

# **Příprava poloxamerních částic s obsahem fenolických sloučenin**

Bc. Jana Šmédková

---

Diplomová práce  
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2020/2021

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

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Šmédková**  
Osobní číslo: **T19463**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Studijní obor: **Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Příprava poloxamerních částic s obsahem fenolických sloučenin**

### Zásady pro vypracování

#### I. Teoretická část

1. Klasifikujte a charakterizujte polymerní amfifilní látky.
2. Věnujte se významu polymerních částic jako nosičů aktivních látek a možnostem jejich stabilizace.
3. Zaměřte se na potenciální fenolické sloučeniny vhodné pro inkorporaci.

#### II. Praktická část

1. Připravte systémy na bázi poloxameru, případně v kombinaci s dalším polymerem, a různými fenolickými sloučeninami.
2. Výsledné systémy charakterizujte a zhodnoťte jejich stabilitu.
3. Závěry vhodně zpracujte a diskutujte.

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] KRONBERG, B. Surface Chemistry of Surfactants and Polymers, John Wiley & Sons, Inc., 2016, ISBN 978-1-119-96124-6.
- [2] DUMITRU, S. Polymeric Biomaterials. Marcel Dekker, Inc. 2002, ISBN 0.8247-0569-6.
- [3] de SIQUEIRA, L. B. Clove oil nanoemulsion showed potent inhibitory effect against *Candida* spp. Nanotechnology 30, 2019, doi: 10.1088/1361-6528/ab30c1.
- [4] BODRATTI, A. M. et al. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. Journal of Functional Biomaterials. 2018, 9, p. 1724, doi: 10.3390/jfb9010011.

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

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

---

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

---

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

Ve Zlíně dne 20. února 2021

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

**Prohlašuji,**

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Teoretická část diplomové práce se věnuje problematice systémů vhodných pro enkapsulaci aktivních látek, jako jsou lipozomy, niozomy, transferzomy, emulze a micely. Důraz je dále kladen na charakteristiku polymerních povrchově aktivních látek a jejich micelární parametry, s ohledem na poloxamery použité v experimentální části.

Praktická část předložené práce se zabývá přípravou a studiem poloxamerních nosičů na bázi vybraných polymerních tenzidů P188, P184 a P407 s obsahem aktivních látek thymolu, eugenolu a kurkuminu. Pozornost je soustředěna na hodnocení fyzikálně-chemických vlastností, stability připravených systémů a v neposlední řadě na studium kinetiky uvolňování zmíněných fenolických aktivních látek v závislosti na použitém typu nosiče, resp. jejich kombinací.

Klíčová slova: aktivní látky, enkapsulace, fenolické sloučeniny, kinetika uvolňování, poloxamer, polymerní micely, povrchově aktivní látky

## **ABSTRACT**

The theoretical part of the diploma thesis is devoted to the issue of systems suitable for encapsulation of active ingredients, such as liposomes, niosomes, transferzomes, emulsions and micelles. Emphasis is also placed on the characteristics of polymeric surfactants and their micellar parameters, with respect to the poloxamers used in the experimental part.

The practical part of the presented work deals with the preparation and study of poloxameric carriers based on selected polymeric surfactants P188, P184 and P407 containing the active ingredients thymol, eugenol and curcumin. Attention is focused on the evaluation of physicochemical properties, stability of prepared systems and last but not least on the study of the release kinetics of the mentioned phenolic active substances, depending on the type of carrier used, or their combinations.

Keywords: active ingredients, encapsulation, phenolic compounds, release kinetics, poloxamer, polymer micelles, surfactants

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce Ing. Janě Sedlařikové, Ph.D. za její neskutečnou ochotu a odbornou pomoc, za řadu cenných rad a vstřícný přístup, jež mi věnovala při vedení mé diplomové práce. Dále bych také ráda poděkovala Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. za pomoc při realizaci mikrobiologického testu. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině, příteli a kamarádům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

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

## OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>1 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK .....</b>	<b>11</b>
1.1 LIPOZOMY .....	11
1.1.1 Metoda hydratace suchého fosfolipidového filmu .....	12
1.1.2 Extruze .....	13
1.1.3 Sonikace .....	13
1.1.4 Metoda French press .....	13
1.1.5 Injekční metoda .....	13
1.2 NIOZOMY .....	13
1.3 TRANSFERZOMY .....	14
1.3.1 Technika hydratace tenkého filmu/rotační metoda odpařování-sonikace .....	15
1.3.2 Metoda vortexování-sonikace .....	15
1.4 EMULZE.....	16
1.4.1 Mikroemulze .....	16
1.4.2 Nanoemulze.....	17
1.4.3 Pevné lipidové nanočástice .....	18
1.4.4 Nanostrukturované lipidové nosiče.....	18
1.5 MICELY .....	19
1.6 CHARAKTERIZACE NOSNÝCH SYSTÉMŮ .....	23
1.6.1 Velikost částic .....	23
1.6.2 Zeta potenciál .....	24
<b>2 POLYMERNÍ POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY .....</b>	<b>25</b>
2.1 TYPY POLYMERNÍCH POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK.....	25
2.1.3 Polymery se střídajícími se hydrofilními a hydrofobními bloky .....	26
2.2 MICELY BLOKOVÝCH KOPOLYMERŮ.....	26
2.3 PŘÍPRAVA POLYMERNÍCH MICEL/ČÁSTIC .....	28
2.3.1 Přímá solubilizace aktivních látek .....	28
2.3.2 Hydratace tenkého filmu .....	29
2.3.3 Teplotou indukovaná emulzifikace .....	29
2.3.4 Náhrada rozpouštědla.....	29
2.3.5 Kineticky zmrazené micely.....	30
2.4 POLOXAMERY TYPU PLURONICS® .....	30
2.5 POLOXAMER 188.....	30
2.6 POLOXAMER 184.....	31
2.7 POLOXAMER 407.....	32
<b>3 FENOLICKÉ SLOUČENINY PRO INKORPORACI.....</b>	<b>33</b>

3.1	FLAVONOIDNÍ LÁTKY .....	33
3.1.1	Kurkumin .....	33
3.1.2	Kvercetin .....	33
3.1.3	Katechin .....	34
3.2	NEFLAVONOIDNÍ LÁTKY .....	35
3.2.1	Resveratrol .....	35
3.2.2	Kyselina gallová.....	35
3.2.3	Kyselina elagová .....	35
3.2.4	Kyselina skořicová .....	35
3.3	FENOLY V ESENCIÁLNÍCH OLEJÍCH .....	36
3.3.1	Thymol .....	36
3.3.2	Eugenol .....	37
<b>4</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>38</b>
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE.....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>POSTUPY PŘÍPRAVY VZORKŮ A MĚŘENÍ.....</b>	<b>44</b>
7.1	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ POLOXAMERŮ .....	44
7.2	STANOVENÍ KRITICKÉ MICELÁRNÍ KONCENTRACE .....	44
7.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ POLOXAMERŮ S AKTIVNÍ LÁTKOU .....	45
7.4	TEST UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍ LÁTKY .....	46
7.5	MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC.....	46
7.7	ANTIBAKTERIÁLNÍ VLASTNOSTI .....	47
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>48</b>
8.1	STANOVENÍ MICELÁRNÍCH PARAMETRŮ POLOXAMERŮ .....	48
8.2	STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC .....	51
8.3	VIZUÁLNÍ HODNOCENÍ.....	57
8.4	STANOVENÍ ZETA POTENCIÁLU.....	60
8.5	STANOVENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINNOSTI.....	61
8.6	TEST UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍ LÁTKY .....	63
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>72</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>84</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>86</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>88</b>



## ÚVOD

Enkapsulace aktivních látek je v posledních letech rozsáhle studována, zejména z důvodu zvýšení stability a prevence proti nežádoucím vnějším vlivům a degradačním mechanismům. Jako aktivní látky lze pro inkorporaci do vhodné matrice využít různá léčiva, vitamíny a esenciální oleje. V kosmetickém průmyslu se pro solubilizaci nejčastěji využívají humektanty, emolienty, antioxidanty, konzervační látky a parfemační činidla. Jako nosiče mohou sloužit například lipozomy, niozomy, pevné lipidové nanočástice, nanostrukturované lipidové nosiče nebo právě micely tvořené molekulami amfifilních povrchově aktivních látek.

V tomto ohledu jsou jako potenciální nosiče aktivních molekul intenzivně studovány micelární agregáty tvořené polymerními povrchově aktivními látkami. Díky jejich struktuře vykazují řadu významných vlastností, jako jsou nízké kritické micelární koncentrace a vysoká solubilizační kapacita. Z těchto důvodů mají zmíněné systémy širokou škálu využití v různých odvětvích, jako je například kosmetický, potravinářský a farmaceutický průmysl.

V předložené diplomové práci byly využity kombinace neionických poloxamerů s různými molekulovými hmotnostmi i hydrofilitou, P188, P184 a P407, u nichž byly sledovány jejich micelární charakteristiky. Následně byly připraveny a charakterizovány systémy jednotlivých poloxamerů a jejich směsí s obsahem aktivních látek thymolu, eugenolu a kurkuminu.

Cílem práce bylo sledovat vliv složení nosičů a typů aktivních látek na fyzikálně-chemické vlastnosti roztoků, stabilitu, a zejména pak na kinetiku uvolňování fenolických aktivních látek pomocí dialyzační metody.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK

Nosiče aktivních látek slouží k ukotvení a následné přepravě účinné látky za řízených podmínek na požadované místo dodání. Existuje mnoho typů nosičů, které jsou rozděleny na vezikulární systémy (lipozomy, niozomy a transferzomy), emulze (mikroemulze a nanoemulze) a dále systémy obsahující mikročástice a nanočástice. Nosné systémy slouží jako ochrana aktivní látky vůči vnějším podmínkám (světlo, teplo, kyslík a degradace), čímž se zvyšuje její stabilita. Dochází ke zlepšení tokových vlastností produktu, což usnadňuje manipulaci a skladování [1].

### 1.1 Lipozomy

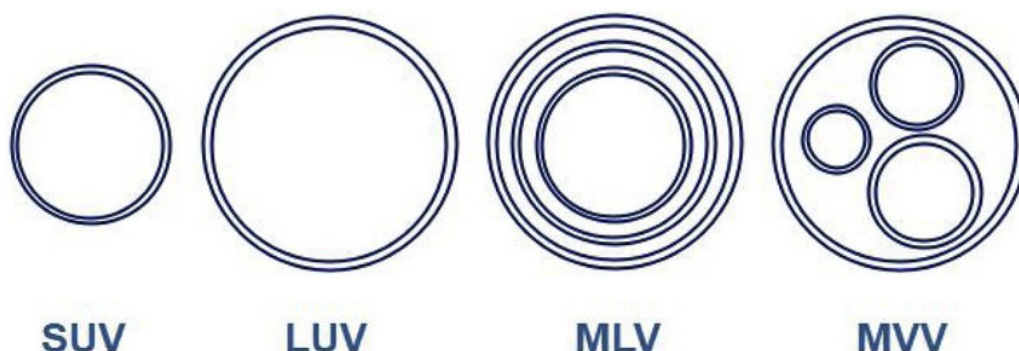
Lipozomy jsou známy od poloviny 60. let minulého století, v dnešní době jsou aplikovány v celé řadě odvětví, jako je například potravinářský, kosmetický a farmaceutický průmysl. Lipozomy jsou koloidní duté sférické vezikuly určené k cílenému dodání aktivních látek. Sestávají se z jedné nebo více lipidových dvojvrstev, oddělenými vodou nebo vodným pufrům. Hlavní strukturální složkou lipozomů jsou fosfolipidy, jejichž nejznámějším zástupcem je lecitin [1].

Lipozomy jsou výhodné pro zapouzdření a podávání různých bioaktivních sloučenin kvůli jejich biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti a nízké toxicitě. Navzdory jejich hydrofilnímu jádru pojmou hydrofobní, hydrofilní nebo amfifilní molekuly. Hydrofobní molekuly jsou zachyceny mezi lipidovou dvojvrstvou, zatímco hydrofilní složky mohou být zapouzdřeny v jádru. Amfifilní molekuly zůstávají na rozhraní lipid/voda podle jejich afinity ke složkám lipozomu [1], [2], [3].

Vlastnosti lipozomů jsou většinou závislé na složení lipidů, povrchovém náboji, velikosti a způsobu přípravy. Podle velikosti a typu struktury lze lipozomy dělit na (Obr. 1):

- Malé unilamelární vezikuly (SUV): 20 až 100 nm, tyto vezikuly jsou nejmenší možné lipozomy, po fyzikálně-chemické stránce jsou relativně nestabilní z důvodu vysokého stupně deformace fosfolipidové membrány.
- Velké unilamelární vezikuly (LUV): > 100 nm, vzhledem k většímu průměru mají tyto vezikuly nízké membránové napětí a větší stabilitu. Slouží jako modely přirozených biologických membrán.
- Multilamelární vezikuly (MVL): > 500 nm, obsahují více lamel, což zpřičňuje zpomalené uvolňování enkapsulované aktivní látky.

- Multivezikulární vezikuly (MW):  $> 1000$  nm, v nichž může být enkapsulováno více menších vezikul [1], [2].



Obrázek 1: Typy vezikul v závislosti na velikosti a lamelaritě [4]

Pro efektivní zapouzdření léčiva hraje důležitou roli velikost, složení a supramolekulární organizace lipozomu. V případě aplikací pro dodávání léčiv se požadovaná velikost lipozomu pohybuje mezi 50 a 200 nm.

Tvorba lipozomů probíhá spontánně při disperzi lipidových molekul ve vodné fázi za vzniku vezikul. Lipozomy lze připravit pomocí široké škály metod, které ovlivňují lipozomové charakteristiky, jako je velikost, lamelarita a účinnost zapouzdření. Lze využít například metody mechanické dispergace, které zahrnují hydrataci lipidového filmu, mikroemulgaci, sonikaci, metodu French press, vytlačování membrány, sušené rekonstituované vezikuly a metodu zmrazení a rozmrazení. Dále se využívají metody dispergace v rozpouštědle, které zahrnují metodu vstřikování ethanolu, metodu infúze etheru, dvojistou emulgaci a odpařování v reverzní fázi [4].

### 1.1.1 Metoda hydratace suchého fosfolipidového filmu

Obecný způsob přípravy touto metodou spočívá v rozpuštění lipidu v organickém rozpouštědle. Rozpouštědlo se následně odpaří na rotační odparce a zanechá na stěně nádoby tenký film. Dále je přidán vodný roztok léčiva. V prvním postupu je směs míchána za vzniku multilamelárních vezikul a poté sonikována, přičemž vznikají SUV. Ve druhém postupu se směs podrobí působení ultrazvuku a dochází k odpaření rozpouštědla, čímž vznikají LUV. Po vytlačení se vytvoří SUV. Léčiva látka může být zabudována do vodného roztoku nebo pufu, pokud je ve vodě rozpustná. Pokud je aktivní látka hydrofobní, může být inkorporována v organickém rozpouštědle [5].

### 1.1.2 Extruze

U této metody je zmenšována velikost vezikul průchodem přes polykarbonátové membrány o definované velikosti pórů, obvykle v rozmezí 100 až 1000 nm. Tuto metodu lze použít ke zpracování LUV i MLV [5].

### 1.1.3 Sonikace

Při sonikační metodě dochází ke zmenšování velikosti vezikul působením ultrazvukového záření. Pro tento postup lze využít buď sonikační lázeň nebo sondu. Sonikační sonda se používá pro suspenze, které vyžadují vysokou energii v malém objemu. Nevýhodou sondy je potenciální kontaminace vzorku kovem ze špičky sondy. Touto metodou se vytvářejí malé unilamelární vezikuly, které se čistí ultracentrifugací. Sonikační lázeň je využívána pro velké objemy vzorků zředěných lipidů. Výhodou této metody je snadná regulace teploty pomocí kapaliny v lázni [5].

### 1.1.4 Metoda French press

Jedná se o extruzi MLV za působení vysokého tlaku, přičemž následně vzniká směs unilamelárních nebo oligolamelárních lipozomů o průměru 30 až 80 nm v závislosti na použitém tlaku [5].

### 1.1.5 Injekční metoda

Při této metodě je ethanolický roztok lipidů přímo injektován jemnou jehlou do přebytku pufu nebo jiného vodného media. Ethanol se zředí vodou a molekuly fosfolipidů se rovnoměrně dispergují v mediu. Tento postup poskytuje vysoký podíl SUV (průměr asi 25 nm) v jednom kroku [5].

## 1.2 Niozomy

Niozomy jsou z hlediska struktury a fyzikálních vlastností podobné lipozomům. Mohou být také připraveny podobnými postupy ve formě unilamelárních nebo multilamelárních vezikul. Ovšem v porovnání s lipozomy niozomální formulace vykazují určité výhody, jako například vyšší strukturní variabilitu a nižší náklady. Mezi další významné vlastnosti niozomů patří dobrá biodostupnost, biologická rozložitelnost, stabilita vůči různému pH a možnosti řízeného uvolňování enkapsulovaných aktivních látek. Niozomy jsou mikroskopické vezikuly, které se skládají z hydrofilního jádra a membrány na bázi neionických povrchově aktivních látek, která tvoří uzavřené dvouvrstvé struktury.

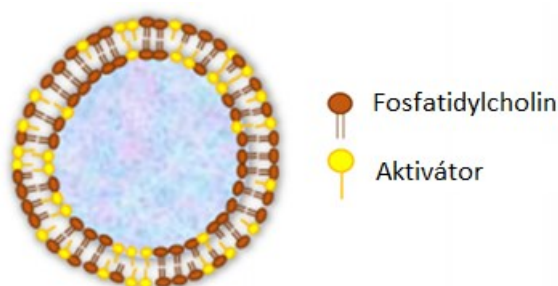
V některých případech obsahují i cholesterol nebo jeho deriváty, jež ovlivňují některé vlastnosti vezikul, jako je účinnost zapouzdření, doba skladování, podmínky uvolňování a stabilita. Cholesterol se používá jako aditivum interagující s hydrofilní částí neionické látky [6], [7].

Organizace amfifilních molekul do uzavřených dvojvrstev niozomů není spontánní, podobně jako v případě lipozomů, ale je nutno dodat určitý podíl energie, jako je například mechanické třepání, ultrazvuk, teplo apod. Termodynamicky stabilní vezikuly vznikají pouze za přítomnosti vhodných směsí povrchově aktivních látek a nabitých sloučenin [7].

Příprava niozomů probíhá různými metodami, včetně odpařování reverzní fáze, hydratace tenkého filmu, metody vstřikování etheru atd. Tyto popsání metody přípravy vyžadují odstranění organického rozpouštědla a jsou také nákladné a časově náročné. V tomto ohledu je výhodnější metoda sonikace, která je jednoduchá a ekologická. Výhodou sonikace je, že poskytuje niozomy s úzkou distribucí velikosti částic. Délka lipidového řetězce, vodná mezivrstva, povrchově aktivní látky a stabilita membrány jsou hlavními faktory, které ovlivňují vlastní sestavení a funkci niozomů. Díky strukturální variabilitě povrchově aktivních látek jsou niozomy schopny inkorporovat hydrofobní i hydrofilní léčiva změnou povrchově aktivní látky [6].

### 1.3 Transferzomy

Základní strukturální jednotkou transferzomů jsou, podobně jako v případě lipozomů, fosfolipidy (například fosfatidylcholin), které se ve vodném prostředí samy shromažďují do vezikul na bázi lipidových dvojvrstev. Další významnou složkou transferzomů je aktivátor (Obr. 2). Jedná se často o povrchově aktivní látku s jedním řetězcem, jako je například cholát sodný, deoxycholát sodný, nebo látky ze skupiny Spanů a Tweenů. Povrchově aktivní látka s jedním řetězcem, vysokým poloměrem zakřivení a pohyblivostí je schopna destabilizovat lipidové dvojvrstvy vezikul a zvýšit pružnost a flexibilitu lipidové dvojvrstvy. Transferzomy jsou účinné při transdermálním podávání nízkomolekulárních i vysokomolekulárních léčiv na bázi hydrofobních a hydrofilních skupin s širokým spektrem rozpustnosti. Tato vysoká deformovatelnost poskytuje lepší penetraci neporušených vezikul [8], [9].



Obrázek 2: Schéma struktury transferzomu [9]

Pro přípravu transferzomů se nejčastěji využívá metoda hydratace tenkého filmu, známá také jako metoda rotačního odpařování-sonikace. Dalšími způsoby přípravy jsou vortexování-sonikace, homogenizace suspenze, proces centrifugace, metoda odpařování reverzní fáze, vysokotlaká homogenizace a metoda vstřikování ethanolu [9].

### 1.3.1 Technika hydratace tenkého filmu/rotační metoda odpařování-sonikace

Během této metody se nejprve fosfolipidy a aktivátor rozpustí za použití těkavé směsi organických rozpouštědel (chloroform a methanol ve vhodném poměru). V tomto kroku může být zabudováno lipofilní léčivo. Za účelem vytvoření tenkého filmu se za sníženého tlaku za použití rotační vakuové odparky odpaří organické rozpouštědlo. Vytvořený tenký film se poté hydratuje za použití roztoku obsahujícího účinnou látku a za průběžného míchání po příslušnou dobu při laboratorní teplotě. Výsledné vezikuly nabobtnají a jsou sonikovány v lázni nebo pomocí sondy, čímž se vytvoří malé vezikuly. Sonikované vezikuly se následně homogenizují extruzí přes polykarbonátové membrány (200 nm až 100 nm) [9].

### 1.3.2 Metoda vortexování-sonikace

Při této metodě jsou fosfolipidy, aktivátor a léčivo míchány ve fosfátovém pufru. Směs se poté vortexuje, dokud se nezíská mléčná suspenze. Následuje sonikace v lázni, která probíhá příslušnou dobu při laboratorní teplotě a poté se směs extruduje přes polykarbonátové membrány (450 a 220 nm) [9].

V následující Tabulce 1 jsou shrnuty vybrané typy nosičů a jejich výhody, případně nevýhody.

Tabulka 1: Srovnání nosných systémů [8]

Metoda	Výhody	Nevýhody
Lipozomy	Fosfolipidové vezikuly, jsou biokompatibilní a biologicky odbouratelné. Vhodné pro řízené uvolňování.	Slabší penetrační schopnost a nižší stabilita.
Niozomy	Neionické vezikuly povrchově aktivních látek. Zlepšují perorální biologickou dostupnost špatně vstřebatelných léčiv a zlepšují transdermální penetraci léčiv.	Slabší penetrační schopnost do hlubších vrstev kůže.
Transferzomy a protransferzomy	Stabilnější, s vysokou penetrací díky vysoké deformovatelnosti, biokompatibilní a biologicky odbouratelné, vhodné pro enkapsulaci nízko i vysokomolekulárních látek, jak pro lipofilní, tak hydrofilní léčiva, penetrují do hlubších vrstev kůže.	Jsou chemicky nestabilní kvůli své predispozici k oxidační degradaci.

## 1.4 Emulze

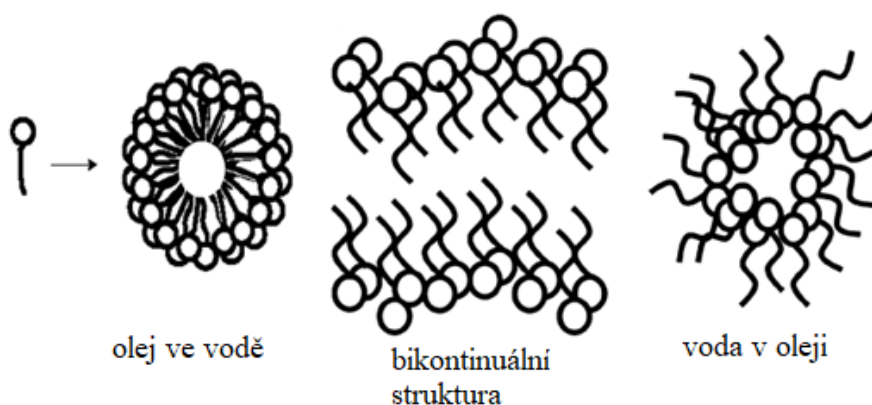
Emulze jsou disperzní heterogenní systémy, složené ze dvou vzájemně nemísitelných nebo omezeně mísitelných kapalin. Lze je klasifikovat podle různých hledisek, například podle polaridy disperzního prostředí na emulze prvního typu, olej ve vodě (o/v), kdy kapky oleje jsou dispergovány ve vodě, a na emulze druhého typu, voda v oleji (v/o), kdy kapky vody jsou dispergovány v oleji. Dále rozlišujeme emulze podle koncentrace disperzního podílu na emulze zředěné, koncentrované a vysoce koncentrované, a dle rozměru částic dispergované fáze, a to na makroemulze, mikroemulze a nanoemulze [10], [11].

### 1.4.1 Mikroemulze

Mikroemulze jsou mikroheterogenní systémy, spontánně vytvořené směsi vody, oleje, povrchově aktivní látky (emulgátoru) a kosurfaktantu, jehož hlavním úkolem je zvýšit



mezifázovou tekutost a upravit hydrofilně-lipofilní rovnováhu (HLB) povrchově aktivní látky na optimální hodnotu. Mikroemulze se mohou objevit ve třech hlavních formách, a to jako voda v oleji (v/o), olej ve vodě (o/v) a bikontinuální struktura (Obr. 3). Mikroemulze jsou transparentní, termodynamicky stabilní systémy, které mají nízkou viskozitu. Velikost částic je 10 až 100 nm. Mezi faktory, které ovlivňují stabilitu mikroemulzí, řadíme mezifázové napětí, charakter fázového rozhraní, entropii a tekutost. Mikroemulze mají velmi vysoké povrchové plochy, tudíž mohou do svého jádra nebo na rozhraní začlenit velká množství molekul, které jsou obvykle v kontinuální fázi nerozpustné. Využívají se pro výrobu nanočástic, k těžbě ropy, v potravinářství a farmaceutickém průmyslu [12], [13], [14].



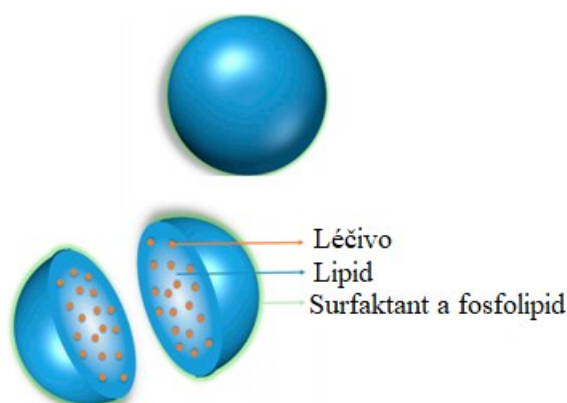
Obrázek 3: Schéma mikroemulze [12]

#### 1.4.2 Nanoemulze

Nanoemulze se skládají z velmi jemných disperzí typu olej ve vodě, které mají velikost částic většinou v rozsahu 50 až 200 nm. Základními stavebními jednotkami nanoemulzí jsou olej, voda a emulgátor. Nanoemulze jsou na rozdíl od mikroemulzí termodynamicky nestabilní, transparentní soustavy, které mohou za daných podmínek vykazovat kinetickou stabilitu. Mezi výhody nanoemulzí patří vysoká schopnost solubilizace hydrofobních sloučenin, vynikající stabilita, možnost řízeného uvolňování a podpora aktivity enkapsulované léčivé formy. Výsledná struktura nanoemulzí závisí na procesu použitém k jejich výrobě. Příprava nanoemulzí může probíhat za použití vysokotlakého homogenizéru, přičemž tento postup je vysoce energeticky náročný. Další možností je využití nízkoenergetických metod, které využívají fázového přechodu během emulzifikace, mezi něž patří metoda EIP (inverzní bod emulze) a metoda PIT (teplota fázové inverze) [14], [15], [16].

### 1.4.3 Pevné lipidové nanočástice

Pevné lipidové nanočástice (SLN) jsou nanonosiče, které byly vyvinuty jako alternativní systémy pro dodávání koloidních léčiv paralelně s lipozomy, lipidovými emulzemi a polymerními nanočásticemi. Poprvé se objevily v roce 1991 s cílem zajistit biokompatibilitu, stabilitu při skladování a zabránit degradaci zabudovaného léčiva. SLN jsou koloidní nosiče o velikosti 50 až 1000 nm, složené z lipidů dispergovaných ve vodě nebo ve vodném roztoku povrchově aktivní látky (Obr. 4). Obsahují pevné hydrofobní jádro stabilizované vrstvou stabilizátoru (emulgátor). Pevné lipidové jádro obsahuje aktivní látku rozpuštěnou nebo dispergovanou v tuhé tukové matrici s vysokým bodem tání. SLN mají potenciál inkorporovat a dodávat lipofilní i hydrofilní aktivní látky. Pro přípravu SLN se využívá řada metod, jako například vysokotlaká homogenizace (za tepla, za studena), sonikace/homogenizace (sondou, v lázni) nebo mikroemulzifikace. Příprava SLN je relativně snadná a nenákladná. Nevýhody použití pevných lipidových nanočástic spočívají v tom, že SLN jsou na bázi kompaktní lipidové matrice (ideální krystalická struktura) s menší kapacitou pro zapouzdření léčiva. Při přípravě SLN s obsahem aktivních látek je třeba vzít v potaz faktory jako vzájemné interakce léčiva a lipidovou maticí, vlastnosti lipidové matrice i aktivní látky, která má být dispergována nebo rozpuštěna v lipidové matrici. Další nevýhodou je vysoký obsah vody a možnost vypuzení léčiva během skladování [17], [18].

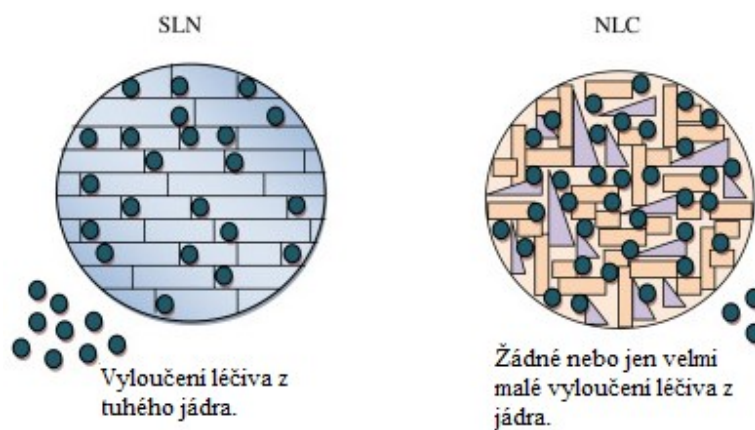


Obrázek 4: *Struktura pevné lipidové nanočástice s inkorporovaným léčivem* [18]

### 1.4.4 Nanostrukturované lipidové nosiče

Nanostrukturované lipidové nosiče (NLC) byly vyvinuty za účelem řešení nevýhod SLN uvedených výše, jako jsou nízké koncentrace inkorporovaného léčiva a jeho vypuzování.

NLC jsou totiž připravovány ze směsi pevných a kapalných lipidů, které mají neideální krystalickou strukturu, zabraňují krystalizaci lipidů a tím i vypuzování léčivé látky. Nanostrukturované lipidové nosiče se skládají z různých prostorově odlišných lipidů (např. acylglycerolů) a poskytují tak větší vzdálenost mezi řetězci mastných kyselin acylglycerolů a obecnými nestrukturovanými krystaly. NLC mohou být klasifikovány do tří typů, a to na nedokonalý typ, mnohonásobný a amorfní typ. Nedokonalé typy NLC se připravují smícháním pevných lipidů s malým množstvím olejů (kapalné lipidy) a umožňují inkorporovat vysoké množství léčiva. V mnohonásobném typu NLC je vyšší zastoupení olejových lipidů, a proto je zajištěna vyšší rozpustnost léčiva ve srovnání s pevnými lipidy. Amorfní NLC obsahují další specifické lipidy (např. isopropylmyristát, hydroxyl oktacosanyl, hydroxystearát atd.), aby se zabránilo krystalizaci pevného lipidu při chlazení. Díky využití NLC amorfního typu lze tedy zabránit vyloučení léčiva způsobené krystalizací pevných lipidů. Mezi výhody NLC lze řadit možnost připravit disperze NLC s vyšším obsahem pevných látek, dále pak vysokou kapacitu pro inkorporaci léčivé látky ve srovnání s SLN, snadnou kontrolu kinetiky uvolňování léčiva, a nižší únik léčiva během skladování v porovnání s SLN [17], [18]. Rozdíl mezi uspořádáním SLN a NLC nosiče je znázorněn na Obrázku 5.

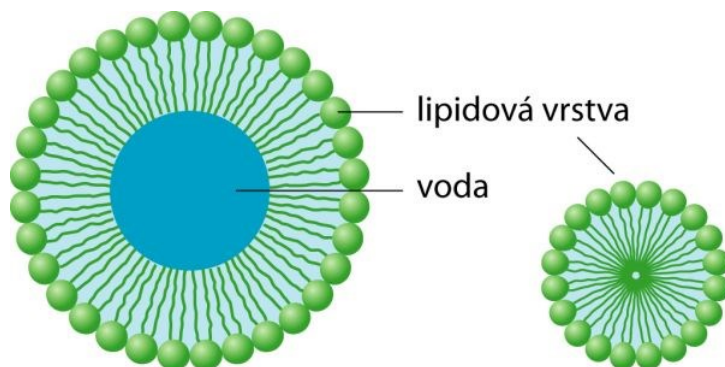


Obrázek 5: Rozdíl mezi uspořádáním SLN a NLC nosiče [19]

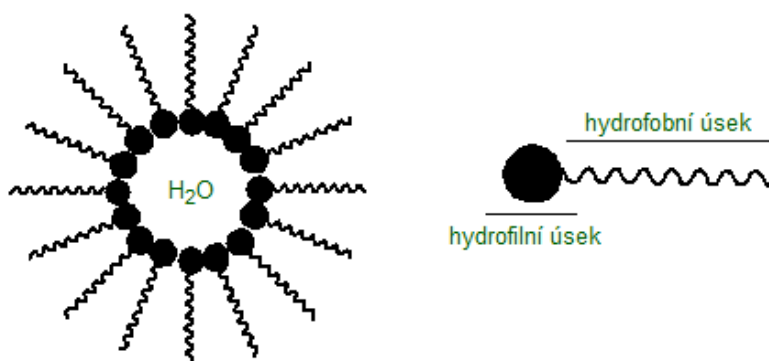
## 1.5 Micely

Micely jsou agregáty amfifilních molekul, tedy látek, jejichž molekula je tvořená ze dvou částí, a to z hydrofilní polární hlavičky a z hydrofobního nepolárního řetězce (Obr. 6). Micely rozlišujeme dle uspořádání na klasické a inverzní neboli obrácené (Obr. 7). Klasické micely se vytvářejí v polárním prostředí, kdy uhlovodíkové nepolární zbytky směřují do

vnitřního prostoru a tvoří tedy jádro, zatímco vnější obal micely tvoří hydrofilní část. Naopak inverzní micely vznikají v prostředí nepolárním, kdy hydrofilní část molekuly tvoří jádro a hydrofobní část vnější obal [10], [20], [21], [22].



Obrázek 6: Schéma klasické micely [23]

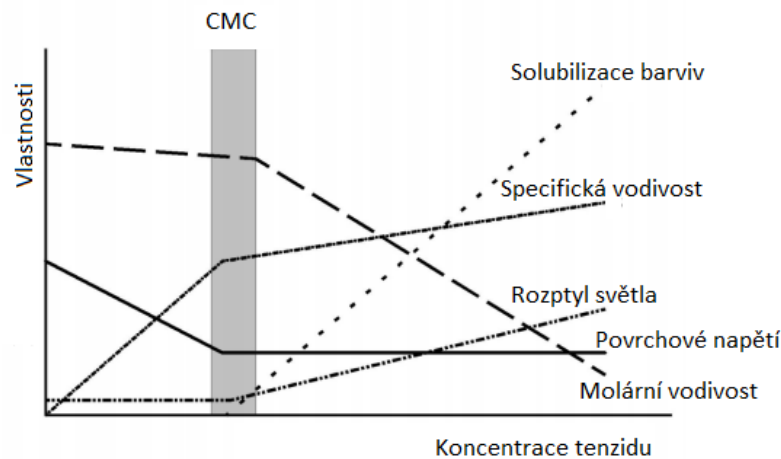


Obrázek 7: Schéma inverzní micely [24]

Micely vznikají po dosažení tzv. kritické micelární koncentrace (z ang. critical micelle concentration, CMC). Hodnota CMC je charakteristickým rysem každé sloučeniny tvořící micely. Faktory ovlivňující CMC jsou hydrofilní a hydrofobní délka bloku kopolymeru, parametr větvení, teplota, koncentrace soli, pH atd. Hodnoty CMC se u většiny povrchově aktivních látek pohybují v rozmezí  $10^{-5}$  až  $10^{-3}$  mol/l [21], [25].

Ke stanovení kritické micelární koncentrace lze využít měření povrchového napětí v závislosti na koncentraci tenzidu, například pomocí tenziometrie, dále pomocí fluorescenční sondy, dále lze aplikovat měření vodivosti, solubilizace, diferenciální skenovací kalorimetrii, chromatografii, nebo nukleární magnetickou rezonanci. Některé z těchto technik, resp. změny v příslušném trendu závislosti v oblasti CMC, jsou znázorněny

na Obr. 8. Průměrný počet monomerů tvořících micelu v daném okamžiku se označuje jako agregační číslo [21].



Obrázek 8: Metody pro stanovení CMC [10]

Hodnota agregačního čísla roste s délkou uhlovodíkového řetězce, a naopak klesá s velikostí polární skupiny. Dalším parametrem pro charakterizaci micel je tzv. kritický agregační parametr (z ang. critical packing parameter, CPP), který lze vypočítat z následující rovnice (1).

$$CPP = \frac{V}{a_o \cdot l_c} \quad (1)$$

Kde  $V$  je objem hydrofobní části,  $a_o$  plocha hydrofilní části a  $l_c$  délka uhlíkatého řetězce. V závislosti na CPP mohou micely zaujímat různé tvary, a to například sférické, válcovité, lamelární nebo inverzní [10], [20].

Micely jsou termodynamicky stabilní, dynamické struktury, které jsou v kontinuální rovnováze s volnými monomery, přičemž monomery jsou neustále vyměňovány mezi micelami a intermicelulárním roztokem. Hlavní hnací silou asociace je snížení volné energie systému. Snížení energie systému je důsledkem odstranění hydrofobních fragmentů z vodného prostředí za vzniku micelárního jádra stabilizovaného hydrofilními bloky vystavenými působení vody. Změnu volné energie procesu micelizace lze vypočítat podle rovnice (2),

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

kde  $R$  je univerzální plynová konstanta,  $T$  je teplota systému a  $CMC$  je kritická micelární koncentrace [21].

Vlastnosti povrchově aktivních látek v roztoku jsou řízeny jejich tendencí minimalizovat kontakt svých hydrofobních skupin s vodou. Tohoto jevu je dosaženo adsorpcí na rozhraní a tvorbou agregátu v roztoku. Termodynamický základ pro adsorpci na rozhraní vyjadřuje Gibbsova adsorpční rovnice (3), která je zásadní pro všechny adsorpční procesy, kde se tvoří monovrstvy. Poskytuje kvantitativní vztah mezi aktivitou molekul na povrchu nebo rozhraní a molekulami v hromadném roztoku.

$$dy = - \sum \Gamma_i d\mu_i \quad (3)$$

Kde  $dy$  je změna povrchového napětí rozpouštědla,  $\Gamma$  je přebytek látky  $i$  na rozhraní a  $d\mu_i$  je změna chemického potenciálu. Podle této rovnice může být povrchový nadbytek buď pozitivní nebo negativní. Pokud rozpuštěná látka absorbuje kladně, dochází ke snížení povrchového napětí rozpouštědla a naopak složka, která absorbuje záporně vede ke zvýšení povrchového napětí [26].

Pomocí rovnice (4) lze vyjádřit změny chemického potenciálu rozpuštěné látky na koncentraci,

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \cdot \ln c_i \quad (4)$$

jelikož platí (5),

$$d\mu_i = RT \cdot d(\ln c) \cdot RT \cdot \frac{dc}{c} \quad (5)$$

můžeme odvodit rovnici Gibbsovy adsorpční izotermy (6) [27].

$$\Gamma = - \frac{c}{RT} \cdot \frac{d\gamma}{dc} \quad (6)$$

Pro roztoky skládající se z rozpouštědla a pouze jedné rozpuštěné látky, lze Gibbsovu rovnici psát ve tvaru (7),

$$d\gamma = -RT (\Gamma_0 d \ln a_0 + \Gamma_1 d \ln a_1) \quad (7)$$

kde indexy 0 a 1 odkazují na rozpouštědlo a rozpuštěnou látku.

Za předpokladu, že  $\Gamma_0 = 0$ , lze psát Gibbsovu rovnici ve tvaru (8).

$$d\gamma = -RT \Gamma_1 d \ln c_1 \quad (8)$$

Adsorpce je popisována pomocí adsorpční izotermy. Koncentraci adsorbátu na rozhraní  $\Gamma_1$  lze vyjádřit pomocí rovnice (9), pokud je známá plocha povrchu adsorbentu připadající na jednotku hmotnosti pevného adsorbentu  $a_s$ .

$$\Gamma_1 = \frac{\Delta c_1 \cdot V}{a_s \cdot m} \quad (9)$$

Kde  $\Delta c_1$  je změna molární koncentrace tenzidu před a po adsorpci a  $V$  je objem kapalné fáze. Poté můžeme vypočítat z rovnice (10) povrchovou plochu adsorbentu připadající na jednu molekulu tenzidu  $a_1^s$ , která je vyjádřena jako 1 Å.

$$a_1^s = \frac{10^{16}}{N\Gamma_1} \quad (10)$$

Kde  $N$  je Avogadrova konstanta [28].

Využívání micel jako nosiče aktivních látek je shrnuto v kapitole 4. Aktivní látky mohou být v micelách umístěny například na povrchu micely, mezi hydrofilními částmi molekul tenzidu v micelle nebo v jádře micely [20].

## 1.6 Charakterizace nosných systémů

Nosné systémy uvedené v předchozích kapitolách lze charakterizovat pomocí různých metod, jako je například měření velikosti částic a zeta potenciálu, které byly také využity v experimentální části této práce.

### 1.6.1 Velikost částic

Velikost částic lze měřit přístrojem zvaným Zetasizer pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS – Dynamic Light Scattering). Tato metoda je neinvazivní, založena na měření velikosti a velikosti distribuce molekul a částic v submikronové oblasti nižší než 1 nm. Metoda dynamického rozptylu světla je využívána k charakterizaci částic, emulzí nebo molekul, které byly rozptýleny nebo rozpuštěny v kapalině. Brownův pohyb částic nebo molekul v suspenzi způsobuje, že laserové světlo je rozptýleno v různých intenzitách. Analýza těchto kolísání intenzity dává rychlost Brownova pohybu a tím i velikost částic, která se vypočítá pomocí Stokesovy-Einsteinovy rovnice (11). DLS metoda se používá k měření velikosti částic dispergačních koloidních vzorků, ke studiu stability přípravků a ke zjištění přítomnosti agregace nebo aglomerace [29], [30].

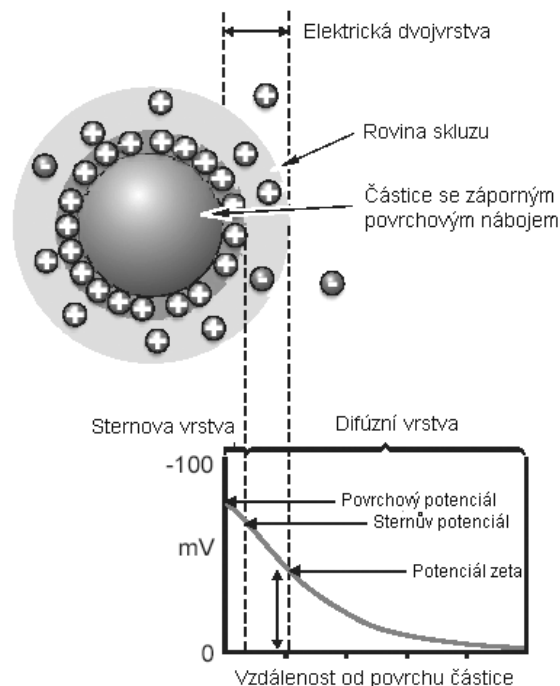
$$D = \frac{kT}{6\pi\eta Rh} \quad (11)$$

Kde  $D$  je difúzní koeficient,  $k$  je Boltzmanova konstanta,  $T$  je teplota,  $\eta$  je viskozita rozpouštědla a  $Rh$  je redynamický poloměr roztoku částic.

### 1.6.2 Zeta potenciál

Většina částic dispergovaných v kapalinách obsahuje ionty v podobě záporně a kladně nabitých atomů, zvané kationty a anionty. Povrch nabitě částice pak bude silně přitahovat opačně nabitě ionty, čímž vzniká tzv. Sternova vrstva. Vzdálenější ionty jsou vázány volněji a vytvářejí tzv. difúzní vrstvu (Obr. 9).

V difúzní vrstvě existuje pomyslná hranice, oddělující ionty pohybující se s částicí, nazývaná rovina skluzu (z ang. slipping plane). Na této vrstvě je měřen zeta potenciál, který má význam pro hodnocení stability disperzních systémů. Soustavy s vysokým potenciálem ( $> +30$  mV,  $< -30$  mV) jsou považovány za elektrostaticky stabilní, zatímco systémy s hodnotami zeta potenciálu mimo zmíněnou hranici mají tendenci ke koalescenci, či flokulaci, což následně vede ke snížení fyzikální stability. Zeta potenciál lze stanovit pomocí laserové Dopplerovy elektroforézy, kdy se měří, jak rychle se částice pohybuje v kapalině, když je aplikováno elektrické pole [31].



Obrázek 9: Schéma elektrické dvojvrstvy [31]



## 2 POLYMERNÍ POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY

Popularita polymerních povrchově aktivních látek během posledních desetiletí vzrostla a dnes jsou využívány v mnoha komerčních odvětvích, buď samostatně, nebo v kombinaci s nízkomolekulárními amfifilními sloučeninami.

Pro přípravu lze využít přírodní polymery, jako například celulózu, škrob, proteiny, nebo syntetické polymerní materiály, jako je polystyren, polyakrylová kyselina nebo polyakrylamid. Hydrofilicitu, resp. hydrofobicitu polymerních materiálů lze dle potřeby regulovat. Modifikace přírodních polymerů může být provedena například degradačními procesy, jako je hydrolýza, nebo chemickými (esterifikace, aminace, oxidace), případně enzymatickými reakcemi. Syntetické polymerní PAL jsou připravovány polymerací amfifilních monomerů [32], [33].

### 2.1 Typy polymerních povrchově aktivních látek

Polymerní povrchově aktivní látky mohou být připraveny třemi způsoby, a to buď s hydrofobními řetězci naroubovanými na hydrofilní základní polymer, nebo s hydrofilními řetězci naroubovanými na hydrofobní hlavní řetězec, a nakonec se střídajícími se hydrofilními a hydrofobními segmenty. První dva typy se nazývají roubované kopolymery, v případě třetího typu se jedná o blokový kopolymer. Polymerní povrchově aktivní látky mohou být jak rostlinného, tak živočišného původu [33].

Zařazení povrchově aktivních polymerů do výše uvedených tří typů nelze provést vždy jednoznačným způsobem. Ve skutečnosti lze dva nebo více typů kombinovat, například povrchově aktivní makromolekula může obsahovat základní polymer sestávající ze střídajících se hydrofilních a hydrofobních segmentů, doplněný o hydrofilní nebo hydrofobní postranní řetězce, tzn., že molekula může být současně blokovým a roubovaným kopolymerem [33].

Důležitým rysem polymerních PAL z fyzikálně-chemického hlediska je, že molekula je schopná se orientovat tak, aby hydrofilní oblasti směřovaly do polárního prostředí a hydrofobní segmenty do nepolární fáze, čímž se následně sníží mezipovrchové napětí a polymer lze definovat jako amfifilní sloučeninu [33].

#### 2.1.1 Polymery s hydrofilním hlavním a hydrofobními postranními řetězci

Zástupci z této skupiny látek jsou lipopolysacharidy s uhlovodíkovým hlavním řetězcem, na němž jsou navázány řetězce lipofilní. Jako příklad lze uvést biotenzid Emulsan, získávaný

z bakterie *Acinetobacter calcoaceticus*. Dalšími příklady jsou například hydrofobizovaný škrob a celulóza, které se využívají jako stabilizátory emulzí a regulátory viskozity (zahušťovadla) [33].

### 2.1.2 Polymery s hydrofobním hlavním a hydrofilními postranními řetězci

Mezi přírodní povrchově aktivní látky tohoto typu patří hlavně glykoproteiny, ze syntetických lze zmínit ethoxylované polyakryláty a pryskyřice, ethoxylované ligninsulfonáty nebo silikonové povrchově aktivní látky. Využívají se jako sterické stabilizátory v disperzích [33].

### 2.1.3 Polymery se střídajícími se hydrofilními a hydrofobními bloky

Do této skupiny patří například přírodní povrchově aktivní proteiny, jako je kasein nebo mléčný protein. Tyto proteiny obsahují polární segmenty s vysokou koncentrací fosfátových skupin spolu s oblastmi, kde dominují hydrofobní aminokyseliny. Mezi syntetické povrchově aktivní látky tohoto typu patří blokové kopolymery na bázi poly(alkylen glykolu).

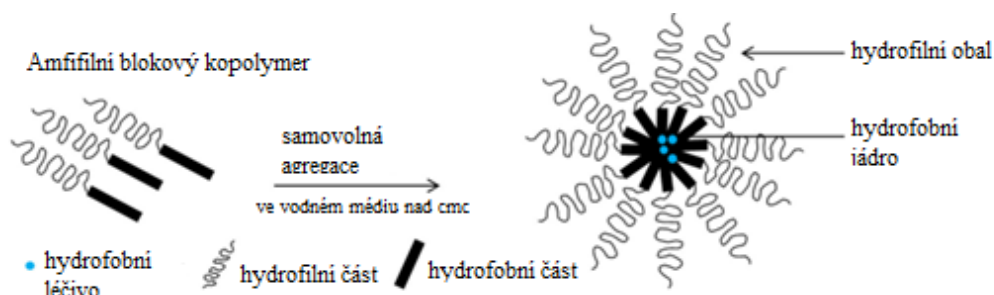
Hydrofilní segment je téměř vždy poly(ethylenglykol) (PEG), získaný polymerací ethylenoxidu (EO). Hydrofobní částí je obvykle poly(propylenglykol) (PPG), ale existují také produkty na bázi poly(butylenglykolu). Již poměrně malý rozdíl ve struktuře obsažených tří typů opakujících se jednotek vyvolá poměrně významný rozdíl fyzikálně-chemických vlastností dané polymerní PAL. Zatímco PEG je rozpustný ve vodě bez ohledu na molekulovou hmotnost, PPG je nerozpustný a tvoří tedy v blokovém kopolymeru hydrofobní segmenty [33].

## 2.2 Micely blokových kopolymerů

Polymerní micely jsou v poslední době rozsáhle studovány jako potenciální nosiče aktivních látek. Hlavními důvody je jejich biokompatibilita, vysoká kapacita pro inkorporaci solubilizátu a nízká toxicita [34].

Podobně jako v případě klasických povrchově aktivních látek, se mohou amfifilní blokové kopolymery obsahující hydrofilní a hydrofobní řetězce organizovat do tzv. polymerních micel, po překročení určité kritické micelární koncentrace. Koncentrovanější roztoky povrchově aktivních polymerů mohou tvořit různé složitější kapalně krystalické fáze. Ve vodném prostředí tvoří polární část vnější obal micely a nepolární část molekuly tvoří jádro, které je chráněno před nevýhodnými interakcemi s polárním prostředím. U většiny polymerních micel je hydrofobní látka zapouzdřena v jádře, a to z důvodu dominantních

hydrofobních interakcí, vodíkových vazeb a elektrostatických interakcí (Obr. 10). Tyto interakce obvykle korelují se stabilitou polymerní micely ve vodném roztoku [35].



Obrázek 10: *Struktura polymerní micely* [36]

Fyzikální stabilita micel ve fyziologickém prostředí může být dána termodynamickou stabilitou, která souvisí především s kritickou micelární koncentrací (CMC), a kinetickou stabilitou, tedy sledováním vývoje micelární struktury v čase. Termodynamická stabilita popisuje strukturu a chování micel během jejich tvorby v rovnovážných podmínkách. Hodnoty kritické micelární koncentrace v zásadě souvisí s volnou energií micelizace a interakcemi mezi polymerem a rozpouštědlem [35].

Hlavní rozdíl mezi micelami konvenčních monomerů povrchově aktivních látek a polymerních surfaktantů spočívá v tom, že uvnitř hydrofobního jádra polymerní micely obvykle existuje kovalentní vazba, která neumožňuje dynamickou výměnu monomerů mezi volným roztokem a micelární pseudofází. Z toho důvodu jsou polymerní micely tuhé a stabilnější. Průměr polymerní micely se pohybuje od 10 do 100 nm [21].

Velikost a morfologie polymerních micel lze snadno regulovat úpravou struktury amfifilních kopolymerů, jelikož význam hraje molekulová hmotnost amfifilního blokového kopolymeru, agregační číslo, relativní podíl hydrofilních a hydrofobních řetězců a množství rozpouštědla zachyceného uvnitř micelárního jádra. Ve vodném prostředí se amfifilní blokové kopolymery mohou shromažďovat do sférických, tyčinkovitých nebo válcových micel, nebo do polymerních vezikul či polymersomů. Hlavním faktorem, který ovlivňuje morfologii micel, je hydrofilně-lipofilní rovnováha (HLB hodnota) blokového kopolymeru [21].

Složení a molekulová hmotnost jsou dvě významné charakteristiky blokových kopolymerů. Podobně jako v případě nízkomolekulárních neionických PAL je micelizace podporována zvyšující se délkou hydrofobního bloku a snižující se délkou hydrofilní části. Dalším

faktorem ovlivňujícím micelizaci blokových kopolymerů je molekulární struktura, kdy diblokové kopolymery se organizují do micel snadněji než triblokové typy se stejnou celkovou molekulovou hmotností a složením [34].

Micelizace blokových kopolymerů obsahujících PEO je podporována také zvyšováním teploty. Stejně jako u nízkomolekulárních povrchově aktivních látek je to způsobeno sníženou rozpustností PEO domény. U kopolymerů PEO/PPO však k tomuto chování přispívá také snížená rozpustnost domény PPO ve vodě se zvyšující se teplotou. Teplotní závislost hodnoty CMC je pro mnoho typů blokových kopolymerů PEO/PPO poměrně silná. Z toho důvodu je počátek tvorby agregátů v takových systémech často identifikován kritickou teplotou micelizace při fixní koncentraci polymeru (CMT), spíše než kritickou micelární koncentrací při fixní teplotě. S rostoucí teplotou dochází také ke zvětšování micel. Stejně jako u povrchově aktivních látek s nízkou molekulovou hmotností obsahujících EO jde o účinek snižující se rozpustnosti polymeru se zvyšující se teplotou [34].

### 2.3 Příprava polymerních micel/částic

Nejjednodušší způsob přípravy formulací na bázi poloxamerů s obsahem aktivní látky je přímá solubilizace. Dále jsou využívány metody vyžadující zahřátí k dosažení konečné struktury produktu, jako je metoda hydratace tenkého filmu a emulgace vyvolaná teplotou. Lze také využít techniku využívající změny CMC, která vede k tvorbě tzv. kineticky zmrazených micel. Některé metody budou popsány v následujících kapitolách [37].

#### 2.3.1 Přímá solubilizace aktivních látek

Poloxamery vytvářejí ve vodném roztoku v oblasti CMC sférické micely, které jsou schopny inkorporovat různá léčiva prostřednictvím solubilizace. Z termodynamického hlediska dochází k poklesu volné energie v případě lokalizace hydrofobního solubilizátu mezi PPO segmenty v jádře micely. Významnou roli při micelizaci tedy hrají vzájemné interakce mezi inkorporovanou aktivní látkou a poloxamerem, polarita solubilizátu, stejně jako charakter použitých rozpouštědel a případných aditiv, které ovlivňují CMC a tvar micely. Micelární charakteristiky, jako CMC, CMT nebo agregační číslo závisí také na poměru PPO/PEO a počtu jednotek EO a PO v molekule poloxameru. Ty následně ovlivňují množství solubilizovaného léčiva a kinetiku uvolňování [37].

### 2.3.2 Hydratace tenkého filmu

Další metodou pro zabudování léčiv do polymerních micel je hydratace tenkého filmu. Na rozdíl od přímé solubilizace ve vodných roztocích se zde využívají organická rozpouštědla. Po homogenizaci směsi se rozpouštědlo odstraní, obvykle za zvýšené teploty a za vakua, což vede k vytvoření tenkého filmu. Tato technika vykazuje většinou vysokou enkapsulační účinnost. Výsledný pevný film léčiva a amfifilu lze později rehydratovat, mícháním za zvýšené teploty, za vzniku micelárního roztoku [37].

### 2.3.3 Teplotou indukovaná emulzifikace

Léky, které jsou omezeně rozpustné ve vodě, mohou být rozpuštěny ve vhodném organickém rozpouštědle. Nevýhodou je, že běžně přidávaná rozpouštědla jsou často poměrně toxická a je nutno je z finálního produktu v dalším kroku separovat. Řešením může být využití techniky emulgace při střední až vysoké teplotě, která je založena na principu vytlačování taveniny, která zahrnuje přechod léčiva z jeho krystalického do amorfního stavu, což vede ke zlepšení jeho rozpustnosti. Tento proces probíhá za teploty výrazně zvýšené nad bod tání léčiva, tedy také nad teplotou skelného přechodu, což usnadní proces vytlačování. Problémem může být potenciální degradace aktivní látky.

Teplotně indukovaná emulgace umožňuje nižší teploty zpracování. V tomto postupu je připravena homogenní směs daného léčiva a biokompatibilního solubilizačního činidla. Tato směs tvoří „olejovou“ fázi, která je enkapsulována poloxamerem. Tavenina se poté rychle ochladí na asi 0 °C. Po rehydrataci vznikají dispergované struktury, jejichž vlastnosti se liší v závislosti na použitých přísadách [37].

### 2.3.4 Náhrada rozpouštědla

Do této skupiny lze řadit různé techniky, jako například dialýzu, přímé odpařování rozpouštědla, kombinaci emulgace-odpařování rozpouštědla nebo emulgace-difúze rozpouštědla. Tyto způsoby jsou obvykle doprovázeny procesem lyofilizace, která je vhodná v přípravě prášků a pelet. Odpařování rozpouštědla s následnou lyofilizací bylo úspěšně použito k enkapsulaci některých protinádorových léků do nanočástic na bázi poloxameru, které jsou následně dodávány ve formě tablet [37].

### 2.3.5 Kineticky zmrazené micely

Termín „kineticky zmrazený“ znamená, že struktura je „uvězněna“ v nerovnovážném stavu po dlouhou dobu relevantní pro aplikaci. Prvním krokem je ko-micelizace poloxameru a léčiva. Poté dochází ke snížení teploty pod CMT, čímž se posune rovnováha micel-unimer k volným unimerům z micel s obsahem léčiva. Uvolněné unimery se následně odstraní pomocí dialýzy a zůstanou nanočástice s vysokým poměrem léčiva k polymeru [37].

## 2.4 Poloxamery typu Pluronic®

V následující kapitole budou charakterizovány vybrané typy blokových kopolymerů, které byly využity v praktické části diplomové práce. Poloxamery, také známé jako Pluronic®, jsou blokové kopolymery poly(ethylenoxidu) (PEO) a poly(propylenoxidu) (PPO). Mají amfifilní charakter a z toho plynou jejich užitečné asociační a adsorpční vlastnosti. Poloxamery nacházejí uplatnění v mnoha aplikacích, které vyžadují solubilizaci nebo stabilizaci sloučenin a mají také pozoruhodné fyziologické vlastnosti, včetně nízké toxicity. Zatímco tradiční povrchově aktivní látky mají nízkou molekulovou hmotnost, blokové kopolymery jsou dlouhé řetězce s molekulovou hmotností několik tisíc Da. Poloxamery vykazují ve vodném roztoku amfifilní charakter na základě hydrofilní PEO segmentu a hydrofobicity PPO bloků.

Poloxamerní agregáty mohou existovat ve formě micel, reverzních micel (voda v oleji) a lyotropních tekutých krystalů (LLC), včetně lamelárních, hexagonálních a kubických agregátů. Zmíněné agregáty nacházejí uplatnění v mnoha oblastech, jako jsou systémy doručování léčiv, formulace kosmetických emulzí, syntéza nanočástic, dispergačních činidel pro inkousty/pigmenty nebo pro aplikace univerzálních povlaků proti biologickému znečištění [37].

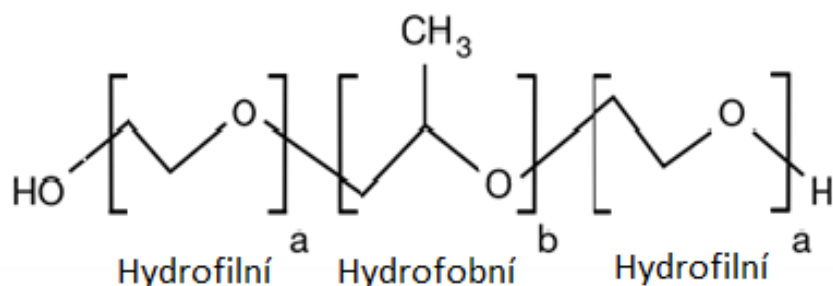
V této práci byly použity tři typy poloxamerních tenzidů, a to blokový kopolymer s komerčním názvem Poloxamer 188, Poloxamer 184 a Poloxamer 407.

## 2.5 Poloxamer 188

Poloxamer 188 je komerčně dostupný syntetický neionický kopolymer, známý pod komerčními názvy Kolliphor® P188, Lutrol® F68 a Pluronic® F68 [38], [39]. Jedná se o kopolymer s triblokovou strukturou typu ABA, která se skládá z centrálního hydrofobního řetězce poly(propylenoxidu) lemovaného dvěma hydrofilními řetězci polyoxyethylenu

(Obr. 11). Jde tedy o tzv. blokové kopolymery, které jsou syntetizovány současnou polymerací více než jednoho monomeru [40], [41].

Poloxamer 188 se využívá jako emulgátor, solubilizátor, dispergační a smáčecí činidlo při přípravě pevných disperzí. Dále také jako povrchově aktivní látka v bioterapeutických a biofarmaceutických formulacích, a to díky svým vynikajícím vlastnostem stabilizujícím bílkoviny. Lze jej také využít ke zvýšení rozpustnosti ve vodě hydrofobních, olejovitých látek a také ke zvýšení mísitelnosti dvou látek o různé hydrofobitě. Z tohoto důvodu se zmíněný poloxamer využívá v kosmetice a také jako modelový systém pro dodávání léčiv [40]. Vlastnosti poloxameru 188 jsou uvedeny v Tabulce 2.



Obrázek 11: *Obecná struktura poloxameru* [42]

Tabulka 2: *Vlastnosti poloxameru 188* [43]

Molekulová hmotnost [g/mol]	8 400
Počet EO jednotek	152,73
Počet PO jednotek	28,97
HLB	29
Bod zákalu [°C]	> 100
Kritická micelární koncentrace [mol/l]	$4,8 \cdot 10^{-4}$

## 2.6 Poloxamer 184

Poloxamer 184 je PEO/PPO/PEO blokový kopolymer, známý také pod komerčními názvy Pluronic® L64 a Kolliphor® P184. Jedná se o povrchově aktivní látku, která funguje jako čisticí a solubilizační činidlo. Právě díky vysoké detergenční aktivitě, a také kvůli nízkému

iritačnímu potenciálu pro pokožku a sliznice, se používá jako součást jemných pleťových čistících produktů. Uplatňuje se také jako emulgátor pro emulze typu O/V [42], [44]. Informace o složení a vybrané fyzikálně-chemické charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: *Vlastnosti poloxameru 184* [43]

Molekulová hmotnost [g/mol]	2 900
Počet EO jednotek	26,36
Počet PO jednotek	30
HLB	15
Bod zákalu [°C]	58
Kritická micelární koncentrace [mol/l]	$4,8 \cdot 10^{-4}$

## 2.7 Poloxamer 407

Poloxamer 407 je známý pod komerčními názvy Pluronic® F127 a Kolliphor® P407. Jedná se o hydrofilní neionickou povrchově aktivní látku z třídy kopolymerů, obsahujících segmenty z polyethylenoxidu (PEO) a polypropylenoxidu (PPO). Používá se jako zahušťovadlo, gelující prostředek, emulgátor a složka přípravků pro osobní hygienu, jako jsou zubní pasty, ústní vody, krémy a tekuté emulze. Dále je aplikován jako solubilizátor účinných látek a éterických olejů v kosmetických přípravcích [42], [45]. Vlastnosti poloxameru 407 jsou shrnuty v Tabulce 4.

Tabulka 4: *Vlastnosti poloxameru 407* [43]

Molekulová hmotnost [g/mol]	12 600
Počet EO jednotek	200,45
Počet PO jednotek	65,17
HLB	22
Bod zákalu [°C]	> 100
Kritická micelární koncentrace [mol/l]	$4,8 \cdot 10^{-4}$



### 3 FENOLICKÉ SLOUČENINY PRO INKORPORACI

Fenolické látky neboli polyfenoly patří do skupiny přirozeně se vyskytujících sloučenin s obsahem většího množství hydroxylových skupin připojených k aromatickým nebo heterocyklickým jádrům [46]. Vyskytují se v různých druzích rostlin a vykazují redukční a antioxidační vlastnosti. Antioxidanty jsou látky, které zpomalují, popřípadě oddalují, oxidační procesy v organismu nebo směsích.

Podle struktury dělíme fenolické látky do tří skupin, a to na flavonoidní (anthokyany, anthoxantiny), neflavonoidní (jednoduché fenoly, benzochinony, fenolické kyseliny), a ostatní (lignany, taniny a stibeny). Výčet vybraných fenolických látek je obsažen v následujících kapitolách [47].

#### 3.1 Flavonoidní látky

Flavonoidy se rozdělují do několika skupin, a to na flavony, flavonoly, isoflavony, flavanony, flavonony, 3-flavanoly (katechiny), chalkony a anthokyanidiny [47].

##### 3.1.1 Kurkumin

Kurkumin je přírodní flavonoid známý také pod názvem kurkumová žluť. Tato žlutá pigmentová látka je hlavním aktivním kurkuminoidem v oddencích kurkumy. Dva další aktivní kurkuminoidy, často zahrnuté v komerčním kurkuminu, jsou demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin. Kurkumin vykazuje antioxidační, protizánětlivé a protirakovinné účinky vůči různým typům rakovinných buněk.

Klinické aplikace kurkuminu jsou ovšem limitovány jeho nízkou rozpustností ve vodě, vstřebatelností a biodostupností. Z toho důvodu jsou vyvíjeny různé typy nosných systémů, jako jsou například lipozomy a nanoemulze. Lipozomy bohužel vykazují určité nevýhody plynoucí z rychlé degradace. Jako perspektivní alternativa se jeví polymerní micely, které se vyznačují snadnou výrobou a vysokou stabilitou enkapsulovaných léčiv. Pro přípravu polymerních micel byly použity různé typy polymerů, z nichž bezpečnými a účinnými materiály se prokázaly právě poloxamery, které byly využity v experimentální části této práce [48].

##### 3.1.2 Kvercetin

Kvercetin je přírodní antioxidant, patřící do skupiny flavonolů. Vyskytuje se v některých druzích ovoce, zeleniny a bylin. Ve své struktuře obsahuje centrální C-kruh spolu s velkým

množstvím hydroxylových skupin a konjugovaných  $\pi$  orbitalů, a tím činí sloučeninu silným a redukčním činidlem. Nejdůležitějším účinkem kvercetinu je vychytávat volné radikály, které hrají důležitou roli při buněčném růstu, diferenciaci, fyziologickém stresu a imunitní odpovědi [49]. Nevýhodou je, že kvercetin má špatnou rozpustnost ve vodě a je snadno rozložitelný, což omezuje jeho použití v hydrofilních potravinářských systémech. Z toho důvodu se provádí jeho enkapsulace [50].

V práci Hao a kol. [50] byla pro enkapsulaci kvercetinu do polymerních nanokapslí na bázi chitosan/lecitin využita metoda elektrostatické depozice s cílem chránit kvercetin před degradací a zvýšit jeho biokompatibilitu. Polymerní nanokapsle s obsahem kvercetinu byly charakterizovány z hlediska velikosti, morfologie, účinnosti enkapsulace, stability při skladování, antioxidačních a antiproliferačních aktivit. Připravené homogenní a sférické nanokapsle vykazovaly vysokou enkapsulační účinnost.

Huang a kol. [51] studovali enkapsulaci kvercetinu a lněného oleje do NLC technikou vysokotlaké homogenizace. Nanočástice nanesené společně s kvercetinem a lněným olejem měly průměr menší než 100 nm a sférický tvar. Rozpustnost kvercetinu v hydrofilních matricích sestávajících z lněného oleje a povrchově aktivních látek se zásadně zvýšila (o několik řádů). Přidání lněného oleje vedlo i ke zlepšení *in vitro* antioxidační aktivity NLC s obsahem kvercetinu. Připravené NLC formulace vykazovaly navíc vysokou dlouhodobou stabilitu, tudíž by mohly být s výhodou aplikovány pro dodávání hydrofobních bioaktivních sloučenin a  $\omega$ -3 nenasycených mastných kyselin v potravinářském průmyslu.

### 3.1.3 Katechin

Katechin je jedním z hlavních zástupců flavonolů, který se vyskytuje hlavně v zeleném čaji, hroznech, červeném víně a v kakau. Katechiny mají antioxidační, protizánětlivé, antiproliferativní, proapoptotické, analgetické, antifungální a antibakteriální účinky. Jeho použití je však v moderní terapii omezené kvůli jeho nízké biologické dostupnosti a omezené stabilitě při fyziologickém pH s rychlou degradací při nízkém a vysokém pH a v přítomnosti světla. Zvýšení stability katechinů lze zajistit pomocí enkapsulace do vhodných nosičů [52].

Katechin byl využit pro enkapsulaci do různých forem nosičů, jako například do složených emulzí typu V/O/V [52], nebo do lipozomů, kde byl navíc obsažen kurkumin [53]. Tyto nosiče s duálním zapouzdřením dvou typů aktivních látek prokázaly potenciál pro zvýšení biologické dostupnosti.

## 3.2 Ne flavonoidní látky

Mezi ne flavonoidní látky patří jednoduché fenoly, benzochinony, fenolické kyseliny (k. gallová, k. vanillinová, k. salicylová, k. elagová), skořicové kyseliny, kumariny, resveratrol atd. [47].

### 3.2.1 Resveratrol

Resveratrol je přírodní ne flavonoidní polyfenol. Snadno dostupný v různých rostlinných druzích, jako jsou hrozny, arašidy a moruše. Resveratrol a jeho deriváty vykazují například imunomodulační, anti-agingové, protizánětlivé a antioxidační vlastnosti [54].

### 3.2.2 Kyselina gallová

Kyselina gallová (3,4,5-trihydroxybenzoová) je přírodní antioxidant obsahující polyfenolové sloučeniny. Získává se z bylin, jako jsou sumach, zelený čaj, vilín a dubová kůra. Používá se v kosmetice, léčivech a potravinách. Kyselina gallová má protizánětlivé, antioxidační, antimutagenní a antikarcinogenní účinky. Navzdory jejím příznivým účinkům při oxidačním stresu a léčivým vlastnostem jsou její aplikace v klinické terapii omezeny kvůli nepříznivé biologické dostupnosti. Řešením opět může být inkorporace do různých forem nosičů, jako jsou například polymerní nanočástice, lipozomy atd., které mohou optimalizovat fyzikální a chemické vlastnosti [55].

### 3.2.3 Kyselina elagová

Kyselina elagová (EA) je bioaktivní polyfenolická sloučenina nacházející se v ovoci (například granátové jablko, maliny, jahody a ostružiny), nebo v ořeších (mandle). Hydroxylová skupina ve struktuře EA zvyšuje antioxidační aktivitu a chrání buňky před poškozením. Vlastnosti EA jsou zejména antioxidační, antikarcinogenní, antiapoptotické a antibakteriální [56].

### 3.2.4 Kyselina skořicová

Kyselina skořicová je součástí silic některých koření, především skořice. Od kyseliny skořicové jsou odvozeny kyselina ferulová, kávová, kumarová a sinapová. Mezi významné skořicové kyseliny patří také p-kumarová kyselina a také kyselina kávová. Příznivé vlastnosti skořicových kyselin a jejich fenolických derivátů jsou antioxidační a protizánětlivé, mají také silné protirakovinné a antimikrobiální účinky [47], [57].

### 3.3 Fenoly v esenciálních olejích

Mezi fenoly nacházející se v esenciálních olejích patří například thymol, eugenol, karvakrol a kresol [58], které jsou známé pro svou antioxidační aktivitu proti volným radikálům a dalším reaktivním kyslíkovým složkám, a také aktivitu vůči oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou, které jsou původci kardiovaskulárních onemocnění. V poslední době se kvůli svému inhibičnímu účinku proti různým zánětlivým cytokinům tyto látky doporučují jako potenciální protizánětlivá léčiva [59].

#### 3.3.1 Thymol

Thymol (2-isopropyl-5-methylfenol) je fenol monoterpenu. Je hlavní účinnou složkou oleje extrahovaného z druhu *Thymus vulgaris* L., běžně známý jako tymián, a dalších rostlin, jako jsou například *Ocimum gratissimum* L., *Origanum* L., *Carum copticum* L. Jedná se o univerzální látku s širokou škálou praktických aplikací, jako jsou například lékařské, veterinární, zubní a potravinářské. Thymol má silné antibakteriální, protizánětlivé, antioxidační a antifungální vlastnosti. Ve skutečnosti thymol inhibuje grampozitivní a gramnegativní patogenní bakterie. Vykazuje aktivitu proti některým patogenním bakteriálním kmenům, jako jsou *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* a *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*. Jeho použití v potravinářských technologiích je však omezeno z důvodu jeho vysoké těkavosti, citlivosti na světlo a nízké rozpustnosti ve vodě [59], [60].

Podobně jako v předchozích případech lze tyto nevýhody překonat pomocí enkapsulace do nosičů. Ve studii Marcet a kol. [61] byla studována enkapsulace thymolu do nanočástic na bázi kyseliny polymléčné. Výsledné sférické částice vykazovaly vysokou stabilitu při skladování při různém pH a zlepšené antimikrobiální vlastnosti ve srovnání s neenkapsulovaným thymolem.

Rassu a kol. [59] enkapsulovali thymol do mikročástic na bázi přírodních polymerů methylcelulózy a jejího derivátu, hydroxylpropylmethylcelulóзовého ftalátu (HPMCP), pomocí techniky sprejového sušení. Použité polymery měly významný vliv na kinetiku uvolňování thymolu. U připravených mikročástic na bázi methylcelulózy byl sledován kratší poločas rozpadu, ale zásadní zvýšení biologické dostupnosti. Naopak formulace připravená z HPMCP vykazovala velmi omezenou systémovou absorpci. Na základě výsledků bylo stanoveno, že připravené methylcelulóзовé formulace by mohly sloužit pro systémové podávání thymolu v nízkých dávkách a částice HPMCP pro lokální léčbu střevních infekcí.

### 3.3.2 Eugenol

Eugenol je přírodní sloučenina vyskytující se ve formě těkavé, bezbarvé až nažloutlé kapaliny. Je primární sloučeninou éterických olejů, jako je například hřebíčkový olej. Mezi další zdroje eugenolu patří skořicový listový a kůrový olej, bazalkový olej, bobkový, sassafrasový, kůrovitý olej a kafrový olej. Vyznačuje se svými antioxidačními, protizánětlivými, antimikrobiálními, antiparazitickými a repelentními vlastnostmi. Používá se v různých průmyslových odvětvích jako je například farmaceutický, potravinářský, zemědělský a kosmetický průmysl [62].

Ve studii Garga a kol. [63] byly připraveny pevné lipidové nanočástice s obsahem eugenolu, které prokázaly vysokou účinnost zapouzdření (více než 90 %) a zvýšenou stabilitu proti oxidační degradaci. Bylo také zjištěno, že enkapsulací eugenolu do lipidových nanočástic došlo ke zvýšení jeho terapeutické účinnosti a byla snížena jeho antifungální aktivita.

## 4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Kosmetické přípravky často obsahují biologicky aktivní látky, které jsou nestabilní a citlivé na teplotu, pH, světlo a oxidaci. Tyto látky také mohou podléhat nežádoucím reakcím, které vedou ke snížení nebo ztrátě jejich účinnosti nebo dokonce k degradaci kosmetického produktu. Proto byly navrženy technologie mikroenkapsulace ke zvýšení stability, ochraně proti degradaci a také k cílenému a kontrolovanému uvolňování aktivních složek používaných v kosmetických přípravcích. Enkapsulace aktivních látek tedy představuje ideální a jedinečný princip, který může zajistit jejich řízené a cílené uvolňování, izolaci a ochranu účinných látek, zlepšenou stabilitu a účinnost, bezpečné podávání, maskování nežádoucích vlastností, jako je zápach, a také zlepšení sensorických charakteristik. Enkapsulační procesy jsou v současnosti předmětem výzkumu v mnoha průmyslových oblastech, jako je farmacie, potravinářství, kosmetický a textilní průmysl.

Enkapsulovaná aktivní látka se může z daného nosiče uvolňovat různými mechanismy, například mechanicky nebo prostřednictvím difúze, změny teplot, pH, v důsledku biodegradace a působení rozpouštědel. Výběr techniky enkapsulace a nosného materiálu závisí na finální aplikaci produktu, v závislosti na fyzikální a chemické stabilitě, koncentraci, požadované velikosti částic, mechanismu uvolňování a výrobních nákladech [64].

Tim a kol. [48] se ve své práci zabývali přípravou a charakterizací polymerní micelární formulace na bázi poloxameru 407 s obsahem kurkuminu s potenciálem pro aplikace u pacientů s leukémií. Největší efektivita zapouzdření byla zaznamenána u vzorků v poměru léčiva k polymeru 1:30.

Účinnost poloxamerních tříblokových kopolymerních micel pro enkapsulaci kurkuminu byla prokázána také ve studii Sahu a kol. [65]. Připravené formulace na bázi kopolymerů Pluronic F127 (poloxamer P407) a F68 (poloxamer P188) vykazovaly velký terapeutický potenciál proti celé řadě onemocnění. Účinnost enkapsulace aktivní látky byla zásadně závislá na poměru léčiva a kopolymeru. Lyofilizovaná forma formulací vykazovala dobrou stabilitu pro dlouhodobé skladování. Fyzikální interakce mezi kurkuminem s Pluronicem byla prokázána XRD analýzou, UV-Vis, fluorescenční a FT-IR spektroskopii.

Formulace na bázi Pluronicu F127 a kurkuminu, připravená metodou hydratace tenkého filmu, byla studována v práci Vaydia a kol. [66]. Díky enkapsulaci do poloxameru (o koncentraci 5 %hm.) došlo k významnému zvýšení rozpustnosti kurkuminu.

*In vitro* studie v práci Akbra a kol. [67] prokázaly pozitivní vliv směsných polymerních micel připravených z poloxamerů P127 a P123. U výsledných formulací byla zaznamenána zvýšená protinádorová, antimikrobiální, antioxidační a  $\alpha$ -amylázová inhibiční aktivita, ve srovnání s jednoduchými micelami s obsahem kurkuminu nebo volným neenkapsulovaným kurkuminem.

Autoři studie Sotoudegan a kol. [68] připravili pomocí metody hydratace tenkého filmu a technik přímého rozpouštění polymerní micely na bázi poloxamerů Pluronic P85, F127 a F68 s inkorporovaným léčivem nimodipinem za účelem jeho řízeného uvolňování pro prevenci a léčbu neurologických poruch. Připravené částice byly sférického tvaru a vykazovaly velikost do 100 nm s nízkým stupněm polydisperzity. Během studie uvolňování léčiva byl prokázán vliv molekulové hmotnosti a hydrofilně lipofilní rovnováhy použitého kopolymeru.

Na základě provedené literární rešerše lze konstatovat, že polymerní micely jako nosiče aktivních látek mají v současnosti velký potenciál a jsou předmětem řady studií. Zvýšená pozornost je věnována právě kombinacím těchto látek za vzniku směsných micel, což je problematika, které byla věnována experimentální část této práce.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 5 CÍLE PRÁCE

Hlavní cíle diplomové práce lze shrnout následovně:

- příprava roztoků jednotlivých poloxamerů a jejich směsí bez přídavku aktivních látek,
- příprava roztoků jednotlivých poloxamerů a jejich směsí s přídavkem aktivních fenolických látek,
- charakterizace připravených systémů (velikost částic, zeta potenciál, stabilita, kinetika uvolňování aktivních fenolických látek).

## 6 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

### 6.1 Použité chemikálie

Poloxamer P188, Sigma Life Science

Poloxamer P407, Sigma Life Science

Poloxamer P184, Aldrich chemistry

Kurkumin pro syntézu, Merck spol. s r.o.

Thymol, Sigma

Eugenol, Aldrich chemistry

Fosfátový pufr (pH 7)

Ftalátový pufr (pH 4)

Chlorid sodný, Iplub

Chlorid draselný, mikroCHEM

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Lachema n. p. Brno

Dihydrogen fosforečnan draselný, Lachema n. p. Brno

Tween 80, Sigma-Aldrich

Mueller Hinton Agar (MHA)

Mikroorganismy: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

*Escherichia coli* CCM 3954

### 6.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy Sartorius Basic 110 S

Magnetické míchadlo Heidolph,

Magnetické míchadlo 2mag magnetic motin MIX 15 eco

Tenziometr Easy Dyne Krüss

Vakuová rotační odparka Heidolph

Ultrazvuková lázeň KAITEK K-10LE

Odstředivka EBA 20, Hettich ZENTRIFUGEN

Spektrofotometr photoLab 6600 UV-VIS Mikropipeta

Bateriový pH metr CPH 51 s kombinovanou pH elektrodou HC 103

Zetasizer Nano ZS Malvern

Mikropipety Eppendorf reaserch plus

Parafilm M Laboratory Seal film

Laboratorní sklo (kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, pipety, tyčinky, lžičky, lodičky, baňky s kulatým dnem)

Dialyzační membrána MWCO: 12 – 14 kD, Specta Por

Uzávěry Specta Por, bílé, těsnící šířka – 23 mm, množství – 10/pkg

Mikrozkumavky, typ Eppendor

Filtr CA 1,2  $\mu\text{m}$ , WVR

Filtr CA 0,22  $\mu\text{m}$ , Millex<sup>®</sup>GS

Parafilm M Laboratory Seal film

Sterilní disky, HIMEDIA

## 7 POSTUPY PŘÍPRAVY VZORKŮ A MĚŘENÍ

### 7.1 Příprava roztoků poloxamerů

Byly připraveny zásobní roztoky poloxamerů o koncentraci 2 %hm. navážením vypočteného množství jednotlivých poloxamerů P407, P188 a P184 s přesností na 0,0001 g. Navážky byly rozpuštěny v daném množství destilované vody na míchadle po dobu 30 minut při laboratorní teplotě a 500 rpm. Dále byly tyto roztoky kvantitativně převedeny do 100 ml odměrných baněk a doplněny destilovanou vodou po rysku.

Směsi poloxamerů byly připraveny v daném poměru 1:1 (P188:P184, P188:P407, P184:P407) odpipetováním 25 ml jednotlivých vzorků do 50 ml odměrných baněk.

### 7.2 Stanovení kritické micelární koncentrace

Stanovení kritické micelární koncentrace bylo prováděno pomocí měření povrchového napětí na tenziometru Krüss (Obr. 12) metodou Wilhelmyho destičky. Měření probíhalo při teplotě 25 °C. Ze zásobních roztoků (2 %hm.) směsí poloxamerů byly připraveny pracovní roztoky do 50 ml odměrných baněk o koncentracích od 0,01 do 0,5 %hm. podle zředovací rovnice (12).

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (12)$$

Kde:

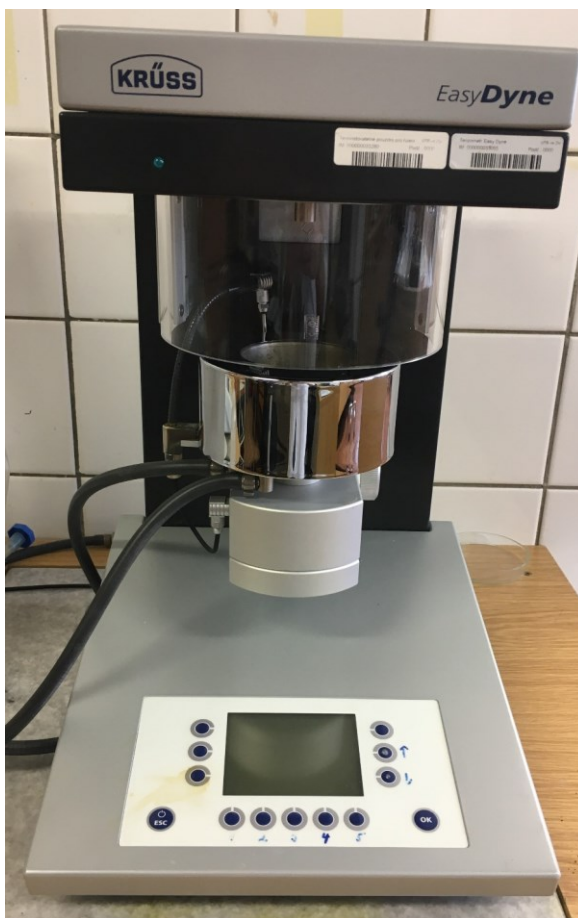
$c_1$  koncentrace zásobního roztoku [mol/l]

$V_1$  objem zásobního roztoku [l]

$c_2$  koncentrace pracovního roztoku [mol/l]

$V_2$  objem pracovního roztoku [l]

Pracovní roztoky byly převedeny do misek tenziometru a pomocí umyté a vyžíhané Wilhelmyho destičky bylo změřeno povrchové napětí. Z hodnot povrchového napětí byly následně vyhodnoceny hodnoty kritické micelární koncentrace. Měření probíhalo ve dvou sériích.



Obrázek 12: *Tenziometr EasyDyne – Krüss*

### 7.3 Příprava roztoků poloxamerů s aktivní látkou

Byly použity roztoky poloxamerů o koncentraci 1 %hm. navážením vypočítaného množství jednotlivých poloxamerů. Dále byla přidána aktivní látka o příslušné koncentraci (0,5 %hm. thymol resp. eugenol a 0,1 %hm. kurkumin). Ke směsi bylo přidáno 20 ml 96 % ethanolu a poté byly vzorky umístěny na míchadlo (cca 25 až 30 min při teplotě 40 °C a 500 rpm). Následně byly roztoky převedeny do 100 ml baněk s kulatým dnem. Baňky se vzorky byly umístěny na vakuovou rotační odparku (cca 6 až 10 minut při teplotě 60 °C a 60 rpm), kde došlo k odpaření ethanolu a vzniku filmu. Poté byly vzorky vloženy do exsikátoru a ponechány přes noc ve tmě. Následující den byly vzorky rehydratovány prostřednictvím 10 ml destilované vody a vloženy do ultrazvukové lázně na cca 20 až 40 min při teplotě 40 °C, kde probíhala dispergace. Po ukončení dispergace byly vzorky přefiltrovány přes filtr o velikosti pórů 1,2 μm a převedeny do skleněných vialek.

Příprava vzorků směsí poloxamerů probíhala stejně s tím rozdílem, že jako základ byla použita vždy směs vybraných poloxamerů v poměru 1:1.

## 7.4 Test uvolňování aktivní látky

Z připravených vzorků (kapitola 7.3) bylo odebráno 5 ml do dialyzační membrány (12 až 14 kD), která byla vložena do kádinky s PBS puforem + Tween 80 (pH 7,48). Poté byly v definovaných intervalech (1, 2, 3, 24 až 78 h) odebírány vzorky o objemu 2 ml do mikrozkrumavek Eppendorf a na spektrofotometru (Obr. 13) byla měřena absorbance při vlnové délce 283 nm (thymol), 286 nm (eugenol) a 424 nm (kurkumin). Měření proběhlo ve dvou sériích.



Obrázek 13: Spektrofotometr photoLab 6600 UV-VIS

## 7.5 Měření velikosti částic

Měření velikosti částic bylo prováděno na roztocích poloxamerů bez (kontrola) a s aktivní látkou a na roztocích směsi poloxamerů bez (kontrola) a s aktivní látkou. Připravené roztoky byly naředěny 2krát přefiltrovanou destilovanou vodou, (filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ ), a to 0,5 ml vzorku do 1 ml destilované vody. Po důkladném promíchání byly vzorky převedeny do kyvety (10 mm), která byla následně umístěna do přístroje ZetaSizer Nano ZS Marvel. Měření probíhalo při teplotě 25 °C. Pro ověření stability vzorků bylo měření opakováno po 3 měsících stání vzorků v lednici ( $T = 4\text{ °C}$ ).

## 7.6 Měření zeta potenciálu

Měření zeta potenciálu probíhalo stejně jako u měření velikosti částic na roztocích poloxamerů s aktivní látkou a bez aktivní látky (kontrola) a na roztocích směsi poloxamerů s aktivní látkou a bez aktivní látky (kontrola). Vzorky byly opět naředěny 2krát přefiltrovanou vodou (6  $\mu\text{l}$  vzorku a 3 ml destilované vody). Naředěné vzorky byly důkladně promíchány a převedeny pomocí injekční stříkačky do kyvety typu DTS1070, která byla

následně umístěna do přístroje ZetaSizer Nano ZS Marvel. Měření probíhalo při teplotě 25 °C. Pro ověření stability vzorků bylo měření opakováno po 3 měsících stání vzorků v lednici (T = 4 °C).

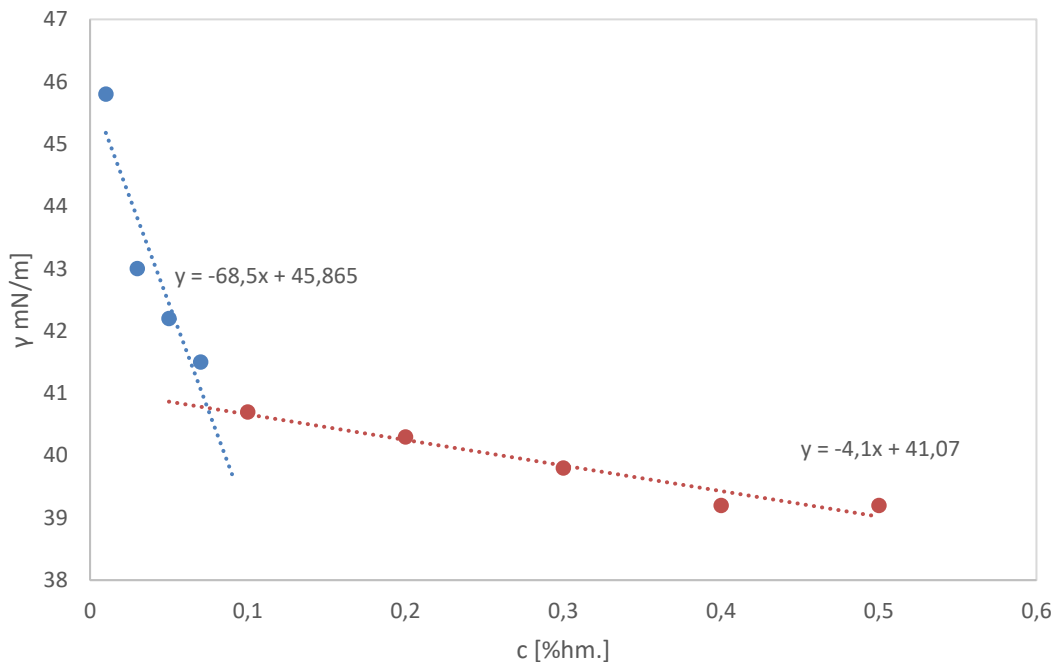
## 7.7 Antibakteriální vlastnosti

Stanovení antibakteriální účinnosti probíhalo na vybraných vzorcích (thymol a eugenol o koncentraci 0,5 %hm., kurkumin o koncentraci 0,1 %hm. a kontrola P188) pomocí diskové difúzní metody. Test byl také proveden na vzorcích samotných aktivních látek (thymol 0,5 %hm., eugenol 0,5 %hm. a kurkumin 0,1 %hm.) rozpuštěných v 5 ml 96 % ethanolu. Nejprve byla vytvořena bakteriální suspenze (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) o koncentraci 0,5 McF. Tato suspenze byla následně naočkována pomocí mikropipety (1 ml) na Petriho misku s Mueller-Hinton agarem. Po zaschnutí byly na povrch půdy sterilní pinzetou umístěny dva sterilní disky o průměru 6 mm, na kterých bylo nanášeno 25 µl vzorku. Misky byly následně kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byla potenciální antibakteriální aktivita vyhodnocena prostřednictvím změření průměrů inhibičních zón okolo jednotlivých disků.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Stanovení micelárních parametrů poloxamerů

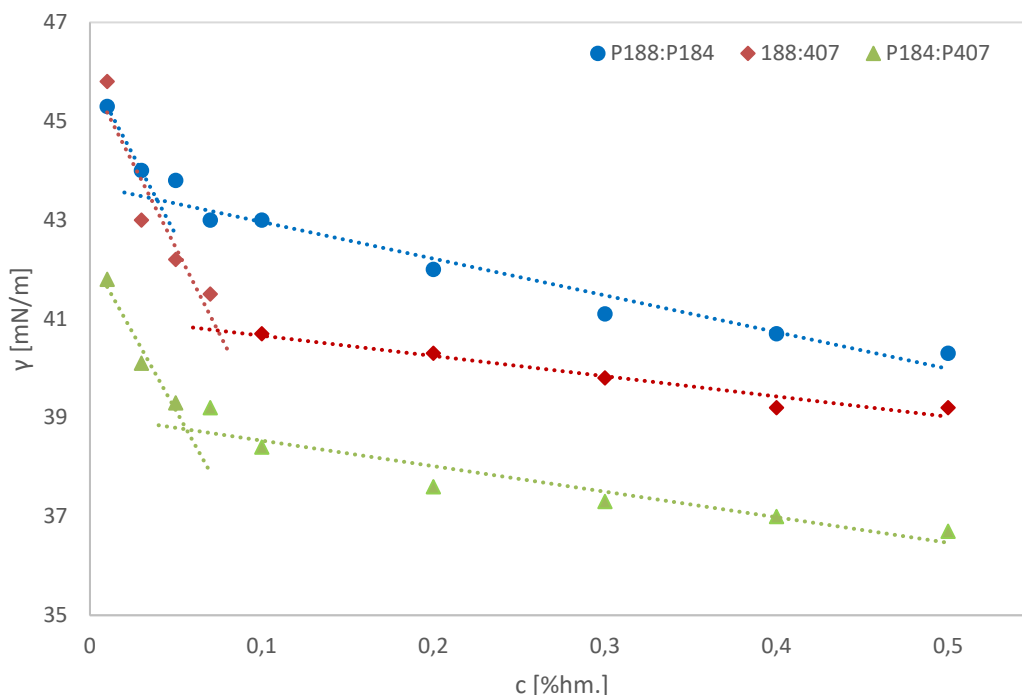
Kritická micelární koncentrace (CMC) vypovídá o povrchové aktivitě daného systému a má proto zásadní význam pro praktické aplikace. Stanovení kritické micelární koncentrace směsi tenzidů bylo prováděno pomocí měření povrchového napětí, a to metodou Wilhelmyho destičky. Poté byly zjištěné hodnoty povrchového napětí vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci směsi tenzidů a následně byla v oblasti zlomu pomocí průsečíků směrnic odečtena kritická micelární koncentrace (viz Obr. 14).



Obrázek 14: Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci směsi poloxamerů

*P188:P407 při 25 °C*





Obrázek 15: Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci směsí tenzidů při 25 °C

Hodnoty  $CMC$  včetně minimálního povrchového napětí  $\gamma_{min}$  jsou shrnuty v Tabulce 5. Pro srovnání jsou zde uvedeny i hodnoty  $CMCs$ , které byly počítány pomocí Clintonova vztahu (rovnice 13).

$$\frac{1}{CMC_s} = \frac{x}{CMC_1} \cdot \frac{(1-x)}{CMC_2} \quad (13)$$

Kde  $CMC_s$  je kritická micelární koncentrace směsi,  $x$  je molární zlomek prvního tenzidu,  $CMC_1$  a  $CMC_2$  jsou kritické micelární koncentrace jednotlivých tenzidů.

Data ukazují, že v případě kombinací P184:P407 a P188:P407 byly teoretické hodnoty nižší, zatímco u P184:P188 byl zaznamenán nárůst oproti výsledku získanému z experimentálního měření pomocí průsečíků směrnic. Hodnoty  $CMC$  směsí získané z experimentálních dat potvrzují synergický efekt všech kombinací poloxamerů, jelikož došlo k poklesu koncentrace tvorby prvních micel, v porovnání s  $CMC$  hodnotami systémů tvořených jednotlivými poloxamery (P184 = 0,05 mM, P188 = 0,16 mM, P407 = 0,01 mM) získaných z předchozí studie [69]. Hodnoty  $\gamma_{min}$  směsí poloxamerů se pohybovaly od 36 do 40 mN/m. Došlo tedy k mírnému poklesu ve srovnání s hodnotami jednotlivých poloxamerů (od 37,4 do 45 mN/m) [69].

Případné synergické účinky směsí tenzidů lze prokázat pomocí parametrů  $\beta$  a  $x_M$  vypovídajících o míře ideálnosti mísení, které lze vypočítat z následujících vztahů pomocí Rubinghovy teorie (rovnice 14 a 15).

$$x_M^2 \cdot \frac{\ln \left( \frac{CMC_s \cdot x}{CMC_1 \cdot x_M} \right)}{(1 - x_M)^2} \cdot \ln \left[ \frac{CMC_s \cdot (1 \cdot x)}{CMC_2 \cdot (1 - x_M)} \right] = 1 \quad (14)$$

Kde  $CMC_s$  je kritická micelární koncentrace směsi,  $CMC_1$  a  $CMC_2$  jsou kritické micelární koncentrace jednotlivých tenzidů,  $x_M$  je molární zlomek tenzidu ve směsné micelě a  $x$  je molární zlomek tenzidu ve směsi. Následně parametr  $\beta$  se vypočítá pomocí rovnice (15).

$$\beta = \frac{\ln \frac{CMC_s \cdot x}{CMC_1 \cdot x_M}}{(1 - x_M)^2} \quad (15)$$

Negativní odchylka od ideálního mísení indikuje působení přitažlivých sil mezi molekulami povrchově aktivní látky v micelárním agregátu a vyjadřuje synergický efekt tenzidů ve směsi. Čím více se parametr  $\beta$  blíží nule, tím ideálnější chování směs vykazuje. Všechny poloxamerní směsi vykazovaly pouze mírné odchylky parametru  $\beta$  od nulové hodnoty, mírný synergický efekt byl prokázán u směsi P188:P184 ( $-0,175$ ). Hodnoty  $x_M$  vypovídající o složení směsné micely se mírně lišily od původního teoretického složení směsi ( $x = 0,5$ ).

V Tabulce 5 jsou dále uvedeny hodnoty Gibbsovy micelární energie  $\Delta G_m$ , adsorpce na rozhraní  $\Gamma$  a plochy  $a$ , kterou na rozhraní zaujímá jedna molekula tenzidu. Vzhledem k faktu, že tvorba micel u povrchově aktivních látek je spontánním jevem, měly by hodnoty micelizační energie být záporné. Čím více má  $\Delta G_m$  zápornou hodnotu, tím snáze probíhá proces micelizace. V našem případě se hodnoty pohybovaly okolo  $-8000$  kJ/mol. Micelární energie agregátů tvořených jednotlivými poloxamery dosahovaly hodnot okolo  $-5000$  kJ/mol [69], tedy nižších než v případě směsí. Což vede k závěru, že kombinace poloxamerů měly příznivý vliv na tvorbu micel.

Pozitivní vliv směsí poloxamerů lze hodnotit i na základě hodnot adsorpce na rozhraní, které byly vyšší v porovnání s výsledky samotných poloxamerů (P184 =  $4,03 \cdot 10^{-7}$  mol/m<sup>2</sup>, P188 =  $3,15 \cdot 10^{-7}$  mol/m<sup>2</sup>, P407 =  $3,93 \cdot 10^{-7}$  mol/m<sup>2</sup> [69]) až na kombinaci P188:P407, tam došlo k poklesu na hodnotu  $1,86$  mol/m<sup>2</sup>. Hodnoty plochy  $a$  byly u směsí poloxamerů nižší než hodnoty samotných poloxamerů ( $a_{P184} = 4,12$  nm<sup>2</sup>,  $a_{P188} = 5,26$  nm<sup>2</sup>,  $a_{P407} = 4,23$  nm<sup>2</sup> [69]). Tato skutečnost je výsledkem těsnějšího uspořádání molekul na

rozhraní a tím i efektivnější adsorpce. Na základě dosažených výsledků lze tedy potvrdit příznivý vliv směsí poloxamerů na micelární parametry.

Tabulka 5 *Micelární parametry směsí tenzidů*

	<b>P188:P184</b>	<b>P188:P407</b>	<b>P184:P407</b>
<b>CMC [%hm.]</b>	0,04	0,07	0,06
<b>CMC [mM]</b>	0,02	0,01	0,01
<b>CMCs [mM]</b>	0,08	0,02	0,02
<b><math>\gamma_{\min}</math> [mN/m]</b>	40,3	39,2	36,7
<b><math>\Delta G_m</math> [kJ/mol]</b>	-8048,1	-6438,8	-7136,1
<b><math>\Gamma \cdot 10^{-7}</math> [mol/m<sup>2</sup>]</b>	4,77	8,91	6,26
<b>a [nm<sup>2</sup>]</b>	3,48	1,86	2,65
<b><math>x_M</math></b>	0,258	0,284	0,938
<b><math>\beta</math></b>	-0,175	0,885	0,938

Synergické chování a parametry interakce  $\beta$  směsí tenzidů byly prokázány také ve studii Thurn a kol. [70], kde byly připraveny a charakterizovány směsné micely na bázi poloxameru 407 (Pluoronic F127) a anionického dodecyl sulfátu sodného (SDS). Také v práci Čirin a kol. [71], kde byly studovány binární směsné micely poloxameru 407 a polysorbátových povrchově aktivních látek (polysorbát 20, polysorbát 60, polysorbát 80, polysorbát 85), byl pomocí Rubinghovy teorie potvrzen synergismus. Polysorbáty s delšími a více nasycenými hydrofobními řetězci zajistily těsnější uspořádání v jádře agregátu a silnější interakce.

## 8.2 Stanovení velikosti částic

Dalším důležitým parametrem pro charakterizaci polymerních roztoků je velikost částic. Měření bylo provedeno v den přípravy vzorků a následně po 3 měsících stání vzorků v lednici ( $T = 4^\circ\text{C}$ ). Výsledky měření velikostí částic u roztoků samotných poloxamerů a jejich směsí a bez aktivních látek jsou uvedeny v Tabulce 6.

Z naměřených dat je zřejmé, že v důsledku kombinace poloxamerních tenzidů došlo ke snížení velikosti částic i indexu polydisperzity PDI. Průměrná velikost částic pro roztok s obsahem poloxameru P188 byla 297,5 nm, s obsahem poloxameru P184 činila 383,3 nm a pro roztok s obsahem poloxameru P407 byla průměrná velikost částic výrazně nižší 81,2 nm.

Na druhou stranu, v případě směsí došlo k významnějšímu zvýšení velikosti částic v porovnání s micelami tvořenými jednotlivými poloxamery.

Částice poloxameru P407, který obsahuje ve své molekule více etylenoxidových a propylenoxidových jednotek ( $\text{EO}_{100}\text{PO}_{65}\text{EO}_{100}$ ), může vytvářet větší velikost než micela poloxameru P184 ( $\text{EO}_{13}\text{PO}_{30}\text{EO}_{13}$ ) [37]. Tento fakt se u našich vzorků zcela neprojevil (Tab. 6).

Tabulka 6: *Velikost částic a polydisperzita jednotlivých poloxamerů a jejich směsí*

Typ poloxameru	ihned		po 3 měsících	
	Velikost částic [d·nm]	Pdl	Velikost částic [d·nm]	Pdl
<b>P188</b>	297,5 ± 70,9	0,7 ± 0,2	244,0 ± 162,6	0,7 ± 0,1
<b>P184</b>	383,3 ± 14,2	0,5 ± 0	253,6 ± 41,5	0,6 ± 0,1
<b>P407</b>	81,2 ± 60,2	0,7 ± 0,3	237,4 ± 60,9	0,8 ± 0,2
<b>P188:P184</b>	178,0 ± 39,0	0,6 ± 0,0	414,7 ± 51,7	0,8 ± 0,1
<b>P188:P407</b>	112,4 ± 10,9	0,4 ± 0,0	201,6 ± 17,3	1,0 ± 0,1
<b>P184:P407</b>	109,5 ± 13,3	0,9 ± 0,2	271,3 ± 13,2	0,6 ± 0,2

Výsledky měření velikostí částic u roztoků poloxamerů s aktivními látkami jsou uvedeny na Obr. 16 až 20. V případě systémů tvořených jednotlivými agregáty poloxamerů byly největší částice zaznamenány u aktivní látky kurkuminu, přičemž mezi systémy byly značné rozdíly (P184 = 18,5 nm, P188 = 917,9 nm a P407 = 41,4 nm). Co se týká směsí, u vzorků s thymolem a eugenolem byl pozorován podobný trend jako u micel bez aktivních látek (Tab. 6), tedy snížení velikosti částic. Například u vzorků s thymolem došlo k poklesu až o 80 % při srovnání samotného P407 a jeho kombinací s poloxamerem 188. Na druhou stranu, u vzorků s kurkuminem došlo k navýšení hodnot. Nejmenší částice byly změřeny u agregátů s eugenolem, a to pouze okolo 22 až 27 nm u P188, P407, či jejich směsi P188:P407. V případě směsi P184:P407 nebylo možno změřit velikost částic, z důvodu příliš velké polydisperzity (velikost částic byla nad hranicí měřitelnosti našeho přístroje).

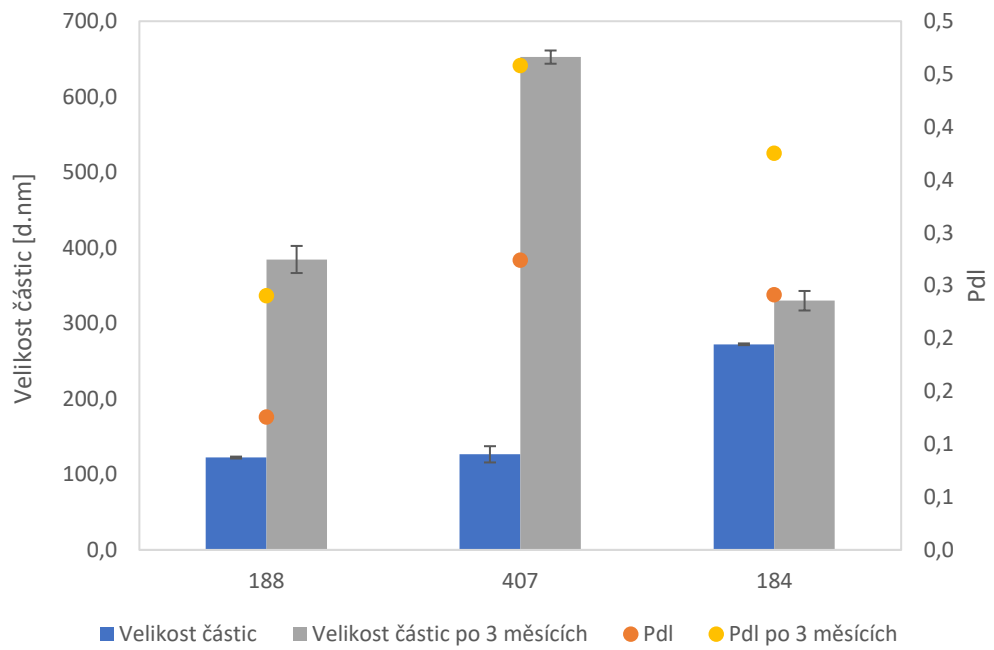
De Souza Ferreira a kol [45] provedli studii fyzikálně-chemických vlastností polymerních systémů obsahujících poloxamer P407 a deriváty kyseliny akrylové (Carbopol 974P®)

s potenciální aplikací ve formě nosičů pro dodávání kurkuminoidů. Formulace vykazovaly sférické micely s různým hydrodynamickým průměrem a distribucí velikostí, které se lišily v závislosti na obsahu kurkuminu. Inkorporace kurkuminu způsobila zvýšení hydrodynamického průměru částic a lepší homogenitu, což se týká velikosti a tvaru.

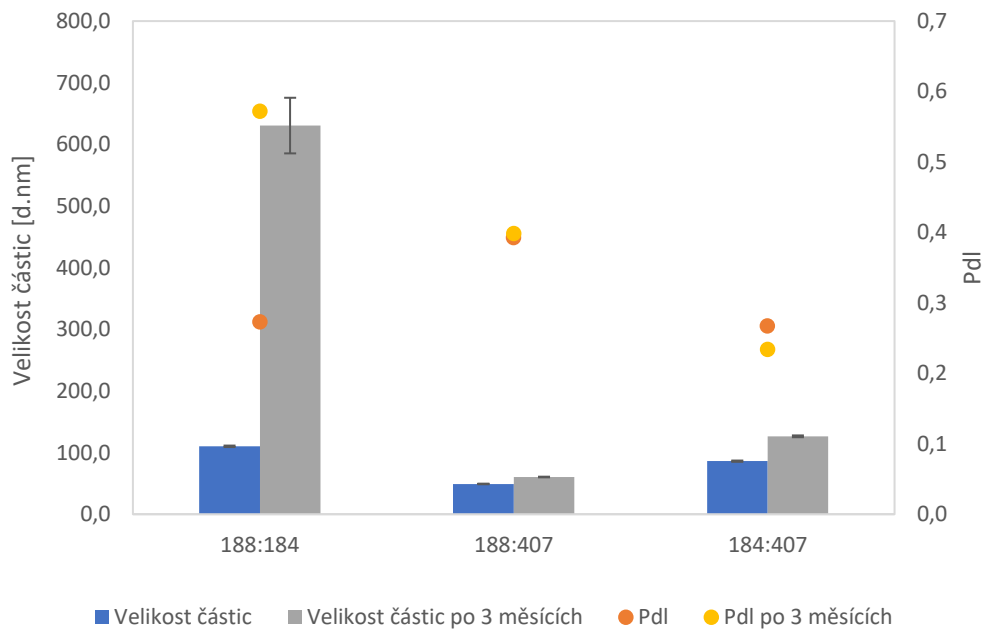
Ve studii Phuc le a kol. [72] byl vliv inkorporace kurkuminu do micel připravených z poloxameru P407 zanedbatelný. Průměrná velikost micel bez a s obsahem kurkuminu zůstala 151 a 146 nm. Na základě námi získaných dat lze obecně konstatovat, že enkapsulací došlo k poměrně zásadním změnám ve velikosti částic. Navíc ve většině případů došlo ke změně distribuce velikostí částic (z multi na monomodální systém), jak je patrné ze srovnání distribučních křivek, např. částic P188 a P188 s enkapsulovaným thymolem (Obr. 21) a směsných micel P184:P188 bez a s kurkuminem (Obr. 22 a 23).

V rámci hodnocení stability vzorků byla velikost částic měřena opět po 3 měsících skladování vzorků v lednici ( $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Obr. 16 až 20). U směsí s thymolem (Obr. 17) došlo časem k agregaci částic, nejvýraznější nárůst byl zaznamenán u směsi P188:184 (více jak 80 %). U vzorků s eugenolem byl největší nárůst velikosti částic zaznamenán u poloxameru P184 (až o 50 %) (Obr. 18). V případě směsných micel (Obr. 19) došlo k nejzásadnějším zvýšení velikosti částic (84 %) u vzorku P184:P407. V případě jednoduchých micel s kurkuminem docházelo také k agregaci částic. U vzorku s poloxamerem P407 došlo ke zvýšení velikosti až o 93 % (Obr. 20). U vzorku P184 s obsahem kurkuminu došlo po třech měsících k sedimentaci a velikost částic nebyla měřitelná. V případě směsných micel s kurkuminem byl měřitelný pouze vzorek P188:P184, u něhož došlo v čase k mírnému zvětšení částic na 119 nm. Z toho důvodu není výsledek uveden formou grafického zobrazení.

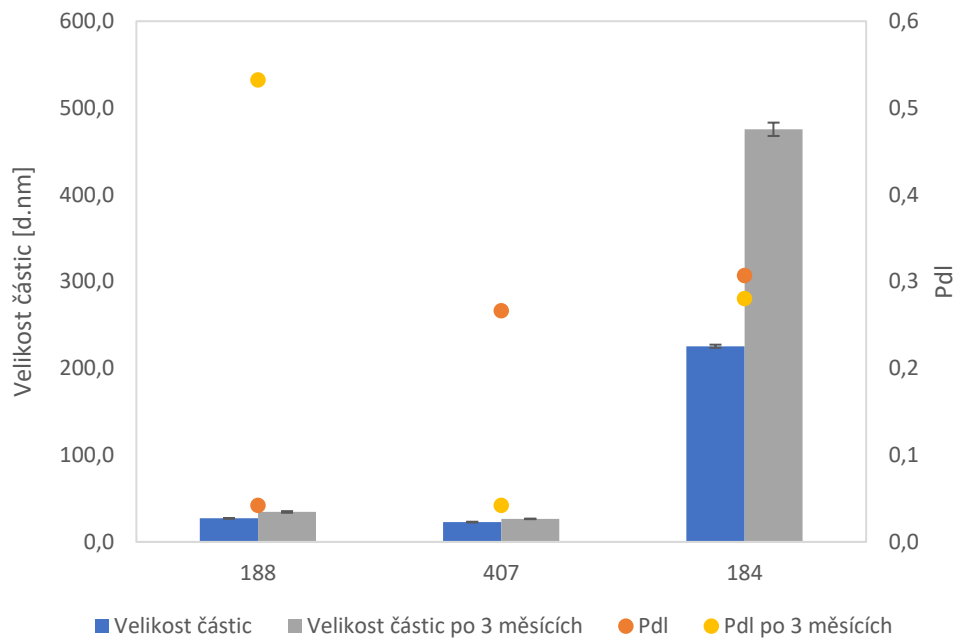
V rámci stabilitní studie lze také monitorovat změny PDI indexu, vypovídající o distribuci velikostí částic. U micel tvořených jednotlivými poloxamery byly prokázány významnější změny v distribuci po dané době skladování (3 měsíce), v porovnání s micelami směsnými (Obr. 16 až 20).



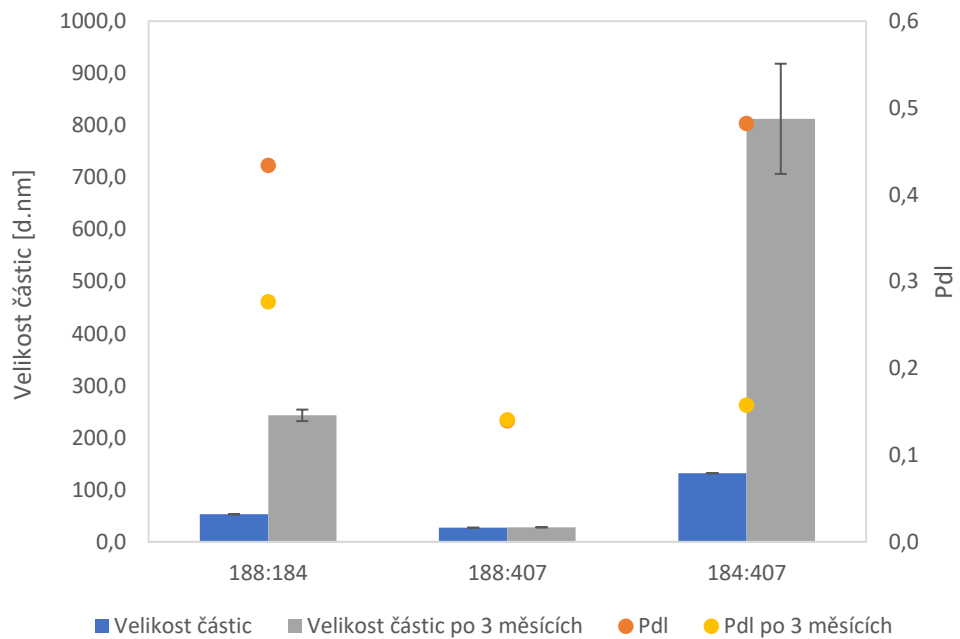
Obrázek 16: Velikost částic a polydisperzita jednotlivých poloxamerů s aktivní látkou thymol



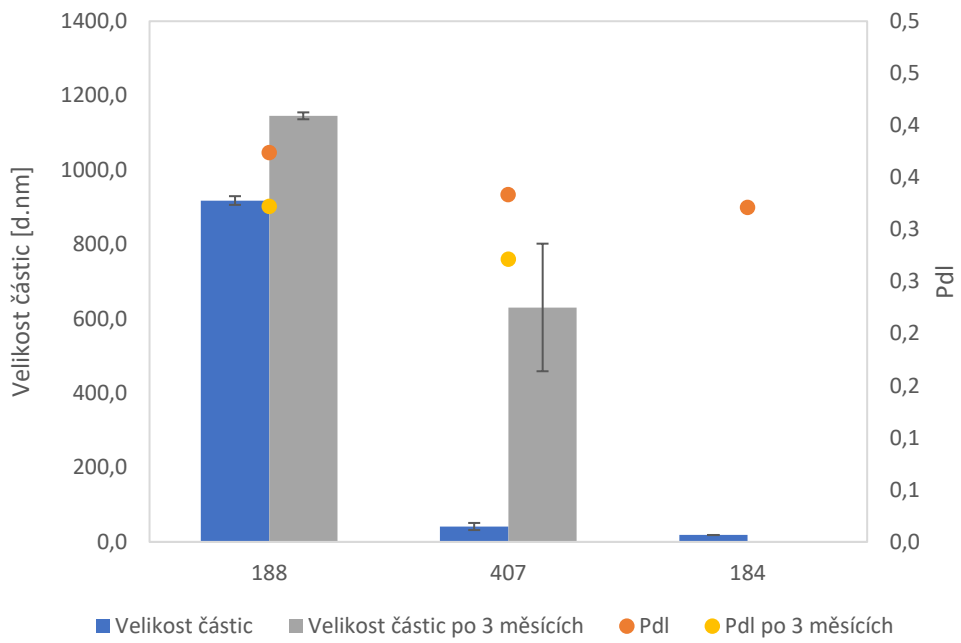
Obrázek 17: Velikost částic a polydisperzita směsí poloxamerů s aktivní látkou thymol



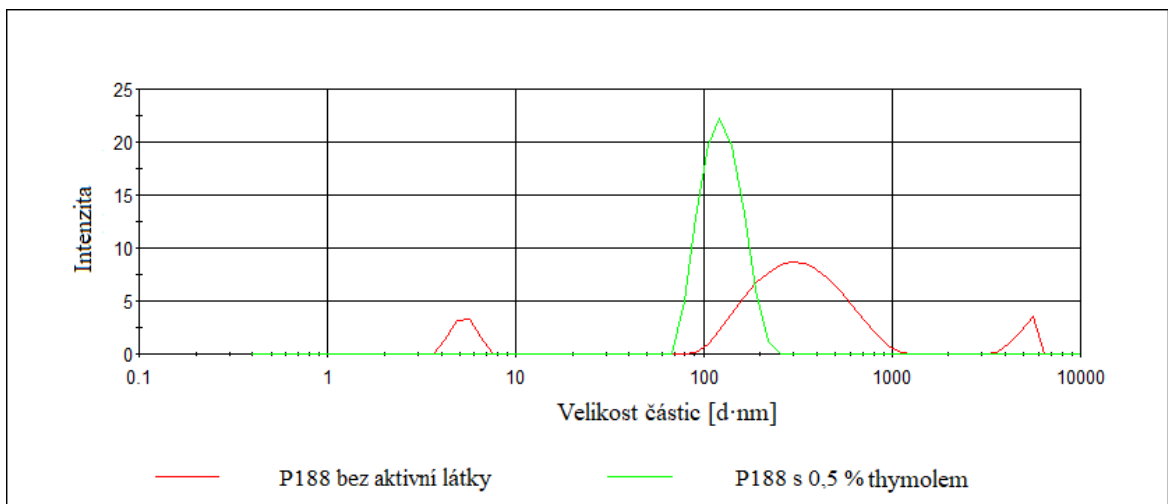
Obrázek 18: Velikost částic a polydisperzita jednotlivých poloxamerů s aktivní látkou eugenol



Obrázek 19: Velikost částic a polydisperzita směsí poloxamerů s aktivní látkou eugenol

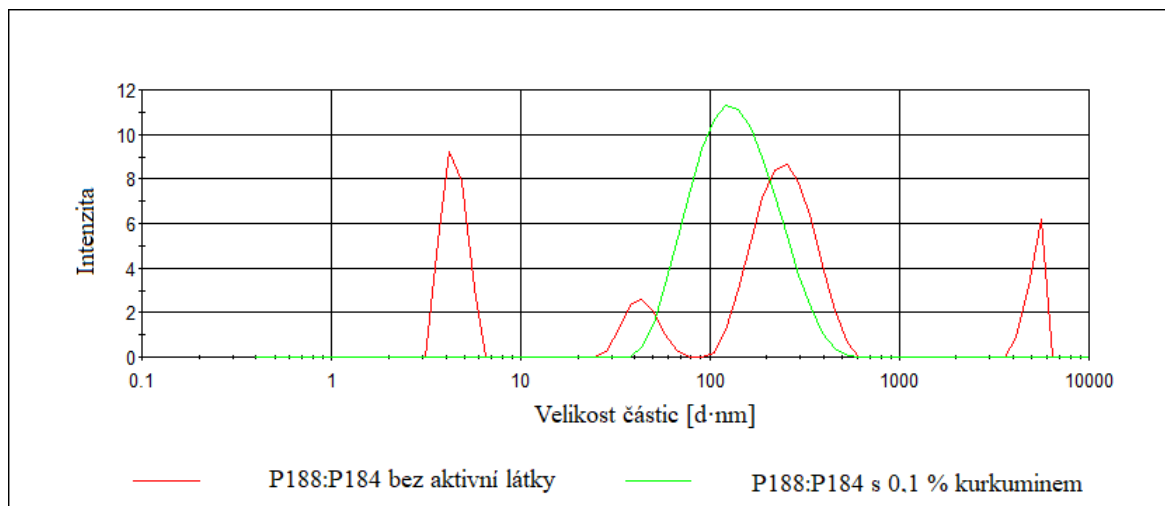


Obrázek 20: Velikost částic a polydispersita jednotlivých poloxamerů s aktivní látkou kurkumin

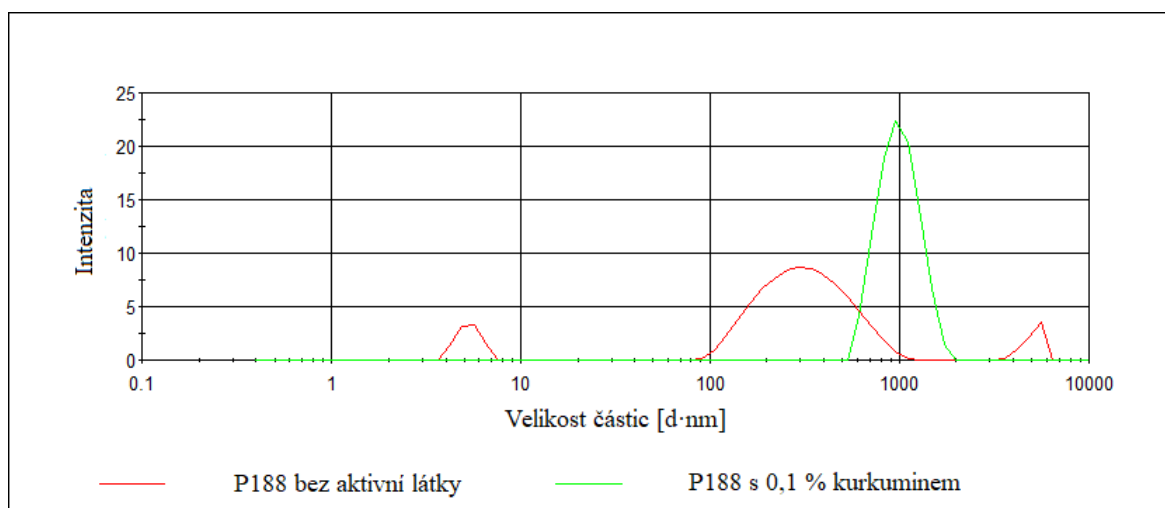


Obrázek 21: Distribuční křivky velikosti částic P188 bez thymolu a P188 s 0,5 % enkapsulovaným thymolem





Obrázek 22: Distribuční křivky velikosti částic P184:P188 bez kurkuminu a P188:P184 s 0,1 % enkapsulovaným kurkuminem



Obrázek 23: Distribuční křivky velikosti částic P188 bez kurkuminu a P188 s 0,1 % enkapsulovaným kurkuminem

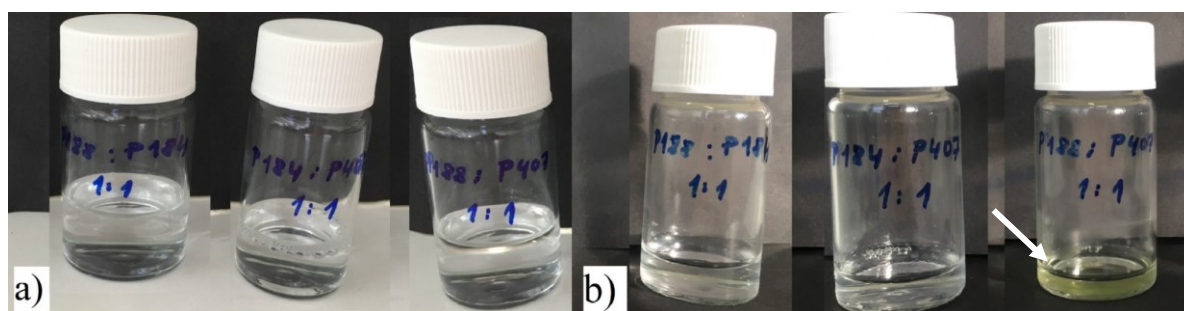
### 8.3 Vizuální hodnocení

Připravené vzorky poloxamerů s aktivními látkami a kontrolní vzorky bez aktivních látek byly hodnoceny i vizuálně, a to opět v den přípravy a po dané době skladování (3 měsíce v případě thymolu, kurkuminu a kontroly a 20 dní v případě eugenolu) při teplotě 4 °C (Obr. 24 až 27).

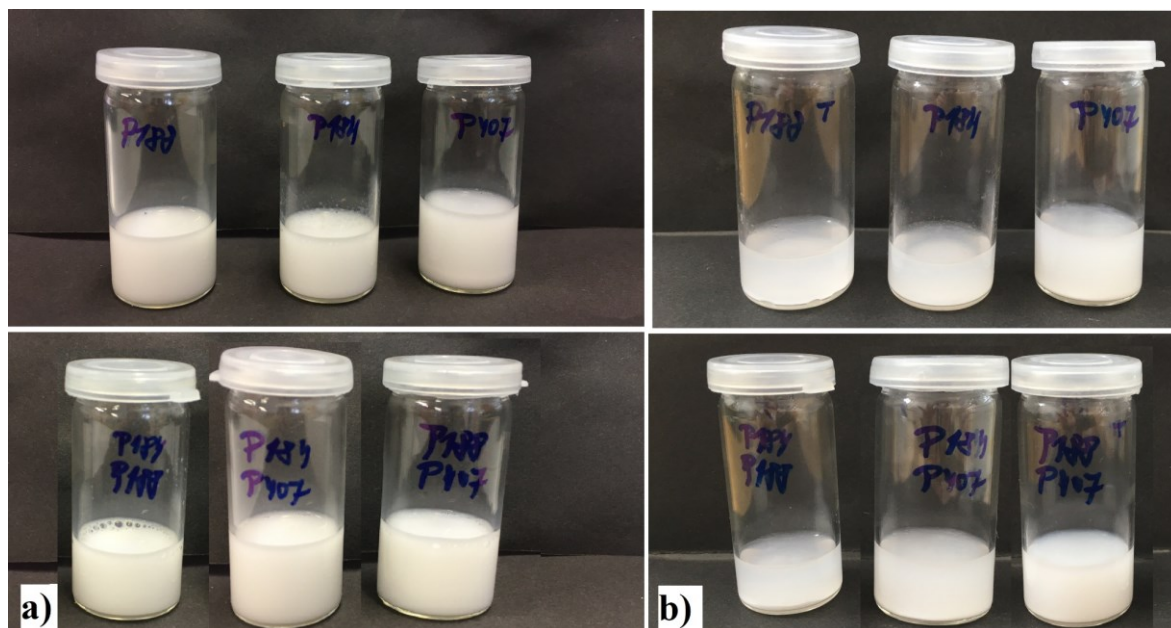
Kontrolní vzorky jednotlivých poloxamerů a jejich směsí bez aktivní látky (Obr. 24) byly čiré a bezbarvé. Po uplynutí doby skladování nedošlo k žádným významným vizuálním změnám, pouze u kombinace P188:P407 byla sledována změna barvy roztoku (z bezbarvého

na nažloutlý). Vizuální hodnocení vzorků obsahujících thymol (Obr. 25) prokázalo dobrou stabilitu, jelikož ani po 3 měsících nebyla pozorována agregace částic. V případě vzorků s eugenolem byl u všech směsí (kromě P188) pozorován zákal. Vzorek P184 a jeho kombinace s P188 byly mléčné (Obr. 26). Po uplynutí doby skladování (20 dní) došlo u roztoku P188 a P184 k agregaci a následné sedimentaci částic. Směsi s kurkumínem vykazovaly charakteristické nažloutlé zbarvení. Podobně jako v případě eugenolu došlo k zákalu u vzorků P184 a P184:P188, zatímco vzorky P188 a P407 byly průhledné (Obr. 27). Po třech měsících byla zaznamenána tvorba agregátů, vedoucí k rozpadu fází, zejména u vzorků směsí poloxamerů.

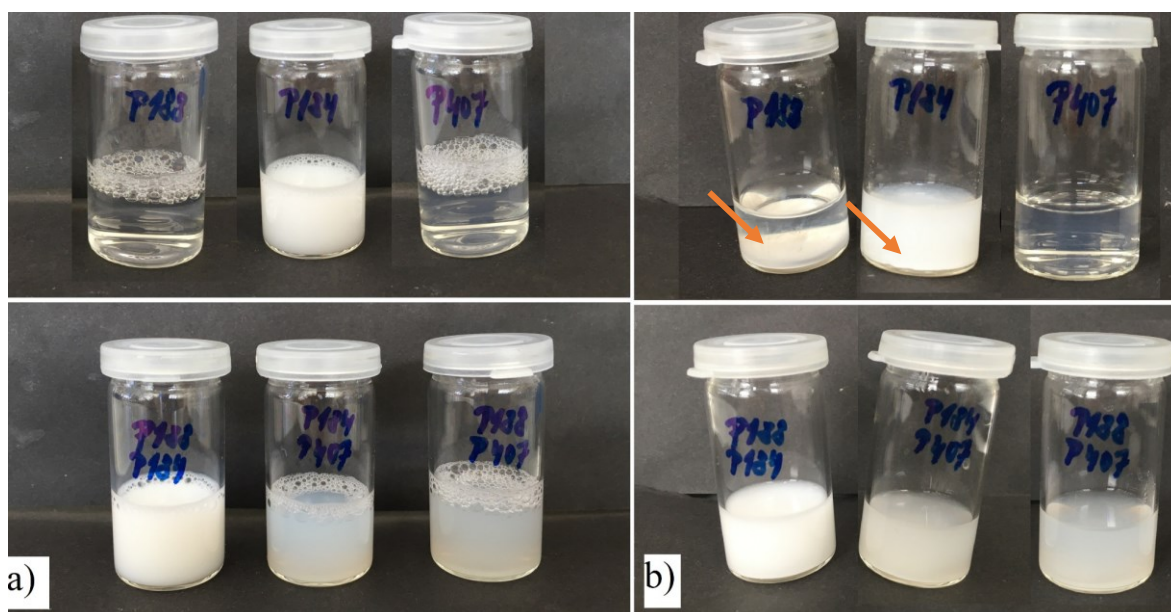
Na základě vizuálního hodnocení lze konstatovat, že nejvyšší stabilitu vykazovaly vzorky s obsahem thymolu a eugenolu. Toto zjištění bylo v podstatě potvrzeno i měřením velikosti částic, zejména v případě směsí s P188:P407 (Obr. 17 a Obr. 19).



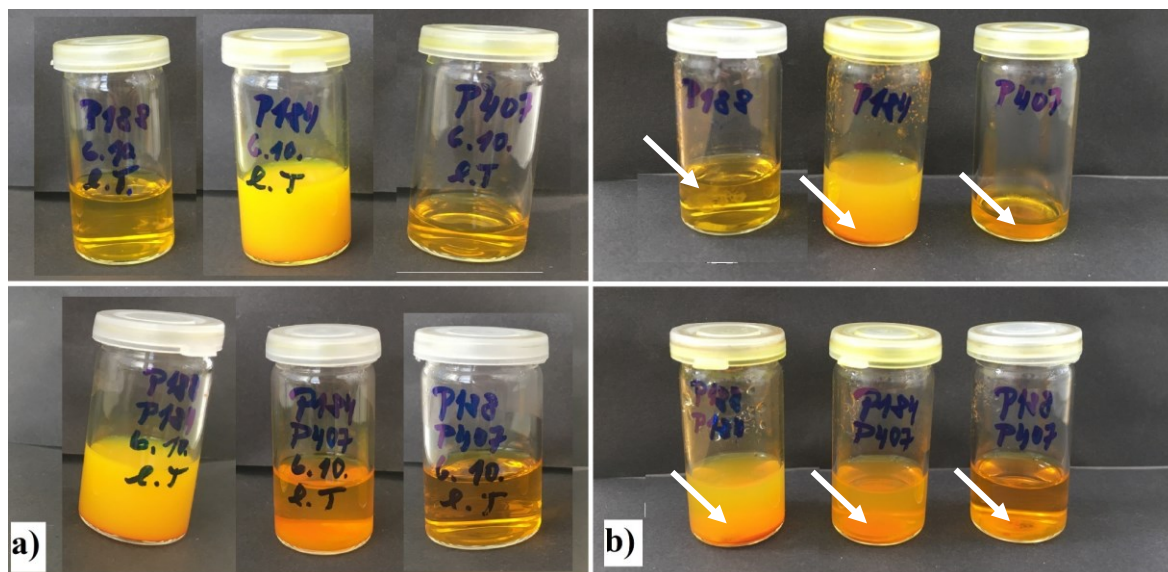
Obrázek 24: Vzorok poloxamerů bez aktivní látky a) ihned po přípravě, b) po 3 měsících skladování při 4 °C



Obrázek 25: Vzorky poloxamerů s obsahem thymolu a) ihned po přípravě, b) po 3 měsících skladování při 4 °C



Obrázek 26: Vzorky poloxamerů s obsahem eugenolu a) ihned po přípravě, b) po 3 měsících skladování při 4 °C



Obrázek 27: Vzorky poloxamerů s obsahem kurkuminu a) ihned po přípravě, b) po 3 měsících skladování při 4 °C

#### 8.4 Stanovení zeta potenciálu

Každá částice je na povrchu obklopena tzv. elektrickou dvojrůstvou, která je tvořena vnější a vnitřní částí. Zeta potenciál je měřítkem velikosti elektrostatického náboje mezi částicemi, pomocí kterého lze posuzovat úroveň stability disperzních soustav. Je známo, že pokud se potenciál pohybuje v dostatečně kladných ( $> +30$  mV) či záporných ( $< -30$  mV) hodnotách, lze soustavu považovat za elektrostaticky stabilní [30], [31], [73].

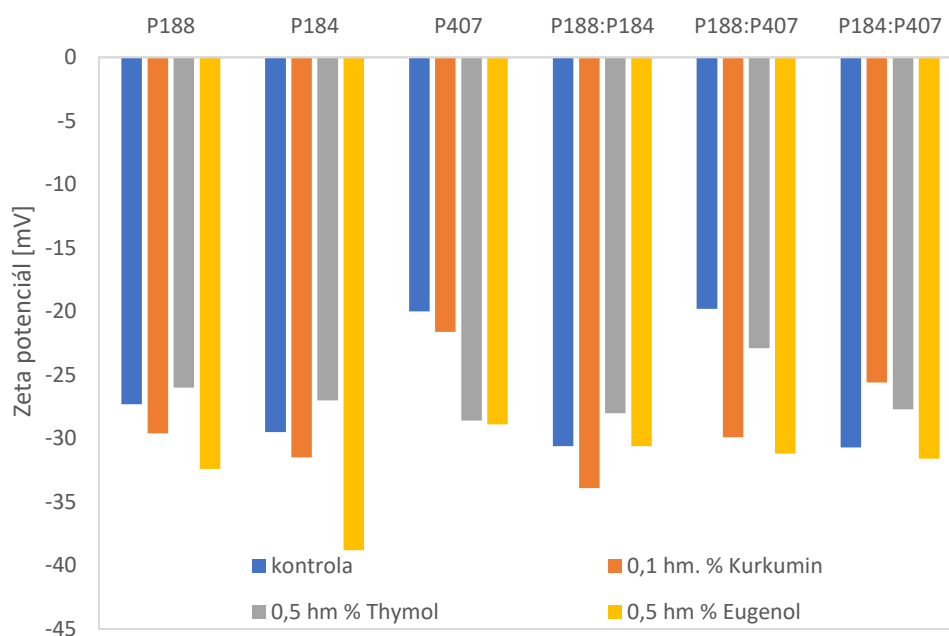
Hodnoty kontrolních vzorků bez aktivních látek se pohybovaly od  $-20$  do  $-30$  mV (Obr. 28). Tento rozsah se nijak významně nezměnil ani po enkapsulaci aktivních látek. Z dosažených výsledků nelze s jistotou určit primární vliv na náboj systému.

Měřením vzorků samotných aktivních látek byly zjištěny hodnoty zeta potenciálu pro thymol  $-25,7$  mV, eugenol  $-15,6$  mV a kurkumin  $+10,4$  mV. Z těchto dat se zdá, že primární vliv neměly použité fenolické sloučeniny, ale nosný poloxamer nebo jeho kombinace, což by znamenalo, že došlo k efektivní enkapsulaci lyofilní aktivní látky do jádra agregátu. Hodnoty pH jednotlivých roztoků, se pohybovaly od 4,5 do 6,5 v závislosti na přidané aktivní látce. Průměrná hodnota pH roztoků byla s obsahem thymolu 6,48, eugenolu 5,52 a kurkuminu 5,54.

Ve studii Gong a kol. [74] byl prokázán vliv pH na stabilitu připravených kurkuminových niozomů, které byly připraveny metodou hydratace tenkého filmu za použití tenzidů Tween 60 / Span 60 v poměru 1:1 s přísadkou dicetylfosfátu a cholesterolu. Bylo zjištěno, že při pH 3 a 7 byly připraveny sférické niozomy, zatímco při pH 7 byly výsledkem

nepravidelné agregáty. Zeta potenciál připravených niozomů se v závislosti na pH pohyboval od  $-14$  do  $-30$  mV. Nejvyšší enkapsulační účinnost kurkuminu (75 %) byla zaznamenána v kyselém prostředí (pH 3).

Pluronic (127) a polyethylenglykol-distearoylfosfatidylethanolamin (PEG-DSPE) byly studovány jako potenciální nosiče léčiv v práci Sezgin a kol. [22]. Hodnoty zeta potenciálu těchto dvou typů micelárních agregátů se pohybovaly v rozmezí od  $-3$  do  $-13$  mV, respektive od  $-11$  do  $-34$  mV. Formulace na bázi PEG-DSPE prokázaly, s ohledem na významněji záporné hodnoty zeta potenciálu, vyšší stabilitu vůči agregaci v porovnání s micelami typu Pluronic. Na druhou stranu, u poloxamerních micel byla pozorována lepší dlouhodobá stabilita.



Obrázek 28: Zeta potenciál a pH jednotlivých poloxamerů a jejich směsí s aktivními látkami

## 8.5 Stanovení antibakteriální účinnosti

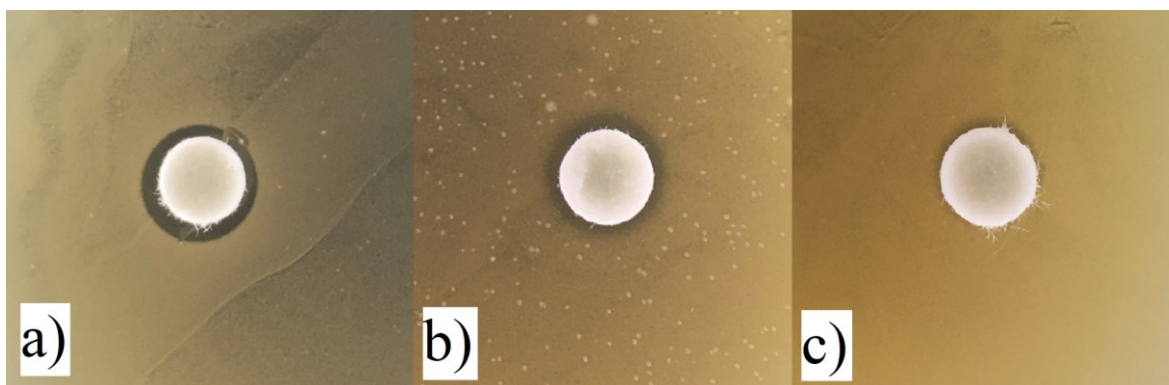
Stanovení antibakteriální účinnosti vůči vybraným mikroorganismům *Escherichia coli* (EC) a *Staphylococcus aureus* (SA) bylo provedeno pomocí diskové difúzní metody popsané v kapitole 7.7. Cílem této metody bylo porovnat účinek aktivních látek volných a inkorporovaných do poloxamerních nosičů, a nepřímou tak ověřit účinnost enkapsulačního procesu.

Na základě výsledků lze konstatovat, že antibakteriální účinek byl pozorován pouze u vzorků s obsahem thymolu (0,5 %hm.). Vyšší aktivita byla zaznamenána vůči gram

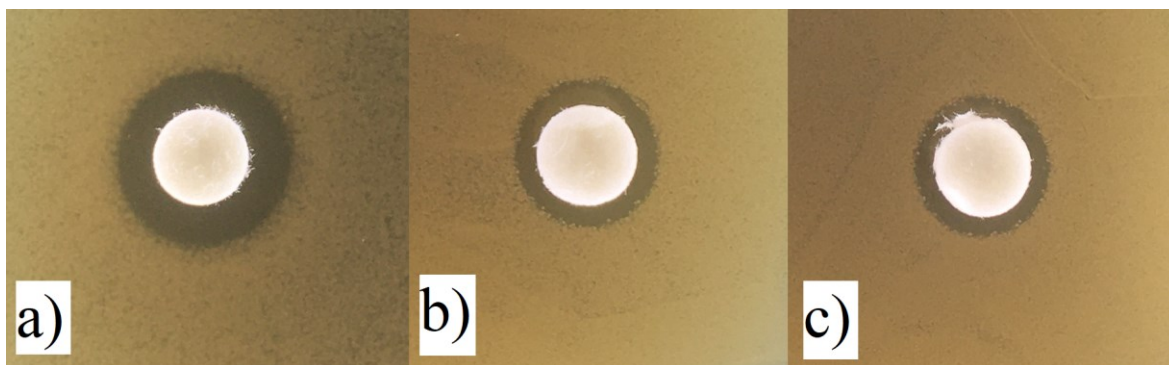
negativní bakterii *Escherichia coli*, gram pozitivní *Staphylococcus aureus* prokázal v tomto testu nižší citlivost. Z Tabulky 7 a Obr. 29 a 30 lze vidět, že vyšší účinek byl prokázán u volného thymolu (inhibiční zóna 10 mm vůči *E. coli* a 9 mm vůči *S. aureus*), na druhou stranu, u thymolu enkapsulovaného do poloxamerní částice došlo, dle předpokladu, ke zpomalení jeho difúze do prostředí. U ostatních testovaných vzorků nebyly pozorovány inhibiční zóny, tudíž nevykazovaly žádný antibakteriální účinek.

Tabulka 7: Hodnoty inhibičních zón vzorků s aktivní látkou thymol

Vzorek	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Inhibiční zóna [mm]	Inhibiční zóna [mm]
0,5 % thymol	10	9
P188	8,5	7
P184	7,5	6,5
P407	9	7
P188:P184	7	6,5
P188:P407	5,5	8
P184:P407	7,5	7



Obrázek 29: Antibakteriální aktivita thymolu a) volného, b) enkapsulovaného v P188:P407, c) P188 vůči *S. aureus*

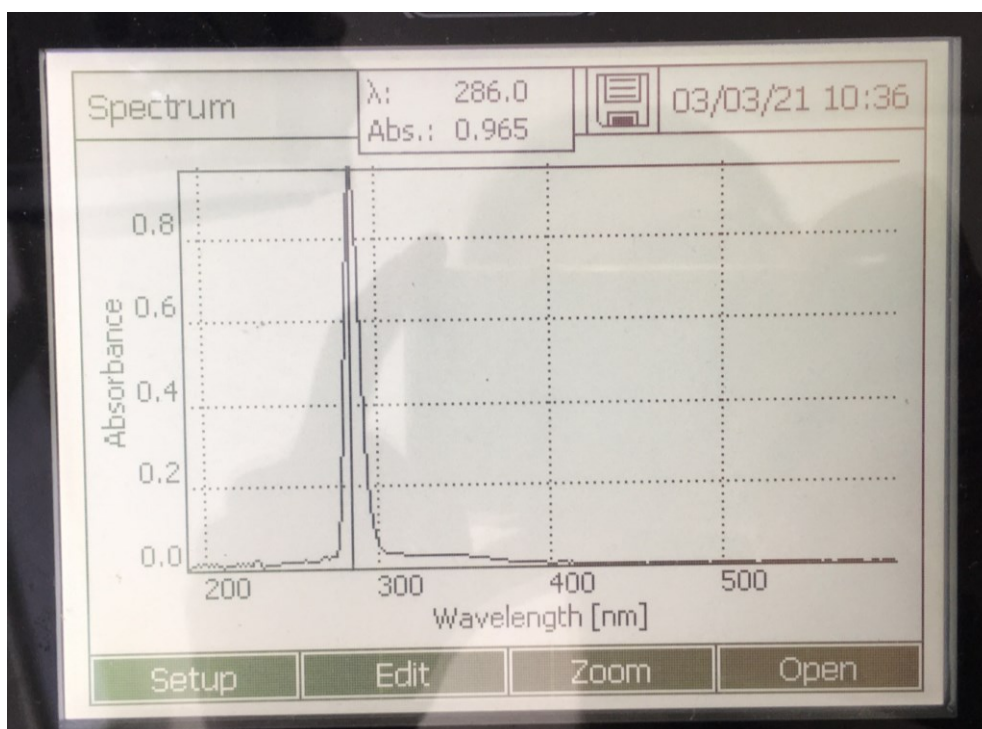


Obrázek 30: Antibakteriální aktivita thymolu a) volného, b) enkapsulovaného v P188:P407, c) P188 vůči *E. coli*

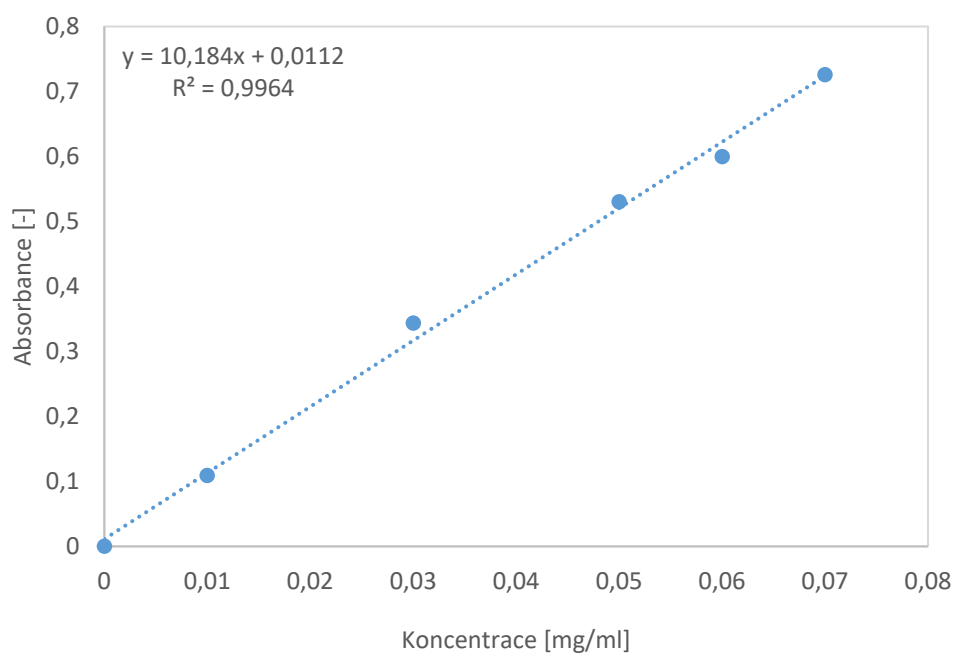
Velké množství studií prokázalo, že gram pozitivní bakterie jsou citlivější vůči působení esenciálních olejů, resp. jejich složek. Předpokládaným důvodem nižší citlivosti gram negativních mikroorganismů je složení jejich vnější lipopolysacharidové membrány, která obklopuje buněčnou stěnu a brání difúzi hydrofobních složek. Tento trend se ovšem v našem testu nepotvrdil. Důvodem může být fakt, že thymol je schopen narušit vnější membránu, v důsledku čehož dojde k nárůstu permeability [75].

## 8.6 Test uvolňování aktivní látky

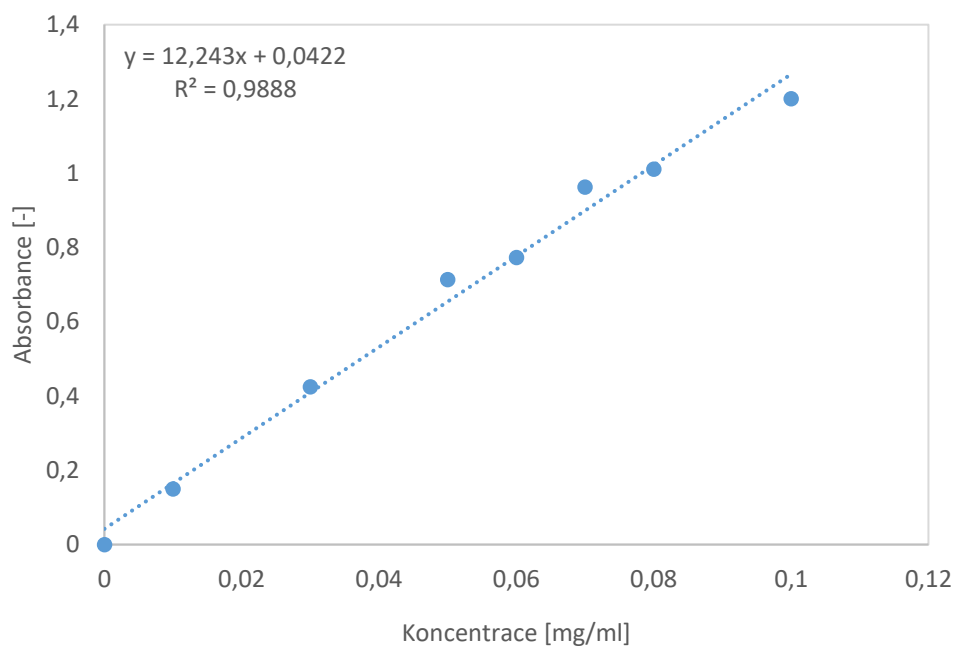
Test uvolňování aktivních látek z poloxamerních nosičů byl prováděn dialyzační metodou *in vitro* v prostředí PBS pufru s přidavkem Tweenu 80 (0,5 %hm.) pro zajištění lepší rozpustnosti (kapitola 7.4). Koncentrace aktivních látek byla stanovena spektrofotometricky metodou UV-Vis. Nejprve byla stanovena maximální vlnová délka pro každou aktivní látku (pro eugenol na Obr. 31) a poté byla provedena kalibrace. Kalibrační přímky pro všechny tři aktivní látky, včetně rovnic lineární regrese, jsou znázorněny na Obr. 32 až 34.



Obrázek 31: Stanovení maximální vlnové délky (eugenol)

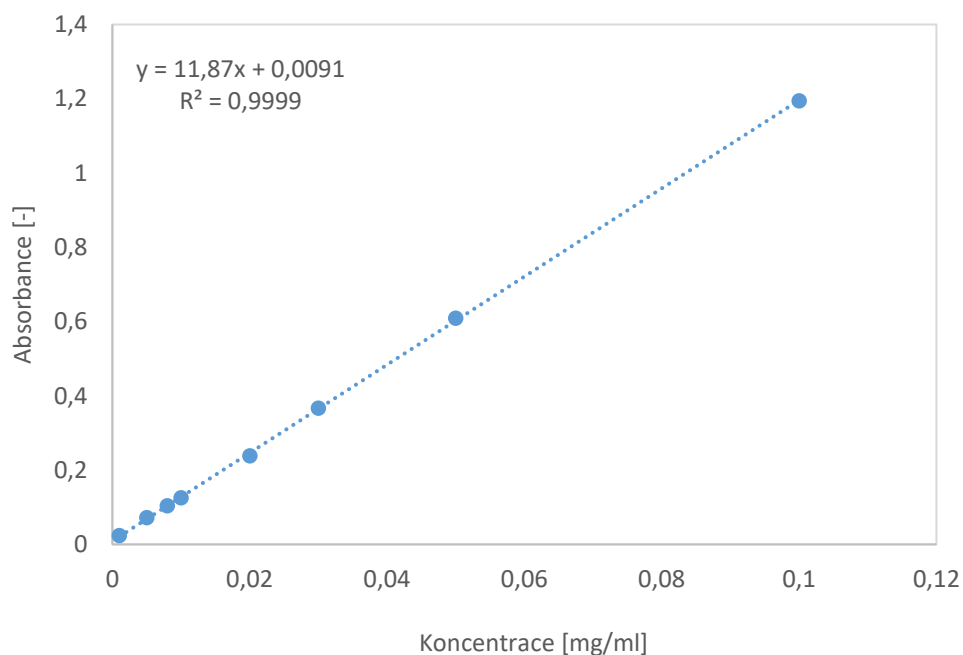


Obrázek 32: Kalibrační přímka pro thymol (měřeno při 283 nm)



Obrázek 33: Kalibrační přímka pro eugenol (měřeno při 286 nm)



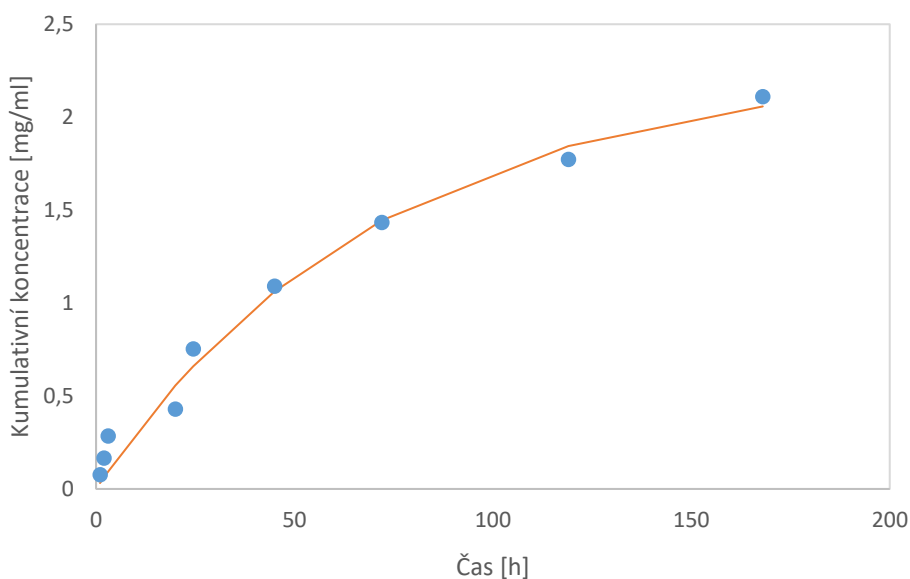


Obrázek 34: Kalibrační přímka pro kurkumin (měřeno při 424 nm)

Data kumulativních koncentrací uvolněných aktivních látek v závislosti na čase byla hodnocena pomocí kinetiky prvního řádu (Rovnice 16) a regrese byla zpracována metodou nejmenších čtverců s použitím subprogramu Řešitel v Microsoft Excel 2016. Příklad proložení závislosti kumulativního množství thymolu na čase je znázorněn na Obr. 35.

$$C_{REL} = C_{MAX} \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (16)$$

Kde  $C_{REL}$  je experimentální koncentrace aktivní látky, která byla uvolněna v čase  $t$ ,  $C_{MAX}$  je maximální teoretická koncentrace aktivní látky a  $k$  představuje rychlostní konstantu, tj. čas potřebný k dosažení  $C_{MAX}$  [76]. Konstanty stanovené pomocí uvedené rovnice pro jednotlivé poloxamery a jejich kombinace jsou shrnuty v Tab. 8 až 10.



Obrázek 35: Závislost kumulativní koncentrace uvolněného thymolu ze systému P184:P407 na čase. Spojnice představuje fitovaný model dle rovnice 1. řádu.

Z Tab. 8 je patrné, že v případě vzorků s obsahem thymolu maximální koncentrace  $C_{MAX}$  dosahovaly hodnot od 2,2 do 3,1 mg/ml. Rychlostní konstanty byly v případě jednotlivých poloxamerů v rozmezí 26 až  $35 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , zatímco u kombinací došlo k mírnému poklesu rychlosti uvolňování (konstanty v rozmezí 27 až  $29 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ). Tato data jsou v souladu s grafem na Obr. 36, z něhož vyplývá, že během sledované doby (200 hodin) došlo k maximálnímu uvolnění thymolu (28 %hm.) z poloxameru P188. Na druhou stranu, nejnižší uvolněné množství thymolu bylo zaznamenáno u směsi P184:P407 (necelých 20 %hm.). Je zřejmé, že v případě aktivní látky thymol došlo k mírnému zpomalení kinetiky uvolňování ze směsných micel v porovnání s agregáty tvořenými jednotlivými poloxamery.

V Tabulce 9 jsou znázorněny výsledky vzorků eugenolu s hodnotami  $C_{MAX}$  v rozmezí od 6,4 do 7,9 mg/ml. Rychlostní konstanty se v případě jednotlivých poloxamerů pohybovaly okolo  $24 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , tedy výše než u směsi poloxamerů ( $19,81$  až  $22,11 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ), s výjimkou vzorku P407. Došlo tedy k podobnému trendu mírného zpomalení kinetiky v případě směsných micel, podobně jako u vzorků s thymolem. Z Obr. 37 vyplývá, že během sledované doby došlo k maximálnímu uvolnění eugenolu (78 %hm.) z částic na bázi poloxameru P188.

U vzorků s obsahem kurkuminu (Tab. 10) se hodnoty  $C_{MAX}$  pohybují v rozsahu od 460 mg/ml (vzorek P188:P407) do 7600 mg/ml (vzorek P188). Na rozdíl od předchozích

dvou typů aktivních látek zde nedošlo k poklesu rychlosti dosažení  $C_{MAX}$  v případě směsných micel v porovnání s agregáty tvořenými jednotlivými poloxamery.

Tabulka 8: *Konstanty rovnice (16) získané fitováním kinetickým modelem 1. řádu popisující uvolňování thymolu*

Thymol	$C_{MAX}$ [mg/ml]	$-k \cdot 10^{-3}$ [1/h]	$r^2$
<b>P184</b>	2,62	25,56	0,98
<b>P188</b>	3,06	32,61	0,98
<b>P407</b>	2,83	34,76	0,98
<b>P188:P184</b>	2,24	26,44	0,99
<b>P188:P407</b>	2,62	29,78	0,98
<b>P184:P407</b>	2,43	27,72	0,99

Tabulka 9: *Konstanty rovnice (16) získané fitováním kinetickým modelem 1. řádu popisující kinetiku uvolňování eugenolu*

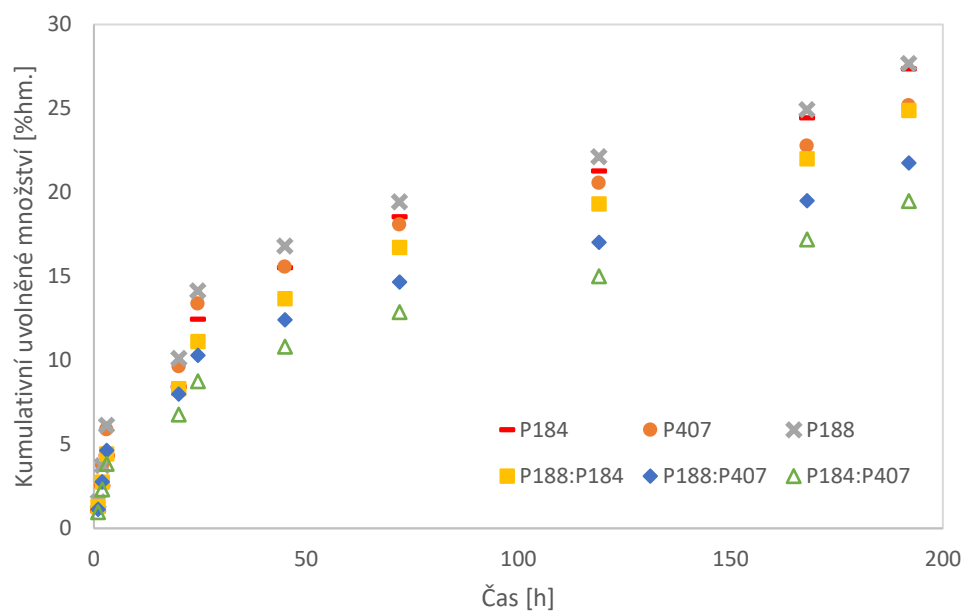
Eugenol	$C_{MAX}$ [mg/ml]	$-k \cdot 10^{-3}$ [1/h]	$r^2$
<b>P184</b>	6,37	23,45	0,97
<b>P188</b>	7,66	23,68	0,98
<b>P407</b>	7,23	18,94	0,98
<b>P188:P184</b>	7,86	19,81	0,99
<b>P188:P407</b>	7,77	22,11	0,98
<b>P184:P407</b>	7,69	20,41	0,98

Tabulka 10: Konstanty rovnice (16) získané fitováním kinetickým modelem 1. řádu popisující kinetiku uvolňování kurkuminu

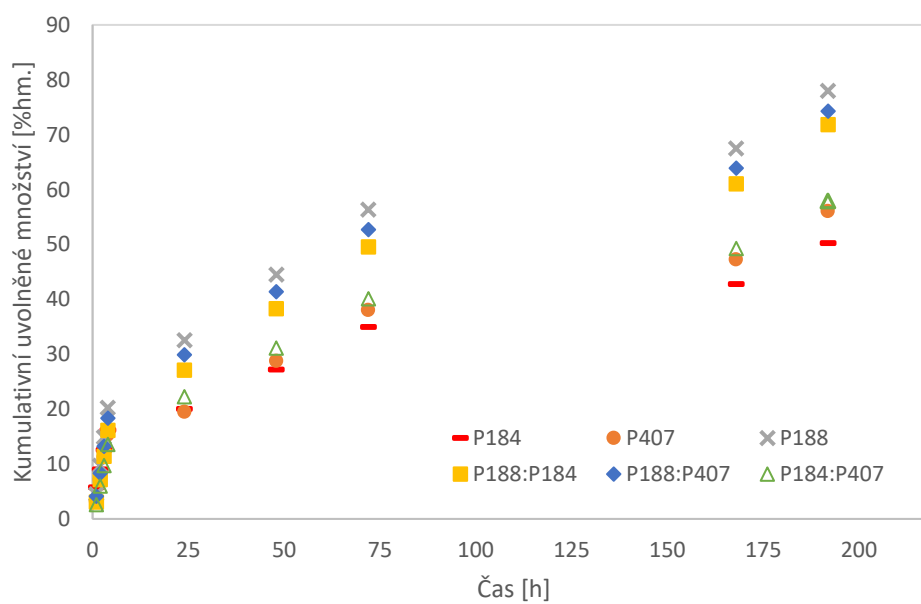
<b>Kurkumin</b>	<b>C<sub>MAX</sub> [mg/ml]</b>	<b>-k · 10<sup>-5</sup> [1/h]</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
<b>P184</b>	3936,13	0,14	0,99
<b>P188</b>	7594,28	0,08	0,98
<b>P407</b>	2639,53	0,14	0,97
<b>P188:P184</b>	5462,33	0,17	0,99
<b>P188:P407</b>	466,88	0,91	0,97
<b>P184:P407</b>	3697,55	0,15	0,98

Výše uvedené rozdíly v chování tří testovaných fenolických sloučenin lze potvrdit i prostřednictvím závislosti kumulativních koncentrací aktivních látek uvolněných ze systémů poloxamerů do PBS pufru na čase (Obr. 36 až 38). Z grafů na Obr. 36 a 37 je zřejmé, že v případě aktivních látek thymolu i eugenolu byl získán podobný trend křivky uvolňování, kdy v počáteční fázi (během prvních 24 hodin) bylo pozorováno rychlejší uvolnění (tendence k tzv. „burst efektu“), následované zpomalením procesu během dalších hodin testu. Ovšem v případě thymolu byla maximální zaznamenaná koncentrace necelých 30 %hm. z původního teoretického množství, zatímco u vzorků s eugenolem činila max. koncentrace téměř 80 % (po cca 200 hodinách).

Podobný trend, tedy rychlejší uvolnění aktivní látky v počáteční fázi, po níž následovalo zpomalení procesu, byl sledován autory Sotoudegan a kol. [68], kteří připravili polymerní micely na bázi Pluronic P85, F127 a F68 s enkapsulovaným léčivem nimodipinem. Nejvíce uvolněné látky bylo detekováno z částic na bázi poloxameru F68, což odpovídá našemu vzorku P188. Ovšem na rozdíl od našich vzorků, byla kinetika uvolňování rychlejší (již po 10 hodinách bylo uvolněno 100 % nimodipinu z agregátů F68). Bylo navíc zjištěno, že rychlost uvolňování léčiva z micel nepřímo koreluje s koncentrací polymeru, s jeho molekulovou hmotností a HLB hodnotou. Největší množství uvolněného léčiva bylo sledováno u systémů tvořených poloxamerem s nejvyšší hydrofilitou.



Obrázek 36: Závislost uvolněného množství thymolu na čase



Obrázek 37: Závislost uvolněného množství eugenolu na čase



Obrázek 38: Závislost uvolněného množství kurkuminu na čase

Z grafu závislosti kumulativního množství uvolněného kurkuminu (Obr. 38) je patrné, že křivka vykazovala dvě části. Během prvních 50 hodin došlo k postupnému ustálení uvolněného množství kurkuminu, které se pohybovalo pouze v jednotkách %hm. (viz detail na vnitřním grafu, Obr. 38). Následně, ale došlo k významnému nárůstu detekované koncentrace kurkuminu, přičemž závislost se zjevně neustálila ani po max. době sledování (215 hodin). Je známo, že mechanismus uvolňování aktivních látek z polymerních nosičů může probíhat různými způsoby, jako je difúze, nebo deformace/roztahování nosného polymerního materiálu. Vzhledem k faktu, že zmíněný trend byl zaznamenán u všech typů poloxamerních částic, je možné, že po uvedené první fázi došlo právě k zásadnější deformaci ve struktuře agregátů, která umožnila uvolnění většího množství kurkuminu do prostředí. Na rozdíl od vzorků s thymolem zde nelze potvrdit trend pomalejšího uvolnění aktivní látky ze směsných micel, v porovnání s agregáty jednoduchými.

V práci [77] byla studována kinetika uvolňování kurkuminu ze směsných micel na bázi Pluronic P123 a Pluronic F68, připravených pomocí metody hydratace tenkého filmu. Test uvolňování probíhal dialyzační metodou do média tvořeného 20 % roztokem dodecylsulfátu sodného (SDS). Po 72 hodinách bylo uvolněno okolo 50 % z původně inkorporovaného množství aktivní látky. Toto množství bylo u našich vzorků detekováno až okolo 120, resp.

215 hodin, v závislosti na konkrétním typu poloxamerního nosiče. Lze tedy konstatovat, že připravené poloxamerní agregáty prokázaly potenciál k přípravě nosičů aktivních látek s postupným uvolňováním.

Kombinace kopolymerního tenzidu a poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu) byla studována v práci Kim a kol. [78], kde sledovali kinetiku uvolnění léčiva indomethacinu do fosfátového pufru. Uvolňování léčiva bylo zkoumáno dialyzační metodou *in vitro*. Zatímco v případě volného neenkapsulovaného léčiva došlo k jeho rychlému uvolňování (více než 97 % během 36 hodin), indomethacin inkorporovaný do zmíněného nosiče byl uvolňován postupně (méně než 30 % během 100 hodin). Také byl prokázán významný vliv teploty, kdy s jejím zvýšením došlo ke zmenšení velikosti částic a dalšímu snížení uvolněného množství léčiva do média.

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla příprava poloxamerních částic bez a s obsahem aktivních látek thymolu, eugenolu a kurkuminu. Kromě fyzikálně-chemických vlastností, pomocí měření povrchového napětí, velikosti částic, pH a zeta potenciálu, také byla sledována kinetika uvolňování vybraných aktivních fenolických sloučenin.

V první části práce byly charakterizovány micelizační parametry připravených kombinací poloxamerů pomocí tenziometrického měření. Stanovené hodnoty kritických micelárních koncentrací při 25 °C ( $CMC_{P188:P184} = 0,02$  mM,  $CMC_{P188:P407} = 0,01$  mM,  $CMC_{P184:P407} = 0,01$  mM) prokázaly pozitivní efekt kombinací poloxamerů. Příznivý vliv připravených směsných micel lze vyhodnotit i z dalších micelárních parametrů, jako jsou hodnoty adsorpce na rozhraní plochy, kterou na rozhraní zaujímá jedna molekula povrchově aktivní látky a také Gibbsovy micelizační energie, která byla ve všech případech významně záporná (v rozmezí od -6400 do -8000 kJ/mol).

Měření velikosti částic bylo provedeno ihned po přípravě vzorků a po 3 měsících skladování při 4 °C. Z naměřených dat bylo zřejmé, že v případě systémů bez aktivních látek byly menší částice pozorovány u kombinací poloxamerů, s výjimkou P407, který obsahoval částice v průměru okolo 80 nm. Obecně nejmenší částice byly zaznamenány u směsi P188:407 s obsahem thymolu, naopak největší (přes 900 nm) u vzorku P188 s kurkuminem. Co se týká distribuce velikostí, ve většině případů došlo v důsledku enkapsulace aktivních látek do poloxamerních částic ke změně charakteru systému z multi na monomodální. Po uplynutí doby skladování u většiny vzorků došlo ke zvětšení velikosti částic bez ohledu na fakt, zda se jednalo o prázdné micely, nebo částice s obsahem aktivních látek. V rámci posouzení stability bylo provedeno i vizuální hodnocení vzorků, které prokázalo vyšší stabilitu systémů s obsahem aktivní látky thymol a eugenol v porovnání s částicemi s inkorporovaným kurkuminem.

Měření zeta potenciálu byly získány záporné hodnoty, a to bez ohledu na to, zda se jednalo o poloxamerní částice bez či s přítomností aktivních látek.

Podstatnou část diplomové práce představovala studie kinetiky uvolňování aktivních látek, která byla prováděna dialyzační metodou v prostředí fosfátového pufru. Data byla zpracována pomocí modelu dle rovnice 1. řádu. Výsledky ukázaly odlišné profily uvolňování, stejně jako maximální kumulativní množství v závislosti na vybrané aktivní sloučenině. V případě směsných micel s obsahem thymolu a eugenolu došlo ke snížení



rychlosti kinetiky uvolňování, v porovnání s agregáty tvořenými jednotlivými poloxamery. Tento trend nebyl potvrzen u vzorků s kurkuminem. Navíc byly na křivce závislosti kumulativní koncentrace na čase pozorovány dvě fáze, kdy během prvních dvou dní došlo k uvolnění pouze nepatrného množství kurkuminu s následným ustálením. Následně byl ovšem zaznamenán významný nárůst koncentrace aktivní látky, který se neustálil ani po 215 hodinách. Lze předpokládat, že po zmíněné době (cca 50 hodin) mohlo dojít k zásadnější deformaci nosného polymerního materiálu, což vedlo k uvolnění většího množství kurkuminu do prostředí. Účinnost enkapsulace thymolu do micel poloxamerů byla potvrzena prostřednictvím doplňujícího experimentu v podobě diskové difuzní metody.

Závěrem lze shrnout, že byly připraveny a charakterizovány poloxamerní částice, které vykazují, v závislosti na charakteru použitého poloxameru nebo jejich směsí, dostatečnou fyzikální stabilitu. Připravené systémy by mohly být využity například v potravinářském, kosmetickém či farmaceutickém průmyslu za účelem řízeného transportu aktivních látek.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] COSTA, Raquel, Lúcia SANTOS, Stéphane FONTANAY, et al. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technology*. 2017, 322: 402-416. [cit. 2020-11-03] DOI:10.1016/j.powtec.2017.07.086. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591017306320>
- [2] Anwekar, Himanshu & Patel, Sita & Singhai, A. (2011). Liposome-as Drug Carriers. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*. 2. s. 945-951 [cit. 2020-11-03]. ISSN 0976 - 7126
- [3] LUO, Mukang, Ruifen ZHANG, Lei LIU, et al. Preparation, stability and antioxidant capacity of nano liposomes loaded with procyanidins from lychee pericarp. *Journal of Food Engineering* [online]. 2020, s. 284 [cit. 2020-11-03]. ISSN 0260 - 8774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110065
- [4] MAJA, Leitgeb, Knez ŽELJKO a Primožič MATEJA. Sustainable technologies for liposome preparation. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2020, s. 165 [cit. 2020-11-03]. ISSN 08968446. Dostupné z: doi:10.1016/j.supflu.2020.104984
- [5] Shashi, Kant & Satinder, Kumar & Parashar, Bharat. (2012). A complete review on: Liposomes. *International Research Journal of Pharmacy*, s. 12 [cit. 2020-11-03]. ISSN 2230 – 8407
- [6] RATHEE, Jyoti, Rohini KANWAR, Deepender KAUSHIK, Deepak B SALUNKE a Surinder K MEHTA. Niosomes as efficient drug delivery modules for encapsulation of Toll-like receptor 7 agonists and IDO-inhibitor. *Applied Surface Science* [online]. 2020, 505 [cit. 2020-11-03]. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2019.144078
- [7] MARIANECCI, Carlotta, Luisa DI MARZIO, Federica RINALDI, Christian CELIA, Donatella PAOLINO, Franco ALHAIQUE, Sara ESPOSITO a Maria CARAFA. Niosomes from 80s to present: The state of the art. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2014, 205, 187-206 [cit. 2020-11-03]. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2013.11.018

- [8] Prasureya, Jyoti & Prasureya, Sarmah & Kalita, Bhupen & Sharma, Anil. Transfersomes based transdermal drug delivery: An overview. Review Article. [online]. (2014), [cit. 2020-11-04]. ISSN: 2230 – 7583. Dostupné z: researchgate.net
- [9] OPATHA, Shakthi Apsara Thejani, Varin TITAPIWATANAKUN a Romchat CHUTOPRAPAT. Transfersomes: A Promising Nanoencapsulation Technique for Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutics* [online]. 2020, 12(9), s. 7-8 [cit. 2020-11-04]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12090855
- [10] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana. *Chemie a technologie tenzidů II*. Fakulta technologická - Nám. T. G. Masaryka 275, 760 01 Zlín. cz.1.07/2.2.00/28.0132. Učební text. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [11] EGNER P. 2018 Přednášky z předmětu Kosmetické výroby, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická
- [12] BENITA, Simon. *Microencapsulation: methods and industrial applications*. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, 2006. ISBN 978-0-8247-2317-0.
- [13] FANUN, Monzer. *Microemulsions: properties and applications*. Boca Raton: CRC Press, c2009. Surfactant science series, v. 144. ISBN 1420089595.
- [14] PATRAVALE, V. B.; MANDAWGADE, S. D. Novel cosmetic delivery systems: an application update. *International journal of cosmetic science*, 2008, 30.1: 19- 33. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1468-2494.2008.00416.x
- [15] ZHANG, Ruojie, Zipei ZHANG a David Julian MCCLEMENTS. Nanoemulsions: An emerging platform for increasing the efficacy of nutraceuticals in foods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2020, **194** [cit. 2020-11-10]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111202
- [16] SCHUENCK-RODRIGUES, Raphaela Aparecida, Luciana Betzler DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA, Ana Paula DOS SANTOS MATOS, et al. Development, characterization and photobiological activity of nanoemulsion containing zinc phthalocyanine for oral infections treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2020, **211** [cit. 2020-11-10]. ISSN 10111344. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.112010

- [17] MEHNERT, Wolfgang a Karsten MÄDER. Solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**, 83-101 [cit. 2020-11-10]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2012.09.021
- [18] MISHRA, Vijay, Kuldeep BANSAL, Asit VERMA, Nishika YADAV, Sourav THAKUR, Kalvatala SUDHAKAR a Jessica ROSENHOLM. Solid Lipid Nanoparticles: Emerging Colloidal Nano Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, **10**(4) [cit. 2020-11-10]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10040191
- [19] SALVI, Vedanti R. a Pravin PAWAR. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2019, **51**, 255-267 [cit. 2021-04-22]. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2019.02.017
- [20] RANGEL-YAGUI, Carlote O., Adalberto PESSOA-Jra a Leoberto Costa TAVARES. *Micellar solubilization of drugs* [online]. 2005 [cit. 2018-10-20]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/7635700\\_Micellar\\_solubilization\\_of\\_drugs](https://www.researchgate.net/publication/7635700_Micellar_solubilization_of_drugs).
- [21] KULTHE, Sushant S., Yogesh M. CHOUDHARI, Nazma N. INAMDAR a Vishnukant MOURYA. Polymeric micelles: authoritative aspects for drug delivery. *Designed Monomers and Polymers* [online]. 2012, **15**(5), 465-521 [cit. 2020-10-20]. ISSN 1568-5551. Dostupné z: doi:10.1080/1385772X.2012.688328
- [22] SEZGIN, Z. YÜKSEL N. a BAYKARA T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2006, **64**(3), 261-268 [cit. 2020-10-20]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2006.06.003
- [23] Micela. Vydavatelství VŠCHT Praha [online]. Dostupné z: [https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002\\_v1/hesla/micela.html](https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/micela.html)
- [24] *E-ChemBook* | *E-ChemBook* : Multimediální učebnice chemie [online]. Copyright ©2000 [cit. 27.10.2020]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/cz/biochemie/Lipidy.pdf>
- [25] NESMĚRÁK, Karel a Irena NĚMCOVÁ. Determination of Critical Micelle Concentration by Electrochemical Means. *Analytical Letters* [online]. 2006, **39**(6),

- 1023-1040 [cit. 2020-10-20]. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1080/00032710600620302
- [26] GODDARD, E. D. a Kavssery P. ANANTHAPADMANABHAN. Interactions of surfactants with polymers and proteins. Boca Raton: CRC Press, c1993. ISBN 08-493-6784-0.
- [27] MYERS, Drew. Surfactant science and technology. 3rd ed. Hoboken, N.J.: J. Wiley, c2006. ISBN 04-716-8024-9
- [28] ROSEN, Milton J. Surfactants and interfacial phenomena. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2004. ISBN 04-714-7818-0.
- [29] RAVAL, Nidhi, Rahul MAHESHWARI, Dnyaneshwar KALYANE, Susanne R. YOUNGREN-ORTIZ, Mahavir B. CHOUGULE a Rakesh K. TEKADE. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *Basic Fundamentals of Drug Delivery* [online]. Elsevier, 2019, 2019
- [30] *Malvern Panalytical* [online]. ©Copyright, 2020 [cit. 2020-10-21]. Dostupné z: www.malvernpanalytical.com
- [31] *Zetasizer Nano Series: User Manual* [online]. 2004 [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf)
- [32] What Are Amphipathic Molecules? Definition, Examples. *ThoughtCo.com is the World's Largest Education Resource* [online]. [cit. 27.10.2020] Dostupné z: <https://www.thoughtco.com/amphipathic-molecules-definition-4783279>
- [33] KRONBERG, Bengt, Krister HOLMBERG a Björn LINDMAN. *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2014 [cit. 2020-11-12]. ISBN 9781118695968. Dostupné z: doi:10.1002/9781118695968
- [34] MALMSTEN, Martin. *Surfactants and polymers in drug delivery*. New York: Marcel Dekker, c2002. ISBN 9780824708047.
- [35] KACAR, Gokhan. Thermodynamic stability of ibuprofen loaded poloxamer micelles. *Chemical Physics* [online]. 2020, 533 [cit. 2020-10-27]. ISSN 03010104. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphys.2020.110713

- [36] JHAVERI, Aditi M. a Vladimir P. TORCHILIN. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2014, **5** [cit. 2020-11-15]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2014.00077
- [37] BODRATTI, Andrew a Paschalis ALEXANDRIDIS. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*. 2018, **9**(1). DOI: 10.3390/jfb9010011. ISSN 2079-4983.
- [38] Kolliphor® P 188. BASF [online]. [cit. 2018-11-18]. Dostupné z: <https://pharmaceutical.basf.com/en/Drug-Formulation/Kolliphor-P188.html>
- [39] LEE, Chin-Fen, Hsueh-Wen TSENG, Pratap BAHADUR a Li-Jen CHEN. Synergistic Effect of Binary Mixed-Pluronic Systems on Temperature Dependent Self-assembly Process and Drug Solubility. *Polymers* [online]. 2018, **10**(1) [cit. 2020-11-18]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10010105
- [40] GIFFARD, Marion, Vanessa DELFOSSE, Giuliano SCIARA, Claudine MAYER, Christian CAMBILLAU, Mohamed EL HAJJI, Bertrand CASTRO a Françoise BONNETÉ. Surfactant Poloxamer 188 as a New Crystallizing Agent for Urate Oxidase. *Crystal Growth & Design* [online]. 2009, **9**(9), 4199-4206 [cit. 2020-11-18]. ISSN 1528-7483. Dostupné z: doi:10.1021/cg900473n
- [41] PASCHEN, Christoph A., Denis KLEMM, Tobias GRAF, Robert KOPF, Cosimo PINTO, Claudia MÜLLER, Christian H. BELL a Janina PFAFF. Simultaneous quantification of polysorbate 20 and poloxamer 188 in biopharmaceutical formulations using evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2021, **192** [cit. 2020-11-18]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2020.113640
- [42] Pluracare L/F Grades Poloxamer [online]. 2008 [cit. 2020-11-18]. Dostupné z: [http://www.rumapel.com.ar/cosmetica\\_miscelaneos/ficha\\_tecnica/Pluracare%20L-%20F%20Grades.pdf](http://www.rumapel.com.ar/cosmetica_miscelaneos/ficha_tecnica/Pluracare%20L-%20F%20Grades.pdf)
- [43] ALMEIDA, Mauro, Mariana MAGALHÃES, Francisco VEIGA a Ana FIGUEIRAS. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. *Journal of Polymer Research* [online]. 2018, **25**(1) [cit. 2020-11-18]. ISSN 1022-9760. Dostupné z: doi:10.1007/s10965-017-1426-x

- [44] POLOXAMER 184 - Cosmetic Ingredient (INCI). Cosmetics Ingredients Database | Online Raw Materials Search [online]. Copyright © SpecialChem 2020 [cit. 18.11.2020]. Dostupné z: <https://cosmetics.specialchem.com/inci/poloxamer-184>
- [45] DE SOUZA FERREIRA, Sabrina Barbosa, Gustavo BRAGA, Évelin Lemos de OLIVEIRA, Hélen Cássia ROSSETO, Noboru HIOKA, Wilker CAETANO a Marcos Luciano BRUSCHI. Colloidal systems composed of poloxamer 407, different acrylic acid derivatives and curcuminoids: Optimization of preparation method, type of bioadhesive polymer and storage conditions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2020, **57** [cit. 2020-11-18]. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2020.101686
- [46] BARUAH, Jubaraj Bikash. Chemistry of phenolic compounds: state of the art. New York: Nova Science Publishers, c2011. ISBN 978-1-61761-335-7.
- [47] PECHOVÁ, Martina. *Stanovení vybraných fenolických látek v ovoci* [online]. Hradec Králové, 2017 [cit. 2020-11-11]. Diplomová práce. Univerzita Karlova, farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.
- [48] TIMA, Singkome, Songyot ANUCHAPREEDA, Chadarat AMPASAVATE, Cory BERKLAND a Siriporn OKONOZI. Stable curcumin-loaded polymeric micellar formulation for enhancing cellular uptake and cytotoxicity to FLT3 overexpressing EoL-1 leukemic cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2017, **114**, 57-68 [cit. 2020-11-11]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2016.12.0
- [49] ZHANG, Song a In Ho KIM. Effect of quercetin (flavonoid) supplementation on growth performance, meat stability, and immunological response in broiler chickens. *Livestock Science* [online]. 2020, **242** [cit. 2020-11-11]. ISSN 18711413. Dostupné z: doi:10.1016/j.livsci.2020.10428632
- [50] HAO, Jianpeng, Bing GUO, Shaoxuan YU, Wentao ZHANG, Daohong ZHANG, Jianlong WANG a Yanru WANG. Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2017, **85**, 37-44 [cit. 2021-02-18]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2017.06.048

- [51] HUANG, Juan, Qiang WANG, Tong LI, Nan XIA a Qiang XIA. Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies. *Journal of Food Engineering* [online]. 2017, **215**, 1-12 [cit. 2021-02-18]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.07.002
- [52] SNOUSSI, Ahmed, Moncef CHOUAIBI, Nabiha BOUZOUITA a Salem HAMDI. Microencapsulation of catechin using water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions: Study of release kinetics, rheological, and thermodynamic properties. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2020, **311** [cit. 2020-11-11]. ISSN 01677322. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2020.113304
- [53] HONG, Sung-Chul, Kyung-Min PARK, Chi Rac HONG, et al. Microfluidic assembly of liposomes dual-loaded with catechin and curcumin for enhancing bioavailability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2020, **594** [cit. 2021-02-18]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.124670
- [54] ZHOU, Yilin, Riguo LAN, Yuanyuan XU, Yuanyuan ZHOU, Xinguang LIN a Jinfeng MIAO. Resveratrol alleviates oxidative stress caused by *Streptococcus uberis* infection via activating the Nrf2 signaling pathway. *International Immunopharmacology* [online]. 2020, **89** [cit. 2020-11-15]. ISSN 15675769. Dostupné z: doi:10.1016/j.intimp.2020.107076
- [55] DEHGHANI, Mohammad Amin, Nader SHAKIBA MARAM, Eskandar MOGHIMIPOUR, Layasadat KHORSANDI, Morteza ATEFI KHAH a Masoud MAHDAVINIA. Protective effect of gallic acid and gallic acid-loaded Eudragit-RS 100 nanoparticles on cisplatin-induced mitochondrial dysfunction and inflammation in rat kidney. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2020, 1866(12) [cit. 2020-11-11]. ISSN 09254439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2020.165911
- [56] IFLAZOGLU MUTLU, Seda, Ismail SEVEN, Gozde ARKALI, Nurgul BIRBEN, Aslihan SUR ARSLAN, Mesut AKSAKAL a Pinar TATLI SEVEN. Ellagic acid plays an important role in enhancing productive performance and alleviating oxidative stress, apoptosis in laying quail exposed to lead toxicity. *Ecotoxicology and*



- Environmental Safety* [online]. 2021, 208 [cit. 2020-11-15]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111608
- [57] KANIOVÁ, Lenka. *Analýza šťáv vybraných odrůd černého rybízu* [online]. Brno, 2015 [cit. 2020-11-11]. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická. Vedoucí práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [58] CLARKE, S. Families of compounds that occur in essential oils. *Essential Chemistry for Aromatherapy* [online]. Elsevier, 2008, 2008, s. 41-77 [cit. 2020-11-15]. ISBN 9780443104039. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-443-10403-9.00003-0
- [59] RASSU, G., M. NIEDDU, P. BOSI, et al. Encapsulation and modified-release of thymol from oral microparticles as adjuvant or substitute to current medications. *Phytomedicine* [online]. 2014, **21**(12), 1627-1632 [cit. 2021-02-19]. ISSN 09447113. Dostupné z: doi:10.1016/j.phymed.2014.07.017
- [60] ESCOBAR, Angélica, Miriam PÉREZ, Gustavo ROMANELLI a Guillermo BLUSTEIN. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2020 [cit. 2020-11-15]. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2020.11.009
- [61] MARCET, Ismael, Shihan WENG, Sara SÁEZ-ORVIZ, Manuel RENDUELES a Mario DÍAZ. Production and characterisation of biodegradable PLA nanoparticles loaded with thymol to improve its antimicrobial effect. *Journal of Food Engineering* [online]. 2018, **239**, 26-32 [cit. 2021-02-19]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2018.06.030
- [62] SELLAMUTHU, R. Eugenol. *Encyclopedia of Toxicology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 539-541 [cit. 2020-11-15]. ISBN 9780123864550.
- [63] GARG, A. a S. SINGH. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2011, **87**(2), 280-288 [cit. 2021-03-26]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2011.05.030
- [64] CASANOVA, Francisca a Lúcia SANTOS. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation*. 2015, **33**(1), 1-17. DOI: 10.3109/02652048.2015.1115900. ISSN 0265-2048.

- [65] SAHU, Abhishek, Naresh KASOJU, Pranab GOSWAMI a Utpal BORA. Encapsulation of Curcumin in Pluronic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Applications. *Journal of Biomaterials Applications* [online]. 2010, **25**(6), 619-639 [cit. 2021-02-17]. ISSN 0885-3282. Dostupné z: doi:10.1177/0885328209357110
- [66] VAIDYA, Foram U., Rakesh SHARMA, Sofiya SHAIKH, Debes RAY, Vinod K. ASWAL a Chandramani PATHAK. Pluronic micelles encapsulated curcumin manifests apoptotic cell death and inhibits pro-inflammatory cytokines in human breast adenocarcinoma cells. *Cancer Reports* [online]. 2019, **2**(1) [cit. 2021-02-17]. ISSN 25738348. Dostupné z: doi:10.1002/cnr2.1133
- [67] AKBAR, Muhammad Usman, Khalid Mahmood ZIA, Ahsan NAZIR, Jamshed IQBAL, Syeda Abida EJAZ a Muhammad Sajid Hamid AKASH. Pluronic-Based Mixed Polymeric Micelles Enhance the Therapeutic Potential of Curcumin. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2018, **19**(6), 2719-2739 [cit. 2021-02-17]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-018-1098-9
- [68] Sotoudegan F, Amini M, Faizi M, Aboofazeli R. Nimodipine-Loaded Pluronic® Block Copolymer Micelles: Preparation, Characterization, In-vitro and In-vivo Studies. *Iran J Pharm Res.* 2016;15(4):641-661.
- [69] PETŽELKOVÁ, Markéta. *Polymerní micely jako nosiče aktivních látek* [online]. Zlín 2020 2015 [cit. 2021-04-19]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická. Vedoucí práce Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D.
- [70] THURN, T., S. COUDERC, J. SIDHU, D. M. BLOOR, J. PENFOLD, J. F. HOLZWARTH a E. WYN-JONES. Study of Mixed Micelles and Interaction Parameters for ABA Triblock Copolymers of the Type EO<sub>m</sub>-PO<sub>n</sub>-EO<sub>m</sub> and Ionic Surfactants: Equilibrium and Structure. *Langmuir.* 2002, **18**(24), 9267-9275. DOI: 10.1021/la020629a. ISSN 0743-7463.
- [71] ĆIRIN, Dejan, Veljko KRSTONOŠIĆ a Mihalj POŠA. Properties of poloxamer 407 and polysorbate mixed micelles: Influence of polysorbate hydrophobic chain. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2017, **47**, 194-201 [cit. 2021-04-13]. ISSN 1226086X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiec.2016.11.032
- [72] PHUC LE, Thi Minh, Van Phuc PHAM, Thi Minh LUA DANG, Thi HUYEN LA, Thi Hanh LE a Quang Huan LE. Preparation of curcumin-loaded pluronic F127/chitosan nanoparticles for cancer therapy. *Advances in Natural Sciences:*

- Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2013, 4(2) [cit. 2021-5-10]. ISSN 2043-6262. Dostupné z: doi:10.1088/2043-6262/4/2/025001
- [73] CAMPBELL, Jos, Sean BURKITT, Natalie DONG a Cristina ZAVALA. Nanoparticle characterization techniques. *Nanoparticles for Biomedical Applications* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 129-144 [cit. 2021-04-15]. ISBN 9780128166628. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816662-8.00009-6
- [74] GONG, Wee Jie, Masrina Mohd NADZIR, Siti Farhana HISHAM a Saravanan Reddy KALIDAS. Size, Entrapment Efficiency and Stability of Curcumin Niosomes Prepared at Different pH Conditions. *Asian Journal of Scientific Research* [online]. 2019, 13(1), 23-28 [cit. 2021-04-18]. ISSN 19921454. Dostupné z: doi:10.3923/ajsr.2020.23.28
- [75] ULLOA, Pablo A., Abel GUARDA, Ximena VALENZUELA, Javiera F. RUBILAR a María J. GALOTTO. Modeling the release of antimicrobial agents (thymol and carvacrol) from two different encapsulation materials. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2017, 26(6), 1763-1772 [cit. 2021-5-7]. ISSN 1226-7708. Dostupné z: doi:10.1007/s10068-017-0226-8
- [76] MERCHAN, Martha, Jana SEDLARIKOVA, Vladimir SEDLARIK, Michal MACHOVSKY, Jitka SVOBODOVA a Petr SAHA. Antibacterial polyvinyl chloride/antibiotic films: The effect of solvent on morphology, antibacterial activity, and release kinetics. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2010, , n/a-n/a [cit. 2021-4-24]. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.32185
- [77] ZHAO, Liyan, Jianchao DU, Yuwei DUAN, Ya'ni ZANG, Huaisong ZHANG, Chunfen YANG, Fengliang CAO a Guangxi ZHAI. Curcumin loaded mixed micelles composed of Pluronic P123 and F68: Preparation, optimization and in vitro characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2012, 97, 101-108 [cit. 2021-04-19]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2012.04.017
- [78] KIM, So Yeon, Jung Chul HA a Young Moo LEE. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres. *Journal of Controlled Release* [online]. 2000, 65(3), 345-358 [cit. 2021-04-19]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(99)00207-2

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

SUV	Malé unilamelární vezikuly
LUV	Velké unilamelární vezikuly
MVL	Multilamelární vezikuly
MW	Multivezikulární vezikuly
O/V	Emulze typu ve vodě
V/O	Emulze voda v oleji
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
EIP	Inverzní bod emulze
PIT	Teplota fázové inverze
SLN	Pevné lipidové nanočástice
NLC	Nanostrukturované lipidové nosiče
CMC	Kritická micelární koncentrace
CPP	Kritický agregační parametr
DLS	Dynamic Light Scattering
PAL	Povrchově aktivní látka
resp.	Respektive
tzn.	To znamená
PEG	Poly(ethylenglykol)
EO	Ethylenoxidu
PEO	Poly(ethylenoxid)
PPO	Poly(propylenoxid)
PPG	Poly(propylenglykol)
CMT	Fixní koncentrace polymeru
LLC	Lyotropní tekuté krystaly
resp.	Respektive

---

PEG	Poly(ethylenglykol)
EO	Ethylenoxidu
PEO	Poly(ethylenoxid)
PPO	Poly(propylenoxid)
PPG	Poly(propylenglykol)
CMT	Fixní koncentrace polymeru
LLC	Lyotropní tekuté krystaly
tzv.	Tak zvaně
atd.	A tak dále
V/O/V	Emuze typu voda v oleji ve vodě
k.	Kyselina
EA	Kyselina elagová
HPMCP	Hydroxypropylmethylcelulósový ftalát
XRD	X-Ray Diffraction
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná
FT-IR	Infračervená
PEG-DSPE	Polyethylenglykol-distearoylfosfatidylethanolamin
EC	<i>Escherichia coli</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
MHA	Mueller Hinton Agar
Cur-PF	Kurkumin naplněný smíšenými micelami
SDS	Dodecylsulfát sodný
PCL	Pluronický/poly( $\epsilon$ -kaprolakton)
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline)

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: <i>Typy vezikul v závislosti na velikosti a lamelaritě [4]</i> .....	12
Obrázek 2: <i>Schéma struktury transferzomu [9]</i> .....	15
Obrázek 3: <i>Schéma mikroemulze [12]</i> .....	17
Obrázek 4: <i>Struktura pevné lipidové nanočástice s inkorporovaným léčivem [18]</i> .....	18
Obrázek 5: <i>Rozdíl mezi uspořádáním SLN a NLC nosiče [19]</i> .....	19
Obrázek 6: <i>Schéma klasické micely [23]</i> .....	20
Obrázek 7: <i>Schéma inverzní micely [24]</i> .....	20
Obrázek 8: <i>Metody pro stanovení CMC [10]</i> .....	21
Obrázek 9: <i>Schéma elektrické dvojvrstvy [31]</i> .....	24
Obrázek 10: <i>Struktura polymerní micely [36]</i> .....	27
Obrázek 11: <i>Obecná struktura poloxameru [42]</i> .....	31
Obrázek 12: <i>Tenziometr EasyDyne – Krüss</i> .....	45
Obrázek 13: <i>Spektrofotometr photoLab 6600 UV-VIS</i> .....	46
Obrázek 14: <i>Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci směsi poloxamerů P188:P407 při 25 °C</i> .....	48
Obrázek 15: <i>Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci směsi tenzidů při 25 °C</i> ..	49
Obrázek 16: <i>Velikost částic a polydisperzita jednotlivých poloxamerů s aktivní látkou thymol</i> .....	54
Obrázek 17: <i>Velikost částic a polydisperzita směsí poloxamerů s aktivní látkou thymol</i> ....	54
Obrázek 18: <i>Velikost částic a polydisperzita jednotlivých poloxamerů s aktivní látkou eugenol</i> .....	55
Obrázek 19: <i>Velikost částic a polydisperzita směsí poloxamerů s aktivní látkou eugenol</i> ..	55
Obrázek 20: <i>Velikost částic a polydisperzita jednotlivých poloxamerů s aktivní látkou kurkumin</i> .....	56
Obrázek 21: <i>Distribuční křivky velikosti částic P188 bez thymolu a P188 s 0,5 % enkapsulovaným thymolem</i> .....	56
Obrázek 22: <i>Distribuční křivky velikosti částic P184:P188 bez kurkuminu a P188:P184 s 0,1 % enkapsulovaným kurkuminem</i> .....	57
Obrázek 23: <i>Distribuční křivky velikosti částic P188 bez kurkuminu a P188 s 0,1 % enkapsulovaným kurkuminem</i> .....	57
Obrázek 24: <i>Vzorky poloxamerů bez aktivní látky a) ihned po přípravě, b) po 3 měsících skladování při 4 °C</i> .....	58
Obrázek 25: <i>Vzorky poloxamerů s obsahem thymolu a) ihned po přípravě, b) po 3 měsících skladování při 4 °C</i> .....	59
Obrázek 26: <i>Vzorky poloxamerů s obsahem eugenolu a) ihned po přípravě, b) po 3 měsících skladování při 4 °C</i> .....	59

Obrázek 27: Vzorky poloxamerů s obsahem kurkuminu a) ihned po přípravě, b) po 3 měsících skladování při 4 °C .....	60
Obrázek 28: Zeta potenciál a pH jednotlivých poloxamerů a jejich směsí s aktivními látkami .....	61
Obrázek 29: Antibakteriální aktivita thymolu a) volného, b) enkapsulovaného v P188:P407, c) P188 vůči <i>S. aureus</i> .....	62
Obrázek 30: Antibakteriální aktivita thymolu a) volného, b) enkapsulovaného v P188:P407, c) P188 vůči <i>E. coli</i> .....	62
Obrázek 31: Stanovení maximální vlnové délky (eugenol) .....	63
Obrázek 32: Kalibrační přímka pro thymol (měřeno při 283 nm) .....	64
Obrázek 33: Kalibrační přímka pro eugenol (měřeno při 286 nm) .....	64
Obrázek 34: Kalibrační přímka pro kurkumin (měřeno při 424 nm) .....	65
Obrázek 35: Závislost kumulativní koncentrace uvolněného thymolu ze systému P184:P407 na čase. Spojnice představuje fitovaný model dle rovnice 1. řádu. ....	66
Obrázek 36: Závislost uvolněného množství thymolu na čase .....	69
Obrázek 37: Závislost uvolněného množství eugenolu na čase .....	69
Obrázek 38: Závislost uvolněného množství kurkuminu na čase .....	70

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: <i>Srovnání nosných systémů</i> [8] .....	16
Tabulka 2: <i>Vlastnosti poloxameru 188</i> [43] .....	31
Tabulka 3: <i>Vlastnosti poloxameru 184</i> [43] .....	32
Tabulka 4: <i>Vlastnosti poloxameru 407</i> [43] .....	32
Tabulka 5 <i>Micelární parametry směsí tenzidů</i> .....	51
Tabulka 6: <i>Velikost částic a polydisperzita jednotlivých poloxamerů a jejich směsí</i> .....	52
Tabulka 7: <i>Hodnoty inhibičních zón vzorků s aktivní látkou thymol</i> .....	62
Tabulka 8: <i>Konstanty rovnice (16) získané fitováním kinetickým modelem 1. řádu popisující uvolňování thymolu</i> .....	67
Tabulka 9: <i>Konstanty rovnice (16) získané fitováním kinetickým modelem 1. řádu popisující kinetiku uvolňování eugenolu</i> .....	67
Tabulka 10: <i>Konstanty rovnice (16) získané fitováním kinetickým modelem 1. řádu popisující kinetiku uvolňování kurkuminu</i> .....	68