

Srovnání částicových stabilizátorů pro Pickeringovy emulze

Valeriia Usynina

Bakalářská práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Valeriia Usynina**
Osobní číslo: **T20425**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Srovnání částicových stabilizátorů pro Pickeringovy emulze**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Zpracujte literární rešerši na zadané téma.

Charakterizujte Pickeringovy emulze, jejich vlastnosti a využití v kosmetice a farmacii.

Dále charakterizujte částice vhodné pro stabilizaci Pickeringových emulzí, zaměřte se jak na anorganické a organické částice, tak na využití buněk pro stabilizaci emulzí.

II. Praktická část:

V praktické části se věnujte přípravě Pickeringových emulzí stabilizovaných různými typy částic, charakterizujte je dostupnými metodami.

Získané výsledky zpracujte, vlastnosti emulzí a stabilizátorů srovnajte, výsledky vhodně diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] AVEYARD, R., BINKS, B.P. and CLINT, J.H., 2003. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, **100**, pp. 503-546.
- [2] LAM, S., VELIKOV, K.P. and VELEV, O.D., 2014. Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **19**(5), pp. 490-500.
- [3] FIROOZMAND, H. and ROUSSEAU, D., 2016. Microbial cells as colloidal particles: Pickering oil-in-water emulsions stabilized by bacteria and yeast. *Food Research International*, **81**, pp. 66-73.
- [4] YANG, Y., FANG, Z., CHEN, X., ZHANG, W., XIE, Y., CHEN, Y., LIU, Z. and YUAN, W., 2017. An Overview of Pickering Emulsions: Solid-Particle Materials, Classification, Morphology, and Applications. *Frontiers in pharmacology*, **8**, pp. 287.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **1. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá srovnáním částicových stabilizátorů pro Pickeringovy emulze. Teoretická část je zaměřena na Pickeringovy emulze, konkrétně jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a použití. Tato část také poskytuje informace o různých typech částic, které mohou být použity ke stabilizaci. Praktická část je věnována charakterizaci částic vhodných pro stabilizaci emulzí pomocí stanovení velikosti částic a zeta-potenciálu. V této části jsou také popsány způsoby přípravy Pickeringových emulzí a jejich následná charakterizace vhodnými fyzikálně-chemickými metodami.

Klíčová slova: Pickeringovy emulze, nanokrystalická celulóza, oxid titaničitý, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus*, myší fibroblasty

ABSTRACT

The bachelor thesis covers the comparison of particle stabilizers for Pickering emulsions. The theoretical part is focused on Pickering emulsions, specifically their physicochemical properties and applications. This section also provides information about the different types of particles that could be used for stabilization. The practical part is devoted to the characterization of particles suitable for the stabilization of emulsions by determining the particle size and zeta-potential. This section also describes the preparation of Pickering emulsions and their further characterization by suitable physicochemical methods.

Keywords: Pickering emulsions, nanocrystalline cellulose, titanium dioxide, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus*, mouse fibroblasts

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Lucii Urbánkové, Ph.D. nejen za odborné vedení, připomínky, pomoc a ochotu při zpracování této práce, ale i za morální podporu, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. za poskytnutí a přípravu bakterií a Ing. Elišce Daňové za přípravu myších fibroblastů. Velké poděkování náleží také rodině a blízkým, kteří mě podporovali a věřili ve mě po celou dobu studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1 EMULZE.....	10
1.1 KLASIFIKACE EMULZÍ.....	10
1.2 STABILITA EMULZÍ A MECHANISMY JEJICH ROZPADU	11
1.3 STABILIZACE EMULZÍ	13
2 PICKERINGOVY EMULZE.....	14
2.1 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI PICKERINGOVÝCH EMULZÍ	14
2.2 VYUŽITÍ PICKERINGOVÝCH EMULZÍ	15
3 TYPY A VLASTNOSTI ČÁSTIC PRO PICKERINGOVY EMULZE.....	18
3.1 CELULÓZA.....	19
3.1.1 Zdroje celulózy.....	19
3.1.2 Typy částic celulózy.....	19
3.1.3 Emulze stabilizované nanokrystalickou celulózou	21
3.2 OXID TITANIČITÝ.....	22
3.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti oxidu titaničitého.....	22
3.2.2 Použití oxidu titaničitého	22
3.2.3 Toxicita oxidu titaničitého	23
3.2.4 Emulze stabilizované TiO ₂	24
3.3 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	25
3.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
3.3.2 Použití <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
3.3.3 Emulze stabilizované <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
3.4 <i>LACTOBACILLUS</i>	28
3.5 FIBROBLASTY NIH/3T3	29
4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	30
5 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	32
6 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....	33
6.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	33
6.2 CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY	34
7 POUŽITÉ METODY	35
7.1 PŘÍPRAVA STABILIZÁTORŮ	35
7.1.1 Příprava disperze nanokrystalické celulózy	35
7.1.2 Příprava disperze oxidu titaničitého.....	35
7.1.3 Příprava disperze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
7.1.4 Příprava disperze bakterií.....	36
7.1.5 Příprava disperze buněčné linie fibroblastů NIH/3T3	36

7.2	PŘÍPRAVA EMULZÍ	37
7.2.1	První fáze – vhodná homogenizační metoda	37
7.2.2	Druhá fáze – příprava emulzí	38
7.3	CHARAKTERIZACE STABILIZÁTORŮ A EMULZÍ	39
7.3.1	Měření zeta-potenciálu	39
7.3.2	Měření velikosti částic	40
7.3.3	Mikroskopie	40
7.3.3.1	Optická mikroskopie	40
7.3.3.2	Konfokální mikroskopie	41
7.3.4	Měření velikosti emulzních kapek	41
7.3.5	Index krémování	42
7.3.6	Vizuální pozorování	42
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
8.1	CHARAKTERIZACE STABILIZUJÍCÍCH ČÁSTIC	43
8.1.1	Velikost částic a zeta-potenciál	43
8.1.2	Mikroskopie	47
9	CHARAKTERIZACE EMULZÍ	50
9.1	PRVNÍ FÁZE – VOLBA PŘÍPRAVY EMULZÍ	50
9.2	DRUHÁ FÁZE – SROVNÁNÍ STABILIZACE EMULZÍ	51
9.2.1	Velikost emulzních kapek	51
9.2.2	Zeta-potenciál	54
9.2.3	Index krémování a vizuální pozorování emulzí	54
9.2.4	Mikroskopie	56
	ZÁVĚR	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	73
	SEZNAM OBRÁZKŮ	75
	SEZNAM TABULEK	76

ÚVOD

Emulze jsou důležitou součástí vědy a průmyslu, jako například farmaceutického, chemického nebo kosmetického. Jsou to disperze nejméně dvou navzájem nemísitelných kapalin, které je zapotřebí stabilizovat. Nejčastěji se jako stabilizátor používají povrchově aktivní látky, které snižují mezipovrchové napětí adsorpcí na fázové rozhraní, a tím přispívají ke stabilizaci emulze. Nicméně, kosmetický průmysl se snaží najít alternativní stabilizátory, které nebudou mít iritační potenciál jako povrchově aktivní látky, a budou šetrnější k pokožce. Mezi takové lze zařadit pevné částice, které jsou schopny se shromažďovat na rozhraní olejové a vodné fáze, a v důsledku toho poskytnout stabilní emulze. Stabilizace emulzí pevnými částicemi je známá již od roku 1907, ale v dnešní době zájem o daný typ emulze významně roste. Charakterizace částic pro stabilizaci Pickeringových emulzí je předmětem práce.

Tato práce se zaměřuje na částice jak organického (nanokrystalická celulóza), anorganického (TiO_2), tak biologického původu. Mezi poslední patří *Saccharomyces cerevisiae*, bakterie rodu *Lactobacillus* a myší fibroblasty.

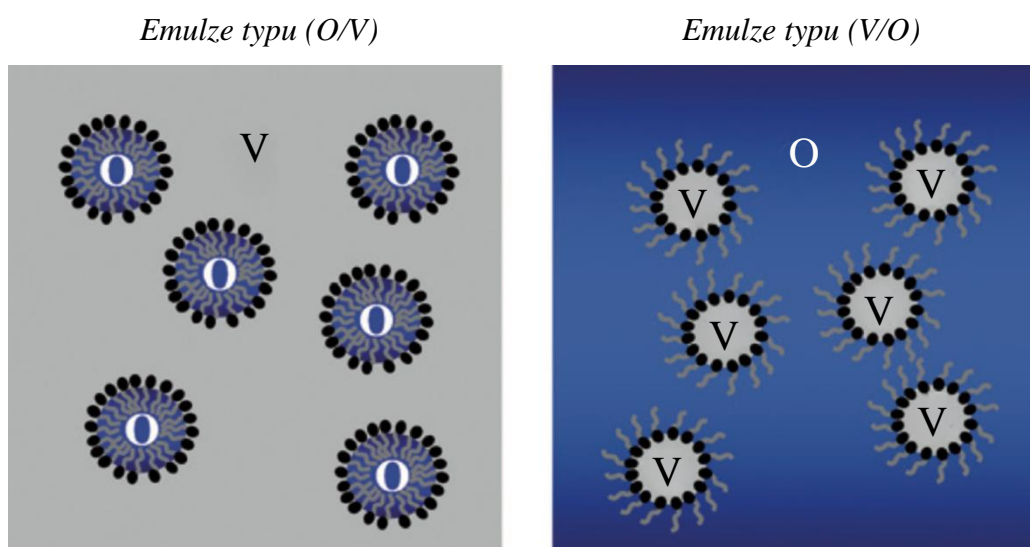
Saccharomyces cerevisiae je nejvíce studovanou jednobuněčnou houbou. Buňky *S. cerevisiae* jsou schopny se adsorbovat na mezifázové rozhraní a stabilizovat emulze díky vlastnostem jejich buněčné stěny, což může vést k větší kinetické a termodynamické stabilitě emulzí. Ze stejného důvodu byly zkoumány bakterie rodu *Lactobacillus* a myší fibroblasty.

Bakalářská práce se zabývá problematikou Pickeringových emulzí, konkrétně jejich přípravou, stabilizací a charakterizací, a zaměřuje se především na srovnání částicových stabilizátorů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 EMULZE

Emulze jsou typem disperzních systémů, které se skládají ze dvou vzájemně nemísitelných kapalin. Dispergovaná kapalina je v emulzi ve formě kapek a označuje se jako dispergovaná fáze, zatímco okolní kapalina se označuje jako kontinuální fáze. Podle toho, jaký druh kapaliny tvoří kontinuální a dispergovanou fázi, se běžné emulze dělí na emulze přímé, a to olej ve vodě, které se označují jako O/V, a emulze obrácené – voda v oleji, které se značí zkratkou V/O. Oba typy emulzí jsou schematicky znázorněny na Obr. 1. Termín olejová fáze je často používán pro organické kapaliny, obvykle uhlovodíky nebo triacylglyceroly, a termín voda se používá pro označení vodné fáze. Velikost kapek těchto emulzí se nachází v rozmezí od 100 nm do 100 μm . Dále existují emulze typu olej v oleji (O/O), kde polární olej (např. propylenglykol) je dispergován v nepolárním oleji (např. parafinový olej) a naopak. Dalším typem méně obvyklých emulzí mohou být emulze dvou vodných fází, tj. voda ve vodě (V/V). Daný typ emulze může vznikat při smísení roztoku dvou hydrofilních makromolekul, které jsou v roztoku termodynamicky neslučitelné. Emulze typu V/V má velký potenciál v biomedicínských a potravinářských formulacích. [1][2][6]



Obrázek 1: Struktura emulzí typu olej ve vodě (O/V) a voda v oleji (V/O). [3]

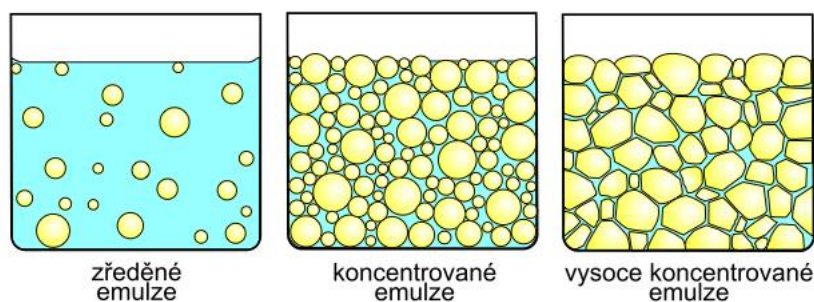
1.1 Klasifikace emulzí

Typy emulzí lze klasifikovat na základě velikosti emulzních kapek anebo koncentrace disperzního podílu. Jednotlivá rozdělení jsou uvedena níže.

Podle velikosti emulzních kapek lze emulze rozdělit následujícím způsobem. Prvním typem jsou nanoemulze, které mají velikost v rozmezí 20–100 nm a jsou kineticky stabilní. V

závislosti na velikosti kapek, objemovém podílu disperzní fáze a rozdílu indexu lomu mezi oběma fázemi mohou být průhledné, průsvitné nebo neprůhledné. Dalším typem emulzí jsou mikroemulze, které mají velikost kapek obvykle v rozmezí 5 až 50 nm, tyto systémy jsou termodynamicky stabilní. Posledním typem emulzí jsou makroemulze, velikost těchto emulzí se nachází v rozmezí od 0,1 μm do 5 μm a jsou pouze kineticky stabilní stejně jako nanoemulze. V důsledku významného rozdílu indexu lomu vodné a olejové fáze a velké velikosti kapek jsou tyto systémy nejčastěji neprůhledné nebo mléčné. [4]

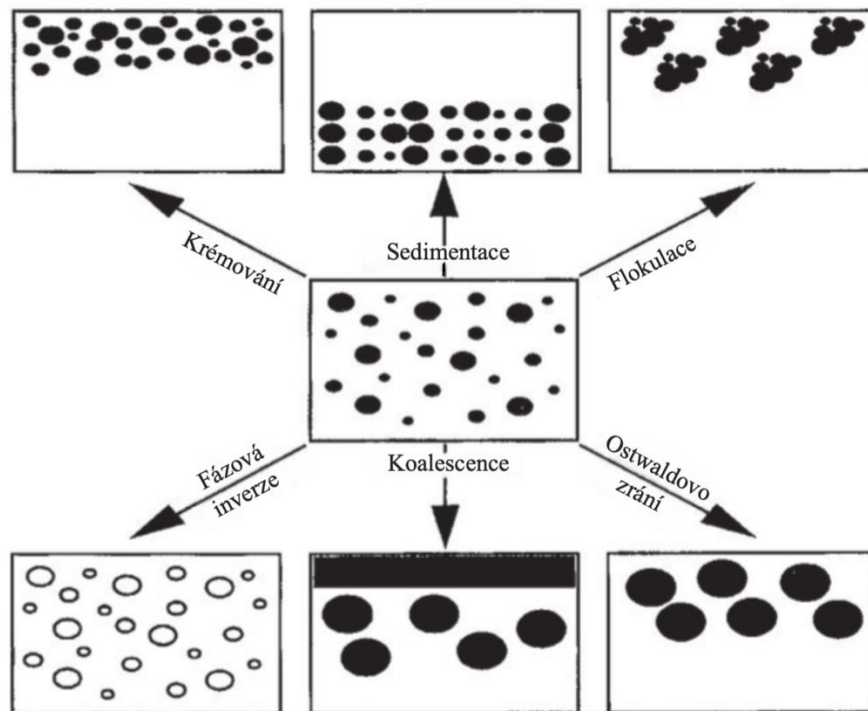
Emulze se také dělí podle koncentrace disperzního podílu na zředěné, ve kterých disperzní fáze zaujímá maximálně 2 % celkového objemu. Dále jsou emulze koncentrované, kde koncentrace disperzního podílu může dosáhnout až 74 obj. %. A v poslední řadě jsou emulze vysoce koncentrované nebo gelovité, v nichž se kapky disperzního podílu nachází tak blízko k sobě, že se vzájemně deformují [5], jak lze vidět na Obr. 2.



Obrázek 2: Zředěná, koncentrovaná a vysoce koncentrovaná emulze. [5]

1.2 Stabilita emulzí a mechanismy jejich rozpadu

Stabilita emulzí je schopnost systému odolat změnám vlastností v průběhu času. Emulze jsou nestabilní systémy, jejich stabilita ovšem záleží na různých okolnostech. Rozpad emulzí může nastat, pokud je systém ponechán v klidu nebo vystaven otřesům, odstředování, změnám teploty nebo jiným vlivům. Nejčastěji je nestabilita způsobena gravitačními silami, které ve výsledku vedou k procesu separace, kdy se odděluje lehčí olejová fáze od vodné fáze, nastává tzv. separace na makroskopické fázi. Tento proces je spontánní a spojen s poklesem Gibbsovy energie. Příklady fyzikální nestability jsou krémování, sedimentace, flokulace neboli vločkování, Ostwaldovo zrání (disproporcionace), koalescence a fázová inverze. Všechny tyto mechanismy jsou znázorněny na Obr. 3. [1]



Obrázek 3: Schematické znázornění různých mechanismů rozpadu emulzí. [1]

Krémování a sedimentace jsou výsledkem působení gravitačních nebo odstředivých sil v důsledku toho, že dispergovaná fáze má rozdílnou hustotu oproti kontinuální fázi. Pokud je hustota dispergované fáze nižší, než je hustota kontinuální fáze, kapky se shromažďují ve vrchní části systému, nastává tzv. krémování. Pokud je hustota dispergované fáze vyšší než kontinuální, dochází k sedimentaci emulzních kapek. [4]

Flokulace neboli vločkování je výsledkem van der Waalových přitažlivých sil. K tomuto jevu dochází při nedostatečném odpuzování, které udržuje kapky od sebe ve vzdálenosti, kde je van der Waalova přitažlivost slabá. U flokulace dochází k agregaci dvou a více kapek při zachování jejich individuální identity. [1]

Jev disproportionace či Ostwaldovo zrání je důsledkem rozdílné rozpustnosti mezi kapkami. U polydisperzních emulzí menší kapky budou mít větší rozpustnost ve srovnání s většími kapkami. Takže při tomto procesu menší kapky mizí, jejich molekuly se rozptýlí a následně splynou do kapek větších. [1]

Pokud nastane proces ztenčování a narušení kapalného filmu mezi kapkami, hovoříme o jevu koalescence. Dochází totiž k prasknutí filmu mezi kapkami, v důsledku čehož dochází ke spojení dvou nebo více kapek za vzniku větších kapek. Mezním případem koalescence je úplné rozdělení emulze na dvě odlišné kapalné fáze. [4]

Posledním typem nestability je inverze fází neboli výměna mezi dispergovanou fází a disperzním prostředím. Například změna typu emulze za určitých podmínek z O/V na V/O. [1][6]

1.3 Stabilizace emulzí

Většina emulzních systémů není termodynamicky stabilních díky pozitivní volné energii spojené s kontaktem vodné a olejové fáze. Dosažení termodynamické stability je relativně složitý proces, mnohem jednodušší je emulzi stabilizovat kineticky, například intenzivním mícháním nebo přidáním emulgátoru či surfaktantu. Tyto látky mají schopnost snižovat mezifázové povrchové napětí, zpomalovat rozpad emulzí tím, že mohou na tomto rozhraní vytvořit film nebo bariéru. [7]

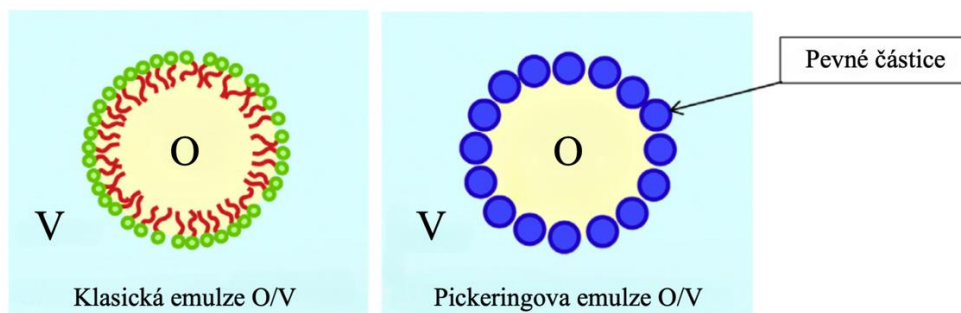
Podle povahy použitého emulgátoru lze emulze stabilizovat různými mechanismy, a to pomocí:

- jednoduchých molekul a iontů (např. OH^-);
- neiontových povrchově aktivních látek (např. ethoxyláty alkoholu), které stabilizují emulze proti flokulaci a koalescenci;
- iontových povrchově aktivních látek (např. dodecylsulfát sodný)
- směsi povrchově aktivních látek (např. směs neiontových PAL), které jsou účinnější při emulgaci a stabilizaci emulze;
- neiontových polymerů (např. pluroniky), které jsou účinnější při stabilizaci emulze, ale při nízké energii mohou vytvářet malé kapičky;
- polyelektrolytů (např. poly(methakrylová kyselina));
- směsi polymerů a povrchově aktivních látek;
- kapalně krystalické fáze;
- pevných částic, pro vytvoření Pickeringovy emulze. [4]

2 PICKERINGOVY EMULZE

Pickeringovy emulze jsou známy od roku 1907, kdy S. U. Pickering rozpoznal úlohu pevných částic smáčených vodou při stabilizaci O/V emulzí. [7][9]

Emulze Pickeringova typu je podobná klasické emulzi až na výjimku, že je stabilizovaná pevnými částicemi namísto povrchově aktivních látek. Rozdíl mezi klasickou emulzí a Pickeringovou je znázorněn na Obr. 4. Pickeringovy emulze mohou být buď přímé, nepřímé nebo dokonce i vícenásobné. [7][10]



Obrázek 4: Rozdíl mezi klasickou a Pickeringovou emulzí. [7]

Pevné částice pro stabilizaci emulzí musí být menší než požadovaná velikost emulzních kapek. Stabilizace pevnými částicemi přináší těmto emulzím specifické vlastnosti. Hlavní výhodou stabilizace pevnými částicemi je vysoká odolnost proti koalescenci. Na rozdíl od povrchově aktivních látek, jsou vhodné pro kosmetické a farmaceutické aplikace, protože nevykazují nepříznivé účinky jako např. dráždivost atd. [7][11]

Proces stabilizace emulzních kapek probíhá stejně jako v případě povrchově aktivních látek pomocí adsorpce pevných částic na povrchu emulzních kapek. Mechanismus adsorpce se však liší, protože pevné částice nemusí být amfifilní. K pevnému ukotvení částic na mezifázovém rozhraní dochází díky částečnému smáčení částic vodnou i olejovou fází [7][12]

2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti Pickeringových emulzí

Při Pickeringově stabilizaci pevné částice chrání kapičky emulze před koalescencí, a to tak, že vytvářejí sférickou bariéru na mezifázovém rozhraní. Tento mechanismus je založen na přichycení pevných částic na mezifázové rozhraní. Nicméně musí být splněna podmínka, že hustota částic na rozhraní musí být dostatečně vysoká, aby byla vytvořena účinná mechanická bariéra. U Pickeringových emulzí závisí přesná poloha každé částice na rozhraní na její interakci se sousedními částicemi a také na kontaktním úhlu θ . [13]

Jak už bylo řečeno, nejdůležitějším faktorem pro stabilizaci Pickeringových emulzí je adsorpce pevných částic na rozhraní. Volná energie adsorpce částic je však o mnohokrát vyšší než tepelná adsorpce a na rozdíl od adsorpce molekul PAL je fakticky nevratná. Změna volné energie, která je potřebná pro tvorbu emulzí, je závislá na mezifázovém napětí rozhraní olej-voda, smáčivosti částic, průměru částic a kapek emulze. Adsorpce je nejvyšší, pokud je kontaktní úhel 90° , a to znamená, že emulze je stabilní. [7][14]

Z tohoto vyplývá, že dalším klíčovým parametrem, který je ekvivalentní hodnotě HLB pro povrchově aktivní látky, je kontaktní úhel částic. Tento úhel je v přímé závislosti na typu stabilizované emulze. Např. pokud je kontaktní úhel větší než 90° , tak částice mají hydrofobní charakter a jsou schopny stabilizovat emulze typu V/O. Naopak když úhel je menší než 90° , částice jsou víc hydrofilní a mohou stabilizovat emulze typu O/V. Jako poslední případ, když úhel je buď roven nebo je blízko hodnotě 90° , tak částice s takovým úhlem umožňují tvorbu dvojitých emulzí. [15]

Částice mohou reagovat na různé stimuly, jako je pH, koncentrace CO_2 , teplota, světlo, magnetické pole, iontová síla, přítomnost specifického iontu nebo chemické látky, a dokonce i elektrochemické stimuly. [16]

Pickeringovy emulze jsou vysoce kineticky stabilní. Existují dvě hlavní kritéria pro přípravu stabilních emulzí. Zaprvé emulze musí být dlouhodobě stabilní vůči jakémukoliv destabilizačnímu jevu, jako např. koagulaci nebo koalescenci, a zadruhé je možný proces emulgace. Pro dlouhodobou stabilitu je důležitý také vhodný návrh formulace a zvolený proces emulgace, které ovlivňují velikost kapek. [7]

Při přípravě emulzí, nezáleží jen na procesu emulgace, ale také na použitém stabilizátoru. Fyzikální vlastnosti každé emulze (nejen Pickeringovy) jsou ovlivněny různými jevy, jako je adsorpce částic, stabilizace kapek adsorbovanými částicemi, kinetika adsorpce, která ovlivňuje proces emulgace, a nakonec i reologické vlastnosti, které mohou ovlivnit procesy krémování a sedimentace. [7]

2.2 Využití Pickeringových emulzí

Pickeringovy emulze lze využít v řadě průmyslových odvětví, např. v potravinářství nebo ropném průmyslu. V rámci bakalářské práce se budu zabývat především aplikací Pickeringových emulzí v kosmetickém, biomedicínském a farmaceutickém průmyslu.

Pickeringovy emulze mohou být v kosmetickém průmyslu vhodnou alternativou k emulzím stabilizovanými klasickými surfaktanty. Aplikace Pickeringových emulzí může najít uplatnění při přípravě mnoha kosmetických přípravků a výrobků osobní péče, jako např. hydratační přípravky na pleť, bělicí přípravky, přípravky proti stárnutí, antiperspiranty, deodoranty. Pickeringovy emulze používané v kosmetických výrobcích pro osobní péči mohou zvýšit stabilitu a trvanlivost produktu a zároveň umožnit rychlé a řízené uvolňování aktivních složek v případě potřeby v reakci na spouštěcí faktory, jako je teplota, pH a světlo. Emulze, které jsou stabilizované pevnými částicemi, jsou také účinné při výrobě opalovacích přípravků. Tyto produkty mohou obsahovat ve svém složení fyzikální filtry, např. oxid titaničitý nebo oxid zinečnatý, které chrání naši pokožku proti slunečnímu záření. A zároveň výše uvedené částice mohou stabilizovat další složky, které jsou přítomné v emulzi. [17][18]

Prostředky na bázi Pickeringových emulzí se mohou používat k omezení iritace pokožky, kterou mohou vyvolat emulze stabilizované klasickými surfaktanty. Zároveň bylo prokázáno, že se po aplikaci těchto prostředků pronikání mikroorganismů a cizorodých látek z vnějšího prostředí do pokožky snížilo. [19] Takže Pickeringovy emulze mohou fungovat jako podpora bariérové vrstvy kůže. Tento koloidní systém se aplikuje přímo na kůži, která je postižena buď ekzémem anebo psoriázou a vytvořená bariéra po aplikaci Pickeringovy emulze omezí transepidermální ztrátu vody. [19] Na trhu se vyskytuje bariérový krém od značky 2Derm (Obrázek 5). Tento prostředek funguje na principu dočasné náhrady kožní bariéry. Aktivní látka Medilan s mikročásticemi talku a zinku brání pronikání znečišťujících látek do hlubších vrstev pokožky a brání ztrátě vody. Mechanismus fungování bariérového krému lze vidět na Obr. 5. To vše je základem pro podporu a urychlené hojení poškozené pokožky. [19]



Obrázek 5: 2Derm REHA special – Bariérový krém. [19]

Pickeringovy emulze jsou také známé v biomedicínském a farmaceutickém průmyslu. Stabilizace Pickeringových emulzí nanokrystalickou celulózu dovoluje používat tento typ

emulzí v aplikacích pro podávání léčiv. Pokud při stabilizaci Pickeringových emulzí použijeme přírodní stabilizátory, jako jsou zein nebo chitosan, tak získaný přípravek bude mít antioxidační účinky. Takové emulze byly použité pro enkapsulaci vitamínu D3, což umožnilo ochranu daného vitamínu. [20] V moderní medicíně lze Pickeringovy emulze využít při vývoji vakcín a zlepšení jejich účinnosti. [20]

3 TYPY A VLASTNOSTI ČÁSTIC PRO PICKERINGOVY EMULZE

Pro stabilizaci Pickeringových emulzí je důležité vybrat správné částice. Protože vlastnosti pevných částic určují typ, charakter a stabilitu emulze. Mezi nejdůležitější vlastnosti částic patří jejich tvar a velikost.

Velikost částic má přímý vliv na velikost emulzních kapek a na stabilitu emulze. S rostoucí velikostí částic se zvyšuje doba adsorpce na rozhraní, a to vede ke zvětšení výsledné velikosti kapek emulzí. Pokud se velikost emulzních kapek zvětší, dojde k jevu zvanému krémování. Pravidlem je, že velikost částic by měla být menší, než je očekávaná velikost emulzních kapek. [21]

Dalšími faktory, které ovlivňují stabilitu emulze, jsou tvar, měkkost, způsob adsorpce a uspořádání částic na povrchu. Částice podle tvaru lze rozdělit do dvou skupin: sférické a nesférické. Do nesférických částic můžeme zařadit částice ve tvaru tyčinek, elipsoidní částice, vlákna, krychličky, Janusovy částice, mikročástice, a dokonce i deformovatelné nanogely. Pomocí nesférických částic mohou být stabilizovány emulze typu O/V, V/O a vícenásobné emulze. Mechanismy stabilizace těmito částicemi se liší od částic sférických. Při stabilizaci nesférickými částicemi vzniká problém v určení volné adsorpční energie, a proto je nutno zohlednit orientaci částic a alespoň dvě charakteristické velikosti. U nesférických částic je také pozorována vyšší polydisperzita velikosti kapek než u sférických. Co se týče měkkosti částic, tak čím jsou měkčí částice, tím je snadnější proces emulgace a lepší stabilita emulzí. [21]

Pevné částice mohou být buď organického nebo anorganického původu, ale mohou se používat i mikroorganismy jako jsou kvasinky a bakterie.

Biopolymery jsou polymery syntetizované živými organismy. Jejich využití je poměrně široké, a to díky jejich vysoké biokompatibilitě. Lze se s nimi setkat v biomedicínském, potravinářském, obalovém nebo kosmetickém průmyslu. Při běžném použití se vyskytují v rozpustné formě jako zahušťovadla nebo polymerní stabilizátory a jejich použití ve formě částic umožňuje rozšíření jejich využití. Biopolymery zahrnují polysacharidy, komplexní polyfenolický lignin a proteiny. [22]

Přírodní organické částice mohou stabilizovat emulze v jejich původní podobě a mají řadu velmi významných vlastností, mezi ně patří biologická rozložitelnost, biokompatibilita a obnovitelnost. Tyto vlastnosti mohou být výhodou pro využití organických částic přírodního

původu, vyrobených z biopolymerů, mikroorganismů nebo molekulových shluků. Hlavním problémem, se kterým se můžeme setkat při stabilizaci emulzí těmito částicemi, je homogenita samotného materiálu. U přírodních zdrojů existuje variabilita. Projevuje se tak, že stejný materiál může pocházet z různých zdrojů nebo dokonce z různých časových úseků, a tím může mít materiál různé vlastnosti. [16]

3.1 Celulóza

Celulóza je jeden z nejrozšířenější biopolymerů na Zemi. Je to polysacharid, který je přítomen prakticky ve všech buněčných stěnách rostlin. Nejčastěji ji lze izolovat v různých nerozpustných formách, které mohou být dále použity ke stabilizaci Pickeringových emulzí. [16]

3.1.1 Zdroje celulózy

Celulóza se získává jak z rostlin, tak i z živočichů a mikroorganismů. Existuje jak ve formě vláken, tak částic. Rozmanitost typů celulózy zaleží na dvou hlavních faktorech. První je biosyntéza celulózových mikrovláken, která závisí na zdroji celulózy. Lze ji získávat ze dřeva, rostlin, různých druhů řas a bakterií rodu *Gluconacetobacter xylinus*. Biosyntéza celulózových mikrovláken je několikastupňový proces, který je vysoce specifický pro organismus produkující celulózu. Rozdíly v tomto procesu určují morfologii, poměr stran, krystalinitu a krystalickou strukturu výsledné mikrofibrily. Za druhé se liší podle procesu extrakce celulózových částic z celulózových mikrovláken. [23]

3.1.2 Typy částic celulózy

Existuje několik typů celulózových částic, které se od sebe obvykle liší na základě zdroje celulózy a metody extrakce. Každý druh těchto částic je odlišný, má vlastní charakteristickou velikost, poměr stran, morfologii, krystalinitu, krystalovou strukturu a vlastnosti. [23]

Prvním typem jsou vlákna ze dřeva (Wood Fiber; WF) a rostlinná vlákna (Plant Fiber; PF). Mají největší velikost ze všech typů částic a lze se s nimi setkat v papírenském, textilním a biokompozitním průmyslu. Skládají se z jednotlivých dřevních nebo rostlinných buněk, které mají průměr v řádu desítek mikrometrů, vysoké procento celulózy a relativně nízkou krystalinitu (43–65 %). [23]

Dalším typem částic je mikrokystalická celulóza, která je komerčně dostupným materiálem. Lze ji najít ve farmaceutickém průmyslu, jako např. pojivo pro tablety, a v potravinářském průmyslu. Přípravuje se kyselou hydrolyzou dřevních vláken, zpětnou neutralizací alkálií a sprejovým sušením. Tyto částice jsou porézní, mají průměr 10–50 μm , vysoký obsah celulózy, vyšší krystalinitu a jsou složeny z agregovaných svazků vícerozměrných celulózových mikrofibril. [23]

Třetím typem je mikrofibrilární celulóza (MFC), která se vyrábí mechanickou rafinací dřevních a rostlinných vláken. Používá se jako zahušťovadlo v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Částice MFC obsahují několik elementárních fibril, mají vysoký poměr stran, jsou ze 100 % tvořeny celulózou a obsahují jak amorfni, tak krystalické oblasti. [23]

Také existuje nanofibrilární celulóza (NFC), která obsahuje jemnější celulózové fibrily. Vzniká mechanickou rafinací dřevních a rostlinných vláken za použití specifické techniky usnadňující fibrilaci. Tyto částice mají čtvercový průřez, vysoký poměr stran, jsou ze 100 % tvořeny celulózou a obsahují jak amorfni, tak krystalické oblasti. Rozdíl mezi NFC a MFC je založen na procesu fibrilace, který vytváří jemnější průměry částic. [23]

Dalším typem částic jsou celulózové nanokrystaly neboli nanokrystalická celulóza (CNC). Tyto částice jsou ve tvaru jehliček. Získáváme je kyselou hydrolyzou WF, PF, MCC, MFC nebo NFC, kdy jsou odstraněny amorfni části vláken. CNC má vysoký poměr stran, obsahuje 100 % celulózy, je vysoce krystalická (54–88 %) a obsahuje vysoký podíl krystalové struktury (68–94 %). [23] Jak již bylo řečeno, nanokrystalickou celulózu lze získat kyselou hydrolyzou s využitím kyseliny sírové, čím se odstraní amorfni části celulózy. Tak vzniknou nejprve nabitě částice mikrokystalické celulózy ve tvaru jehliček a po delší hydrolyze nanokrystalické částice celulózy. V posledních letech lze také použít metodu mikrofluidizace vhodného meziprojektu, jako je MCC, tzv. mikrokystalická celulóza. Nevýhodou této metody je, že se zmenším velikosti částic a při homogenizaci CNC, dochází ke zvýšení povrchové energie nanokrystalické celulózy, to vede ke flokulaci, agregaci nebo k růstu krystalů a následně ke snížení volné adsorpční energie. [13][24][25]

Šestým typem jsou tunikátové nanokrystaly celulózy (t-CNC). Tento typ částic vzniká kyselou hydrolyzou pláštěnců, což je podkmen mořských strunatců. Od ostatních částic se t-CNC liší morfologií částic, krystalovou strukturou a mechanickými vlastnostmi. Páskovitě tvarované t-CNC obsahují 100 % celulózy, jsou vysoce krystalické (85–100 %) a obsahují

vysoký podíl (76–90 %) krystalové struktury. Hlavní výhodou t-CNC je jejich vysoce krystalická struktura a také největší poměr stran ze všech CNC. [23]

Jako předposlední budou uvedeny částice celulózy z řas (AC), které jsou tvořeny mikrofibrilami extrahovanými z buněčné stěny různých řas kyselou hydrolyzou a mechanickou rafinací. Vzniklé částice jsou relativně dlouhé, mají velký poměr stran (větší než 40) s morfologií závislou na typu řasy. [23]

Posledním typem jsou částice bakteriální celulózy (BC). Tento druh částic je vylučován různými bakteriemi pomocí jejich oddělení od bakteriálních těl a růstového média. Vzniklé mikrofibry mají délku mikrometrů, velký poměr stran (více než 50) s morfologií závislou na konkrétní bakterii a podmínkách kultivace. Je také možné měnit šířku mikrovláken změnou kultivačních podmínek (míchání, teplota a přísady). [23]

3.1.3 Emulze stabilizované nanokrystalickou celulózą

Nanokrystalická celulóza je ideálním biomateriálem ke stabilizaci Pickeringových emulzí. Získala popularitu díky svým zvláštním vlastnostem, zejména nízké hustotě, dobré chemické odolnosti, nízké ceně a ekologické udržitelnosti. [26]

Jedním ze způsobů použití nanokrystalické celulózy jako stabilizátoru emulzí je její modifikace. Využívá se například modifikace CNC sodnou soli karboxymethylcelulózy, díky čemuž vzniká ve vodě rozpustný celulóžový derivát, kterým je možné rovněž stabilizovat Pickeringovy emulze. Částice nanokrystalické celulózy působí především jako stabilizátory proti koalescenci, nikoli proti krémování nebo flokulaci. [27][28] Pickeringovy emulze lze také připravit pomocí celulóžových nanokrystalů roubovaných termoreaktivními polymery. [29]

Další možnost stabilizace emulzí je zmíněna ve studii Wena, Yuana, Lianga, a Vriesekeopa. Zabývali se stabilizací sonikovaných emulzí D-limonenu pomocí nabitých koloidních krystalů o velikosti cca 360 nm, vyrobených z celulózy, konkrétně z kukuřičného šrotu hydrolyzou persíranem amonným. Během experimentu bylo pozorováno snížení stability v důsledku krémování, které vznikalo při nízkém pH nebo vysoké koncentraci soli. [30]

Poslední metoda, která zde bude uvedena, je stabilizace emulzí s palmovým olejem nanokrystalami celulózy. Tato nanokrystalická celulóza byla vyráběna hydrolyzou stonků chřestu kyselinou sírovou. V průběhu práce Wang a jeho kolegové zjistily, že čím je velikost nanočástic menší, tím je vyšší stabilita emulzí. [31]

3.2 Oxid titaničitý

Oxid titaničitý (TiO_2) je přírodní, polovodičový materiál, který nereaguje s jinými prvky, nevytváří mnoho chemických sloučenin, je nereaktivní. V přítomnosti světla vykazuje fotokatalytickou aktivitu. Díky zmíněným vlastnostem, relativně nízké ceně a jeho zpracování je v posledních letech stále populárnějším. Oxid titaničitý se většinou vyrábí čištěním minerálu rutilu nebo podrobením ilmenitu (FeTiO_3) buď tzv. chloridovým, nebo sulfátovým procesům, které v obou případech nakonec poskytují čistý titan. [32][33]

3.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti oxidu titaničitého

Oxid titaničitý se podle velikosti dělí na částice mikronových rozměrů a nanočástice. Tyto částice se chemicky od sebe nějak výrazně neliší a nejde stanovit jasnou hranici mezi nimi, ale vzhledem k jejich specifickému povrchu, nanočástice vykazují fyzikální a chemické vlastnosti odlišné od vlastností částic s větším rozměrem. [32]

Mikročástice oxidu titaničitého vždy obsahují nějaký určitý podíl nanočástic a zároveň i nanočástice se mohou sdružovat do silně vázaných agregátů či měkkých aglomerátů. Mohou se snadno dispergovat v kapalně fázi a jejich dispergace je závislá na zeta-potenciálu, který se může lišit podle hodnoty pH. [32][33]

Krystalický oxid titaničitý existuje ve třech polymorfních formách, a to jsou rutil, anatas a brookit. Rutil je nejstabilnější modifikací TiO_2 . Při tepelném zpracování se amorfní TiO_2 může přeměnit na anatas nebo brookit v procesu zvaném kalcinace, který probíhá při teplotě kolem 400°C . Tyto se dále při zahřátí na teplotu vyšší než 600°C přemění na rutil. Změnou povrchových vlastností lze ovlivnit fyzikálně-chemické vlastnosti částic, hlavně jejich aktivitu. Anatas je jednou z krystalových forem oxidu titaničitého. Je chemicky nejreaktivnější a má vyšší potenciál toxicity na rozdíl od rutilu. [26][32][33]

Modifikace částic oxidu titaničitého zlepšuje jeho vlastnosti a kompatibilitu [26]. Nejčastějšími úpravami oxidu titaničitého v nanorozměrech je lipofilní povrchová úprava za účelem zlepšení disperze nanočástic v olejové fázi emulze, např. prostřednictvím dimetikonu nebo kyseliny stearové. [34]

3.2.2 Použití oxidu titaničitého

Oxid titaničitý se používá v každodenním životě v různých výrobcích. V potravinářském průmyslu lze oxid titaničitý nalézt jako přídatnou látku, která se označuje jako E171, pro

bělení a texturu výrobku. Můžeme jej najít v některých sýrech (Mozzarella), omáčkách, citronovém tvarohu a zmrzlíně. Úřad FDA tvrdí, že TiO_2 lze bezpečně používat jako barvivo k barvení potravin v množství do 1 % hmotnosti potraviny. [32]

Co se týče kosmetiky, tak oxid titaničitý je více než čtvrt století běžnou složkou opalovacích krémů, a to díky své bezpečnosti, efektivnosti a nízkému iritačnímu faktoru. Také se používá jako stabilizátor Pickeringových emulzí a dodává přípravku vlastnosti SPF. [26]

Ve farmaceutické oblasti byl TiO_2 použit jako pomocná látka při výrobě tablet a také jako katalytický systém schopný eliminovat nebezpečné chemické a farmaceutické škodliviny. V kombinaci s protinádorovými látkami umožňuje účinnější podávání chemoterapeutik. Díky určitým mechanismům je uvolňování léčiva v nádorových buňkách mnohem vyšší než ve zdravých buňkách a z tohoto vyplývá, že množství léčiva, které je potřebné při léčbě, je výrazně nižší, ale farmakologický účinek zůstává zachován a vyskytuje se méně potenciálních nežádoucích účinků. [33]

Fotochemická aktivita oxidu titaničitého našla uplatnění i v zubním lékařství, a to zejména pro zlepšení osobní péče o zuby a jejich bělení. Jeden z dalších způsobů využití tohoto oxidu jsou scaffoldy z oxidu titaničitého, včetně přípravy implantátů pro chirurgické zákroky v kostním tkáňovém inženýrství. [33]

3.2.3 Toxicita oxidu titaničitého

Oxid titaničitý je běžnou součástí mnoha kosmetických přípravků díky své nízké toxicitě. Přestože je populární, jeho velikost a krystalové formy, jako jsou anatas a rutil, mohou ovlivňovat bezpečnost jeho použití.

Lidská kůže a oční tkáň jsou nejvíce ovlivněny okolním zářením. Ve studii Sanders a kol. testy in vitro ukázaly, že při ozáření je nejmenší forma oxidu titaničitého, anatas (25 nm), fototoxická pro buňky lidské sítnice. [35]

Jako další studii zde uvedu studii Yin a kol. Vědci analyzovali fototoxicitu nanočástic oxidu titaničitého s různou velikostí molekul a krystalovou formou (anatas a rutil) v keratinocytech lidské kůže HaCaT. HaCaT je samovolně transformovaná aneuploidní nesmrtelná keratinocytová buněčná linie z dospělé lidské kůže, která je široce používána ve vědeckém výzkumu. V průběhu experimentu bylo zjištěno, že nanočástice daného oxidu jsou fototoxické pro lidské kožní keratinocyty v důsledku vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) vznikajících při ozařování UVA. Menší částice způsobily vyšší fototoxicitu než částice větší. Rutilová forma

nanočástic oxidu titaničitého prokázala menší fototoxicitu než anatasová forma. A směs anatasových/rutilových nanočástic TiO_2 vykázala nejvyšší fototoxicitu, což odpovídá přechodnému tvrzení. [36]

Ve studii Wu a kol. hodnotili penetraci a potenciální toxicitu nanočástic oxidu titaničitého *in vitro* a *in vivo* kožní cestou u myši bez srsti a vepřové kůže po subchronické dermální expozici. Výsledky ukázaly, že nano oxid titaničitý o různé velikosti může pronikat kůží, vstupovat do různých orgánů a vyvolávat různá poškození tkání, a to v kůži i játrech. Takže po subchronické dermální expozici po relativně dlouhou dobu představuje zdravotní riziko pro člověka v důsledku hlubší tkáňové distribuce. [37]

V další studii Crosera a kol. studovali penetraci nanočástic oxidu titaničitého a cytotoxicitu na keratinocytech HaCaT po dobu 24 hodin na neporušené a poškozené kůži. Tato studie prokázala, že přítomnost těchto nanočástic byla omezena na epidermální vrstvu, zatímco v dermální vrstvě byla jejich koncentrace pod mezí detekce. Z tohoto vyplývá, že kožní poškození nezměnila propustnost nanočástic oxidu titaničitého. Takže byl zaznamenán mírný cytotoxický účinek na lidské HaCaT keratinocyty, což naznačuje potenciální riziko spojené s nanočásticemi oxidu titaničitého pouze po dlouhodobé expozici. [38]

3.2.4 Emulze stabilizované TiO_2

Z publikovaných studií je zřejmé, že pro stabilizaci emulzí pomocí částic TiO_2 , je zásadní hydrofobicita částic. Ve studii Stillera a kol. byl zkoumán vliv smáčivosti různých povrchově modifikovaných oxidů titaničitých na typ a stabilitu Pickeringových emulzí. Různé pigmenty TiO_2 o velikosti nanometrů byly seřazeny podle jejich hydrofobicity pomocí měření kontaktních úhlů. Z naměřených hodnot vychází, že jenom částice se střední hydrofobností jsou schopny vytvářet stabilní emulze. Také během experimentu dospěli k výsledkům, že dlouhodobá stabilita emulzí typu olej ve vodě klesá, zatímco stabilita emulzí typu voda v oleji se zvyšuje s rostoucími hodnotami zdánlivého kontaktního úhlu vůči vodě. [39]

V další studii Silva a kol. bylo prokázáno, že povrchově modifikovaná nanofibrilární celulóza stabilizuje nanočástice oxidu titaničitého v širokém rozsahu pH (4–8), včetně izoelektrické oblasti (kolem pH 6,7). Tato směs vytvářela stabilní emulze typu O/V po dobu 2 měsíců bez jakékoliv makroskopické separace fází. Kromě dobré makroskopické stability, kterou zajišťuje celulóza, emulze vykazovaly ochranné vlastnosti proti UVB záření. [40]

3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae je jednobuněčná houba. Jedná se o zdaleka nejstudovanější a nejlépe poznáný druh z oblasti kvasinek a důležitý modelový systém pro základní výzkum biologie eukaryotické buňky. Má jadernou genomovou DNA o velikosti 12068 kilobází (kb), uspořádanou do 16 chromozomů. *S. cerevisiae* se rozmnožují vegetativně mnohostranným pučením a pohlavně pomocí askospor. [41]

S tímto kmenem se můžeme setkat buď v laboratoři nebo ve vnějším okolí. Nicméně environmentální kmeny jsou vystaveny mnohem drsnější podmínkám než laboratorní. Environmentální kmeny jsou schopny přezimovat v půdě, kde mohou sporulovat. Z tohoto vyplývá, že je můžeme najít v listech a v různých druzích rostlin. [41] Ve studii Taylor a kol. dokázali pomocí metagenomického přístupu detekovat přibližně jednu buňku *S. cerevisiae* mezi přibližně 20 000 buňkami patřícími k různým jiným rodům/druhům hub. Zjistili, že kmen *S. cerevisiae* se častěji vyskytuje v poškozených plodech (např. hroznech) než v neporušených. Vysvětlení je takové, že *S. cerevisiae* obsadí hmyz, který se živí mimo jiné také poškozenými hrozny, a tak dojde k přenosu *S. cerevisiae*. [42]

3.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae je modelový organismus, cenný nástroj pro všechny aspekty základního výzkumu ve srovnání s ostatními modelovými organismy. Hlavním důvodem je, že se jedna část životního stylu *S. cerevisiae* označuje jako "make-accumulate-consume". Spočívá v tom, že *S. cerevisiae* ani za aerobních podmínek nevyužívá dýchací aparát k metabolismu sacharidů a podpoře růstu biomasy. Místo toho *S. cerevisiae* produkuje ethanol a další dvouuhlíkaté sloučeniny prostřednictvím pyruvátu. Ethanol a jeho zvyšující se koncentrace se stává toxickým pro většinu ostatních mikrobiálních druhů, a tím probíhá eliminace konkurence. Pak už *S. cerevisiae* jen pokračuje ve spotřebě vyrobeného ethanolu, čímž podporuje svůj vlastní růst. [41]

S. cerevisiae je také schopen fermentovat monosacharidy se 6 uhlíky (D-glukózu, D-fruktózu a D-manózu), sacharózu, maltózu, maltotriózu a D-galaktózu, zatímco dextriny a škrob fermentují pouze specializované druhy (*Saccharomyces diastaticus*). Laktózu, L-sacharidy a všechny pentózy neumí fermentovat s výjimkou xylulózy. Navíc tento kmen snadno metabolizuje nefermentované sloučeniny jako je kyselina mléčná, jiné organické kyseliny a polyhydroxyalkoholy. [43]

Nejcharakterističtější vlastnost druhů *Saccharomyces* je jejich tolerance k vysokým koncentracím ethanolu. Obecně platí, že většina kmenů je schopna růst v nápojích obsahujících kolem 15 % ethanolu. Jinak při kvašení může koncentrace ethanolu dosáhnout až 20 %, pokud přítomnost nenasycených mastných kyselin podporuje toleranci alkoholu. Citlivost druhu na ethanol se však zvyšuje při teplotách vyšších než 30 °C nebo nižších než 10 °C. [43]

Saccharomyces cerevisiae, stejně jako ostatní kvasinky, preferuje mírně kyselé prostředí s pH mezi 4,5 a 6,5 a vykazuje toleranci k pH i v kyselé oblasti. Také vykazuje maximální toleranci vůči kyselině benzoové a kyselině sorbové. [43]

Jako poslední vlastnost zde uvedu selektivní výhodu oproti striktně aerobním kvasinkám, protože jí vyhovuje prostředí i při nízkém obsahu kyslíku v nápojích a ve vnitřních vrstvách potravin. Kyslík je základní živinou pro všechny kvasinky a je nezbytný pro zachování životaschopnosti buněk, a přestože *S. cerevisiae* může růst v mikroaerofilních podmínkách. Za anaerobních podmínek se zastaví syntéza některých buněčných složek (např. mastných kyselin a sterolů) a následně kvasinkové buňky přestanou růst. [43]

3.3.2 Použití *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, známá také jako pekařské kvasnice nebo prostě "kvasnice", je nejběžnějším druhem kvasinek v chlebu a v kvásku. Kvašení cukrů v pečivu vede ke zvětšení objemu chlebového těsta z kvasných plynů, tedy ke změnám struktury výrobku a k syntéze organických kyselin a těkavých produktů, které přispívají k chuti a vůni chleba. [44]

Už po mnoho let se *S. cerevisiae* používají pro různé biotechnologické aplikace. Jejich užitečnost spočívá v jedinečných biologických vlastnostech, tj. v její schopnosti fermentace doprovázené produkcí alkoholu a CO₂ a v její odolnosti vůči nepříznivým podmínkám osmolarity a nízkého pH. [44]

S. cerevisiae lze také použít jako genetické referenční materiály, které jsou důležitým článkem kontroly kvality molekulární diagnostiky a jsou široce využívány v různých platformách detekce genů, jako je detekce mutací, kvantifikace genů a sekvencování. [45]

V kosmetice se také můžeme setkat se *Saccharomyces cerevisiae*, protože mohou působit při oxidačním stresu a zlepšovat stav pokožky. Gaspar a kol. zkoušeli dermatologické účinky u kosmetických přípravků, které ve svém složení obsahovaly extrakt *Saccharomyces cerevisiae* nebo vitaminy A, C a E. Během experimentu byly sledovány transepidermální ztráta

vody, vlhkost kůže, mikrorelief kůže a ochrana proti volným radikálům. Jejich výsledky naznačují, že prostředek, obsahující kvasinkové buňky, zvyšoval vlhkost kůže předloktí, vykazoval dlouhodobé účinky ve zlepšení mikroreliefu kůže. Všechny tyto charakteristiky jsou velmi důležité při vývoji kosmetiky pro vyhodnocení nejlepšího poměru rizika a výhod. [46]

3.3.3 Emulze stabilizované *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae mohou ovlivnit stabilitu emulzí olej ve vodě. Tyto buňky mohou vytvořit bariéru okolo olejových kapek, a tak zvýšit stabilitu emulze. [47]

Ve studii Heeres a kol. byla zkoumána stabilizace emulze pomocí kvasinek. Byl použit modelový systém, který se skládal z hexadekanu dispergovaného ve vodě obsahující glukózu, chlorid draselný, ethanol, kyselinu octovou, vanilin a 5-hydroxymethylfurfural, přičemž emulgační složkou byly mannoproteiny. Během experimentu autoři dospěli k výsledkům, že složky obsažené v hydrolyzované celulóзовé biomase a mannoproteiny z buněčné stěny kvasinek snižovaly koalescenci kapiček hexadekanu, a tím zvyšovaly stabilitu emulze. [48]

V práci Furtado a kol. byl pro přípravu emulze použitý hexadekan a disperze *S. cerevisiae* ve vodě. Emulze byly připraveny smícháním hexadekanu a vodné suspenze kvasinek (o koncentracích 10, 20 a 30 %) v poměru 30:70 pomocí hřídelové míchačky RW20 (900 rpm/30 min). Výsledná velikost emulzních kapek stabilizovaných kvasinkami byla 60 μm. V průběhu experimentu byly ještě zkoumány faktory stability Pickeringových emulzí. Ke stabilizaci emulzí přispělo elektrostatické odpuzování mezi kapičkami oleje, viskoelastické vlastnosti emulze a Pickeringova stabilizace. [49]

Později byla provedena studie Moreira a kol., ve které byly zkoumány stejné modelové emulze obsahující hexadekan, vodu a *S. cerevisiae*. Bylo pozorováno, že se stabilita emulzí snížila, když jako disperze byly použité čerstvé buňky pekařských kvasnic promytých vodou. Z tohoto vyplývá, že promýváním vodou kvasinkových buněk byly odstraněny sloučeniny, které přispívaly ke stabilitě emulzí. Po provedení experimentu tito autoři došli k výsledkům, že adheze kvasinkových buněk zvyšuje stabilitu emulze. Dospěli k závěru, že hlavní složky přispívající ke stabilitě jsou ve skutečnosti přítomny vně buněk, a že jiné složky než buňky nebo složky připojené k obalu kvasinkových buněk mají větší vliv na stabilitu emulze než samotné kvasinkové buňky nebo viskozita emulze. [50]

3.4 *Lactobacillus*

Laktobacily jsou grampozitivní, kataláza-negativní, nesporulující bakterie. Rod *Lactobacillus* patří do čeledi *Lactobacillaceae*, řádu *Lactobacillales* a kmenu *Firmicutes*. Mají tyčinkovitý tvar a produkují kyselinu mléčnou, která je hlavním konečným produktem fermentace. Laktobacily jsou považovány za nepatogenní. Ve vztahu ke kyslíku jsou aerotolerantní nebo anaerobní s fermentativním metabolismem. Ke své existenci potřebují dostatek sacharidů, mastných kyselin nebo jejich esterů, solí, derivátů nukleových kyselin a vitaminů. [51]

Zkoumání laktobacilů pomocí genetických metod vedlo ke klasifikování řady laktobacilů do následujících skupin: *Lb. Buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. sakei* a *Lb. salivarius* atd. [52]

Dalším způsobem rozdělení daného rodu na tři odlišné skupiny bylo provedeno na základě způsobů fermentace sacharidů. Jako první jsou obligátně homofermentativní laktobacily. Fermentují hexózy téměř výhradně na kyselinu mléčnou, zatímco pentózy nebo glukonát nefermentují. Do této skupiny řadíme např. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Druhou skupinou jsou fakultativně heterofermentativní laktobacily. Ty fermentují buď všechny hexózy na kyselinu mléčnou nebo všechny hexózy kromě glukózy na kyselinu mléčnou, octovou, ethanol a kyselinu mravenčí. Také jsou schopny fermentovat pentózy na kyselinu mléčnou a octovou. Tato skupina zahrnuje druhy *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*. Poslední skupina se nazývá obligátně heterofermentativní laktobacily, které fermentují hexózy na kyselinu mléčnou, oxid uhličitý, kyselinu octovou a/nebo ethanol a pentózy na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou. Do této skupiny patří např. *Lactobacillus fermentum*. [52]

Laktobacily můžeme najít v lidském těle. *Lactobacillus* patří mezi nejčastěji používaná probiotika a tvoří cca 6 % všech bakterií dvanáctníku a 0,3 % bakterií tlustého střeva člověka. Několik kmenů *Lactobacillus* se zapojuje do mnoha biologických procesů, včetně odstraňování patogenních bakterií, zlepšování funkcí střevní bariéry, imunoregulace, protinádorové aktivity a regulace metabolismu v jejich hostiteli. Kromě toho podávání specifických druhů *Lactobacillus* zmírňuje klinické příznaky a/nebo zabraňuje recidivě některých střevních onemocnění, včetně infekce *Helicobacter pylori*, průjmu, zánětlivých střevních onemocnění a syndromu dráždivého tračníku. [53]

3.5 Fibroblasty NIH/3T3

V roce 1858 Rudolf Virchowen poprvé zmínil pojem fibroblasty. Přípona "-blast" označuje morfologické znaky aktivní syntézy proteinů. Tyto buňky se nacházejí ve všech hustých i volných vláknitých pojivových tkáních. [54]

Fibroblasty jsou mezenchymální buňky pojivové tkáně. V normálních dospělých tkáních mají fibroblasty větvenovitý nebo hvězdovitý tvar, oválné jádro a zřetelné endoplazmatické retikulum. Jsou odolné a snadno se množí na umělých substrátech, jako je sklo a plast. Produkují složky tvořící extracelulární matrix, především kolageny, a tím určují architekturu tkání podporou orgánů. Na základě morfologických i molekulárních kritérií bylo zjištěno, že fibroblasty z různých anatomických lokalit se liší. [54][55]

Fibroblasty jsou skutečně heterogenní buňky, a i v rámci jedné tkáně existují rozmanité podtypy fibroblastů. Jejich organotypová heterogenita je hluboká, i když určité kombinace markerů mohou ukazovat na subtypy fibroblastů, které překračují hranice orgánů. Jako užitečné markery pro identifikaci fibroblastů pomocí imunohistochemických technik slouží některé proteiny, jako je vimentin a fibroblastový specifický protein 1. [54][55]

V sedmdesátých a osmdesátých letech minulého století se fibroblasty používaly k identifikaci buněčných onkogenů a také k novějšímu zavedení technik pro indukovanou pluripotentci. Kromě toho se běžně používají v kultivačních experimentech, aby poskytovaly buněčné interakce, extracelulární matrix a růstové faktory potřebné pro rozvoj jiných buněk, jako jsou embryonální kmenové buňky. Fibroblasty hrají také významnou roli při hojení ran. Proces hojení rány zahrnuje tři fáze: zánětlivou, proliferační a regenerační fázi, v nichž se fibroblasty aktivují a přeměňují na myofibroblasty. Myofibroblasty jsou vysoce kontraktilní typy buněk a klasicky se vyznačují expresí alfa-hladkosvalového aktinu (α -SMA), ale vykazují také zvýšenou regulaci fibronektinu a kolagenu a tvorbu stresových vláken. Myofibroblasty mají navíc rozsáhlé drsné endoplazmatické retikulum a jsou větší než fibroblasty. Fibroblasty jsou mnohostrannými hráči v řízení zdraví a nemocí, jako například fibrózy, artritidy a rakoviny. [54][55]

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V dnešní době se zájem o Pickeringovy emulze neustále zvyšuje. Důvodem je, že pevné částice, které stabilizují emulze, jsou biokompatibilní a netoxické, a poskytují dobrou stabilitu emulzím. Částice, které mají organický, anorganický a biologický původ, jsou šetrné k životnímu prostředí ve srovnání s povrchově aktivními látkami.

Pickeringovy emulze představují zajímavý výzkumný obor v oblasti koloidní chemie, kosmetického a farmaceutického průmyslu. Studuje se výběr vhodných stabilizačních částic pro Pickeringovy emulze. Jedním z nich je nanokrystalická celulóza, která je ideálním stabilizátorem při přípravě Pickeringových emulzí díky svým vlastnostem, např. nízké hustotě a ekologické udržitelnosti. [26] Ve studiích bylo prokázáno, že pro stabilizaci emulzí nanokrystalickou celulózą jsou dostatečné i velmi nízké koncentrace částic, je možné připravit i emulze s vysokou koncentrací vnitřní fáze (HIPPE). Získané emulze jsou vysoce stabilní. [57]

Pro stabilizaci emulzí se používá i oxid titaničitý. Ve studii Stillera a kol. byly zkoumány Pickeringovy emulze stabilizované různými typy povrchově modifikovaných částic oxidu titaničitého. Bylo zjištěno, že typ a stabilita emulzí závisí na smáčivosti použitých nanočástic, která může být kontrolována typem modifikace. [39]

Stabilizací emulzí pomocí částic biologického původu se zabývali Furtado a kol., kteří připravili emulze z hexadekanu a disperze *S. cerevisiae* ve vodě metodou míchání. Pomocí této metody získaly emulze s velikostí okolo 60 μm a mikroskopické snímky ukázaly, že buňky *S. cerevisiae* byly adsorbovány na mezifázovém rozhraní emulzních kapek. [49] Ve studii Firoozmanda a kol. byly emulze připraveny z disperzí *S. cerevisiae* nebo *Lactobacillus* a extra panenského olivového oleje. Pro dosažení stabilizace byl použit postup obyčejného míchání. Výsledkem jsou dlouhodobé stabilní emulze s velkým množstvím olejové fáze a s velikostí emulzních kapek vyšší než 100 μm . [57]

5 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerší na téma Pickeringových emulzí, konkrétně jejich fyzikálně-chemických vlastností. Hlavní část práce byla soustředěna na charakterizaci různých typů částic, které se dají pro stabilizaci použít. V této části byly popsány vlastnosti typů částic, jako jsou částice nanokrystalické celulózy, oxidu titaničitého a různé typy mikrobiálních buněk.

Praktická část mé bakalářské práce byla nejprve zaměřena na charakterizaci částic vhodných pro stabilizaci emulzí. Tyto částice byly charakterizovány pomocí měření zeta-potenciálu a velikosti částic. Částice byly následně použity pro přípravu a stabilizaci Pickeringových emulzí. Optimální formulace emulzí byly charakterizovány vhodnými fyzikálně-chemickými metodami a na závěr byla srovnána účinnost stabilizace emulzí pomocí různých druhů částic.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

Tato kapitola zahrnuje seznam použitých materiálů, chemikálií a potřebných přístrojů pro přípravu a charakterizaci emulzí typu O/V.

6.1 Přístroje a pomůcky

V této části jsou uvedené přístroje, které byly použity pro přípravu a charakterizaci částic i emulzí.

- Analytické váhy (VWR, Spojené státy americké/USA)
- Centrifugační zařízení (Hettich EBA-20, Německo)
- Digital Ultra-Turrax (IKA T25, Německo)
- Sonikační zařízení (Hielscher UP400St, Německo)
- Vortex (V-1 plus, Biosan, Lotyšsko)
- pH metr (CPH 51, Eltec, Spojené státy americké/USA + magnetické míchadlo Heidolph Hei-Mix S)
- Magnetická míchadla (Heidolph Hei-Mix S, Německo; MM4 Lavat Chotutice, Česká Republika)
- Mikroskop (Olympus CX21, Japonsko)
- Konfokální mikroskop (FLUOVIEW FV3000, Olympus, Japonsko)
- Zetasizer (Malvern Panalytical, Velká Británie)
- Kyveta pro měření zeta-potenciálu (DTS1070)
- Kyveta pro měření velikosti částic (DTS0012)
- Mastersizer 3000 (Malvern Panalytical, Velká Británie)
- Ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení (kádinky, odměrné baňky, pipety, odměrné válce, tyčinky, magnety, stojany, reagenční láhve s modrým uzávěrem, centrifugační zkumavky, vialky šroubovací)

6.2 Chemikálie a materiály

V rámci přípravy vzorků pro bakalářskou práci byly použity následující chemikálie a materiály:

- Nanokrystalická celulóza (CNC; Cellulforce, Kanada)
- Oxid titaničitý (TiO₂; Sigma Aldrich, Německo)
- Buněčná linie fibroblastů NIH/3T3 (USA)
- *Saccharomyces cerevisiae* (Sušené droždí, z lokálního supermarketu)
- *Lactobacillus casei* CCDM 422
- *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 963A
- *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* CCDM 717
- *Lactobacillus plantarum* CCDM 181
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCDM 66
- *Lactobacillus plantarum* CCDM 196
- *Lactobacillus fermentum* CCDM 154
- *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198
- Saboderm TCC RSPO MB (Caprylic/Capric triglyceride, ACE Trade; MCT olej)
- Hexadekan (Sigma Aldrich, Německo)

Pro přípravu disperzí bakterií a *Saccharomyces cerevisiae* byly použity:

- Destilovaná voda
- Fyziologický roztok
- Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (Biosera, Francie)

7 POUŽITÉ METODY

V této kapitole jsou popsány metody, které byly použity v experimentální části bakalářské práce. Nejprve byly připraveny disperze stabilizujících částic a následně emulze, které byly charakterizovány.

7.1 Příprava stabilizátorů

Stabilizátory jsou klíčovými složkami při přípravě emulzí. Jsou potřebné pro udržení stability a pomáhají zajistit, požadovanou funkčnost emulze. Níže jsou uvedeny postupy jejich přípravy.

7.1.1 Příprava disperze nanokrystalické celulózy

Pro přípravu 2% disperze byl navážen 1 g nanokrystalické celulózy, která byla dispergována v 50 ml destilované vody za stálého míchání po dobu 1 hodiny na magnetickém míchadle až do získání homogenní disperze. Dalším krokem byla sonikace dané disperze po dobu 3 minut při amplitudě 60 %. Proces sonikace byl použit k rozrušení agregátů nanokrystalické celulózy. Pro dosažení požadovaných vlastností emulze a zajištění optimální účinnosti emulgátoru disperze byla zředěna na koncentraci 1 hm.%.

7.1.2 Příprava disperze oxidu titaničitého

Pro přípravu disperze oxidu titaničitého bylo na analytických váhách naváženo 2,5 g TiO_2 a ten byl rozdispergován v 50 ml destilované vody. Tato disperze (5 hm.% TiO_2) byla dále zesonikována po dobu 30 minut při amplitudě 60 %. Sonikace byla použita ke snížení velikosti částic oxidu titaničitého a pro dosažení homogenní disperze. Následně bylo provedeno ředění TiO_2 na koncentraci 1 hm.%. Ředěním oxidu titaničitého byla zlepšena jeho schopnost emulgovat dvě nemísitelné kapaliny a byla snížena viskozita roztoku, která usnadňuje jeho rozptýlení v emulzi. Příliš vysoká koncentrace způsobuje tvorbu agregátů, které vedou ke snížení stability a homogenity emulze. Ředění také snižuje toxicitu a alergenicitu oxidu titaničitého, což je důležitým faktorem při výrobě kosmetických a farmaceutických prostředků, kde je vysoká toxicita a alergenita nežádoucí.

7.1.3 Příprava disperze *Saccharomyces cerevisiae*

Příprava disperze *Saccharomyces cerevisiae* probíhala tak, že bylo naváženo 5 g sušeného droždí a toto množství bylo rozdispergováno v 50 ml destilované vodě za stálého míchání až do získání homogenní disperze. Z takto připravené disperze byly připraveny emulze, nicméně při pozorování emulzních kapek pod mikroskopem nebylo zřejmé, zda je emulze stabilizována jednotlivými buňkami *Saccharomyces cerevisiae* nebo přídatnými látkami ze sušeného droždí. Proto v dalším kroku byla disperze *Saccharomyces cerevisiae* přečištěna. K přečištění disperze kvasinek byla použita centrifugace při 3500 rpm po dobu 10 minut. Polovina supernatantu byla po každé centrifugaci ze zkumavek odlita a nahrazena čerstvou destilovanou vodou. Tento krok byl opakován pětkrát, dokud nebyly získány čisté buňky *Saccharomyces cerevisiae*. Při použití disperze pro stabilizaci emulzí nebylo dosaženo požadovaného stabilizačního výsledku, proto byla destilovaná voda v přípravě *Saccharomyces cerevisiae* nahrazena pufrem PBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline). Na konec byla připravena disperze kvasinek o koncentraci 1 hm.% v PBS.

7.1.4 Příprava disperze bakterií

MRS bujón (bujón pro *Lactobacillus* podle DE MAN, ROGOSA a SHARPE) byl inokulován 0,2 % 24hodinové suspenze bakterií (0,5 MF – McFarland). Bakterie rodu *Lactobacillus* se nechaly pomnožit po dobu 48 h při 37 °C. K jejich přečištění byla použita centrifugace při 3500 rpm po dobu 30 minut. Po každé centrifugaci byla odstraněna polovina supernatantu a nahrazena fyziologickým roztokem o koncentraci 0,9 hm.%. Fyziologický roztok byl použitý, aby nedošlo k prasknutí buněk. Opakování daného kroku bylo provedeno třikrát. Při přípravě emulzí s připravenou disperzí nebyly získány stabilní emulze, pravděpodobně z důvodu zničení bakteriálních buněk. Proto byl zvolen modifikovaný postup, centrifugace byla provedena při 3000 rpm po dobu 5 min a fyziologický roztok byl nahrazen PBS. Tímto způsobem byla připravena 5% disperze bakterií, která byla následně ředěna na 1 hm.%.

7.1.5 Příprava disperze buněčné linie fibroblastů NIH/3T3

Buněčná suspenze byla připravena metodou trypsinizace. Plně narostlé buňky v 75ml kulturační baňce byly promyty 10 ml PBS. PBS byl odstraněn a nahrazen 3 ml trypsinu, který byl ponechán s buňkami po dobu 5 minut. Po 5 minutách byl trypsin deaktivován přidáním stejného množství čerstvého kulturačního média a buněčná suspenze byla odstředována po dobu 3 minut při 1100 rpm. Směs média a trypsinu byla opatrně odstraněna a byl přidán 1 ml

čerstvého média. V tomto okamžiku 1 ml buněčné suspenze obsahoval 2×10^7 buněk. Dalším krokem byly buňky homogenizovány a zředěny 19 ml čerstvého média, aby se dosáhlo konečné koncentrace 10^6 buněk na ml. Suspenze byla vyrobena celkem pětkrát. Pro použití připravené suspenze jako stabilizátoru Pickeringových emulzí bylo provedeno čištění buněčné linie. K přečištění byla použita centrifugace při 3000 rpm po dobu 3 minut. Po každé centrifugaci byla odstraněna polovina supernatantu a nahrazena PBS. Tento krok se opakoval třikrát, kde při poslední centrifugaci celý supernatant byl odstraněn a bylo přidáno určité množství PBS, aby výsledná koncentrace disperze byla 1 hm.%.

7.2 Příprava emulzí

Samotná příprava emulze není tak složitá, ale je důležité zajistit, aby byla emulze stabilní. Nejprve je nutné vybrat správné složky pro emulzi, tedy vodnou a olejovou fázi. Dalším krokem je zvolení vhodného způsobu jejich míchání. Níže budou uvedeny postupy, které byly použity při přípravě emulzí.

7.2.1 První fáze – vhodná homogenizační metoda

V první fázi experimentu bylo při přípravě emulzí stabilizovaných bakteriemi a buňkami *S. cerevisiae* vycházeno ze studie Firoozmanda a kol., kde metoda přípravy emulzí spočívala v míchání disperze vodné fáze na míchadle a postupném přikapávání olejové fáze. [57]

Jako první byl tedy vyzkoušen tento postup, kdy vodná disperze *Lactobacillus delbrueckii* (koncentrace 5 hm.%), nebo ostatních kmenů, byla míchána na magnetickém míchadle a k ní byla postupně přikapána olejová fáze tvořená MCT olejem, tak aby výsledná emulze byla v poměru O/V 50:50. Tímto postupem se nezdařilo připravit stabilní emulze. Proto byl k míchání emulze použit vortex, ale ani pomocí tohoto zařízení nebylo dosaženo požadovaných výsledků. Získaný systém nemohl být považován za emulzi, protože ihned po přípravě byly na stěnách vialky viditelné velké kapky olejové fáze a v krátkém časovém okamžiku nastala separace fází. Z tohoto důvodu byl zvolen jiný postup přípravy emulzí, kdy k emulgaci byl použit ultra-turrax (UT) i sonikátor (SON).

Sonikace je založena na principu vystavení olejové fáze vysokofrekvenčním ultrazvukovým vlnám. Tedy pomáhá rozdělit olejové kapky na menší částice. Tím se zvětší povrch olejových kapiček a umožní se snadnější promíchání s disperzí stabilizátoru. To vede k vytvoření stabilnější a homogennější emulze. [58] Ultra-turrax je přístroj, který se používá k

homogenizaci, míchání a disperzi látek v kapalném prostředí. Skládá se z motoru a konstrukční hřídele, na níž je umístěn rotor s velkým počtem lopatek. Kapky oleje jsou rozmíchány na velmi jemné částice v důsledku rychlého otáčení rotoru, které vytváří proud kapaliny. Výsledkem je systém, ve kterém jsou rovnoměrně rozptýleny částice. [59]

Emulze byly připraveny v poměrech O/V 10/90 a 20/80 a koncentracemi stabilizujících buněk 1 a 5 hm.%, před samotnou emulgací pomocí UT i SON byly vodná a olejová fáze promíchány pomocí vortexu (1 min). Emulze byly při použití UT míchány při různých otáčkách v rozsahu 9 000–22 000 rpm po dobu (1–10 min). Při sonikaci emulzí byla použita amplituda 60 %, čas sonikace 1 minuta, v případě potřeby byla sonikace zopakována. Ani takto připravené emulze nebyly příliš stabilní, a při pozorování pod mikroskopem bylo zřetelně vidět, že se buňky neabsorbovaly na fázové rozhraní. Při použití *S. cerevisiae* ke stabilizaci emulzí sonikací byly připraveny emulze, které byly poměrně stabilní, ale při pozorování systému pod mikroskopem, bylo zřejmé, že se buňky *S. cerevisiae* neúčastnily stabilizace. U *S. cerevisiae* byl zvolen postup jejich přečištění, protože dle článku Meirelles a kol. komerčně získané kvasnice obsahují přídavné stabilizující látky a emulgátory, které při přípravě emulzí stabilizují systém. To bylo prokázáno experimentem, kdy k přípravě emulzí byl použit supernatant, získaný při přečištění kvasinek. [47]

Poslední možností, která by mohla přispět k získání stabilnějších systémů, byla výměna olejové fáze. Místo MCT oleje byl zvolen hexadekan. A to z toho důvodu, že hexadekan má vyšší rozpustnost ve srovnání s MCT, což může zajistit vyšší stabilitu emulzí. Za druhé, hexadekan má vyšší viskozitu než MCT. Tato vlastnost může pomoci zabránit rozpadu emulzí tím, že bude vytvářet větší viskózní bariéru mezi vodnou a olejovou fází. Poslední faktor je teplotní stabilita. Hexadekan má vyšší teplotní stabilitu na rozdíl od MCT, a proto vede k menšímu rozpadu emulzí při vyšších teplotách. [60]

7.2.2 Druhá fáze – příprava emulzí

Po zkušenostech z první fáze experimentu byl pro přípravu emulzí zvolen následující postup. Do vialky byl navážen hexadekan jako olejová fáze, k ní byla přidána vodná fáze tvořená disperzí bakterií, popřípadě *S. cerevisiae*, myších fibroblastů, CNC nebo TiO₂ v koncentraci 1 hm%, poměr olejové a vodné fáze byl 10/90 a celkový objem emulze 10 g. Vodná a olejová fáze byly následně sonikovány při amplitudě 60 % po dobu 1 minutu. Tento krok se opakoval dvakrát. Takto připravené emulze byly charakterizovány metodami, které jsou popsány níže.

7.3 Charakterizace stabilizátorů a emulzí

Charakterizace stabilizátorů je důležitá z hlediska určení jejich vlastností a následného použití v různých aplikacích. U emulzí i částic byly sledovány parametry jako je jejich zeta-potenciál a velikost, u emulzí byl následně ještě sledován index krémování a mikrostruktura emulzí.

7.3.1 Měření zeta-potenciálu

Distribuce iontů v okolní mezifázové oblasti je závislé na formování čistého náboje na povrchu částice, čímž dochází ke zvýšení počtu iontů s opačným nábojem, než má částice v blízkosti povrchu. Kolem každé částice existuje elektrická dvojvrstva, která se skládá ze dvou částí. První část je vnitřní oblast, známá také jako Sternova vrstva. Obsahuje ionty, které jsou pevně vázány. Druhá část je vnější či difúzní. Tato oblast zahrnuje ionty, které jsou méně vázány a uvnitř dané vrstvy existuje hypotetická hranice, na které ionty a částice tvoří stabilní celek. Potenciál, který se na této hranici nachází, se nazývá zeta-potenciál (ZP). Jinými slovy ZP je rozdílem potenciálů mezi pohyblivým disperzním prostředím a stacionární vrstvou disperzního prostředí navázanou na dispergovanou částici. [61]

Stabilitu koloidního systému udává velikost ZP. Jestliže všechny částice v koloidní soustavě mají velký záporný nebo kladný zeta-potenciál, jsou schopny se vzájemně odpuzovat a nemají tendenci flokulovat. Za stabilní jsou považovány takové koloidní systémy, u kterých hodnota ZP bude kladnější než +30 mV nebo zápornější než -30 mV. Nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje zeta potenciál, je pH. [61]

Měření zeta-potenciálu bylo provedeno pomocí přístroje Zetasizer. Disperze nanokrystalické celulózy byla změřena tak, že do kádinky byly napipetovány 4 ml destilované vody a mikropipetou bylo přidáno 12 μ l disperze nanokrystalické celulózy. Vzniklá zředěná disperze byla důkladně promíchána a plastovou 2ml stříkačkou byla nadávkována do kyvety DTS1070. Stejným postupem byla připravena disperze oxidu titaničitého. V případě *Saccharomyces cerevisiae*, bakterií, buněčné linie fibroblastů NIH/3T3 a z nich připravených emulzí byly vzorky pro měření zeta-potenciálu připraveny následujícím způsobem. Do kádinky byly napipetovány 4 ml destilované vody a k nim bylo přidáno 250 μ l dané disperze či emulze. Stříkačkou byla zředěná disperze nebo připravená emulze nadávkována do kyvety. Dále byla kyveta vložena do přístroje a byly nastaveny příslušné parametry měření. Pro každý vzorek byly provedeny alespoň 3 měření.

7.3.2 Měření velikosti částic

Klíčovým parametrem koloidních systémů je jejich velikost. Měření velikosti částic pomocí přístroje Zetasizer je založeno na dynamickém rozptylu světla (DLS). Dynamický rozptyl světla, známý také jako fotonová korelační spektroskopie (PCS), měří Brownův pohyb a vztahuje jej k velikosti částic. Princip je takový, že se částice osvětlí laserem a analyzují se fluktuace intenzity rozptýleného světla. Částice se v roztoku neustále pohybují v důsledku Brownova pohybu, což způsobuje, že se pohybuje i skvrnitý vzor. Konstruktivní a destruktivní sčítání fází rozptýleného světla způsobuje, že světlé a tmavé oblasti získávají a ztrácejí intenzitu, což se projevuje jako kolísání intenzity v určitém bodě. Přístroj Zetasizer měří rychlost těchto kolísání a na základě těchto informací pak vypočítá velikost částic. [61]

Pro měření velikosti částic oxidu titaničitého byl do plastové kyvety DTS0012 s uzávěrem napipetován 1 ml destilované vody a bylo přidáno 3,5 μ l této disperze. Vzniklá zředěná disperze byla důkladně promíchána. Obdobně byl připraven vzorek nanokrystalické celulózy. Pokud jde o *Saccharomyces cerevisiae*, bakterie a fibroblasty, byly vzorky pro měření velikosti částic připraveny dále uvedeným způsobem. Do kyvety byl napipetován 1 ml disperzí o koncentraci 5 hm%, kyveta byla uzavřena a vložena do přístroje. Pro měření byly zadány následující parametry: index lomu polysacharidu $n=1,33$; index lomu proteinu $n=1,45$; index lomu disperzního prostředí $n=1,33$. Měření probíhalo pod detekčním úhlem 90° a při teplotě 25°C ve třech opakováních. Pro každý vzorek byly provedeny alespoň 3 měření.

7.3.3 Mikroskopie

Mikroskopie je důležitou metodou pro charakterizaci koloidních systémů. Během přípravy těchto systémů se často používají různé metody, jako je homogenizace nebo ultrazvuková dispergace pro dosažení požadované velikosti a distribuce částic. Mikroskopie umožňuje posoudit funkčnost těchto metod a ověřit, jestli jsou požadavky na velikost a distribuci částic splněny. Kromě toho mikroskopické metody umožňují pozorovat interakce mezi částicemi.

7.3.3.1 Optická mikroskopie

Optický mikroskop je přístroj, který umožňuje rozeznat struktury, které nelze pozorovat pouhým okem. Optická mikroskopie je založená na principu procházení světla optickým systémem, který se skládá z objektivu a okuláru. Světlo, které projde přes objektiv, se zobrazí na okuláru. Objektiv, v tomto případě, funguje jako lupové sklo, které zvětšuje obraz, zatímco

okulár umožňuje pozorovat tento obraz. Detaily objektu se stanou viditelnými díky rozlišovací schopnosti mikroskopu, které závisí na jeho konstrukci a použitém světle. [62]

Disperze a některé emulze byly pozorovány pomocí optického mikroskopu Olympus CX21. Na podložní sklíčko bylo napipetováno 10 μl vzorku disperze nebo emulze a ty byly překryty krycím sklíčkem. Vzorky byly pozorovány při zvětšeních 40x, 100x, 200x a 400x.

7.3.3.2 Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskop se nejčastěji používá pro zobrazování vzorku s vysokým rozlišením a vysokou kontrastností. Konfokální mikroskopie vychází z principu skenování vzorku pomocí laserového paprsku a získávání informací pouze z jednoho ohniska nebo konfokálního bodu. Laserový paprsek, který projde skrz objektiv, se zaměřuje na jedno místo vzorku, zatímco ostatní oblasti zůstávají tmavé. Rozptýlené nebo odrážené světlo z tohoto bodu je zachyceno před okulárem, a tím jsou eliminovány signály ze světla, které z tohoto bodu nevycházejí. Po tomto kroku se laser posune na další bod, ve kterém zopakuje daný postup, dokud nebude celý vzorek naskenován. [62]

Konfokální mikroskop FLUOVIEW FV3000 byl použit pro stanovení struktury disperzí stabilizujících částic a emulzí. Na podložní sklo bylo napipetováno 10 μl vzorku disperze nebo emulze a ty byly překryty krycím sklíčkem. Vzorky emulzí stabilizovaných nanokrystalickou celulórou byly naředěny 4x. Pozorování byla provedena při zvětšeních 40x, 100x, 400x a 600x. Pořízené snímky byly upraveny pomocí programu ImageJ.

7.3.4 Měření velikosti emulzních kapek

Měření velikosti emulzních kapek bylo provedeno na přístroji Mastersizer 3000, který využívá techniku laserové difrakce. Principem této metody je měření úhlové změny intenzity rozptýleného světla. Velké částice rozptylují světlo pod malými úhly vzhledem k laserovému paprsku a malé částice rozptylují světlo pod velkými úhly. Měření probíhá v rozmezí od 10 nm do 3,5 mm a rozměr částic se vyjadřuje jako objemový ekvivalent průměru koule. [63]

Měření velikosti emulzních kapek bylo provedeno pomocí jednotky „Hydro“, která je naplněna demineralizovanou vodou, ve které se disperguje vzorek. Jednotka „Hydro“ je opatřena míchadlem, jehož otáčky byly nastaveny na 2200 ot./min. Měření probíhalo při 25 °C, a parametry měření byly následující: absorbance emulzních kapek byla nastavena na hodnotu

0,001 a refrakční index na hodnotu 1,421. Každý vzorek byl proměřen třikrát a výsledná hodnota byla vyjádřena jako průměrná hodnota. Výsledky udávající velikost kapek jsou uvedeny jako objemově vážený průměr $D(4;3)$ v μm .

7.3.5 Index krémování

Index krémování (Creaming Index) je fyzikální parametr, který udává schopnost emulze udržet stabilní rovnoměrné rozložení částic v celém objemu emulze. Index krémování byl stanoven podle rovnice [6]:

$$CI = \frac{H_{\text{krém}}}{H_{\text{celk}}} \times 100 [\%] \quad [6]$$

kde:

$H_{\text{krém}}$ je výška vrstvy krémování v emulzi [mm]

H_{celk} je celková výška emulze [mm]

7.3.6 Vizuální pozorování

Vizuální pozorování je jednoduchou a rychlou metodou kontroly vlastností emulze. Poskytuje informaci o stabilitě, textuře a barvě emulze. Pozorování bylo prováděno před černým pozadím, přičemž byly pořízeny fotografie mobilním telefonem.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato kapitola je klíčovou částí bakalářské práce, kde jsou prezentovány a diskutovány výsledky. Nejprve je uvedena charakterizace jednotlivých stabilizátorů, konkrétně velikost částic a zeta-potenciál, a jejich srovnání mezi sebou. Dále je popsána charakterizace emulzí: velikost emulzních kapek, jejich distribuce, zeta-potenciál, index krémování a mikroskopie.

8.1 Charakterizace stabilizujících částic

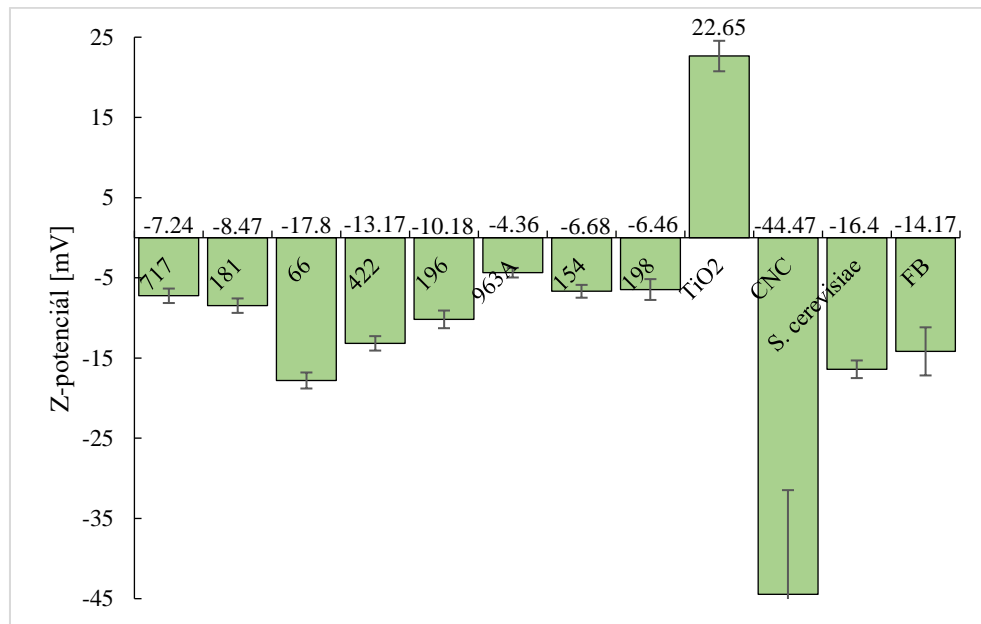
Při přípravě emulzí je charakterizace stabilizujících částic důležitá pro pochopení jejich mechanismu stabilizace emulzí.

8.1.1 Velikost částic a zeta-potenciál

Jako částice stabilizující Pickeringovy emulze byly vybrány částice různého původu, jak organického, anorganického, tak biologického. Konkrétně byly vybrány částice nanokrystalické celulózy, oxidu titaničitého, buněčné linie fibroblastů, různé druhy bakterií rodu *Lactobacillus*, a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Před samotnou charakterizací částic bylo nutné přechistit mikrobiální buňky i buňky *S. cerevisiae* a myší fibroblasty (FB), tak aby jejich suspenze neobsahovala zbytky bujónu, média či přídatných látek z komerčních kvasnic.

V prvním kroku bylo u disperzí částic změřeno pH. Bylo zjištěno, že pH vodné disperze oxidu titaničitého se pohybuje v kyselé oblasti a nese hodnotu pH 2,6. Stejně tak bakterie rodu *Lactobacillus* mají mírně kyselé pH v rozmezí 3,5 až 5,5. Tato kyselost je dána jejich schopností metabolizovat cukry, které jsou obsaženy v jejich prostředí, a produkovat kyselinu mléčnou jako vedlejší produkt fermentace (viz. kap. 3.4.). [52] Stejně jako laktobacily mají mírně kyselé pH i *S. cerevisiae*. Jejich pH je 5,2. Naopak, celulóza má pH 6,2, což znamená, že je neutrální. Co se týče vodné disperze fibroblastů, tak jejich hodnota pH 7,4, což je blízko pH krve a dalších tělních tekutin, které jsou také neutrální.

Následně byly částice charakterizovány pomocí zetasizeru, kdy byla změřena velikost stabilizujících částic a jejich zeta-potenciál (ZP). Na obrázcích 6 a 7 můžete vidět výsledky měření.



Obrázek 6: Zeta-potenciál jednotlivých stabilizátorů.

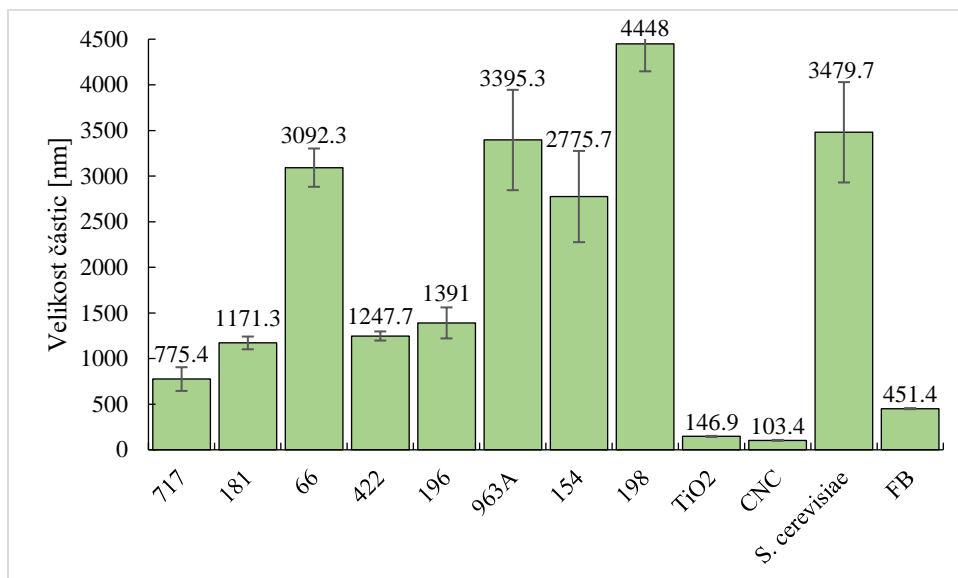
Pro porovnání hodnot zeta-potenciálu je důležitá absolutní hodnota a to, zda je hodnota kladná či záporná. Absolutní hodnota ZP vyjadřuje míru elektrostatického odpuzování mezi částicemi v disperzi. Vyšší absolutní hodnota naznačuje silnější odpudivou sílu mezi částicemi, a to vede ke stabilitě disperzního systému. Naopak, nižší hodnota zeta-potenciálu poskytuje vyšší pravděpodobnost vzniku shluků a agregátů. Z obrázku 6 lze vidět, že největší hodnotu zeta-potenciálu má nanokrystalická celulóza ($|44,47|$ mV), a proto je její koloidní stabilita nejvyšší. Nejnižší hodnotu zeta-potenciálu má *Lactobacillus rhamnosus* (963A; $|4,36|$ mV).

Znaménko ZP indikuje povahu náboje na povrchu částic. Záporný zeta-potenciál naznačuje, že povrch částice je nabitý záporně, zatímco kladný ZP naopak. Znaménko je nezbytné pro interakce mezi částicemi v disperzi. Částice s opačnými náboji se přitahují, což přispívá k nestabilitě disperzního systému. Ze sloupcového grafu na obrázku 6 lze vidět, že všechny stabilizátory, kromě TiO₂, mají zápornou hodnotu zeta-potenciálu. Naopak kladný zeta-potenciál odpovídá oxidu titaničitému.

Velikost stabilizujících částic ovlivňuje velikost emulzních kapek a stabilitu emulze, a proto by měla být menší, než je předpokládána/požadovaná velikost emulzních kapek. Čím menší jsou částice stabilizátoru, tím více se rozptýlí na rozhraní a jsou více schopny vytvořit tenčí vrstvu kolem emulzních kapek. (viz. Kap. 3) [21]

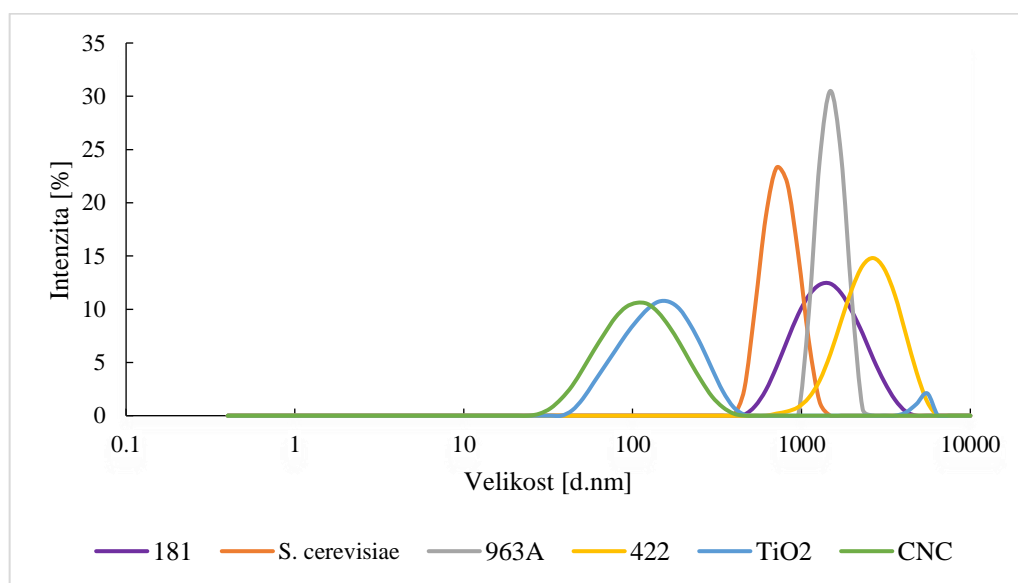
Z obrázku 7 vyplývá, že nejmenší velikost stabilizujících částic má nanokrystalická celulóza. Její velikost je 103,4 nm. V literatuře je velikost nanokrystalické celulózy uváděna od 100 nm do několika mikrometrů, což odpovídá naměřené hodnotě. [64] S nevelkým rozdílem se pohybuje velikost částic oxidu titaničitého, který má velikost 146,9 nm. Dále v rozmezí 450 až 1500 nm se nacházejí fibroblasty, *Lactobacillus sakei* (717), *Lactobacillus plantarum* (181), *Lactobacillus casei* (422) a *Lactobacillus plantarum* (196). V rozsahu 2500–3500 nm se pohybuje velikost částic *Lactobacillus fermentum* (154), *Lactobacillus delbrueckii* (66), *Lactobacillus rhamnosus* (963A) a *S. cerevisiae*. Největší velikost stabilizující částic má kmen 198 (*Lactobacillus casei*), jeho velikost je 4448 nm.

Velikost částic bakterií rodu *Lactobacillus* může být ovlivněna několika faktory. Jako první faktor lze uvést druh bakterie, což znamená, že jednotlivé druhy daného rodu se liší fyziologií, metabolickými vlastnostmi a morfologií, a to může ovlivnit i jejich velikost. Za druhé, rod *Lactobacillus* může mít odlišné velikosti částic v závislosti na fázi růstu, ve které se nachází a kde se mění jeho metabolická aktivita a rychlost dělení. V neposlední řadě nelze zapomínat na podmínky kultivace. Parametry jako teplota, pH a přístup kyslíku mohou mít také vliv na růst a morfologii bakterií, a tedy i na velikost jejich částic. V literatuře jsou popsány velikosti buněk různých druhů *Lactobacillus*, ale zde budou uvedeny jen některé z nich. Velikost buněk *Lactobacillus casei* se pohybuje v rozšahu 2–4 μm . [65] Stejně jako *Lactobacillus casei*, má velikost částic 2 až 4 μm na délku i *Lactobacillus rhamnosus*. [66] Buňky *Lb. plantarum* jsou obvykle 3–8 μm dlouhé. [67] Podobné rozměry mají i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 2 až 9 μm . [68] Celkově lze říct, že naměřené hodnoty odpovídají hodnotám z literatury. Mírně se liší velikost bakterie *Lb. plantarum*. Možným důvodem rozdílu je rozbití shluků buněk bakterií centrifugací.



Obrázek 7: Velikost částic jednotlivých stabilizátorů.

Dalším krokem bylo porovnání distribuce velikosti částic. Na obrázku 8 lze vidět, že vybrané stabilizátory mají monodisperzní distribuční křivku. Nejmenší velikost částic má CNC a TiO₂, u kterých se pohybuje v blízkosti hodnoty 100 nm. Naproti tomu největší velikosti dosahují bakterie rodu *Lactobacillus*, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 1500 až 3000 nm.



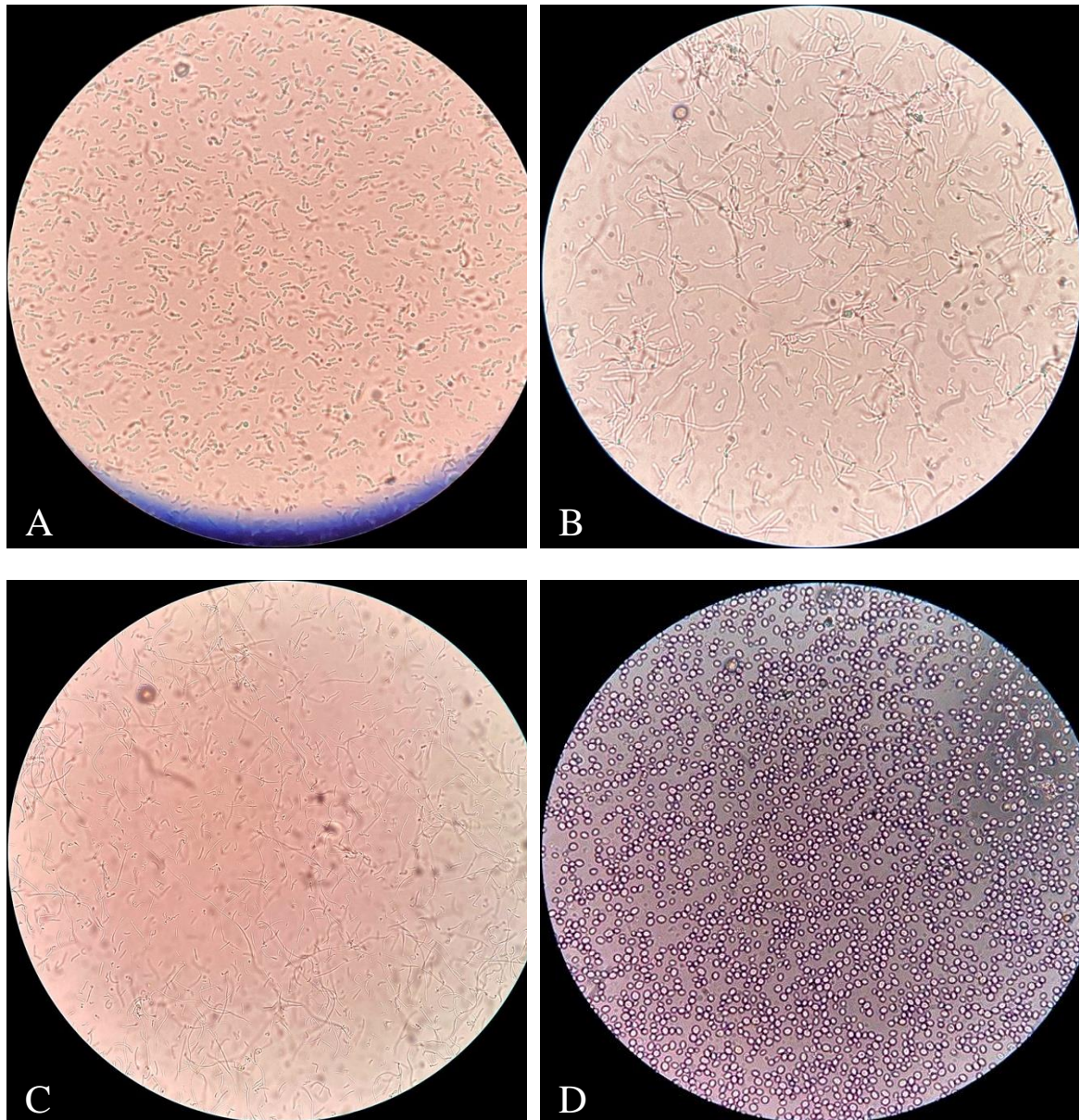
Obrázek 8: Graf rozložení velikosti podle intenzity jednotlivých stabilizátorů.

Dále bylo provedeno porovnání na základě PDI indexů jednotlivých stabilizátorů. PDI (Polydispersity Index) je index vyjadřující míru polydisperzity částic nebo molekul v disperzním systému. Hodnota PDI indexu se pohybuje v rozsahu hodnot 0 až 1. Přičemž pokud je

hodnota PDI 0, částice obsažené ve vzorku jsou perfektně uniformní, v případě že se hodnota PDI blíží 1, značí to vysoce polydisperzní vzorek s více velikostmi částic. Nejvyšší PDI má kmen 963A (*Lactobacillus rhamnosus*). Jeho hodnota je 0,469 a jeho buňky jsou tedy nejvíce polydisperzní. Na druhém místě je oxid titaničitý s PDI 0,306. Ostatní částice jako CNC, *Lactobacillus plantarum* (181), *Saccharomyces cerevisiae* a kmen 422 (*Lactobacillus casei*) mají indexy polydisperzity v rozsahu 0,176–0,276.

8.1.2 Mikroskopie

Pro porovnání tvaru a velikosti bakterií rodu *Lactobacillus* a kvasinek *S. cerevisiae* byla použita mikroskopie. Na obrázku 9 můžete vidět tvar a řetězení jednotlivých druhů *Lactobacillus*, konkrétně *Lactobacillus sakei* (717), *Lactobacillus casei* (422), *Lactobacillus rhamnosus* (963A), a kvasinek *S. cerevisiae*.



Obrázek 9: Tvar a velikost buněk A. *Lb. sakei* (717), B. *Lb. casei* (422), C. *Lb. rhamnosus* (963A), D. *S. cerevisiae* (400x).

Obecně mají gram-pozitivní bakterie *Lactobacillus* tvar tyčinek, nazývaný také bacilární tvar. Tyčinky mohou být různých délek a šířek v závislosti na konkrétním druhu bakterií *Lactobacillus*. [51] Z obrázku 9A je vidět, že buňky *Lb. sakei* (717) mají tvar tyčinky nebo válcovité buňky. Vyskytují se jako jednotlivé buňky, občas ve formě krátkých řetězců. Řetězce mohou obsahovat několik buněk, které jsou navzájem spojeny, a mohou vytvářet lineární strukturu. Velikost druhu 422 (*Lactobacillus casei*) se pohybuje v rozmezí 0,7–1,1 μm podle šířky a 2,0–4,0 μm podle délky. [65] Na obrázku 9B je znázorněn jeho tvar a řetězení. Bakterie jsou ve tvaru tyčinek, často se čtvercovými konci. Mají tendenci tvořit řetízky. Tyto řetězce mohou stejně jako řetězce *Lactobacillus sakei* vytvářet lineární struktury.

Lactobacillus rhamnosus má tyčinkový tvar, kde tyčinky mají délku obvykle mezi 2,0 až 4,0 μm a šířku mezi 0,8 až 1,0 μm . Co se týče řetězení, bakterie *Lactobacillus rhamnosus* (Obr. 9C) se obvykle vyskytuje v podobě jednotlivých buněk, v párech nebo v krátkých řetězcích. [66] *S. cerevisiae* (Obr. 9D) mají kulovitý až elipsoidní tvar. Jejich velikost je obvykle do 10 μm . Tyto buňky existují samostatně a jednotlivě, nevytvářejí viditelné řetězce.

9 CHARAKTERIZACE EMULZÍ

Charakterizace emulzí poskytuje informaci o jejich stabilitě a identifikuje faktory, které mohou tuto stabilitu ovlivnit.

9.1 První fáze – volba přípravy emulzí

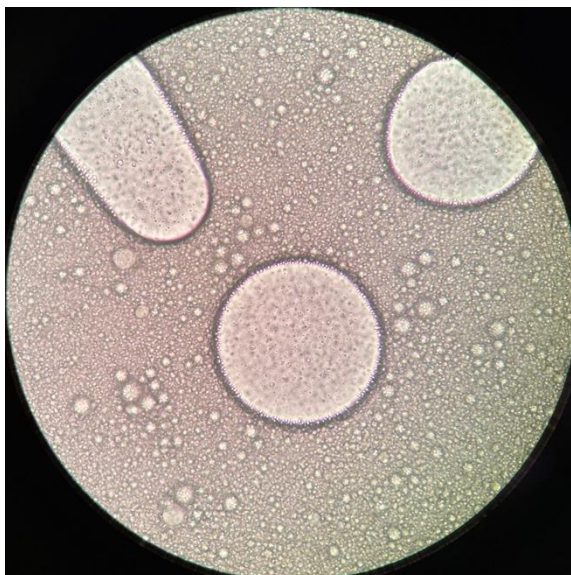
V první fázi byl proveden výběr vhodné emulgační metody pro přípravu emulzí. Jako první byl použit postup přípravy emulzí metodou míchání a postupného přikapávání olejové fáze podle studie Firoozmunda a kol. [57] Tímto postupem se ale nepodařilo připravit stabilní emulze, protože po jejich přípravě byly na stěnách vialky viditelné velké kapky olejové fáze a následně nastala separace fází. Na obrázku 10 lze vidět, jak vypadá emulze ihned po přípravě a jakou má mikrostrukturu. Emulze byla připravena z disperze bakterií 717 (*Lb. sakei*) a MCT, v poměru olej-voda 50:50, metodou míchání a přikapávání. Emulze obsahuje výrazně větší kapky oleje MCT, které jsou zřetelně viditelné pouhým okem a u kterých dochází k okamžité koalescenci vedoucí k separaci fází. Na fotografii z optického mikroskopu jsou viditelné mále emulzní kapky, ale také velké množství volného oleje.



Obrázek 10: Vzorek a struktura emulze připravené z 717 (*Lb. sakei*) (400x).

Proto byl vybrán jiný postup přípravy emulze, při kterém byl k emulgaci použit ultra-turrax i sonikátor. Velké mechanické namáhání a silné míchání ultra-turraxu vedlo pravděpodobně k narušení struktury částic stabilizátoru a deformaci emulzních částic, což buď bránilo vzniku emulze nebo snižovalo její stabilitu. Proto byl zvolen pro přípravu emulzí sonikátor,

díky kterému se povedlo připravit emulze, ale jejich stabilita byla nízká. Při použití *S. cerevisiae* pro stabilizaci emulzí bylo při mikroskopickém pozorování emulzní struktury zjištěno, že se buňky neúčastní stabilizace mezifázového rozhraní a emulze je pravděpodobně stabilizována přídatnými látkami, které pocházejí z droždí (Obr. 11). Proto bylo jako další krok zvoleno přečištění, u *S. cerevisiae* byla pro jejich přečištění zvolena destilovaná voda, což ale způsobilo prasknutí buněk. Proto byla destilovaná voda nahrazena PBS, protože tento pufr poskytuje optimální podmínky pro udržení buněčné integrity, funkce a stability. Pro dosažení stabilních emulzí byla provedena výměna olejové fáze. Místo MCT oleje byl použit hexadekan, který má lepší vlastnosti pro přípravu emulze, jak bylo popsáno výše (viz. kap. 6.2.1).



Obrázek 11: Struktura emulze připravené ze supernatantu *S. cerevisiae* (400x).

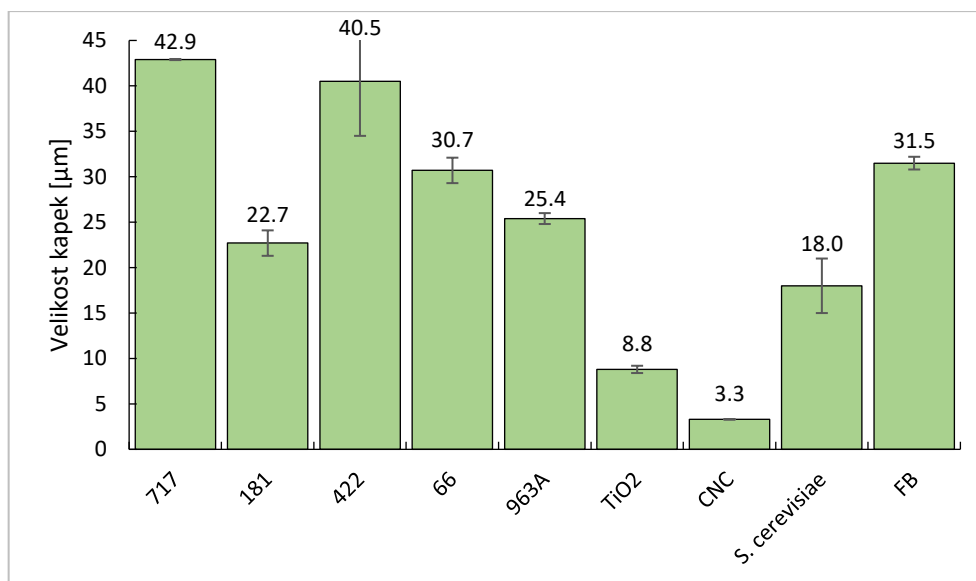
9.2 Druhá fáze – srovnání stabilizace emulzí

Ve druhé fázi bylo provedeno srovnání emulzí mezi sebou na základě velikosti emulzních kapek, zeta-potenciálu, indexu krémování a mikroskopie.

9.2.1 Velikost emulzních kapek

Velikost emulzních kapek má vliv na stabilitu emulze a migrační schopnost kapek, což je pro zachování dlouhodobé stability emulze důležité. Menší kapky jsou stabilnější díky jejich většímu povrchu, který umožňuje lepší dispergaci emulgované fáze a snižuje riziko srážení. Velikost emulzních kapek také ovlivňuje texturu a konzistenci emulzí. Větší kapky tvoří

hrubší strukturu, zatímco menší kapky mohou vytvářet jemnější a hladší texturu. Na obrázku 12 můžete vidět sloupcový graf srovnání velikosti kapek emulzí, které byly připraveny pomocí různých stabilizujících částic. Velikost emulzních kapek byla změřena pomocí přístroje Mastersizer 3000, a je vyjádřena jako parametr D [4, 3]. K přípravě emulzí byly použity částice v koncentraci 1 hm%, poměr O/V byl 10:90, a jako olejová fáze byl použit hexadekan.



Obrázek 12: Velikost emulzních kapek.

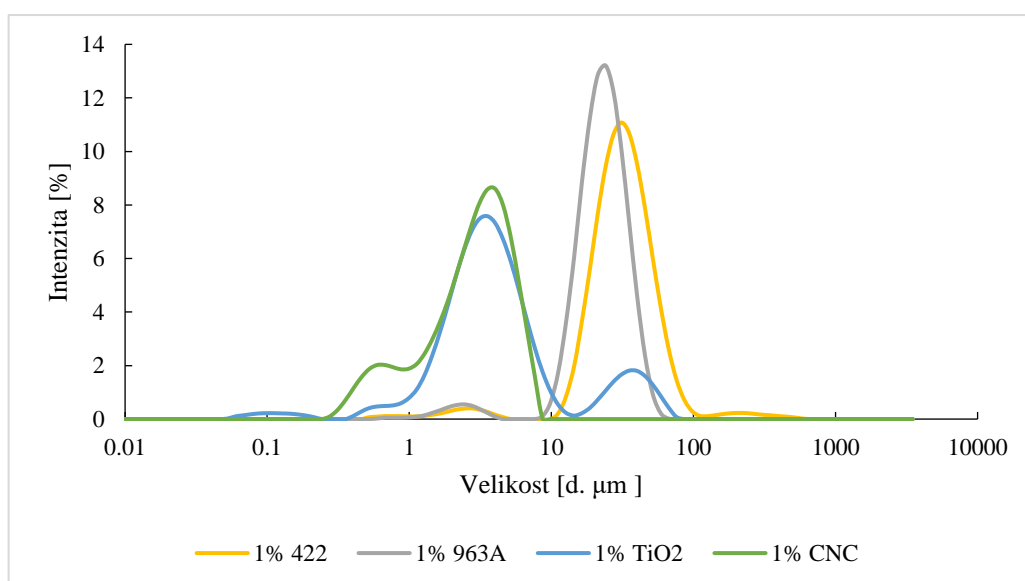
Nejmenší velikost kapiček emulze byla naměřena u emulze stabilizované disperzí nanokrytalické celulózy, její velikost je 3,3 µm. Emulze, která byla stabilizována disperzí oxidu titaničitého, má o něco větší velikost, a to 8,8 µm. Velikost emulzních kapek u emulzí, které byly připraveny z disperzí *Lactobacillus plantarum* (181), *Lactobacillus rhamnosus* (963A), *Lactobacillus delbrueckii* (66) a myších fibroblastů, se nachází v rozmezí 20 až 35 µm. Velikost 40,5 µm byla naměřena u emulze stabilizované disperzí *Lactobacillus casei* (422). Největší velikost kapek emulze je zjištěna u emulze, která byla stabilizována pomocí disperze *Lactobacillus sakei* (717), 42,9 µm.

Pro umožnění účinného pokrytí mezifázového rozhraní by měl být průměr adsorbovaných částic mnohem menší než velikost kapiček. (viz. Kap. 3) [21] Proto jsou mnohem lepší stabilizátory CNC a TiO₂, které mají velikost 103 nm a 147 nm, což je menší než velikost bakterií a *S. cerevisiae*. Pokud srovnáme buňky, tak nejlepší stabilizační účinnost by měly mít buňky myších fibroblastů, protože jejich velikost je kolem 451 nm, nebo bakterie *Lb. plantarum* o velikosti částic 1171 nm. Nicméně velikost emulzních kapek stabilizovaných

pomocí myších FB byla větší než například u emulzí stabilizovaných kmeny 181 a 963A. Je možné, že při sonikaci emulzí došlo k rozrušení řetězků tyčinek, a ty tak měly možnost se lépe adsorbovat na fázové rozhraní a lépe stabilizovat emulze.

Nicméně u některých druhů bakterií (např. *Lb. casei*), může být obtížné dosáhnout požadovaného stabilizačního účinku kvůli agregaci buněk nebo jejich schopnosti vytvářet řetězce, které mohou ovlivnit fyzikální vlastnosti emulze. Pokud je spojení buněk v řetězci pevné a nedojde k jeho narušení v průběhu sonikace, tak může řetězení nebo tvorba shluků zvýšit viskozitu vodné fáze a tím dochází ke zhoršení její dispergace během emulgace, což následně vede k nízké stabilitě emulze.

Následně bylo provedeno porovnání distribuce velikosti emulzních kapek. Na obrázku 13 můžete vidět, že distribuce emulzí stabilizovaných druhy bakterií 963A a 422, a pomocí TiO_2 jsou bimodální. První pík u 963A (*Lb. rhamnosus*) a 422 (*Lb. casei*) pravděpodobně ukazuje velikost buněk neabsorbovaných na fázové rozhraní, další pík představuje velikost emulzních kapek. Důvodem prvního píku může být příliš velká koncentrace částic stabilizátoru v emulzi. Distribuce emulze stabilizované TiO_2 ukazuje to, že emulze obsahuje dvě populace emulzních kapek, kde jedna populace představuje kapky s menší velikostí dobře stabilizované TiO_2 a druhá populace bude tvořena velkými kapkami olejové fáze, které nejsou tak dobře pokryty stabilizátorem. Distribuce emulze stabilizované CNC má monomodální charakter s velmi malými emulzními kapkami, což může znamenat, že emulze připravená z CNC je stabilní a neobsahuje volné částice daného stabilizátoru.

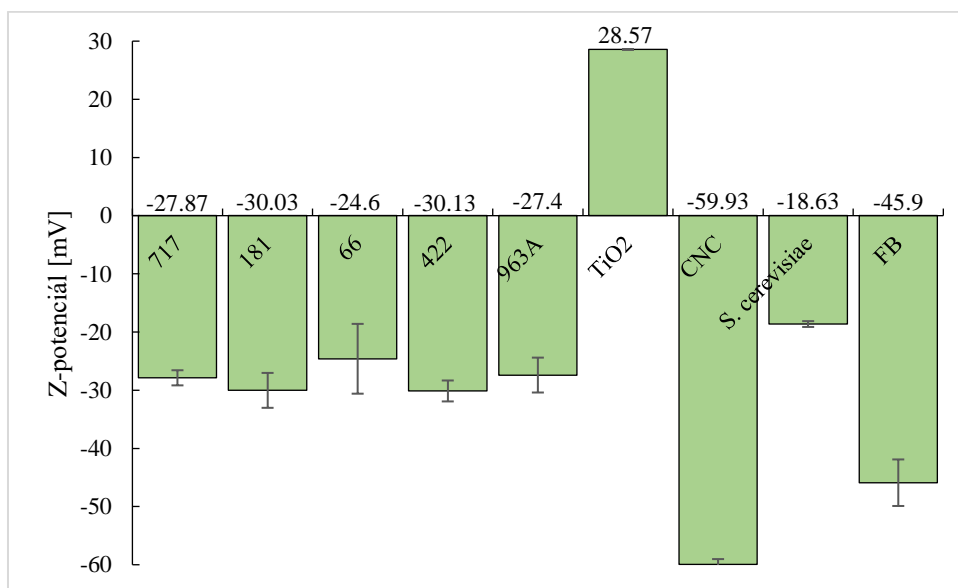


Obrázek 13: Graf rozložení velikosti emulzních kapek podle intenzity.

9.2.2 Zeta-potenciál

Emulze byly dále charakterizovány měřením zeta-potenciálu emulzí. Emulze s hodnotami zeta-potenciálů vyššími/nížšími než ± 30 mV mohou být považovány za stabilní.

Na obrázku 14 lze vidět sloupcový graf hodnot zeta-potenciálu emulzí stabilizovaných různými částicemi a bakteriemi. Nejvyšší hodnotu zeta-potenciálu má emulze, která byla připravena z nanokrystalické celulózy, a to -59,93 mV. Na druhém místě je emulze, která byla stabilizována myšími fibroblasty, s hodnotou ZP -45,9 mV. Přibližně stejnou hodnotu zeta-potenciálu mají emulze připravené z bakterií *Lb. casei* (422; -30,13 mV) a *Lb. plantarum* (181; -30,03 mV). V rozmezí hodnot ZP -25–(-30) mV se nacházejí emulze, které byly připraveny z disperzí *Lb. delbrueckii* (66), *Lb. rhamnosus* (963A) a *Lb. sakei* (717). Nejnižší hodnotu zeta-potenciálu má emulze stabilizovaná *S. cerevisiae*, a to -18,63 mV. Kladná hodnota zeta-potenciálu byla naměřena u emulzí stabilizovaných TiO_2 , kde hodnota ZP byla 28,6 mV. Ve výsledku lze říct, že téměř všechny emulze mají hodnotu ZP kolem ± 30 mV, což znamená, že emulze můžeme považovat za stabilní.



Obrázek 14: Zeta-potenciál emulzí.

9.2.3 Index krémování a vizuální pozorování emulzí

Kinetická stabilita emulzí může být popsána pomocí indexu krémování, který nepřímou podává informaci například o flokulaci emulzních kapek. Index krémování odpovídající hodnotě 100 % znamená, že emulze je kineticky stabilní. V tabulce 1 jsou znázorněny příslušné indexy krémování emulzí v poměru O/V 10:90, které byly připraveny z různých částic a

bakterií. Při srovnání indexů krémování je zřejmé, že všechny emulze nejsou kineticky stabilní. To dokazuje i vizuální porovnání emulzí (obrázek 15), kdy u některých formulací je jasně viditelná krémová fáze v horní části, a oddělená vodná fáze ve spodní části vialky.

Nejvyšší index krémování, a tedy nejvyšší kinetickou stabilitu, má emulze, která byla stabilizována disperzí nanokrystalické celulózy. Výška krémové fáze vzhledem k výšce celé emulze je 95 %. Nejnižší index krémování se vztahuje na emulzi, která byla připravena z disperze myších fibroblastů (1 hm.%), její hodnota CI je 23,8 %.

Tabulka 1: Indexy krémování emulzí.

	Emulze						
	CNC	TiO ₂	FB	422	963A	66	<i>S.cerevisiae</i>
CI [%]	95,5	90,0	23,8	27,3	27,3	30	68,2

Co se týče vizuálního vyhodnocení, na obrázku 15 jsou zobrazeny vzorky emulzí, které byly připraveny z částic o koncentraci 1 hm%, s poměrem O/V 10:90 a hexadekanem jako olejovou fází.

Na obrázku 15A lze vidět emulzi, která byla stabilizována nanokrystalickou celulórou. Emulze má bílou či mléčnou barvu a viskózní konzistenci.

Na dalším obrázku 15B je možno pozorovat emulzi z oxidu titaničitého. Samotný oxid titaničitý je bílý, a proto i emulze, která byla připravena z TiO₂, má také bílou či mléčnou barvu, tudíž bylo obtížné pozorovat homogenitu emulze nebo její krémování.

Emulze připravená z myších fibroblastů, která je na obrázku 15C, nemá výraznou barvu, ale má zakalený vzhled. U této emulze byla pozorována rychlá separace na vodnou a krémovou fázi.

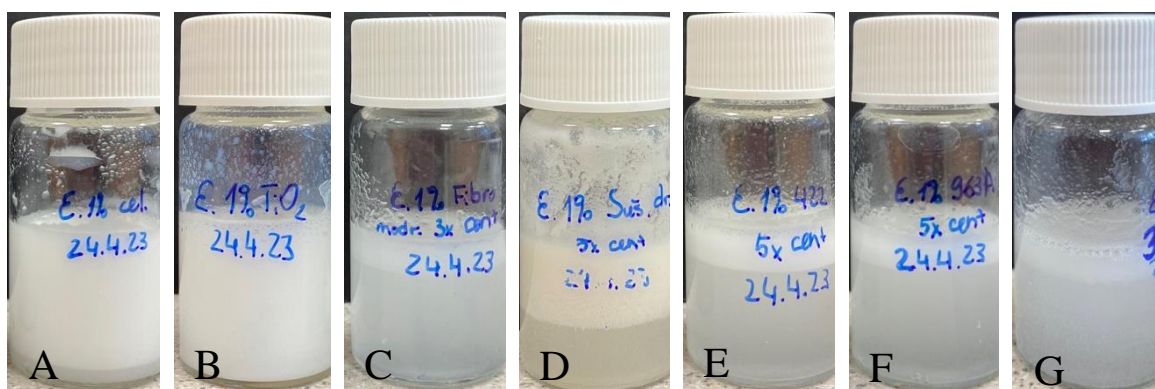
Na obrázku 15D lze vidět emulzi stabilizovanou *Saccharomyces cerevisiae*. Tato emulze má zvláštní barvu, je světle žlutá až slámově žlutá. Intenzita barvy je ovlivněna koncentrací buněk. Má viskózní konzistenci. Její krémová část je větší než krémová část emulzí stabilizovaných buňkami bakterií.

Emulzi připravenou z bakterie 422 (*Lb. casei*) můžete vidět na obrázku 15E. Daná emulze má, ve srovnání s ostatními emulzí stabilizovanými buňkami bakterií, výraznější bílou

barvu, a její vodná fáze je zakalená. U této emulze byly viditelné kapky nezaemulgované olejové fáze.

Na obrázku 15F je vidět emulzi, která byla stabilizována buňkami bakterie *Lactobacillus rhamnosus*. Vypadá téměř stejně jako emulze 13E. Má bílou barvu, tekutou konzistenci a viditelné kapky oleje.

Poslední emulze (Obr. 15G) byla připravena z disperze bakterie 66 (*Lb. delbrueckii*). Tato emulze vypadá stejně jako emulze z myších fibroblastů. Má nevýraznou bílou barvu a viditelný zákal ve vodné fázi. U této emulze byly nejvíce viditelné velké kapky olejové fáze na stěnách vialky a téměř okamžitý rozpad na vodnou a olejovou fázi.

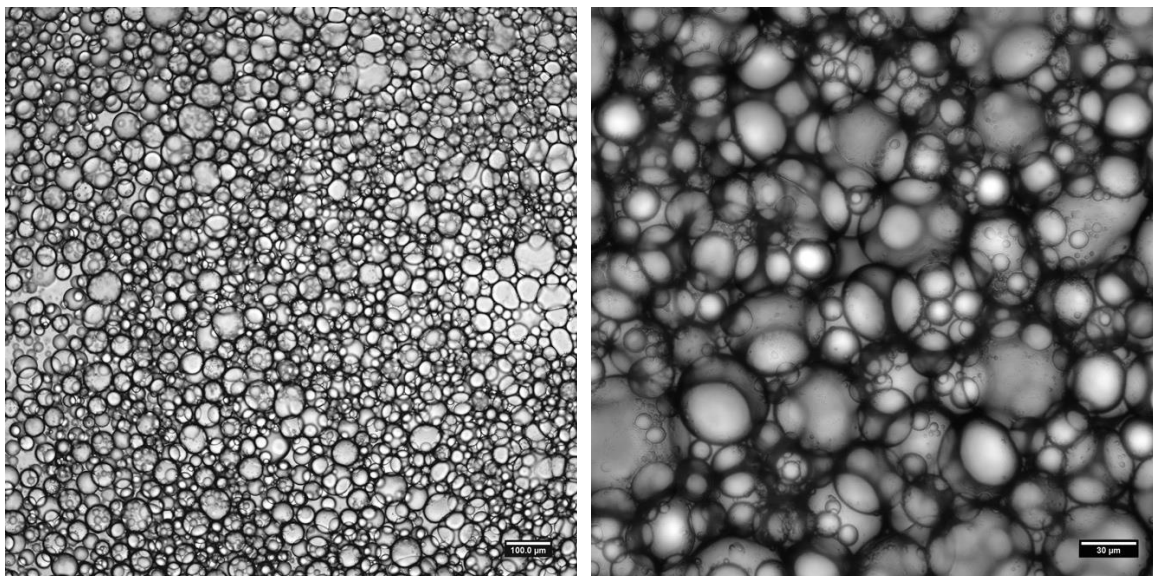


Obrázek 15: Emulze v poměru 10:90 stabilizované A. CNC, B. TiO₂, C. FB, D. *S. cerevisiae*, E. *Lb. casei* (422), F. *Lb. rhamnosus* (963A), G. *Lb. delbrueckii* (66)

9.2.4 Mikroskopie

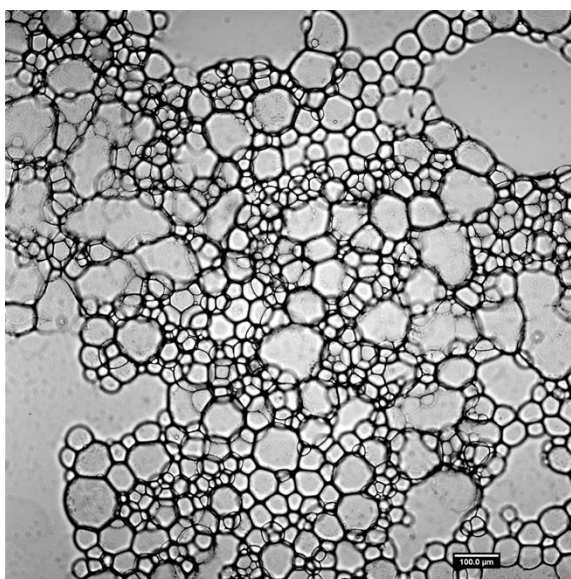
Pro stanovení mikrostruktury emulzí byl použit konfokální mikroskop (viz. kap. 6.3.3.2). Pozorování emulzí bylo provedeno při zvětšeních 40x, 100x, 400x a 600x.

Na obrázku 16 lze vidět, jak vypadá struktura emulze, která byla připravena z disperze *Lactobacillus casei* (422; 1 hm.%) a hexadekanu, při zvětšení 100x a 400x. Velikost emulzních kapek je dle měření z mastersizeru 40,5 μm. Mají kulovitý tvar s přibližně stejným průměrem. Můžeme pozorovat, že emulzní kapky se nachází těsně vedle sebe a vytvářejí vícevrstvou strukturu. Velikosti stabilizujících částic byla 1248 nm. Danou emulzi můžeme považovat za stabilní, protože splňuje řadu podmínek. První, že velikost stabilizujících částic je menší než velikost emulzních kapek. Za druhé, prakticky všechny kapky mají stejný průměr, tím pádem pravděpodobně nedochází ke koalescenci.



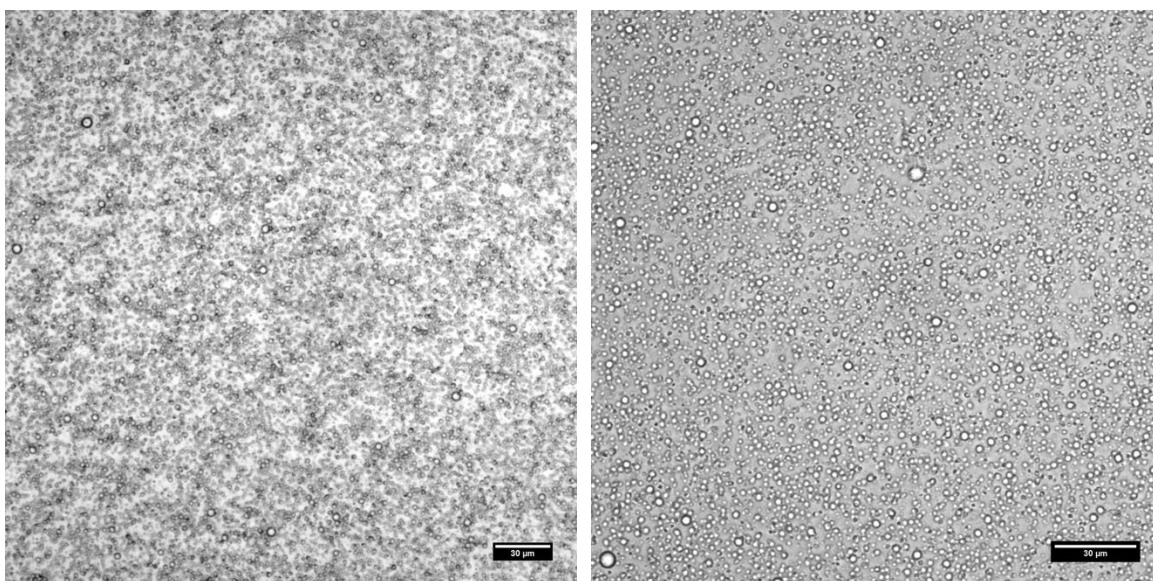
Obrázek 16: Zobrazení struktury emulze z *Lb. casei* (422) (100x; 400x); měřítko je u levého snímku 100 µm a u pravého snímku 30 µm.

Následující obrázek (Obr. 17) znázorňuje strukturu emulze stabilizované *Lb. casei* (422) při celkovém zvětšení 100x. Emulzní kapky nemají pravidelný tvar, mají odlišný průměr. Jejich velikost, která byla změřena pomocí mastersizeru, je 25 µm. Tady lze také vidět, že emulzní kapky jsou ve více vrstvách, ale počet vrstev je nižší než u emulze stabilizované bakterií 422 (*Lb. casei*). Velikost stabilizujících částic byla 3395 nm, což je menší než velikost kapek emulze. Buňky nejsou flokulované a lze pozorovat velké kapky volné olejové fáze. Tato emulze byla po přípravě stabilní, ale velmi rychle nastala separace fází na olejovou a vodnou.

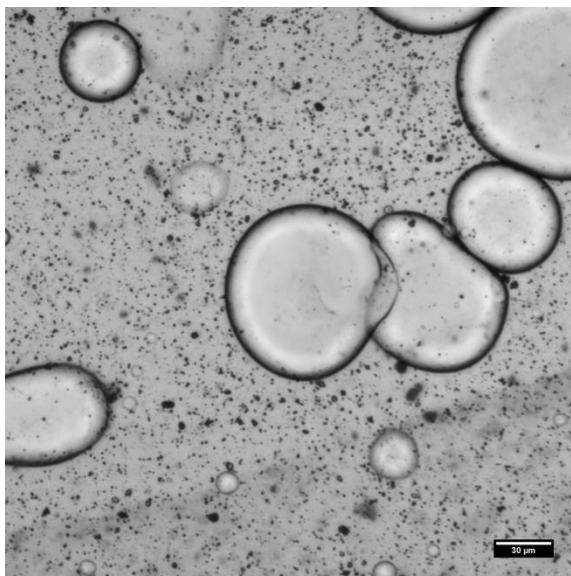


Obrázek 17: Zobrazení struktury emulze z *Lb. rhamnosus* (963A) (100x); měřítko je 100 µm.

Na dalším obrázku (Obr. 18) je zobrazena emulze stabilizovaná nanokrystalickou celulózą. Struktura byla pozorována při zvětšení 400x a 600x. Pro pozorování bylo nutné emulzi 4x naředit destilovanou vodou kvůli vysoké koncentraci emulzních kapek. Velikost nanokrystalické celulózy byla o průměrné velikosti 104 nm, přičemž velikost emulzních kapek byla na mastersizeru stanovena na 3,3 μm , což je větší než velikost samotných částic. Kapky mají pravidelný, kulovitý tvar a stejný průměr. Z tohoto vyplývá, že daná emulze je stabilní a dalším důkazem její stability je její hodnota ZP -59,93 mV.

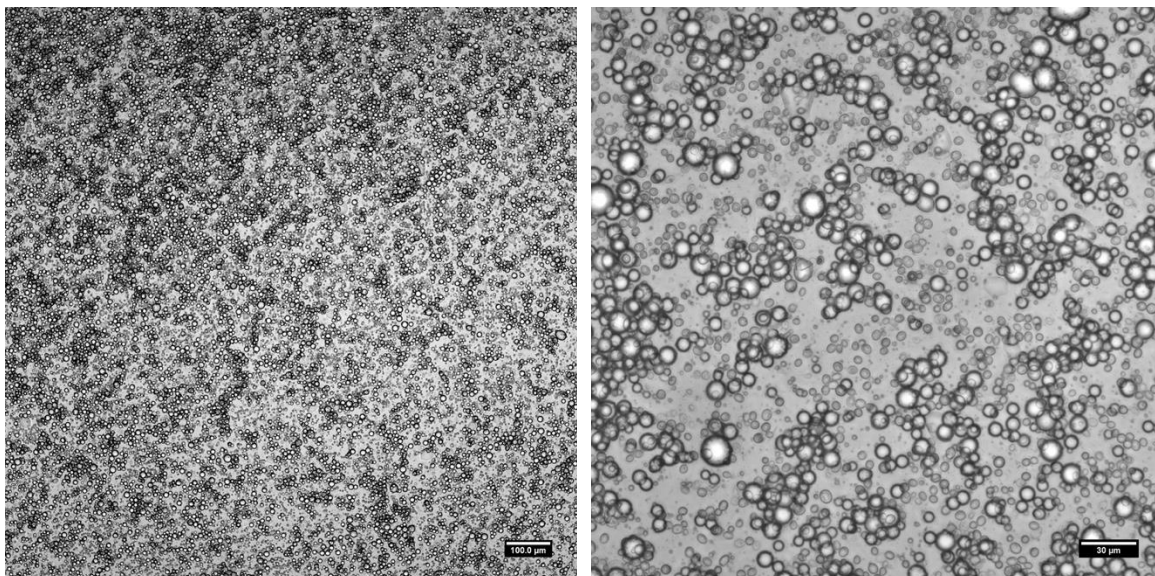


Obrázek 18: Zobrazení struktury 4x zředěné emulze z CNC (400x; 600x); měřítko je 30 μm . Struktura emulze, která byla stabilizována oxidem titaničitým, je znázorněna na obrázku 19, kde lze vidět velké kapky volného oleje, mezi kterými jsou malé emulzní kapky, pravděpodobně i s částečně agregovanými částicemi TiO_2 . U této emulze bylo obtížné pozorovat její kinetickou stabilitu, popř. rozpad na olejovou a vodnou fázi, kvůli disperzi TiO_2 , která je bílá stejně jako emulze.



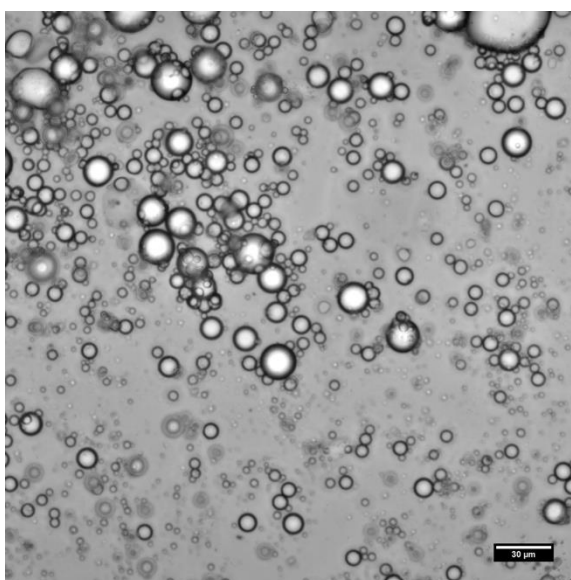
Obrázek 19: Zobrazení struktury emulze z TiO_2 (400x); měřítko je 30 μm .

Na obrázku 20 je možné vidět strukturu emulze stabilizované *S. cerevisiae*. Emulzní kapky mají kulovitý tvar s přibližně stejným průměrem a jejich velikost naměřená na mastersizeru byla 18 μm , což je větší než velikost buněk, která byla 3480 nm. Na mezifázovém rozhraní emulzních kapek nebyly pozorovány adsorbované buňky *S. cerevisiae*. Volné buňky *S. cerevisiae* jsou pozorovány na pravém obrázku, kde je viditelný rozdíl mezi emulzní kapkou, která má pravidelný sférický tvar, a *S. cerevisiae*, která má tvar vejčitý. Proto lze předpokládat, že při sonikaci emulzí nastalo rozbití části buněk kvasinek a emulze byly stabilizovány komponenty buněčné stěny.



Obrázek 20: Zobrazení struktury emulze ze *S. cerevisiae* (100x; 400x); měřítko je u levého snímku 100 μm a u pravého snímku 30 μm .

Jako poslední zde bude uvedena struktura emulze připravené z myších fibroblastů. Na obrázku 21 jsou znázorněny kapky emulze, které mají kulovitý tvar o různé velikosti. Na rozhraní však nejsou pozorovány žádné buňky, což naznačuje, že stabilizace této emulze byla dosažena složkami buněčné stěny FB.



Obrázek 21: Zobrazení struktury emulze stabilizované myšími fibroblasty (400x); měřítko je 30 μm .

Při porovnání výsledků mezi sebou lze říct, že nejstabilnější emulze byla připravena z disperze nanokrystalické celulózy (1 hm.%) a hexadekanu pomocí sonikátoru. Poměr olejové a

vodné fáze byl 10:90. Nejméně stabilní byla emulze stabilizovaná disperzí myších fibroblastů (1 hm.%).

Co se týče emulzí připravených z bakterií rodu *Lactobacillus*, výsledky lze porovnat se studií Firoozmanda a kol. [57] Podle tohoto článku byl pro přípravu emulzí vyzkoušen postup obyčejného míchání olejové a vodné fáze. Ve zmiňované studii tímto postupem získali stabilní emulze s poměrně vysokým obsahem olejové fáze, nicméně v bakalářské práci nebylo tohoto výsledku dosaženo. Velikost emulzních kapek byla v případě studie [57] vyšší než 100 μm . Autoři uvádí, že schopnost bakterií absorbovat se na fázovém rozhraní je dána jejich povrchovými vlastnostmi. Díky přítomnosti karbohydrátů a peptidoglykanů v buněčné stěně mají bakterie hydrofilní charakter. MCT je pravděpodobně více hydrofobní oproti hexadekanu, a proto tento fakt mohl přispět k neúspěchu přípravy stabilních emulzí v experimentální části bakalářské práce. Nicméně, ve studii bylo rovněž prokázáno, že buňky jsou schopny se absorbovat na fázové rozhraní olej-voda, a to díky hydrofobním interakcím. Tento jev je však ovlivněn složením buněčné stěny. Pravděpodobně vyšší úspěšnost byla dosažena při použití inaktivovaných buněk, kdy tepelná inaktivace denaturuje buněčnou stěnu a odhaluje hydrofobní skupiny. V bakalářské práci byly použity aktivní/živé buňky, a proto by bylo vhodné při dalším postupu vyzkoušet pro stabilizaci emulzí inaktivované buňky, které by se pravděpodobně lépe adsorbovaly na mezifázové rozhraní.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo porovnání částicových stabilizátorů pro přípravu Pickeringových emulzí. Jako stabilizující částice byly zvoleny nanokrystalická celulóza, oxid titaničitý, *Saccharomyces cerevisiae*, bakterie rodu *Lactobacillus* a myší fibroblasty. Tyto částice byly jako první charakterizovány a následně použity pro přípravu emulzí v různých poměrech olejové a vodné fáze. Nejprve olejovou složkou tvořil MCT olej, který byl později nahrazen hexadekanem, protože ten vykazuje lepší vlastnosti při přípravě emulzí.

Dále byly vyzkoušeny různé způsoby přípravy emulzí, jako např. míchání a postupné přikapávání olejové složky, a emulgace pomocí ultra-turraxu a sonikátoru. Jako neúčinnější metoda byla vyhodnocena homogenizace pomocí sonikátoru. Je to jednoduchá a relativně rychlá metoda pro přípravu Pickeringových emulzí, ale má i své nevýhody, jako například rozbití buněk.

Z měření bylo zjištěno, že neúčinnějším stabilizátorem při přípravě Pickeringových emulzí byla nanokrystalická celulóza, a to díky její malé velikosti a velmi pevnému ukotvení na mezifázovém rozhraní. Emulze připravená z CNC měla nejmenší a pravidelné emulzní kapky, vysokou absolutní hodnotu zeta-potenciálu a vysoký index krémování.

Relativně dobré výsledky prokázaly *S. cerevisiae*, resp. přídatné látky, které pocházejí z komerčně dostupného droždí. Emulze připravené ze supernatantu po přečištění kvasnic měly strukturu velmi jemné emulze. Jelikož se ale jedná o různé emulgátory a přídatné látky, nejednalo se v tomto případě o Pickeringovy emulze.

Emulze stabilizované bakteriemi rodu *Lactobacillus* už byly méně stabilní než emulze z nanokrystalické celulózy, ale nenastala u nich separace na vodnou a olejovou fázi. Emulze stabilizované jednotlivými druhy bakterií měly přibližně stejnou hodnotu zeta-potenciálu, která se nacházela v rozmezí od -25 do -30 mV, ale jejich stabilita a struktura byla různá, a to v závislosti na tvaru a povrchových vlastnostech buněk.

Jako další stabilizátor byl použit oxid titaničitý, u kterého bylo těžké pozorovat separaci na vodnou a krémovou fázi kvůli stejné barvě disperze TiO_2 a emulze. Takže tuto emulze lze posoudit jenom na základě hodnoty zeta-potenciálu a velikosti emulzních kapek, ale obecně byla tato emulze vyhodnocena jako stabilní, protože u ní nebyla viditelná separace olejové fáze.

Nejméně stabilními byly emulze připravené z disperze myších fibroblastů, kde ke stabilizaci emulzí přispívaly komponenty buněčné stěny fibroblastů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TADROS, Tharwat F. *Emulsion science and technology* [online]. Weinheim: Wiley-VCH, ©2009 [cit. 2022-11-11]. ISBN 9783527626564.
- [2] Costa C, Medronho B, Filipe A, Mira I, Lindman B, Edlund H, Norgren M. Emulsion Formation and Stabilization by Biomolecules: The Leading Role of Cellulose. *Polymers* [online]. 2019, 11(10) [cit. 2022-11-11]. ISSN 2073-4360.
- [3] SHUI, Lingling, Albert VAN DEN BERG a Jan C. T. EIJKEL. Interfacial tension controlled W/O and O/W 2-phase flows in microchannel. *Lab Chip* [online]. 2009, 9(6), 795-801 [cit. 2022-11-11]. ISSN 1473-0197.
- [4] TADROS, Tharwat F. *Emulsions* [online]. De Gruyter, 2016 [cit. 2022-11-12]. ISBN 9783110452242.
- [5] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz* [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008 [cit. 2022-11-20]. ISBN 9788070806753.
- [6] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010 [cit. 2022-11-20]. ISBN 9788070807453.
- [7] JAKUBEC, Martin. *Emulze: Příprava a stabilizace* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [cit. 2016-01-01]. Dostupné z: <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/cwUA.pdf?redirected>
- [8] CHEVALIER, Yves a Marie-Alexandrine BOLZINGER. *Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012, (439): 23–34. ISSN 0927-7757.
- [9] PICKERING, Spencer Umfreville. CXCVI.—Emulsions. *J. Chem. Soc., Trans* [online]. 1907, **91**, 2001-2021 [cit. 2022-12-15]. ISSN 0368-1645. Dostupné z: doi:10.1039/CT9079102001
- [10] AVEYARD, Robert, Bernard P BINKS a John H CLINT. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2003, **100-102**, 503-546 [cit. 2022-12-12]. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/S0001-8686(02)00069-6

- [11] Patravale, V.B. and Mandawgade, S.D. (2008), *Novel cosmetic delivery systems: an application update. International Journal of Cosmetic Science*, 30: 19–33. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00416.x>
- [12] BINKS, Bernard P. Particles as surfactants—similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*[online]. 2002, 7(1-2), 21-41 [cit. 2022-12-12]. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-0294(02)00008-0
- [13] Eric Dickinson, *Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and foams*, Food Hydrocolloids, 2017, 219-231, ISSN 0268-005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.024>.
- [14] AVEYARD, Robert, John H. CLINT a Tommy S. HOROZOV. Solid particles as emulsion stabilisers. In: LAGALY, G., ed. *Molecular Organisation on Interfaces* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006, s. 11-18 [cit. 2023-01-25]. Progress in Colloid and Polymer Science. Dostupné z: doi:10.1007/3-540-47822-1_3
- [15] AVEYARD, Robert, Bernard P BINKS a John H CLINT. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2003, 100-102, 503-546 [cit. 2023-01-25]. Dostupné z: doi:10.1016/S0001-8686(02)00069-6
- [16] Hanaé Dupont, Valentin Maingret, Véronique Schmitt, and Valérie Héroguez, *Macromolecules*, 2021, 54 (11), 4945-4970. DOI: 10.1021/acs.macromol.1c00225
- [17] Tang, Juntao & Quinlan, Patrick & Tam, Kam. (2015). *Stimuli responsive Pickering emulsions: Recent advances and potential applications. Soft Matter*. 11. 10.1039/C5SM00247H. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C5SM00247H>
- [18] GUZMÁN, Eduardo, Francisco ORTEGA a Ramón G. RUBIO. *Pickering Emulsions: A Novel Tool for Cosmetic Formulators. Cosmetics* [online]. 2022, 9(4) [cit. 2023-01-25]. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics9040068
- [19] ZÁHEJSKÝ, Jiří. *Nová generace emulzních systémů v dermatologii: 2Derm krém*. Brno, 2011. https://www.2derm.com/doc/prezentace_2derm_pro_lekare_04.2013.pdf, <https://www.forlifemadaga.com/cz/2derm-reha-special-barierovy-krem>

- [20] DE CARVALHO-GUIMARÃES, Fernanda Brito, Kamila Leal CORREA, Tatiane Pereira DE SOUZA, Jesus Rafael RODRÍGUEZ AMADO, Roseane Maria RIBEIRO-COSTA a José Otávio Carrera SILVA-JÚNIOR. *A Review of Pickering Emulsions: Perspectives and Applications. Pharmaceuticals* [online]. 2022, 15(11) [cit. 2023-01-25]. Dostupné z: doi: 10.3390/ph15111413
- [21] ALBERT, Claire, Mohamed BELADJINE, Nicolas TSAPIS, Elias FATTAL, Florence AGNELY a Nicolas HUANG. Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release* [online]. 2019. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2019.07.003
- [22] LAM, Stephanie, Krassimir P. VELIKOV a Orlin D. VELEV. Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2014, 19(5), 490-500 [cit. 2022-12-12]. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2014.07.003
- [23] MOON, Robert J., Ashlie MARTINI, John NAIRN, John SIMONSEN a Jeff YOUNGBLOOD. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews* [online]. 2011, 40(7) [cit. 2022-12-12]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/c0cs00108b
- [24] BUFFIERE, Jean, Zoltán BALOGH-MICHELS, Marc BORREGA, Thomas GEIGER, Tanja ZIMMERMANN a Herbert SIXTA. The chemical-free production of nanocelluloses from microcrystalline cellulose and their use as Pickering emulsion stabilizer. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, 178, 48-56 [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2017.09.028
- [25] WANG, Yancai, Ying ZHENG, Ling ZHANG, Qiwei WANG a Dianrui ZHANG. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2013, 172(3), 1126-1141 [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2013.08.006
- [26] PEITO, Sofia, Diana PEIXOTO, Inês FERREIRA-FARIA, Ana MARGARIDA MARTINS, Helena MARGARIDA RIBEIRO, Francisco VEIGA, Joana MARTO a Ana CLÁUDIA PAIVA-SANTOS. Nano- and microparticle-stabilized Pickering emulsions designed for topical therapeutics and cosmetic

- applications. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2022, 615 [cit. 2022-12-13]. ISSN 03785173.
- [27] XIE, Jin, Yijing LUO, Yingchong CHEN, Yang LIU, Yueqin MA, Qin ZHENG, Pengfei YUE a Ming YANG. Redispersible Pickering emulsion powder stabilized by nanocrystalline cellulose combining with cellulosic derivatives. *Carbohydrate Polymers*[online]. 2019, 213, 128-137 [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.02.064
- [28] GESTRANIUS, Marie, Per STENIUS, Eero KONTTURI, Johan SJÖBLOM a Tekla TAMMELIN. Phase behaviour and droplet size of oil-in-water Pickering emulsions stabilised with plant-derived nanocellulosic materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2017, 519, 60-70 [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2016.04.025
- [29] ZOPPE, Justin O., Richard A. VENDITTI a Orlando J. ROJAS. Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2012, 369(1), 202-209 [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2011.12.011
- [30] WEN, Chunxia, Qipeng YUAN, Hao LIANG a Frank VRIESEKOOOP. Preparation and stabilization of d-limonene Pickering emulsions by cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, 112, 695-700 [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.06.051
- [31] WANG, Wenhong, Guanhua DU, Cong LI, Hongjie ZHANG, Yunduo LONG a Yonghao NI. Preparation of cellulose nanocrystals from asparagus (*Asparagus officinalis* L.) and their applications to palm oil/water Pickering emulsion. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, 151, 1-8 [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.052
- [32] SKOCAJ, Matej, Metka FILIPIC, Jana PETKOVIC a Sasa NOVAK. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe?. *Radiology and Oncology* [online]. 2011, 45(4) [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: doi:10.2478/v10019-011-0037-0
- [33] ZIENTAL, Daniel, Beata CZARCZYNSKA-GOSLINSKA, Dariusz T. MLYNARCZYK, Arleta GLOWACKA-SOBOTTA, Beata STANISZ, Tomasz GOSLINSKI a Lukasz SOBOTTA. Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and

- Applications in Medicine. *Nanomaterials* [online]. 2020, 10(2) [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: doi:10.3390/nano10020387
- [34] ROSSANO, Manon, Nicolas HUCHER, Céline PICARD, Daniel COLLETTA, Frank LE FOLL a Michel GRISEL. Effects of aging on structure and stability of TiO₂ nanoparticle-containing oil-in-water emulsions. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, 461(1-2), 89-96 [cit. 2022-12-13]. ISSN 03785173.
- [35] SANDERS, Kristen, Laura L. DEGN, William R. MUNDY, Robert M. ZUCKER, Kevin DREHER, Baozhong ZHAO, Joan E. ROBERTS a William K. BOYES. In Vitro Phototoxicity and Hazard Identification of Nano-scale Titanium Dioxide. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2012, 258(2), 226-236 [cit. 2023-03-10]. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2011.10.023
- [36] YIN, Jun-Jie, Jun LIU, Marilyn EHRENSHAFT, Joan E. ROBERTS, Peter P. FU, Ronald P. MASON a Baozhong ZHAO. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes—Generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2012, 263(1), 81-88 [cit. 2023-03-10]. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2012.06.001
- [37] WU, Jianhong, Wei LIU, Chenbing XUE, et al. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology Letters* [online]. 2009, 191(1), 1-8 [cit. 2023-03-10]. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2009.05.020
- [38] CROSERÀ, Matteo, Andrea PRODI, Marcella MAURO, et al. Titanium Dioxide Nanoparticle Penetration into the Skin and Effects on HaCaT Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2015, 12(8), 9282-9297 [cit. 2023-03-10]. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph120809282
- [39] STILLER, S., H. GERS-BARLAG, M. LERGENMUELLER, F. PFLÜCKER, J. SCHULZ, K.P. WITTERN a R. DANIELS. Investigation of the stability in emulsions stabilized with different surface modified titanium dioxides. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2004, 232(2-3), 261-267 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.colsurfa.2003.11.003
- [40] SILVA, Caroline E.P., Juliana S. BERNARDES a Watson LOH. Stabilizing both oil droplets and titanium dioxide nanoparticles in aqueous dispersion with

- nanofibrillated cellulose. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2023, 302 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.carbpol.2022.120354
- [41] PARAPOULI, Maria, Anastasios VASILEIADI, Amalia-Sofia AFENDRA a Efsthios HATZILOUKAS. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology* [online]. 2020, 6(1), 1-32 [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: doi:10.3934/microbiol.2020001
- [42] TAYLOR, Michael W., Peter TSAI, Nicole ANFANG, Howard A. ROSS a Matthew R. GODDARD. Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environmental Microbiology* [online]. 2014, 16(9), 2848-2858 [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: doi: 10.1111/1462-2920.12456
- [43] WANG, Qi-Ming, Wan-Qiu LIU, Gianni LITI, Shi-An WANG a Feng-Yan BAI. Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Molecular Ecology* [online]. 2012, 21(22), 5404-5417 [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05732.x
- [44] PARAPOULI, Maria, Anastasios VASILEIADI, Amalia-Sofia AFENDRA a Efsthios HATZILOUKAS. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology* [online]. 2020, 6(1), 1-32 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: doi: 10.3934/microbiol.2020001
- [45] HE, Xin, Jiaqi DING, Zhenhua XU, Na LI, Jingmin YANG, Hongyan CHEN a Daru LU. Development of a new genetic reference material system based on *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Molecular Therapy – Methods & Clinical Development* [online]. 2021, 20, 473-482 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.omtm.2021.01.004
- [46] GASPAR, L.R., F.B. CAMARGO, M.D. GIANETI a P.M.B.G. MAIA CAMPOS. Evaluation of dermatological effects of cosmetic formulations containing *Saccharomyces cerevisiae* extract and vitamins. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, 46(11), 3493-3500 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.fct.2008.08.028
- [47] MEIRELLES, Aureliano Agostinho Dias, Rosiane Lopes DA CUNHA a Andreas Karoly GOMBERT. The role of *Saccharomyces cerevisiae* in stabilizing emulsions of hexadecane in aqueous media. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology* [online]. 2018, 102(7), 3411-3424 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-017-8725-3
- [48] HEERES, Arjan S., Karin SCHROËN, Joseph J. HEIJNEN, Luuk A. M. VAN DER WIELEN a Maria C. CUELLAR. Fermentation broth components influence droplet coalescence and hinder advanced biofuel recovery during fermentation. *Biotechnology Journal* [online]. 2015, 10(8), 1206-1215 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: doi:10.1002/biot.201400570
- [49] FURTADO, Guilherme F., Carolina S.F. PICONE, Maria C. CUELLAR a Rosiane L. CUNHA. Breaking oil-in-water emulsions stabilized by yeast. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2015, 128, 568-576 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.03.010
- [50] MOREIRA, Thais Caldas Paiva, Vanessa Martins DA SILVA, Andreas Karoly GOMBERT a Rosiane Lopes DA CUNHA. Stabilization mechanisms of oil-in-water emulsions by *Saccharomyces cerevisiae*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2016, 143, 399-405 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.043
- [51] HAMMES, W. P. a R. F. VOGEL. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B. a W. H. HOLZAPFEL, ed. *The Genera of Lactic Acid Bacteria* [online]. Boston, MA: Springer US, 1995, 1995, s. 19-54 [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4615-5817-0_3
- [52] DE ANGELIS, M. a M. GOBBETTI. Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus spp*: General Characteristics. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Elsevier, 2011, 2011, s. 78-90 [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00259-4
- [53] HUANG, Roujie, Fei WU, Qian ZHOU, Wei WEI, Juan YUE, Bo XIAO a Zhaohui LUO. *Lactobacillus* and intestinal diseases: Mechanisms of action and clinical applications. *Microbiological Research* [online]. 2022, 260 [cit. 2023-03-23]. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2022.127019
- [54] LENDAHL, Urban, Lars MUHL a Christer BETSHOLTZ. Identification, discrimination and heterogeneity of fibroblasts. *Nature Communications* [online]. 2022, 13(1) [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-30633-9

- [55] RAHIMI, Amir Mohammad, Mingfang CAI a Sigrid HOYER-FENDER. Heterogeneity of the NIH3T3 Fibroblast Cell Line. *Cells* [online]. 2022, 11(17) [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: doi:10.3390/cells11172677
- [56] MEIRELLES, Aureliano Agostinho Dias, Ana Letícia Rodrigues COSTA a Rosiane Lopes CUNHA. Cellulose nanocrystals from ultrasound process stabilizing O/W Pickering emulsion. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, 158, 75-84 [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.185
- [57] FIROOZMAND, Hassan a Dérick ROUSSEAU. Microbial cells as colloidal particles: Pickering oil-in-water emulsions stabilized by bacteria and yeast. *Food Research International* [online]. 2016, 81, 66-73 [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2015.10.018
- [58] Hielscher UP400St, 2017. Dostupné z: Hielscher_manual
- [59] IKA design for scientists T 25 digital Ultra-Turrax. Dostupné z: T_25_digital_Ultra_Turrax_manual_EN
- [60] BAREL, André O., Marc PAYE a Howard I. MAIBACH, ed. *Handbook of Cosmetic Science and Technology* [online]. CRC Press, 2009 [cit. 2023-05-01]. ISBN 9780429149726. Dostupné z: doi:10.1201/b15273
- [61] Malvern ZETASIZER NANO. Ursinus College. 2013. Dostupné z: Zetasizer_nano_series_user_manual
- [62] Petra Grznárová, Jan Lipov, Jindřiška Angelini. Optická mikroskopie. Dostupné z: Optická_mikroskopie_presentation
- [63] Mastersizer 3000, *Malvern Panalytical LTD*, 2021. Dostupné z: Mastersizer_3000_presentation
- [64] PURKAIT, Mihir Kumar a Dibyajyoti HALDAR. Value-added products derived from lignocellulosic biomass. In: *Lignocellulosic Biomass to Value-Added Products* [online]. Elsevier, 2021, 2021, s. 125-140 [cit. 2023-05-09]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-823534-8.00005-3
- [65] GOBBETTI, Marco. LACTOBACILLUS | Lactobacillus Casei. In: *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 1999, 1999, s. 1157-1164 [cit. 2023-05-09]. Dostupné z: doi:10.1006/rwfm.1999.0910

- [66] VALÍK, Ľubomír, Alžbeta MEDVEĎOVÁ, Michal ČIŽNIAR a Denisa LIPTÁKOVÁ. Evaluation of temperature effect on growth rate of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk using secondary models. *Chemical Papers* [online]. 2013, 67(7) [cit. 2023-05-09]. Dostupné z: doi:10.2478/s11696-013-0365-1
- [67] Preedy, V. & Watson, Ronald. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. (2010).
- [68] TEIXEIRA, P. LACTOBACILLUS | *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 425-431 [cit. 2023-05-09]. ISBN 9780123847331. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00177-4

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

O/V	emulze typu olej ve vodě.
V/O	emulze typu voda v oleje.
O/O	emulze typu olej v oleje.
V/V	emulze typu voda ve vodě.
V/O	emulze typu voda v oleje.
PAL	povrchově aktivní látka.
WF	vlákna ze dřeva.
PF	rostlinná vlákna.
MFC	mikrofibrilární celulóza.
NFC	nanofibrilární celulóza.
CNC	nanokrystalická celulóza.
MCC	mikrokrystalické celulóza.
t-CNC	tunikátové nanokrystal celulózy.
AC	částice celulózy z řas.
BC	částice bakteriální celulózy.
TiO ₂	oxid titaničitý.
FeTiO ₃	ilmenit.
BC	potravinářské barvivo z oxidu titaničitého.
TiO ₂	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration).
HaCaT	buněčná linie lidských keratinocytů.
ROS	reaktivní forma kyslíku.
UVA	ultrafialové záření typu A.
UVB	ultrafialové záření typu B.
α -SMA	alfa-hladkosvalový aktin.

PBS	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline.
MRS	bujón pro <i>Lactobacillus</i> podle DE MAN, ROGOSA a SHARPE.
MCT	triacylglycerol trikaprin/trikaprylin.
UT	ultra-turrax.
SON	sonikátor.
ZP	zeta-potenciál.
PE	Pickeringovy emulze.
PDI	index polydisperzity.
FB	fibroblasty.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura emulzí typu olej ve vodě (O/V) a voda v oleji (V/O). [3].....	10
Obrázek 2: Zředěná, koncentrovaná a vysoce koncentrovaná emulze. [5]	11
Obrázek 3: Schematické znázornění různých mechanismů rozpadu emulzí. [1]	12
Obrázek 4: Rozdíl mezi klasickou a Pickeringovou emulzí. [7]	14
Obrázek 5: 2Derm RENA special – Bariérový krém. [19].....	16
Obrázek 6: Zeta-potenciál jednotlivých stabilizátorů.	44
Obrázek 7: Velikost částic jednotlivých stabilizátorů.	46
Obrázek 8: Graf rozložení velikosti podle intenzity jednotlivých stabilizátorů.	46
Obrázek 9: Tvar a velikost buněk A. <i>Lb. sakei</i> (717), B. <i>Lb. casei</i> (422), C. <i>Lb. rhamnosus</i> (963A), D. <i>S. cerevisiae</i> (400x).	48
Obrázek 10: Vzorek a struktura emulze připravené z 717 (<i>Lb. sakei</i>) (400x).....	50
Obrázek 11: Struktura emulze připravené ze supernatantu <i>S. cerevisiae</i> (400x).	51
Obrázek 12: Velikost emulzních kapek.	52
Obrázek 13: Graf rozložení velikosti emulzních kapek podle intenzity.....	53
Obrázek 14: Zeta-potenciál emulzí.....	54
Obrázek 15: Emulze v poměru 10:90 stabilizované A. CNC, B. TiO ₂ , C. FB, D. <i>S. cerevisiae</i> , E. <i>Lb. casei</i> (422), F. <i>Lb. rhamnosus</i> (963A), G. <i>Lb. delbrueckii</i> (66)	56
Obrázek 16: Zobrazení struktury emulze z <i>Lb. casei</i> (422) (100x; 400x); měřítko je u levého snímku 100 μm a u pravého snímku 30 μm.....	57
Obrázek 17: Zobrazení struktury emulze z <i>Lb. rhamnosus</i> (963A) (100x); měřítko je 100 μm.....	57
Obrázek 18: Zobrazení struktury 4x zředěné emulze z CNC (400x; 600x); měřítko je 30 μm.....	58
Obrázek 19: Zobrazení struktury emulze z TiO ₂ (400x); měřítko je 30 μm.....	59
Obrázek 20: Zobrazení struktury emulze ze <i>S. cerevisiae</i> (100x; 400x); měřítko je u levého snímku 100 μm a u pravého snímku 30 μm.....	60
Obrázek 21: Zobrazení struktury emulze stabilizované myšími fibroblasty (400x); měřítko je 30 μm.	60

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Indexy krémování emulzí.	55
--	----