

# Niozomální nosiče pro enkapsulaci flavonoidů

Kateřina Salvová

---

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: **Kateřina Salvová**  
Osobní číslo: **T20420**  
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**  
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Niozomální nosiče pro enkapsulaci flavonoidů**

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část:

V teoretické části se věnujte problematice rostlinných flavonoidů, jejich klasifikaci a biologickým vlastnostem. Dále se zaměřte na možnosti zvýšení jejich stability prostřednictvím enkapsulace do různých typů nosičů.

### II. Praktická část:

V praktické části připravte nosiče na bázi niozomů s enkapsulovanými flavonoidními látkami. Stabilitu připravených systémů a jejich aktivitu charakterizujte pomocí dostupných metod.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Andersen, M., Markham, K.R. *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor & Francis Group, LLC 2006. ISBN 0-8493-2021-6.
- [2] Javani, R., Hashemi, F. S. a kol. Quercetin-loaded niosomal nanoparticles prepared by the thin-layer hydration method: Formulation development, colloidal stability, and structural properties. *LWT – Food Science and Technology* 2021, 141, 110865.
- [3] Lu, B., Huang, Y., Chen, Z. a kol. Niosomal Nanocarriers for Enhanced Skin Delivery of Quercetin with Functions of Anti-Tyrosinase and Antioxidant. *Molecules* 2019, 24, 2322.
- [4] Yousefi, M., Shadnoush, M., Sohrabvandi, S. a kol. Encapsulation Systems for Delivery of Flavonoids: A Review. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 2021, 11, 13934 – 13951.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Jana Sedlaříková, 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 užit 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, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

**Prohlašuji,**

- že jsem 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**

Teoretická část bakalářské práce se zaměřuje na problematiku rostlinných flavonoidů, jejich klasifikaci a biologické vlastnosti. Dále se soustřeďuje na možnosti zvýšení jejich stability prostřednictvím enkapsulace do různých typů nosičů. V neposlední řadě je věnována pozornost praktickému využití enkapsulovaných flavonoidů.

Praktická část předložené práce se zabývá přípravou nosičů na bázi niozomů s enkapsulovaným kvercetinem a jejich charakterizací s důrazem na hodnocení fyzikálně-chemických vlastností, stability připravených systémů, kinetiky uvolňování aktivní látky a účinnosti enkapsulace.

Klíčová slova: enkapsulace, flavonoidy, kvercetin, niozom, poloxamer

## **ABSTRACT**

The theoretical part of the bachelor thesis deals with the issue of plant flavonoids, their classification and biological properties. It also focuses on the possibilities of increasing their stability through encapsulation into different types of carriers. Finally, attention is paid to the practical application of encapsulated flavonoids.

The practical part of the presented work deals with the preparation of niosome-based carriers with encapsulated quercetin and their characterization with emphasis on the evaluation of physicochemical properties, stability of the prepared systems, kinetics of active substance release and encapsulation efficiency.

Keywords: encapsulation, flavonoids, niosomes, poloxamer, quercetin

Největší poděkování bych ráda věnovala mé vedoucí doc. Ing. Janě Sedlaříkové, Ph.D., za její trpělivost, ochotu, vstřícný přístup a cenné rady, které mi poskytla během zpracování bakalářské práce. Velmi děkuji také své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>1 FLAVONOIDY</b> .....	<b>10</b>
1.1 STRUKTURA .....	10
1.2 KLASIFIKACE.....	11
1.2.1 Flavony.....	11
1.2.2 Flavonoly.....	12
1.2.3 Flavanony .....	12
1.2.4 Flavanoly.....	13
1.2.5 Chalkony .....	13
1.2.6 Antokyanidiny.....	14
1.2.7 Isoflavony.....	14
<b>2 TYPY NOSIČŮ</b> .....	<b>15</b>
2.1 VEZIKULÁRNÍ SYSTÉMY .....	15
2.1.1 Lipozomy .....	16
2.1.2 Transferozomy .....	16
2.1.3 Ethozomy .....	16
2.1.4 Fytozomy.....	16
2.1.5 Niozomy.....	17
2.2 NON-VEZIKULÁRNÍ SYSTÉMY .....	17
2.2.1 Pevné lipidové nanočástice .....	17
2.2.2 Nanostrukturované lipidové částice .....	17
2.3 SYSTÉMY NA BÁZI PROTEINŮ.....	18
2.4 SYSTÉMY NA BÁZI SACHARIDŮ .....	18
2.5 POLYMERNÍ SYSTÉMY .....	18
2.5.1 Polymerní nanočástice.....	18
2.5.2 Dendrimery.....	19
2.5.3 Polymerzomy .....	19
2.5.4 Micely.....	20
2.6 DALŠÍ TYPY NOSIČŮ .....	20
2.6.1 Emulzní systémy .....	20
2.6.2 Anorganické systémy .....	20
<b>3 METODY ENKAPSULACE</b> .....	<b>21</b>

3.1	SPREJOVÉ SUŠENÍ .....	21
3.2	LYOFILIZACE.....	22
3.3	VYTLAČOVÁNÍ .....	22
3.4	KOACERVACE.....	22
3.5	METODA VYUŽÍVAJÍCÍ SUPERKRITICKÉ TEKUTINY .....	23
3.6	EMULZNÍ METODA ODSTRANĚNÍ ROZPOUŠTĚDLA .....	24
3.7	IONTOVÁ GELACE.....	25
3.8	METODA „LAYER-BY-LAYER“ .....	25
3.9	HYDRATACE TENKÉHO FILMU .....	25
3.10	MEZIFÁZOVÁ POLYMERACE .....	26
3.11	POLYMERACE IN SITU .....	26
<b>4</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>28</b>
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE.....</b>	<b>33</b>
6.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	33
6.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	33
<b>7</b>	<b>POSTUPY MĚŘENÍ.....</b>	<b>35</b>
7.1	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ POLOXAMERŮ .....	35
7.2	STANOVENÍ KRITICKÉ MICELÁRNÍ KONCENTRACE.....	35
7.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ POLOXAMERŮ S AKTIVNÍ LÁTKOU.....	36
7.4	PŘÍPRAVA PUFRU.....	37
7.5	MĚŘENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY .....	37
7.6	MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC A ZETA POTENCIÁLU .....	38
7.7	MĚŘENÍ ENKAPSULAČNÍ ÚČINNOSTI .....	38
7.8	KINETIKA UVOLNĚNÍ AKTIVNÍ LÁTKY.....	39
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>40</b>
8.1	STANOVENÍ CMC POLOXAMERŮ.....	40
8.2	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA .....	42
8.3	VIZUÁLNÍ HODNOCENÍ.....	44
8.4	VELIKOST ČÁSTIC.....	45
8.5	ZETA POTENCIÁL .....	47
8.6	ENKAPSULAČNÍ ÚČINNOST .....	49
8.7	KINETIKA UVOLŇOVÁNÍ ÚČINNÉ LÁTKY .....	50
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>52</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>54</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>68</b>



## ÚVOD

Flavonoidy patří mezi přírodní sloučeniny, které se vyskytují v různých druzích rostlin. Jsou známé především pro své antioxidační, protizánětlivé, anti-karcinogenní a další zdravé prospěšné vlastnosti. Na druhou stranu jsou nestabilní, náchylné k oxidaci, špatně rozpustné a hůře biologicky dostupné, a z těchto důvodů se v současné době stále hledají nové strategie, jak tyto limity překonat. Jednou z možností je enkapsulace, při níž se aktivní látky uzavírají do vhodného nosného systému s využitím různorodých technik. Jako nosiče mohou sloužit lipozomy, niozomy nebo například polymerní mikro- a nanočástice. Mezi časté techniky enkapsulace patří například sprejové sušení, koacervace, extruze nebo mezifázová polymerace. Jedná se o stále se rozvíjející odvětví, které nachází uplatnění ve farmaceutickém, potravinářském i kosmetickém průmyslu. Enkapsulované látky vykazují vyšší stabilitu, lepší biologickou dostupnost, možnost řízeného uvolňování a cílené působení.

Kvercetin, který je využíván v této práci, patří mezi nejsilnější flavonoidy, nacházející se běžně například v cibuli, bobulovinách, brokolici a citrusových plodech. Jedná se o univerzální antioxidant, který se používá jako výživový doplněk a může být prospěšný proti různým onemocněním. Kvercetin má příznivý účinek například při léčbě zánětů, vředů, cukrovky, infekcí, alergií a slouží jako prevence kardiovaskulárních onemocnění, jelikož působí proti vzniku krevních sraženin.

V praktické části této práce byly připraveny a charakterizovány nosiče typu niozomů na bázi směsi poloxamerů, do nichž byl inkorporován kvercetin s aditivní složkou tokoferyl acetátem nebo PEG 400. Cílem bylo sledovat vliv různého složení nosičů a typu aditiva na fyzikální vlastnosti roztoků, stabilitu a účinnost enkapsulace.

## I. TEORETICKÁ ČÁST

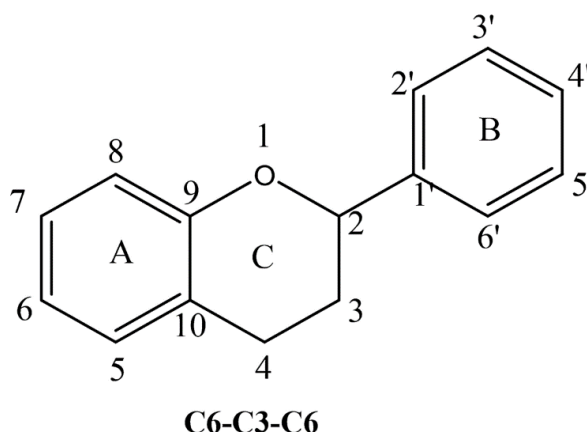
## 1 FLAVONOIDY

Flavonoidy jsou bioaktivní sloučeniny s polyfenolickou strukturou patřící do významné třídy sekundárních rostlinných metabolitů s nízkou molekulovou hmotností. Mají široké zastoupení v ovoci, zelenině a bylinách, proto jsou známy také jako „dietní flavonoidy“. Vyskytují se především jako květové pigmenty čeledi krytosemenných, ale v různé míře je lze nalézt ve všech částech rostliny. V rostlinách hrají flavonoidy významnou roli, jelikož jsou zodpovědné za barvu květů, mají význam při lákání opylovačů či při klíčení spór a samotný vývoj rostliny. V neposlední řadě rostlinu chrání před různými biotickými a abiotickými vlivy, kdy mohou sloužit jako UV filtry, signální molekuly, fytoalexiny, detoxikační látky a antimikrobiální obranné látky [1], [2].

Flavonoidy jsou přínosné i pro lidský organismus a vykazují řadu zdraví prospěšných účinků. Jedná se zejména o antioxidační, protizánětlivé, antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti a schopnost ovlivňovat enzymatickou aktivitu. Z tohoto hlediska jsou flavonoidy nepostradatelnou součástí řady nutričních, farmaceutických, ale i kosmetických přípravků [1], [2].

### 1.1 Struktura

Všechny flavonoidy obsahují ve své základní kostře 15 atomů uhlíku, které jsou uspořádány ve formě dvou fenylových kruhů (A a B) a heterocyklického kruhu C (Obr. 1). Tato struktura je proto označována jako C6-C3-C6 [3].



Obrázek 1: Obecná struktura flavonoidů [3]

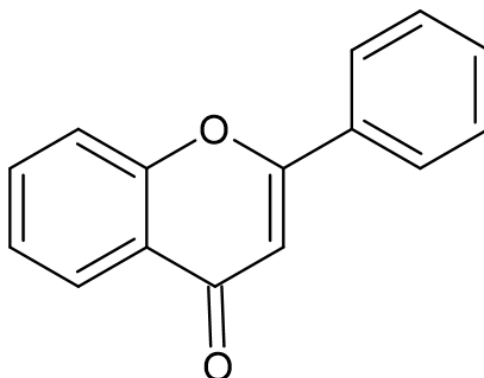
Biologická aktivita flavonoidů je významně ovlivněna jejich molekulární strukturou, konkrétně je dána počtem nahrazených hydroxylových skupin, substitucí funkčních skupin, dále různými typy polymeračních reakcí. Připojení funkčních skupin k základní molekulární struktuře ovlivňuje rozpustnost, reaktivitu, stabilitu, i různé typy reakcí (methylace, glykosylace) flavonoidů [3].

## 1.2 Klasifikace

Skupina flavonoidů zahrnuje více než 6000 fenolických sloučenin. V závislosti na poloze vazby aromatického jádra B na pyranové části lze flavonoidy obecně rozřadit do tří tříd: flavonoidy, isoflavonoidy a neoflavonoidy [1], [4], [5]. Flavonoidy dále můžeme klasifikovat do několika podtříd v závislosti na modifikaci struktury C kruhu, a to na: flavony, isoflavony, flavonoly, flavanony, flavanoly, chalkony a antokyanidiny. Avšak je možné se setkat i s rozčleněním do dalších skupin, které zahrnují například dihydroflavonoly, flavan-3,4-oly, biflavonoidy, neoflavony, aurony a další [1], [2], [5], [6].

### 1.2.1 Flavony

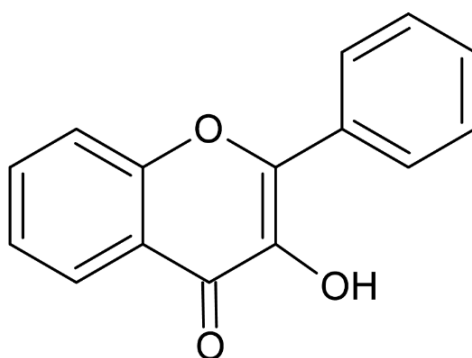
Jedná se o nejjednodušší podskupinu flavonoidů, jejichž struktura obsahuje mezi uhlíkem C2 a C3 dvojnou vazbu a v poloze C4 je připojena ketonová skupina (Obr. 2) [7]. Mezi hlavní zdroje flavonů patří celer, petržel a červená paprika, kde se nachází apigenin či luteolin. Slupky citrusových plodů jsou bohaté na polymethoxylované flavony mezi jejichž zástupce patří tangeretin a nobiletin. V rostlinách se flavony vyskytují převážně ve formě 7-O-glykosidů [6].



Obrázek 2: Základní struktura flavonu

### 1.2.2 Flavonoly

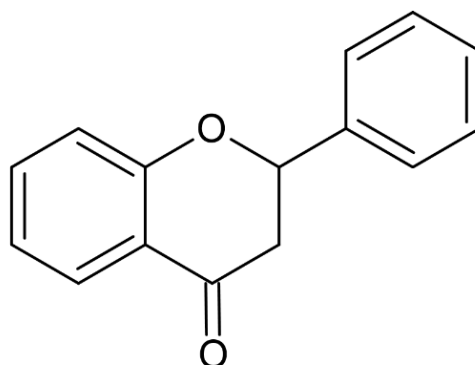
Flavonoly obsahují ketonovou skupinu a oproti flavonům mají navíc hydroxylovou skupinu na pozici 3 kruhu C, který může být glykosilován (Obr. 3). Zástupci se vyznačují specifickými substitucemi hydroxylových skupin na kruzích A a B. Nejvíce studovanými flavonoly jsou kaempferol, kvercetin, myricetin, fisetin a isorhamnetin. Bylo zjištěno, že příjem flavonolů je spojen s různými zdravotními benefity, které zahrnují antioxidační potenciál či snížené riziko kardiovaskulárních a cévních onemocnění. Bohatým zdrojem je např. cibule, kapusta, salát, rajčata, jablka, hrozny a bobule. Kromě ovoce a zeleniny obsahuje značné množství flavonolů také čaj a červené víno. V přírodě jsou nejvíce rozšířeny jako O-glykosidy [1], [2], [6].



Obrázek 3: Základní struktura flavonolu

### 1.2.3 Flavanony

Skupina flavanonů nazývána také dihydroflavony je charakteristická absencí dvojné vazby mezi uhlíkem C2 a C3 ve struktuře kruhu C (Obr. 4).



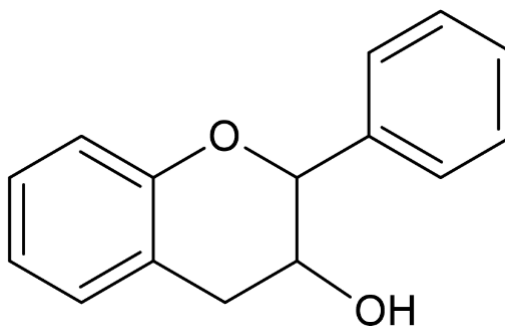
Obrázek 4: Základní struktura flavanonu

Jedná se o skupinu, která je obecně přítomna ve všech citrusových plodech, jako jsou pomeranče nebo citrony. Flavanony dokáží pohlcovat volné radikály a zároveň jsou tyto sloučeniny odpovědné za hořkou chuť šťávy a kůry citrusových plodů. Zajímavé jsou

i z farmakologického hlediska, jelikož vykazují antioxidační a protizánětlivé účinky, dále jsou schopny snižovat hladinu krevních lipidů a cholesterolu. Tato skupina zahrnuje hesperidin, naringenin, eriodictyol, narirutin a neohesperedin [1], [2], [3], [7].

#### 1.2.4 Flavanoly

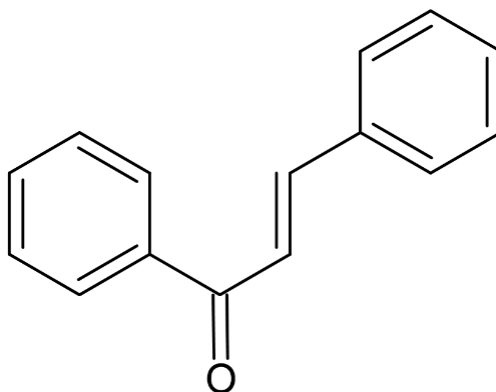
Flavanoly jsou označovány jako katechiny nebo flavan-3-oly kvůli připojení hydroxylové skupiny na pozici 3 na kruhu C (Obr. 5). Tato skupina postrádá dvojnou vazbu mezi C2 a C3 a ketonovou skupinu v poloze 4 kruhu C. Jsou kategorizovány jako monomerní (např. (+)-katechin nebo (-)-epikatechin a jeho galátový typ). Flavanoly se hojně vyskytují v banánech, jablkách, meruňkách, hroznech, ale také v kakaových bobech, čaji a červeném víně. Je známo, že potraviny bohaté na flavanoly předcházejí kardiovaskulárním onemocněním snížením rizika hypertenze, hyperglykémie a dyslipidémie [1], [2], [8].



Obrázek 5: Základní struktura flavanolu

#### 1.2.5 Chalkony

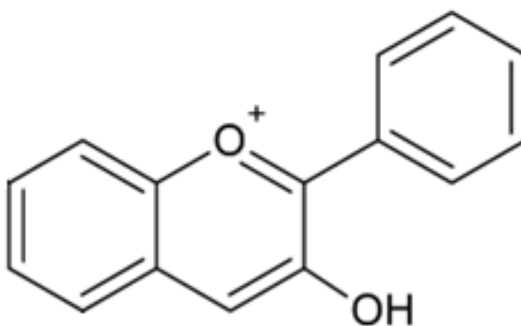
Jedná se o flavonoidy, které jsou charakteristické absencí kruhu C (Obr. 6), lze tedy označit jako flavonoidy s otevřeným řetězcem. Mezi hlavní příklady chalkonů patří floridzin, arbutin, phloretin a chalkonaringenin. Chalkony se vyskytují ve značném množství v rajčatech, hruškách, jahodách a některých obilninách [1], [2], [4].



Obrázek 6: Základní struktura chalkonu

### 1.2.6 Antokyanidiny

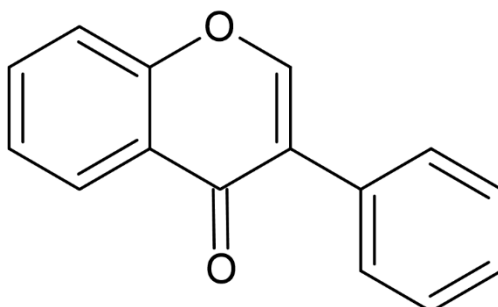
Antokyanidiny jsou nestabilní a jsou obecně přítomny jako antokyaniny v glykosylované formě. Ve své struktuře postrádají ketonovou skupinu na pozici 4 na C kruhu a atom kyslíku má kladný náboj (Obr. 7). Antokyaniny jsou rostlinné pigmenty, které běžně rostlinám propůjčují červenou, fialovou nebo modrou barvu. Barva závisí na pH, methylaci či acylaci hydroxylové skupiny na kruzích A a B. Vyskytují se zejména u květů rostlin a ve vnějších buněčných vrstvách ovoce a zeleniny, jako jsou brusinky, černý rybíz, ostružiny, lilek, červené zelí. Mezi nejběžnější zástupce patří pelargonin, kyanidin, malvidin, delfinidin a petunidin. Podobně jako ostatní skupiny flavonoidů vykazují antioxidační účinnost a mohou hrát důležitou roli při prevenci kardiovaskulárních onemocnění [1], [2], [3], [6].



Obrázek 7: Základní struktura anthokyanidinu

### 1.2.7 Isoflavony

U isoflavonů je kruh B připojen k poloze 3 na kruhu C (Obr. 8). Strukturálně tak připomínají 17- $\beta$ -estradiol a váží se na estrogenové receptory, proto jsou také známé jako fytoestrogeny. Skupina isoflavonů má velký potenciál v boji proti různým onemocněním, včetně zmírnění osteoporózy, kardiovaskulárních onemocnění, jako prevence a léčba rakoviny související s hormony, léčba symptomů menopauzy a další. Hlavním zdrojem jsou luštěniny, ze sójových isoflavonů jsou důležité genistein a daidzein, které jsou účinnými antioxidanty [2], [4].



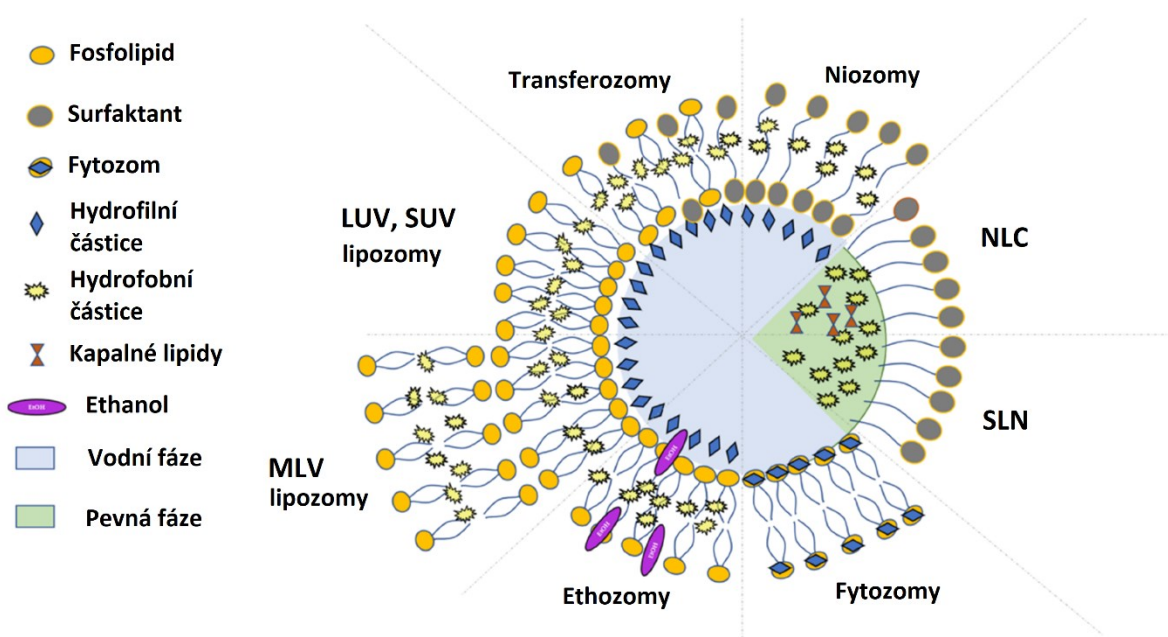
Obrázek 8: Základní struktura isoflavonu

## 2 TYPY NOSIČŮ

Flavonoidy mají řadu pozitivních a zdraví prospěšných účinků, ale nejsou stabilní vůči svému okolí, mají malou rozpustnost ve vodě a vyznačují se nízkou biodostupností po perorálním užití, což limituje jejich aplikace. Proces enkapsulace je považován za slibný nástroj pro zvýšení stability těchto sloučenin a zachování jejich příznivých účinků. K zapouzdření flavonoidů se používají různé techniky a materiály, které musí být bezpečné, levné a nesmí reagovat s enkapsulovanou aktivní látkou. Cílem je nejen zlepšit stabilitu a rozpustnost, ale také zajistit možnost kontrolovaného uvolňování bioaktivní sloučeniny za daných podmínek [9].

### 2.1 Vezikulární systémy

Vezikulární systémy bývají často na bázi lipidů a představují nejvíce zkoumanou kategorii nosičů. Z toho důvodu je i mnoho formulací založeno právě na lipidových strukturách, jako jsou např. lipozomy, ethozomy, transferozomy, pevné lipidové nanočástice a další (Obr. 9). Tyto nosiče vykazují příznivé vlastnosti, jako je nízká toxicita, nízké náklady a snadná výroba, možnost zapouzdření lipofilních i hydrofilních molekul, řízené uvolňování, biologická rozložitelnost, vysoká biologická dostupnost, a kromě toho mohou být připravovány udržitelnými procesy [10].



Obrázek 9: Schématický přehled nosičů na bázi lipidů (upraveno dle [10])



### 2.1.1 Lipozomy

Lipozomy jsou vezikulární nosiče, které jsou tvořeny ze soustředných dvojvrstev tvořených amfifilními molekulami. Zároveň se řadí k nejstarším vezikulárním systémům, které byly vyvinuty v roce 1960. Jedná se o vysoce účinné a poměrně snadno produkovatelné nosiče, které mají velikost v řádech nanometrů či mikrometrů. Hlavními složkami těchto formulací jsou fosfolipidy a sfingolipidy, v mnoha případech se využívají i steroly, jako je cholesterol, a polymery [10].

Lipozomální vezikuly jsou tvořeny hydrofilním jádrem obklopeným alespoň jednou lipidovou dvojvrstvou. Na základně průměru a počtu vrstev jsou obvykle klasifikovány jako multilamelární vezikuly (MLV) obsahující více dvojvrstev a unilamelární vezikuly tvořené jednou dvojvrstvou. Ty lze dále rozdělit na malé unilamelární vezikuly (LUV) a velké unilamelární vezikuly (SUV) [10], [11].

Nevýhodu často představuje cena surovin pro výrobu lipozomálních nosičů. Problémem je i termodynamická nestabilita těchto systémů, jelikož lipozomy jsou náchylné k fúzi, agregaci a předčasnému uvolnění zapouzdřené složky. Kromě toho mají lipidy zvýšenou tendenci k oxidačním jevům. Na druhou stranu vykazují i výhody zahrnující nízkou toxicitu, biokompatibilitu, flexibilitu a biodegradabilitu [10].

### 2.1.2 Transferezomy

Jedná se o deformovatelné vezikuly, které nacházejí uplatnění zejména při aplikaci na pokožku díky svým vlastnostem podporující transdermální penetraci. Od klasických lipozomů se odlišují použitím povrchově aktivních látek, které poskytují pružnost a zároveň destabilizují a změkčují membrány [10].

### 2.1.3 Ethozomy

Ethozomy byly vyvinuty jako účinné vezikuly pro topické, transdermální a systémové aplikace. Jsou tvořeny z fosfolipidů, vody a vysoce koncentrovaných alkoholů (ethylalkohol nebo isopropanol), které poskytují elastické vlastnosti vezikulám a zvyšují účinnost zapouzdření [10].

### 2.1.4 Fytozomy

Vyrábějí se interakcí metabolitů obsažených v rostlinných extraktech s fosfatidylcholinem. Formulace vykazují dobrou rozpustnost a biologickou dostupnost [10].

### 2.1.5 Niozomy

Niozomy byly poprvé vyráběny v kosmetickém průmyslu, konkrétně firmou L'Oréal, později byly jejich aplikace studovány i pro oblast farmaceutického průmyslu [12]. Pro přípravu niozomů jsou využívány syntetické neionické povrchově aktivní látky, lipidy anebo cholesterol. Struktura niozomů závisí na několika parametrech, jako je teplota hydratace lipidů, typ a koncentrace povrchově aktivní látky a způsob přípravy [10].

Ve srovnání s lipozomy nabízejí niozomální nosiče větší chemickou stabilitu, osmotickou aktivitu a delší trvanlivost. Protože nenesou žádný náboj jsou méně toxické a kompatibilnější. Mohou být použity k zapouzdření hydrofilních i hydrofobních molekul [12].

## 2.2 Non-vezikulární systémy

Nevezikulární systémy zahrnují nosiče na bázi pevných lipidů. Jsou to koloidní částice, které lze vyrobit různými metodami (vysokotlaká homogenizace, ultrazvuk, s využitím rozpouštědel, ...). Díky své univerzálnosti byly nosiče na bázi nevezikulárních lipidů studovány zejména pro různé lékařské aplikace, jako přenos genů, bioobrazování či antimikrobiální aktivitu. Vzhledem k tomu, že jsou vysoce biokompatibilní, mohou být podávány různými cestami, např. perorálně, intravenózně či topicky [10].

### 2.2.1 Pevné lipidové nanočástice

Pevné lipidové nanočástice (SLN, Solid Lipid Nanoparticles) mají průměrnou velikost 40 až 1000 nm a sférickou morfologii. Hlavní složkou SLN je pevný lipid, který je dispergován ve vodné fázi, a ke zvýšení stabilizace je využito povrchově aktivních látek [13]. Velký povrch, vysoká účinnost enkapsulace, řízené uvolňování a cílené dodávání jsou některé z charakteristik, které učinily SLN jedním z nejvíce perspektivních nanonosičů v posledních letech [10].

### 2.2.2 Nanostrukturované lipidové částice

Nanostrukturované lipidové částice (NLC, Nanostructured Lipid Carriers) představují koloidní systémy podobné SLN s tím rozdílem, že jsou složeny ze směsi pevných a kapalných lipidů. To vede k vytvoření neorganizované matrice, která je pokryta jednou nebo více povrchově aktivními látkami. Takový typ nosiče zabraňuje předčasnému uvolňování inkorporovaných sloučenin a zajišťuje dosažení vysoké účinnosti enkapsulace.

V kombinaci s dobrou biologickou rozložitelností a biokompatibilitou použitých lipidů lze NLC považovat za velmi výhodný systém pro zvýšení stability a zajištění kontrolovaného uvolňování přírodních aktivních látek [10].

### 2.3 Systémy na bázi proteinů

Kromě nutriční hodnoty vykazují bílkoviny řadu příznivých vlastností, jako je biokompatibilita, biodegradabilita, emulgační, pěnicí a gelační aktivita. Z tohoto důvodu jsou vhodnými kandidáty pro enkapsulaci jak hydrofilních, tak hydrofobních bioaktivních složek, jako jsou fenolické sloučeniny, karotenoidy, polynenasycené mastné kyseliny, vitaminy atd. V literatuře byla popsána široká škála nosných systémů na bázi proteinů, včetně hydrogelů, mikro- a nanočástic či filmů. Bílkoviny, které se nejčastěji používají jako enkapsulační materiály pro vývoj potravinářských nosných systémů, mohou být živočišného původu, např. kasein, syrovátkové bílkoviny, želatina nebo rostlinného původu, jako jsou bílkoviny získané ze sóji, obilovin (např. zein) a luštěnin (např. hrachu) [10].

### 2.4 Systémy na bázi sacharidů

Sacharidy se spolu s lipidy a proteiny řadí mezi přírodní makromolekuly. Aplikace nacházejí zejména díky své rozpustnosti, biodegradabilitě a také schopnosti zachytávat hydrofilní i hydrofobní molekuly. Sacharidy jsou také považovány za tepelně stabilnější ve srovnání s lipidy či proteiny, u nichž může docházet k denaturaci [10]. Obecně lze systémy na bázi sacharidů rozřadit podle biologického původu: na rostlinné (např. škrob, celulóza, pektin a guarová guma); živočišného původu (např. chitosan); typy pocházející z řas (např. alginát a karagenan) a mikrobiálního původu (např. xanthan, dextran a cyklodextriny) [14].

### 2.5 Polymerní systémy

#### 2.5.1 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice (PNP, Polymeric nanoparticles) jsou koloidní pevné částice nebo částicové disperze o velikosti 1 až 1000 nm, jež jim umožňuje penetraci přes biologické bariéry. Mezi přední charakteristiky PNP patří vysoká biokompatibilita, schopnost zapouzdření sloučenin různých fyzikálně-chemických vlastností, zlepšení stability a ochrany enkapsulovaných molekul, snížení rychlosti degradace, ale i pomalé a kontrolované uvolňování. Obecně lze PNP rozdělit na nanokapsle, ve kterých jsou aktivní sloučeniny uzavřeny v dutině obklopené polymerní membránou a nanosféry, ve kterých jsou aktivní

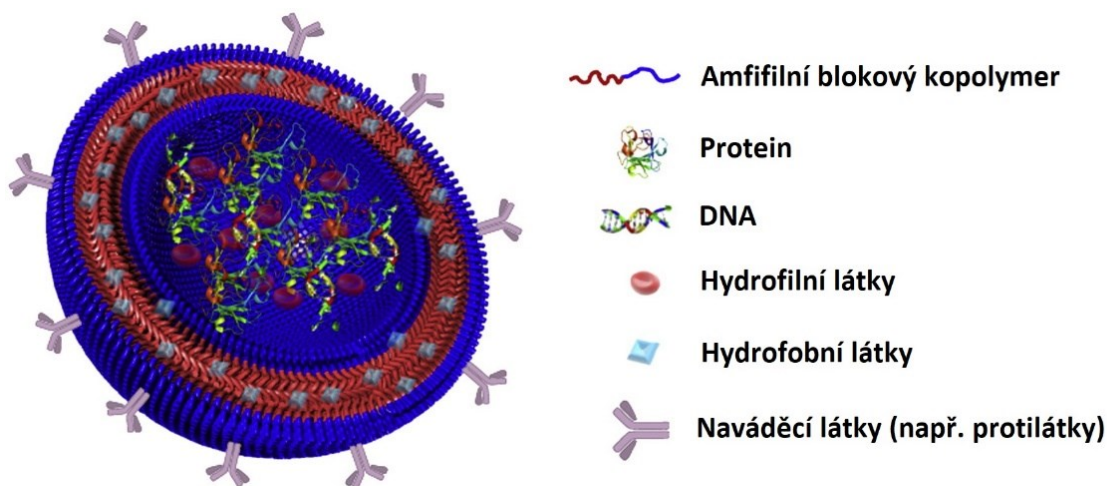
sloučeniny rovnoměrně rozloženy v matici systému. Pro přípravu PNP se používají polymery přírodní i syntetické [10].

### 2.5.2 Dendrimery

Dendrimery se skládají z vnitřního jádra a vysoce rozvětvených periferních struktur. Aktivní sloučeniny jsou začleněny jak do rozvětvených struktur, tak uvnitř jádra hlavně na základě elektrostatických nebo kovalentních interakcí. Jejich velikost může být od 1 do 100 nm. Dendrimery se vyznačují vysokou rozpustností, schopností cílení, stabilitou, a zejména monodisperzností systému. Naproti tomu není uvolňování látek příliš účinné a výrobní náklady jsou vysoké. Byly však vyvinuty nové dendronizované polymery, mezi něž patří např. polyamidoamin (PAMAM), který je v poslední době velmi využíván [10].

### 2.5.3 Polymerzomy

Polymerzomy jsou umělé vezikuly tvořené samouspořádáním kopolymerů amfipatických bloků [10]. Typicky mají podobu dutých kuliček, které v jádře obsahují vodný roztok, jež je obklopen dvouvrstvou membránou (Obr. 10) [15]. Navzdory jejich podobnosti s lipozomy jsou méně propustné a stabilnější. Mají schopnost vázat protilátky, inkorporovat proteiny, hydrofobní a hydrofilní bioaktivní sloučeniny, a dokonce i fragmenty DNA a RNA do své membrány [10]. Vlastnosti polymerzomů lze snadno ovlivnit použitím různých blokových kopolymerů, které jsou biologicky odbouratelné a/nebo schopné reagovat na podněty. Tyto výhody činí polymerzomy jedny z nejzajímavějších supramolekulárních struktur pro potenciální aplikace při dodávání aktivních látek, léčiv, genů a proteinů v nově vznikající oblasti nanomedicíny a nanobiologie [16].



Obrázek 10: Struktura polymerzomu (upraveno dle [15])

### 2.5.4 Micely

Polymerní micely jsou tvořeny samouspořádáním amfifilních polymerů, po dosažení tzv. kritické micelární koncentrace (CMC). Velikost agregátů se pohybuje v rozmezí 10 až 100 nm. V závislosti na hydrofilních a hydrofobních segmentech a rozpouštědle mohou micely zaujímat různé tvary, jako jsou sférické, tubulární, inverzní micely atd. [17].

## 2.6 Další typy nosičů

### 2.6.1 Emulzní systémy

Emulzní systémy jsou heterogenní disperzní soustavy, které vznikají dispergováním dvou vzájemně nemísitelných kapalin. Velikost kapek závisí na stupni homogenizace a na povaze jednotlivých kapalných fází. Emulze můžeme klasifikovat podle polaritý disperzního prostředí na přímé označované jako o/v (olej ve vodě) a obrácené označované jako v/o (voda v oleji). Dále se mohou dělit podle koncentrace nebo velikosti rozptýlených částic na makroemulze, mikroemulze a nanoemulze, z nichž nanoemulze bývají definovány jako termodynamicky nejstabilnější a transparentní [18].

### 2.6.2 Anorganické systémy

Kromě výše popsaných nosných systémů na bázi organických látek přitahují pozornost i anorganické materiály, které jsou potencionálními nosiči pro potravinářské, farmaceutické i lékařské aplikace [10]. Příkladem mohou být mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého, které získaly na popularitě díky velkému povrchu, objemu pórů, biokompatibilitě a biodegradabilitě, což jsou výhodné vlastnosti pro zapouzdření a dodání flavonoidů [19].

Dalším příkladem anorganického nosného systému jsou superparamagnetické nanočástice oxidu železa, které kromě biokompatibility a malé velikosti mají i vysoký magnetický moment v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Díky těmto superparamagnetickým vlastnostem nacházejí uplatnění např. jako nanosenzory, nebo kontrastní látky při zobrazování magnetickou rezonancí, avšak nejslibnější aplikací se jeví cílené dodávání léků založené na magnetické odezvě oxidu železa, což umožňuje magnetické cílení, které prodlužuje zadržování nanočástic v cílové tkáni [10].

### 3 METODY ENKAPSULACE

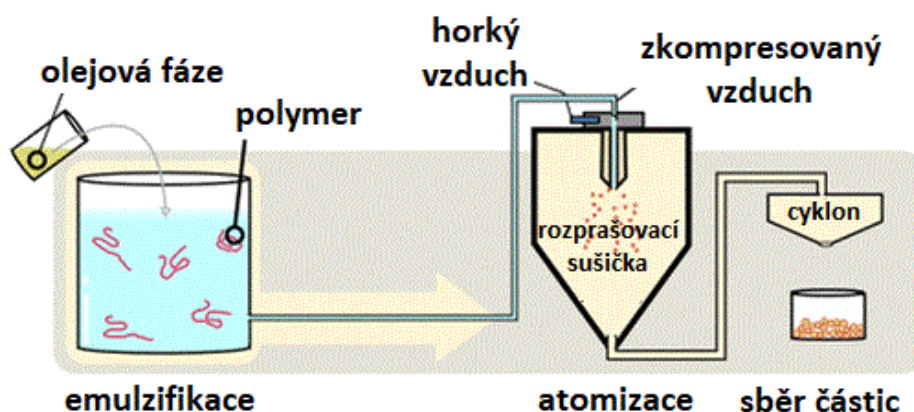
Pro enkapsulaci látek byla vyvinuta řada technik, přičemž při výběru konkrétní metody je třeba brát v úvahu charakter materiálu, který má být enkapsulován, stejně jako vlastnosti nosiče, jeho morfologie a velikost. Optimalizace těchto faktorů může výrazně ovlivnit účinnost enkapsulace [20].

Enkapsulační techniky můžeme rozdělit do tří základních skupin, a to na techniky fyzikálně-mechanické, fyzikálně-chemické a chemické. Do první skupiny metod patří sprejové sušení, extruze, srážení fázovou inverzí či nástřik ve fluidním loži. Metody fyzikálně-chemické zahrnují metody jako je koacervace, “layer-by-layer“, iontová gelace a zesíťování suspenze. Mezi chemické metody patří mezifázová polymerace a polymerace in situ (suspenzní, emulzní, disperzní polymerace) [21].

Následující přehled je zaměřen především na vybrané metody pro enkapsulaci polyfenolických látek.

#### 3.1 Sprejové sušení

Mechanismus sprejového sušení je založen na odstranění vlhkosti pomocí ohřáté atmosféry, které je produkt vystaven. Proces zahrnuje tři hlavní fáze: atomizaci, přeměnu kapiček na částice a sběr částic (Obr. 11). Roztok je čerpán do rozprašovače, který jej disperguje do jemných kapiček. Poté jsou kapičky transportovány do sušicí plynové komory, kde dochází k odpařování vlhkosti a vznikají suché částice. Nakonec jsou připravené vysušené částice odděleny od sušicího média a shromážděny v příslušné nádobě [22].



Obrázek 11: *Proces sušení rozprašováním (upraveno dle [23])*

Prášky vytvořené touto technikou jsou stabilní, odolné vůči mikrobiologické a oxidační degradaci, mají nízkou aktivitu vody, jsou více rozpustné a vykazují lepší kvalitativní

parametry (barva, chuť, živiny). Avšak vysoká teplota procesu (150-220 °C vstupního vzduchu a 50-80 °C výstupního vzduchu) má neblahý vliv na senzitivní sloučeniny jako jsou vitaminy, barviva, lykopen,  $\beta$ -karoten a polyfenoly [9].

Technika sprejového sušení má kvůli nízkým výrobním nákladům široké využití především v potravinářském průmyslu. Jako obalový materiál může být použit maltodextrin, arabská guma, chitosan atd. [9].

### 3.2 Lyofilizace

Lyofilizace je často používaná enkapsulační metoda, která je založena na dehydrataci sublimací zmrazeného vzorku. Vstupní emulze je zmrazena při nízkých teplotách, zmrazený roztok je následně vystaven extrémně nízkým tlakům a vyrobené krystaly jsou sublimovány. Dalším krokem je desorpce, a nakonec skladování ke stabilizaci materiálů. Vzhledem k použití vakuové technologie a době sušení (24-48 h) je lyofilizace považována za poměrně nákladnou a energeticky náročnou techniku. Na druhou stranu se jedná o metodu vhodnou pro citlivé bioaktivní sloučeniny, jelikož látky nejsou vystaveny vysokým teplotám, jako je tomu v případě sprejového sušení. Výhodou také je, že lyofilizované produkty lze rychle a snadno rekonstituovat a zachovávají si své vlastnosti, jako tvar, barvu, chuť či texturu. Mezi často používané obalové materiály patří arabská guma, maltodextrin, škroby a syrovátkový protein [24], [25], [26].

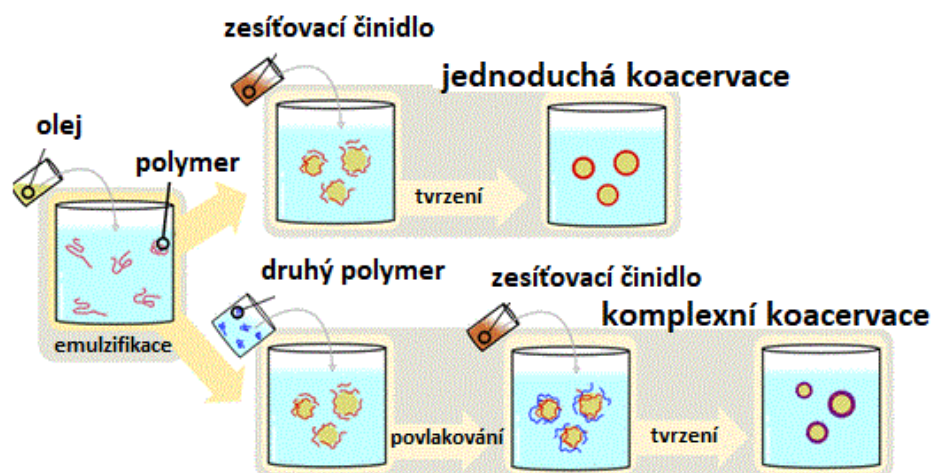
### 3.3 Vytlačování

Vytlačování neboli extruze je fyzikálně-mechanický proces pro enkapsulaci různých bioaktivních sloučenin, kdy je aktivní látka vedena tryskou do gelovacího roztoku. Konečná velikost částic se odvíjí od průměru trysky a jejím průtoku a pohybuje se v rozmezí mezi 50 a 2000  $\mu\text{m}$ . Obecně platí, že vytlačování je nákladově efektivní metoda s vysokou výrobní kapacitou, bez nutnosti použití organických rozpouštědel, vysokých teplot nebo pH. Mohou ovšem nastat potíže v případě vysoce viskózních roztoků a účinnost enkapsulace bývá nižší než u jiných metod, jako je např. sušení rozprašováním [20], [26].

### 3.4 Koacervace

Při procesu koacervace je aktivní látka distribuována v homogenním roztoku polymeru a následně se na vnějším povrchu kapky aktivní látky vytvářejí koloidní agregáty. Proces může být zahájen změnou jednoho nebo více parametrů systému, jako je teplota, pH nebo

složení reakční směsi (např. přidavek soli) [21]. Počet použitých polymerů určuje typ koacervace, přičemž při použití pouze jednoho typu polymeru se jedná o koacervaci jednoduchou, zatímco komplexní koacervace zahrnuje použití polymerní směsi jako materiálu stěny (Obr. 12). Pro zvýšení pevnosti a stability materiálu stěn lze použít zesíťovací činidla, a to chemická nebo enzymatická. Elektrostatické interakce zesíťovacího činidla napomáhají tvorbě koacervátů. Činidla musí být dostatečně silná, aby indukovala elektrostatické interakce, ale zároveň nesmí být interakce příliš velká, aby zabránila srážení. Koacervace je slibná technika, která umožňuje dosáhnout vysokou účinnost enkapsulace aktivní látky a řízené uvolňování. Jistou nevýhodou je, že výsledné kapsle nejsou stabilní ve vodných roztocích a mají tendenci se aglomerovat. Kromě toho se jedná o ekonomicky náročnější proces, který může být navíc citlivý na změny pH [20].



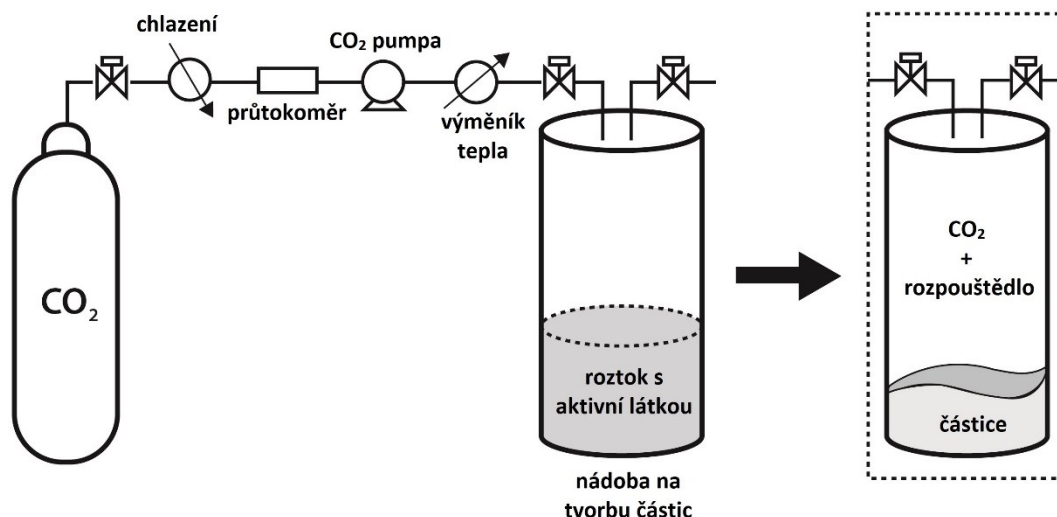
Obrázek 12: Jednoduchá a komplexní koacervace (upraveno dle [23])

### 3.5 Metoda využívající superkritické tekutiny

Dostupné klasické techniky enkapsulace s sebou nesou různé nevýhody. Ve skutečnosti často vyžadují velké množství organických rozpouštědel, povrchově aktivních látek a dalších přísad, které mohou vést k emisím těkavých organických sloučenin, způsobit problémy s eliminací odpadu a zanechat potenciálně toxické zbytky obsažené v konečných produktech. V posledních letech byly vyvinuty procesy enkapsulace využívající technologii superkritických tekutin (Obr. 13). Nejpoužívanější superkritickou kapalinou je oxid uhličitý, a to díky své relativně nízké kritické teplotě ( $T_K = 304,2 \text{ K}$ ) a tlaku ( $p_K = 7,38 \text{ MPa}$ ). Je proto vhodný pro zpracování teplotně senzitivních materiálů, navíc je netoxický, nehořlavý, levný a má status GRAS (Generally Recognized as Safe, všeobecně považováno za bezpečné) [27].



Procesy jsou obecně klasifikovány do tří skupin, v závislosti na způsobu, jakým je superkritická tekutina použita. Lze ji aplikovat jako rozpouštědlo, antirozpouštědlo nebo jako rozpouštěnou látku [27].



Obrázek 13: Schématické znázornění zařízení využívaného na enkapsulaci pomocí superkritické tekutiny  $\text{CO}_2$  (upraveno dle [28])

### 3.6 Emulzní metoda odstranění rozpouštědla

Tyto procesy jsou založeny na odpařování nebo extrakci vnitřní fáze emulze, což vede k vysrážení polymerního povlaku, který vzniká z polymerních částic předem v této fázi rozpouštěných. Polymer určený k vytvoření matrice se nejprve rozpustí v organickém rozpouštědle [27].

Při metodě odpařování se volí těkavé rozpouštědlo s velmi nízkou mísitelností s vodou, jako je dichlormethan. Poté se účinná sloučenina rozpustí nebo disperguje v roztoku polymeru. Směs je velmi jemně emulgována (ultrazvuk, homogenizátor) ve velkém množství vody obsahující povrchově aktivní látky, aby byla vytvořena emulze oleje ve vodě (o/v). Odpařování rozpouštědla se provádí při zahřátí a/nebo ve vakuu a za mírného míchání. Tento proces se nedoporučuje pro enkapsulaci těkavých sloučenin nebo molekul s vyšší afinitou ke kontinuální fázi. Metodu lze použít pro přípravu mikro- a nebo nanočástic [27].

Při metodě extrakce rozpouštědla, nanoprecipitace, musí být rozpouštědlo mísitelné s vodou ve všech poměrech. Polymerní roztok obsahující účinnou látku se za míchání vstříkne do kontinuální vodné fáze obsahující povrchově aktivní látku. Nanočástice vznikají spontánní difúzí rozpouštědla ve vodné fázi: polymer, nerozpustný ve směsi vody a rozpouštědla se

vysráží za vzniku nanočástic, přičemž zachycuje účinnou látku. Po odstranění rozpouštědla se částice promyjí, shromáždí filtrací nebo odstředěním a poté se suší nebo lyofilizují [27].

Významnou výhodou této metody je možné použití široké škály účinných látek a enkapsulačních materiálů. Na druhou stranu jsou s procesem spojeny vyšší náklady a relativně nízká účinnost enkapsulace [26].

### **3.7 Iontová gelace**

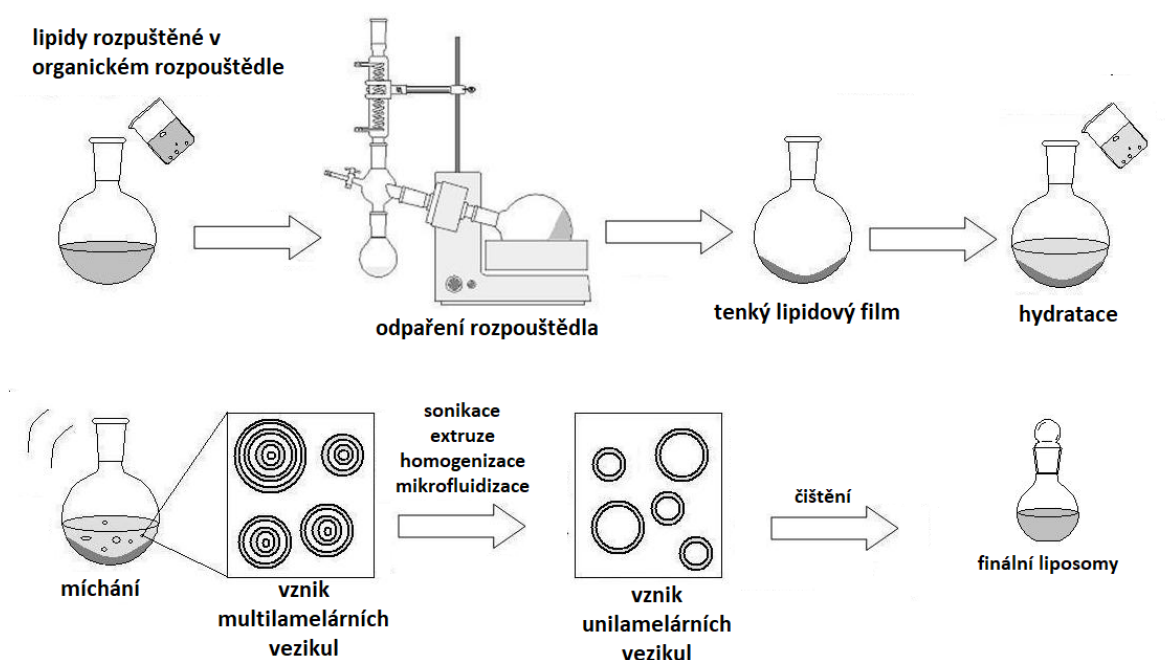
Proces iontové gelace spočívá ve vytlačování vodného roztoku polymeru pomocí stříkačky nebo trysky, ve které je aktivní materiál rozpuštěn nebo dispergován. Kapičky jsou přijímány v dispergační fázi a po reakci jsou přeměněny na sférické gelové částice [27].

### **3.8 Metoda „layer-by-layer“**

Tato metoda spočívá v nanášení střídavých vrstev opačně nabitých materiálů na minerální nebo organické substráty, které tvoří jádro částice. Jinými slovy se jedná o techniku založenou na elektrostatickém přitahování nabitých polymerů vedoucí k tvorbě membrán regulovatelné tloušťky podle počtu naskládaných vrstev [27].

### **3.9 Hydratace tenkého filmu**

Pro výrobu částic na bázi lipidů je k dispozici mnoho metod, avšak hydratace tenkého filmu patří k těm nejčastějším (Obr. 14) [27]. Tato metoda známá také jako Banghamova metoda, spočívá v rozpuštění lipidů ve vhodném organickém rozpouštědle, jako je chloroform nebo methanol. Po tomto procesu následuje odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku rotačním odpařováním, dokud se nevytvoří tenký film. Poté je tenký film hydratován ve vodném médiu nad teplotou fázového přechodu, což vede k tvorbě lipozomů MLV. Jedná se o nejjednodušší způsob tvorby vezikul. Použití je však omezené kvůli nízké schopnosti zapouzdření [29].



Obrázek 14: Schéma produkce lipozomů metodou hydratace tenkého filmu (upraveno dle [29])

### 3.10 Mezifázová polymerace

Při mezifázové polymeraci obecně dochází k reakci dvou monomerů na rozhraní kapky, což vede k vytvoření kapsle. Jedná se o relativně jednoduchou, levnou a flexibilní metodu, kterou lze díky kontrolovatelným podmínkám tuto metodu využít v různých průmyslových odvětvích, např. v agrochemii, farmacii či kosmetice. Stále jsou ovšem studovány optimalizační procesy, související s vlivem teploty, katalyzátoru, povrchově aktivní látky a aktivní složky [21].

### 3.11 Polymerace in situ

Polymerace in situ je široký pojem, který zahrnuje suspenzní, emulzní a disperzní polymeraci. Doslovný překlad slova *in situ* znamená „na místě“, což z hlediska polymerní vědy znamená v reakční směsi. Obě chemické metody – mezifázová polymerace i polymerace in situ – zahrnují polymerační reakce. V případě polymerace in situ jsou však monomer nebo prepolymer přítomny pouze v jedné reakční směsi, zatímco při mezifázové polymeraci obsahuje každá z kapalných fází alespoň jeden reaktivní monomer [21].

Suspenzní polymerace je proces, při kterém je monomer relativně nerozpustný ve vodě dispergován ve formě kapek kapaliny se sterickým stabilizátorem a za intenzivního míchání vznikají částice polymeru jako dispergovaná pevná fáze. V tomto polymeračním procesu se

používají iniciátory rozpustné v kapalném monomerní fázi. Problémem je vytvoření co nejrovnoměrnější disperze kapiček monomeru ve vodné fázi s řízenou koalescencí během polymerace. Velikost kapiček je závislá na dispergaci monomeru, stupni míchání a konstrukčním uspořádání systému míchadlo/reaktor. Přítomnost suspenzních činidel navíc brání koalescenci kapiček monomeru a adhezi částečně polymerizovaných částic v průběhu polymerizace, takže výsledné pevné částice lze získat v podobné sférické formě, v jaké byl monomer předtím dispergován ve vodné fázi [21].

Emulzní polymerace probíhá tak, že se do roztoku jádrového materiálu a povrchově aktivní látky (emulze) po kapkách přidává monomer [21].

V případě disperzní polymerace jsou monomer, iniciátor a dispergátor přítomny ve stejné směsi. Důležitou roli zde hraje rozpouštědlo, které musí být optimální pro všechny výše uvedené substráty, ale nerozpouští vyrobený polymer; polymer se v něm tedy vysráží [21].

## 4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Současné trendy ve využití flavonoidů zahrnují několik oblastí, které reflektují jejich široký terapeutický a zdravotní potenciál. Řada studií se zabývá příznivými účinky flavonoidů při regeneraci kostní tkáně, konkrétně při léčbě osteoporózy, což je chronické onemocnění, při kterém křehnou kosti a snadněji se lámou. Tímto onemocněním trpí převážně ženy po menopauze, kdy dochází ke snížení hladiny estrogenu. Několik studií prokázalo, že konzumace sójových potravin s obsahem izoflavonů může zvyšovat obsah kostních minerálů a kosterní hmoty, čímž významně snižuje klinické rizikové faktory osteoporózy [30].

Zhidong Lu a kol. [31] studovali nanočástice na bázi kyseliny polymléčné-ko-glykolové (PLGA), do nichž byl pomocí emulzní metody odstranění rozpouštědla enkapsulován kvercetin a kurkumin. *In vitro* studie prokázaly vysokou enkapsulační účinnost a minimální úroveň cytotoxicity připravených nanočástic. Ze studie *in vivo* prováděné na potkanech po ovariektomii, bylo zjištěno, že vybrané flavonoidy inkorporované v PLGA inhibovaly ztrátu trabekulární kostní tkáně, významně zlepšily hustotu kostního minerálu a mikroarchitekturu kosti. Bylo prokázáno, že připravené částice mají velký potenciál pro vývoj nových terapeutických přípravků pro léčbu osteoporózy [31].

Existuje množství studií, které se věnují antioxidačním účinkům rostlinných flavonoidů. Zmínit lze například rostlinu *Nymphaea lotus L.* neboli leknín posvátný, který je v mnoha zemích dobře známý pro své léčivé účinky. Tento druh je uváděn jako slibný zdroj mnoha flavonoidů, které by mohly být využity pro kosmetické účely. Největší pozornost si získal extrakt z květů, kdy výsledné antioxidační aktivity byly podobné syntetickému antioxidantu BHT (butylovaný hydroxytoluen) či kyselině askorbové. Dále vysokou aktivitu při odstraňování volných radikálů vykazovaly extrakty z oddenků *N. lotus*. Tyto rostlinné antioxidanty by se mohly využívat ke zlepšení oxidační stability kosmetických emulzí, jako slibná alternativa běžně využívaných potencionálně rizikových syntetických typů, jako je právě BHT [32].

Práce autorů de Oliveira a kol. [33] se zabývá možnostmi enkapsulace flavonoidů do potravin pro diabetiky. Příjem flavonoidů je významně spojen se snížením rizika a/nebo zlepšením poruchy glukózové tolerance a diabetu. Ovšem přestože flavonoidy zde představují velký potenciál, je důležité zdůraznit, že jejich účinnost souvisí se způsobem, jakým jsou tyto látky dodávány, uvolňovány, vstřebávány a metabolizovány. V důsledku toho je klíčové vybrat vhodné materiály a metody pro jejich enkapsulaci. Jedná se především

o jedlé enkapsulační materiály jako jsou lipidy, polysacharidy a proteiny. Jako vhodné metody se ukázaly např. sprejové sušení, lyofilizace, sušení ve fluidním loži, vytlačování nebo koacervace. Autoři ve své práci uvedli několik studií zabývajících se touto problematikou, kde se několik systémů podávání osvědčilo pro kontrolu uvolňování v gastrointestinálních podmínkách. Ve studii autorů Zhou a kol. [34] byl prokázán vliv typu nosného oleje použitého pro přípravu nanoemulze na biologickou dostupnost zapouzdřeného kvercetinu. Konkrétně se příznivě projeví oleje bohaté na mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (např. lněný a slunečnicový olej), než typy se středním řetězcem (např. kokosový olej). Navíc bylo prokázáno, že geometrie molekuly a rozložení polárních/nepolárních skupin ovlivňuje schopnost kvercetinu optimálně se uspořádat do hydrofobních domén smíšených micel. Huang a kol. [35] vyvinuli hydrogelové částice na bázi lipozom-chitosan, do nichž enkapsulovali současně kvercetin a lněný olej. Studie simulovaného trávení *in vitro* ukázala, že tyto hydrogelové částice mohou zlepšit stabilitu lipozomů v gastrointestinálním traktu a inhibovat rychlé uvolňování mastných kyselin. Na základě studie zrychlené oxidace a fotostability bylo prokázáno zlepšení chemické stability funkčních bioaktivních látek. Hydrogelové částice lipozom-chitosan lze tedy považovat za atraktivní možnost pro enkapsulaci funkčních bioaktivních látek v potravinářství. Na příznivé účinky flavonoidů při léčbě diabetu upozornila 12týdenní randomizovaná studie v Číně [36], která zahrnovala 160 dospělých účastníků s prediabetem nebo nově vzniklým diabetem a příznivý vliv antokyanů na snížení hladiny glykolovaného hemoglobinu.

Enkapsulace kvercetinu v nanočásticích zeinu potažených biopolymery byla předmětem studie [37]. Kompozitní nanočástice byly vyrobeny vytvořením kaseinát/ $\kappa$ -karagenového povlaku kolem nanočástic zeinu. Kvercetin byl v kompozitech přítomen v amorfním stavu a jeho účinnost zapouzdření se pohybovala okolo 76 %. Disperze nanočástic s inkorporovaným kvercetinem byly odolné vůči širokému spektru pH, solím a zvýšené teplotě, což znamená, že by mohly být začleněny do široké škály potravinářských a nápojových výrobků bez tendence k agregaci. Mimo jiné tento způsob enkapsulace kvercetinu zvýšil jeho antioxidační aktivitu a biologickou dostupnost. Celkově výsledky této studie naznačují, že kompozitní nanočástice jsou účinné při zapouzdření, zadržování a dodávání kvercetinu, a proto mohou být použity v doplňcích stravy, funkčních potravinách a farmaceutických výrobcích.

Autoři studie [38] využili niozomální formulaci na bázi kaptoprilu a kvercetinu v připravené procesem hydratace tenké vrstvy za účelem vývoje nového účinného antihypertenziva.

Částice vykazovaly vysokou účinnost zapouzdření a postupný profil uvolňování léku po dobu 24 hodin. Testy cytotoxicity byla potvrzena biologická bezpečnost lékové formy. Studie *in vivo* na potkanech prokázaly zvýšenou antihypertenzní aktivitu této hybridní niozomální formulace, která snížila systolický a diastolický tlak ve srovnání s jinými jednotlivě podávanými léky.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 5 CÍLE PRÁCE

Hlavní cíle praktické části bakalářské práce lze shrnout následovně:

- příprava směsných poloxamerních roztoků a charakterizace jejich micelárních parametrů,
- příprava niozomálních částic metodou hydratace tenkého filmu, s obsahem aktivní látky kvercetin a aditiv,
- charakterizace fyzikálně-chemických vlastností připravených systémů – velikost částic, zeta potenciál, vliv stabilizátoru, antioxidační aktivita, enkapsulační účinnost, kinetika uvolňování kvercetin.

## 6 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

### 6.1 Použité chemikálie

Poloxamer P188, Sigma Life Science

Poloxamer P407, Sigma Life Science

Quercetin Dihydrát, Carl Roth + Co. KG

Poly(ethylen glycol) 400, Aldrich

DL-a-tokoferylacetát, FICHEMA

Fosfátový pufr (pH 7)

Ftalátový pufr (pH 4)

Chlorid sodný, Iplub

Chlorid draselný, mikroCHEM

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Lachema n. p. Brno

Dihydrogen fosforečnan draselný, Lachema n. p. Brno

Tween 80, Sigma-Aldrich

0,1 mM ethanolický roztok DPPH

### 6.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy Sartorius Basic 110 S

Magnetické míchadlo Heidolph

Magnetické míchadlo 2mag magnetic motin MIX 15 eco

Tenziometr Easy Dyne Krüss

Vakuová rotační odparka Heidolph

Ultrazvuková lázeň KAITEK K-10LE

Odstředivka EBA 20, Hettich ZENTRIFUGEN

Spektrofotometr photoLab 6600 UV-VIS

Mikropipeta

Bariérový pH metr CPH 51 s kombinovanou pH elektrodou HC 103

Zetasizer Nano ZS Malvern

Parafilm M Laboratory Seal film

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

Dialyzační membrána MWCO: 12-14 kD, Spectra Por

Mikrozkumavky, typ Eppendorf

Filtr CA 0,22  $\mu\text{m}$ , Millex®GS

Zkumavky s filtrem 0,45  $\mu\text{m}$  CA, Midi Spin Filters

## 7 POSTUPY MĚŘENÍ

### 7.1 Příprava roztoků poloxamerů

Zásobní roztoky směsí poloxamerů v poměrech 2:1 a 1:2 byly připraveny smícháním roztoku P407 a P188 tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 1 %. Jednotlivé roztoky poloxamerů byly připraveny navážením příslušného množství P407 a P188 s přesností na 0,0001 g. Navážky byly rozpuštěny na míchadle za mírného zahřívání. Po rozpuštění byly roztoky kvantitativně převedeny do 100ml odměrných baněk a doplněny destilovanou vodou po rysku.

### 7.2 Stanovení kritické micelární koncentrace

Pro stanovení kritické micelární koncentrace bylo využito měření povrchového napětí na tenziometru Krüss EasyDyne (Obr. 15) pomocí metody Wilhemyho destičky. Měření probíhalo při teplotě  $25 \pm 1$  °C. Ze zásobních roztoků (1 %hm.) směsí poloxamerů byly připraveny pracovní roztoky o koncentracích 0,001 až 0,09 %hm. tak, že bylo odpipetováno vypočtené množství směsi poloxamerů a doplněno do 50ml odměrné baňky po rysku. Pipetované množství poloxamerních roztoků se vypočítalo pomocí zředovací rovnice (1).

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (1)$$

Kde:

$c_1$  koncentrace zásobního roztoku [mol/l]

$V_1$  objem zásobního roztoku [l]

$c_2$  koncentrace pracovního roztoku [mol/l]

$V_2$  objem pracovního roztoku [l]

Při samotném měření byla směs poloxamerů o určité koncentraci převedena do misky tenziometru a po ustálení hladiny bylo změřeno povrchové napětí roztoku. Stanovení bylo pro každý roztok provedeno dvakrát ve dvou sériích.



Obrázek 15: *Tenziometr EasyDyne – Krüss*

### 7.3 Příprava roztoků poloxamerů s aktivní látkou

Vzorky s aktivní látkou kvercetinem (Q) byly připravovány v pěti různých poměrech poloxamerů P188 a P407, a to 1:0, 1:2, 1:1, 2:1 a 0:1 (P188:P407). Vzorky byly připravovány navážením vypočteného množství, tak aby výsledná koncentrace směsi poloxamerů činila 1 %hm. Dále bylo přidáno 0,001 %hm. aditiva PEG 400 nebo tokoferyl acetátu (TOC) a 0,05 %hm. aktivní látky kvercetinu. Ke směsi bylo napipetováno 20 ml 96% ethanolu, následně byly vzorky přikryty parafilmem a umístěny na míchadlo při laboratorní teplotě, po dobu přibližně 30 minut při 350 rpm. Poté byly vzorky převedeny do 100ml baněk s kulatým dnem a umístěny na vakuovou rotační odparku, která byla nastavena na 50 °C a 55 rpm. Baňky po odpaření ethanolu a vzniku tenkého filmu byly zabaleny do alobalu a umístěny do exsikátoru, kde byly ponechány ve tmě přes noc. Poté byly vzorky rehydratovány pomocí 10 ml destilované vody a následně dispergovány v ultrazvukové lázni po dobu 40 až 90 minut při teplotě 40 °C.

Stejným způsobem se připravila i další sada vzorků bez aktivní látky a aditiv, sloužící jako reference.

## 7.4 Příprava pufru

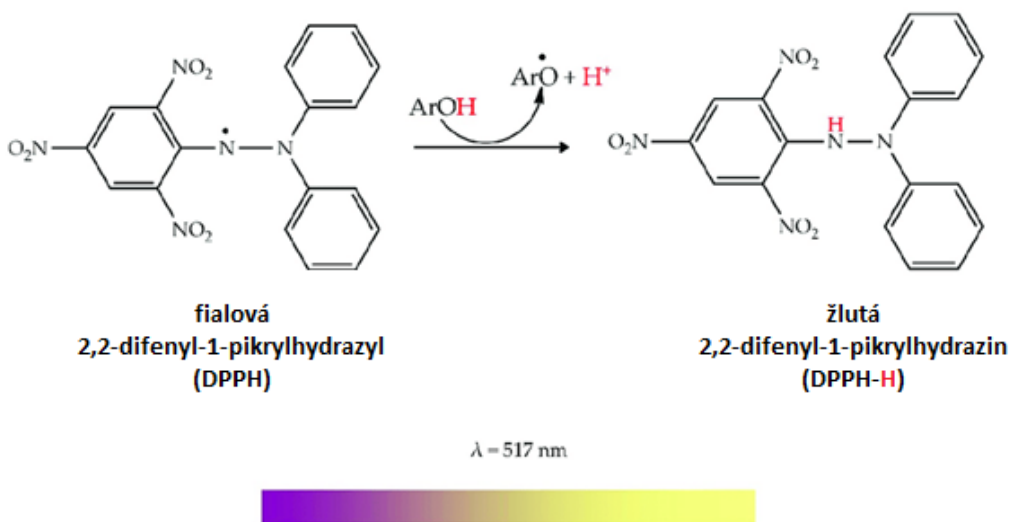
Pro stanovení uvolnění aktivní látky byl připraven fosfátový pufr, také označován jako PBS (Phosphate Buffered Saline). Jednotlivé suroviny (Tabulka 1) byly naváženy a rozpuštěny v malém množství destilované vody a kvantitativně převedeny do litrové odměrné baňky, která poté byla doplněna destilovanou vodou po rysku. K pufru byl přidán Tween 80 (0,5 %hm.) pro zajištění lepší rozpustnosti aktivní látky při testu uvolňování. Hodnota pH byla přeměřena pomocí pH metru.

Tabulka 1: Navážky pro 1 litr pufru o hodnotě pH 7,5

Surovina	Navážka [g]	Koncentrace [mol/l]
Chlorid sodný ( $M_w = 58,44$ g/mol)	8	0,137
Chlorid draselný ( $M_w = 74,55$ g/mol)	0,2	0,0027
Hydrogenfosforečnan disodný ( $M_w = 141,96$ g/mol)	1,44	0,01
Dihydrogen fosforečnan draselný ( $M_w = 136,09$ g/mol)	0,245	0,0018

## 7.5 Měření antioxidační aktivity

Pro měření antioxidační aktivity vzorků byla využita metoda se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), který je redukován na DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Tato reakce je charakteristická svou barevnou změnou, kdy fialový roztok DPPH přechází na světle žlutou (Obr. 16) [39].



Obrázek 16: Mechanismus metody s DPPH (upraveno dle [40])

Vzorek o objemu 200  $\mu$ l byl smíchán s 0,1 mM ethanolickým roztokem DPPH a po dobu 30 minut ponechán ve tmě při teplotě 25 °C. Následně se spektrofotometricky změřila absorbance při vlnové délce 517 nm s ethanolem jako referencí. Procentuální úbytek absorbance byl vypočítán podle vztahu (2):

$$\%A = \frac{A_{blank} - A_{vzorek}}{A_{vzorek}} \cdot 100 \quad (2)$$

Kde:

%A množství inhibované látky [%]

$A_{blank}$  absorbance 0,1 mM ethanolického roztoku DPPH oproti referenci při 517 nm

$A_{vzorek}$  absorbance změřená na vzorku oproti referenci při 517 nm

## 7.6 Měření velikosti částic a zeta potenciálu

Velikost částic byla měřena pomocí dynamického rozptylu světla na přístroji ZetaSizer Nano ZS Marvel. Z připravených vzorků bylo odpipetováno 0,5 ml do 5ml kádinky a naředěno 1 ml dvakrát přefiltrovanou destilovanou vodou (filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu$ m). Takto zředěný roztok byl důkladně promíchán a převeden do kyvety (10 mm), která byla následně vložena do přístroje. Měření bylo prováděno na vzorcích s kvercetinem a oběma typy aditiv (PEG 400 a tokoferyl acetát) a následně přeměřeno po měsíci uložení vzorků v lednici (cca 4 °C) pro zhodnocení fyzikální stability disperzního systému.

Zeta potenciál byl měřen na stejných sadách vzorků s kvercetinem a aditivou (PEG 400 a tokoferyl acetát) na přístroji ZetaSizer Nano ZS Marvel. Bylo odpipetováno 6  $\mu$ l z připravených vzorků a naředěno 3 ml dvakrát přefiltrované destilované vody. Naředěné vzorky byly důkladně promíchány a pomocí injekční stříkačky převedeny do kyvety typu DTS1070, která byla následně vložena do přístroje.

## 7.7 Měření enkapsulační účinnosti

Pro stanovení enkapsulační účinnosti vzorků poloxamerů s kvercetinem a aditivem (PEG 400 nebo tokoferyl acetát) byl připraven zásobní roztok voda:ethanol v poměru 1:1 do 100ml odměrné baňky. Při stanovování bylo využíváno zkumavek s filtrem (filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu$ m), do kterých bylo napipetováno 2 ml vzorku a 2 ml ethanolického vodného roztoku v poměru 1:1. Zkumavky byly následně vloženy do odstředivky na 10 minut při 5000 rpm. Ze zkumavky bylo odebráno 2 ml supernatantu a naředěno 2 ml ethanolickým

vodným roztokem. Naředěné vzorky byly důkladně promíchány a spektrofotometricky byly stanoveny hodnoty absorpance při vlnové délce 375 nm, z nichž byla následně vypočítána enkapsulační účinnost dle vztahu (3). Měření enkapsulační účinnosti bylo provedeno ve dvou opakováních pro oba typy aditiv.

$$\%EE = \left(1 - \frac{Q_{volný}}{Q_{původní}}\right) \cdot 100 \quad (3)$$

Kde:

%EE            množství enkapsulovaného kvercetinu [%]

$Q_{volný}$         koncentrace kvercetinu po odstředění [mg/ml]

$Q_{původní}$      původní koncentrace kvercetinu [mg/ml]

## 7.8 Kinetika uvolnění aktivní látky

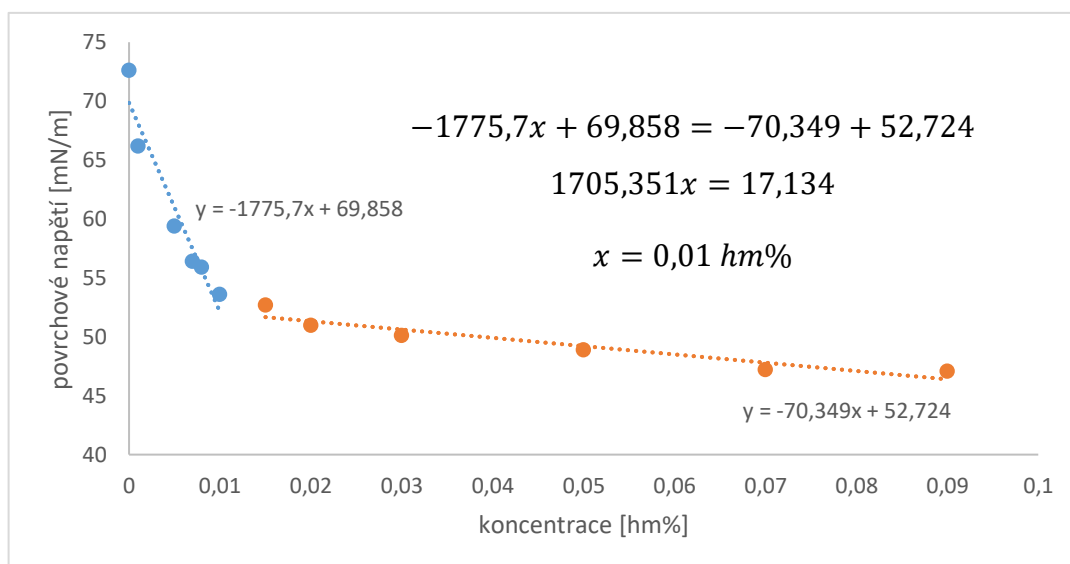
Ze vzorků směsi poloxamerů s kvercetinem a aditivem bylo napipetováno 5 ml a převedeno do dialyzační membrány (12 až 14 kD), která byla uzavřena svorkami a vložena do kádinky, do které bylo vloženo míchadlo a přidáno 25 ml PBS pufru + Tween 80. Kádinky s dialyzačními membránami byly zakryty parafilmem a uchovávány ve tmě při laboratorní teplotě za kontinuálního míchání při 300 rpm. Poté byly v definovaných intervalech (1, 2, 4, 7, 24 až 192 h) odebírány vzorky o objemu 2 ml do mikrozkušavek Eppendorf a na spektrofotometru byla změřena absorpance při vlnové délce 378 nm.



## 8 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 8.1 Stanovení CMC poloxamerů

Kritická micelární koncentrace (CMC) je důležitou charakteristikou tenzidů a vypovídá o povrchové aktivitě systému. Stanovení CMC bylo provedeno metodou Wilhelmyho destičky, kde je měřeno povrchové napětí kapaliny. Kritická micelární koncentrace byla stanovována ve dvou opakováních pro roztoky poloxamerů P188:P407 v poměru 1:2 a 2:1. Naměřené hodnoty povrchového napětí byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci směsi tenzidů. Hodnoty CMC byly odečteny jako průsečíky směrnic jednotlivých grafů. Vybraný graf s průsečíky směrnic se vzorovým výpočtem CMC je uveden na Obr. 17.



Obrázek 17: Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci směsi poloxamerů P188:P407 v poměru 2:1 při 25 °C

Naměřené hodnoty CMC, stanovené ve dvou opakováních pro oba poměry poloxamerů byly zprůměrovány a využity pro výpočet hodnoty Gibbsovy micelizační energie  $\Delta G_m$  (dle rovnice 4 [41]) a adsorpce na rozhraní  $\Gamma$  (dle rovnice 5 [42]), které jsou uvedeny v Tab.2.

$$\Delta G_m = RT \ln(CMC) \quad (4)$$

Kde:

R univerzální plynová konstanta [ $J K^{-1} mol^{-1}$ ]

T termodynamická teplota [K]

CMC kritická micelární koncentrace

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \left( \frac{d\gamma}{d \ln C} \right)$$

Kde:

R univerzální plynová konstanta [ $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ]

T termodynamická teplota [K]

$d\gamma/d \ln C$  směrnice z grafu závislosti povrchového napětí na hodnotě přirozeného logaritmu koncentrace

Tabulka 2: *Micelární parametry směsí poloxamerů*

Poměr poloxamerů P188:P407	1:2	2:1
CMC [hm.%]	0,0106±0,0005	0,0098±0,0003
CMC [mM]	0,018±0,003	0,012±0,002
$\Delta G$ [kJ/mol]	-27,1±0,4	-27,9±0,2
$\Gamma \cdot 10^{-7}$ [mol/m <sup>2</sup> ]	1,66±0,00	1,60±0,02

Z Tabulky 2 je patrné, že hodnoty Gibbsovy micelární energie jsou záporné, což potvrzuje spontánnost procesu tvorby micel u směsných poloxamerních systémů. Zároveň platí, že čím více je hodnota  $\Delta G_m$  záporná, tím je proces micelizace z termodynamického hlediska snazší. Námi stanovené hodnoty se pohybovaly okolo  $-27$  kJ/mol. Podobný výsledek pro Poloxamer 407 ( $-24$  kJ/mol) při teplotě  $30$  °C byl stanoven ve studii [43]. Jindal a kol. [44], kteří se zabývali studiem směsných micel na bázi Poloxameru 407 a Pluronic 123 v různých poměrech, získali hodnoty Gibbsovy micelární energie ještě nižší, okolo  $-40$  kJ/mol, které se ještě snížily s rostoucí teplotou. Hodnoty povrchové adsorpce na rozhraní, indikující úroveň povrchové aktivity dané látky, se pohybuje okolo  $1,6 \cdot 10^{-7}$  mol/m<sup>2</sup>, což je srovnatelný výsledek jako ve studii Shubhra a kol. [45], kde byla pro jednoduché micely pouze na bázi Poloxameru 407 stanovena adsorpce na rozhraní v průměru  $1,8 \cdot 10^{-7}$  mol/m<sup>2</sup>.

Hodnoty kritické micelární koncentrace jsou poměrně nízké, a to od 0,01 až 0,02 mM pro směs 2:1 a 1:2. Je zřejmé, že hodnoty koncentrací, kdy se začínají tvořit micely, závisejí na mnoha faktorech, přičemž primární roli hraje molekulární struktura dané látky. V našem případě se jedná o polymerní surfaktanty, které se mohou výrazně lišit svou molekulovou hmotností a hydrofilně-lipofilní rovnováhou (HLB).

Různých hodnot CMC bylo dosaženo i v předešlých studiích. Autoři Kabanov a kol. [46], kteří studovali blokové kopolymery na bázi Pluronicu jako potenciální nosné systémy pro

dodávání léčiv, uvádějí kritickou micelární koncentraci Poloxameru 188 (Pluronic F68) hodnotu 0,48 mmol a pro Poloxamer 407 (Pluronic F127) hodnotu 0,0028 mmol.

Podobného výsledku pro Poloxamer 188 (CMC hodnota stanovená teziometrickým měřením 0,047 mM) bylo dosaženo ve studii autorů [47], kde následně do micel enkapsulovali sildenafil, což je prostředek využívaný jako inhibitor specifické fosfodiesterázy. Vývojem směsných micel na bázi Poloxameru 407 a Pluronic 123 v různých poměrech (1:2, 1:1, 2:1) pro zapouzdření antiretrovirového léčiva Nevirapinu se zabývala studie [44]. Kritické micelární koncentrace pro směsné micely Poloxamer 407/Pluronic P123 při teplotě 25 °C byly stanoveny na hodnoty 0,0029 hm.% pro poměr 1:2, 0,0032 hm.% pro 1:1 a 0,0059 hm.% pro 2:1.

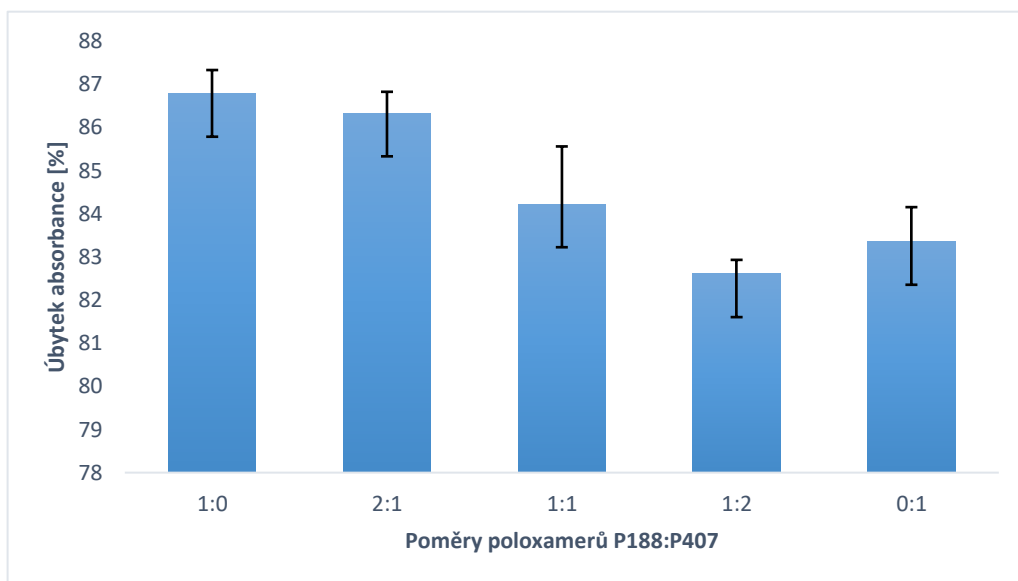
## 8.2 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita připravených formulací byla testována na základě jejich schopnosti pohlcovat volné radikály DPPH, prostřednictvím UV-VIS spektrofotometrie při vlnové délce 517 nm.

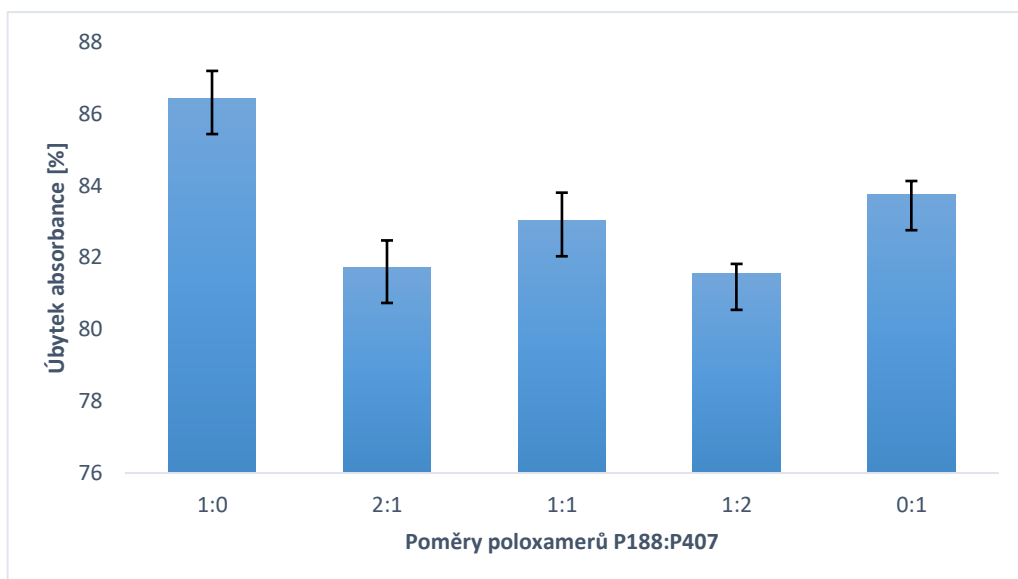
Měření probíhalo na směsích poloxamerů P188:P407 s kvercetinem a aditivou (PEG 400 nebo tokoferyl acetát), ve dvou opakováních.

Antioxidační účinky bylo možno pozorovat i vizuálně po uplynutí inkubační doby, kdy byla patrná výrazná barevná změna vzorků původního fialového na světle žluté zbarvení.

Z následujících grafů na Obr. 18 a 19 lze vidět, že všechny směsi poloxamerů s enkapsulovaným kvercetinem vykazovaly hodnoty úbytku absorpance nad 80 %, bez ohledu na to, zda byl ve formulaci přítomen PEG 400 nebo tokoferyl acetát. Nicméně nejvyšší antioxidační účinek byl zaznamenán u směsí poloxamerů v poměru 1:0 byly hodnoty inhibice největší, kdy pro aditiva PEG 400 i TOC hodnota přesáhla 86 %. Podobných výsledků bylo dosaženo i ve studii [48], kde byl kvercetin inkorporován do multilamelárních lipozomů na bázi fosfatidylcholinu.



Obrázek 18: Antioxidační aktivita vzorků poloxamerů Q/PEG 400



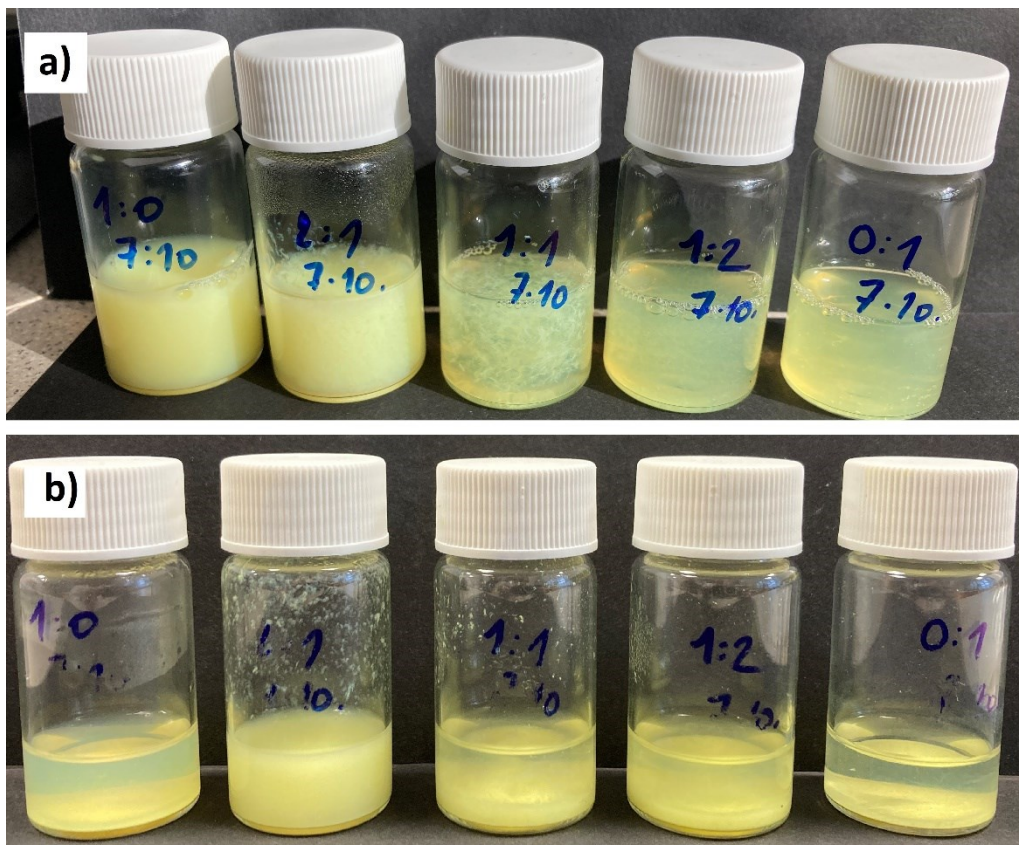
Obrázek 19: Antioxidační aktivita vzorků poloxamerů Q/TOC

Autoři studie [49] hodnotili antioxidační aktivitu několika aktivních látek, zahrnujících kromě kvercetinu i festin, myricetin, morin, rutin, BHT nebo breviskapin, z nichž právě kvercetin a festin vykazovaly nejsilnější schopnost zachycovat volné radikály. Jardiš a kol. [50] se věnovali enkapsulaci kvercetinu do nanočástic chitosanu zesíťovaných iontovou gelací s tripolyfosforečnanem sodným, kde z hodnocení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH bylo zjištěno, že enkapsulovaný kvercetin vykazuje větší antioxidační účinek ve srovnání s kvercetinem volným.

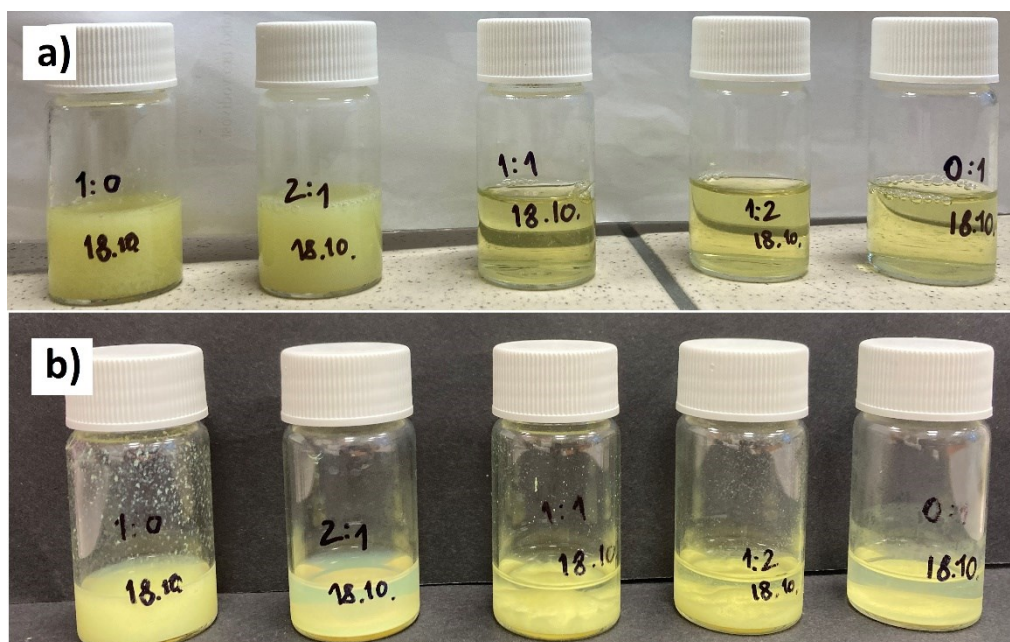
### 8.3 Vizualní hodnocení

Připravené vzorky poloxamerů s kvercetinem a aditivy byly hodnoceny i vizuálně, a to v den přípravy a poté po jednom měsíci skladování při teplotě 4 °C (Obr. 20 a 21). Připravené směsi vykazovaly charakteristické nažloutlé zbarvení. Vzorky Q/PEG 400 byly zakalené a směs v poměru 1:1 byla nehomogenní již po přípravě. Po uplynutí doby skladování došlo ke gravitační separaci u většiny vzorků, vyjma poměru 2:1 (Obr. 20 b)).

Vzorky Q/TOC vykazovaly také žluté zbarvení, ovšem na rozdíl od formulace s PEG 400 byl zákal pozorován pouze u vzorků s vyšším zastoupením poloxameru P188 (1:0 a 2:1), zatímco ostatní směsi byly čiré (Obr. 21). Po sledované době byl pozorován podobný jev jako v případě Q/PEG 400 systémů, tj. sedimentace jako projev gravitační nestability.



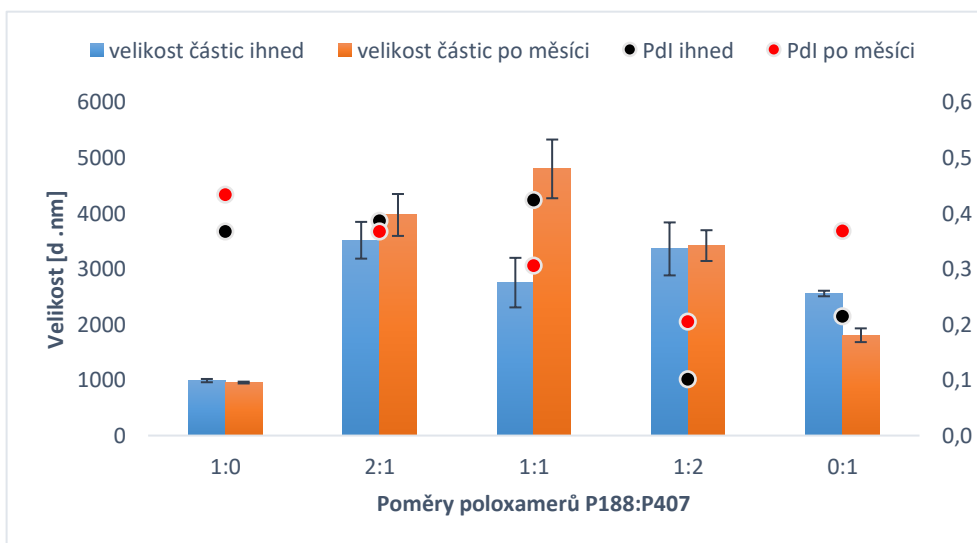
Obrázek 20: Vzorky poloxamerů Q/PEG 400 a) ihned po přípravě b) po měsíci skladování při 4 °C



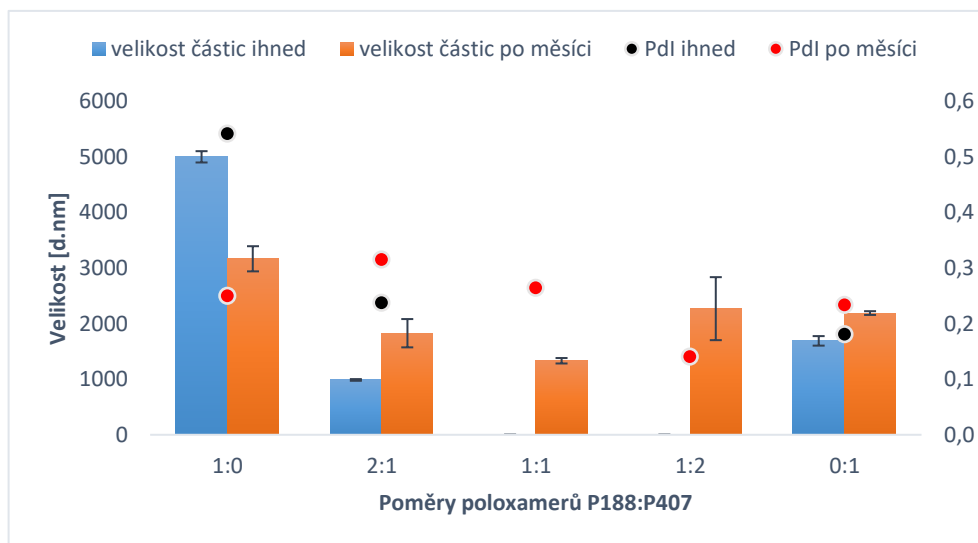
Obrázek 21: Vzorky poloxamerů Q/TOC a) ihned po přípravě b) po měsíci skladování při 4 °C

#### 8.4 Velikost částic

Velikost částic je významným parametrem, který poskytuje zásadní informace o fyzikálních vlastnostech a stabilitě daného systému. Velikost částic spolu s indexem polydisperzity byly stanoveny pomocí metody dynamického rozptylu světla. Měření bylo prováděno ihned po přípravě roztoků a poté po měsíci skladování při teplotě 4 °C. Výsledky měření poloxamerních směsí s kvercetinem a aditivy (PEG 400 a tokoferyl acetát) jsou uvedeny na Obr. 22 a 23.



Obrázek 22: Velikost částic a polydisperzita směsí poloxamerů Q/PEG 400



Obrázek 23: Velikost částic a polydisperzita směsí poloxamerů Q/TOC

Z grafu na Obr. 22 je zřejmé, že, velikost částic měřená ihned po přípravě niozomálních formulací se pohybuje od 989 nm pro poměr 1:0 do zhruba 3500 nm pro směs 2:1. Hodnocením velikosti částic v čase lze potvrdit nejvyšší stabilitu u formulace obsahující pouze Poloxamer 188 a pak u směsi v poměru 1:2, u kterých po měsíci skladování nedošlo k výrazným změnám tohoto parametru. Nejvýznamnější změna se projevila u směsi 1:1, kdy se velikost zvýšila během měsíce skladování o více jak 40 %.

Index polydisperzity vypovídající o distribuci velikosti částic se pohybuje v rozsahu 0,1 až 0,4. Autoři Javani a kol. [51] studovali niozomální částice připravené metodou hydratace tenkého filmu s enkapsulovaným kvercetinem v přítomnosti různých aditiv, včetně polyetylenglykolu s různou molekulovou hmotností. V porovnání s našimi výsledky dosáhli nižších hodnot velikosti částic, a to od 100 do zhruba 1100 nm, v závislosti na konkrétním typu aditiva a také na technice přípravy (bez a s využitím ultrasonikace).

V případě částic s tokoferyl acetátem se velikosti částic pohybovaly v rozpětí 980–5000 nm (Obr. 23). Podobných výsledků bylo dosaženo i ve studii [52], kde autoři enkapsulovali dithranol do formulace na bázi surfaktantu Span 60 a cholesterolu. Směsi v poměru 1:1 a 1:2 nejsou uvedeny v grafu, jelikož zjištěná velikost částic byla nad hranicí měřitelnosti přístroje. Po měsíci skladování byly zaznamenány pouze méně zásadní změny velikosti částic. Jako nejvíce stabilní se jevily částice v poměru 0:1 a 2:1. Hodnoty indexu polydisperzity vzorků se pohybovaly přibližně v rozsahu 0,2 až 0,5.



Pro srovnání bylo provedeno také měření poloxamerních směsí P188 a P407 bez aktivní látky a aditiv, přičemž velikosti částic se v tomto případě pohybovaly ve výrazně nižších hodnotách, a to v rozmezí 115–350 nm. Podobných hodnot velikosti částic ( $111,8 \pm 14,6$  nm) bylo dosaženo v práci [53], kde studovali směsné micely složené ze dvou biokompatibilních kopolymerů Soluplus a Poloxamer 188, do nichž byla inkorporována bioaktivní složka magnolol.

Dle literatury se velikost niozomů může pohybovat v poměrně širokém rozpětí, a to přibližně od 20 nm až do 50  $\mu$ m [54]. Je zřejmé, že tento parametr je ovlivněn řadou faktorů, jako je charakter nosného materiálu, jeho struktura a molekulová hmotnost. Bylo prokázáno, že volba povrchově aktivní látky a její HLB hodnota má přímý dopad na velikost částic a index polydisperzity, v menší míře je pak ovlivněn zeta potenciál. Je známo, že hydrofilní/lipofilní rovnováha povrchově aktivních látek reflektuje procentuální podíl hydrofilních a lipofilních skupin v molekule. Tento parametr také může vypovídat o schopnosti materiálu tvořit vezikuly. Povrchově aktivní látky, jako je Tween 20, 60 a 80 s hodnotami HLB mezi 14 a 17, nejsou schopny tvořit vezikuly bez přidání lipidů, zatímco surfaktanty typu Span s hodnotami HLB  $< 8$  ano. Hydrofilita molekuly povrchově aktivní látky může také ovlivnit index PDI, látky s vyšší hodnotou HLB obecně vykazují i větší index polydisperzity [55]. Zásadní vliv použitého typu polymeru na velikost niozomálních částic připravených na bázi kombinace různých povrchově aktivních látek (Tween 60/Span 60 a Tween 80/Span 80), polymerů (PEG 400, 1500 a 10 000, polyglykol), glycerolu a cholesterolu byl prokázán ve studii [51]. Důležitou roli hraje i použitá technika přípravy nosičů, případně zařazení kroků, jako je filtrace, výkonnější ultrazvuková dispergace a podobně.

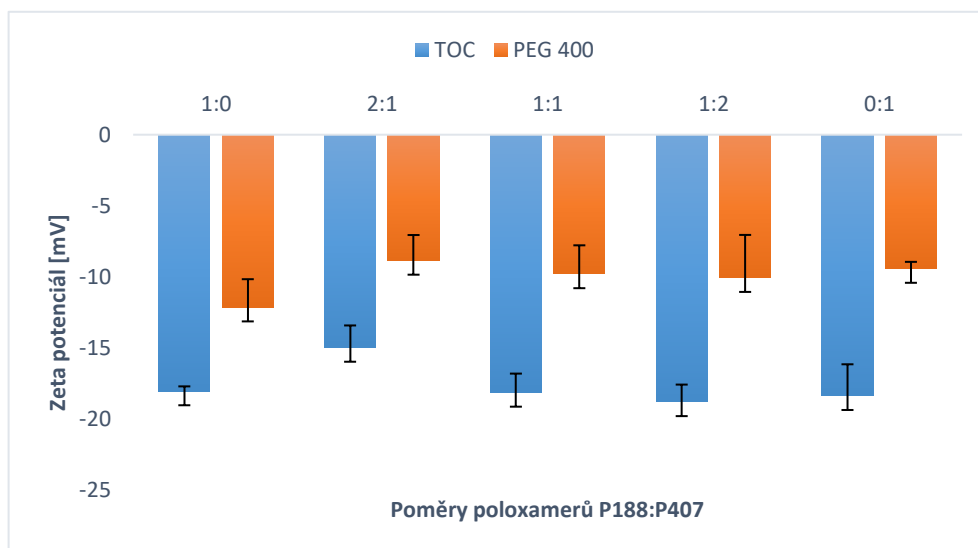
## 8.5 Zeta potenciál

Každou částici obklopuje vrstva nábojů, tzv. elektrická dvojvrstva, která má dvě části: vnitřní vrstvu (Sternova), kde jsou ionty silně vázány, a vrstvu vnější (difúzní). Uvnitř difúzní vrstvy existuje pomyslná hranice nazývaná jako rovina skluzu. Pokud se dá částice do pohybu, vázané ionty se začnou pohybovat s částicí. Potenciál přítomný právě na této hranici je charakterizován jako zeta potenciál. Obecná hranice mezi stabilní a nestabilní suspenzí je stanovena jako  $\pm 30$  mV. Tzn. že částice se zeta potenciálem pozitivnějším než +30 mV nebo zápornějším než -30 mV se obvykle považují za elektrostaticky stabilní. Zeta potenciál je jedním z nejpoužívanějších základních parametrů, o nichž je známo, že ovlivňují



stabilitu z hlediska dispergace, agregace nebo flokulace a může být použit ke zlepšení stability formulací disperzních systémů [56], [48].

Následující graf na Obr. 24 znázorňuje naměřené hodnoty zeta potenciálu pro vzorky směsí poloxamerů s inkorporovaným kvercetinem a s aditivou (PEG 400/tokoferyl acetát).

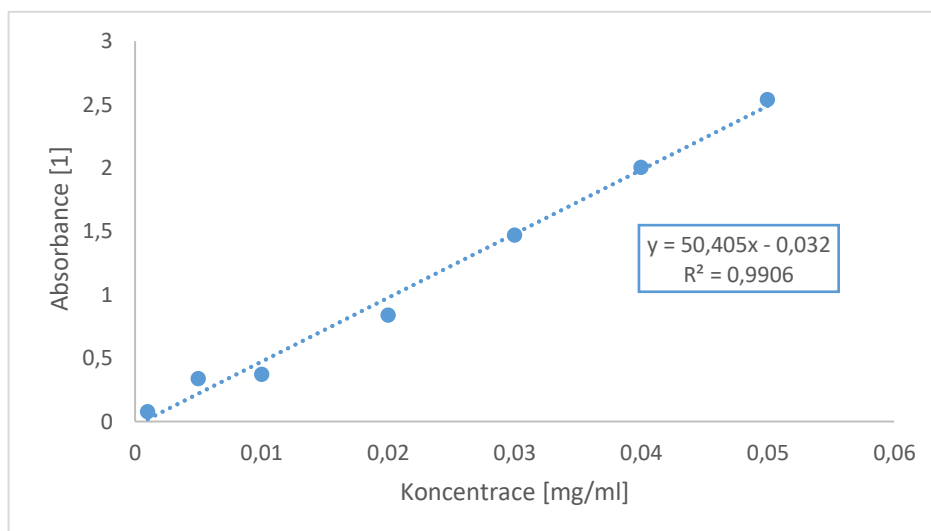


Obrázek 24: Zeta potenciál směsí poloxamerů Q/PEG 400 a Q/TOC

Z výsledků je patrné, že náboj se pohyboval od  $-9$  do  $-12$  mV pro vzorky Q/PEG 400 a od  $-15$  do  $-18$  mV pro směsi Q/TOC, tudíž nelze očekávat významný podíl elektrostatické stabilizace připravených niozomálních částic. Hodnoty pH roztoků se pohybovaly v rozsahu od 6 do 7. Záporné hodnoty náboje byly naměřeny i v jiných studiích. Elmi a kol. ve své studii [57], kteří připravili niozomy na bázi surfaktantů Span 60 a Tween 80 s kvercetinem, naměřili zeta potenciál niozomů v rozsahu  $-8,59$  až  $-28,58$  mV. Patel a kol. [58], kteří připravili a charakterizovali směsné micely na bázi blokových kopolymerů s inkorporovaným kvercetinem, získali srovnatelné hodnoty zeta potenciálu s naším měřením, v rozsahu od  $-5$  do  $-16$  mV, v závislosti na konkrétním složení dané formulace, tj. zastoupení jednotlivých poloxamerů typu P123/F88.

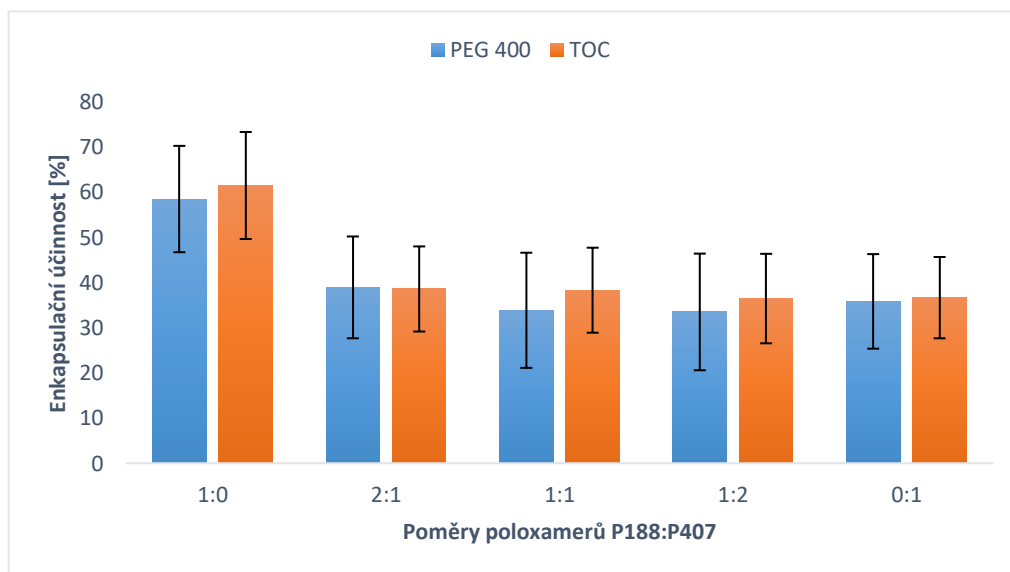
## 8.6 Enkapsulační účinnost

Enkapsulační účinnost byla hodnocena prostřednictvím UV-VIS spektrofotometrie při vlnové délce 375 nm. Kalibrace aktivní látky, kvercetinu, byla provedena v ethanolickém vodném roztoku 1:1. Kalibrační přímka použité aktivní látky včetně rovnice lineární regrese je zobrazena na Obr. 25.



Obrázek 25: Kalibrační přímka pro kvercetin (měřeno při 375 nm)

V grafu na Obr. 26 jsou znázorněny hodnoty dosaženého enkapsulačního účinku pro jednotlivé poměry polymerů s různým typem aditiva. Nejvyššího stupně enkapsulace bylo dosaženo u směsi na bázi samotného poloxameru P188, a to jak v případě PEG 400 (58,5 %), tak s tokoferyl acetátem (61,5 %). Ostatní směsi vykazovaly enkapsulační kapacitu v rozmezí 30–40 %.

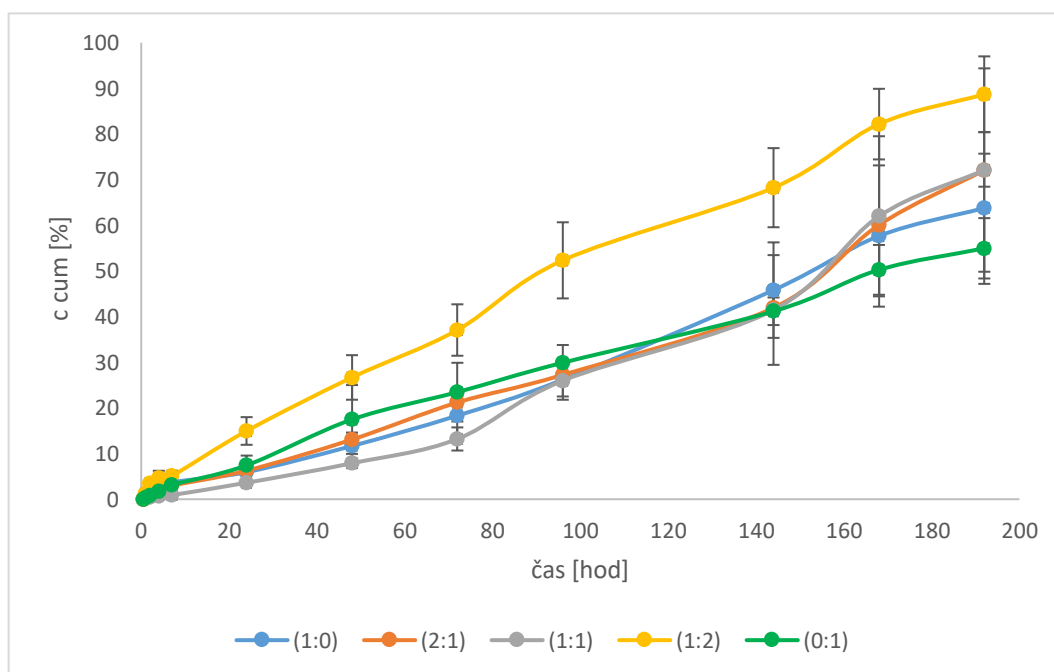


Obrázek 26: Enkapsulační účinnost směsí poloxamerů Q/PEG 400 a Q/TOC

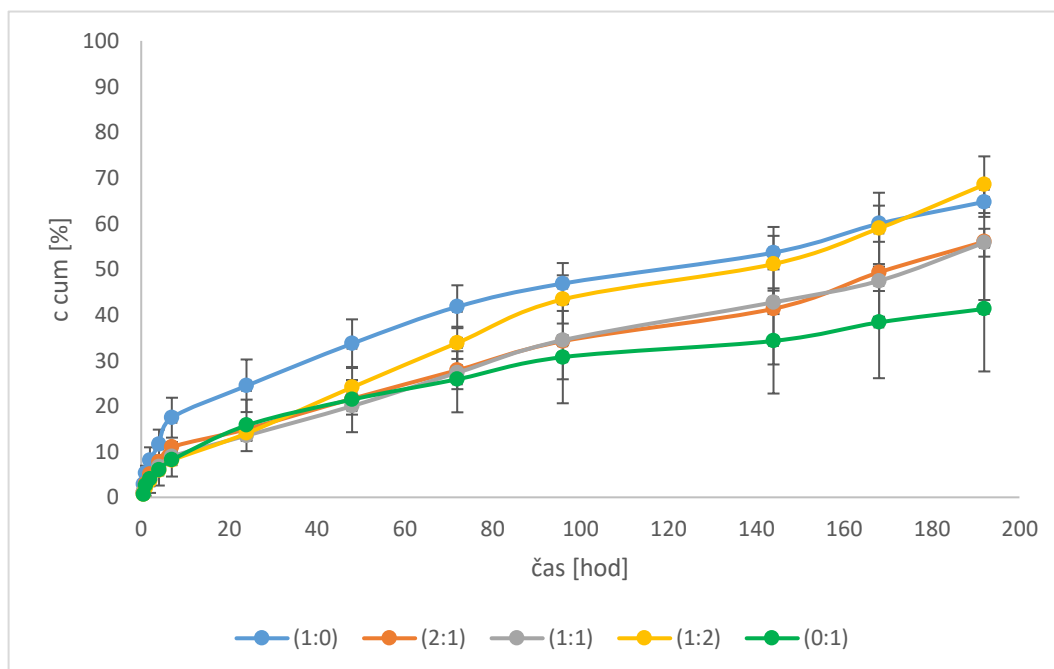
Výsledky autorů v práci [51] prokázaly enkapsulační účinnost kvercetinu v niozomech na bázi Tween80/Span80 a Tween60/Span60 v rozmezí od 27 do 79 %, v závislosti na použitém aditivu (PEG o různé molekulové hmotnosti, cholesterol, propylenglykol). Nejvyšší enkapsulační kapacita byla monitorována u niozomální formulace s PEG 400 a polypropylenglykolem. Ještě vyšší enkapsulační účinek (87 %) aktivní látky kvercetinu byl získán autory Lu a kol. [49] v případě vezikul na bázi Span60-RH40.

## 8.7 Kinetika uvolňování účinné látky

Uvolňování aktivní látky bylo studováno pomocí dialyzační metody, kdy byla suspenze umístěna do dialyzační membrány, uzavřena a vložena do kádinky s fosfátovým pufrům, po celou dobu stanovování bylo udržováno míchání směsi. V definovaných intervalech byly odebírány vzorky, u nichž byla stanovena absorbance, která byla následně přepočtena množství uvolněné látky. Na grafech (Obr. 27 a 28) jsou vyobrazeny závislosti kumulativní koncentrace v % jednotlivých poměrů na čase pro systémy poloxamerů Q/PEG 400 nebo Q/TOC. Z grafu (Obr. 27) je patrné, že v případě formulace Q/PEG 400 bylo uvolňování aktivní látky v prvních 20 hodinách pozvolnější, než u směsi Q/TOC (Obr.28), kde průběh kopíroval spíše trend odpovídající kinetice 1.řádu. Nicméně u žádné směsi nedocházelo k žádnému výraznému uvolnění v počáteční fázi sledovaného času, tzv. burst efektu, a připravené niozomy lze tedy doporučit spíše pro postupné uvolnění aktivní látky.



Obrázek 27: Závislost kumulativní koncentrace kvercetinu na směsi poloxamerů Q/ PEG 400



Obrázek 28: Závislost kumulativní koncentrace kvercetinu na směsí poloxamerů Q/TOC

Ve studii [49] byly hodnoceny podmínky uvolňování kvercetinu z niozomů na bázi Span60-RH40, kde jako dialyzační médium bylo použito roztok Tween 80. Ve srovnání s volným kvercetinem došlo po enkapsulaci do niozomů k mnohem pozvolnějšímu uvolňování, kdy se během přibližně 25 hodin uvolnilo 20 % inkorporovaného kvercetinu. Kinetika uvolňování jiné flavonoidní aktivní látky, kurkuminu, byla předmětem studie [59], kde byly připraveny směsné micely na bázi Pluronic P123 a Pluronic F68 metodou hydratace tenkého filmu. Test probíhal dialyzační metodou s 20% roztokem dodecylsulfátu sodného (SDS). Během prvních 6 hodin se uvolnilo necelých 10 %, po 72 hodinách bylo detekováno množství uvolněné látky přibližně 50 %, což bylo v naší studii dosaženo u vybraných směsí až po téměř 140 hodinách.

## ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce byla příprava a charakterizace niozomálních částic s obsahem aktivní látky kvercetin. Studován byl zejména vliv různých hmotnostních poměrů poloxamerů P188 a P407 a aditiv PEG 400 nebo tokoferyl acetátu na fyzikálně-chemické vlastnosti připravených systémů. Hodnocena byla i antioxidační aktivita, enkapsulační kapacita a podmínky uvolňování aktivní látky.

V úvodní fázi byla stanovena kritická micelární koncentrace poloxamerních roztoků pomocí tenziometrického měření, přičemž hodnoty se pohybovaly okolo 0,01 mM. Povrchová aktivita směsných micel byla prokázána prostřednictvím záporné Gibbsovy micelizační energie (okolo  $-27$  kJ/mol) a parametrem adsorpce na rozhraní (okolo  $1,6 \cdot 10^{-7}$  mol/m<sup>2</sup>).

Další část experimentální práce byla věnována studiu antioxidační aktivity, kdy všechny niozomální formulace prokázaly významný úbytek absorbance (>80 %) indikující významné antioxidační účinky.

Připravené částice vykazovaly průměrnou velikost v rozmezí 980–5000 nm a po opětovném proměření (po měsíci skladování při 4 °C) byly jako nejstabilnější hodnoceny poměry 1:0 a 1:2 s PEG 400 a směsi 2:1 a 0:1 s tokoferyl acetátem. Při měření zeta potenciálu byly získány záporné hodnoty v rozmezí od  $-8,6$  do  $-28,6$  mV.

Nejvyšší enkapsulační účinnosti (okolo 60 %) bylo dosaženo u formulace pouze na bázi poloxameru P188. Při porovnání obou testovaných aditiv PEG 400 a tokoferyl acetátu nebyly prokázány zásadní rozdíly v dosažené enkapsulační aktivitě.

Studie uvolňování aktivní látky monitorovaná v prostředí fosfátového pufru odhalila u všech formulací pozvolné uvolňování enkapsulovaného kvercetin, kdy během sledované doby 190 hodin došlo k uvolnění v průměru 40 až 60 % (u vzorků Q/TOC), a 50 až 80 % (u vzorků Q/PEG 400) kvercetin.

Závěrem lze říci, že byly připraveny niozomální částice s různým složením poloxamerních surfaktantů, obsahem aditiv a enkapsulovaného kvercetin, které vykazují vysokou úroveň antioxidační aktivity a příznivé podmínky uvolňování aktivní látky do prostředí. Při komplexním zhodnocení výsledků všech provedených experimentů lze učinit závěr, že bez ohledu na typ aditiva se jevil jako optimální nosný systém na bázi poloxameru P188 (poměr 1:0). Závěry této pilotní studie mohou sloužit jako podklad pro budoucí experimenty zaměřené na optimalizaci podmínek přípravy, zejména s důrazem na zařazení účinnější

metody pro redispergaci částic připravených metodou hydratace tenkého filmu, a zvýšení homogenity. S jistotou lze ovšem konstatovat, že vzhledem k bezpečnosti a biokompatibilitě vstupních surovin by připravené systémy mohly sloužit při dodávání aktivních látek v kosmetickém nebo farmaceutickém průmyslu.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PANCHE, A., A. DIWAN a S. CHANDRA. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* [online]. 2016, **5** [cit. 2023-02-27]. ISSN 2048-6790. Dostupné z: doi:10.1017/jns.2016.41
- [2] SHEN, Nan, Tongfei WANG, Quan GAN, Sian LIU, Li WANG a Biao JIN. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry* [online]. 2022, **383** [cit. 2023-02-27]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2022.132531
- [3] HAMSALAKSHMI, , Ann ALEX, Mahalakshmi AREHALLY MARAPPA, Suresh JOGHEE a Saravana CHIDAMBARAM. Therapeutic benefits of flavonoids against neuroinflammation: a systematic review. *Inflammopharmacology* [online]. 2022, **30**(1), 111-136 [cit. 2023-02-27]. ISSN 0925-4692. Dostupné z: doi:10.1007/s10787-021-00895-8
- [4] RAMESH, Priyanka, Rahul JAGADEESAN, Saravanan SEKARAN, Anuradha DHANASEKARAN a Selvaraj VIMALRAJ. Flavonoids: Classification, Function, and Molecular Mechanisms Involved in Bone Remodelling. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2021, **12** [cit. 2023-02-27]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2021.779638
- [5] ALZAND, Kutaiba a Mohamed MOHAMED. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Antioxidant activity. *Journal of Pharmacy Research* [online]. 2012, **2012**(58), 4013-4020 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/320957444\\_Flavonoids\\_Chemistry\\_Biochemistry\\_and\\_Antioxidant\\_activity#fullTextFileContent](https://www.researchgate.net/publication/320957444_Flavonoids_Chemistry_Biochemistry_and_Antioxidant_activity#fullTextFileContent)
- [6] VOLF, Karel a František ANDRS. *Flavonoidy a jejich biologické působení*. [Česko: s.n.], 2008. ISBN 978-80-254-4225-8. Dostupné také z: <http://krameriusndk.nkp.cz/search/handle/uuid:8ef087a0-a7eb-11e6-b707-005056827e51>

- [7] BRAND-GARNYS, Elzbieta, Horst DENZER, Hamke MEIJER a Hans BRAND. Flavonoids: A Review For Cosmetic Application. Part I. *Journal Of Applied Cosmetology* [online]. 2007, **2007**(25), 93-109 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <http://www.iscd.it/files/FLAVONOIDS---A-REVIEW-FOR-COSMETIC-APPLICATION---PART--I.pdf>
- [8] OSAKABE, Naomi a Junji TERAO. Possible mechanisms of postprandial physiological alterations following flavan 3-ol ingestion. *Nutrition Reviews* [online]. 2018, **76**(3), 174-186 [cit. 2023-02-27]. ISSN 0029-6643. Dostupné z: [doi:10.1093/nutrit/nux070](https://doi.org/10.1093/nutrit/nux070)
- [9] YOUSEFI, Motjaba, Mahdi SHADNOUSH, Sara SOHRABVANDI, Nasim KHORSHIDIAN a Amir MORTAZAVIAN. Encapsulation Systems for Delivery of Flavonoids: A Review. *Biointerface Research in Applied Chemistry* [online]. 2021, **11**(6), 13934-13951 [cit. 2023-02-27]. ISSN 2069-5837. Dostupné z: [doi:10.33263/BRIAC116.1393413951](https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1393413951)
- [10] KYRIAKOUDI, Anastasia, Eleni SPANIDI, Ioannis MOURTZINOS a Konstantinos GARDIKIS. Innovative Delivery Systems Loaded with Plant Bioactive Ingredients: Formulation Approaches and Applications. *Plants* [online]. 2021, **10**(6) [cit. 2023-02-27]. ISSN 2223-7747. Dostupné z: [doi:10.3390/plants10061238](https://doi.org/10.3390/plants10061238)
- [11] COSTA, Raquel a Lúcia SANTOS. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technology* [online]. 2017, **322**, 402-416 [cit. 2023-02-27]. ISSN 00325910. Dostupné z: [doi:10.1016/j.powtec.2017.07.086](https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.07.086)
- [12] BHARDWAJ, Peeyush, Purnima TRIPATHI, Rishikesh GUPTA a Sonia PANDEY. Niosomes: A review on niosomal research in the last decade. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2020, **56** [cit. 2023-02-28]. ISSN 17732247. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jddst.2020.101581](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101581)
- [13] NASERI, Neda, Hadi VALIZADEH a Parvin ZAKERI-MILANI. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2015, **5**(3), 305-313 [cit. 2023-02-27]. ISSN 2228-5881. Dostupné z: [doi:10.15171/apb.2015.043](https://doi.org/10.15171/apb.2015.043)



- [14] FATHI, Milad, Ángel MARTÍN a David MCCLEMENTS. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2014, **39**(1), 18-39 [cit. 2023-02-27]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2014.06.007
- [15] LEE, Jung a Jan FEIJEN. Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **161**(2), 473-483 [cit. 2023-03-11]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2011.10.005
- [16] ZHANG, Xiao-ying a Pei-ying ZHANG. Polymersomes in Nanomedicine - A Review. *Current Nanoscience* [online]. 2017, **13**(2), 124-129 [cit. 2023-03-11]. ISSN 15734137. Dostupné z: doi:10.2174/1573413712666161018144519
- [17] PERUMAL, Suguna, Raji ATCHUDAN a Wonmok LEE. A Review of Polymeric Micelles and Their Applications. *Polymers* [online]. 2022, **14**(12) [cit. 2023-03-22]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14122510
- [18] EGNER, Pavlína. *Technologie výroby kosmetiky: Učební text*. CZ.1.07/2.2.00/28.0132. Fakulta technologická: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2022.
- [19] CUNHA, Catarina, Ana DANIEL-DA-SILVA a Helena OLIVEIRA. Drug Delivery Systems and Flavonoids: Current Knowledge in Melanoma Treatment and Future Perspectives. *Micromachines* [online]. 2022, **13**(11) [cit. 2023-03-22]. ISSN 2072-666X. Dostupné z: doi:10.3390/mi13111838
- [20] GRGIć, Josipa, Gordana ŠELO, Mirela PLANINIć, Marina TIŠMA a Ana BUCIć-KOJIć. Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. *Antioxidants* [online]. 2020, **9**(10) [cit. 2023-02-27]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox9100923
- [21] TROJANOWSKA, Anna, Adrianna NOGALSKA, Ricard VALLS, Marta GIAMBERINI a Bartosz TYLKOWSKI. Technological solutions for encapsulation. *Physical Sciences Reviews* [online]. 2017, **2**(9) [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1515/psr-2017-0020

- [22] SANTOS, Daniel, Ana MAURÍCIO, Vitor SENCADAS, José SANTOS, Maria FERNANDES a Pedro GOMES. Spray Drying: An Overview. In: PIGNATELLO, Rosario a Teresa MUSUMECI, ed., Rosario PIGNATELLO, Teresa MUSUMECI. *Biomaterials - Physics and Chemistry - New Edition* [online]. InTech, 2018 [cit. 2023-03-23]. ISBN 978-1-78923-064-2. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.72247
- [23] BRUYNINCKX, Kevin a Michiel DUSSELIER. Sustainable Chemistry Considerations for the Encapsulation of Volatile Compounds in Laundry-Type Applications. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. 2019, 7(9), 8041-8054 [cit. 2023-04-25]. ISSN 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.9b00677
- [24] PUDZIUVELYTE, Lauryna, Mindaugas MARKSA, Katarzyna SOSNOWSKA, Katarzyna WINNICKA, Ramune MORKUNIENE a Jurga BERNATONIENE. Freeze-Drying Technique for Microencapsulation of *Elsholtzia ciliata* Ethanolic Extract Using Different Coating Materials. *Molecules* [online]. 2020, 25(9) [cit. 2023-03-23]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25092237
- [25] M, Mahalakshmi a Murlidhar MEGHWAL. Microencapsulation of fruit juices: Techniques, properties, application of fruit powder. *Journal of Food Process Engineering* [online]. 2023, 46(2) [cit. 2023-03-24]. ISSN 0145-8876. Dostupné z: doi:10.1111/jfpe.14226
- [26] ANUSHA SIDDIQUI, Shahida, Ali REDHA, Yasaman ESMAEILI a Mohammad MEHDIZADEH. Novel insights on extraction and encapsulation techniques of elderberry bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2022, 1-16 [cit. 2023-03-24]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2022.2026290
- [27] MUNIN, Aude a Florence EDWARDS-LÉVY. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* [online]. 2011, 3(4), 793-829 [cit. 2023-04-26]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics3040793

- [28] KEVEN SILVA, Eric a M. ANGELA A. MEIRELES. Encapsulation of Food Compounds Using Supercritical Technologies: Applications of Supercritical Carbon Dioxide as an Antisolvent. *Food and Public Health* [online]. 2014, **4**(5), 247-258 [cit. 2023-04-26]. ISSN 2162-8440. Dostupné z: doi:10.5923/j.fph.20140405.06
- [29] ARAJO LOPES, Svía, Cristiane SANTOS GIUBERTI, Talita RIBEIRO, Digo SANTOS FERREIRA, Elaine AMARAL LEITE a Mnica CRISTINA. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. In: RANGEL, Leticia, ed., Leticia RANGEL. *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches* [online]. InTech, 2013 [cit. 2023-04-26]. ISBN 978-953-51-1098-9. Dostupné z: doi:10.5772/55290
- [30] ANDERSEN, Øyvind a Kenneth MARKHAM. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor & Francis, 2006. ISBN 0-8493-2021-6.
- [31] LU, Zhidong, Peng LI, Zhirong CHEN a Liang ZHANG. Co-encapsulation of combinatorial flavonoids in biodegradable polymeric nanoparticles for improved anti-osteoporotic activity in ovariectomized rats. *Environmental Technology & Innovation* [online]. 2021, **24** [cit. 2023-05-11]. ISSN 23521864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2021.102079
- [32] TUNGMUNNITHUM, Duangjai, Panida KONGSAWADWORAKUL a Christophe HANO. A Cosmetic Perspective on the Antioxidant Flavonoids from *Nymphaea lotus* L. *Cosmetics* [online]. 2021, **8**(1) [cit. 2023-05-11]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics8010012
- [33] OLIVEIRA, Williara, Iramaia NERI-NUMA, Henrique ARRUDA, David MCCLEMENTS a Glaucia PASTORE. Encapsulation of flavonoids in foods for diabetics: The emerging paradigm for an effective therapy. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2022, **127**, 198-206 [cit. 2023-05-11]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2022.06.004

- [34] ZHOU, Hualu, Bingjing ZHENG a David MCCLEMENTS. Encapsulation of lipophilic polyphenols in plant-based nanoemulsions: impact of carrier oil on lipid digestion and curcumin, resveratrol and quercetin bioaccessibility. *Food & Function* [online]. 2021, **12**(8), 3420-3432 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2042-6496. Dostupné z: doi:10.1039/D1FO00275A
- [35] HUANG, Juan, Qiang WANG, Lanling CHU a Qiang XIA. Liposome-chitosan hydrogel bead delivery system for the encapsulation of linseed oil and quercetin: Preparation and in vitro characterization studies. *LWT* [online]. 2020, **117** [cit. 2023-05-13]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2019.108615
- [36] YANG, Liping, Wenhua LING, Yan YANG et al. Role of Purified Anthocyanins in Improving Cardiometabolic Risk Factors in Chinese Men and Women with Prediabetes or Early Untreated Diabetes—A Randomized Controlled Trial. *Nutrients* [online]. 2017, **9**(10) [cit. 2023-05-11]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu9101104
- [37] ZOU, Yan, Yi QIAN, Xiaoyun RONG, Kaixin CAO, David MCCLEMENTS a Kun HU. Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: Formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids* [online]. 2021, **120** [cit. 2023-05-13]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2021.106980
- [38] SAYYAD, Nisar, Ruma MAJI, Calvin OMOLO et al. Development of niosomes for encapsulating captopril-quercetin prodrug to combat hypertension. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2021, **609** [cit. 2023-05-13]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121191
- [39] MFOTIE NJOYA, Emmanuel. Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer. In: *Cancer* [online]. Elsevier, 2021, s. 349-357 [cit. 2023-05-11]. ISBN 9780128195475. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819547-5.00031-6

- [40] BIBI SADEER, Nabeelah, Domenico MONTESANO, Stefania ALBRIZIO, Gokhan ZENGIN a Mohamad MAHOMOODALLY. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants* [online]. 2020, **9**(8) [cit. 2023-05-11]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox9080709
- [41] KULTHE, Sushant S., Yogesh M. CHOUDHARI, Nazma N. INAMDAR a Vishnukant MOURYA. Polymeric micelles: authoritative aspects for drug delivery. *Designed Monomers and Polymers* [online]. 2012, **15**(5), 465-521 [cit. 2023-05-16]. ISSN 1568-5551. Dostupné z: doi:10.1080/1385772X.2012.688328
- [42] MYERS, Drew. *Surfactant Science and Technology*. 3rd ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006. ISBN 0-471-68024-9.
- [43] WANG, Li, Min PENG, Yuan ZHU, Shan-shan TONG, Xia CAO, Xi-ming XU a Jiang-nan YU. *Preparation of Pluronic/Bile salt/Phospholipid Mixed Micelles as Drug Solubility Enhancer and Study the Effect of the PPO Block Size on the Solubility of Pyrene* [online]. 1157-1163 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4232780/pdf/ijpr-13-1157.pdf>
- [44] JINDAL, Neha a S.K. MEHTA. Nevirapine loaded Poloxamer 407/Pluronic P123 mixed micelles: Optimization of formulation and in vitro evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2015, **129**, 100-106 [cit. 2023-05-15]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2015.03.030
- [45] SHUBHRA, Quazi T. H., Judit TÓTH, János GYENIS a Tivadar FECZKÓ. Poloxamers for Surface Modification of Hydrophobic Drug Carriers and Their Effects on Drug Delivery. *Polymer Reviews* [online]. 2014, **54**(1), 112-138 [cit. 2023-05-16]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583724.2013.862544
- [46] KABANOV, Alexander V, Elena V BATRAKOVA a Valery Yu ALAKHOV. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2002, **82**(2-3), 189-212 [cit. 2023-05-15]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(02)00009-3

- [47] CHUNHACHAICHANA, Charisopon a Teerapol SRICHANA. Efficiency of sildenafil encapsulation in poloxamer micelles. *Journal of Dispersion Science and Technology* [online]. 2019, **40**(10), 1461-1468 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0193-2691. Dostupné z: doi:10.1080/01932691.2018.1518142
- [48] YELIGAR, Veerendra, Manjiri RAJMANE, Yasmin MOMIN a Rajendra DOIJAD. Formulation, characterization and evaluation of in vitro antioxidant potential of melatonin and quercetin loaded liposomes. *Annals of Phytomedicine: An International Journal* [online]. 2021, **10**(2) [cit. 2023-05-13]. ISSN 22789839. Dostupné z: doi:10.21276/ap.2021.10.2.44
- [49] LU, Banyu, Yanting HUANG, Zhongyun CHEN, Jingyi YE, Hongyu XU, Wenrong CHEN a Xiaoying LONG. Niosomal Nanocarriers for Enhanced Skin Delivery of Quercetin with Functions of Anti-Tyrosinase and Antioxidant. *Molecules* [online]. 2019, **24**(12) [cit. 2023-05-15]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24122322
- [50] JARDIM, Katiúscia Vieira, Joseilma Luciana Neves SIQUEIRA, Sônia Nair BÃO a Alexandre Luis PARIZE. In vitro cytotoxic and antioxidant evaluation of quercetin loaded in ionic cross-linked chitosan nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2022, **74** [cit. 2023-05-15]. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2022.103561
- [51] JAVANI, Raziéh, Fatemeh HASHEMI, Babak GHANBARZADEH a Hamed HAMISHEHKAR. Quercetin-loaded niosomal nanoparticles prepared by the thin-layer hydration method: Formulation development, colloidal stability, and structural properties. *LWT* [online]. 2021, **141** [cit. 2023-05-14]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.110865
- [52] AGARWAL, R, O.P KATARE a S.P VYAS. Preparation and in vitro evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antipsoriatic drug dithranol. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2001, **228**(1-2), 43-52 [cit. 2023-05-15]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(01)00810-9

- [53] LI, Guoyuan, Yuting LU, Yongchun FAN, Qing NING a Weiguang LI. Enhanced oral bioavailability of magnolol via mixed micelles and nanosuspensions based on Soluplus® -Poloxamer 188. *Drug Delivery* [online]. 2020, **27**(1), 1010-1017 [cit. 2023-05-16]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.1080/10717544.2020.1785582
- [54] SHILPA, B. P SRINIVASAN a Meenakshi CHAUHAN. Niosomes as vesicular carriers for delivery of proteins and biologicals. *International Journal of Drug Delivery* [online]. 2011, **3**(1), 14-24 [cit. 2023-05-15]. ISSN 09750215. Dostupné z: doi:10.5138/ijdd.2010.0975.0215.03050
- [55] WITIKA, Bwalya A., Kokoette E. BASSEY, Patrick H. DEMANA, Xavier SIWE-NOUNDOU a Madan S. POKA. Current Advances in Specialised Niosomal Drug Delivery: Manufacture, Characterization and Drug Delivery Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(17) [cit. 2023-05-15]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23179668
- [56] MALVERN PANALYTICAL. *Zeta potential - An introduction in 30 minutes* [online]. [cit. 2023-05-13]. Dostupné z: <https://www.research.colostate.edu/wp-content/uploads/2018/11/ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern.pdf>
- [57] ELMI, Neda, Babak GHANBARZADEH, Ali AYASEH, Samar SAHRAEE, Maryam Khakbaz HESHMATI, Mohammadyar HOSEINI a Akram PEZESHKI. Physical properties and stability of quercetin loaded niosomes: Stabilizing effects of phytosterol and polyethylene glycol in orange juice model. *Journal of Food Engineering* [online]. 2021, **296** [cit. 2023-05-16]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110463
- [58] PATEL, Hemil S., Sofiya J. SHAIKH, Debes RAY, Vinod K. ASWAL, Foram VAIDYA, Chandramani PATHAK a Rakesh K. SHARMA. Formulation, Solubilization, and In Vitro Characterization of Quercetin-Incorporated Mixed Micelles of PEO-PPO-PEO Block Copolymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2022, **194**(1), 445-463 [cit. 2023-05-17]. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-021-03691-w

- [59] ZHAO, Liyan, Jianchao DU, Yuwei DUAN, Ya'ni ZANG, Huaisong ZHANG, Chunfen YANG, Fengliang CAO a Guangxi ZHAI. Curcumin loaded mixed micelles composed of Pluronic P123 and F68: Preparation, optimization and in vitro characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2012, **97**, 101-108 [cit. 2023-05-16]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2012.04.017



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

atd.	A tak dále
BHT	Butylhydroxytoluen
CMC	Kritická micelární koncentrace
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPPH	Difenylpikrylhydrazyl
DPPH-H	Difenylpikrylhydrazin
EE	Enkapsulační účinek
GRAS	Generally Recognized As Safe
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
LUV	Velké unilamelární vezikuly
MLV	Multilamelární vezikuly
např.	Například
NLC	Nanostrukturované lipidové nosiče
o/v	Emulze olej ve vodě
P188	Poloxamer 188
P407	Poloxamer 407
PAMAM	Polyamidoamin
PBS	Fosfátový pufr
PDI	Polydisperzní index
PEG 400	Polyethylenglykol 400
$p_K$	Kritický tlak
PLGA	Kyselina polymléčná-koglykolová
PNP	Polymerní nanočástice
Q	Kvercetin
RNA	Ribonukleová kyselina

---

SDS	Dodecylsulfát sodný
SLN	Pevné lipidové nanočástice
SUV	Malé unilamelární vezikuly
$T_K$	Kritická teplota
TOC	Tokoferyl acetát
tzv.	Tak zvaně
UV	Ultrafialové záření
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
v/o	Emulze voda v oleji

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: <i>Obecná struktura flavonoidů [3]</i> .....	10
Obrázek 2: <i>Základní struktura flavonu</i> .....	11
Obrázek 3: <i>Základní struktura flavonolu</i> .....	12
Obrázek 4: <i>Základní struktura flavanonu</i> .....	12
Obrázek 5: <i>Základní struktura flavanolu</i> .....	13
Obrázek 6: <i>Základní struktura chalkonu</i> .....	13
Obrázek 7: <i>Základní struktura anthokyanidinu</i> .....	14
Obrázek 8: <i>Základní struktura isoflavonu</i> .....	14
Obrázek 9: <i>Schématický přehled nosičů na bázi lipidů (upraveno dle [10])</i> .....	15
Obrázek 10: <i>Struktura polymerzomu (upraveno dle [15])</i> .....	19
Obrázek 11: <i>Proces sušení rozprašováním (upraveno dle [23])</i> .....	21
Obrázek 12: <i>Jednoduchá a komplexní koacervace (upraveno dle [23])</i> .....	23
Obrázek 13: <i>Schématické znázornění zařízení využívaného na enkapsulaci pomocí superkritické tekutiny CO<sub>2</sub> (upraveno dle [28])</i> .....	24
Obrázek 14: <i>Schéma produkce lipozomů metodou hydratace tenkého filmu (upraveno dle [29])</i> .....	26
Obrázek 15: <i>Tenziometr EasyDyne – Krüss</i> .....	36
Obrázek 16: <i>Mechanismus metody s DPPH (upraveno dle [40])</i> .....	37
Obrázek 17: <i>Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci směsi poloxamerů P188:P407 v poměru 2:1 při 25 °C</i> .....	40
Obrázek 18: <i>Antioxidační aktivita vzorků poloxamerů Q/PEG 400</i> .....	43
Obrázek 19: <i>Antioxidační aktivita vzorků poloxamerů Q/TOC</i> .....	43
Obrázek 20: <i>Vzorky poloxamerů Q/PEG 400 a) ihned po přípravě b) po měsíci skladování při 4 °C</i> .....	44
Obrázek 21: <i>Vzorky poloxamerů Q/TOC a) ihned po přípravě b) po měsíci skladování při 4 °C</i> .....	45
Obrázek 22: <i>Velikost částic a polydisperzita směsí poloxamerů Q/PEG 400</i> .....	45
Obrázek 23: <i>Velikost částic a polydisperzita směsí poloxamerů Q/TOC</i> .....	46
Obrázek 24: <i>Zeta potenciál směsí poloxamerů Q/PEG 400 a Q/TOC</i> .....	48
Obrázek 25: <i>Kalibrační přímka pro kvercetin (měřeno při 375 nm)</i> .....	49
Obrázek 26: <i>Enkapsulační účinnost směsí poloxamerů Q/PEG 400 a Q/TOC</i> .....	49

Obrázek 27: <i>Závislost kumulativní koncentrace kvercetinu na směsí poloxamerů Q/ PEG 400 .....</i>	<i>50</i>
Obrázek 28: <i>Závislost kumulativní koncentrace kvercetinu na směsí poloxamerů Q/ TOC .....</i>	<i>51</i>

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: <i>Navážky pro 1 litr pufru o hodnotě pH 7,5</i> .....	37
Tabulka 2: <i>Micelární parametry směsí poloxamerů</i> .....	41