

Interakcie nanočastíc so simulovanými telesnými tekutinami

Bc. Simona Dronzeková

Diplomová Práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Simona Dronzeková**
Osobní číslo: **T16585**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Interakce nanočástic se simulovanými tělními tekutinami**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma.
2. Definujte nanočástice, popište jejich příprav a vlastnosti.
3. Věnujte se především nanočásticím ZnO a TiO₂ a jejich použití v kosmetických přípravcích.
4. Uveďte metody vhodné pro charakterizaci nanočástic a jejich možných interakcí s biologickými systémy.

II. Praktická část

1. V praktické části analyzujte vhodnými metodami vzorky nano ZnO a TiO₂, případně jejich směsí a sledujte chování těchto systémů v simulovaných tělních tekutinách.
2. Výsledky práce zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Mihranyan, A.; Ferraz, N.; Stromme, M.: Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics

[2] Katz, L. M., Dewan, K., Bronaugh, R. L.: Nanotechnology in cosmetics

[3] Jones, K.; Morton, J; Smith, I.; et al. Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles

[4] Jones, K.; Morton, J; Smith, I.; et al. Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles, Toxicology Letters 233 (2015) 95101

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2018

Ve Zlíně dne 5. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: SIMONA BRONZEKOVÁ


Obor: TTDK

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 11. 5. 2014



¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlíádne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Predmetom diplomovej práce je popísať nanomateriály a nanočastice so zameraním sa na oxid titaničitý, ich pôsobenie na ľudský organizmus, priblíženie mechanizmu toxického účinku daných častíc a legislatívne požiadavky týkajúce sa danej problematiky. Praktická časť sa venuje stanoveniu veľkosti častíc oxidu titaničitého vo fyziologických tekutinách a v simulovaných tekutinách tráviaceho traktu metódou dynamického rozptylu svetla. Ďalej sú vybrané vzorky bližšie charakterizované stanovením zeta potenciálu a pomocou SEM. Posledná časť je venovaná stanoveniu cytotoxicity vybraných vzoriek podľa nariadenia OECD.

Kľúčové slová: Nanočastice, oxid titaničitý, dynamický rozptyl svetla, cytotoxicita.

ABSTRACT

The diploma thesis is dealing with the description of nanomaterials and nanoparticles. It mainly focuses on titanium dioxide, its influence on the human body, toxic impact and legislation requirements regarding the given topic. The experimental part consists of the investigation of particle sizes of TiO₂ in physiological fluids and also in simulated fluids of the digestive tract *via* dynamic light scattering. Furthermore, selected samples are in more details characterized by determination of zeta potential and with the help of SEM. The final part of the thesis covers the determination of cytotoxicity of selected samples, which is based on the OECD regulation.

Key words: Nanoparticles, titanium dioxide, dynamic light scattering, cytotoxicity.

Týmto by som chcela poďakovať doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. hlavne za jej trpezlivosť, ochotu a profesionalitu pri vedení a pomoci pri spracovávaní diplomovej práce. Ďalej ďakujem Ing. Lucke Pindákovéj za pomoc pri vykonávaní meraní v praktickej časti diplomovej práce a zamestnancom CPS za ochotu poskytnúť rôzne zariadenia a za spoluprácu pri testovaní vzoriek. Ďalej by som rada poďakovala projektu IGA/CPS/2017/001 a IGA/CPS/2018/001 za umožnenie realizácie experimentálnej práce.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia bakalárskej/diplomovej práce a verzia elektronická nahraná do IS/STAG sú totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČASŤ.....	12
1 NANOMATERIÁLY	13
1.1 DEFINÍCIA NANOMATERIÁLOV.....	13
1.2 NANOŠTRUKTÚRY A NANOČASTICE.....	13
1.3 METÓDY VÝROBY NANOČASTÍC	13
1.3.1 Metóda top-down	13
1.3.2 Metóda bottom-up.....	14
1.4 HISTÓRIA NANOČASTÍC	14
1.5 VLASTNOSTI NANOMATERIÁLOV	15
1.5.1 Fyzikálno-chemické vlastnosti nanomateriálov	15
1.5.2 Optické vlastnosti.....	15
1.5.3 Teplota topenia.....	16
1.5.4 Mechanická pevnosť	16
1.5.5 Chemické vlastnosti	16
1.6 KLASIFIKÁCIA NANOMATERIÁLOV	16
1.7 TOXIKOLÓGIA NANOČASTÍC	17
1.7.1 Mechanizmus toxicity nanočastíc	17
2 NANOMATERIÁLY V KOZMETIKE A FARMÁCII	19
2.1 SPÔSOBY VYUŽITIA NANOČASTÍC V KOZMETIKE.....	19
2.1.1 Nanočastice v emulzii	19
2.1.2 Mikroemulzie	20
2.1.3 Nanočastice v disperzných systémoch	20
2.1.4 Nanočastice ako funkčná nanokonzervácia.....	20
2.1.5 Transportné systémy	21
2.1.5.1 Lipozómy.....	21
2.1.6 Lipidické nanočastice.....	21
2.1.7 Nanokapsule.....	22
2.1.8 Nanokryštály	22
2.2 OXID TITANIČITÝ.....	23
2.2.1 Štruktúra (TiO ₂)	23
2.2.2 Nano TiO ₂	23
2.2.2.1 Foto aktivita	24
2.3 OXID ZINOČNATÝ	25
2.3.1 Antibakteriálna aktivita nano ZnO.....	25
2.4 TOXICITA NANO TiO ₂ A ZNO.....	26
2.4.1 Cytotoxicita	26
2.4.2 Genotoxicita	27
2.5 INÉ TYPY NANOČASTÍC VYUŽÍVANÉ V KOZMETIKE A FARMÁCII.....	28
2.5.1 Nanočastice zlata.....	28
2.5.2 Nanočastice striebra	28

2.5.3	Nanočastice hliníka	28
2.5.4	Nanočastice methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenylu	28
2.5.5	Prehľad ďalších nanomateriálov v kozmetike.....	30
3	CESTY VSTUPU NANOČASTÍC DO ORGANIZMU A ICH PÔSOBENIE NA JEDNOTLIVÉ TYPY BUNIEK	31
3.1	CESTY VSTUPU NANOČASTÍC DO TELA.....	32
3.2	PÔSOBENIE NANOČASTÍC NA BUNKY	33
3.2.1	Chemické mechanizmy nanotoxikológie	33
3.2.2	Fyzikálne mechanizmy nanotoxikológie.....	33
3.2.3	Pôsobenie nanočastíc na bunkovej úrovni	33
3.2.4	Vplyv nanočastíc na bunkové membrány	34
3.2.5	Pôsobenie nanočastíc na ostatné orgány	34
4	LEGISLATÍVA NANOMATERIÁLOV V KOZMETIKE	36
4.1	NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY (ES) Č. 1223/2009 O KOZMETICKÝCH VÝROBKOCH A JEHO ČLÁNOK 16 – NANOMATERIÁLY	36
4.2	OZNÁMENIE	38
4.3	OZNAČOVANIE	38
5	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....	40
5.1	INTERAKCIE SPÔSOBENÉ NANOČASTICAMI TiO ₂ PRI ORÁLNO M PRÍJME.....	40
5.2	VPLYV POVRCHOVEJ ÚPRAVY NANOČASTÍC NA PLÚCNU TOXICITU.....	40
5.3	NÁVRH NA ZARADENIE TiO ₂ MEDZI INHALAČNÉ KARCINOGENY	41
6	CIEĽ PRÁCE	42
II	PRAKTICKÁ ČASŤ	43
7	MATERIÁLY A METÓDY	44
7.1	POUŽITÉ VZORKY	44
7.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	46
7.2.1	Disperzné média použité k stanoveniu.....	46
7.2.2	Roztoky použité pri simulácii chovania sa nanočastíc v gastrointestinálnom trakte	46
7.3	BUNKOVÉ LÍNIE.....	46
7.4	POUŽITÉ PRÍSTROJE, ZARIADENIA A POMÔCKY	46
7.5	METODIKA	47
7.5.1	Príprava TiO ₂ pre stanovenie veľkosti častíc v rôznych disperzných médiách	47
	Príprava základnej disperzie	47
	Príprava vzorky na stanovenie.....	47
7.5.2	Príprava disperzných médií použitých na stanovenie veľkosti častíc.....	48
	Príprava simulovanej žalúdočnej tekutiny (SGF).....	48
	Príprava simulovaných slín.....	48
7.5.3	Príprava základnej disperzie nano TiO ₂ pre stanovenie fotokatalytickej aktivity	48
7.5.4	Príprava disperzie nano TiO ₂ pre stanovenie fotocytotoxicity	49

7.6	STANOVENIE VEĽKOSTI A DISTRIBÚCIE ČASTÍC V RÔZNYCH MÉDIÁCH METÓDOU DLS.....	49
7.6.1	Vlastné stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS.....	49
7.7	ZETA POTENCIÁL.....	50
7.8	SKENOVACIA ELEKTRÓNOVÁ MIKROSKOPIA (SEM).....	50
7.9	ÚČINNOSŤ TiO ₂ NANOČASTÍC AKO UV FILTROV.....	50
	Vlastné stanovenie.....	50
7.10	STANOVENIE CYTOTOXICITY NANO TiO ₂	51
8	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	54
8.1	STANOVENIE VEĽKOSTI ČASTÍC METÓDOU DLS.....	54
8.1.1	Stanovenie veľkosti častíc jednotlivých vzoriek vo vode.....	55
8.1.2	Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v PBS.....	60
8.1.3	Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v médiu.....	62
8.1.4	Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v médiu s obsahom 10% séra.....	64
8.1.5	Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v simulovanej žalúdočnej tekutine.....	65
8.1.6	Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v simulovanej žalúdočnej tekutine s prídavkom pepsínu.....	67
8.1.7	Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v simulovanej črevnej tekutine.....	68
8.1.8	Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v simulovaných slinách.....	70
8.1.9	Zhrnutie.....	71
8.2	STANOVENIE ZETA POTENCIÁLU.....	72
8.3	SEM.....	73
8.4	STANOVENIE ÚČINNOSTI TiO ₂ AKO UV FILTRA.....	75
8.5	STANOVENIE CYTOTOXICITY NANO TiO ₂	77
	ZÁVER.....	81
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	83
	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	89
	ZOZNAM OBRÁZKOV.....	92
	ZOZNAM TABULIEK.....	94

ÚVOD

Využitie nanomateriálov, kde sa zaraďujú aj nanočastice v priemysle v súčasnosti stúpa zo dňa na deň a ich aplikácie sú široké. V budúcnosti sa predpokladá, že používanie nanočastíc bude hrať rolu takmer v každom aspekte ľudskej činnosti. V kozmetických prípravkoch sa zväčša vyskytuje oxid titaničitý a oxid zinočnatý, ktoré majú prednostne úlohu fyzikálnych UV filtrov. Využitie nanočastíc v kozmetike však týmto nekončí. Okrem UV filtrov v kozmetike nájdeme aj iné zlúčeniny, ako napríklad striebro, ktoré má antibakteriálne účinky, či oxidy železa s využitím ako pigmenty. Zároveň sa nevyužívajú iba nanomateriály z prírodných zložiek, ale aj syntetické, umelo vytvorené materiály, ktoré majú taktiež široké spektrum využitia. Aplikácie nanočastíc však predstavujú aj dôvod na obavy o ich bezpečnosti, keďže sa diskutuje o tom, či môžu dané materiály prenikať do ľudskeho organizmu. Aj keď sa výskum celosvetovo zameriava na analýzu bezpečnosti nanočastíc, nie je ešte stanovisko, ktoré by úplne vylučovalo ich škodlivý účinok na organizmus. Zdravá ľudská koža by mala byť účinnou bariérou pri prenikaní nanočastíc do tela, no organizmus môže byť vystavený ich účinku aj pri požití či inhalovaní.

Z praktického hľadiska sa preto výskum sústreďuje na mnoho cieľov. Jedným z nich je sledovanie osudu TiO_2 nanočastíc po ich orálnom požití, ktoré je napr. relevantné, pokiaľ sú nanočastice použité v kozmetických prípravkoch prichádzajúcich do styku s ústnou dutinou a perami (napr. rúž). Pri požití sa nanočastice vyskytnú v prvom rade v ústnej dutine, kde môže dochádzať k interakciám so slinami. Ak nanočastice budú putovať gastrointestinálnym traktom, bude dochádzať taktiež k interakciám so žalúdočnými či črevnými tekutinami, kde sa nanočastice v závislosti na týchto prostrediach môžu meniť. Touto problematikou sa diplomová práca zaoberá. Na daný výskum je použitá metóda dynamického rozptylu svetla (DLS), ktorá objasňuje správanie sa nanočastíc v rôznych disperzných prostrediach, na základe sledovania zmeny ich veľkosti.

V praktickej časti sa diplomová práca sústreďuje tiež na objasnenie vplyvu UV žiarenia na nanočastice, keďže expozícia slnečnému žiareniu je pri aplikáciách v opaľovacích prostriedkoch najviac pravdepodobná. S vplyvom UV žiarenia na nanočastice taktiež súvisí aj testovanie cytotoxicity nanočastíc TiO_2 na viabilitu buniek. Vzhľadom k časovej náročnosti experimentálnej práce s TiO_2 neboli do diplomovej práce zaradené pôvodne plánované testy s oxidom zinočnatým a bol uprednostnený výskum problematiky správania sa TiO_2 v simulovaných telesných tekutinách.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 NANOMATERIÁLY

1.1 Definícia nanomateriálov

V roku 2011 prijala Európska únia definíciu nanomateriálu (odporúčanie o definícii nanomateriálu 2011/696/EÚ), podľa ktorého nanomateriál znamená prirodzený, náhodný alebo vyrobený materiál obsahujúci častice v neviazanom stave, alebo ako agregát či aglomerát, kde 50% alebo viac častíc v rozložení veľkosti čísel má jeden alebo viac vonkajších rozmerov v rozsahu veľkosti od 1–100 nm. V osobitých prípadoch a tam kde to vyplýva z dôvodov týkajúcich sa životného prostredia, zdravia a bezpečnosti, môže byť prahová hodnota 50% nahradená hranicou 1–50%. [1]

1.2 Nanoštruktúry a nanočastice

Nanoštruktúry – teda častice a štruktúry, ktoré majú veľkosti o rozmeroch medzi 1 nm až 100 nm, považujeme za základné stavebné jednotky nanomateriálov. Ich skúmaním a objavovaním sa zaoberá nanoveda, ktorej hranice sa však nedajú presne vymedziť. Zahŕňa oblasti fyziky, pevných látok, chémie, inžinierstva aj molekulárnej biológie. Z tohto plynie, že nanotechnológie môžeme považovať za interdiciplinárne a prierezové technológie, zaoberajúce sa praktickým využitím nových a neobvyklých vlastností nanomateriálov pre konštrukciu nových štruktúr, materiálov a zariadení.[2] [3]

1.3 Metódy výroby nanočastíc

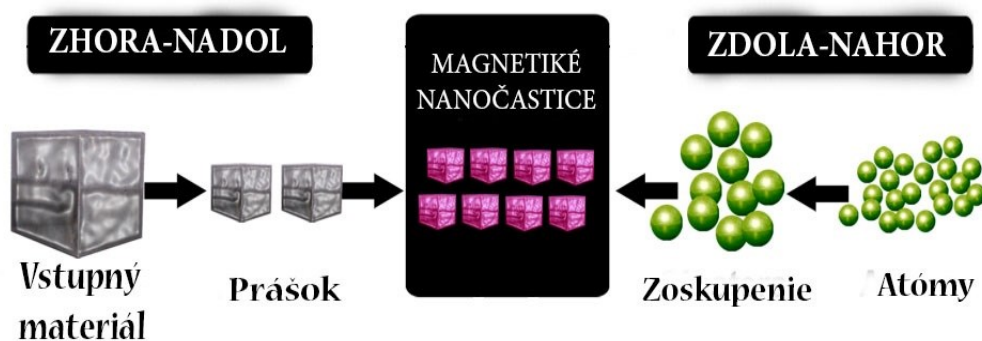
Hlavný rozdiel medzi nanotechnológiami a konvenčnými technológiami je v metóde výroby štruktúr. Zatiaľ čo nanotechnológie preferujú spôsob „bottom-up“, konvenčné technológie sa zvyčajne prikláňajú k metóde „top-down. [3]

1.3.1 Metóda top-down

Výraz „top-down“ , teda „zhora-nadol“ označuje metódu, v ktorej sa väčšie organizácie zmenšujú do nanorozmerov, pričom zachovávajú pôvodné vlastnosti bez kontroly atómovej úrovne. [4]

1.3.2 Metóda bottom-up

„Bottom-up“, teda „zdola-nahor“ označuje metódu, pri ktorej sa atómy a molekuly zhromažďujú do najmenších nanoštruktúr, väčšinou o rozmeroch od 2 do 10 nm. Tento spôsob využíva na výrobu častíc kontrolované chemické reakcie a schopnosť samozostavovania a samoorganizácie častíc. V prírode môžeme túto metódu pozorovať pri vzniku zložitých biologických štruktúr. [5]



Obr.1. Porovnanie metód top down a bottom up. [6]

1.4 História nanočastíc

Skorá história nanočastíc sa prejavila už v 9. storočí, kedy remeselníci v Mezopotámii využívali nanočastice zlata a striebra na vytvorenie trblietavého účinku pri zdobení hrncov. V starom Egypte sa zase využíval spôsob farbenia vlasov pomocou nanočastíc PbS (sulfid olovnatý – galenit), ktorými bolo dosiahnuté ich dlhodobé a stále čierne zafarbenie. V stredoveku používali sklári ako prísady prášky rôznych kovov a látok na dosiahnutie zaujímavého farebného efektu skla. Išlo predovšetkým o zlato, striebro, síru a selén. Bolo dokázané, že tieto látky sa v skle vyskytovali vo forme nanokryštáľov. Kovové nanokryštály sa využívali taktiež v 13. – 16. storočí na vytvorenie lesku glazovanej keramiky. V roku 1861 britský chemik Thomas Graham popísal suspenziu obsahujúcu častice o rozmeroch 1-100 nm, ktorú nazval koloidným systémom a položil tak základ nového odboru – koloidnej chémie. Prvú vedeckú zmienku o vlastnostiach nanočastíc poskytol v roku 1857 Michael Faraday v jeho diele Experimentálne vzťahy zlata (a iných kovov) na svetlo. V rokoch 1950 až 1960 sa svet zamerl na využitie týchto častíc v oblasti farmácie

a dodávania liekov do organizmu. Jeden z vedcov, ktorý sa o to zaslúžil bol Peter Paul Speiser a jeho výskum zameraný najprv na polyakrylátové perličky pre perorálne podanie a neskôr na vývin prvých nanočastíc na účely dodávania liekov a vakcín. Zatiaľ čo ľudia objavili nanotechnológie zhruba v 20. storočí, príroda tento pojem pozná už celé tisícročia. Väčšina životných procesov prebieha v nanorozmeroch a celá rada biologických materiálov a objektov môže byť zaradená medzi nanočastice. Príkladom sú vírusy (10–200 nm) alebo baktérie (5–50 nm). [2] [7]

1.5 Vlastnosti nanomateriálov

Vlastnosti nanomateriálov sú špecifické a závisia od štruktúry i zloženia. Tieto vlastnosti však môžu byť modifikované zmenou relatívneho vplyvu medzifázového správania, makroskopických vlastností vstupného materiálu, či charakteristickými rozmermi jednotlivých komponentov daného materiálu. V závislosti od fyzikálneho alebo chemického charakteru každej zložky existuje komplexná súvislosť medzi štruktúrou a zložením materiálu. V porovnaní s časticami v bežných rozmeroch vykazujú nanočastice jedinečné fyzikálne vlastnosti vrátane elektrických, katalytických, magnetických, mechanických, tepelných či zobrazovacích. Vďaka týmto špecifickým charakteristikám sú nanomateriály vo veľkej miere využívané v lekárskejších, farmaceutických, strojárskych či iných odvetviach.[7] [8]

1.5.1 Fyzikálno-chemické vlastnosti nanomateriálov

Medzi hlavné parametre nanočastíc patrí ich tvar (poprípade pomery strán), veľkosť a morfológická štruktúra danej látky. Nanočastice sa môžu vyskytovať vo forme aerosólu (najčastejšie pevná alebo kvapalná látka vo vzduchu), suspenzie (tuhá látka v kvapaline), alebo emulzie (dve kvapalné fázy). V prítomnosti istých povrchovo aktívnych chemických činidiel môžu byť ich medzifázové vlastnosti pozmenené. Takéto činidlá môžu nepriamo pôsobiť ako stabilizátory pri koagulácii či agregácii tým, že zachovávajú náboj a upravujú povrchovú vrstvu častice.[7]

1.5.2 Optické vlastnosti

Niektoré materiály sa pri prechode do nano rozmerov javia v inej farbe ako za bežných veľkostí. Príkladom je zlato, kedy jeho nanočastice vykazujú červenú farbu. Tento jav je spôsobený takzvanou povrchovou plazmónovou rezonanciou, ktorá je u zlata zodpovedná za

absorpciu modrozelenej časti spektra (450 nm), zatiaľ čo odraz je v červenom spektre (700 nm). [8]

1.5.3 Teplota topenia

Bod topenia výrazne klesá, s približovaním sa veľkosti častíc k nano rozmerom. Tieto zmeny sú spôsobené tým, že nanomateriály majú oveľa väčší pomer povrchu k objemu ako vstupné práškové (bulk) materiály. Jav súvisiaci s poklesom teploty topenia je dôležitý pri materiáloch, ktoré sa v nano rozmeroch topia pri teplotách o stovky stupňoch nižších. Príkladom sú nanolinky, nanotrúbice a samotné nanočastice. [8]

1.5.4 Mechanická pevnosť

Nanomateriály môžu dosahovať až jeden alebo dvojnásobne vyššiu pevnosť v porovnaní s konvenčnými materiálmi s rovnakým zložením. Premena materiálov do nano úrovne zvyšuje kryštalickú usporiadanosť alebo redukuje defekty daného materiálu, čo vedie k zvýšenej mechanickej pevnosti. [8]

1.5.5 Chemické vlastnosti

Reaktivita častíc v nano rozmeroch sa v porovnaní s bežnými materiálmi enormne zvyšuje. V prípade nanočastíc je 50% všetkých atómov povrchových, v dôsledku čoho majú nanomateriály vyššiu energiu v porovnaní s atómami prítomnými v sypkých materiáloch. S tým súvisí aj fakt, že elektrické vlastnosti týchto častíc sú priamo spojené s chemickými vlastnosťami. Interakcie nanočastíc tiež závisia od chemickej povahy povrchu, ktorá sa v porovnaní s bežnými materiálmi náhle mení.

1.6 Klasifikácia nanomateriálov

Nanočastice môžeme všeobecne rozdeliť do dvoch hlavných skupín na: organické a anorganické. Organické nanočastice zahŕňajú uhlíkaté nanočastice (nanotrúbice, fullerény), zatiaľ čo anorganické môžu zahŕňať magnetické nanočastice, ušľachtilých kovov (zlato a striebro) a polovodičové nanočastice (oxid titaničitý a oxid zinočnatý). [7]

Ďalším typom nanočastíc vyskytujúcich sa v rôznych odvetviach sú nanočastice založené na konjugovaných polyméroch. Javia sa ako multifunkčné materiály s obrovským potenciálom a využitím napríklad ako zobrazovacie činidlá, biosenzory či fotonické

zariadenia. Ich vlastnosti sa dajú pomerne ľahko prispôbovať pre požadované aplikácie prostredníctvom výberu konjugovaných polymérov a povrchovej modifikácie. Atraktivite týchto materiálov prispieva aj ich jednoduchá syntéza, jemné vlastnosti, menšia toxicita a vyššia biologická kompatibilita v porovnaní s existujúcimi anorganickými nanočasticami. [9]

1.7 Toxikológia nanočastíc

Nanotoxikológia sa objavila až niekoľko rokov po prvom rozmachu nanotechnológií, a teda až po ich zavedení do rôznych procesov či výrobkov. Nové vlastnosti materiálov vzniknuté vďaka nano rozmerom (povrchové vlastnosti, chemická reaktivita) pútajú zvýšenú pozornosť nanotoxikológie. Zložitosť skúmania toxicity nanomateriálov sa spája so schopnosťou častíc viazať sa a interagovať s biologickou hmotou a meniť svoje povrchové charakteristiky v závislosti od prostredia, v ktorom sa nachádzajú. Kategorizácia nanomateriálov na základe ich toxicity nie je jednoduchá, vzhľadom na to, že nezávisí od dávky danej látky, ale od mnohých premenných (prostredie, materiál, veľkosť, tvar, povrch, náboj, povlak, aglomerácia, agregácia či koncentrácia). [10]

1.7.1 Mechanizmus toxicity nanočastíc

Existuje niekoľko mechanizmov, ktoré môžu spôsobiť toxicitu nanočastíc. Väčšina z nich je založená na vzniku nadbytočných reaktívnych foriem kyslíka (reactive oxygen species - ROS). Jeden z možných mechanizmov indukuje navodenie oxidačného stresu počas rozpadu nanočastíc na báze železe, ktoré katalyzujú generovanie ROS a tvorbu OOH· (peroxylových) a OH· (hydroxylových) radikálov z peroxidu vodíka. Niektoré inertné nano materiály nespôsobujú spontánnu produkciu ROS, ale sú schopné navodiť ich produkciu v biologických systémoch tým, že pôsobia na mitochondrie. ROS sú pre organizmus nevyhnutné a zároveň aj deštruktívne. Ich mierne hladiny zohrávajú špecifické úlohy pri mnohých bunkových pochodoch vrátane transdukcie signálu, pri génovej expresii, či pri regulácii redoxného potenciálu proteínov. Na druhej strane, vysoké hladiny ROS môžu navodiť oxidačný stres a poškodiť bunky peroxidáciou lipidov, zmenou vlastností proteínov, narušením DNA, zasahovaním do signalizačných procesov v bunke, moduláciou transkripcie génov. ROS tiež môžu spôsobiť ochorenie obličiek, neurodegeneráciu, kardiovaskulárne či pľúcne ochorenia a spotrebovaním elektrónov z bunkovej membrány navodiť pokles fyziologických funkcií a smrť buniek. Je známe, že hladina oxidačného

stresu ovplyvňuje bunkovú signalizáciu v troch stupňoch. Jeho nízka hladina zvyšuje transkripciu obranných génov. Vyššia hladina aktivuje zápalovú signalizáciu a veľmi vysoké hladiny sú spojené s aktiváciou apoptických mechanizmov a nekrózy buniek. [10]

2 NANOMATERIÁLY V KOZMETIKE A FARMÁCI

Rýchly vývoj nanotechnológií vyústil do rastúceho počtu spotrebiteľských produktov založených práve na nanomateriáloch. Vzhľadom na ich jedinečné fyzikálne vlastnosti, dané materiály výrazne zmenili funkciu a aplikáciu komerčných produktov v oblasti ošetrovania rán, kozmetiky, detergentov, balenia potravín, liekov, biosenzorov či antimikrobiálnych povrchov. V záujme kozmetického priemyslu sú aj nanočastice využívané v systémoch dodávania liekov, ktoré zahŕňajú nanoenkapsulačné vezikulárne systémy, lipozómy, micely, polymérne nanokapsule a.t.d.. Popularitu získali najmä nanočastice na báze minerálov oxidu titaničitého (TiO_2) a oxidu zinočnatého (ZnO) pre ich schopnosť odrážať a rozptyľovať UVA a UVB žiarenie. Vyrábajú sa v rôznych kompozíciách, tvaroch, štruktúrach či veľkostiach.

Výhody použitia nanomateriálov v kozmetike:

- zlepšenie stability kozmetických zložiek (napríklad nenasýtené mastné kyseliny, vitamíny, antioxidanty enkapsulované v nanočasticiach),
- zvýšenie penetrácie niektorých zložiek,
- zvýšenie účinnosti UV filtrov na povrchu kože,
- zvýšenie spotrebiteľskej atraktivity (transparentnosť opaľovacích prípravkov).

[11] [12]

Pri používaní nanomateriálov v kozmetike je potrebné dodržiavať legislatívne požiadavky, ktoré sú uvedené v kapitole 4.

2.1 Spôsobu využitia nanočastíc v kozmetike

2.1.1 Nanočastice v emulzii

Emulzifikačné a solubilizačné technológie sú používané v kozmetike hlavne na starostlivosť o pleť ako sú pleťové vody, lotiony a telové mlieka či krémy. Zmenou poradia miešania jednotlivých zložiek alebo tlaku v procese vytvárania emulzie je možné ovládať veľkosť emulgovaných častíc na nanometre. Metódy prípravy ultrajemných emulzií sú povrchová chemická a mechanická metóda. Z povrchových chemických metód sa využívajú najčastejšie fázová inverzia, aminokyselinová gélová emulzifikácia, HLB (hydrofilne-lipofilná rovnováha) teplotná emulzifikácia, ale aj agregáčna metóda. Agregáčnou metódou je možné pripraviť emulziu s veľkosťou častíc menšou ako 50 nm rozpustením surfaktantu,

oleja a vody a následným ochladením na izbovú teplotu, čím sa systém prenesie na dvojfázovú oblasť. Pre vytvorenie emulzie s malými rozmermi častíc je dôležité použiť vhodný emulzifikačný prístroj. Požiadavkou je vysoká strihová sila, ale taktiež mechanické sily ako šmyková, kavitačná a nárazová. Medzi prístroje využívané k emulzifikácii patria vysokotlakový homogenizátor, ultrazvukový emulgačný prístroj, statický miešací prístroj, nízkorýchlostné a vysokorýchlostné miešacie prístroje. Priemerná veľkosť častíc ultrajemných emulzií je od 50 do 1000 nm. Aplikujú sa v kozmetike zväčša kvôli kontrolovanému prenosu zložiek v kozmetických výrobkoch starostlivosti o pleť, v deodorantoch, opaľovacích prípravkoch, šampónoch a ostatných prípravkoch na vlasy. Vďaka svojim rozmerom emulzie ostávajú transparentné a stabilné po dlhšiu dobu. Majú dobré biofyzikálne a senzorické vlastnosti ako rýchlosť penetrácie či hydratačný účinok. [12]

2.1.2 Mikroemulzie

Mikroemulzie sú definované ako homogénne, transparentné, termodynamicky stabilné typy emulzií, v ktorých sú dispergované kvapôčky extrémne malé (menej ako 100 nm). Vznikajú spoločným zmiešaním oleja, vody a surfaktantu a kosurfaktantu. Surfaktant a kosurfaktant sa do mikroemulzií pridávajú za účelom stabilizácie systému, pretože separácia olejovej a vodnej fázy je jeden z najčastejších dôvodov rozpadu emulzie. [13] [14] [15]

2.1.3 Nanočastice v disperzných systémoch

Nanočastice použité v disperzných systémoch sú typické hlavne pre prípravky na ochranu proti UV žiareniu. V týchto typoch kozmetických prípravkov sa okrem organických filtrov absorbujúcich UV žiarenie miešajú aj nanočastice oxidu titaničitého či oxidu zinočnatého, ktoré majú schopnosť dané žiarenie rozptyľovať a odrážať. [12]

2.1.4 Nanočastice ako funkčná nanokonzervácia

Povrch niektorých častíc (kyseliny, zásady), vykazuje v spojení s nanočasticami istú katalytickú aktivitu, ktorá môže spôsobiť degradáciu parfumov či olejov. V prípade použitia nanočastíc s veľkým špecifickým povrchom je potrebné tejto aktivite zabrániť. Funkčná nanokonzervácia sa realizuje pomocou 2,4,6,8-tetramethylcyklotetrasiloxanu, ktorý vytvorí na povrchu častice sieťovaný silikón s hrúbkou do 1 nm. Vďaka tejto konzervácii sa zabráni katalytickej aktivite a tým aj zhoršeniu senzorických vlastností parfumov či olejov. [16]

2.1.5 Transportné systémy

Pravdepodobne najčastejším dôvodom použitia nanomateriálov v kozmetike je zlepšenie dodávania kozmetických prísad do kože. Malé veľkosti lipidických vezikúl môžu umožniť rýchlejšie vstrebávanie nanomateriálov do pokožky. Vedecké štúdie tejto problematiky preukázali rozdielne výsledky, ktoré boli spôsobené pravdepodobne študijnými podmienkami a rozdielnymi vlastnosťami skúmaných materiálov ako je veľkosť a stabilita nanočastíc. Rozdielne fyzikálno–chemické vlastnosti týchto vezikúl ovplyvňujú interakcie daných zložiek s kožou. Niektoré vezikuly nemusia prenikať do kože, ale ich úlohou je uvoľniť danú zložku na povrchu. Ďalším využitím nanomateriálov v kozmetike je poskytnutie stability kozmetickým formuláciám, ktoré obsahujú zložky rozkladajúce sa pôsobením oxidácie, či iných faktorov. [17]

2.1.5.1 Lipozómy

Lipozómy predstavujú vezikulárne štruktúry s vodným jadrom, ktoré sú obklopené hydrofóbnou lipidovou dvojvrstvou vytvorenou fosfolipidmi. Patria medzi najznámejšie kozmetické transportné systémy slúžiace na transdermálne podávanie jednotlivých látok. Vyskytujú sa vo veľkostiach od 15 nm do niekoľkých μm a majú buď jednu vrstvu (unilamelárne), alebo sú viacvrstvé. Fosfatydidilcholín, ktorý je jednou z hlavných zložiek lipozómov je široko využiteľný v kozmetických výrobkoch pre starostlivosť o pleť a šampónoch, kvôli jeho schopnosti zmäkčovania a kondicionovania. Boli vytvorené aj typy lipozómov s postupným uvoľňovaním látok (napríklad vitamínov) počas dlhého časového obdobia. Osvedčili sa v prípravkoch na spomalenie vypadávania vlasov a v starostlivosti o pleť, pretože znižujú transdermálnu stratu vody a zvyšujú prísun lipidov do *stratum corneum*. [12]

2.1.6 Lipidické nanočastice

Prvá generácia pevných lipidických nanočastíc (Solid Liquid Nanoparticles – SLN) bola vyvinutá na začiatku 90. rokov ako alternatíva pre nosiče emulzií, lipozómov či polymérnych nanočastíc. SLN sú vyrábané nahradením kvapalného lipidu v emulzii o/v pevným lipidom, alebo zmesou pevných lipidov, ktoré sú tuhé aj pri telesnej teplote. Stabilizácia SLN sa prevádza pomocou povrchovo aktívnych látok. Ich funkcia spočíva v ochrane enkapsulovaných zložiek, ktoré sú určené na riadené dodávanie kozmetických prostriedkov pred degradáciou a na zlepšenie prestupu účinných látok do *stratum corneum*.

Taktiež bolo dokázané, že kozmetické formulácie obsahujúce SLN majú lepšie hydratačné účinky.

Druhou generáciou lipidických nanočastíc sú nanoštrukturované nosiče lipidov (Nanostructured Lipid Carrier – NLC), pozostávajúce zo zmesi pevného a kvapalného lipidu, pričom sú pri telesnej teplote takisto pevné. NLC v porovnaní s SLN znesú vyššie množstvo účinných látok. NLC a SLN sú koloidné systémy s výhodnými kozmetickými a dermatologickými vlastnosťami (okluzíva, hydratačné schopnosti, bieliace účinky, ochrana zložiek pred degradáciou, zvýšenie penetrácie či vlastnosti riadeného uvoľňovania prísad). Požívajú sa ako nosiče pre riadené uvoľňovanie prísad ako je napríklad koenzým Q10, tokoferol či retinol. [12] [18]

2.1.7 Nanokapsule

Ďalším spôsobom využitia nanomateriálov v kozmetike sú submikroskopické častice pozostávajúce z polymérnej kapsuly, ktorá obklopuje vodné alebo olejové jadro – nanokapsule. Bolo preukázané, že použitie nanokapsúl znižuje penetráciu aktívnych látok, napríklad oktylmetoxycinamátu (OMC) v koži ošpaných v porovnaní s bežnými emulziami. OMC patrí k najpoužívanejším UVB filtrom, ktorý môže pôsobiť ako fotoalergén alebo môže vyvolať scitlivenie pokožky. Pri vystavení OMC slnečnému žiareniu môže dôjsť k zmene jeho formy z trans na cis a tým k zníženiu jeho účinnosti, čomu enkapsulácia dokáže zabrániť v dôsledku zvyšovania jeho fotostability. [12] [19]

2.1.8 Nanokryštály

Nanokryštály - kryštály menšie ako 1 μm (zvyčajne od 10 do 400 nm) sú agregáty, ktoré obsahujú množstvo atómov spájajúcich sa do klastrov. V kozmetických prípravkoch môžu byť použité zle rozpustné látky vo forme nanokryštálov, pretože poskytujú vysokú penetračnú silu pri aplikácii na pokožku. Konkrétnym príkladom sú zle rozpustné rastlinné glykozidové antioxidanty, ktoré sa v inej forme nedali doposiaľ dermálne použiť. Ako náhle sú však použité vo forme nanokryštálov, stávajú sa dermálne dostupné a majú merateľný antioxidačný účinok. Využiteľné sú v akýchkoľvek kozmetických formuláciách ako sú krémy, pleťové vody a lipozomálne disperzie. [12]

2.2 Oxid titaničitý

Diplomová práca sa v praktickej časti zameriava hlavne na nano oxid titaničitý, preto je potrebné zhrnúť jeho základné charakteristiky. V krátkosti bude opísaný aj oxid zinočnatý, ktorý takisto patrí ku fyzikálnym UV filtrom.

2.2.1 Štruktúra (TiO₂)

Oxid titaničitý sa radí do skupiny oxidov prechodných kovov. Vyskytuje sa v štyroch rôznych polymorfných formách a to ako anatas (tetragonálna sústava), brookit (kosoštvorcová sústava), rutil (tetragonálna sústava) a TiO₂ (jednoklonná sústava).

Rutil je stály vo pri väčšine teplotách a pri tlaku do 60 kbar. Po dosiahnutí určitej veľkosti sa anatasová a brookitová forma transformujú na formu rutilovú, ktorá je stabilnejšia. Vo všeobecnosti má ako fotokatalyzátor veľmi slabú aktivitu, avšak závisí to od podmienok jeho prípravy.

Anatas je forma vyskytujúca sa v tetragonálnej sústave a v porovnaní s rutilom je pri teplote 0 K stabilnejšia, ale energetický rozdiel medzi týmito dvomi fázami je malý. Táto štruktúra je v porovnaní s ostatnými výhodná pre aplikácie v solárnych článkoch. Bol tiež preukázaný aj ako najefektívnejší vhodný fotokatalyzátor pre degradáciu znečisťujúcich látok v životnom prostredí a to kvôli jeho nízkym nákladom, netoxicite, dostupnosti, relatívne vysokej účinnosti a štruktúrnej stabilite.

Brookit patrí do skupiny látok vyskytujúcich sa v kosoštvorcovej kryštalickej sústave, je zložitejší a na experimentálne účely sa často nevyužíva. [20] [21]

2.2.2 Nano TiO₂

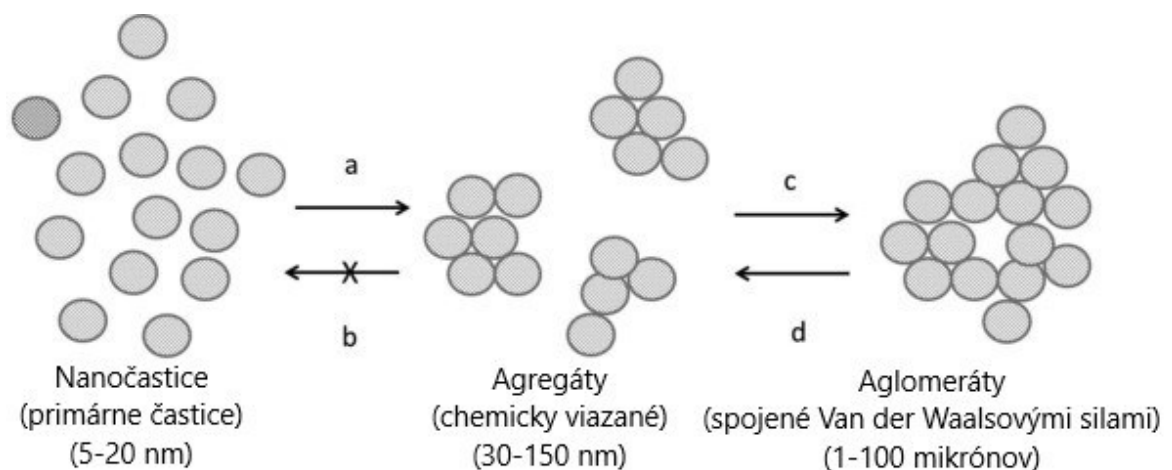
Oxid titaničitý vo forme nanočastíc sa stal súčasťou každodenného používania, pretože sa nachádza v zozname zložiek bežných výrobkov pre domácnosť ako sú kozmetické výrobky (hlavne opaľovacie krémy či zubné pasty), potravinárske farbivá ale aj farby a nátery vitamínových doplnkov. Vyznačuje sa vysokým indexom lomu a bielym sfarbením, z čoho vyplýva aj jeho najbežnejšie využitie ako pigmentu. Vo forme nanočastíc je najviac využívaný v opaľovacích prípravkoch, pretože vďaka menším rozmerom (0,2 - 100 nm) nadobúdajú tieto prípravky pri aplikácii na pokožku transparentnosť, zatiaľ čo jeho reflexné vlastnosti ostávajú zachované. Nanočastice oxidu titaničitého sa vďaka vlastnostiam absorbovať a rozptyľovať UV žiarenie používajú ako plnidlá do komerčných prípravkov

proti slneniu. Kryštály TiO_2 absorbujú najmä žiarenie od vlnovej dĺžky 280 do 315 nm. [22] [23]

Oxid titaničitý, ale aj oxid zinočnatý v nano forme existujú v troch rôznych štádiách:

- primárne častice (5-20 nm),
- agregáty (30-150 nm),
- aglomeráty (1-100 mikrónov).

Primárne častice sa zhlukujú a vytvárajú tak agregáty, ktoré predstavujú najmenšie jednotky prítomné v konečnom prípravku na ochranu proti slnečnému žiareniu. Väčšie aglomeráty vznikajú, keď sa agregáty voľne viažu počas výrobného procesu. V tejto forme nemajú funkciu účinných absorbérov UV žiarenia, preto je potrebné ich rozdeliť na účinnejšie agregáty, ktoré sú chemicky viazané. [24]



Obr.2 Znážornenie častíc vo forme agregátov a aglomerátov [25]

2.2.2.1 Foto aktivita

Viacere výskumy potvrdili, že oxid titaničitý má oveľa lepšie vlastnosti ako fotokatalyzátor práve vo forme nanočastíc (veľkosť 60 – 120 nm) v porovnaní s práškom s veľkými časticami. Keď priemer kryštálov danej polovodičovej častice klesne pod kritický polomer 10 nm, každý náboj nosiča sa chová kvantovo mechanicky. Kvantové častice teda majú vyššiu fotoaktivitu ako makrokryštalické polovodičové častice a použitím týchto zložiek sa zvyšuje fotoefektívnosť systémov. Obmedzujúcim krokom je rýchlosť prenosu náboja. Najpoužívanejšou formou oxidu titaničitého, ktorá je vhodná ako UV filter je kryštalická

forma rutilu. Efektívne ochranné emulzie musia byť navrhnuté ako zmes niekoľkých UVA a UVB filtrov, ktoré však môžu ovplyvniť stabilitu konečnej zmesi. Foto aktivita oxidu titaničitého ma priamy vplyv na stabilitu všetkých organických zlúčenín, teda môže spôsobiť deštrukciu organických UV filtrov. Na druhej strane bolo však zistené, že po prídavku organického UV filtra sa účinnosť ochrany môže až zdvojnásobiť, pôsobia teda synergicky. Základným predpokladom pre použitie tohto materiálu v ochrannom systéme proti UV žiareniu v kozmetických prípravkoch je proces deaktivácie fotoaktivity. [26] [27]

2.3 Oxid zinočnatý

Oxid zinočnatý (ZnO) spolu s oxidom titaničitým sa v kozmetike využívajú hlavne v prípravkoch proti slneniu ako účinné anorganické fyzikálne blokátory UV žiarenia. ZnO, narozdiel od TiO_2 , ktorý je účinný v oblasti UVB, je účinnejší v oblasti UVA (320 – 400 nm). Kombináciou týchto dvoch fyzikálnych UV filtrov sa dosahuje zabezpečenie vysokej ochrany. Postupom času sa mikročastice stále viac nahradzujú časticami týchto zlúčenín v nano veľkosti. Týmto postupom sa vyriešil problém s nepriehľadnosťou daných kozmetických prostriedkov a nanočastice zabezpečujú výrobkom transparentnosť. [26]

2.3.1 Antibakteriálna aktivita nano ZnO

Na hodnotenie antibakteriálneho účinku oxidu zinočnatého v nano forme boli vykonané mnohé štúdie. Pôsobenie na mikroorganizmy bolo skúmané ako na G^+ tak aj na G^- typoch bakteriálnych buniek. Citlivosť G^+ baktérií na pôsobenie ZnO je vyššia ako citlivosť G^- baktérií, pretože antibakteriálny účinok nano ZnO prebieha prostredníctvom jeho interakcie so špecifickými bunkovými jednotkami, ktoré majú vyššie zastúpenie práve v G^+ bakteriálnych bunkách. V niektorých prípadoch bolo antimikrobiálne pôsobenie porovnateľné s účinkom antibiotík ako sú gentamicín či metilín. Antimikrobiálna aktivita súvisí s veľkosťou častíc oxidu zinočnatého, pretože menšie častice vykazujú túto aktivitu silnejšiu. Medzi jeden z mechanizmov pôsobiacich proti mikroorganizmom patrí vytváranie peroxidu vodíka z povrchu častice. Množstvo vytvoreného peroxidu vodíka takisto súvisí s veľkosťou daného oxidu, pretože menšie častice ho produkujú viac. Ďalším možným mechanizmom antibakteriálnej aktivity nanočastíc ZnO je uvoľňovanie iónov Zn^{2+} . [28]

Vďaka týmto antimikrobiálnym vlastnostiam sa ZnO okrem farmácie a kozmetiky využíva v náteroch, tmeloch a lepidlách. Ďalšie aplikácie zahŕňajú využitie v elektrospotrebičoch, plastoch, cementoch, potravinách, keramike, pigmentoch a v mnohých ďalších odvetviach.

Širokospektrálnosť využitia ZnO je vďaka jeho vlastnostiam ako transparentnosť, biokompatibilita, či fotokatalytická účinnosť. [29]

2.4 Toxicita nano TiO₂ a ZnO

Nanočastice sa v súčasnej dobe používajú v mnohých kozmetických výrobkoch, avšak skutočný podiel použitého nanomateriálu závisí od definície danej zložky použitej v nano veľkosti. Niektoré z týchto nanomateriálov môžu mať zvýšenú biologickú dostupnosť alebo toxicitu, preto jedným z najdôležitejších faktorov pre posúdenie potenciálneho rizika je kožná absorpcia. [17]

Ako už bolo v práci spomenuté, v prípravkoch na ochranu proti slnečnému žiareniu sa využívajú fyzikálne UV filtre väčšinou vo forme agregátov. Aglomeráty sa primárne v prípravkoch nevyskytujú, ale môžu sa vytvoriť na povrchu kože po nanosení, čo by znamenalo, že pre penetráciu do pokožky je k dispozícii menej primárnych nanočastíc. [30]

2.4.1 Cytotoxicita

Aj oxid titaničitý aj oxid zinočnatý môžu prostredníctvom UV indukovanej fotokatalýzy vytvárať reaktívne kyslíkové zlúčeniny, ktoré následne môžu spôsobiť poškodenie bunkových zložiek a makromolekúl (lipidy, proteíny, nukleové kyseliny). Toto poškodenie môže viesť až k bunkovej smrti. ROS vytvorené fotokatalýzou sú cytotoxické a indukujú poškodenie DNA v rôznych typoch buniek ako sú napríklad bunky ľudského karcinómu hrubého čreva, ľudské fibroblasty, gliálne a neurálne bunkové línie a.t.d. . Na liečbu v zmysle zabránenia účinkom ROS sa využívajú ich zachytávače alebo antioxidanty (napr. N-merkaptopropionylglycín, N-acetylcysteín), ktoré by mali zabrániť nanočasticovej indukovanej cytotoxicite s dôrazom na centrálnu úlohu oxidačného stresu.

Pri testoch cytotoxicity *in vivo* vykonaných na hlodavcoch spôsobili nanočastice ZnO mierny akútny pľúcny a systémový zápal, poškodenie pľúcnych buniek a zníženie antioxidantnej kapacity pľúc. Silná zápalová reakcia sa potvrdila aj u potkanov, ktorým bol podaný TiO₂ vnútrožilovo. Táto reakcia bola spôsobená rozsiahlou infiltráciou leukocytov a tvorbou ROS. [31]

2.4.2 Genotoxicita

Genotoxicita je spôsobená primárnym priamym poškodením genetickej informácie - interakciami nanočastíc s DNA. Primárna nepriama genotoxicita je vyvolaná interakciou DNA s reaktívnymi zlúčeninami kyslíka a s reaktívnymi zlúčeninami dusíka (Reactive nitrogen species - RNS). Nanočastice môžu zvýšiť produkciu ROS a RNS alebo spomaliť ich likvidáciu antioxidantným systémom. Sekundárny nepriamy toxický účinok je vyvolaný stimuláciou zápalovej reakcie, kedy dochádza k produkcii ROS a následne ku poškodeniu DNA. [32]

Tab. 1. Porovnanie výsledkov bežných genotoxických testov nanočastíc TiO_2 a ZnO [32]

Nanočastice	Amesov test	Chromozómové aberácie	Mikronukleus test	Kometový test	<i>In vivo</i> genotoxicita
TiO₂	-	-	+	+	-
ZnO	-	+	-	+	-

- Negatívny test, + pozitívny test

Krátka charakteristika testov:

- Amesov test je relatívne rýchly a lacný spôsob posúdenia mutagénneho potenciálu chemických látok, pomocou baktérie *Salmonella typhimurium*. [33]
- Chromozómové aberácie sú jedným z typov mutácií, ktoré vo väčšine prípadov vedú k zmene fenotypu, a to prevažne patologickej povahy. Niektoré bunky sú citlivejšie na pôsobenie mutagénov a prejavuje sa u nich daný typ mutácie, preto sa niektoré látky testujú na schopnosť vytvorenia chromozómových aberácií. [34]
- Mikronukleus test *in vivo* u cicavcov slúži k odhaleniu poškodenia, ktoré testovaná látka spôsobuje v chromozómoch, alebo v mitotickom aparáte erytroblastov. Test spočíva v tom, že sa analyzujú erytrocyty z kostnej drene alebo z periférnej krvi zvierat, obvykle hlodavcov. [35]
- Kometový test, alebo gélová elektroforéza jednotlivých buniek je mikroeletroforetická metóda pre zistenie poškodenia DNA na úrovni jednotlivých buniek. [36]
- *In vivo* genotoxicita je štúdium biologických pochodov (sledovanie genotoxicity) za života organizmu. [37]

2.5 Iné typy nanočastíc využívané v kozmetike a farmácii

Okrem nanočastíc oxidu titaničitého a zinočnatého sa v kozmetike a farmácii využíva rada ďalších prvkov v nano veľkosti. Zastupujú rôzne funkcie od dodávania liekov cez biomedicínske využitia až po prípravky v kozmetike na starostlivosť o pleť, vlasy či zubnú hygienu a mnohé ďalšie.

2.5.1 Nanočastice zlata

Nanočastice zlata sa využívajú hlavne ako inertné nosiče v medicínskych odvetviach a pri terapeutickej liečbe a diagnostike ochorení ako je rakovina, Alzheimerova choroba, hepatitída, artritída, diabetes a mnohé ďalšie. V kozmetickom priemysle môžu byť využité ako kožný transportný systém. [38] [39]

2.5.2 Nanočastice striebra

Nanočastice striebra sú veľmi často využívané v rôznych priemyselných odvetviach vďaka ich antimikrobiálnym, optickým, katalytickým a dezinfekčným vlastnostiam. Jeho častice sú využívané hlavne v kozmetike (zubné pasty, izbové spreje, deodoranty, šampóny), vo výrobkoch pre domácnosť, potravinárskych výrobkoch, v medicínskych zobrazovacích metódach, v biosenzoroch, v hračkách, či vo vodných čistiacich systémoch. Nanočastice striebra pokryté kolagénovým povlakom v kolagénovom hydrogéli vykazujú vo výrazne nižších koncentráciách protiinfekčné vlastnosti proti *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. [39]

2.5.3 Nanočastice hliníka

Hliník je tretím najrozšírenejším prvkom zeme a je široko využiteľný v mnohých odvetviach. Nanočastice oxidu hlinitého sa používajú v kozmetických a keramických výrobkoch, alebo aj v biomedicínskych produktoch ako sú kostné implantáty. [39]

2.5.4 Nanočastice methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenylu

Podľa nariadenia Európskej Únie, ktorým sa mení príloha VI nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kozmetických prípravkoch je methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenyl (MBBT) jedným z ďalších povolených fyzikálnych UV filtrov v použití do kozmetických prípravkov. Vedecký výbor pre bezpečnosť

spotrebiteľa (VVBS) dospel k záveru, že použitie danej látky s požadovanými charakteristikami (čistota, stredná veľkosť častíc, veľkostné rozdelenie častíc) je bezpečné pri aplikácii na zdravú pokožku a nepredstavuje riziko pre ľudské zdravie. Závery tohto stanoviska sa nevzťahujú na aplikácie, ktoré môžu viesť k expozícii pľúc konečného spotrebiteľa MBBT (nano) pri vdychovaní. S ohľadom na stanovisko VVBS by malo byť použitie MBBT v kozmetických prípravkoch povolené v koncentrácii najviac 10% s výnimkou aplikácií, pri ktorých môže viesť k expozícii pľúc konečného užívateľa touto látkou pri jej vdychovaní. [40]

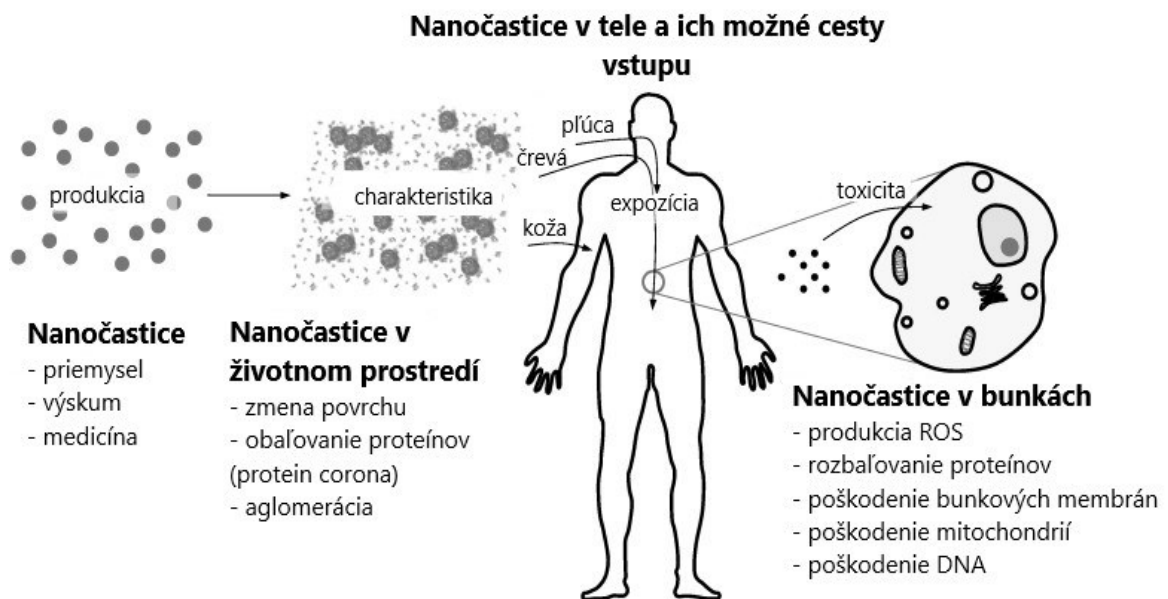
2.5.5 Prehľad ďalších nanomateriálov v kozmetike

Tab. 2. Vybrané príklady nanočastíc využívaných v kozmetike [41]

Trieda	Materiál	Funkcia	Príklad produktu
Činidlo	Arbutín	Bielenie	Nano Bright™
Kovy a oxidy kovov	ZnO	Opal'ovacie prípravky	ZinClear-IM™
	Ag	Antibakteriálna zložka	GNS Nanogist
	Fe _x O _y	korektor	Minerálny základ
	Au	Konjugované hodvábné mikrovlnáko	Chantacaille Nano Gold Energizing Cream
	Ti _x O _y	Opal'ovacie prípravky	Soltan®
	Al/Al ₂ O ₃	Starostlivosť o vlasy	Nano Weight Pro 1800
Nano íl a silica	SiO ₂	Spevnenie pokožky, dodávanie aktívnych zložiek	LEOREX®, Rénergie®
	SiO ₂ /Me _x O _y	Opal'ovacie prípravky	Eusolex® UV Pearls
Vezikulárne tukové nano nosiče	Lipozómy, ceramidy, nanoemulzie	Dodávanie aktívnych zložiek	Revitalift®, Lyphazome®
SLN	Pevný tuk	Dodávanie aktívnych zložiek	Lipopearl™, Nanopearl™
	Vosk	Vlasový styling	Pureology®
Prirodzené alebo modifikované polyméry	Kyselina hyalurónová	Hydratačné činidlo	PowerMoist™ Nano Hyaluronic acid
Syntetické polyméry	Nanokapsule	Dodávanie aktívnych zložiek	Primordiale Intense, Hydra Flash® Bronzer

3 CESTY VSTUPU NANOČASTÍC DO ORGANIZMU A ICH PÔSOBENIE NA JEDNOTLIVÉ TYPY BUNIEK

Nanočastice uvoľnené do životného prostredia interagujú so vzduchom, vodou a pôdou, čím sa často menia ich povrchové vlastnosti. To môže viesť k agregácii alebo k zmene povrchového náboja častíc a k zmenám ďalších povrchových vlastností. Je preto dôležité poznať správanie sa nanočastíc v životnom prostredí, na zistenie, či môžu spôsobovať toxicitu ako kontaminanti. Počet výrobkov v potravinárskom a kozmetickom priemysle založených na báze nanomateriálov sa neustále zvyšuje (využitie v cukrových filmoch, zubných pastách, krémoch na opaľovanie, kapsule...). Ľudia sú neustále vystavení pôsobeniu nanomateriálov, preto sa čoraz viac štúdie zaoberajú skúmaním príjmu nanomateriálov orálne-gastrointestinálnou cestou. [32], [42], [43]



Obr.3. Nanočastice v tele a možné cesty vstupu nanočastíc do organizmu [42]

3.1 Cesty vstupu nanočástíc do tela

Bolo preukázané, že nanočastice sa do tela môžu dostať tromi rôznymi mechanizmami:

- prostredníctvom dýchacích ciest;
- cez pokožku;
- ich požitím.

Taktiež bolo dokázané, že sú schopné sa v malých množstvách translokovať do sekundárnych orgánov. Hlavnou cestou pre ich vstup do organizmu je cez dýchací systém. Existuje mnoho správ o veľmi jemných časticiach ako sú prach, sadza a iné znečisťujúce látky a ich účinkoch na pľúca a dýchacie cesty. Ľudský organizmus má určité obranné mechanizmy na regulovanie cudzorodých častíc (hlen, mukocilárny eskalátor), no je pravdepodobné, že nanočastice sú schopné premiestniť sa aj napriek nim z pľúc do sleziny, pečene, srdca, prípadne iných orgánov. Okrem expozície z pľúc môžu inhalované častice preniknúť k iným orgánom cez čuchový bulbus, čo predstavuje potenciálne riziko z neutotoxikologického hľadiska, pretože častice by tak mohli získať prístup k centrálnemu nervovému systému.

Keďže sa nanočastice hlavne oxidu titaničitého využívajú vo veľkej miere v opaľovacích prípravkoch, ďalšou možnou cestou vstupu týchto nanočastíc je vstup cez kožu, presnejšie cez vlasové folikuly, rany alebo kožné lézie. U žien je všeobecne známe, že majú tenšiu pokožku, čo uľahčuje prestup nanočastíc. Na objasnenie tohto javu sú však potrebné ďalšie štúdie. [42] [32]

Nanočastice sa čoraz viac využívajú aj v potravinárskom priemysle ako potravinové prísady, či pri spracovaní a balení. Existujú teda obavy, že by mohli získať prístup ku krvnému riečištiu prostredníctvom gastrointestinálneho traktu. Absorpcia nanočastíc črevom je možná a závisí od veľkosti častíc.

Miera absorpcie orálnou cestou a gastrointestinálnym traktom je závislá na veľkosti častíc v nano rozmeroch. Príkladom je napríklad absorpcia kovových nanočastíc, ktorá je u menších a nabitých časticiach väčšia. Pri absorpcii pľúcami je takisto dôležitá veľkosť. Nimi sa absorbujú tzv. respirabilný podiel a častice sa po kontakte so stenami dýchacieho traktu ukladajú v dýchacích cestách. Pre častice väčšie ako 500 nm je hlavným mechanizmom sedimentácia, ktorá je riadená gravitáciou, alebo tzv. inertný zásah, ktorý nastáva v prípade, že sa v pľúcach zmení prúdenie vzduchu. Pre častice menšie ako 500 nm je depozícia

riadená difúziou. U oxidu titaničitého o veľkosti 4 nm bolo zistené prenikanie až do bazálnych buniek epidermu. [32]

3.2 Pôsobenie nanočastíc na bunky

Nanomateriály, ktoré sa bežne používajú v kozmetických výrobkoch môžeme rozdeliť do dvoch skupín:

- rozpustné a/alebo biologicky odbúrateľné nanočastice - pri aplikácii na kožu sa rozpadajú na molekulárne zložky (napríklad niektoré lipozómy);
- nerozpustné, dostatočne stabilné a/alebo bioperzistentné nanočastice (napríklad oxid titaničitý, fullerény) - pri určitých vlastnostiach sú schopné prekročiť biologické membrány a mať škodlivé účinky na organizmus. [44]

Pri posudzovaní nanotoxikológie v testoch *in vitro* je potrebné zvážiť dávku daných častíc, teda počiatočnú koncentráciu pri vystavení buniek nanočasticiam, ale aj skutočné množstvo nanočastíc prijatých jednou bunkou. Toxikologické pôsobenie na bunky je možné dvoma hlavnými spôsobmi – fyzikálnymi a chemickými. [42]

3.2.1 Chemické mechanizmy nanotoxikológie

Ako už bolo spomenuté podrobnejšie v kapitole o mechanizme toxicity nanočastíc, chemické mechanizmy zahŕňajú produkciu ROS, rozpustenie a uvoľnenie toxických iónov, narušenie transportnej aktivity iónov v bunkovej membráne či oxidačné poškodenie katalýzou. Vznik ROS sa považuje za hlavný základný chemický proces v nanotoxikológii, ktorý vedie k sekundárnym procesom a tie môžu spôsobiť poškodenie až smrť buniek. Vznik ROS sa považuje tiež za jeden z hlavných faktorov vzniku zápalových reakcií. [42]

3.2.2 Fyzikálne mechanizmy nanotoxikológie

Fyzikálne mechanizmy sú hlavne výsledkom veľkosti častíc a povrchových vlastností častíc. Patrí medzi ne poškodenie membrán, poškodenie membránovej aktivity, ovplyvnenie transportných procesov, zmena konformácie proteínov či ich agregácia. [42]

3.2.3 Pôsobenie nanočastíc na bunkovej úrovni

Významnú úlohu pri interakciách s bunkovými membránami či tkanivami hrá pri nanočasticiach ich povrch. Interakcie nanočastíc s membránami môžu vyústiť buď k ich

mechanickému alebo chemickému poškodeniu. U biologicky aktívnych látok môže byť spôsobená zmena konformácie a tým môže byť ovplyvnená ich funkcia. Pôsobenie nanočastíc na proteíny či enzýmy spôsobuje inhibíciu ich aktivity a v prípade DNA môžu mať interakcie s nanočasticami genotoxický či mutagénny účinok. [32]

3.2.4 Vplyv nanočastíc na bunkové membrány

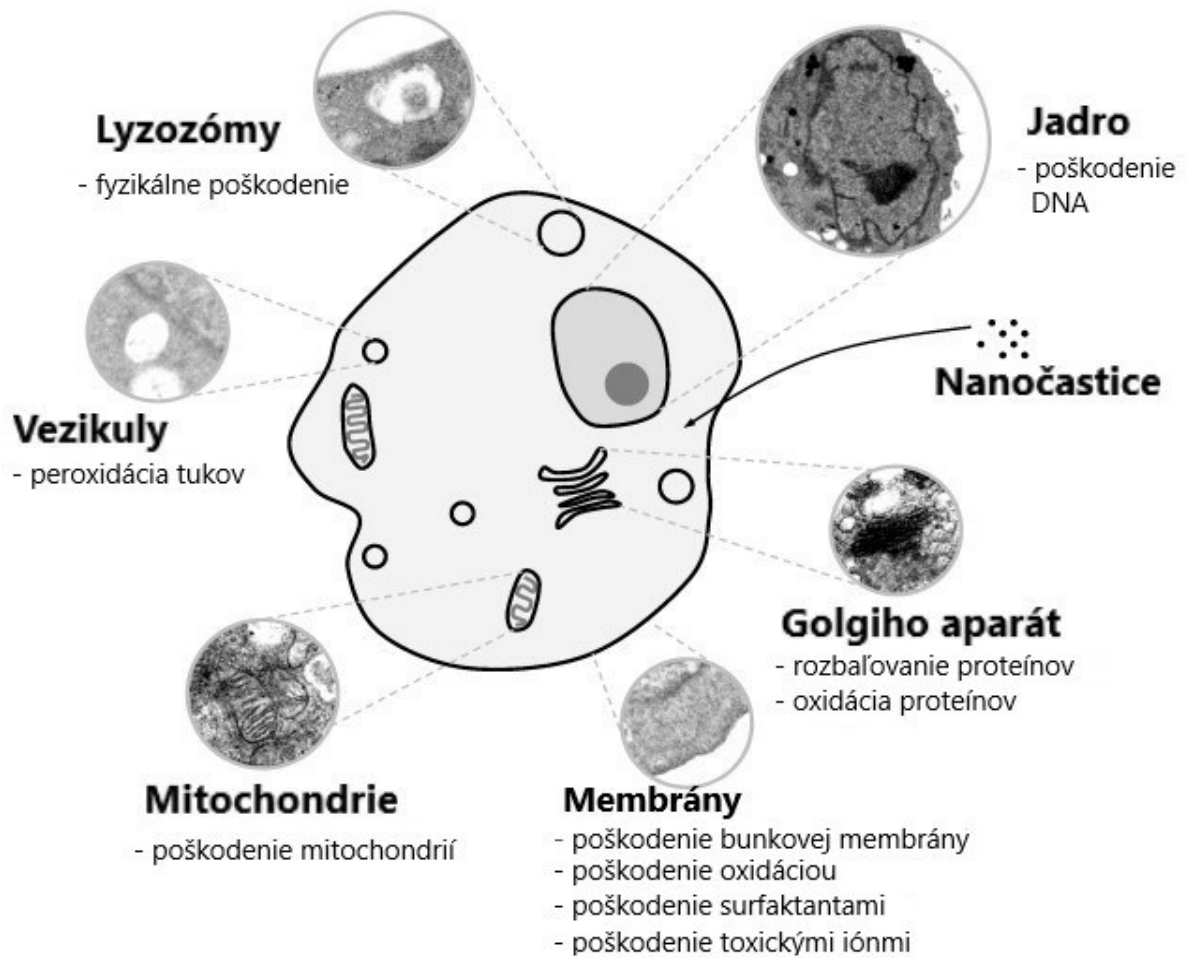
Bunková plazmatická membrána je zložená z fosfolipidovej dvojvrstvy s obsahom proteínov, cholesterolu a oligosacharidov, ktoré sa v nej môžu voľne pohybovať. Okrem týchto zložiek obsahuje aj vodu a ióny. Biomembrány vo všeobecnosti separujú dve chemicky a metabolicky odlišné fázy. Oddelujú vnútorné časti bunky od vonkajšieho prostredia alebo organely od zvyšku bunky. Pôsobia ako selektívna priepustná (polopriepustná) prekážka umožňujúca určitým látkam prejsť a iným zase nie. [45]

Stabilita membrány môže byť nanočasticami ovplyvnená buď priamo (napríklad fyzikálnym poškodením), alebo nepriamo (napríklad oxidáciou), čo môže viesť až k bunkovej smrti. Interakcie nanočastíc s membránami vo veľkej miere závisia od povrchových vlastností nanočastíc, ale aj od ich veľkosti, pretože ovplyvňuje povrchový tlak a adhézne sily. Rôzne nanomateriály sú schopné poškodiť biomembrány rôznymi mechanizmami. Za zmeny v stabilite a morfológií membrán sú zodpovedné fyzikálno-chemické vlastnosti nanomateriálov. [42]

3.2.5 Pôsobenie nanočastíc na ostatné organely

Mitochondrie patria k membránovým organelám, ktoré majú v organizme funkciu vytvárania energie. Pre niektoré nanočastice, napríklad fulerény, uhlíkové nanotrúbky, ale aj oxid titaničitý či striebro, predstavujú hlavný cieľ v pôsobení na bunky a sú schopné ovplyvniť ich funkciu a spôsobiť apoptózu.

Výskumom bolo zistené, že nanočastice vo svojej ceste organizmom väčšinou končia v lyzozómoch – v tráviacom systéme buniek. V nich sa nanomateriály buď trávia, alebo sa zabezpečuje ich vylučovanie. [42]



Obr.4. Znázornenie pôsobenia nanočastíc na bunkové organely [42]

4 LEGISLATÍVA NANOMATERIÁLOV V KOZMETIKE

Legislatívne nariadenia a požiadavky na nanomateriály sú sústredené v Nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kozmetických výrobkoch. Podľa tohto nariadenia je nanomateriál definovaný ako nerozpustný alebo biopeizistentný materiál vyrobený na špecifický účel s jedným alebo viacerými vonkajšími rozmermi alebo vnútornou štruktúrou veľkosti od 1 do 100 nm. Legislatívne určené pravidlá a limity pre používanie nanomateriálov sú dôležité hlavne z hľadiska bezpečnosti spotrebiteľa. Doposiaľ nie sú potvrdené všetky nežiaduce vplyvy nanomateriálov na ľudský organizmus, preto je potrebná ich regulácia.

4.1 Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kozmetických výrobkoch a jeho článok 16 – Nanomateriály

Článok 16 v danom nariadení je venovaný výhradne nanomateriálom. Obsahuje niekoľko základných bodov, ktoré ustanovujú nasledujúce:

1. Pri každom kozmetickom výrobku s obsahom nanomateriálov sa zabezpečí vysoká úroveň ochrany zdravia ľudí.
2. Ustanovenia tohto článku sa neuplatňujú na nanomateriály používané ako farbivá, UV filtre alebo konzervačné látky regulované podľa článku 14, okrem prípadov, ak to je vyslovene uvedené.
3. Okrem oznámenia podľa článku 13 kozmetické výrobky obsahujúce nanomateriály oznamujú zodpovedné osoby Komisii v elektronickej podobe šesť mesiacov pred ich uvedením na trh, okrem prípadov, ak ich tá istá zodpovedná osoba uviedla na trh pred 11. januárom 2013.
4. Informácie oznamované Komisii obsahujú aspoň tieto údaje:
 - a. Identifikácia nanomateriálu vrátane chemického názvu (IUPAC) a iných deskriptorov;
 - b. Špecifikácia nanomateriálu vrátane veľkosti častíc, fyzikálnych a chemických vlastností;
 - c. Odhad množstva nanomateriálu v kozmetických výrobkoch, ktoré sa má uviesť na trh za rok;
 - d. Toxikologický profil nanomateriálu;

- e. Bezpečnostné údaje o nanomateriále týkajúce sa kategórie kozmetického výrobku, v ktorom sa používa;
 - f. Racionálne predvídateľné podmienky expozície.
5. V prípade, že Komisia má obavy pokiaľ ide o bezpečnosť použitého nanomateriálu, bezodkladne požiadava VVBS o stanovisko k jeho bezpečnosti pre príslušné kategórie kozmetických výrobkov a racionálne predvídateľné podmienky expozície. Komisia tieto informácie zverejní. VVBS vypracuje svoje stanovisko do šiestich mesiacov od žiadosti Komisie. Ak VVBS zistí, že v žiadosti chýbajú potrebné údaje, Komisia požaduje od zodpovednej osoby, aby ich predložila vo výslovne stanovenej primeranej lehote, ktorú nie je možné predĺžiť. VVBS vypracuje svoje konečné stanovisko do šiestich mesiacov od predloženia doplňujúcich údajov. Stanovisko VVBS je verejne prístupné.
6. Zohľadňujúc stanovisko VVBS a v prípade, ak existuje potenciálne riziko pre zdravie ľudí vrátane nedostatočných údajov môže Komisia zmeniť a doplniť prílohy II (látky v kozmetike zakázané) a III (látky povolené s obmedzením).
7. Komisia musí sprístupniť tieto informácie:
 - a. Katalóg všetkých nanomateriálov používaných v kozmetických výrobkoch uvedených na trh vrátane tých, ktoré sa používajú ako farbivá, UV filtre a konzervačné látky, ktoré uvedie v samostatnej časti katalógu a kategórie kozmetických výrobkov a racionálne predvídateľné podmienky expozície. Tento katalóg sa následne pravidelne aktualizuje a je dostupný verejnosti.
 - b. Komisia každoročne predkladá Európskemu parlamentu a Rade aktualizovanú správu o situácii s informáciami o vývoji v používaní nanomateriálov v kozmetických výrobkoch v Spoločenstve vrátane tých, ktoré sa používajú ako farbivá, UV filtre a konzervačné látky v samostatnom oddiele. Prvá správa bola predložená do 11. júla 2014. Aktualizovaná správa obsahuje predovšetkým zhrnutie nových nanomateriálov v nových kategóriách kozmetických výrobkov, počet oznámení, informácie o pokroku dosiahnutom vo vývoji špecifických metód hodnotenia nanomateriálov a usmerneniach na posudzovanie bezpečnosti, ako aj informácie o medzinárodných programoch spolupráce.

8. Komisia pravidelne preskúmava v kontexte vedeckého pokroku ustanovenia tohto nariadenia týkajúce sa nanomateriálov a v prípade potreby navrhne vhodnú revíziu týchto ustanovení.
9. Prvé preskúmanie sa uskutoční najskôr 11. júla 2018.

Na všeobecné požiadavky zhrnuté v kapitole 4.1. nadväzuje povinnosť oznámenia a označovania.

4.2 Oznámenie

Na výrobcov akejkoľvek kozmetiky a kozmetických produktov sa podľa Nariadenia (ES) č. 1223/2009 vzťahuje oznamovacia povinnosť. Podľa článku 13 daného nariadenia je zodpovedná osoba pred uvedením kozmetického výrobku na trh predložiť Komisii elektronicky tieto údaje :

- a) kategóriu kozmetického výrobku a jeho názov alebo názvy umožňujúce jeho konkrétnu identifikáciu;
- b) meno zodpovednej osoby a adresu, na ktorej je informačná zložka o výrobku ľahko dostupná;
- c) krajinu pôvodu v prípade dovozu;
- d) členský štát, v ktorom je daný kozmetický výrobok uvedený na trh;
- e) kontaktné údaje o fyzickej osobe, na ktorú je možné sa v prípade potreby obrátiť;
- f) prítomnosť látok vo forme nanomateriálov a:**
 - a. ich identifikáciu vrátane chemického názvu (IUPAC) a iných deskriptorov;**
 - b. racionálne predvídateľné podmienky expozície;**
- g) názov a registračné číslo (CAS) alebo číslo ES látok identifikovaných ako karcinogénne, mutagénne alebo toxické pre reprodukciu (CMR) kategórií podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008;
- h) rámcové zloženie, ktoré umožní včasné a adekvátne lekárske ošetrovanie v prípade ťažkostí.

4.3 Označovanie

Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kozmetických prípravkoch obsahuje článok 19, ktorý sa týka označovania kozmetických prípravkov.

Kozmetika s obsahom nanomateriálov musí obsahovať v zozname zložiek (INGREDIENTS) všetky zložky prítomné vo forme nanomateriálov. Za názvy týchto zložiek sa musí uviesť slovo „nano“ v zátvorkách. [46]

5 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Praktická časť diplomovej práce sa venuje výhradne testom na vzorkách nano oxidu titaničitého, preto sa mu táto kapitola bude podrobnejšie venovať. V nasledujúcom texte budú zhrnuté informácie vychádzajúce z literatúry, ktorá stručne poskytuje náhľad do aktuálnej situácie vo výskume oxidu titaničitého v jeho nano forme.

5.1 Interakcie spôsobené nanočasticami TiO₂ pri orálnom príjme

V dnešnej dobe sú nanočastice TiO₂ čoraz viac využívané v potravinových a kozmetických výrobkoch, preto vznikajú otázky o potenciálnom vplyve na gastrointestinálny systém. Prvú, vstupnú bránu do tela predstavuje ústna dutina, ktorej prítomné zložky rýchlo interagujú s nanočasticami. Interakcia medzi jednotlivými zložkami závisí od povrchového náboja a veľkosti nanočastíc. Bol skúmaný takisto vplyv hydrofobicity a hydrofilnosti jednotlivých materiálov, kde bolo preukázané, že tieto vlastnosti aktívne prispievajú k interakciám medzi nanočasticami a biologickými systémami. Ako hydrofóbne, tak aj hydrofilné častice aglomerujú v ústnych fyziologických podmienkach, no 10% dávky častíc ostalo prítomných v nano rozmeroch a prenikali nezávisle na hydrofóbných / hydrofilných vlastnostiach do sliznice ústnej dutiny. Rozdiely boli preukázané v intracelulárnom pôsobení. Zatiaľ čo hydrofóbne nanočastice sa po vniknutí do organizmu nachádzali na úrovni cytoplazmatickej membrány, hydrofilné častice priamo vstúpili bez porušenia integrity membrán do buniek. Aj keď životaschopnosť slizničných buniek ústnej dutiny nebola narušená ani hydrofóbnymi, ani hydrofilnými nanočasticami, došlo k narušeniu základnej bunkovej homeostázy. Obidva materiály spôsobili tiež pokles potenciálu mitochondriálnej membrány a vyvolali trvalé zvýšenie hladiny ROS, ktorá bola významne vyššia u hydrofilných nanomateriáloch. [47]

5.2 Vplyv povrchovej úpravy nanočastíc na pľúcnu toxicitu

Cieľom ďalšieho výskumu bolo vyhodnotiť pľúcnu toxicitu inhalovaných častíc oxidu titaničitého s rôznymi povrchovými úpravami, na ktoré bol použitý hlavne oxid hlinitý alebo amorfný oxid kremičitý. Povrchová úprava vytvorila mierne hydrofilný povlak, preto sú dané častice označované ako bázičné (base TiO₂). Výskum bol prevedený na potkanoch a účinky boli porovnávané s referenčnými hodnotami kontrolných vzoriek. Štúdia dospela k dvom hlavným záverom. Prvým tvrdením je fakt, že expozícia pľúc potkanov oxidu

titaničitému má aj pri jeho vysokých dávkach nízky toxický účinok. Druhým tvrdením je, že povrchová úprava nanočastíc môže ovplyvniť toxicitu nano TiO_2 v pľúcach. Nepriaznivé účinky sa prejavili pri použití povrchovej úpravy, kde bol skombinovaný oxid hlinitý s amorfným oxidom kremičitým. [48]

5.3 Návrh na zaradenie TiO_2 medzi inhalačné karcinogény

Napriek tomu, že oxid titaničitý je z hľadiska toxikológie často používaný ako referenčný netoxický materiál, podala francúzska organizácia ANESS (Agentúra pre potraviny, životné a pracovné prostredie, zdravie a bezpečnosť) návrh na zaradenie TiO_2 ako inhalačného karcinogénu. Štúdie týkajúce sa aplikácie TiO_2 na kožu alebo do gastrointestinálneho traktu nepreukázali žiadnu známku možnej karcinogenity, a teda nebolo možné označiť oxid titaničitý ako všeobecný karcinogén. Efekty TiO_2 , na ktorých návrh stavia sa prejavili v niekoľkých štúdiách výhradne na potkanoch. [49]

6 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo vypracovať teoretický prehľad so zameraním na nanočastice a ich pôsobenie v organizme. Práca sa sústreďuje hlavne na vlastnosti nanomateriálov, ich výrobu, využitie predovšetkým v kozmetike a farmácii a na pôsobenie týchto častíc na organizmus. Neodmysliteľnou súčasťou tejto problematiky je zhrnutie legislatívnych požiadaviek na používanie nanomateriálov.

Cieľom praktickej časti diplomovej práce bolo zamerať sa na oxid titaničitý v nano forme a na jeho správanie sa v telesných tekutinách gastrointestinálneho traktu. Súčasťou praktickej časti boli takisto testy zamerané na pozorovanie správania sa nano oxidu titaničitého po jeho ožiarení a na jeho cytotoxicitu.

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

7 MATERIÁLY A METÓDY

7.1 Použité vzorky

V praktickej časti bolo použitých viacero vzoriek nano TiO₂ od rôznych výrobcov. Väčšina vzoriek bola pred prípravou v práškovej forme. Výnimkou bola vzorka SOLTEX – 20% TiO₂ dodaný ako disperzia v deionizovanej vode.

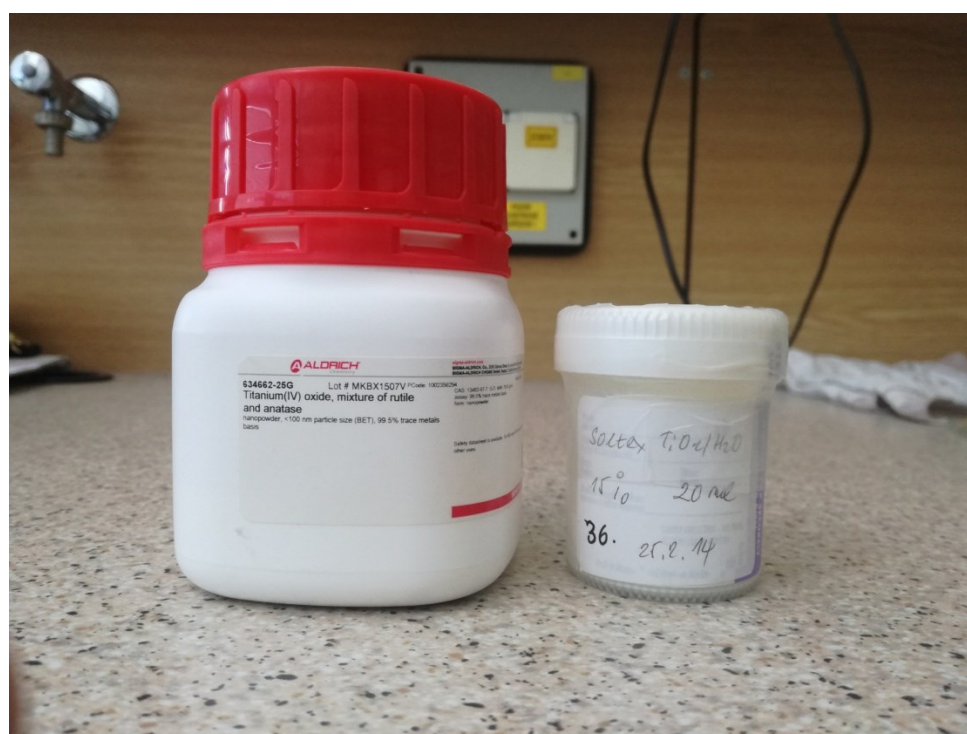
Tab. 3. Prehľad použitých materiálov v praktickej časti a ich charakteristika deklarovaná výrobcom (dodávateľom)

Označenie vzorky	Číslo šarže	Merný povrch [m ² g ⁻¹]	Veľkosť kryštálov [nm]	Forma
PRECH 1	120717/1	76,02	21	Prášková
PRECH 2	120717/2	52,13	23	Prášková
PRECH 3	120717/3	35,1	30	Prášková
PRECH 4	120717/4	21,02	45	Prášková
PRECH 5	120717/5	7,11	150	Prášková
PRECH 6	120717/6	Nestanovené	Nestanovené	Prášková
PRECH 1.0	101216/1	Nestanovené	Nestanovené	Prášková
SIGMA	634662-25G	Nestanovené	Nestanovené	Prášková
SOLTEX	Pripravené v SZÚ - nestanovené	Nestanovené	Nestanovené	Disperzia

Vzorky s označením PRECH sú v kryštalickej forme rutilu a vzorka zakúpená v Sigma-Aldrich je zmesou foriem rutil a anatas.



Obr. 5. Použité vzorky PRECH



Obr. 6. použité vzorky SIGMA a SOLTEX

7.2 Použité chemikálie a roztoky

7.2.1 Disperzné média použité k stanoveniu

- Demineralizovaná voda ($D_i - H_2O$)
- Fosfátom pufovaný fyziologický roztok – PBS
- DMEM bez séra (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- DMEM s 10% teľacieho séra

7.2.2 Roztoky použité pri simulácii chovania sa nanočastíc v gastrointestinálnom trakte

- Simulovaná žalúdočná tekutina
- Simulovaná črevná tekutina
- Simulovaná žalúdočná tekutina s prídavkom pepsínu
- Simulované sliny

7.3 Bunkové línie

- Embryonálne myšie fibroblasty (ATCC CRL – 1658 NIH-3T3)

7.4 Použité prístroje, zariadenia a pomôcky

- Prístroj na analýzu veľkosti častíc Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Ltd. Veľká Británia)
- Kyveta typ DTS1070
- Kyveta (polystyrénová)
- Digitálne váhy Denver Instrument
- Ultrazvukový kúpeľ Kraintek Czech s.r.o.
- Sonikátor UP400S, Hielscher
- Sonikátor Microson Ultrasonic Cell Disruptor, USA
- Automatické pipety (Eppendorf, Nemecko)
 - Rozsah merania 2 – 200 μ l
 - Rozsah merania 100 – 1000 μ l
- Solárny simulátor SunTray Suntest CPS+ (Agilent Technologies, USA)

- Spektrofotometer UV-VIS Cary 100 (Agilent Technologies, USA)
- UV lampa
- Trepačka VORTEX IKA MS 3 Basic
- pH meter
- Centrifúga 5702 R (Eppendorf, Nemecko)
- Laminárny box Herasafe (Thermo Fisher Scientific)
- Fotometer INFINITE M200Pro NanoQuant
- Biologický inkubátor HERAcell 150i
- Bežné laboratórne pomôcky
- Laboratórne plasty (špičky pre automatické pipety)

7.5 Metodika

7.5.1 Príprava TiO₂ pre stanovenie veľkosti častíc v rôznych disperzných médiách

Príprava základnej disperzie

Z každej vzorky bola pred meraním pripravená základná disperzia, ktorá obsahovala 0,05 g vzorky na 10 ml Di – H₂O. Všetky základné disperzie boli pred samotným stanovením homogenizované sonikáciou na sonikátore UP400S, Hielscher, alebo na sonikátore Microson Ultrasonic Cell Disruptor. Pri použití už zhomogenizovanej vzorky v nasledujúci deň merania bola vzorka zhomogenizovaná v ultrazvukovej lázni. Doba hmogenizácie bola 30 minút pri najvyššej amplitúde. Počas homogenizácie bola vzorka z dôvodu zahrievania sa umiestnená v ľadovom kúpeli.. Dôvodom homogenizácie je fakt, že skúmané materiály môžu pri skladovaní aglomerovať, preto je potrebné ich sonikáciou rozbiť na menšie častice.

Príprava vzorky na stanovenie

Podľa typu merania bol do kyvety odobratý 1 ml príslušného disperzného média a k nemu bol napipetovaný zvolený objem pripravenej disperzie TiO₂. Boli premerané vzorky obsahujúce objemy disperzie v rozmedzí od 10 do 50 µl a pre každú vzorku bola zvolená vyhovujúca koncentrácia.

7.5.2 Příprava disperzných médií použitých na stanovenie veľkosti částíc

Příprava simulovanej žalúdočnej tekutiny (SGF)

Simulovaná žalúdočná tekutina bola pripravená nasledujúcim postupom:

- bol navážený 1 g NaCl;
- k NaCl bolo pridaných 40 ml 1M roztoku HCl;
- rozpustená NaCl v kyseline chlorovodíkovej bola prenesená do 500 ml odmernej banky;
- postupne bola do dosiahnutia objemu 500 ml pridávaná deionizovaná voda;
- na pH metri bolo zmerané pH;
- pH sa pomocou 1M roztoku NaOH a 1M roztoku HCl upravilo na hodnotu 1,2.

Obdobným spôsobom bola pripravená aj simulovaná žalúdočná tekutina s prídavkom pepsínu. Pepsín bol pridaný v množstve 1,6 g do 500 ml simulovanej žalúdočnej tekutiny.

Příprava simulovaných slín

Sliny boli pripravené navážením a rozpustením nasledujúcich zložiek v 1 l deionizovanej vody:

- 0,031 g NaNO₂;
- 0,201 g K₂CO₃;
- 0,501 g NaCl;
- 4,200 g NaHCO₃.

Pomocou 1M roztoku NaOH a 1M roztoku HCl bolo pH slín upravené na hodnotu 6,8.

Příprava simulovanej črevnej tekutiny (SIF)

Použitá simulovaná črevná tekutina bola vyrobená firmou Sigma – Aldrich (Nemecko).

7.5.3 Příprava základnej disperzie nano TiO₂ pre stanovenie fotokatalytickej aktivity

Na základe premerania všetkých vzoriek vo vode boli na stanovenie fotokatalytickej aktivity použité vzorky s odlišnou veľkosťou částíc:

- PRECH 5 s číslom šarže 120717/5
- SIGMA

Na stanovenie bola pripravená disperzia, ktorá obsahovala 5% vzorky TiO_2 v 10 ml glycerolu. Vzniknutá disperzia bola dôkladne rozmiešaná do vytvorenia homogénnej hmoty.

7.5.4 Príprava disperzie nano TiO_2 pre stanovenie fotocytotoxicity

Na stanovenie cytotoxicity nano TiO_2 boli použité rovnaké vzorky ako pri stanovení fotokatalytickej aktivity. Bola pripravená základná disperzia, ktorá obsahovala 25% nano TiO_2 na 10ml PBS. Disperzie boli zhomogenizované pomocou sonikátoru po dobu 30min v ľadovom kúpeli. Následne bola základná disperzia riedená na polovicu 7-krát, až po dosiahnutie koncentrácie 0,20%. Takto pripravené vzorky boli použité na stanovenie.

7.6 Stanovenie veľkosti a distribúcie častíc v rôznych médiách metódou DLS

Stanovenie veľkosti častíc bolo prevedené metódou dynamického rozptylu svetla DLS (Dynamic Light Scattering), ktorá je určená na meranie veľkosti častíc väčšinou v submikrónovej veľkosti. Metóda DLS je založená na meraní Brownovho pohybu častíc, ktorý je definovaný ako náhodný pohyb častíc v dôsledku ich kolízie rozpúšťadlom. Platí, čím väčšia je častica, tým bude jej Brownov pohyb pomalší. [52]

7.6.1 Vlastné stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS

Meranie veľkosti častíc nano oxidu titaničitého bolo prevedené pomocou prístroja Zetasizer Nano ZS90 od výrobcu Malvern pri teplote 25°C a rozptylovom uhle 90° . Na stanovenie bola použitá klasická polystyrénová kvveta. Prístroj bol nastavený tak, aby každé meranie obsahovalo tri meracie cykly. Doba temperovania prístroja bola nastavená na 100s. Výsledky meraní boli vyjadrené hodnotou z-average, teda z-priemeru častíc, čo je intenzitne vážený priemer veľkosti všetkých častíc prítomných v suspenzii. Bol takisto stanovený index polydisperzity (PDI), ktorý charakterizuje štruktúru distribúcie častíc. Veľkosť častíc bola meraná ihneď po príprave vzorky a potom po 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 minútach. Z-priemer všetkých vzoriek bol stanovený po ich dispergácii vo vode. Správanie TiO_2 v rôznych telesných tekutinách a médiách sa sledovalo iba pre vybrané vzorky, a to PRECH, PRECH 5, SIGMA a SOLTEX.

7.7 Zeta potenciál

Zeta potenciál je fyzikálna vlastnosť, ktorou je popísaná akákoľvek častica v suspenzii. Zeta potenciál je charakterizovaný ako potenciál na rozhraní vnútornej a vonkajšej vrstvy kvapalnej fázy (disperzné prostredie), ktorá obklopuje jednotlivé častice. Poznanie zeta potenciálu istých systémov, môže pomôcť pri optimalizácii formulácií suspenzií či emulzií a je dôležitou veličinou charakterizujúcou stabilitu koloidných častíc v disperzii.

Vlastné stanovenie zeta potenciálu

Stanovenie bolo vykonané na prístroji Zetasizer Nano ZS90, za podobných podmienok ako u stanovenia veľkosti častíc. Na meranie bola použitá kyveta typu DTS1070. Pre výpočet bola použitá Smoluchovského rovnica.

7.8 Skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM)

Pomocou mikroskopu Nova NanoSEM 450, ktorého analýza je založená na skenovacej elektrónovej mikroskopii bol vyhodnotený tvar častíc PRECH 1 – 6 a PRECH 1.0. Táto metóda poskytuje najlepší zobrazovací a analytický výkon vo svojej triede. Test bol prevedený a vyhodnotený pracovníkmi CPS (Centrum polymérnych systémov v Zlíne).

7.9 Účinnosť TiO₂ nanočastíc ako UV filtrov

Spomedzi ďalších vlastností nanomateriálov bola praktická časť venovaná stanoveniu účinnosti TiO₂ ako UV filtrov. Pre stanovenie boli použité vzorky PRECH 5 a SIGMA V nasledujúcom texte bude priblížený princíp tohto stanovenia.

K stanoveniu bolo potrebné vyvinúť umelé slnečné žiarenie, čo bolo zabezpečené pomocou prístroja SUNTEST CPS+ (ATLAS). Tento prístroj slúži k ožarovaniu vzorky po určitú dobu pri stanovenej teplote. Počas stanovovania boli vzorky odoberané a bola u nich zmeraná transmitancia na spektrofotometri UV-VIS Cary 100.

Vlastné stanovenie

Zo základnej disperzie, ktorá bola vytvorená zhomogenizovaním vzoriek v glycerole bolo pred každým meraním odobraté dostatočné množstvo na PMMA SB6 dosku. Vzorka bola na zdrsnenom povrchu každej dosky dôkladne rozotrená prstom, pričom bol počas rozotierania menený smer pohybu prsta, pre dôkladné a rovnomerné rozotrenie. Pri nanášaní sa pri konci

vyvinul na dosku mierny tlak, pre dokonalé nanosenie vzorky na substrát. Od každej vzorky boli pripravené dve dosky. Takto pripravené vzorky boli po dobu 15 minút uložené v tme, pre dosiahnutie ustálenia častíc na substráte a následne boli vložené do spektrofotometra, kde bola zmeraná transmitancia v 10-tich rôznych bodoch pred ožiarení UV svetlom. Namerané hodnoty boli vyhodnotené systémom Cary WinUV. Získané hodnoty boli prevedené do programu Microsoft Excel a ďalej spracované. Nasledovne boli vzorky podrobené ožiareniu UV svetlom (v rozmedzí od 290 do 400 nm) v solárnej komore SUNTEST CPS+ pri teplote 40°C po dobu 55 minút. V časoch 15, 30 a 55 minút bola opätovne zmeraná transmitancia v spektrofotometri. Získané hodnoty boli prevedené na absorbanciu a boli vyhotovené závislosti absorbancie na vlnovej dĺžke v podobe grafov.

7.10 Stanovenie cytotoxicity nano TiO₂

Stanovenie cytotoxicity nano TiO₂ bolo prevedené na základe pokynov na testovanie chemických látok OECD (Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj).[50] Test fotocytotoxicity je založený na porovnaní chemickej látky v prítomnosti a v neprítomnosti expozície netoxickej dávky simulovaného slnečného žiarenia. Cytotoxicita v danom teste je vyjadrená pomocou MTT testu, ktorého princíp je založený na redukcii vo vode rozpustného 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyln tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný, tmavo fialový formazán. Táto reakcia prebieha na mitochondriálnej membráne pôsobením mitochondriálnych dehydrogenáz a dochádza k nej iba v žijúcich bunkách. Test sa vyhodnocuje spektrofotometricky, kedy hodnota absorbancie odpovedá množstvu viabilných buniek. V nariadení OECD je odporúčaný typ buniek Balb/c 3T3, no pri našom stanovení boli použité bunky NIH/3T3. Na vyhodnotenie testu bola použitá nasledujúca stupnica cytotoxicity podľa požiadaviek medzinárodnej normy ISO 10993-5:

- netoxický účinok: množstvo viabilných buniek vyšší než 80 %,
- slabo toxický účinok: množstvo viabilných buniek 60 – 80 %,
- stredne toxický účinok: množstvo viabilných buniek 40 – 60 %,
- Silno toxický účinok: množstvo viabilných buniek menší než 40%.

Výpočet doby ožiarenia buniek v prítomnosti TiO₂

Čas potrebný na ožiarenie bol vypočítaný podľa vzťahu [50]:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dávka ožarenia (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{intenzita ožarenia (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1)$$

Dávka ožiarenia predstavuje podľa nariadenia hodnotu 5 J/cm^2 . Intenzita ožiarenia bola stanovená podľa výkonu použitej UV lampy. Intenzita bola zmeraná v ôsmich bodoch 96 jamkovej doštičky. Podľa stanovených hodnôt, bol čas vypočítaný podľa vzťahu (1) nasledovne:

$$t(\text{min}) = \frac{5 (\text{J/cm}^2) \times 1000}{1,5 (\text{mW/cm}^2) \times 60}$$

$$t = 55 \text{ min}$$

Príprava nano TiO₂ na stanovenie cytotoxicity

Na stanovenie fotocytotoxicity boli použité rovnaké vzorky ako na stanovenie fotokatalytickej aktivity, a to vzorka PRECH 5 a SIGMA. Podľa nariadenia OECD musia byť chemikálie rozdispergované v pufrovanom roztoku solí, preto bolo na stanovenie zvolené prostredie PBS. Z každej vzorky bola pripravená základná disperzia o koncentrácii 25% nano TiO₂, pretože táto koncentrácia predstavuje najvyššie povolené množstvo TiO₂ v kozmetických výrobkoch. Dispergácia častíc bola prevedená pomocou sonikátora UP400S, Hielscher a vzorky boli umiestnené v ľadovom kúpeli. Sonikácia každej vzorky trvala 30 min. Následne bolo riedením danej disperzie vytvorených 7 roztokov o objeme 5 ml s koncentráciami 12,5; 6,25; 3,13; 1,57; 0,78; 0,39 a 0,20. Takto pripravené vzorky boli podrobené testovaniu.

Vlastné stanovenie cytotoxicity

Stanovenie prebiehalo pri izbovej teplote a počas ožiarenia buniek bola platňa uložená na trepačke, aby nedochádzalo k usadzovaniu TiO₂. Trepačka bola nastavená na 500 otáčok za minútu.

Stanovenie bolo zahájené nasadením buniek NIH/3T3 do 96 jamkových doštičiek v koncentrácii 1×10^5 . Po 24 hodinách bolo prevedené odsatie média a opláchnutie buniek pomocou $1 \times 100 \mu\text{l}$ PBS. Následne bolo pridaných $100 \mu\text{l}$ PBS do všetkých jamiek doštičky a bunky boli podrobené UV žiareniu, ktoré pôsobilo 55 minút. Následne boli bunky opäť opláchnuté pomocou $5 \times 100 \mu\text{l}$ PBS, keďže nebolo úplne zabránené sedimentácii TiO₂ na dno jamiek. Ďalším krokom bolo opätovné pridanie $100 \mu\text{l}$ média. Po 24 hodinách bolo médium odsaté a bunky boli inkubované 24 hodín pri 37°C. Následne bolo odsaté médium s MTT a bolo pridaných $80 \mu\text{l}$ DMSO (dimethylsulfoxidu), ktorý pôsobil 15 minút.

Ukončením stanovenia bolo meranie absorbancie pri 570 nm. Referencia bola meraná pri 690 nm.

Test cytotoxicity bol prevedený a vyhodnotený v spolupráci s pracovníkmi CPS.

8 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom praktickej časti práce bolo stanoviť veľkosť častíc rôznych vzoriek nano TiO₂ a charakterizovať ich správanie v prostrediach, ktoré sa používajú na testovanie látok in vitro a v simulovaných tekutinách tráviaceho traktu pomocou metódy DLS. Morfológia vybraných vzoriek bola stanovená pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie. Na záver bola skúmaná aj účinnosť nano TiO₂ ako UV filtrov a ich fotocytotoxicita.

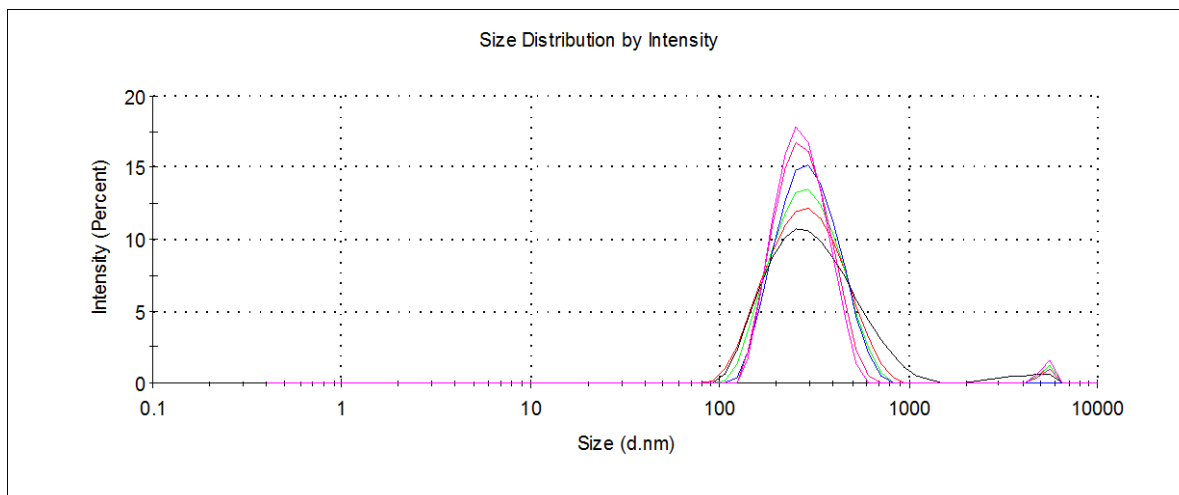
8.1 Stanovenie veľkosti častíc metódou DLS

Pred stanovením veľkosti častíc bolo meranie zamerané na uistenie sa, že prístroj Zetasizer Nano ZS90 poskytuje reprodukovateľné výsledky. Bolo preto zhotovených 6 meraní po sebe, na ktoré bola použitá vzorka od výrobcu PRECH 5 s označením šarže 120717/5.

Tab. 4. Stanovenie opakovateľnosti merania z-priemeru veľkosti častíc a Pdl vzorky PRECH 5 vo vode

Číslo merania	Z-average [nm]	PdI
1.	294,6	0,24
2.	293,7	0,24
3.	290,1	0,19
4.	287,4	0,20
5.	291,0	0,22
6.	293,8	0,24
\bar{x}	291,8	0,22
SMODCH	2,5	0,02

Výsledky zhrnuté v Tab.1. ukazujú, že z-priemer veľkosti častíc TiO₂ bol 291,8 nm so štandardnou odchýlkou 2,5 nm. Reprodukovateľnosť merania je teda dobrá. Pre šírku distribúcie vyjadrenú pomocou PdI je možno spraviť rovnaký záver. Distribučné krivky týchto meraní sú uvedené na Obr. 7.



Obr.7. Distribúcia častíc pri meraní opakovateľnosti vzorky PRECH 5

8.1.1 Stanovenie veľkosti častíc jednotlivých vzoriek vo vode

Pre všetky vzorky bolo najskôr prevedené stanovenie veľkosti častíc v deionizovanej vode. Potrebný objem vzorky pre vlastné meranie bol odobratý z pripravenej základnej disperzie. Koncentrácia bola volená vždy pred meraním. Vo väčšine prípadov bolo použité 20 μ l disperzie v 1000 μ l disperzného média.

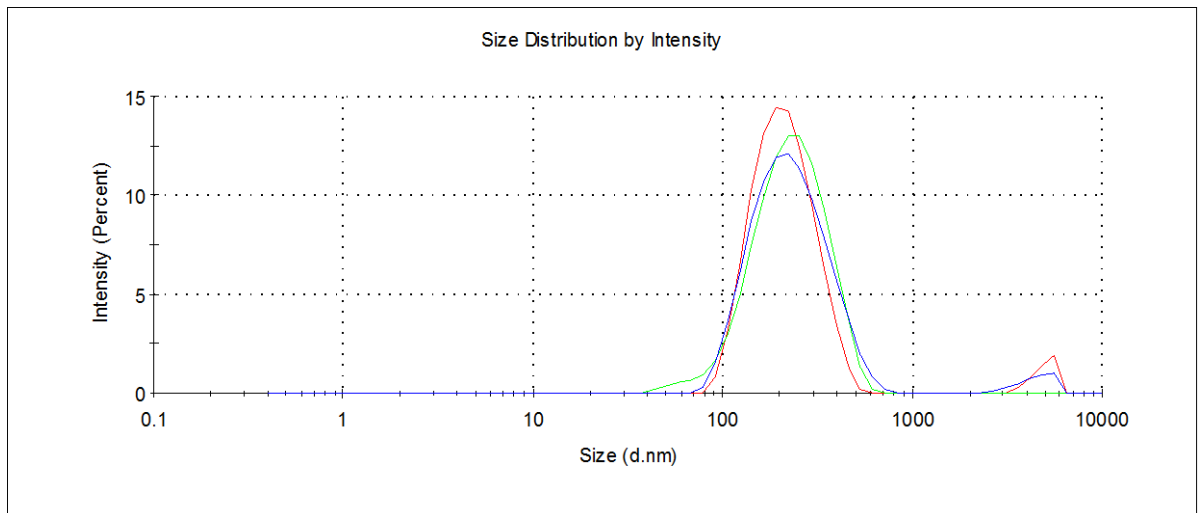
Stanovenie veľkosti častíc vzoriek s označením PRECH

Výsledky merania sú uvedené v Tab.5. a distribučné krivky na obrázkoch 8 až 14. Z výsledkov je zrejmé, že aj keď sa veľkosti primárnych kryštálov jednotlivých vzoriek líšili, veľkosť aglomerátov TiO₂ ležala v intervale 192 až 292 nm. Výnimkou bola vzorka PRECH 2 s veľkosťou častíc 1537 \pm 90 nm. To je zrejmé aj z distribučných kriviek, ktoré sú pre PRECH 2 (Obr. 9.) odlišné.

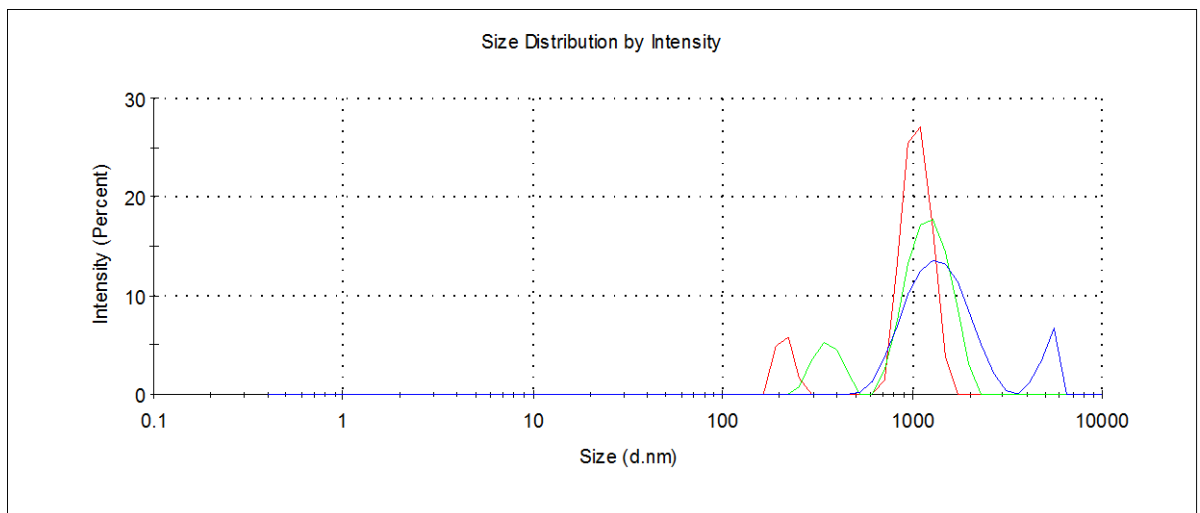
Tab. 5. Stanovenie veľkosti častíc a indexu polydisperzity Pdl vzoriek s označením PRECH vo vode

Vzorka	Z-Average [nm]	Priemer \bar{x} [nm]	Pdl	Priemer \bar{x} [nm]
		SD		SD
PRECH 1	213,0	214,6 ± 1,2	0,241	0,229 ± 0,01
	216,0		0,228	
	214,8		0,217	
PRECH 2	1551	1537 ± 90,4	0,805	0,648 ± 0,16
	1420		0,717	
	1640		0,421	
PRECH 3	229	236,1 ± 5,1	0,184	0,179 ± 0,01
	238,6		0,186	
	240,7		0,166	
PRECH 4	299,4	291,1 ± 8,3	0,311	0,276 ± 0,05
	294,1		0,309	
	079,8		0,208	
PRECH 5	278,9	286,6 ± 7,5	0,170	0,182 ± 0,01
	284,2		0,196	
	296,7		0,180	
PRECH 6	160,9	192,1 ± 23,0	0,437	0,433 ± 0,01
	199,8		0,437	
	215,6		0,424	
PRECH 1.0	209,2	212,9 ± 2,9	0,195	0,198 ± 0,01
	213,2		0,191	
	216,2		0,209	

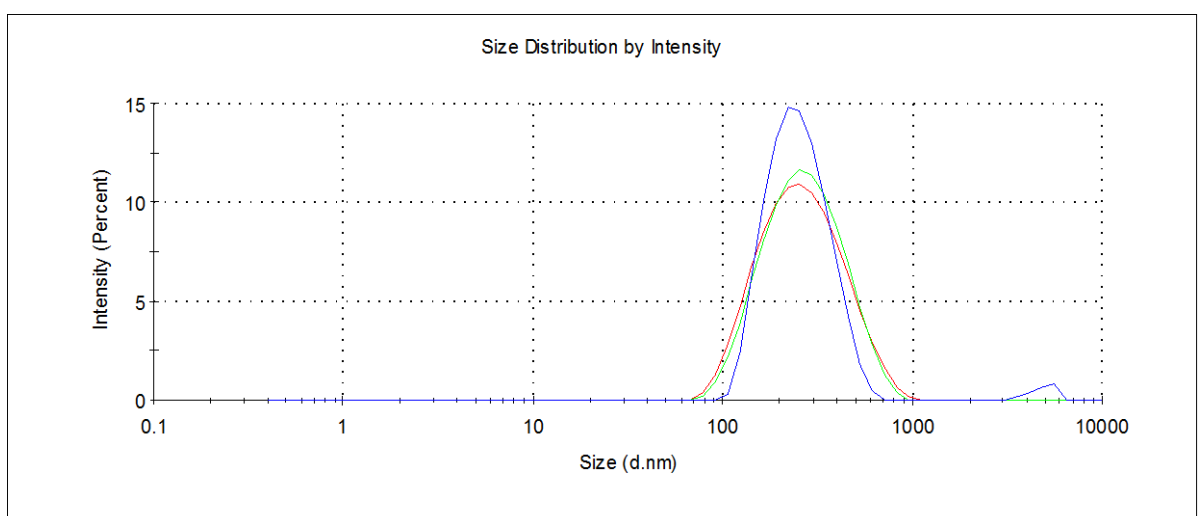
Pozn.: SD – smerodajná odchýlka



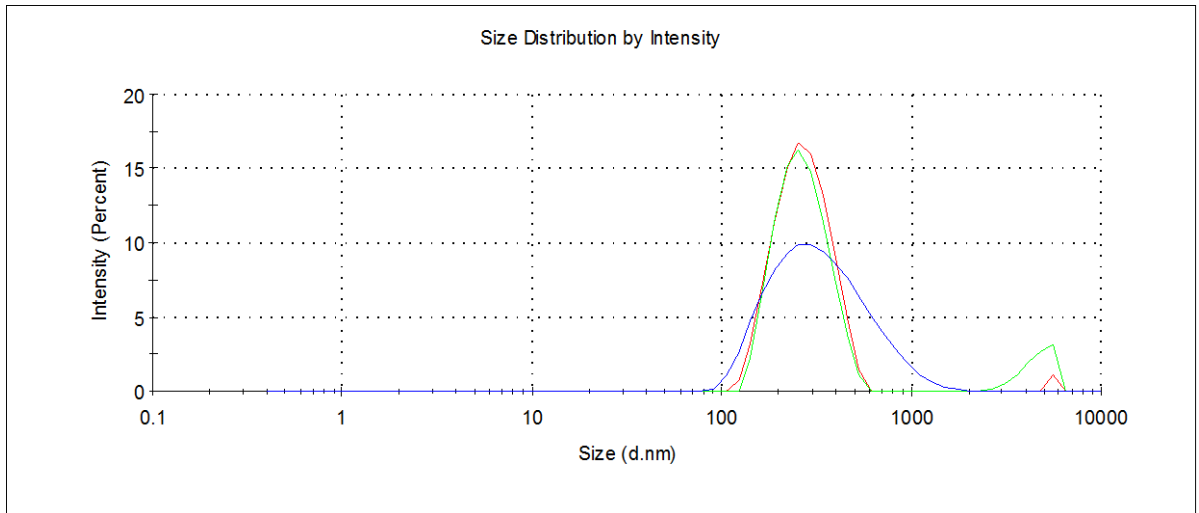
Obr. 8. Distribúcia častíc vzorky PRECH 1 vo vode.



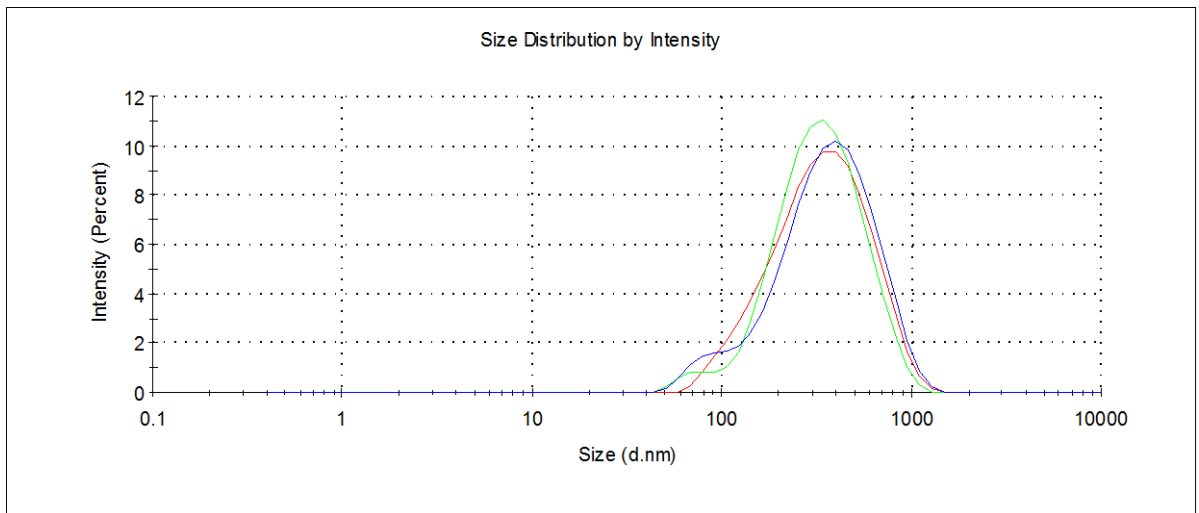
Obr. 9. Distribúcia častíc vzorky PRECH 2 vo vode.



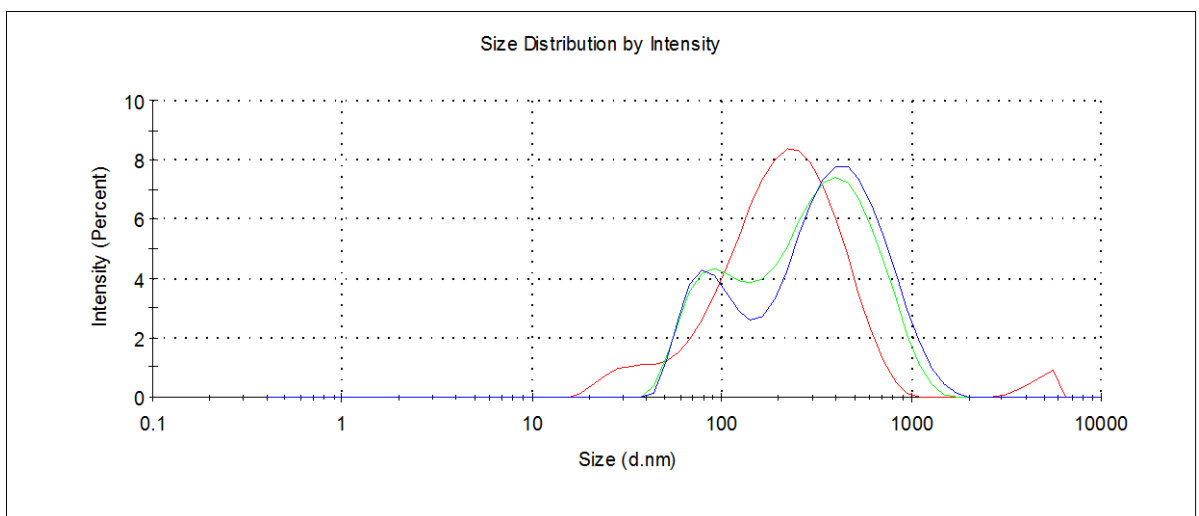
Obr. 10. Distribúcia častíc vzorky PRECH 3 vo vode.



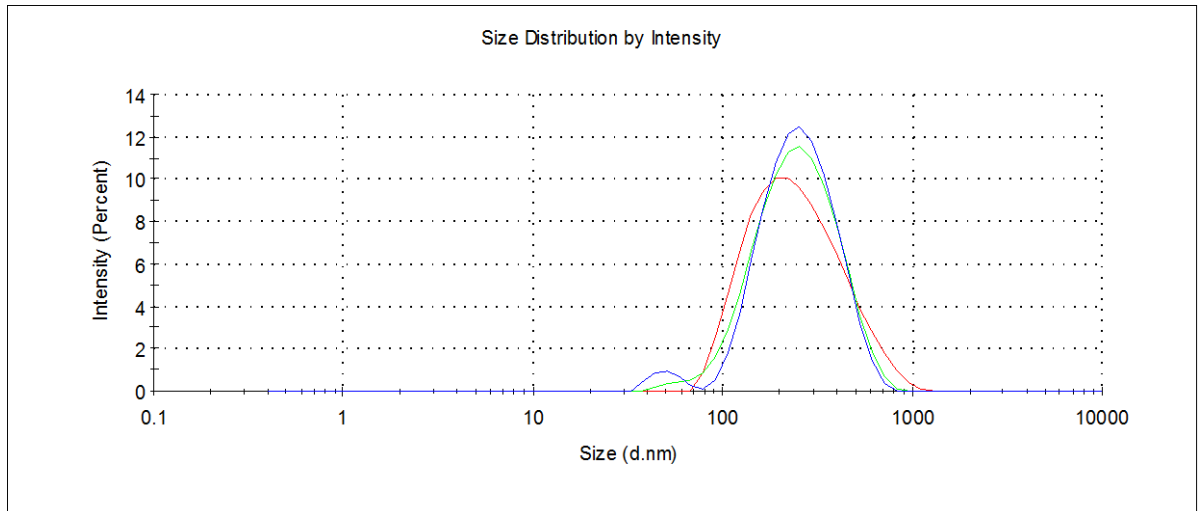
Obr. 11. Distribúcia častíc vzorky PRECH 4 vo vode.



Obr. 12. Distribúcia častíc vzorky PRECH 5 vo vode.



Obr. 13. Distribúcia častíc vzorky PRECH 6 vo vode.



Obr. 14. Distribúcia častíc vzorky PRECH 1.0 vo vode.

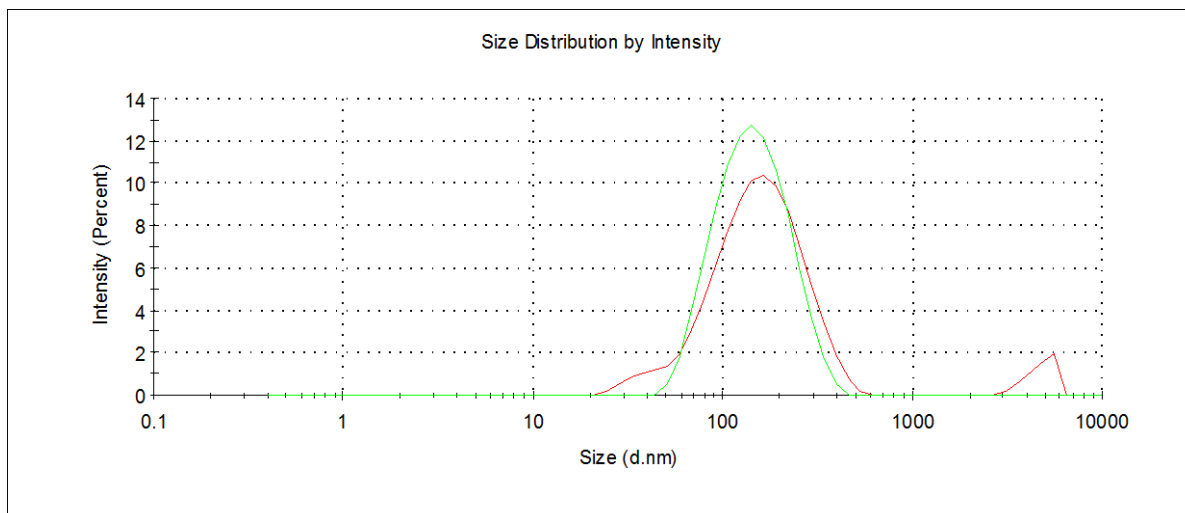
Stanovenie veľkosti častíc vzoriek SIGMA a SOLTEX

Veľkosť častíc týchto dvoch vzoriek je uvedená v Tab. 6 a ich distribúcie na Obr. 15 a 16. Je zrejmé, že ich častice sú menšie (~140 nm) než u vzoriek PRECH. Pri porovnaní hodnôt PDI je možné ďalej vidieť, že vzorka SOLTEX má užšiu distribúciu ako vzorka SIGMA.

Tab.6. Stanovenie veľkosti častíc vzoriek SIGMA a SOLTEX vo vode

Vzorka	Z-Average [nm]	Priemer	PDI	Priemer
		\bar{x} [nm]		\bar{x} [nm]
		SD		SD
SOLTEX	141,0	142,3 ± 0,9	0,159	0,166 ± 0,01
	143,1		0,179	
	142,9		0,161	
SIGMA	139,0	141,5 ± 2,0	0,363	0,353 ± 0,01
	144,0		0,340	
	141,5		0,357	

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka



Obr. 15. Distribúcia častíc vzoriek SIGMA a SOLTEX vo vode. (červená – SIGMA, zelená – SOLTEX)

Na základe získaných hodnôt veľkostí všetkých častíc vo vode boli vybrané na ďalší výskum iba 4 vzorky. Keďže vzorky PRECH 1, PRECH 5, SIGMA a SOLTEX vykazovali najlepšie vlastnosti na základe merania pomocou metódy DSL, boli zvolené pre ďalšie testovanie.

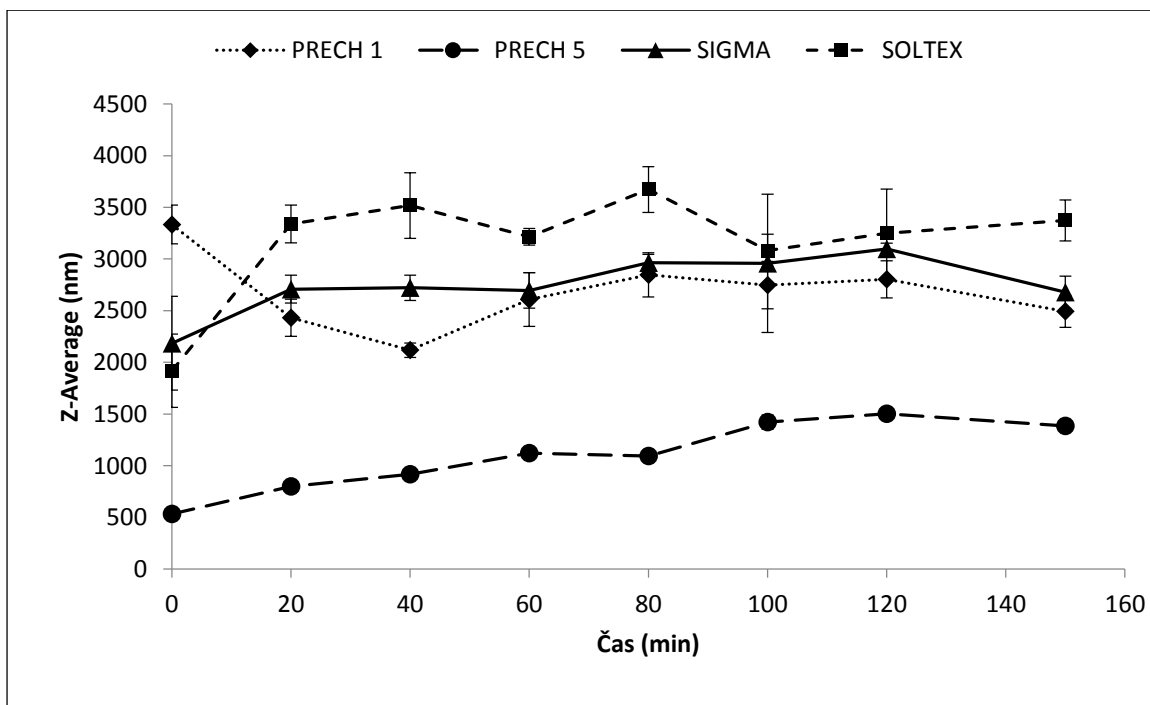
8.1.2 Stanovenie veľkosti častíc TiO₂ v PBS

Stanovenie v každom disperznom médiu bolo prevedené meraním veľkosti častíc na prístroji Zetasizer Nano ZS90 po dobu 150 minút. Z každej vzorky bolo do PS kvety pomocou automatickej pipety k 1ml daného prostredia pridaných 20 μ l základnej disperzie. Po spustení meraní sa každá vzorka v prostredí PBS správala idividuálne. Vzorka PRECH 1 zmenila v danom prostredí svoju veľkosť z pôvodných 214 nm až na hodnotu 3334 \pm 187 nm. V časovom priebehu veľkosť častíc klesla pod hodnotu \sim 3000 nm a ďalej sa už výrazne nemenila. Tento jav pravdepodobne naznačuje, že daná vzorka v prostredí solí ihneď aglomerovala. Vzorka PRECH 5 svoju veľkosť oproti pôvodnej takisto zmenila, ale menej rapídne. Postupom času sa veľkosť jej častíc zvyšovala, čo značí, že častice mohli aglomerovať. Častice vzorky SIGMA takisto v prostredí PBS výrazne zvýšili svoju veľkosť a postupne aglomerovali a sedimentovali. Častice vzorky SOLTEX sa správali podobne ako vzorka od výrobcu SIGMA. Výsledky týchto analýz sú uvedené v Tab. 7 a na Obr. 16.

Tab. 7. Stanovenie veľkosti častíc TiO_2 v PBS v priebehu 150 minút

Čas [min]	PRECH 1		PRECH 5		SIGMA		SOLTEX	
	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD
0	3334	187	533	39	2185	454	1919	355
20	2431	179	801	44	2708	134	3339	181
40	2117	71	917	41	2711	122	3518	318
60	2607	260	1123	34	2696	172	3215	81
80	2846	215	1094	34	2964	83	3673	221
100	2747	230	1421	68	2958	670	3083	158
120	2803	180	1502	31	3096	58	3249	428
150	2493	155	1387	52	2678	156	3372	199

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka

Obr. 16. Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO_2 v PBS

8.1.3 Stanovenie veľkosti častíc TiO₂ v médiu

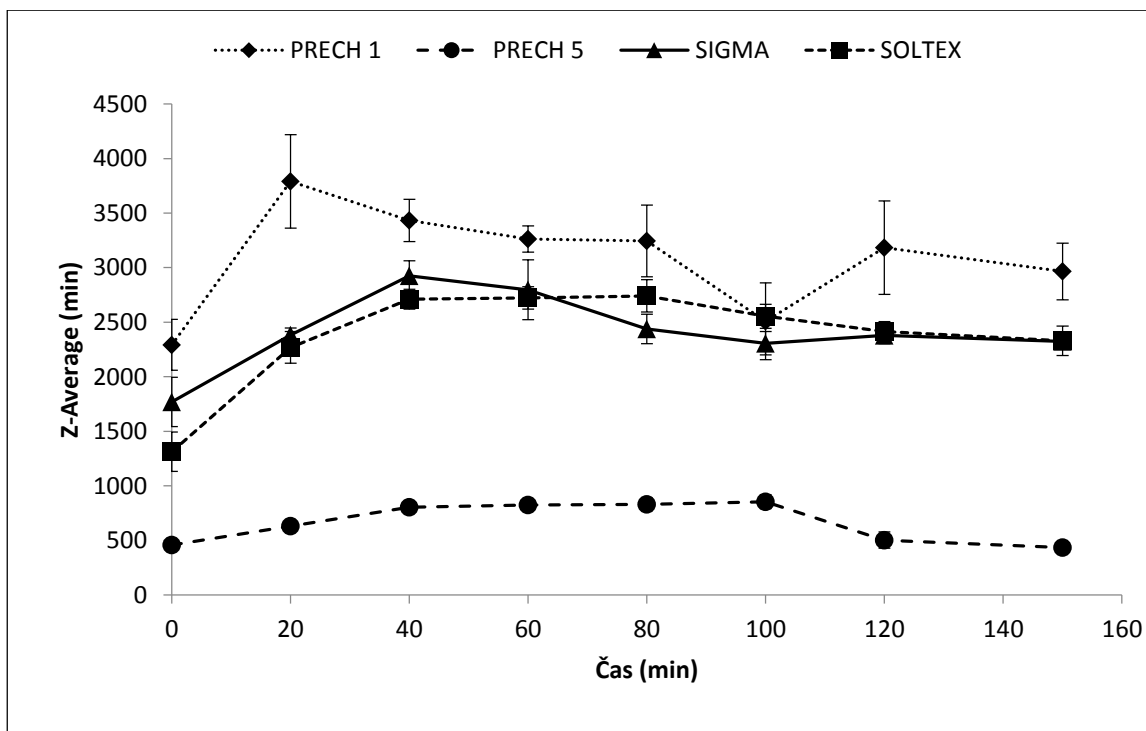
V poradí druhým disperzným prostredím bolo skúmané médium. Vzorka PRECH 1 v médiu zväčšila svoju veľkosť na hodnotu 2293±232 nm. V priebehu 150 minút jej veľkosť vzrástla na maximálnu hodnotu 3791±429 nm a po ukončení merania klesla na hodnotu 2965±260 nm. U vzorky je viditeľné, že jej častice aglomerovali a po čase aj sedimentovali, o čom svedčí aj mierny pokles veľkosti častíc. Ten môže byť spôsobený tým, že veľké aglomeráty sedimentujú a sú merané iba tie menšie, ktoré sú prítomné v disperznom médiu. Vzorka PRECH 5 svoju veľkosť s porovnaním s ostatnými vzorkami až tak výrazne nezvýšila a pri prvom meraní v médiu činila 457±21 nm. Po 100 min dosiahla veľkosť 855±63 nm a po ukončení merania opäť spadla na 435±18 nm. Takisto je zrejmé, že vzorka aglomerovala a sedimentovala. Vzorka SIGMA v médiu po prvom meraní dosiahla veľkosť 1770±227 nm, v priebehu sa jej z-priemer taktiež zväčšovala a po ukončení merania bola jej veľkosť 2323±14 nm. Podobne sa správala aj vzorka SOLTEX. Obe vzorky v médiu aglomerovali.

Proces aglomerácie TiO₂ častíc pozorovaný v PBS a v médiu je vyvolaný zvýšením iónovej sily v disperzii nanočastíc. Proces je možné vysvetliť skutočnosťou, že rast iónovej sily znižuje hrúbku difúznej vrstvy okolo každej častice a v dôsledku toho sa častice môžu dostať k sebe navzájom dostatočne blízko a začať aglomerovať.

Tab. 8. Stanovenie veľkosti častíc TiO_2 v médiu v priebehu 150 minút

Čas [min]	PRECH 1		PRECH 5		SIGMA		SOLTEX	
	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD
0	2293	232	457	21	1770	227	1312	180
20	3791	429	632	11	2384	64	2269	145
40	3432	193	805	21	2924	140	2710	90
60	3263	120	825	33	2797	274	2723	103
80	3245	328	831	60	2438	135	2741	149
100	2509	352	855	63	2307	107	2554	110
120	3184	428	503	74	2380	77	2414	91
150	2965	260	435	18	2323	14	2329	135

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka

Obr. 17. Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO_2 v médiu

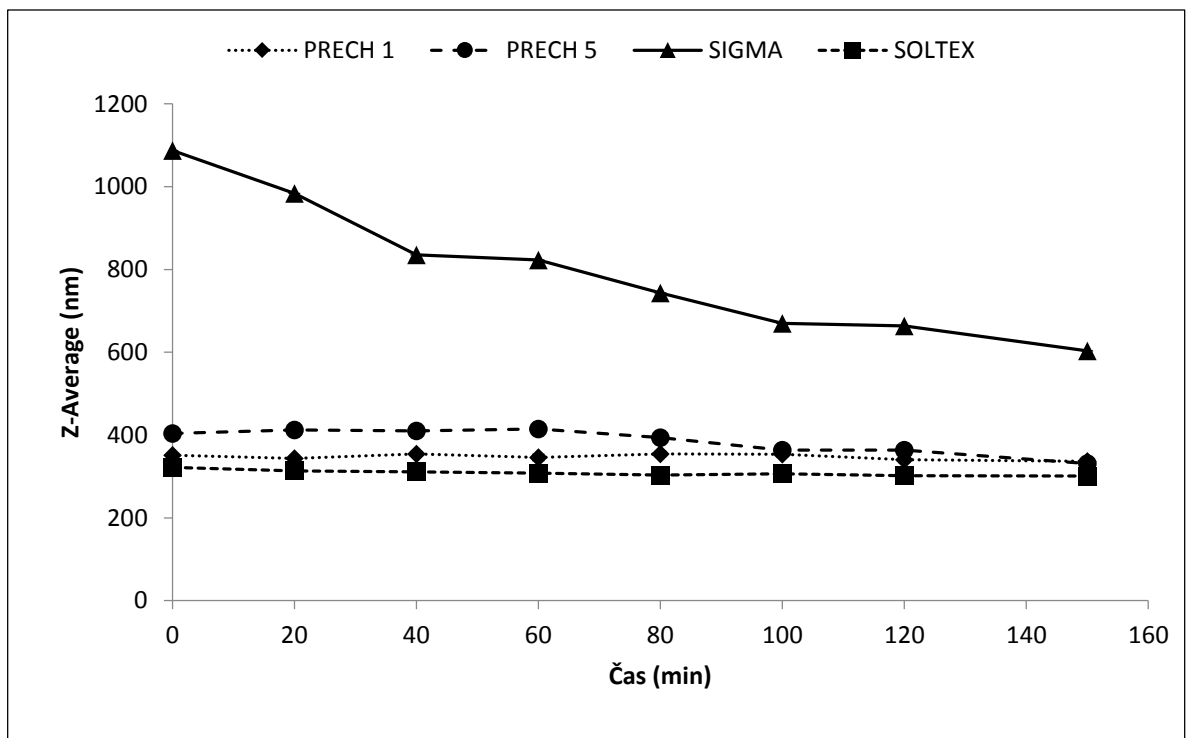
8.1.4 Stanovenie veľkosti častíc TiO₂ v médiu s obsahom 10% séra

Tretím disperzným prostredím, v ktorom bol meraný časový priebeh správania sa veľkosti častíc bolo médium s prídavkom 10%-tného séra. Vzorka PRECH 1 v danom prostredí zväčšila svoju veľkosť na 351±3,8 nm a jej hodnota bola v priebehu celého merania skoro konštantná. Vzorka PRECH 5 sa správala podobne ako vzorka PRECH 1 a jej hodnota v médiu so sérom na začiatku merania činila hodnotu 404±7,6 nm. Vzorka SIGMA v médiu so sérom zväčšila svoju veľkosť najvýraznejšie, a to na hodnotu 1087±47 nm. V priebehu merania klesla na 604±33 nm. SOLTEX takisto ako vzorky PRECH 1 a PRECH 5 nezmenili svoju veľkosť až tak rapídne a jej hodnota po prvom meraní bola 322±0,6 nm. Vzorky v danom médiu síce aglomerovali, ale menej ako v ostatných médiách. Je pravdepodobné, že proteíny prítomné v sére vytvorili akúsi ochrannú vrstvu na povrchu častíc TiO₂ a ich veľkosť sa menila iba obmedzene. Z tejto skutočnosti je možné usudzovať, že sérum prítomné v médiu má stabilizačný účinok a zamedzuje aglomerácii častíc TiO₂ v disperzii. Tento efekt bol popísaný aj v literatúre kedy autori [51] sledovali aglomeráciu Ag nanočastíc a zistili, že v prítomnosti SGF s obsahom pepsínu je aglomerácia strieborných častíc nižšia v porovnaní s čistou SGF.

Tab. 9. Stanovenie veľkosti častíc TiO₂ v médiu so sérom v priebehu 150 minút

Čas [min]	PRECH 1		PRECH 5		SIGMA		SOLTEX	
	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD
0	351	3,8	404	7,6	1087	47	322	0,6
20	344	3,7	412	3,0	984	41	314	4,6
40	355	5,8	410	4,8	835	26	311	2,8
60	346	7,9	415	7,8	823	20	308	4,3
80	354	6,2	394	9,0	743	39	304	3,8
100	354	6,1	364	6,9	670	17	307	4,2
120	340	7,0	364	4,8	664	15	302	1,0
150	337	4,7	331	4,8	604	33	301	3,0

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka



Obr. 18. Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO_2 v médiu so sérom

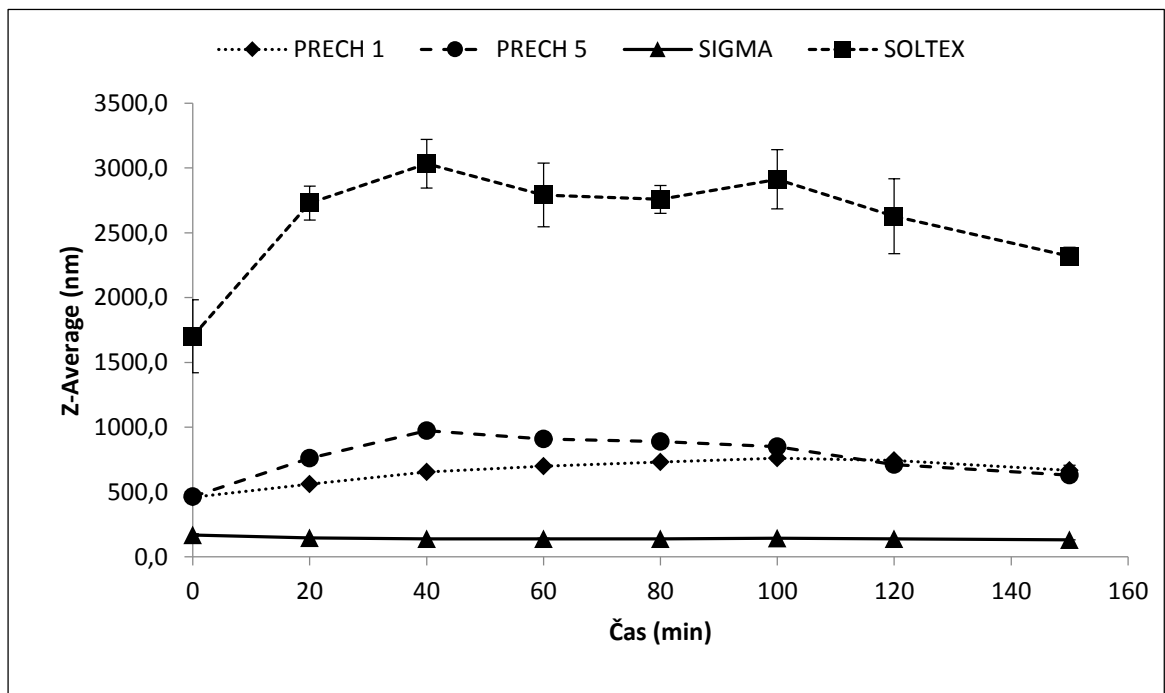
8.1.5 Stanovenie veľkosti častíc TiO_2 v simulovanej žalúdočnej tekutine

Ďalšími tekutinami, v ktorých bolo merané správanie sa veľkosti častíc jednotlivých vzoriek nano TiO_2 boli tekutiny tráviaceho traktu. Prvým prostredím bola simulovaná žalúdočná tekutina (SGF, pH = 1,2). Častice vzorky PRECH 1 zväčšili svoju veľkosť po prvom meraní v SGF na 459 ± 16 nm a počas 150 min svoju veľkosť postupne zmenila na maximálnu hodnotu 762 ± 21 nm. Vzorka PRECH 5 sa správala podobne ako vzorka PRECH 1, ale jej maximálna hodnota, ktorú počas merania dosiahla bola 973 ± 24 nm. Vzorka SIGMA zväčšila svoju veľkosť iba nebadateľne a to na hodnotu 169 ± 10 nm a po skončení merania činila veľkosť $131 \pm 0,8$ nm. Táto vzorka bola teda v prostredí SGF najstabilnejšia. U vzorky SOLTEX bola zmena najvýraznejšia. Po prvom meraní bola veľkosť častíc 1701 ± 282 nm a po ukončení merania bola veľkosť častíc 2319 ± 70 nm, čo značí, že častice boli podrobene výraznej aglomerácii.

Tab. 10. Stanovenie veľkosti častíc TiO_2 v simulovanej žalúdočnej tekutine v priebehu 150 minút

Čas [min]	PRECH 1		PRECH 5		SIGMA		SOLTEX	
	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD
0	459	16	464	38	169	10	1701	282
20	561	16	761	26	146	2,7	2728	131
40	656	7	973	24	139	2,2	3032	187
60	700	10	908	35	140	3,3	2792	246
80	731	16	891	12	138	1,8	2757	107
100	762	21	849	43	144	2,9	2913	229
120	745	21	711	40	138	4,5	2627	289
150	656	42	630	36	131	0,8	2319	70

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka



Obr. 19. Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO_2 v simulovanej žalúdočnej tekutine ($pH = 1,2$)

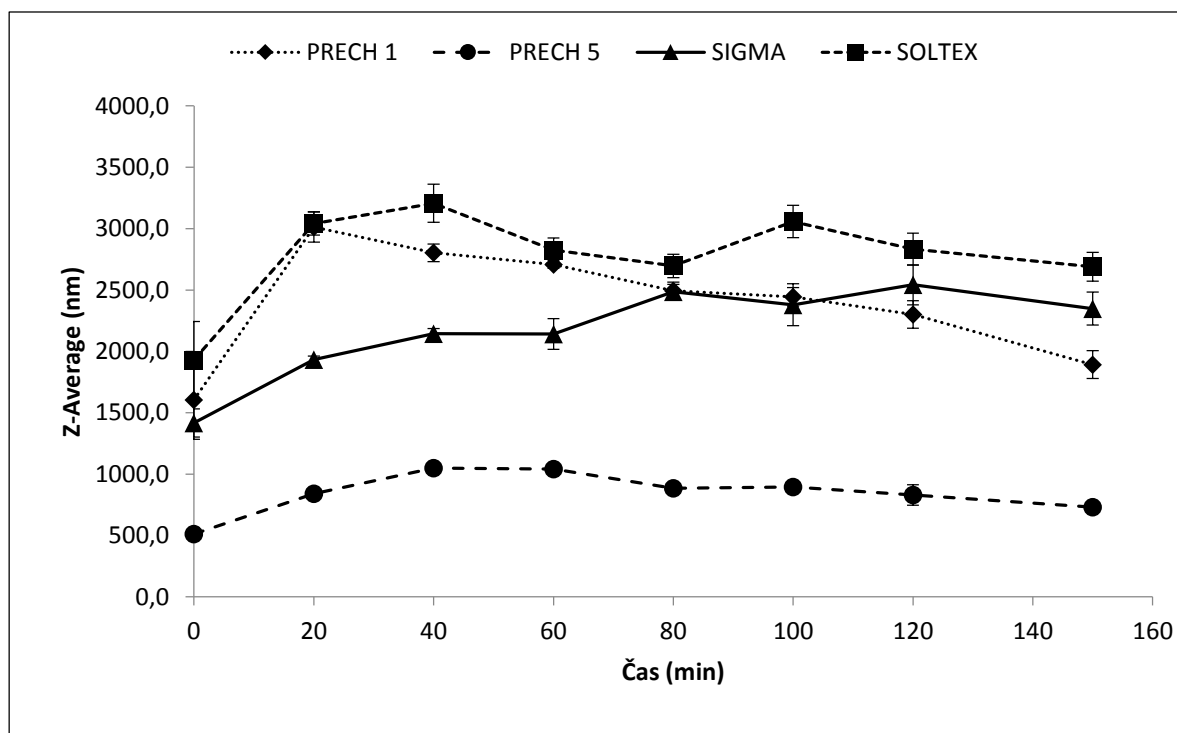
8.1.6 Stanovenie veľkosti častíc TiO₂ v simulovanej žalúdočnej tekutine s prídavkom pepsínu

Druhou tekutinou z prostredia tráviaceho traktu bola takisto SGF (pH = 1,2), ale s prídavkom enzýmu pepsínu. Oproti čistej SGF všetky vzorky menili veľkosť svojich častíc oveľa výraznejšie. Vzorka PRECH 1 mala veľkosť svojich častíc po prvom meraní 1605±320 nm a počas merania dosiahli maximálnu hodnotu 3014±124. Po ukončení merania opäť zmenili častice veľkosť na 1893±113 nm. Vzorka PRECH 5 mala po prvom meraní veľkosť 512±52 nm a počas merania dosiahli častice maximálnu veľkosť 1051±25 nm. Vzorka SIGMA mala po prvom meraní v SGF s pepsínom častice veľkosti 1417±313 nm a po ukončení 2349±117 nm. Vzorka SOLTEX mala hodnotu na začiatku merania častice s priemerom 1930±116 nm a počas 150 minút dosiahli častice maximálnu veľkosť 3206±42 nm. Vzorka teda v danom prostredí výrazne aglomerovala.

Tab. 11. Stanovenie veľkosti častíc TiO₂ v simulovanej žalúdočnej tekutine s prídavkom pepsínu v priebehu 150 minút

Čas [min]	PRECH 1		PRECH 5		SIGMA		SOLTEX	
	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD
0	1605	320	512	52	1417	313	1930	116
20	3014	124	842	44	1933	94	3041	29
40	2803	72	1051	25	2144	156	3206	42
60	2709	34	1040	20	2143	99	2826	125
80	2493	71	885	14	2485	95	2696	61
100	2444	76	895	19	2380	132	3058	170
120	2301	112	830	82	2543	131	2833	163
150	1893	113	730	28	2349	117	2690	134

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka



Obr. 20. Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO_2 v simulovanej žalúdočnej tekutine s prídavkom pepsínu

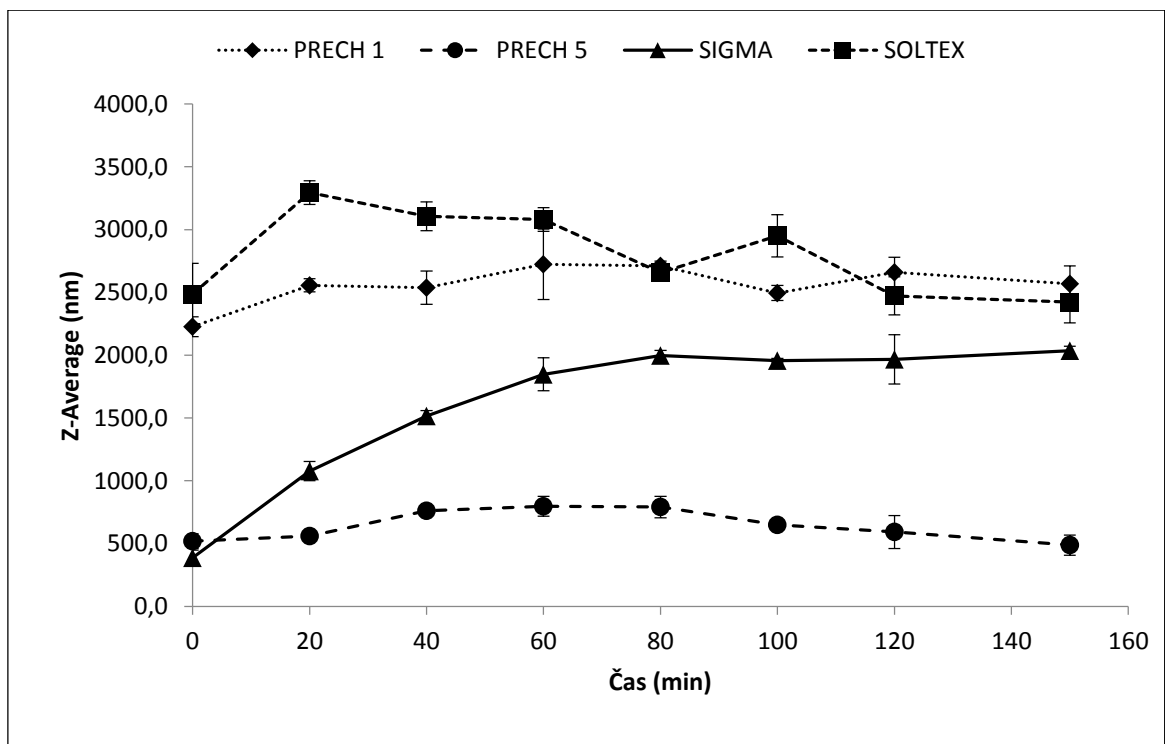
8.1.7 Stanovenie veľkosti častíc TiO_2 v simulovanej črevnej tekutine

Ďalšou tekutinou tráviaceho traktu bola simulovaná črevná tekutina (SIF, pH = 6,8). Vzorka PRECH 1 výrazne zmenila svoju veľkosť po prvom meraní na hodnotu 2226 ± 79 nm, no počas merania už veľmi táto hodnota nekolísala. Z toho vyplýva, že častice aglomerovali do väčších zhlukov. Vzorka PRECH 5 svoju veľkosť zmenila menej rapídne a po prvom meraní mali častice priemer 520 ± 58 nm. Počas merania sa ich hodnota zvýšila na 797 ± 79 nm a po ukončení boli častice opäť menšie a mali 488 ± 81 nm. Došlo k menej výraznej aglomerácii, ale aj k sedimentácii častíc. Vzorka SIGMA po prvom meraní ešte nebola výrazne ovplyvnená, no v priebehu merania dosiahla maximálnej veľkosti 2035 ± 37 nm. U tejto vzorky dochádzalo k postupnej aglomerácii častíc. Vzorka SOLTEX v prostredí SIF po prvom meraní vykazovala hodnotu veľkosti častíc 2486 ± 247 nm a v priebehu merania sa častice zväčšovali až do hodnoty 3106 ± 115 nm. Došlo takisto k výraznej aglomerácii častíc.

Tab. 12. Stanovenie veľkosti častíc TiO_2 v simulovanej črevnej tekutine v priebehu 150 minút

Čas [min]	PRECH 1		PRECH 5		SIGMA		SOLTEX	
	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD
0	2226	79	520	58	386	63	2486	247
20	2556	53	560	19	1077	77	3295	94
40	2538	132	761	24	1516	43	3106	115
60	2725	280	797	79	1848	132	3081	94
80	2711	40	791	85	1998	40	2657	18
100	2495	60	650	27	1956	17	2950	169
120	2661	119	593	130	1968	196	2473	153
150	2568	142	488	81	2035	37	2422	166

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka

Obr. 21. Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO_2 v simulovanej črevnej tekutine

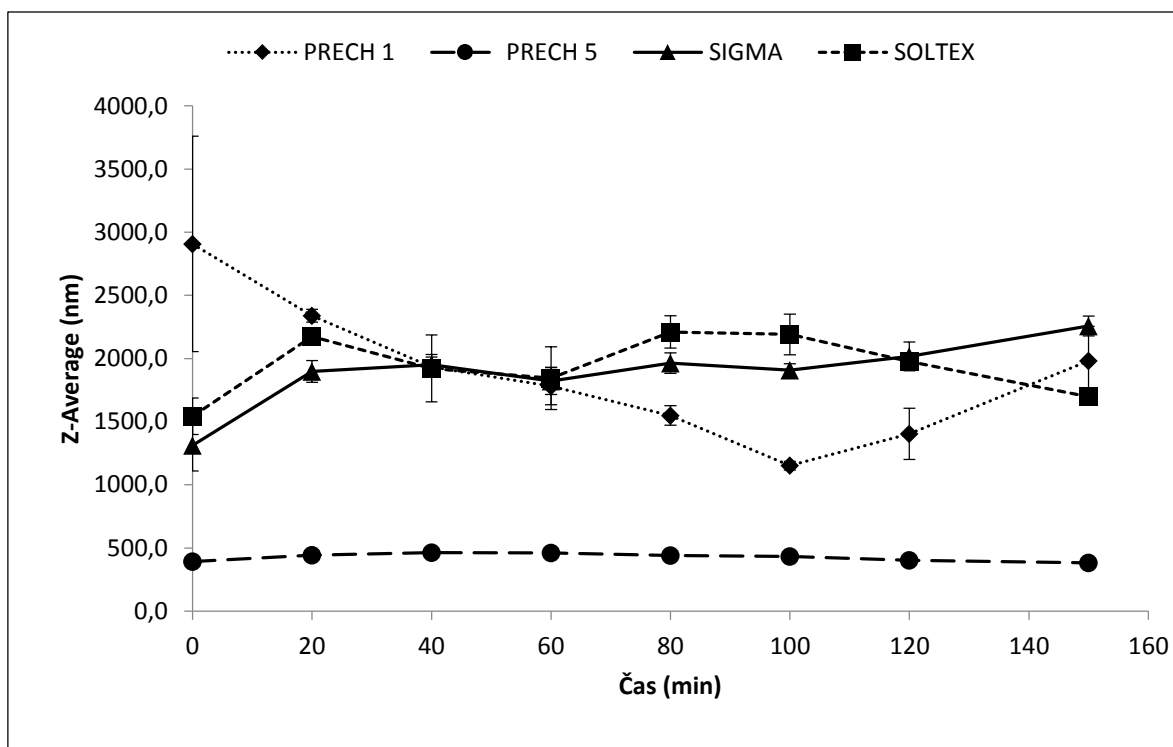
8.1.8 Stanovenie veľkosti častíc TiO₂ v simulovaných slinách

Poslednou tekutinou z prostredia tráviaceho traktu boli simulované sliny. Vzorka PRECH 1 po prvom meraní mala veľkosť častíc v maximálnej hodnote a to 2908±854 nm. Počas merania sa ich veľkosť zmenila na konečných 1981±274 nm. Vzorka teda sedimentovala a jej častice aj výrazne aglomerovali do väčších skupín. Vzorka PRECH 5 oproti ostatným vzorkám zmenila veľkosť častíc najmenej. Po prvom meraní mali častice 392±13 nm a počas merania dosiahli maximálnej hodnoty 463±16 nm. Po 150 minútach mali častice 384±7 nm, čo naznačuje miernu sedimentáciu častíc. Vzorka SOLTEX takisto výrazne aglomerovala a po prvom meraní mali častice 1544±144 nm. Maximálna veľkosť častíc tejto vzorky bola 2211±128 nm a po ukončení merania mali častice 1697±32 nm. Vzorka teda taktiež aj sedimentovala.

Tab. 13. Stanovenie veľkosti častíc TiO₂ v simulovaných slinách v priebehu 150 minút

Čas [min]	PRECH 1		PRECH 5		SIGMA		SOLTEX	
	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD	Z-average [nm]	SD
0	2908	854	392	13	1313	202	1544	144
20	2339	50	445	10	1898	86	2175	56
40	1935	77	463	16	1952	81	1921	265
60	1782	148	460	21	1822	106	1845	249
80	1549	77	441	3	1963	81	2211	128
100	1152	34	434	9	1909	50	2191	161
120	1404	203	404	12	2017	115	1976	29
150	1981	274	384	7	2258	79	1697	32

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka



Obr. 22. Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO_2 v simulovaných slinách

8.1.9 Zhrnutie

Metódou DLS bolo analyzované správanie sa častíc vzoriek v rôznych disperzných prostrediach. Prostredia PBS, médium a médium s 10% teľacím sérom boli dôležité pre analýzu, pretože sa používajú na testovanie vzoriek *in vitro*, napríklad pri testoch bio-kompatibility. Cieľom bolo sledovať stabilitu častíc pozorovaním aglomerácie a sedimentácie v daných prostrediach. V týchto troch prostrediach sa jednoznačne najlepšie správala vzorka PRECH 5, ktorá aglomerovala najmenej výrazne. V médiu so sérom mali takmer všetky vzorky podobné správanie, čo bolo spôsobené pravdepodobne prítomnosťou proteínov, ktoré vytvorili akúsi ochrannú vrstvu na povrchu častíc. Pokiaľ zhodnotíme aglomeráciu najpodrobnejšie študovaných vzoriek PRECH 5 a SIGMA v týchto médiách, tak môžeme konštatovať, že aglomerácia rástla pre obidve vzorky rovnako, a to v nasledujúcom poradí: médium so sérom < médium < PBS.

Analýza vzoriek v tekutinách tráviaceho traktu bola prevedená na objasnenie ako sa častice môžu správať v ľudskom organizme po ich požití. Vzorka PRECH 5 a SIGMA aglomerovali najmenej. Ich chovanie vo vzťahu k aglomerácii však bolo v rôznych simulovaných telesných tekutinách rôzne. Pre PRECH 5 rástla aglomerácia nasledovne: simulované sliny <

SIF < SGF < SGF + pepsín. Pre vzorku SIGMA však bolo poradie nasledujúce: SGF < SIF < simulované sliny < SGF + pepsín. Z výsledkov je zrejmé, že prítomnosť pepsínu v simulovanej žalúdočnej tekutine spôsobila najväčšiu aglomeráciu oboch vzoriek. Rozdielne chovanie v ďalších telesných tekutinách môžeme vysvetliť rozdielnym zeta potenciálom stanoveným pre obidve vzorky (Tab.14.), kedy pre PRECH 5 bol zeta potenciál záporný ($-21,3 \pm 0,3$ mV), zatiaľ čo pre vzorku SIGMA bol kladný ($+18,8 \pm 0,3$ mV). Vzorka SOLTEX vo všetkých tekutinách tráviaceho traktu aglomerovala najviac.

8.2 Stanovenie zeta potenciálu

Medzi ďalšie charakteristiky, ktoré boli skúmané v diplomovej práci patrí aj zeta potenciál jednotlivých častíc vzoriek. Jeho hodnota vypovedá o stabilite sledovaných disperzií. Ak je hodnota zeta potenciálu veľká, a to buď kladná, alebo záporná, budú sa navzájom častice odpudzovať, čo zabráni ich aglomerácii. Pokiaľ sú jeho hodnoty nízke, častice budú aglomerovať. Hraničná hodnota stability/nestability častíc predstavuje +30 mV alebo -30 mV. Hodnoty zeta potenciálu boli stanovované iba v Di-H₂O, pretože disperzné médiá obsahujú rôzne zložky ako soli, proteíny a pod., ktoré ovplyvňujú hodnoty potenciálu, čo by znemožnilo ich zrovnanie. Preto uvedené hodnoty vypovedajú iba o stabilite vo vodnej disperzii častíc.

Tab. 14. Hodnoty zeta potenciálu jednotlivých vzoriek vo vode s neadjustovaným pH

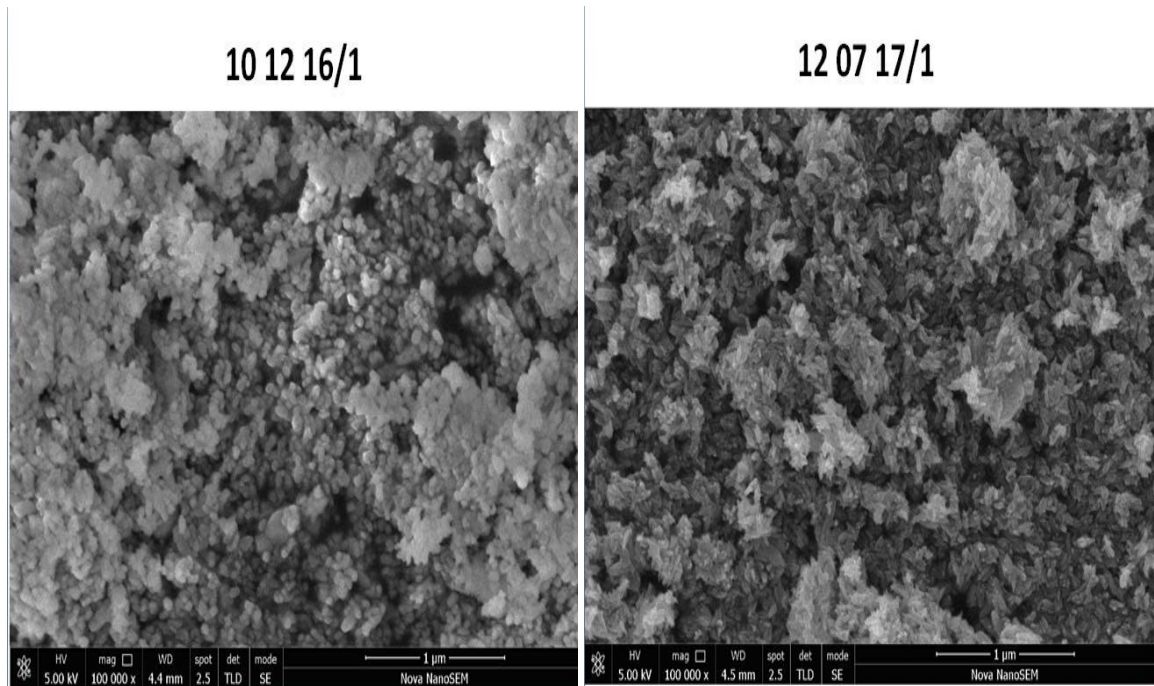
Vzorka	Zeta potenciál [mV]	SD [mV]
PRECH 1	-9,3	0,3
PRECH 5	-21,4	0,3
SIGMA	18,8	0,3
SOLTEX	-24,8	0,5

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka

Z výsledkov merania zeta potenciálu jednotlivých vzoriek je zrejmé, že v neadjustovanom pH ani jedna z nich nedosiahla hranicu stability. U všetkých vzoriek je teda pravdepodobné, že budú v disperzných prostrediach aglomerovať a spájať sa do väčších celkov. Z Tab. 14. Je takisto zrejmé, že vzorka SIGMA ako jediná vykazovala kladný zeta potenciál, čo sa prejavilo vo vyššie popísaných rozdieloch jej správania sa v prostredí o rôznom pH (SGF pH = 1,2 a SIF pH = 6,8)

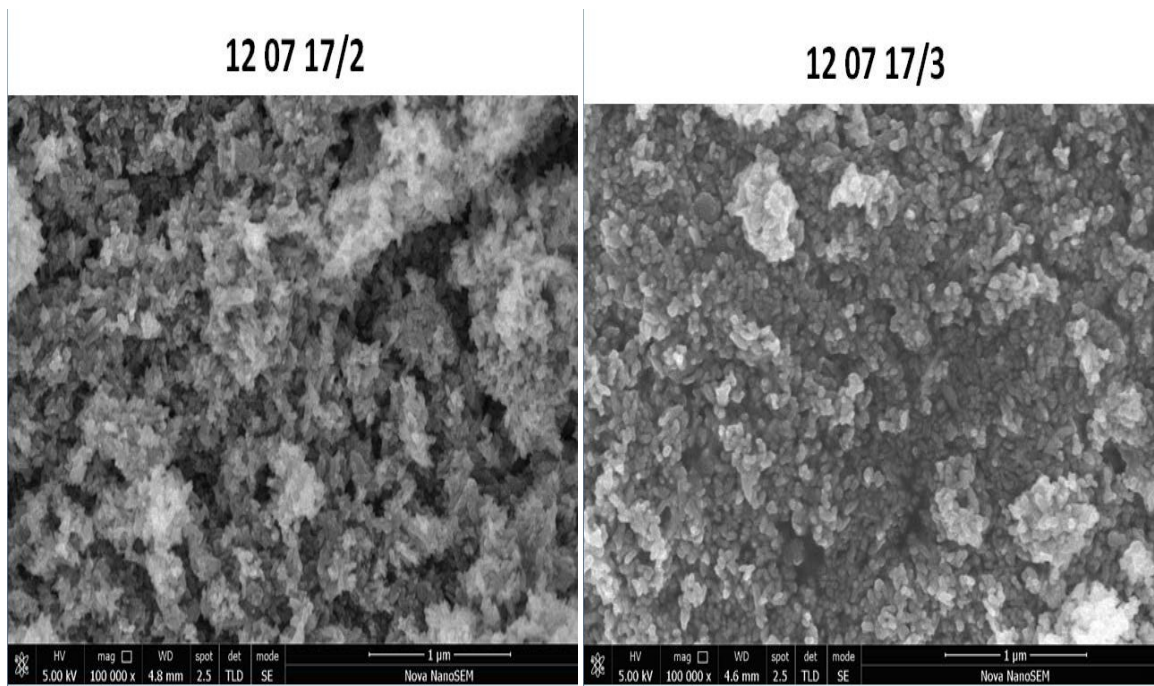
8.3 SEM

Vďaka SEM bolo možné porovnať jednotlivé vzorky PRCH podľa ich tvaru a morfológie. Medzi jednotlivými vzorkami sú zreteľné rozdiely. Vzorky PRECH 5 (Obr. 28) a PRECH 6 (Obr. 29) vykazujú viditeľne rozdielnu morfológiu a tvar častíc ako ostatné vzorky.



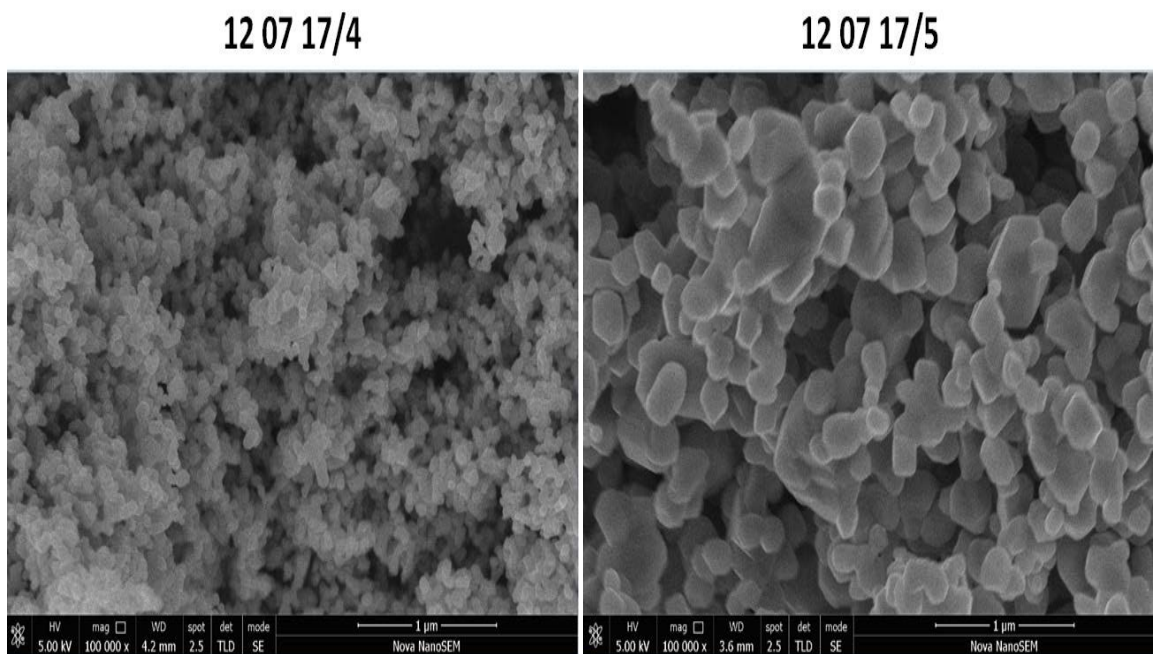
*Obr.23. Vyhodnotenie pomocou SEM
vzorky 101216/1 – PRECH 1.0*

*Obr.24. Vyhodnotenie pomocou SEM
vzorky 120717/1 – PRECH 1*



*Obr.25. Vyhodnotenie pomocou SEM
vzorky 120717/2 – PRECH 2*

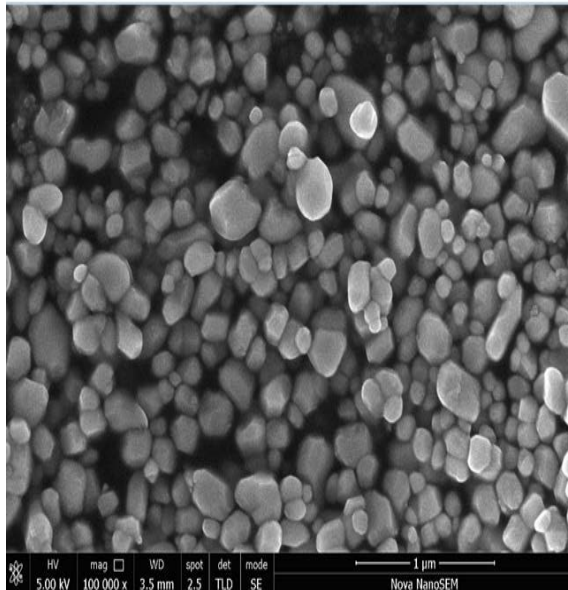
*Obr.26. Vyhodnotenie pomocou SEM vzorky
120717/3 – PRECH 3*



*Obr.27. Vyhodnotenie pomocou SEM
vzorky 120717/4 – PRECH 4*

*Obr.28. Vyhodnotenie pomocou SEM
vzorky 120717/5 – PRECH 5*

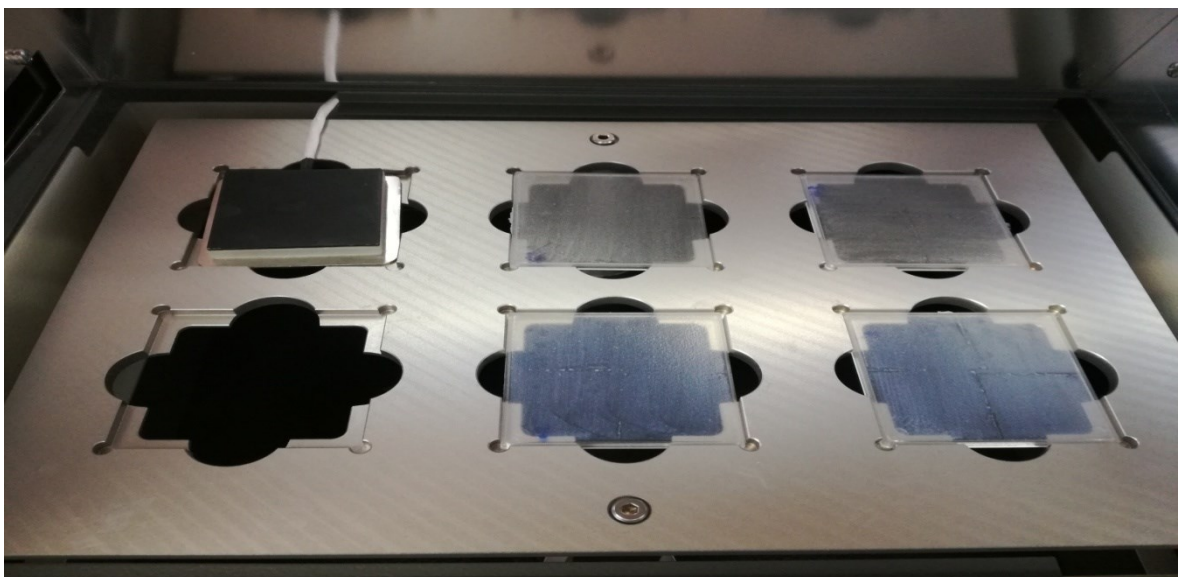
12 07 17/6



Obr.29. Vyhodnotenie pomocou SEM vzorky 120717/6 – PRECH 6

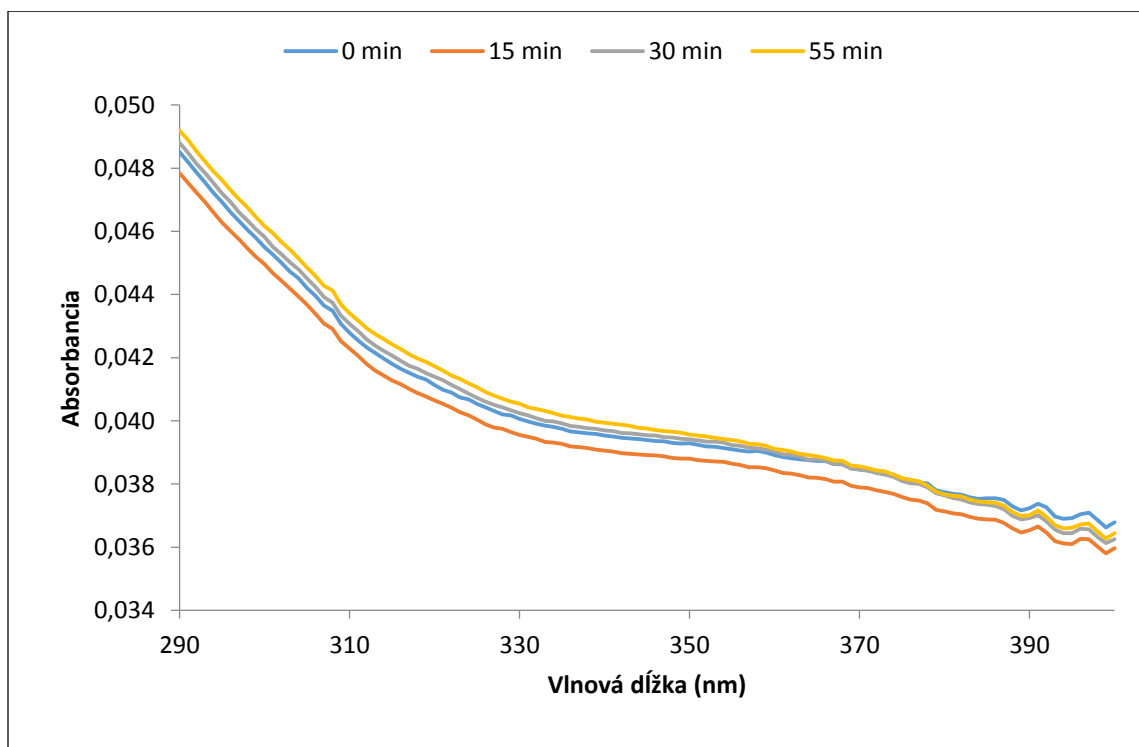
8.4 Stanovenie účinnosti TiO₂ ako UV filtra

Ako už bolo spomenuté na test boli použité vzorky s označením PRECH 5 a od výrobcu SIGMA. Stanovenie filtračnej účinnosti prebehlo u všetkých pripravených dosiek naraz, vložení do prístroja SUNTEST CPS+ a ožiarením UV svetlom po dobu 55 minút.



Obr.30. Dosky s nanesenými vzorkami pred ožiarením vložené do prístroja SUNTEST CPS+

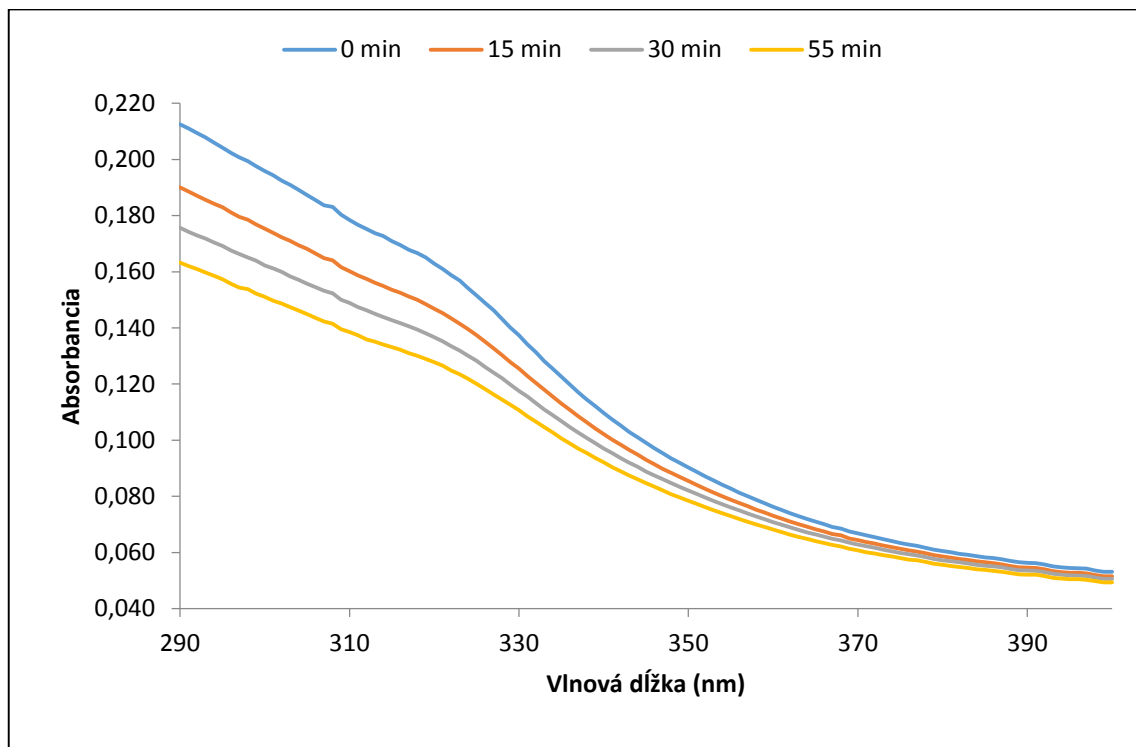
Vzorky sa javili rozdielne už pri pohľade voľným okom. Po spracovaní dát získaných zo spektrofotometra boli zostavené grafické závislosti absorpcie na vlnovej dĺžke. Absorbancia bola meraná pri vlnových dĺžkach od 400 do 290 nm. Vlnové dĺžky 320 – 400 nm odpovedajú UVA žiareniu, zatiaľ čo dĺžky 290 – 320 nm prináležia UVB žiareniu. Vzorka PRECH 5 (Obr. 31) mala pri $\lambda=400$ nm pred ožiarovaním hodnotu absorpcie 0,037. V priebehu ožarovania sa pri tejto hodnote vlnovej dĺžky absorpcia výrazne nemenila. Hodnota absorpcie pri $\lambda=290$ nm pred ožiarovaním bola 0,049. Po 15-tich minútach expozície UV svetla klesla na hodnotu 0,048 a pri odobratí vzoriek po 30-tich a 55-tich minútach mala opäť hodnotu 0,049. Je však tiež možné konštatovať, že k výraznej zmene absorpcie počas ožarovania nedošlo.



Obr. 31. Priebeh merania účinnosti ako UV filtra vzorky PRECH 5

Vzorka od výrobcu SIGMA ALDRICH sa správala odlišne (Obr.32). Pred ožiarovaním mala hodnotu absorpcie pri $\lambda=400$ nm 0,053. V priebehu ožarovania absorpcia klesla iba nevýrazne. Po 15-tich minútach sa jej hodnota zmenila na 0,052, po 30-tich minútach na 0,051 a po 55-tich minútach klesla na hodnotu 0,049. Zmeny pri vlnovej dĺžke $\lambda=290$ nm však boli výraznejšie. Pred ožiarovaním bola hodnota absorpcie 0,213. Po 15-tich

minútach klesla jej hodnota na 0,190, po 30-tich minútach na 0,176 a po 55-tich minútach až na 0,163.



Obr. 32. Priebeh merania účinnosti ako UV filtra vzorky SIGMA

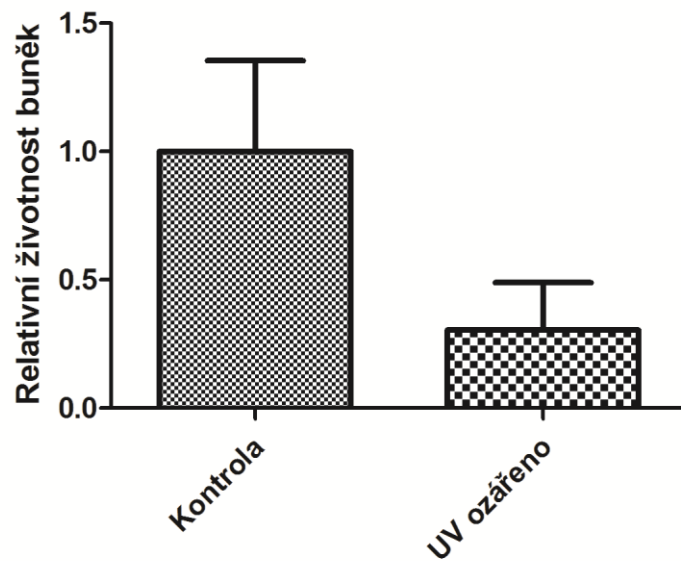
Z grafického spracovania je zrejmé, že vzorka s označením PRECH 5 bola po expozícii UV žiareniu po dobu 55 minút stabilnejšia ako vzorka SIGMA.

Z Obr. 31 a 32 súčasne vyplýva, že obe vzorky sú viac účinné v UVB oblasti, keďže je ich absorbancia v rozmedzí 290 – 320 nm vyššia, než pri dlhších vlnových dĺžkach odpovedajúcich UVA žiareniu, čo je typická vlastnosť TiO_2 . Súčasne je zrejmé, že pri rovnakej koncentrácii disperzie 5 % je absorbancia, teda efektivita TiO_2 disperzie vyššia pre vzorku SIGMA s menšími časticami než pre vzorku PRECH, ktorej častice sú väčšie. Ďalším rozdielom je zloženie vzoriek. Zatiaľ čo vzorka PRECH je TiO_2 vo forme rutilu, vzorka SIGMA je zmesou rutilu a anatasu.

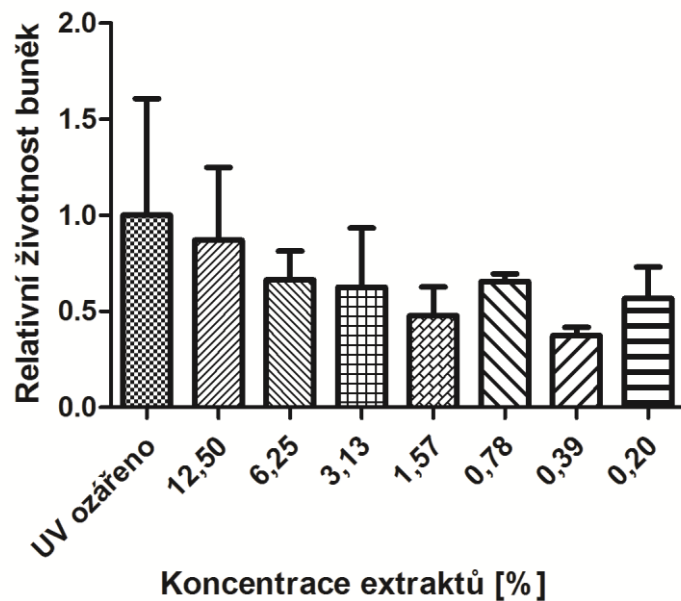
8.5 Stanovenie cytotoxicity nano TiO_2

Cytotoxicita je dôležitým parametrom pri posudzovaní bezpečnosti a účinnosti kozmetických prípravkov. Pri vyhodnotení výsledkov z tohto stanovenia boli zostrojené grafické závislosti relatívnej životaschopnosti buniek na koncentrácii TiO_2 , ktoré boli

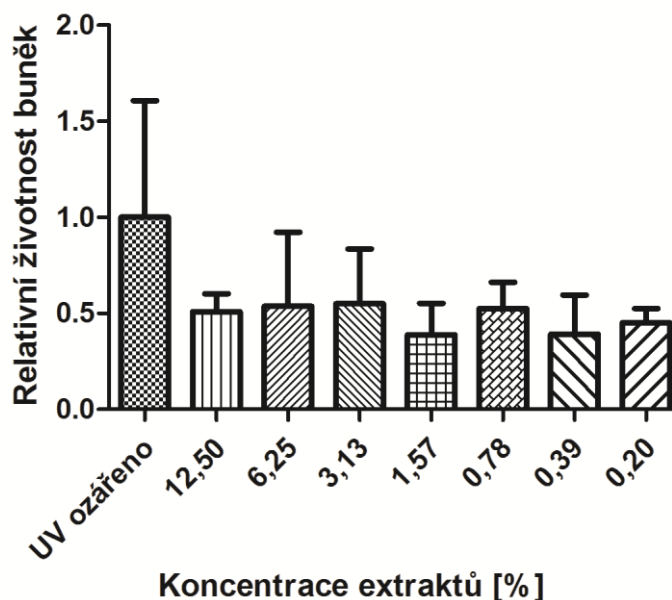
porovnávané s kontrolou. Ako kontrola výsledkov cytotoxicity uvedených na Obr. 33 a 34 je považovaná relatívna životaschopnosť buniek po ožiarení UV svetlom. Na Obr. 32 je znázornený vplyv UV žiarenia na myšie fibroblasty NIH/3T3 bez prítomnosti TiO₂. Z obrázku je zrejmé, že pre bunky NIH/3T3 bolo toxické už samotné UV žiarenie, ktoré spôsobilo zníženie životaschopnosti buniek viac ako o polovicu.



Obr.33. Kontrola životaschopnosti buniek NIH/3T3 bez prítomnosti TiO₂



Obr.34. Životnosť buniek NIH/3T3 v závislosti na koncentrácii TiO_2 vzorky SIGMA po ožiarení UV svetlom



Obr.35. Životnosť buniek NIH/3T3 v závislosti na koncentrácii TiO_2 vzorky PRECH 5 po ožiarení UV svetlom

Na vyhodnotenie testu bola použitá nasledujúca stupnica cytotoxicity podľa požiadaviek medzinárodnej normy ISO 10993-5:

- netoxický účinok: množstvo viabilných buniek vyšší než 80 %,
- slabo toxický účinok: množstvo viabilných buniek 60 – 80 %,
- stredne toxický účinok: množstvo viabilných buniek 40 – 60 %,
- Silno toxický účinok: množstvo viabilných buniek menší než 40%.

Viabilita buniek po pridaní vzorky TiO_2 SIGMA o koncentrácii 12,5 % klesla oproti kontrole na cca 90%, čo značí, že dané množstvo nebolo pre bunky toxické. So znižujúcou sa koncentráciou toxicita rástla a keď vezmeme do úvahy smerodajnú odchýlku stanovenia, bola viabilita buniek pri nižších koncentráciách vo väčšine prípadov v blízkosti 60 %. To značí, že dané množstvo malo na bunky stredne toxický účinok. Výnimkou bola koncentrácia 0,39 %, pri ktorej bol stanovený silne toxický účinok.

Životaschopnosť buniek po pridaní vzorky PRECH 5 o koncentrácii 12,5 % mala na bunky stredne toxický účinok, pretože ich viabilita klesla na úroveň 50 %. Podobne ako u vzorky SIGMA sa toxicita pri ďalšom riedení menila iba veľmi málo.

V súvislosti s textom cytotoxicity na ožiarených bunkách je potrebné poznamenať, že testovanie cytotoxicity na bunkách NIH/3T3 nebolo v súlade s nariadením OECD, ktoré prepisuje použitie línie Balb/c 3T3. Tá však nebola na pracovisku CPS k dispozícii. Z výsledkov daného testu teda nie je možné urobiť očakávané závery, keďže bunky, ktoré boli použité sú v porovnaní s odporúčanými bunkami citlivejšie.

Pri porovnaní toxického účinku na bunky vzoriek SIGMA a PRECH 5 môžeme skonštatovať, že toxickejší účinok na viabilitu buniek mala vzorka PRECH 5, pretože ich životaschopnosť po pridaní TiO_2 a UV ožiareniu pre koncentráciu 12,5 % nižšia ako u vzorky SIGMA. Pri nižších koncentráciách boli výsledky oboch vzoriek porovnateľné. V novej štúdii však bude nutné zopakovať test s bunkami Balb/c 3T3.

ZÁVER

Diplomová práca sa v teoretickej časti venovala charakterizácii nanomateriálov, priblíženiu ich základných vlastností a zhrnutiu ich využitia v priemysle. Ďalej sa teoretická časť venovala dôkladnejšie nanočasticiam TiO_2 a ZnO , ktoré sa najčastejšie využívajú ako UV filtre v kozmetických prípravkoch. Bolo popísané takisto ich pôsobenie na organizmus a jednotlivé orgány, cesty vstupu týchto častíc do organizmu a mechanizmus možného toxického účinku na človeka. V neposlednom rade bolo dôležité zhrnúť aj legislatívne požiadavky na dané nanomateriály, keďže spadajú pod prísnu kontrolu.

Praktická časť diplomovej práce sa venovala výhradne TiO_2 , kde hlavnou časťou bolo popísať správanie sa daných častíc v rôznych disperzných prostrediach, prostredníctvom metódy dynamického rozptylu svetla (DLS) meraním na prístroji Zetasizer Nano ZS90. Danou metódou boli popísané zmeny veľkostí v závislosti od prostredia, v ktorom sa častice nachádzali a časový priebeh zmien po dobu 150 minút. Meranie v PBS, v médiu a v médiu s prídavkom 10 % teľacieho séra má význam pri skúmaní častíc in vitro, kde bolo zistené, že všetky vzorky v daných prostrediach aglomerovali, teda zväčšovali svoju veľkosť. V médiu so sérom častice aglomerovali najmenej, čo je spôsobené pravdepodobne vytvorením komplexu nanočastice – proteín, ktorý daný systém stabilizoval. Keďže veľmi pravdepodobnou cestou vstupu nanočastíc do organizmu je aj cez ústnu dutinu, meranie veľkostí častíc pomocou metódy DLS bolo prevedené aj v simulovaných tekutinách tráviaceho traktu, teda v slinách, v žalúdočnej tekutine, v žalúdočnej tekutine s prídavkom pepsínu a v črevnej tekutine. Výsledky týchto stanovení jasne hovoria, že častice všetkých použitých vzoriek TiO_2 v týchto tekutinách aglomerovali a niektoré aj sedimentovali, čo by mohlo znamenať usadenie daných častíc v gastrointestinálnom trakte. Na prístroji Zetasizer Nano ZS90 bolo takisto prevedené aj meranie stability pomocou stanovenia hodnôt zeta potenciálu daných vzoriek, ktoré určujú pravdepodobnosť aglomerácie častíc. Z výsledkov je zrejmé, že častice daných vzoriek nedosahujú hodnotu ± 30 mV, ktorá stanovuje hranicu stability častíc.

Na ďalšiu charakterizáciu jednotlivých vzoriek boli použité tiež výsledky zo skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM), ktoré zostavili v Centre polymérnych systémov v Zlíne.

Posledným, veľmi dôležitým stanovením, bolo stanovenie cytotoxicity daných vzoriek. Stanovenie prebiehalo podľa odporúčaní OECD s malými úpravami. Boli použité bunky NIH/3T3, ktoré boli spolu s vybranými vzorkami TiO_2 vystavené UV žiareniu po dobu 55

minút. Samotnému stanoveniu predchádzalo ožiarenie buniek bez prítomnosti TiO₂, kde bolo zistené, že daný typ buniek je citlivý už na samotné UV žiarenie a viabilita buniek sa výrazne znížila. V prítomnosti TiO₂ sa toxický účinok na bunky ešte prehĺbil. Porovnaním vzoriek, ktoré boli použité na daný výskum môžeme skonštatovať, že vzorka PRECH 5 mala toxickejší účinok a viabilitu buniek znížila oproti vzorke SIGMA výraznejšie. Keďže na meranie bol použitý iný typ buniek ako je určený v OECD, výsledky preto môžu byť odlišné, aké by sme mohli očakávať, preto je potrebné dodržať pokyny OECD na stanovenie fotocytotoxicity a použiť odporúčanú bunkovú líniu Balb/c 3T3.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] *ODPORÚČANIE KOMISIE z 18. októbra 2011 o vymedzení pojmu nanomateriál: (Text s významom pre EHP)*. In: . Úradný vestník Európskej únie, 20.10.2011, L 275/38. Dostupné také z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011H0696&from=EN>
- [2] KUBÍNEK, Roman. *Vzdělávání v nanotechnologiích*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011.
- [3] VOLLATH, D. *Nanomaterials: an introduction to synthesis, properties and application*. Weinheim: Wiley-VCH, c2008. ISBN 978-3-527-31531-4.
- [4] BARBHUIYA, Salim a Muneeb QURESHI. Applications of Nanotechnology in Cement and Concrete Science. SONI, Shivani, Amandeep SALHOTRA a Mrutyunjay SUAR, ed. *Handbook of Research on Diverse Applications of Nanotechnology in Biomedicine, Chemistry, and Engineering* [online]. IGI Global, 2015, s. 624-639 [cit. 2018-05-14]. *Advances in Chemical and Materials Engineering*. DOI: 10.4018/978-1-4666-6363-3.ch029..
- [5] MIJATOVIC, D, Jan C.T EIJKEL a Albert VAN DEN BERG. Technologies for nanofluidic systems. *Lab on a Chip* [online]. Royal Soc Chemistry, 2005, **5**(5), 492-500 [cit. 2018-03-09]. DOI: 10.1039/b416951d. ISSN 14730197
- [6] DUONG, Johnson. *Nanotechnology* [online]. [cit. 2018-05-14]. Dostupné z: <https://nanotechnologyjd.weebly.com/manufacturing-processed.html>
- [7] SINGH, M., S. MANIKANDAN a A. K. KUMARAGURU. Nanoparticles: A New Technology with Wide Applications. *Research Journal of Nanoscience and Nano-technology* [online]. 2011, roč. 1, č. 1, s. 1-11 [cit. 2014-11-20]. DOI: 10.3923/rjnn.2011.1.11
- [8] *Pharmainfo.net* [online]. 2016 [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <http://www.pharmainfo.net/book/emerging-trends-nanotechnology-pharmacy-1introduction-nanotechnology/physical-and-chemical>
- [9] TUNCEL, Dönüs a Hilmi Volkan DEMIR. Conjugated polymer nanoparticles. *Nanoscale*[online]. Royal Soc Chemistry, 2010, **2**(4), 484-494 [cit. 2017-12-09]. DOI: 10.1039/b9nr00374f. ISSN 20403364
- [10] ELSAESSER, Andreas a C. Vyvyan HOWARD. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**(2), 129-137 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.addr.2011.09.001.

- [11] LU, Pei-Jia, Shou-Chieh HUANG, Yu-Pen CHEN, Lih-Ching CHIUEH a Daniel Yang-Chih SHIH. Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. *Journal of Food and Drug Analysis*[online]. 2015, **23**(3), 587-594 [cit. 2018-05-15]. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.02.009.
- [12] KHAN, Yaqub; GUPTA, Poonam; BIHARI, Bipin; SHARMA, Vineet Kumar; AZIZ, Irfaan. A Review-Miracle of Nanotechnology in Cosmetics. *Research Journal of Topical and Cosmetic Sciences*. 2014, vol. 5, no. 1 s. 15-22. ISSN:0976-2981
- [13] MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* [online]. 2012, **8**(6), 1719-1729 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1039/C2SM06903B.
- [14] SLOVÁKOVÁ, Ivana. *Formulace a vlastnosti mikroemulzí s obsahem esenciálních olejů*. 2014. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [15] Copyright. *Dictionary of Energy* [online]. Elsevier, 2015, 2015, iv [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/B978-0-08-096811-7.50030-5.
- [16] FUKUI, Hiroshi. Development of New Cosmetics Based on Nanoparticles. *Nanoparticle Technology Handbook* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 399-405 [cit. 2018-05-15]. DOI: 10.1016/B978-0-444-64110-6.00008-1.
- [17] KATZ, Linda M., Kapal DEWAN a Robert L. BRONAUGH. Nanotechnology in cosmetics. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2015, **85**, 127-137 [cit. 2018-05-15]. DOI: 10.1016/j.fct.2015.06.020.
- [18] PARDEIKE, Jana, Aiman HOMMOSS a Rainer H MÜLLER. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*[online]. Elsevier B.V, 2009, **366**(1), 170-184 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.10.003.
- [19] VETTOR, M, P PERUGINI, S SCALIA, B CONTI, I GENTA, T MODENA a F PAVANETTO. Poly(D,L- lactide) nanoencapsulation to reduce photoinactivation of a sunscreen agent. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. Blackwell Publishing, 2008, **30**(3), 219-227 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1111/j.1468-2494.2008.00443.x.
- [20] CHEN, ZR; ZHONG, W; LIANG, ZT; LI, WQ; HE, GN; WANG, YZ; LI, W; XIE, YD; HE, QY. Photocatalytic Activity Enhancement of Anatase TiO₂ by Using TiO. *Journal of Nanomaterials*. 2014, vol. 2014 s. 1-9. ISSN:1687-4110

- [21] MANOJ, GUPTA Shipra Mital TRIPATHI. A Review of TiO₂ Nanoparticles. *中国科学通报: 英文版*. 2011, vol. 56, no. 16 s. 1639-1657. ISSN:1001-6538
- [22] HUANG, Yujian; LENAGHAN, Scott C; XIA, Lijin; BURRIS, Jason N; STEWART, C Neal Jr; ZHANG, Mingjun. Characterization of Physicochemical Properties of Ivy Nanoparticles for Cosmetic Application. *Journal of Nanobiotechnology*. 2013, vol. 11, no. 1 s. 3-14. ISSN:1477-3155
- [23] YU, Julia X a Thomas H LI. Distinct biological effects of different nanoparticles commonly used in cosmetics and medicine coatings. *Cell and Bioscience* [online]. Biomed Central, 2011, **1**(1), 19-19 [cit. 2017-12-09]. DOI: 10.1186/2045-3701-1-19.
- [24] Literature review on the safety of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens dostupné z : <https://www.tga.gov.au/literature-review-safety-titanium-dioxide-and-zinc-oxide-nanoparticles-sunscreens>
- [25] CHEN, L.L. a S.Q. WANG. Nanotechnology in Photoprotection. *Nanoscience in Dermatology* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 229-236 [cit. 2018-04-13]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802926-8.00018-5.
- [26] SMIJS, Threes G; PAVEL, Stanislav. Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Sunscreens: Focus on Their Safety and Effectiveness. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2011, vol. 4, no. 1 s. 95-112. ISSN:1177-8903
- [27] KUBAC, L, J AKRMAN, K KEJLOVA, et al. Characteristics of titanium dioxide microdispersions with different photo-activity suitable for sunscreen formulations. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Elsevier Science Bv, 2015, **481**(1-2), 91-96 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.02.004. ISSN 03785173
- [28] SIDDIQUE, Sumera; SHAH, Zaheer Hussain; SHAHID, Sammia; YASMIN, Farida. Preparation, Characterization and Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticles on Broad Spectrum of Microorganisms. *Acta Chimica Slovenica*. 2013, vol. 60, no. 3 s. 660-665. ISSN:1318-0207 str 663
- [29] PANDEY, Rajan Kumar a Vijay Kumar PRAJAPATI. Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. *International Journal of Biological*

- Macromolecules* [online]. 2018, **107**, 1278-1293 [cit. 2018-05-15]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.110.
- [30] ELSAESSER, Andreas a C. Vyvyan HOWARD. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**(2), 129-137 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.addr.2011.09.001.
- [31] Literature Review on the safety of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens. *Australian Government Department of Health: Therapeutic Goods Administration*. Australia, 2016.
- [32] DOHNALOVÁ, Lucie a Vlastimil DOHNAL. Nanočástice a jejich toxocita. *Chemické listy 109*. **2015**, 444 - 450.
- [33] ŠEDA, Ondřej, František LIŠKA a Lucie ŠEDOVÁ. *Aktuální genetika: Multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a genomiky* [online]. Praha: Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN, ©2005-2006 [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/slovník.htm>
- [34] *Biopedia* [online]. [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/genetika/chromozomove-mutacie>
- [35] *EuroChem: Professional Chemistry Guide* [online]. [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: http://archiv.eurochem.cz/index/toxi/443_a2_13.htm
- [36] DVOŘÁK, Miroslav. *Sledovanie poškodenia DNA metódou kometovej analýzy*. Brno, 2013. Dizertačná práca. Masarykova univerzita.
- [37] *Is.muni.cz, Informační systém Masarykovy univerzity: 6. Testy genotoxicity* [online]. [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2006/Bi8635/GenEkotox-05-07-Predn6.pdf>
- [38] LAM, ATN, EO GANBOLD, KH CHO, D KANG a SW JOO. Raman spectroscopy of gold nanoparticle conjugates of cosmetic ingredient kinetin. *Vibrational Spectroscopy* [online]. Elsevier Science Bv, 2014, **73**, 15-18 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.vibspec.2014.03.010.
- [39] PANDEY, Rajan Kumar a Vijay Kumar PRAJAPATI. Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **107**, 1278-1293 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.110.

- [40] *Nařízení Komise (EU), kterým se mění příloha VI nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích: draft*. In: . Brusel: Evropská komise, 2016.
- [41] MIHRANYAN, Albert, Natalia FERRAZ a Maria STRØMME. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science* [online]. 2012, **57**(5), 875-910 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2011.10.001.
- [42] ELSAESSER, Andreas a C. Vyvyan HOWARD. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**(2), 129-137 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.addr.2011.09.001.
- [43] TEUBL, Birgit J., Christa SCHIMPEL, Gerd LEITINGER, Bettina BAUER, Eleonore FRÖHLICH, Andreas ZIMMER a Eva ROBLEGG. Interactions between nano-TiO₂ and the oral cavity: Impact of nanomaterial surface hydrophilicity/hydrophobicity. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2015, **286**, 298-305 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.064.
- [44] Guidance for Industry: Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration: Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2014.
- [45] *Biopedia* [online]. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/bunka/biomembrany>
- [46] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích (Text s významem pro EHP). In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2009. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&qid=1418576251564&from=CS>
- [47] TEUBL, Birgit J., Christa SCHIMPEL, Gerd LEITINGER, Bettina BAUER, Eleonore FRÖHLICH, Andreas ZIMMER a Eva ROBLEGG. Interactions between nano-TiO₂ and the oral cavity: Impact of nanomaterial surface hydrophilicity/hydrophobicity. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2015, **286**, 298-305 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.064.
- [48] WARHEIT, D. B., W. J. BROCK, K. P. LEE, T. R. WEBB a K. L. REED. Comparative Pulmonary Toxicity Inhalation and Instillation Studies with Different TiO₂ Particle Formulations: Impact of Surface Treatments on Particle

- Toxicity. *Toxicological Sciences* [online]. 2005, **88**(2), 514-524 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1093/toxsci/kfi331.
- [49] PIKAL, Petr. *Medzinárodní kosmetologická konference Mikulov 2017: Doporučení RAC pro TiO₂ ve světle rizik, aneb je třeba se obávat použití (nano) TiO₂ ?*. 1. Kosmetologická společnost České republiky. ISBN 978-80-904679-8-9.
- [50] OECD/ECDE. *OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS: In Vitro 3T3 NR U phototoxicity test*. 434. 2014.
- [51] PIŠŤKOVÁ, Lucie. *Fotonová korelační spektroskopie v charakterizaci nanočástic*. 2015. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati v Zlíně.
- [52] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 minutes*. 8 s. Dostupné z: www.malvern.co.uk

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

μ	mikrometer
1M	1 molárny roztok
a.t.d'	A tak ďalej
Ag	Chemická značka pre prvok striebro
Al	Chemická značka pre prvok hliník
Al ₂ O ₃	Oxid hlinitý
ANESS	Agentúra pre potraviny, životné a pracovné prostredie, zdravie a bezpečnosť
Au	Chemická značka pre prvok zlato
CAS	Registračné číslo materiálu
CMR	Označenie kategórie látok identifikovaných ako karcinogénne, mutagénne alebo reprotoxické
CPS	Centrum polymérnych systémov v Zlíne
DLS	Dynamic light scattering – metóda merania veľkosti častíc pomocou dynamického rozptylu
DNA	2-deoxyribonukleová kyselina
EÚ	Európska únia
Fe _x O _y	Všeobecné označenie pre oxidy železa
g	gram
G ⁻	Bakteriálny typ bunky, ktorý sa podľa Grammovho farbenia javí ako gramm negatívny
G ⁺	Bakteriálny typ bunky, ktorý sa podľa Grammovho farbenia javí ako gramm pozitívny
HCl	Kyselina chlorovodíková
HLB	Hydrofilne – lipofilná rovnováha
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry – Medzinárodná únia pre čistú a aplikovanú chémiu

K_2CO_3	Uhličitan draselný
l	liter
MBBT	Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenyl – fyzikálny UV filter
Me_xO_y	Všeobecné označenie pre oxidy kovov
ml	mililiter
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NaCl	Chlorid sodný
$NaHCO_3$	Hydrogénuhličitan sodný
$NaNO_2$	Dusitan sodný
NaOH	Hydroxid sodný
NLC	Nanostructured lipid carrier – nanoštrukturované nosiče lipidických častíc
nm	Nanometer
$OH\cdot$	Hydroxylový radikál
OMC	Oktylmetoxycinamát
$OOH\cdot$	Peroxylový radikál
PAL	Povrchovo aktívna látka – surfaktant
PbS	Sulfid olovnatý
PdI	Index polydisperzity
PMMA	Polymethylmetakrylát
RNS	Reactive nitrogen species – reaktívne formy dusíka
ROS	Reactive oxygen species – reaktívne formy kyslíka
SGF	Simulovaná žalúdočná tekutina
SIF	Simulovaná črevná tekutina
SiO_2	Oxid kremičitý
SLN	Solid lipid nanoparticles – pevné lipidické nanočastice
TiO_2	Oxid titaničitý

Ti_xO_y	Všeobecné označenie pre oxidy titánu
UV	Ultra fialové žiarenie
UVA	Ultra fialové žiarenie vo vlnovej dĺžke 400-320 nm
UVB	Ultra fialové žiarenie vo vlnovej dĺžke 320-290 nm
VVBS	Vedecký výbor pre bezpečnosť spotrebiteľa
ZnO	Oxid zinočnatý

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1. Porovnanie metód top down a bottom up. [6]	14
Obr. 2 Znázornenie častíc vo forme agregátov a aglomerátov [25]	24
Obr. 3 Nanočastice v tele a možné cesty vstupu nanočastíc do organizmu [42].....	31
Obr. 5 Použité vzorky PRECH	45
Obr. 6 Použité vzorky SIGMA a SOLTEX	45
Obr. 7 Distribúcia častíc pri meraní opakovateľnosti vzorky PRECH 5	55
Obr. 8 Distribúcia častíc vzorky PRECH 1 vo vode.....	57
Obr. 9 Distribúcia častíc vzorky PRECH 2 vo vode.....	57
Obr. 10 Distribúcia častíc vzorky PRECH 3 vo vode.....	57
Obr. 11 Distribúcia častíc vzorky PRECH 4 vo vode.....	58
Obr. 12 Distribúcia častíc vzorky PRECH 5 vo vode.....	58
Obr. 13 Distribúcia častíc vzorky PRECH 6 vo vode.....	58
Obr. 14 Distribúcia častíc vzorky PRECH 1.0 vo vode.....	59
Obr. 15 Distribúcia častíc vzoriek SIGMA a SOLTEX vo vode.....	60
Obr. 16 Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO ₂ v PBS.....	61
Obr. 17 Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO ₂ v médiu	63
Obr. 18 Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO ₂ v médiu so sérom.....	65
Obr. 19 Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO ₂ v simulovanej žalúdočnej tekutine (pH = 1,2)	66
Obr. 20 Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO ₂ v simulovanej žalúdočnej tekutine s prídavkom pepsínu	68
Obr. 21 Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO ₂ v simulovanej črevnej tekutine.....	69
Obr. 22 Grafické znázornenie časovej závislosti vzoriek TiO ₂ v simulovaných slinách.....	71
Obr. 23 Vyhodnotenie pomocou SEM vzorky 101216/1 – PRECH 1.0	73
Obr. 24 Vyhodnotenie pomocou SEM vzorky 120717/1 – PRECH 1	73
Obr. 25 Vyhodnotenie pomocou SEM vzorky 120717/2 – PRECH 2	74
Obr. 26 Vyhodnotenie pomocou SEM vzorky 120717/3 – PRECH 3	74
Obr. 27 Vyhodnotenie pomocou SEM vzorky 120717/4 – PRECH 4	74
Obr. 28 Vyhodnotenie pomocou SEM vzorky 120717/5 – PRECH 5	74
Obr. 29 Vyhodnotenie pomocou SEM vzorky 120717/6 – PRECH 6	75

Obr. 30 Dosky s nanesenými vzorkami pred ožiarením vložené do prístroja SUNTEST CPS+.....	75
Obr. 31 Priebeh merania účinnosti ako UV filtra vzorky PRECH 5	76
Obr. 32 Priebeh merania účinnosti ako UV filtra vzorky SIGMA	77
Obr. 33 Kontrola životaschopnosti buniek NIH/3T3 bez prítomnosti TiO ₂	78
Obr. 34 Životnosť buniek NIH/3T3 v závislosti na koncentrácii TiO ₂ vzorky SIGMA po ožiarení UV svetlom	78
Obr. 34 Životnosť buniek NIH/3T3 v závislosti na koncentrácii TiO ₂ vzorky PRECH 5 po ožiarení UV svetlom	79

ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1 Porovnanie výsledkov bežných genotoxických testov nanočastíc TiO ₂ a ZnO [32].....	27
Tab. 2 Vybrané príklady nanočastíc využívaných v kozmetike [41]	30
Tab. 3 Prehľad použitých materiálov v praktickej časti a ich charakteristika deklarovaná výrobcom (dodávateľom).....	44
Tab. 4 Stanovenie opakovateľnosti merania z-priemeru veľkosti častíc a PdI vzorky PRECH 5 vo vode.....	54
Tab. 5 Stanovenie veľkosti častíc a indexu polydisperzity PdI vzoriek s označením PRECH vo vode.....	56
Tab. 6 Stanovenie veľkosti častíc vzoriek SIGMA a SOLTEX vo vode	59
Tab. 7 Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v PBS v priebehu 150 minút	61
Tab. 8 Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v médiu v priebehu 150 minút	63
Tab. 9 Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v médiu so sérom v priebehu 150 minút	64
Tab. 10 Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v simulovanej žalúdočnej tekutine v priebehu 150 minút	66
Tab. 11 Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v simulovanej žalúdočnej tekutine s prídavkom pepsínu v priebehu 150 minút.....	67
Tab. 12 Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v simulovanej črevnej tekutine v priebehu 150 minút.....	69
Tab. 13 Stanovenie veľkosti častíc TiO ₂ v simulovaných slinách v priebehu 150 minút.....	70
Tab. 14 Hodnoty zeta potenciálu jednotlivých vzoriek vo vode s neadjustovaným pH.....	72