Prakash. Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: A review. Online. *AAPS PharmSciTech*. 2005, roč. 6, č. 2, s. E298-E310. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/pt060240>. [cit. 2024-04-07].
- [8] NEDOVIC, Viktor; KALUSEVIC, Ana; MANOJLOVIC, Verica; LEVIC, Steva a BUGARSKI, Branko. An overview of encapsulation technologies for food applications. Online. *Procedia food science*. 2011, roč. 1, s. 1806-1815. ISSN 2211-601X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>. [cit. 2024-04-07].
- [9] LE, Ngoc Thuy Trang; NGUYEN, Dinh Tien Dung; NGUYEN, Ngoc Hoi; NGUYEN, Cuu Khoa a NGUYEN, Dai Hai. Methoxy polyethylene glycol–cholesterol modified soy lecithin liposomes for poorly water-soluble anticancer drug delivery. Online. *Journal of applied polymer science*. 2021, roč. 138, č. 7. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.49858>. [cit. 2024-04-14].
- [10] BRÁS, Teresa; ROSA, Daniela; GONÇALVES, Ana C.; GOMES, Andreia C.; ALVES, Vítor D. et al. Development of bioactive films based on chitosan and Cynara



- cardunculus leaves extracts for wound dressings. Online. *International journal of biological macromolecules*. 2020, roč. 163, s. 1707-1718. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.109>. [cit. 2024-03-13].
- [11] YOUNES, Islem a RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. Online. *Marine Drugs*. 2015, roč. 13, č. 3, s. 1133-1174. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md13031133>. [cit. 2024-04-03].
- [12] KULKA, Karolina a SIONKOWSKA, Alina. Chitosan Based Materials in Cosmetic Applications: A Review. Online. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2023, roč. 28, č. 4, s. 1817. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28041817>. [cit. 2024-04-07].
- [13] TEIXEIRA-COSTA, Barbara E. a ANDRADE, Cristina T. Chitosan as a valuable biomolecule from seafood industry waste in the design of green food packaging. Online. *Biomolecules (Basel, Switzerland)*. 2021, roč. 11, č. 11, s. 1599. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom11111599>. [cit. 2024-03-14].
- [14] BAMIDELE, Oluwaseun P. a EMMAMBUX, Mohammad Naushad. Encapsulation of bioactive compounds by "extrusion" technologies: a review. Online. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2021, roč. 61, č. 18, s. 3100-3118. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793724>. [cit. 2024-04-03].
- [15] LIU, Nan a PARK, Hyun-jin. Chitosan-coated nanoliposome as vitamin E carrier. Online. *Journal of microencapsulation*. 2009, roč. 26, č. 3, s. 235-242. ISSN 0265-2048. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/02652040802273469>. [cit. 2024-04-03].
- [16] KIM, Sehui a LEE, Tai Gyu. Stabilization of l-ascorbic acid in cosmetic emulsions. Online. *Journal of industrial and engineering chemistry (Seoul, Korea)*. 2018, roč. 57, s. 193-198. ISSN 1226-086X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.08.023>. [cit. 2024-04-03].
- [17] PETERSON, Michael E. a FLUEGEMAN, Kerstin. Cholecalciferol. Online. *Topics in companion animal medicine*. 2013, roč. 28, č. 1, s. 24-27. ISSN 1938-9736. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2013.03.006>. [cit. 2024-04-03].
- [18] WANG, Wenjuan; LIU, Miaomiao; GAO, Weiqun; SUN, Yan a DONG, Xiaoyan. Coassembled Chitosan–Hyaluronic Acid Nanoparticles as a Theranostic Agent Targeting Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid. Online. *ACS applied materials & interfaces*. 2021, roč. 13, č. 47, s. 55879-55889. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsami.1c17267>. [cit. 2024-04-03].
- [19] WANG, Chun-chi a WU, Shou-mei. Simultaneous determination of l-ascorbic acid, ascorbic acid-2-phosphate magnesium salt, and ascorbic acid-6-palmitate in commercial cosmetics by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. Online. *Analytica chimica*

*acta*. 2006, roč. 576, č. 1, s. 124-129. ISSN 0003-2670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.017>. [cit. 2024-04-14].

- [20] SETYANINGSIH, Widiastuti. *Methods of Analysis of Food Components and Additives*. Editor: SemihÖtles. CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, 2011. 512 pages. Online. *Journal of food biochemistry*. 2014, roč. 38, č. 3, s. 363-364. ISSN 0145-8884. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12061>. [cit. 2024-04-14].
- [21] MAIONE-SILVA, Lorena; DE CASTRO, Elisandra Gava; NASCIMENTO, Thais Leite; CINTRA, Emílio Ramos; MOREIRA, Larissa Cleres et al. Ascorbic acid encapsulated into negatively charged liposomes exhibits increased skin permeation, retention and enhances collagen synthesis by fibroblasts. Online. *Scientific reports*. 2019, roč. 9, č. 1, s. 522-522. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36682-9>. [cit. 2024-04-14].
- [22] HRNEIOOVA, Dana. Kobalamin a jeho biodostupnost Z potravin živoeisneho a rostlinneho puvodu. Online. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*. 2015, roč. 18, č. 2, s. 83-88. ISSN 1211-9326. [cit. 2024-04-03].
- [23] HLÚBIK, P.; OPLTOVÁ, L. a CHALOUPKA, J. 3.P.19 Antioxidant vitamins and cardiovascular disease risk factors. Online. *Atherosclerosis*. 1997, roč. 134, č. 1-2, s. 202-202. ISSN 0021-9150. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(97\)89043-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(97)89043-0). [cit. 2024-04-03].
- [24] FAN, Yuchen; SAHDEV, Preety; OCHYL, Lukasz J.; J. AKERBERG, Jonathan a MOON, James J. Cationic liposome–hyaluronic acid hybrid nanoparticles for intranasal vaccination with subunit antigens. Online. *Journal of controlled release*. 2015, roč. 208, s. 121-129. ISSN 0168-3659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.010>. [cit. 2024-04-03].
- [25] KAMAR, Samaa Samir; SHAMSELDEEN, Asmaa Mohammed; HOSNY, Sara Adel; EL-SHAFEI, Asmaa Ahmed; RASHID, Laila Ahmad et al. Comparing Effectiveness of Hyaluronic Acid-Chitosan Nanoparticles Encapsulation Versus Hyaluronic Acid Monotherapy in Osteoarthritis Rat Model: Microarray Screening for miR-140. Online. *Microscopy and microanalysis*. 2023, roč. 29, č. 2, s. 686-697. ISSN 1431-9276. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/micmic/ozac048>. [cit. 2024-04-03].
- [26] LEROUX, Jean-christophe. Liposome Methods and Protocols. Online. *Journal of controlled release*. 2003, roč. 86, č. 2-3, s. 371. ISSN 0168-3659. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00420-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00420-0). [cit. 2024-04-03].
- [27] AKBARZADEH, Abolfazl; REZAEI-SADABADY, Rogaie; DAVARAN, Soodabeh; JOO, Sang Woo; ZARGHAMI, Nosratollah et al. Liposome: classification, preparation, and applications. Online. *Nanoscale research letters*. 2013, roč. 8, č. 1, s. 102-102. ISSN 1931-7573. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>. [cit. 2024-04-03].

- [28] HADIAN, Zahra; SAHARI, Mohammad Ali; MOGHIMI, Hamid Reza a BARZEGAR, Mohsen. Formulation, characterization and optimization of liposomes containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids; A methodology approach. Online. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2014, roč. 13, č. 2, s. 393-404. ISSN 1735-0328. [cit. 2024-04-03].
- [29] NEDOVIC, Viktor; KALUSEVIC, Ana; MANOJLOVIC, Verica; LEVIC, Steva a BUGARSKI, Branko. An overview of encapsulation technologies for food applications. Online. *Procedia food science*. 2011, roč. 1, s. 1806-1815. ISSN 2211-601X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>. [cit. 2024-04-03].
- [30] TAVANO, Lorena; MUZZALUPO, Rita; PICCI, Nevio a DE CINDIO, Bruno. Co-encapsulation of antioxidants into niosomal carriers: Gastrointestinal release studies for nutraceutical applications. Online. *Colloids and surfaces, B, Biointerfaces*. 2014, roč. 114, s. 82-88. ISSN 0927-7765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.058>. [cit. 2024-04-03].
- [31] DESAI, K.G.H a PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. Online. *Drying technology*. 2005, roč. 23, č. 7, s. 1361-1394. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>. [cit. 2024-04-07].
- [32] LI, Xiaomeng; TANG, Chaoqing; SALAMA, Mohamed; XIA, Minquan; HUANG, Xi et al. Encapsulation efficiency and oral delivery stability of chitosan–liposome-encapsulated immunoglobulin Y. Online. *Journal of food science*. 2022, roč. 87, č. 4, s. 1708-1720. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16116>. [cit. 2024-02-14].
- [33] JOY, Jean Mary; P, Amruth; M, Rosemol Jacob; DARA, Pavan Kumar; RENUKA, V. et al. Liposome mediated encapsulation and role of chitosan on modulating liposomal stability to deliver potential bioactives-A review. Online. *Food hydrocolloids for health*. 2023, roč. 4, s. 100142. ISSN 2667-0259. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2023.100142>. [cit. 2024-02-15].
- [34] IRAVANI, Siavash a VARMA, Rajender S. Alginate-Based Micro- and Nanosystems for Targeted Cancer Therapy. Online. *Marine drugs*. 2022, roč. 20, č. 10, s. 598. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md20100598>. [cit. 2024-03-18].
- [35] KIM, Yujung; BAEK, Youjin; JEONG, Eunwoo a LEE, Hyeon Gyu. Development of gelatinized-core liposomes for the oral delivery of EGCG with improved stability, release property, and cellular antioxidant activity. Online. *Colloids and surfaces, B, Biointerfaces*. 2024, roč. 234, s. 113723-113723. ISSN 0927-7765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113723>. [cit. 2024-02-16].
- [36] AHMADI, Elham; ELHAMIRAD, Amir Hossein; MOLLANIA, Nasrin; SAEIDI ASL, Mohammad Reza a PEDRAMNIA, Ahmad. Incorporation of white tea extract in nano-liposomes: optimization, characterization, and stability. Online. *Journal of the science of*

*food and agriculture*. 2022, roč. 102, č. 5, s. 2050-2060. ISSN 0022-5142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11544>. [cit. 2024-04-14].

- [37] Malvern launches new Zetasizer Nano series. Online. *Powder metallurgy*. 2003, roč. 46, č. 2, s. 92-93. ISSN 0032-5899. [cit. 2024-04-14].
- [38] *Www.horiba.com: Dynamic Light Scattering (DLS)*. Online. *Www.horiba.com: Dynamic Light Scattering (DLS)*. 2022. Dostupné z: <https://www.horiba.com/int/scientific/technologies/dynamic-lightscattering-dls-particle-size-distribution-analysis/dynamic-light-scattering-dlsparticle-size-distribution-analysis/>. [cit. 2022-04-06].
- [39] QIAO, Weihong; ZHENG, Zhibo; QU, Wenhui a ZHANG, Shumin. Synthesis and Characterization of Carbamate-Linked Cationic Lipids with Hydroxyethyl Group. Online. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2012, roč. 89, č. 12, s. 2121-2125. ISSN 0003-021X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2115-x>. [cit. 2024-02-14].
- [40] MOGHIMIPOUR, Eskandar; REZAEI, Mohsen; RAMEZANI, Zahra; KOUCHAK, Maryam; AMINI, Mohsen et al. Transferrin targeted liposomal 5-fluorouracil induced apoptosis via mitochondria signaling pathway in cancer cells. Online. *Life sciences (1973)*. 2018, roč. 194, s. 104-110. ISSN 0024-3205. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.026>. [cit. 2024-02-12].
- [41] VARGA, Norbert; TURCSÁNYI, Árpád; HORNOK, Viktória a CSAPÓ, Edit. Vitamin e-loaded pla- and plga-based core-shell nanoparticles: synthesis, structure optimization and controlled drug release. Online. *Pharmaceutics*. 2019, roč. 11, č. 7, s. 357. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070357>. [cit. 2024-04-14].
- [42] MA, Yanlan; LI, Siying; JI, Tengting; WU, Wenqi; SAMEEN, Dur E. et al. Development and optimization of dynamic gelatin/chitosan nanoparticles incorporated with blueberry anthocyanins for milk freshness monitoring. Online. *Carbohydrate polymers*. 2020, roč. 247, s. 116738. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116738>. [cit. 2024-04-14].
- [43] WASAY, Syed Abdul; JAN, Syed Umer; AKHTAR, Muhammad; NOREEN, Sobia a GUL, Rahman. Developed meloxicam loaded microparticles for colon targeted delivery: Statistical optimization, physicochemical characterization, and in-vivo toxicity study. Online. *PloS one*. 2022, roč. 17, č. 4, s. e0267306. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267306>. [cit. 2024-02-14].
- [44] GENG, Tao; ZHAO, Xia; MA, Meng; ZHU, Gang a YIN, Ling. Resveratrol-Loaded Albumin Nanoparticles with Prolonged Blood Circulation and Improved Biocompatibility for Highly Effective Targeted Pancreatic Tumor Therapy. Online.

- Nanoscale research letters*. 2017, roč. 12, č. 1, s. 437-10. ISSN 1931-7573. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2206-6>. [cit. 2024-02-14].
- [45] HASIJA, Rahul; CHAURASIA, Sundeep a GUPTA, Swati. Formulation design, optimization and in vivo evaluation of oral co-encapsulated resveratrol-humic acid colloidal polymeric nanocarriers. Online. *Pharmaceutical development and technology*. 2021, roč. 26, č. 9, s. 953-966. ISSN 1083-7450. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10837450.2021.1966442>. [cit. 2024-02-18].
- [46] BARENHOLZ, Yechezkel. Liposome application: Problems and prospects. Online. *Current opinion in colloid & interface science*. 2001, roč. 6, č. 1, s. 66-77. ISSN 1359-0294. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(00\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(00)00090-X). [cit. 2024-04-14].
- [47] VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, Martha L.; CALPENA, Ana C.; DOMÈNECH, Òscar; MONTERO, M. Teresa a BORRELL, Jordi H. Enhanced topical delivery of hyaluronic acid encapsulated in liposomes: A surface-dependent phenomenon. Online. *Colloids and surfaces, B, Biointerfaces*. 2015, roč. 134, s. 31-39. ISSN 0927-7765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.06.029>. [cit. 2024-04-14].
- [48] SIGOT, Valeria; ARNDT-JOVIN, Donna J a JOVIN, Thomas M. Targeted Cellular Delivery of Quantum Dots Loaded on and in Biotinylated Liposomes. Online. *Bioconjugate chemistry*. 2010, roč. 21, č. 8, s. 1465-1472. ISSN 1043-1802. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bc100054c>. [cit. 2024-03-14].
- [49] SVĚTNIČKA, Martin; SIGAL, Anat; SELINGER, Eliška; HENIKOVÁ, Marina; EL-LABABIDI, Eva et al. Cross-Sectional Study of the Prevalence of Cobalamin Deficiency and Vitamin B12 Supplementation Habits among Vegetarian and Vegan Children in the Czech Republic. Online. *Nutrients*. 2022, roč. 14, č. 3, s. 535. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu14030535>. [cit. 2024-04-14].
- [50] ZHAO, Xu; WANG, Kaili; ZHAO, Jiale; SUN, Rongbo; SHANG, Hang et al. Physical and oxidative stability of astaxanthin microcapsules prepared with liposomes. Online. *Journal of the science of food and agriculture*. 2022, roč. 102, č. 11, s. 4909-4917. ISSN 0022-5142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11854>. [cit. 2024-03-11].
- [51] ISTENIČ, Katja; CERC KOROŠEC, Romana a POKLAR ULRIH, Nataša. Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes. Online. *Journal of the science of food and agriculture*. 2016, roč. 96, č. 13, s. 4623-4632. ISSN 0022-5142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7691>. [cit. 2024-03-10].
- [52] FLYNN, Shannon L. *Environmental behavior of metals and radionuclides*. 2015. ISBN 1321437854.
- [53] ABDUL HAMZA, Rehab Shather a HABEEB, Majeed Ali. Structural and Dielectric Parameters of PVA/CMC Blend Reinforced with SiO<sub>2</sub>/SnO<sub>2</sub> Nanoparticles for Nanoelectronics Applications. Online. *Transactions on electrical and electronic*

- materials*. 2024, roč. 25, č. 1, s. 77-88. ISSN 1229-7607. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42341-023-00486-0>. [cit. 2024-02-18].
- [54] NICOL, Noreen Heer. Anatomy and physiology of the skin. Online. *Dermatology nursing*. 2005, roč. 17, č. 1, s. 62-62. ISSN 1060-3441. Dostupné z: <https://www.proquest.com/docview/224828103?pq-origsite=primo&sourcetype=Scholarly%20Journals>. [cit. 2024-03-22].
- [55] ANTONOVICH, Diana D. Cosmetic dermatology: Products & procedures. Online. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010, roč. 63, č. 4, s. 731-731. ISSN 0190-9622. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.06.022>. [cit. 2024-04-22].
- [56] FEŘTEKOVÁ, Vlasta; FEŘTEK, Otakar; STRÁNSKÝ, Petr; ŠEDIVÝ, Zbyněk a ŠRÁMEK, Dobroslav. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 3. rozšíř.vyd. Praha: MAXDORF, 2000. ISBN 80-85912-19-8.
- [57] JANIŠ, Rahula; PATA, Vladimír; EGNER, Pavlína; PAVLAČKOVÁ, Jana; ZAPLETALOVÁ, Andrea et al. Comparison of metrological techniques for evaluation of the impact of a cosmetic product containing hyaluronic acid on the properties of skin surface. Online. *Biointerphases*. 2017, roč. 12, č. 2, s. 021006-021006. ISSN 1934-8630. Dostupné z: <https://doi.org/10.1116/1.4985696>. [cit. 2024-03-22].
- [58] TAKEUCHI, A. (Kobe Women's Coll. of Pharmacy (Japan)); OKANO, T; AYAME, M; YOSHIKAWA, H; TERAOKA, S et al. High-performance liquid chromatographic determination of vitamin D3 in fish liver oils and eel body oils. Online. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 1984, roč. 30, č. 5, s. 421-430. ISSN 0301-4800. Dostupné z: <https://doi.org/10.3177/jnsv.30.421>. [cit. 2024-05-13].
- [59] KHAN, Abad; KHAN, Muhammad I.; IQBAL, Zafar; SHAH, Yasar; AHMAD, Lateef et al. An optimized and validated RP-HPLC/UV detection method for simultaneous determination of all-trans-Retinol (Vitamin A) and  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) in human serum: Comparison of different particulate reversed-phase HPLC columns. Online. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2010, roč. 878, č. 25, s. 2339-2347. ISSN 1570-0232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.07.009>. [cit. 2024-05-13].
- [60] IMRAMOVSKÁ, Nela. *Analýza vitamínu E (tokoferolů) v potravinách*. 2011.

## **8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ**

DLS – Dynamická rozptylová spektroskopie („Dynamic light scattering“)

ZP – Zeta potenciál

PdI – Index polydisperzity

HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie

UV-VIS – Ultrafialová a viditelná spektroskopie

SEM – Rastrovací elektronová mikroskopie

TEM – Transmisní elektronová mikroskopie

## 9. PŘÍLOHY

### Příloha: Dotazník k senzorické analýze Senzorická analýza kosmetických produktů ÚDAJE O RESPONDENTU

#### Pohlaví

Žena                      Muž

#### Věk

19–25                      26–30                      31–40                      41–50                      51–60

#### Váš typ pokožky

Normální                      Suchá                      Mastná                      Smíšená

#### Popište Vaše problémy – sklony k podráždění

Žádné                      Málo                      Střední                      Velmi

#### Popište Vaše problémy – nadměrná dehydratace

Žádné                      Málo                      Střední                      Velmi

#### Používáte pravidelně hydratační produkty?

Pravidelně                      V případě potřeby                      Zřídka                      Nepoužívám je vůbec

#### HODNOCENÍ TESTOVANÝCH PRODUKTŮ (stupnice 1-5)

Vzorek	Hydratační gel	Pleťový krém
Konzistence		
Vzhled		
Roztíratelnost		
Vstřebatelnost		
Hydratace		
Zlepšení vzhledu pokožky		

Za nejlepší hodnocení se považuje 5, za nejhorší 1.