

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Brno, 2018

Ing. Jitka Bokrová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ VYBRANÝCH BIOPOLYMERŮ, NANOČÁSTIC A NANOVLÁKEN PRO KOSMETICKÉ A POTRAVINÁŘSKÉ ÚČELY

PREPARATION AND APPLICATION OF SOME BIOPOLYMERS, NANOPARTICLES AND NANOFIBRES FOR
COSMETICS AND FOOD

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Jitka Bokrová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2018

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Ing. Jitka Bokrová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2017/18

Název dizertační práce:

PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ VYBRANÝCH BIOPOLYMERŮ, NANOČÁSTIC A NANOVLÁKEN PRO KOSMETICKÉ A POTRAVINÁŘSKÉ ÚČELY

Zadání dizertační práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- screening, výběr a úprava vhodných přírodních biopolymerů a jejich charakterizace
- příprava moderních typů aplikačních forem (mikro– a nanočástice a vlákna) z biomateriálů na bázi jednoho či více typů přírodních polymerů
- optimalizace metod charakterizace mikro–a nanočástic a vláken na bázi přírodních polymerů
- příprava funkcionalizovaných částic a vláken, testování fyzikálně–chemických vlastností
- testování antioxidační a antimikrobiální aktivity čistých i funkcionalizovaných materiálů
- zavedení postupů kultivace buněčných kultur a testů cytotoxicity, optimalizace testů genotoxicity
- testování genotoxických, cytotoxických a dalších biologických účinků materiálů i aplikačních forem
- sledování stability a biodegradability polymerů a aplikačních forem v modelových fyziologických podmínkách.

Termín odevzdání dizertační práce: 31.8.2018

Ing. Jitka Bokrová
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená dizertační práce je zaměřena na přípravu kombinovaných preparátů s přírodní aktivní složkou ve formě nanočástic a nanovláken a testování jejich biologických účinků. Moderní typy aplikačních forem byly připraveny z biomateriálů na bázi jednoho či více přírodních polymerů. Chitosanové částice byly připraveny metodou zesítnění polymeru s využitím ultrasonikace. Pro přípravu liposomů byla použita směs sojového lecithinu a cholesterolu, v případě nového typu kombinovaných liposomů navíc biopolymer poly-3-hydroxybutyrát. Všechny liposomové částice byly rovněž připraveny metodou ultrasonifikace. Nanovláknena byla získána z polyhydroxybutyrátu s využitím elektrospinningu. Aktivní složkou preparátů byly směsi nízkomolekulárních látek získané extrakcí z přírodních zdrojů s vysokým obsahem antioxidantů. Jako zdroje aktivních látek byly zvoleny vzorky různých typů čajů a kůr, bylin, koření a také vzorky ovoce a zeleniny. U extraktů vzorků byl pomocí spektrofotometrických metod stanoven celkový obsah polyfenolů, flavonoidů a celková antioxidační aktivita. Získané extrakty byly následně použity k enkapsulaci. Připravené kombinované preparáty byly charakterizovány z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností. Velikost částic byla sledována s pomocí dynamického rozptylu světla. Koloidní stabilita částic v suspenzi byla stanovena pomocí zeta potenciálu. Ke stanovení účinnosti enkapsulace aktivní látky do částice byly použity spektrofotometrické metody. Morfologie nového typu kombinovaných liposomů byla sledována pomocí elektronové mikroskopie a pro kvantifikaci jednotlivých složek částic byly využity metody plynové i kapalinové chromatografie. Morfologie vláken a inkorporace aktivní složky do jejich struktury byla sledována s využitím FTIR-ATR spektroskopie a elektronové mikroskopie. Připravené preparáty byly následně hodnoceny z hlediska jejich antimikrobiálních, cytotoxických a genotoxických účinků.

Bylo zjištěno, že nejvhodnějšími typy extraktů pro přípravu liposomových částic jsou vodné a lipidické extrakty zdrojů antioxidantů. Připravené částice vykazovaly výbornou stabilitu a dobrou enkapsulační účinnost. Rovněž bylo potvrzeno, že inkorporace polyhydroxybutyrátu nesnižuje koloidní stabilitu částice ani účinnost procesu enkapsulace. U připravených preparátů byl potvrzen antimikrobiální nebo antimykotický účinek proti testovacím mikroorganismům *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* a *Candida glabrata*. Bylo zjištěno, že proces enkapsulace do částic zvyšuje inhibiční efekt samotných přírodních extraktů.

Bezpečnost připravených preparátů byla testována s využitím dvou humánních buněčných kultur: epidermálních keratinocytů a buněčné linie HaCaT. Ke stanovení cytotoxicity byly použity jak metody stanovení metabolické aktivity buněk, tak metody sledující intaktnost plazmatické membrány. Pomocí série cytotoxických testů byla potvrzena nízká toxicita liposomových částic. Zkoumání účinků suspenze liposomů a kombinovaných PHB liposomů ukázalo, že spojení fosfolipidu s polymerem PHB nezpůsobuje výrazně vyšší hladinu cytotoxicity na lidských kožních buňkách. Testováním genotoxicity na modelovém mikroorganismu nebyl prokázán u připravených preparátů žádný genotoxický potenciál. Nový typ kombinovaných částic i polymerních vláken může být tedy použit jako cílený nosič pro aktivní složky jako jsou antioxidanty, komplexní přírodní extrakty, antimikrobiální činidla a mnoho dalších.

KLÍČOVÁ SLOVA

antioxidanty, antimikrobiální aktivita, cytotoxicita, genotoxicita, nanočástice, nanovláknena, liposomy, enkapsulace, biopolymery

ABSTRACT

The presented doctoral thesis is focused on preparation of nanoparticles and nanofibers with natural active ingredient and testing their biological effects. Modern types of application forms were prepared from biomaterials based on one or more natural polymers. Chitosan particles were prepared from cross-linked polymer using ultrasonication. A mixture of soy lecithin and cholesterol was used for preparation of liposomes. Poly-3-hydroxybutyrate was used for preparation of combined liposomes, too. All liposome particles were prepared by ultrasonication. Nanofibers were obtained from polyhydroxybutyrate using electrospinning. Mixtures of low-molecular antioxidants obtained by extraction from natural sources were used as active ingredients. Different types of teas, barks, herbs, spices, fruits and vegetables were selected as sources of natural antioxidants. Total phenolic and flavonoid content and total antioxidant activity of extracts were determined using spectrophotometrical methods. Obtained natural extracts were subsequently used for encapsulation. Prepared application forms were characterized in terms of their physicochemical properties. Particle size was monitored by dynamic light scattering. Colloidal stability of particles in suspension was determined using zeta potential. Spectrophotometry was used to evaluate the efficiency of encapsulation of active compounds into particles. The morphology of the new type of combined PHB liposomes was monitored by electron microscopy. Chromatography was used for quantification of individual components of particles. Morphology of nanofibers and incorporation of active agent into their structure were monitored using FTIR-ATR spectroscopy and electron microscopy. Afterwards, antimicrobial, cytotoxic and genotoxic effects of preparations were evaluated.

It was found that the most suitable types of extracts for liposome preparation are aqueous and lipid extracts of natural antioxidants. Prepared particles showed excellent stability and good encapsulation efficiency. The study confirmed that incorporation of polyhydroxybutyrate into liposome structure does not reduce neither the colloidal stability of the particle, nor the efficiency of encapsulation process. Antimicrobial and antimycotic effect of preparations against model microorganisms *Micrococcus lutues*, *Serratia marcescens* and *Candida glabrata* was detected. It was found that process of encapsulation increases the inhibitory effect of natural extracts of antioxidants. The safety of preparations was assessed using two human cell cultures: epidermal keratinocytes and HaCaT cell line. Assays of cell viability and plasma membrane integrity were used to determine cytotoxicity of preparations. Low toxicity of liposome particles was confirmed by a series of cytotoxic tests. Obtained data showed that association of phospholipid with PHB polymer does not cause a significant increase in cytotoxicity in human skin cells. Genotoxicity testing on model procaryotic organism confirmed zero genotoxic potential of preparations. The new type of combined particles and polymeric fibers cant thus be used as a carrier for active ingredients, complex natural extracts, antimicrobial agents and many others.

KEY WORDS

antioxidants, antimicrobial activity, cytotoxicity, genotoxicity, nanoparticles, nanofibers, liposomes, encapsulation, biopolymers

BOKROVÁ, J. *Příprava a využití vybraných biopolymerů, nanočástic a nanovláken pro kosmetické a potravinářské účely*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 123 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že všechny literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem školitele dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ:

Mé poděkování patří především školitelce této dizertační práce, prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. Velice si vážím této příležitosti k rozšíření mých vědomostí a dovedností. Rovněž oceňuji poskytování cenných rad a zkušeností po celou dobu studia.

Dále děkuji týmu NanoSafety Research Group z Heriot Watt University a pracovníkům Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně, za zasvěcení do problematiky práce s buněčnými kulturami.

Můj dík patří i kolektivu doktorandů z Fakulty chemické za pomoc, spolupráci a vytvoření podnětného prostředí. V neposlední řadě děkuji svým blízkým za trpělivost a podporu během celého studia. Závěrem děkuji všem, kteří se mnou sdíleli své znalosti a zkušenosti a umožnili tak vznik této práce.

OBSAH

ABSTRAKT	3
KLÍČOVÁ SLOVA	3
ABSTRACT	4
KEY WORDS	4
1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Enkapsulace v potravinářském a kosmetickém průmyslu.....	10
2.1.1 Interakce mikro- a nanočástic s lidským organismem.....	10
2.1.2 Metody enkapsulace do mikro- a nanočástic	13
2.1.3 Materiály pro přípravu mikro- a nanočástic	15
2.1.4 Metody charakterizace částic	17
2.2 Zvláknování v kosmetickém a potravinářském průmyslu.....	18
2.2.1 Metody přípravy vláken.....	19
2.2.2 Materiály pro výrobu vláken.....	20
2.2.3 Metody charakterizace vláken	21
2.3 Bioaktivní složky částic a vláken	22
2.3.1 Bioaktivní účinek.....	22
2.3.2 Polyfenolické látky	23
2.4 Stanovení antioxidačního účinku.....	26
2.4.1 Stanovení celkové antioxidační aktivity	26
2.4.2 Stanovení specifických skupin antioxidantů	27
2.5 Stanovení antimikrobiální aktivity	28
2.5.1 Diluční metody	28
2.5.2 Difuzní metody.....	28
2.6 <i>In vitro</i> testy toxicity	29
2.6.1 Testy viability a cytotoxicity.....	29
2.6.2 Buněčné kultury pro <i>in vitro</i> testování toxicity	32
2.6.3 Stanovení genotoxicity.....	34
3 CÍLE PRÁCE	37
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1 Použité přístroje a chemikálie	38
4.1.1 Použité přístroje a pomůcky	38
4.1.2 Použité chemikálie	38
4.2 Materiál.....	39
4.2.1 Zdroje aktivních složek preparátů.....	39
4.3 Použité mikroorganismy	40
4.4 Použité buněčné kultury	40
4.5 Příprava vzorků pro enkapsulaci a charakterizaci.....	40
4.5.1 Příprava vodných a alkoholových extraktů	40
4.5.2 Příprava ovocných/zeleninových šťáv a extraktů	40
4.5.3 Izolace lipidických extraktů metodou dle Folche	40
4.6 Stanovení základních charakteristik vzorků	41

4.6.1	Stanovení celkových polyfenolů	41
4.6.2	Stanovení celkových flavonoidů	41
4.6.3	Stanovení jednotlivých flavonoidů metodou HPLC.....	41
4.6.4	Stanovení kofeinu, theofylinu a theobrominu metodou HPLC.....	42
4.6.5	Stanovení obsahu tříslovin	42
4.6.6	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS	42
4.7	Příprava částic	43
4.7.1	Příprava chitosanových částic	43
4.7.2	Příprava liposomů.....	43
4.7.3	Příprava kombinovaných liposomů s PHB	43
4.8	Analýza částic.....	43
4.8.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	43
4.8.2	Stanovení velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla	44
4.8.3	Stanovení elektrokinetické stability částic pomocí zeta potenciálu	44
4.8.4	Stanovení stability částic	44
4.8.5	Analýza liposomů a PHB liposomů kryo-TEM mikroskopii.....	44
4.9	Příprava vláken.....	44
4.9.1	Příprava pracovních roztoků pro zvláknění	44
4.9.2	Příprava vláken pomocí elektrospinningu.....	45
4.10	Analýza vláken	45
4.10.1	Stanovení antioxidačních vlastností vláken.....	45
4.10.2	Sledování uvolňování aktivní látky z vláken	45
4.10.3	Analýza vláken technikou FTIR-ATR.....	45
4.10.4	Analýza vláken TEM mikroskopii.....	46
4.11	Antimikrobiální testy	46
4.11.1	Kultivace mikroorganismů pro testování antimikrobiální aktivity	46
4.11.2	Testování antimikrobiální a antimykotické aktivity částic	46
4.11.3	Testování antimykotické aktivity vláken.....	47
4.12	Testování toxicity částic.....	47
4.12.1	Příprava částic pro testování toxicity	47
4.12.2	Stanovení množství jednotlivých složek v suspenzi liposomů a kombinovaných PHB-liposomových částic	47
4.12.3	Cytotoxické testy.....	48
4.12.4	Genotoxické testy	49
4.13	Testování toxicity vláken	50
4.14	Statistické zpracování výsledků	50
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	51
5.1	Charakterizace extraktů přírodních vzorků z hlediska obsahových látek	51
5.1.1	Stanovení výtežnosti extrakce lipidů dle Folche	51
5.1.2	Stanovení celkových polyfenolů	52
5.1.3	Stanovení celkových flavonoidů	54
5.1.4	Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS.....	55
5.1.5	Stanovení individuálních charakteristik u vzorků čajů a kůr	57
5.2	Stanovení enkapsulační účinnosti částic.....	59
5.2.1	Chitosanové částice.....	59
5.2.2	Liposomy a kombinované liposomy.....	60

5.3	Stanovení velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla	62
5.3.1	Chitosanové částice	62
5.3.2	Liposomy a kombinované liposomy	63
5.4	Stanovení elektrokinetické stability částic pomocí zeta potenciálu	65
5.4.1	Chitosanové částice	65
5.4.2	Liposomy a kombinované liposomy	66
5.5	Stanovení dlouhodobé stability částic	69
5.5.1	Stanovení stability částic v modelových potravinách	69
5.6	Analýza liposomů a PHB liposomů pomocí kryo-TEM mikroskopie	71
5.7	Příprava vláken	72
5.8	Stanovení antioxidačních vlastností vláken	72
5.9	Sledování uvolňování aktivní látky z vláken	73
5.10	Analýza vláken pomocí FTIR-ATR	75
5.11	Analýza vláken pomocí SEM	76
5.12	Stanovení antimikrobiálního a antimykotického účinku připravených preparátů	77
5.12.1	Jamková agarová difuzní metoda	77
5.12.2	Bujonová diluční metoda	79
5.13	Stanovení toxicity částic	85
5.13.1	Stanovení množství jednotlivých složek v liposomové suspenzi	85
5.13.2	Stanovení cytotoxicity částic	88
5.13.3	Stanovení genotoxického účinku na modelovém organismu	102
5.14	Stanovení toxicity vláken	102
6	ZÁVĚR	104
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	107
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERAURY	109
9	ŽIVOTOPIS A PUBLIKAČNÍ ČINNOST	121
	OSOBNÍ ÚDAJE	121
	VZDĚLÁNÍ	121
	PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI	121

1 ÚVOD

Rostoucí poptávka spotřebitelů po zdravých potravinách a účinnějších léčivých přípravcích vede výzkumníky k hlubšímu pochopení problematiky a vývoji nových technologií. V současnosti nejvíce diskutovaným nástrojem pro revoluci mnoha oborů lidské činnosti je pole nanotechnologií.

Nanotechnologie, neustále se rozvíjející vědní obor, představují celou řadu jednotlivých technologií, jimž všem je společný koncept vlastností hmoty v nanorozměru. Materiál v nanoškále disponuje charakteristikami, které se liší od vlastností stejného materiálu na makroúrovni.

Nanomateriály jsou velikostí blíže jednotlivým atomům a molekulám než makromateriálům, cílem nanotechnologií je tedy ovládnout strukturální podstatu a chování hmoty na úrovni atomů a molekul. Protože nanotechnologie sjednocují přírodovědné, technické a biomedicínské obory, je pro výzkum v této oblasti nezbytný mezioborový přístup.

Mnoho ze současných nanotechnologických aplikací v potravinářském odvětví se objevuje i v některých dalších podobných odvětvích, především ve farmacii a kosmetice. Hranice mezi potravinami, farmaceutiky a kosmetickými přípravky jsou již nyní v některých případech téměř neznatelné. Příchod nanomateriálů, které mohou reagovat s biologickými entitami na téměř molekulární úrovni, tyto hranice pravděpodobně dále rozostří.

Hlavní příčinou širokého využívání nanomateriálů je jejich velikost, umožňující penetraci kůží a zvýšení biologické dostupnosti aktivní látky v místě účinku, a také jejich biodegradabilní charakter, jenž zajišťuje pozvolné uvolňování. Produkce výrobků obsahujících nanočástice a nanovlákná se v posledních dvou dekádách navyšuje, což má za následek stále častější kontakt s lidským organismem. Je tedy naprosto nezbytné odhalit mechanismy jejich interakce s buňkami lidského těla. Nanotoxické studie objasňují podstatu působení nanomateriálů na lidský organismus a mají za cíl potvrdit či vyvrátit bezpečnost použití produktů obsahujících nanočástice a nanovlákná.

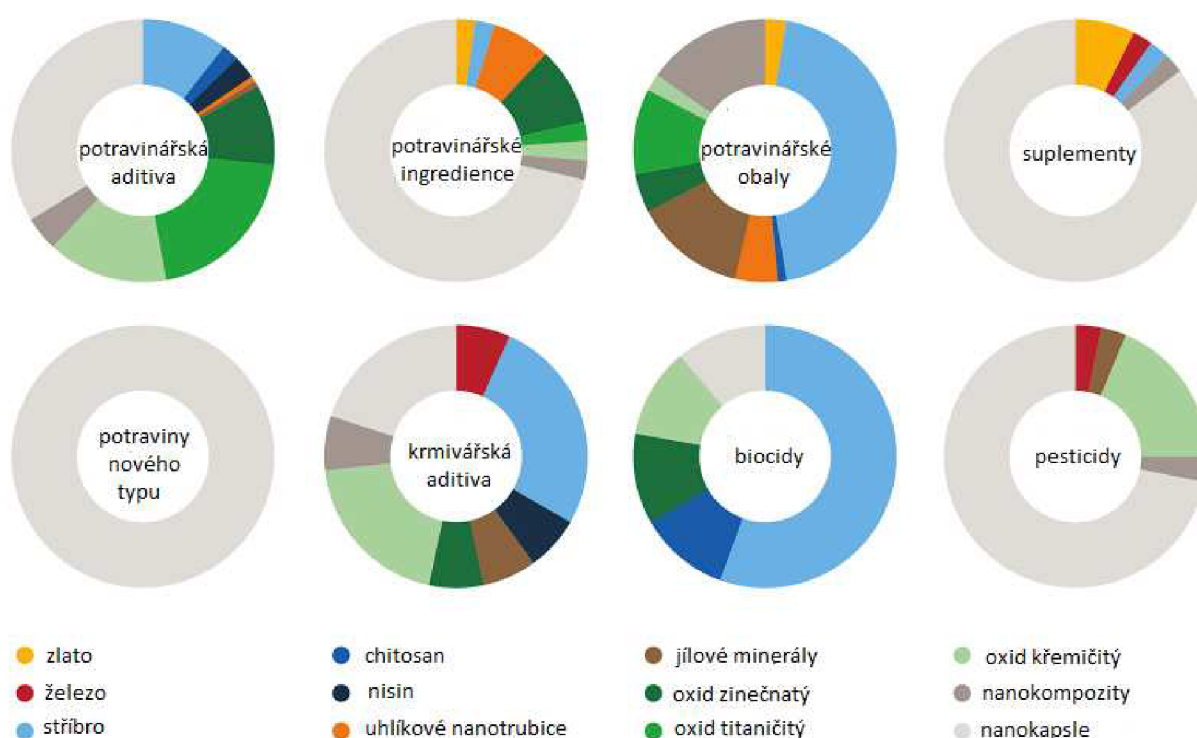
Od zavedení pojmu nanotoxikologie, jakožto nového toxikologického odvětví, bylo navrženo mnoho metod k vymezení případných škodlivých účinků nanomateriálů. Proces posouzení toxicity obecně zahrnuje čtyři hlavní kroky. Nejdříve musí být nanočástice a nanovlákná charakterizovány z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností. Dalším krokem je monitorování jejich potenciálních toxických účinků na buněčné úrovni. Následuje posouzení jejich potenciální orgánové toxicity a závěrečnou částí je stanovení toxicity nanomateriálů na zvířecích organismech.

Cílem této práce bylo vyvíjet nové typy částic a vláken z přírodních materiálů za účelem zisku účinnějších kosmetických výrobků a potravin s lepší výživovou hodnotou. U připravených preparátů byly popsány jejich vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti a byla též ověřena jejich stabilita v různých typech prostředí. Připravené částice a vlákna obohacené o aktivní složku byly rovněž hodnoceny z hlediska potenciálních toxických účinků pro lidský organismus.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Enkapsulace v potravinářském a kosmetickém průmyslu

V posledních čtyřech dekádách získaly nano- i mikročástice své nezastupitelné místo v potravinářských, farmaceutických a kosmetických disciplínách i v průmyslu produktů denní potřeby. Technologie přípravy částic řeší problémy s nerozpustností aktivních sloučenin, chrání je před fyzikálním a chemickým znehodnocením, umožňuje řízené uvolňování aktivní látky a zlepšuje její penetraci do lidské pokožky. Částicové transportní systémy jsou v kosmetickém průmyslu rozsáhle využívány jako nosič pro transport bioaktivních látek, nástroj pro trvalý, kontrolovaný a cílený přísun bez nepříznivých systémových efektů. V potravinářství se enkapsulačních technik využívá ke zlepšení sensorických vlastností potravin, zvýšení biologické dostupnosti nutrientů a rovněž k výrobě nových obalových materiálů s lepšími mechanickými, bariérovými a antimikrobiálními vlastnostmi [1, 2].



Obrázek 1: Nejčastěji používané nanomateriály v potravinářském a zemědělském průmyslu, převzato a upraveno z [3]

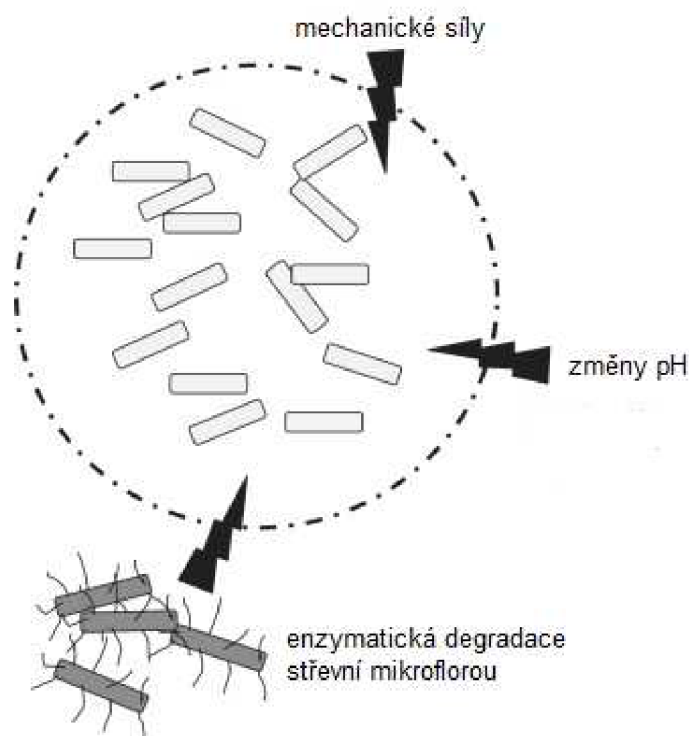
2.1.1 Interakce mikro- a nanočástic s lidským organismem

2.1.1.1 Průchod trávicím traktem

Benefity enkapsulace bioaktivních komponent potravin spočívají v zachování jejich aktivity během skladování, ale také v ochraně aktivních látek při jejich průchodu gastrointestinálním traktem na místo požadovaného účinku [4, 5].

Při navrhování cíleného uvolňování bioaktivních potravinových složek je nutné vzít do úvahy specifické mechanismy rozpouštění kapslí v různých částech gastrointestinálního traktu. Prvním mechanismem jsou silné peristaltické vlny v tlustém střevě. V horních částech GIT je tlak relativně nízký, kvůli přítomnosti velkého množství tekutiny v žaludku a tenkém střevě. Zvýšení mechanické

odolnosti kapslí, jež odolají tlaku v žaludku a tenkém střevě, umožňuje cílené uvolňování bioaktivních molekul v dolní části GIT. Druhým mechanismem je využití změn pH v různých částech GIT. Kapsle z polymerů citlivých na změny pH zůstanou neporušené v žaludku, ale při průchodu tenkým střevem dojde k jejich rozpuštění vlivem trávicích enzymů. Třetím a nejslibnějším mechanismem cíleného transportu gastrointestinálním traktem je využití přesné lokální aktivity enzymových systémů produkovaných mikroorganismy. Bakteriální populace ve střevě a s ní související enzymová aktivita jsou specifické pro různé části GIT a umožňují cílené uvolnění enkapsulovaných bioaktivních látek. Mikroorganismy ve střevě produkují širokou škálu enzymů, jako je β -glukuronidasa, β -xylosidasa, α -arabinosidasa, β -galaktosidasa, nitroreduktasa, azoreduktasa, deaminasa, hydroxylasa a mnohé další. Volba specifických matricových molekul pro tvorbu kapslí závisí na dostupných znalostech o rozložitelnosti matrice enzymy produkovanými anaerobními bakteriemi v tlustém střevě. Většina výzkumu se soustředí na biologicky rozložitelné přírodní polymery, které jsou odolné vůči rozkladu v horní části gastrointestinálního traktu. Většina těchto molekul je také považována za prebiotika, neboť slouží jako zdroj energie pro komenzální bakteriální populaci [4, 5, 6, 7].



Obrázek 2: Mechanismy rozpouštění kapslí uplatňované při cíleném uvolňování bioaktivních látek, převzato a upraveno z [4]

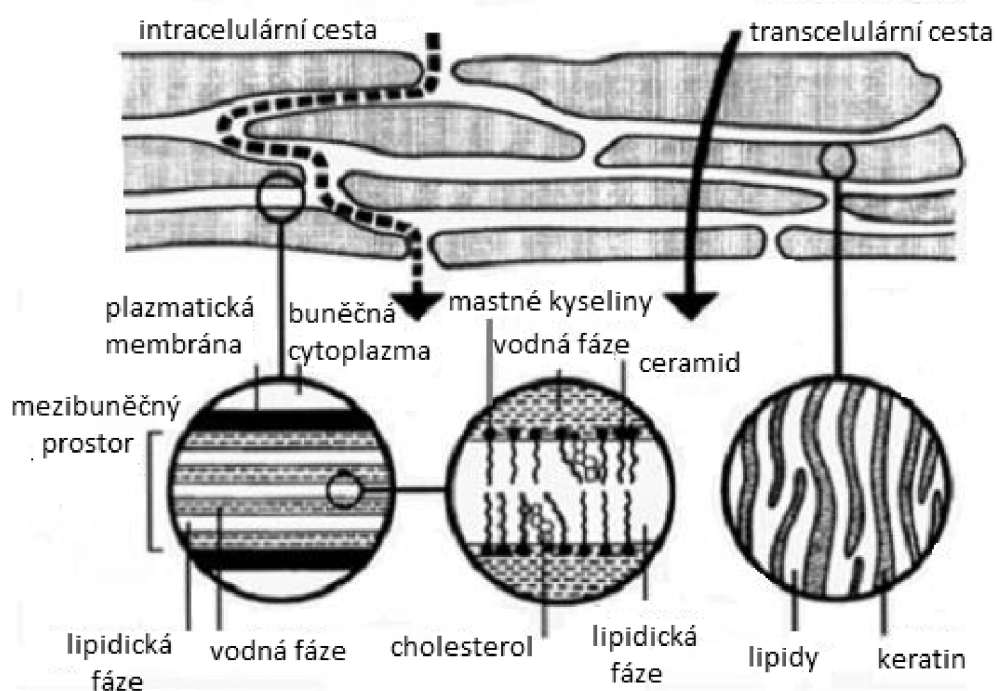
2.1.1.2 Kůže a průnik kůží

Majoritní funkcí lidské pokožky je ochrana organismu před okolním prostředím. Kůže představuje fyzikální, imunologickou, metabolickou i UV protektivní bariéru, která zabraňuje napadení mikroby, poškození toxickými chemikáliemi, UV zářením i částicemi z okolí (včetně nanočástic, které se mohou přirozeně v okolí vyskytovat). Na druhé straně může být kůže využita jako vstupní místo pro léčiva a jiné aktivní látky, pokud jsou chápány a využívány mechanismy, které poskytují bariérové vlastnosti [8, 9].

Kůže se skládá ze dvou hlavních vrstev. Podkladová dermis obsahuje celou řadu různých buněk, nervů, cév a lymfatických žláz v husté síti pojivové tkáně. Nad dermis se oddělená bazální membránou nachází epidermis, složená především z vrstev stratifikovaných keratinocytů obklopených extracelulární lipidovou matrix. Keratinocyty podléhají procesu keratinizace, ve kterém buňka

diferencuje a postupuje směrem vzhůru od bazální vrstvy přes *stratum spinosum* a *stratum granulosum* až po vnější vrstvu, *stratum corneum* (SC, rohová vrstva). Po dosažení SC se buňky nakonec odloučí. Mezi keratinocyty se ve viabilní epidermis nacházejí i buňky produkující melanin, buňky se senzoryckou a imunologickou funkcí a také další komponenty pokožky, jako vlasové folikuly a mazové a potní žlázy [8, 9, 10].

Stratum corneum představuje hlavní fyzikální bariéru kůže, přestup látky přes SC je tedy limitujícím krokem penetrace. Na bílkoviny bohaté korneocyty jsou hustě zabaleny extracelulární lipidovou matrix a společně tuto tvoří bariéru. Transport látek přes *stratum corneum* se děje především pasivní difuzí, a to třemi různými mechanismy – transcelulárně, intercelulárně a skrz vlasové folikuly a potní žlázy [8, 9].



Obrázek 3: Mechanismy transportu látek přes *stratum corneum*, převzato a upraveno z [9]

Intercelulární transport vede zkratkovitě přes intercelulární lipidy, zatímco transcelulární dráha vyžaduje prostup látek jak lipidy, tak i samotnými keratinocyty. Z toho vyplývá, že intercelulární lipidy hrají hlavní roli v bariérové povaze *stratum corneum*. Intercelulární dráha je obecně považována za hlavní cestu transportu většiny sloučenin, přirozeně však všechny molekuly procházejí kombinací všech tří cest, jejichž jednotlivý význam se bude lišit v závislosti na fyzikálně-chemické charakteristice penetrující látky [8, 9].

2.1.1.3 Průchod do buněk a interakce s intracelulárními strukturami

Charakteristickým znakem každé buněčné membrány je její schopnost selektivně řídit tok iontů a molekul dovnitř a ven z buňky a oddělovat cytosolický prostor od okolního prostředí. Velké makromolekulové aglomeráty, např. proteiny, lipoproteinové částice, viry a také nanočástice jsou typicky zapouzdřeny do váčků a selektivně transportovány do buňky procesem endocytózy. V závislosti na velikosti transportních váčků a vlastnostech vstupující látky jsou rozlišovány různé mechanismy endocytózy, ve většině buněk dochází k internalizaci tzv. pinocytózou. V tomto procesu

dochází v buněčné membráně k invaginaci, jejímž výsledkem je uvolnění vezikula se zapouzdřenou vstupující látkou do cytoplazmy. Kromě aktivního transportu mohou nanočástice vstupovat do buněk také pasivní penetrací buněčné membrány [11, 12].

Interakce buňka – nanočástice jsou na jedné straně modulovány fyzikálně-chemickými vlastnostmi nanočástic včetně velikosti, tvaru a povrchového náboje a na druhé straně specifickými parametry buňky (buněčný typ, fáze buněčného cyklu). Porozumění interakci nanočástice s biomolekulou či membránou je proto důležitým předpokladem pro navrhování nanočástic se zvýšenou nebo potlačenou buněčnou absorpcí [11, 13].

2.1.2 Metody enkapsulace do mikro- a nanočástic

Přestože je popsána celá řada enkapsulačních technik, žádný z postupů není univerzálně vhodný pro všechny materiály a produktové aplikace. Výběr nejvhodnější metody závisí na aplikaci transportního systému, požadované velikosti částic, fyzikálních a chemických vlastnostech aktivní látky i obalového materiálu, zamýšleném mechanismu uvolnění a v neposlední řadě na nákladech výroby. Proces enkapsulace musí být tedy vždy navržen s ohledem na zamýšlený účel aplikace. Mezi nejčastěji používané techniky enkapsulace patří v potravinářském i kosmetickém průmyslu sprejové sušení, sprejové chlazení, extruze, koacervace, lyofilizace, polymerace a enkapsulace do liposomů [14, 15].

2.1.2.1 Sprejové sušení

Metoda sprejového sušení je nejhojněji využívanou technikou při enkapsulaci v potravinářství. Tento proces zahrnuje vytvoření emulze, suspenze či roztoku aktivní látky a obalového materiálu. Směs je vstříkována pomocí rozprašovače nebo trysek do sušicí komory s cirkulujícím horkým vzduchem. Voda ve směsi se začne okamžitě odpařovat a dojde k zapouzdření aktivní látky do obalového materiálu. Výhodou metody je především jednoduchost zařízení a velký objem výroby, hlavní nevýhodou pak tvorba neuniformních částic z hlediska jejich velikosti. Technikou sprejového sušení lze enkapsulovat například potravinářské přídatné látky, příchutě a pigmenty [15, 16].

2.1.2.2 Sprejové chlazení

Metoda sprejového chlazení je velice podobná předchozí technice, nedochází však k odpařování rozpouštědla. Připravená směs obalového materiálu a aktivní látky je pomocí trysek či rotujících kotoučů vstříkována do chlazené komory, kde dochází k tuhnutí směsi a tvorbě částic. Obalovým materiálem bývají při sprejovém chlazení nejčastěji lipidy a aktivní látkou pak ve vodě rozpustné minerály, vitaminy, enzymy apod. [17].

2.1.2.3 Extruze

Zapouzdření aktivních látek metodou extruze je vhodné především pro enkapsulaci těkavých a málo stabilních sensorických sloučenin. Potahový materiál může být složen z více složek, typicky se jedná o směs ze sacharózy, škrobu, alginátu či dalších sacharidů. Proces zahrnuje protlačování směsi aktivní látky v tekuté sacharidové matici přes trysky do lázně s vytvrzovacím roztokem, po dopadnutí kapek do lázně dojde ke gelaci sacharidu a tvorbě částic. Výhodou je nízká teplota procesu, i proto je metoda často využívána k enkapsulaci probiotických bakterií [17, 18].

2.1.2.4 Koacervace

Koacervace je technika, která zahrnuje vytvoření obalu kolem aktivního jádra dehydratací a vyloučením polymerních materiálů z roztoku změnou fyzikálně-chemických vlastností roztoku (změna teploty, iontové síly, pH, polarity). Polymery bývají v tomto případě želatina, arabská guma,

chitosan, sójový protein či karboxymethylcelulosa. K vytvoření stabilních kapslí se využívá síťovacích činidel, např. glutaraldehydu. Koacervace je další vhodnou metodou k enkapsulaci probiotických mikroorganismů, je však velice nákladná [15, 17].

2.1.2.5 Lyofilizace

Lyofilizace, neboli mrazové sušení, patří rovněž mezi enkapsulační techniky. Používá se k zapouzdření aromatických sloučenin, esencí i léčiv. Výhodou lyofilizace je vynikající kvalita produktu z hlediska zachování aktivity, na druhou stranu je tento proces velice nákladný a dlouhý, obvykle 20 hodin [15, 17].

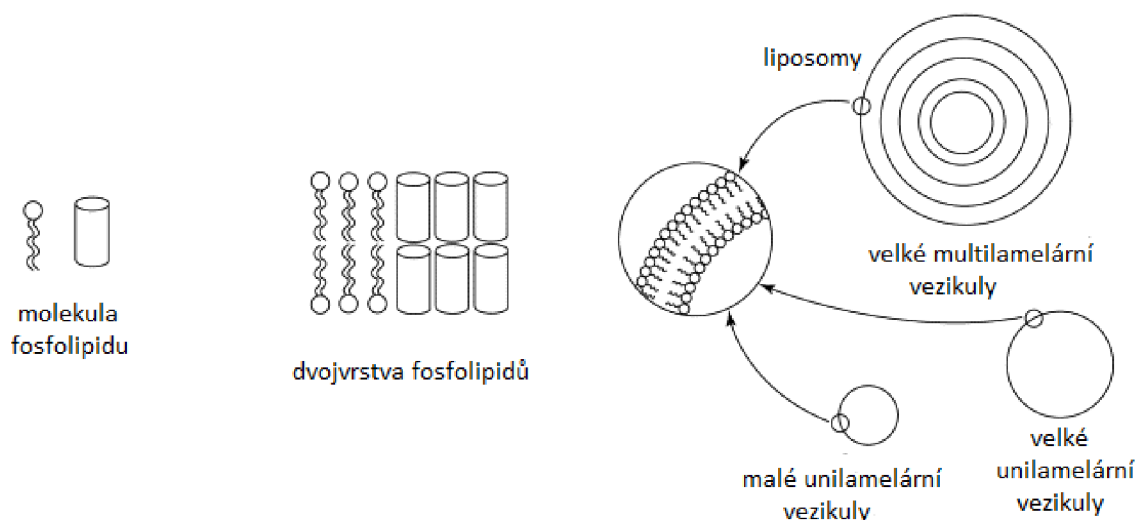
2.1.2.6 Polymerace

Podstatou metody je tvorba kapslí chemickým nebo fyzikálním zesítním polymerních řetězců. Obalový materiál (např. alginát) je ve formě roztoku nebo taveniny přikapáván do síťujícího činidla (roztok dvojmocného iontu, nejčastěji Ca^{2+}). Podobně lze připravovat částice i z chitosanu, karagenanu a dalších. Pro tvorbu kapek slouží jednoduše pipeta, případně trysky či rozprašovače. Změnou podmínek metody (teplota, tlak, koncentrace obalového materiálu, velikost trysky) lze variovat velikosti připravených částic [19, 20].

2.1.2.7 Enkapsulace do liposomů

Liposomy jsou malé sférické vezikuly z přírodních fosfolipidů a cholesterolu. Podstatou tvorby liposomů je hydrofilně-hydrofobní interakce mezi fosfolipidy a molekulami vody. Molekuly fosfolipidů mají amfifilní charakter, ve své struktuře obsahují polární i nepolární část. To umožňuje tvorbu uspořádaných struktur s polárními skupinami orientovanými do vnějšího vodného prostředí a vodní fáze uvnitř liposomu [21, 22].

Mechanismus přípravy liposomů zahrnuje nejprve rozpuštění lipidů v organickém rozpouštědle a následně dispergaci lipidů ve vodě a odpaření organické fáze. Liposomy se nejčastěji připravují metodou injekce rozpouštědla, odpařováním na reverzní fázi a sonikací. Při injekční metodě je pomocí jehly a stříkačky alkoholový roztok fosfolipidů vstříkovan do vodné fáze. U odpařování na reverzní fázi je fosfolipidový film, vytvořený odpařením organického rozpouštědla, převrstven vodní fází, přičemž dojde ke vzniku liposomů. V obou případech dochází k tvorbě liposomů tvořených více biomembránami, tzv. multilamelárních liposomů. Menší unilamelární liposomy vznikají při sonikaci. V tomto případě se částice připravují s využitím ultrazvukové sondy ponořené do roztoku nebo v ultrazvukové lázni [23, 24, 25].



Obrázek 4: Ilustrace struktury liposomů, převzato a upraveno z [21]

2.1.3 Materiály pro přípravu mikro- a nanočástic

Pro zapouzdření aktivních látek je vhodná celá řada sloučenin různých typů a vlastností, při jejich výběru je však nezbytné řídit se bezpečnostními předpisy. Potravinářská legislativa je v tomto směru mnohem striktnější, než předpisy farmaceutické a kosmetické. Množství sloučenin schválených pro enkapsulaci léčiv a kosmetiky není povoleno užívat pro zapouzdření aktivních látek v potravinářství, protože nebyly schváleny jako GRAS („generally recognized as safe“) materiály. Celý proces výroby nových funkčních potravin a kosmetiky musí být navržen tak, aby vyhovoval požadavkům bezpečnostních institucí jako je Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA), resp. Evropskou asociací kosmetického průmyslu COLIPA [20].

Materiály používané pro enkapsulaci aktivních látek musí být biologicky odbouratelné, a musí poskytovat maximální ochranu zapouzdřené látky, přičemž s ní nesmí nijak reagovat. Pro enkapsulaci v potravinářství se nejčastěji využívají polysacharidy. Používají se především škrob a jeho deriváty, celulóza, dále rostlinné exudáty arabská guma, guma tragant, guma karaya a také galaktomanany a pektiny. Pro enkapsulaci do potravin se používají i extrakty řas (karagenany a alginát) a mikrobiální i živočišné polysacharidy (dextran, chitosan, xanthan). Kromě polysacharidů jsou vhodné i některé proteiny (kaseiny, želatina) a lipidy. Mezi lipidické materiály vhodné pro potravinářské aplikace patří vosky (včelí, karnaubský), glyceridy a fosfolipidy [20].

V kosmetickém průmyslu jsou rovněž nejběžněji využívány polysacharidy (gumy, škroby, cyklodextriny, chitosan), dále proteiny (želatina, kolagen) a lipidy. Velice častou volbou jsou i nanočástice z přírodních a syntetických polymerů (alifatické polyestery PLA, PLGA, PHA či akrylové polymery, polyvinylalkohol atd.). Anorganické kovové částice a dendrimery rovněž nacházejí své uplatnění v transportních systémech pro topické aplikace [12, 14].

2.1.3.1 Chitosanové částice

Nejrozšířenějším polymerem pro přípravu nanočástic pro topickou aplikaci je chitosan. Jedná se o lineární polysacharid odvozený od chitinu, který se nachází v exoskeletu koryšů. Aminokupina chitosanu snadno podléhá protonaci v kyselém až neutrálním prostředí, a tedy přítomnosti pozitivního náboje. Díky tomu je chitosan rozpustný ve vodě a působí bioadhezivně, protože pozitivně nabitý polymer se váže na negativně nabitě mukoproteiny. Tato interakce přispívá k prodloužení doby

cirkulace preparátů na bázi chitosanu a tedy k lepší biologické dostupnosti aktivní látky. Pozitivní vlastností chitosanu je i jeho antimikrobiální aktivita, především proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím a houbám. Chitosanové částice mohou být připraveny použitím iontového zesílení, kovalentního zesílení, precipitací či polymerizací s velikostí částic v rozsahu 20-800 nm podle použité metody [12, 26].

2.1.3.2 Alginátové částice

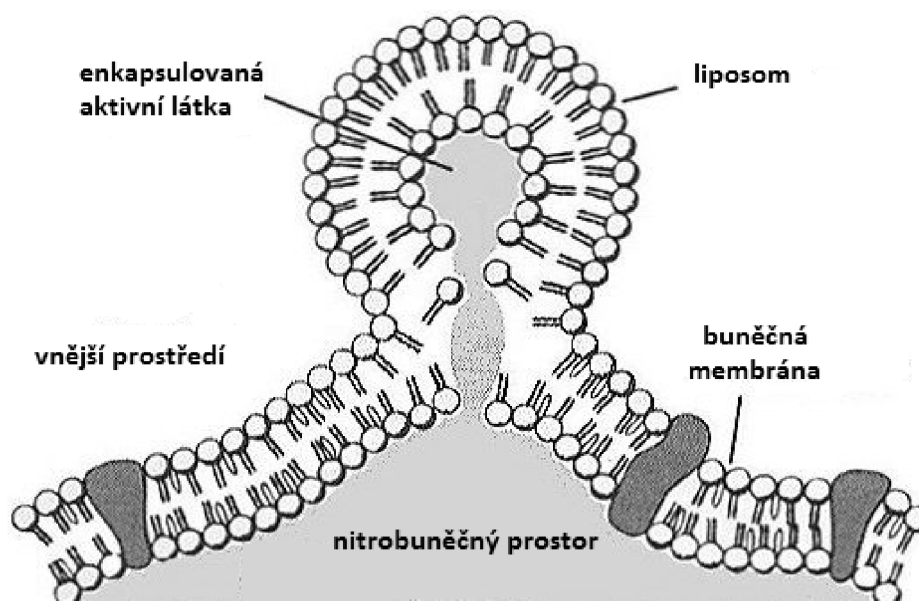
Alginát je přirozeně vyskytující se aniontový polymer získávaný z hnědých mořských řas. V biomedicíně je hojně využíván především pro svou biokompatibilitu, nízkou toxicitu, relativně nízkou cenu a schopnost snadné gelace přidáním dvojmocných kationtů, např. Ca^{2+} . Alginátové hydrogely mohou být připraveny různými způsoby zesílení a jejich strukturální podobnost s extracelulárními maticemi živých tkání umožňuje široké využití při hojení ran a cíleném transportu bioaktivních látek. Krytí z alginátu udržuje fyziologicky vlhké prostředí, minimalizuje infekci v místě rány a umožňuje řízené uvolňování aktivních molekul, v závislosti na metodě zesílení a použitém činidle [27, 28].

2.1.3.3 Liposomy

Liposomy jsou sférické vezikuly tvořené lipidy, jež jsou hlavní součástí buněčných membrán. Ve své struktuře obsahují nejméně jednu dvojvrstvu fosfolipidů, do níž může být zapouzdřena aktivní látka. Průměrná velikost liposomů se pohybuje od 50 do 300 nm v závislosti na způsobu výroby. Technik přípravy liposomů je mnoho, nejčastěji se využívá hydratace tenkého filmu, odpařování na reverzní fázi, vstřikování rozpouštědla, sonikace, vysokotlaká homogenizace a nízkotlaká extruze [9, 12].

Vlastnosti liposomových částic se odvíjí od jejich rozměrů, lipidového složení, povrchového náboje a metody přípravy. Liposomy představují užitečný nástroj cíleného transportu především díky své malé velikosti, biokompatibilitě a schopnosti zapouzdřit hydrofilní i hydrofobní látky [25, 29].

Jejich nevýhodou je tendence ke ztrátě stability v průběhu delšího skladování. Existuje několik způsobů, jakými lze zabránit předčasnému uvolnění enkapsulované aktivní látky. Jednou z možností zvýšení stability liposomových částic je asociace s biodegradabilním polymerem [30].



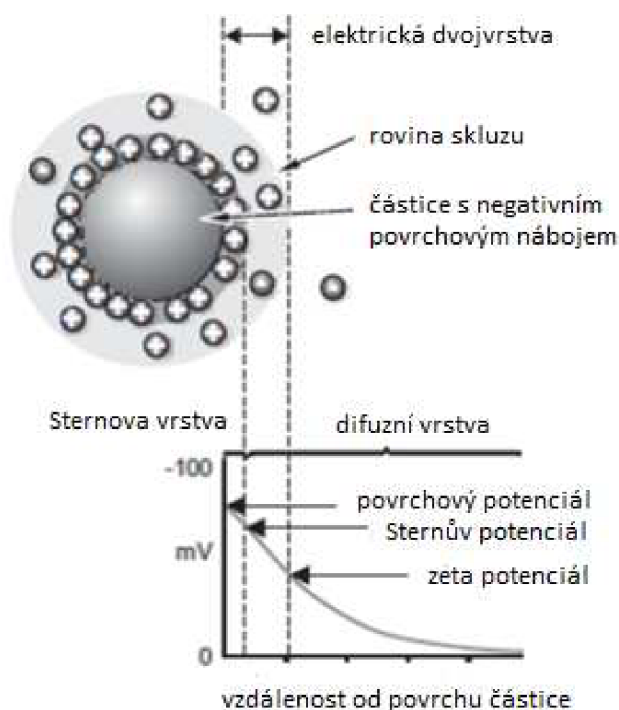
Obrázek 5: Přijetí liposomu do buňky, převzato a upraveno z [31]

2.1.4 Metody charakterizace částic

Vlastnosti nanočástic a způsob jejich interakce s lidským organismem jsou determinovány celou řadou faktorů, včetně distribuce velikostí, povrchového náboje, reaktivity, tendencí k agregaci, tvarem i chemickým složením. Pro popis těchto částicových charakteristik lze využít celou řadu analytických metod. Vizualizaci připravených nanočástic, ale i informace o jejich agregaci, disperzi, velikosti, struktuře a tvaru umožňují optické metody (TEM, SEM, AFM, apod.). K separaci částic z prostředí, případně frakcionaci podle velikostí, lze využít chromatografické metody (SEC) a také centrifugaci či filtraci. Spektroskopické techniky (DLS, Ramanova spektroskopie, NMR, atd.) poskytují široké spektrum informací, včetně distribuce velikostí částic, jejich agregaci a strukturálním uspořádání částic. Další hojně využívanou metodou je hmotnostní spektrometrie, termogravimetrie (podává informace o tepelné stabilitě a v tandemu s MS slouží k analýze povrchu nanočástic) a v neposlední řadě stanovení elektroforetické mobility a zeta potenciálu [32, 33, 34].

2.1.4.1 Zeta potenciál

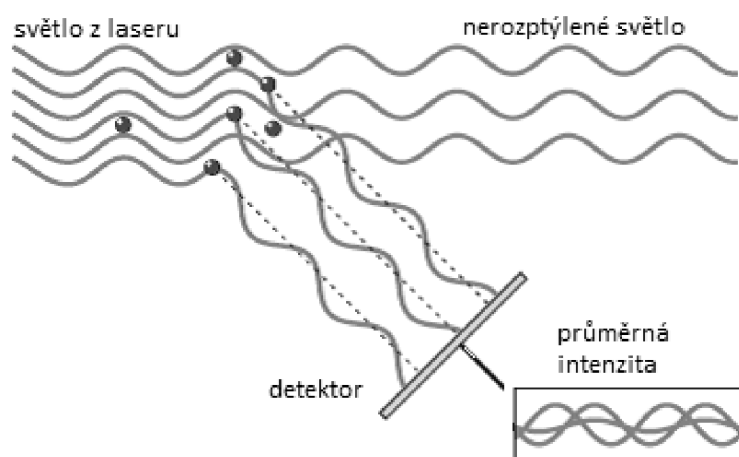
Zeta potenciál je hodnota udávající stabilitu koloidního systému. V blízkosti každé koloidní částice se nachází elektrická dvojvrstva. V okolí částice dojde ke zvýšení koncentrace iontů s opačným nábojem, než je náboj na povrchu částice. Vrstva kapaliny, která obklopuje částici, existuje ve dvou samostatných částech. Přímou k povrchu částice přiléhá tzv. Sternova vrstva, která se pohybuje zároveň s částicí. Uvnitř vnější, tzv. difuzní vrstvy, se nachází pomyslná hranice, uvnitř které tvoří ionty a částice stabilní jednotku. Tato hranice je pohybovým rozhraním vykazujícím elektrokinetický potenciál (zeta potenciál) a nazývá se rovina skluzu. Jestliže všechny částice v suspenzi budou mít velký negativní nebo pozitivní zeta potenciál, pak se budou odpuzovat a nedojde k flokulaci. Pokud však hodnoty zeta potenciálu budou nízké, nebude existovat žádná síla, jež by zabránila flokulaci. Obecně je za hranici stability považována hodnota +30 V, resp. -30 mV. Částice s hodnotou zeta potenciálu vyšší než +30 mV či nižší než -30 mV jsou hodnoceny jako stabilní [35, 36].



Obrázek 6: Charakterizace částic s využitím zeta potenciálu, převzato a upraveno z [35]

2.1.4.2 Dynamický rozptyl světla

Částice v suspenzi v kapalině nejsou nikdy stacionární, ale neustále se pohybují. Tento fenomén, tzv. Brownův pohyb, je způsoben náhodnými kolizemi částice s okolními molekulami rozpouštědla. Zatímco malé částice se pohybují rychle, pohyb větších částic je o mnoho pomalejší. Tento vztah mezi velikostí částic a rychlostí jejich pohybu popisuje Stokes-Einsteinova rovnice. Přístroj Zetasizer využívá k analýze velikosti částic dynamický rozptyl světla. Podstatou měření je ozáření suspenze laserovým paprskem a následná analýza fluktuace intenzity rozptýleného světla (Obr. 7). Protože částice jsou v neustálém pohybu, intenzita světla fluktuuje rovněž. Z naměřené intenzity fluktuace je následně vypočtena velikost částic v suspenzi [35, 37, 38].



Obrázek 7: Stanovení velikosti částic s využitím dynamického rozptylu světla, převzato a upraveno z [35]

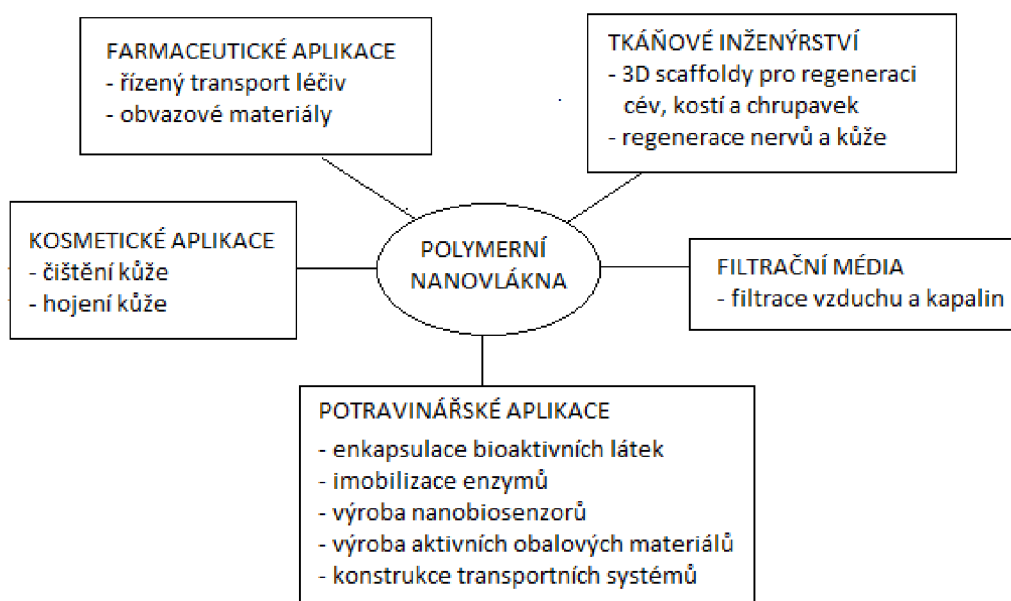
2.1.4.3 Kryo-TEM analýza

Kromě pozorování pod klasickým optickým mikroskopem lze ke sledování nanočástic využít i sofistikovanější elektronovou mikroskopii. Uspořádání elektronového mikroskopu je téměř totožné jako u optického modelu, skleněné čočky jsou však nahrazeny elektromagnetickými a vzorek je zobrazován nikoliv pomocí fotonů, nýbrž pomocí prošlých elektronů. Transmisní elektronová mikroskopie umožňuje zobrazování vzorků s rozlišením 0,1-2 nm. Klasické uspořádání této techniky vyžaduje sušení a barvení pozorovaného objektu, což má za následek mírná zkreslení ve výsledném zobrazení. Kryo-elektronová mikroskopie umožňuje zobrazování objektů v podobě, v jaké skutečně v roztoku existují. Vzorky pro kryo-TEM analýzu jsou prudce zamrazeny a zůstávají tak ve svém přirozeném hydratovaném stavu. Ačkoliv byla tato technika původně navržena pro získávání informací o struktuře biologických vzorků na buněčné a makromolekulární úrovni, dnes představuje velice cenný nástroj pro vizualizaci nově syntetizovaných nanomateriálů. Kryo-transmisní elektronová mikroskopie poskytuje představu o skutečné podobě nanočástic, polydisperzitě vzorku a změnách v morfologii částic při různých metodách přípravy [39].

2.2 Zvláknování v kosmetickém a potravinářském průmyslu

Materiály na bázi mikro- a nanovláken z biokompatibilních a biologicky rozložitelných polymerů získávají stále větší pozornost v mnoha oblastech lidské činnosti. V biomedicínských oborech

a tkáňovém inženýrství hrají nezastupitelnou roli díky své schopnosti imitovat fyziologické prostředí *in vivo*. Krytí ran na bázi nanovláken se vyznačuje velkou povrchovou plochou, vysokou porézností, biologickou rozložitelností a schopností vytvářet vhodné prostředí pro růst živých buněk a inhibici mikroorganismů. Nanovlákná lze využít i pro topické aplikace léčiv a umožnit jejich řízené uvolňování. Kromě farmaceutických aplikací nacházejí nano- a mikrovlákná uplatnění i v potravinářském průmyslu (např. obalové materiály či scaffold pro bakteriální kultury), při ochraně životního prostředí a mnoha dalších průmyslových odvětvích [40, 41, 42, 43].



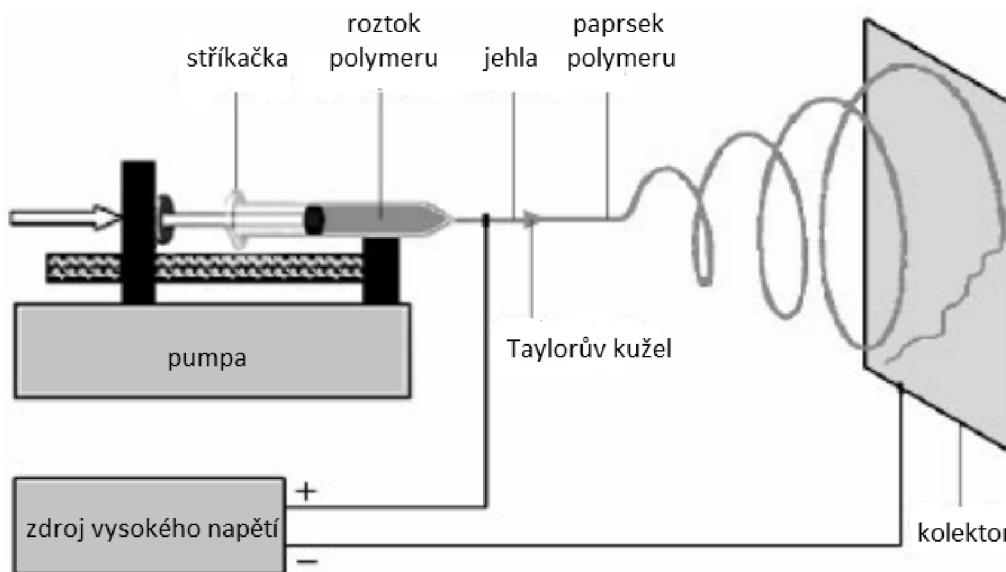
Obrázek 8: Vybrané aplikace polymerních nanovláken v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, převzato a upraveno z [42, 44]

2.2.1 Metody přípravy vláken

Existuje mnoho různých metod přípravy nanovláken, zdaleka nejběžnější je elektrostatické (elektrospinning) a rotační (forcespinning) zvlákňování. Další možnosti představují fázová separace, rozfoukávání nanovláken z roztoku či taveniny, dále technika tažení nanovláken z kapky a v neposlední řadě matricová syntéza s využitím šablon [45].

2.2.1.1 Elektrospinning

Elektrospinning je proces, při kterém jsou jemná polymerní vlákna vyráběna z kapalného roztoku za použití elektrostatické síly. Systém pro tento typ zvlákňování obvykle sestává ze tří komponent: zdroje napětí, jehly připojené ke stříkačce a kovového kolektoru. Zdroj napětí vytváří vysoký elektrický potenciál mezi jehlou a uzemněným kolektorem. Nejprve dojde k vytvoření kapičky roztoku polymeru na špičce jehly vlivem povrchového napětí. Při zvýšení elektrického potenciálu se kapičkový tvar polymerního roztoku prodlužuje na tzv. Taylorův kužel. Další zvýšení elektrického potenciálu překonává povrchové napětí a způsobí tvorbu paprsku polymeru směrem ke kovovému kolektoru. Tryskající polymerní roztok se postupně koncentruje s odpařováním rozpouštědla a v pevném skupenství se zachytává na kolektoru. Koncept elektrospinningu je poměrně jednoduchý, systém je však velmi citlivý na řadu parametrů včetně použitého roztoku polymeru, teplotu, relativní vlhkost apod. [46, 47, 48].



Obrázek 9: Schéma sestavy pro elektrosponing, převzato a upraveno z [49]

2.2.2 Materiály pro výrobu vláken

Možnosti využití vláken v tkáňovém inženýrství a v transportních systémech léčiv jsou téměř neomezené. Jejich funkcionalizace umožňuje řízené uvolňování hydrofobních i hydrofilních léčiv, tkaniny z nanovláken mohou být součástí krytí ran [12].

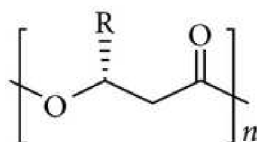
Nejdůležitější požadavek pro nanovlákná sloužící jako biomateriály je jejich biokompatibilita, tedy nulové toxické působení. Mohou být biologicky degradabilní i nedegradabilní, v závislosti na druhu jejich aplikací. Obvykle se upřednostňují vlákna degradabilní, čímž se eliminuje nutnost jejich následného odstranění z biologického systému [50].

Nano- i mikrovlákná mohou být vyráběna jak z přírodních, tak i ze syntetických polymerů, případně jejich kombinací. Přírodní polymery pro přípravu nanovláken jsou především polysacharidy (škrob, celulósa, agarosa, alginát, chitin, chitosan) a polyamidy (kolagen, fibrin). Tyto látky vyvolávají při interakci s lidským organismem minimální zánětlivou reakci, vyznačují se dobrými mechanickými vlastnostmi a některé i specifickou biologickou aktivitou, jsou proto vhodnými substráty pro výrobu nanovláken v medicíně i kosmetice. Další široce využívanou skupinou látek pro přípravu nanovláken jsou polyester, především kyselina polyglykolová (PGA), kyselina polymlečná (PLA) a jejich kopolymer (PLGA). Speciální kategorií jsou pak polyhydroxyalkanoáty, polyester produkované činností mikroorganismů [51, 52, 53].


2.2.2.1 Polyhydroxyalkanoáty a PHB

Poly-3-hydroxybutyrát (PHB) je intracelulární polyester z rodiny polyhydroxyalkanoátů. Polyhydroxyalkanoáty jsou skupinou biopolymerů vyznačujících se dobrou biodegradabilitou i biokompatibilitou. Jedná se o biopolyestery produkované řadou mikroorganismů, na průmyslové úrovni jsou to bakterie rodu *Cupriavidus* a *Azohydromonas* [43,54].

PHB se skládá z monomerů 3-hydroxybutyrátu, ve kterých je karboxylová skupina jedné jednotky vázána esterickou vazbou s hydroxylovou skupinou sousedního monomeru. Má vlastnosti podobné těm, které se vyskytují u běžných plastů, je však biologicky odbouratelný a biokompatibilní. PHB proto nachází uplatnění v potravinářském průmyslu, ve farmacii i medicíně. Jeho hlavní limitací je vysoká cena v porovnání s polymery získanými z petrochemického průmyslu [55, 56, 57].



Poly(3-hydroxyalkanoáty) [PHA]

R zbytek		
—CH ₃	Poly(3-hydroxyalkanoáty)	PHA
—CH ₂ -CH ₃	Poly(3-hydroxyvalerát)	PHV
—(CH ₂) ₂ —CH ₃	Poly(3-hydroxyhexanoát)	PHHex
—(CH ₂) ₄ —CH ₃	Poly(3-hydroxyoktanoát)	PHO
—(CH ₂) ₆ —CH ₃	Poly(3-hydroxydekanoát)	PHD
—CH ₂ — 	Poly(3-hydroxy-5-fenylvalerát)	PHPV

Obrázek 10: Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů a příklady jejich strukturálních derivátů, převzato a upraveno z [58]

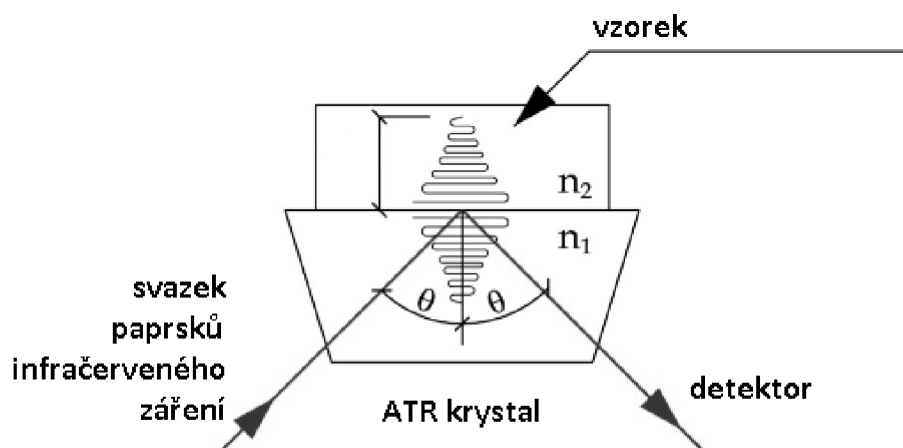
2.2.3 Metody charakterizace vláken

Podobně jako u nanočástic, ke zjištění fyzikálně-chemických vlastností nanovláken se využívá celá řada nejrůznějších technik. K pozorování molekulární struktury nanovláken se používá infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a nukleární magnetická rezonance (NMR). Průměr vláken a jejich morfologii popisují, stejně jako v případě nanočástic, optické metody SEM, TEM, AFM apod. Pro zkoumání chemických vlastností povrchu nanovláken a přítomných vazeb je nejčastěji využívána FTIR a X-ray spektroskopie [59, 60].

2.2.3.1 FTIR-ATR technika

FTIR (Fourier Transform Infrared) spektroskopie je optická technika poskytující informace o chemických a strukturálních vlastnostech sloučenin. Tato metoda měří pohlcení infračerveného záření (0,78-1000 μm) analyzovaným materiálem, výstupem je infračervené spektrum zobrazující transmitanci (propustnost) v závislosti na vlnové délce dopadajícího záření. Infračervené záření je elektromagnetické záření v rozsahu vlnočtů od 12 500 do 20 cm^{-1} , přičemž pro sledování chemické struktury látek má význam především oblast s vlnočtem 4 000 – 200 cm^{-1} . Při absorpci infračerveného záření dochází u vzorku ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipolového momentu molekuly [61].

U vzorků, u nichž je zájmovou oblastí jejich povrch, se používá technika zeslabeného vnitřního odrazu ATR („Attenuated Total Reflectance“, Obr. 10). Podstatou metody je uplatnění úplného odrazu záření na fázovém rozhraní měřeného vzorků a krystalu z materiálu s vysokým indexem lomu. Pomocí soustavy zrcadel je svazek paprsků do krystalu přiveden tak, aby úhel dopadu na fázové rozhraní odpovídal podmínce totálního odrazu. Protože měřený vzorek je v kontaktu s ATR krystalem, záření částečně proniká i do něj. Pokud analyzovaný materiál absorbuje záření o určité frekvenci, pak tato složka záření bude v jinak totálně odraženém světle zeslabena. Touto technikou lze analyzovat pouze velmi tenké povrchové vrstvy, protože penetrační hloubka do povrchu vzorků je minimální (řádově jednotky μm) [62, 63].



Obrázek 11: Schématické znázornění svazku paprsků přivedeného na rozhraní vzorek krystal v FTIR-ATR spektrometru, převzato a upraveno z [64]

2.2.3.2 Rastrovací elektronová mikroskopie SEM

V elektronovém mikroskopu jsou klasické optické čočky nahrazeny elektromagnetickými a pro zkoumání vzorku se využívá urychlených elektronů, čímž se mnohonásobně zvyšuje rozlišovací schopnost přístroje. Při pozorování vzorků je každé místo zaměřeno pohyblivým svazkem elektronů, které interagují s atomy vzorku. Část dopadajících elektronů je absorbována, část odražena a navíc dochází ke generaci primárním svazkem excitovaných sekundárních elektronů. Rastrovací elektronový mikroskop následně vytvoří ze signálů odražených a sekundárních elektronů obraz povrchu studovaného vzorku [65].

2.3 Bioaktivní složky částic a vláken

S rostoucím povědomím spotřebitelů se zvyšuje poptávka po funkčních potravinách s množstvím zdravotních benefitů, jakož i po účinnějších kosmetických výrobcích. Enkapsulace antioxidantů, vitamínů, příchutí, probiotik i esenciálních olejů je celosvětově uznávanou a úspěšnou technikou výroby moderních potravin a kosmetiky. Výzkumy rovněž ukazují, že synergické účinky více bioaktivních složek v komplexních preparátech významně zvyšují účinnost hotových výrobků [66, 67, 68].

2.3.1 Bioaktivní účinek

2.3.1.1 Antioxidační účinek

Volný radikál je částice s volným nepárovým elektronem, což ji činí nestabilní a vysoce reaktivní. Volné radikály atakují důležité makromolekuly (lipidy, nukleové kyseliny, proteiny), což má za následek poškození buněk. Na lidský organismus působí volné radikály z okolního prostředí, (rentgenové záření, ozon, cigaretový kouř, průmyslové chemikálie) i volné radikály přirozeně vznikající v samotném metabolismu [69, 70].

Oxidativní stres je termín pro stav oxidativního poškození, ke kterému dochází, pokud je rovnováha mezi volnými radikály a antioxidačním obranným systémem posunuta ve prospěch radikálových částic. Předpokládá se, že oxidativní stres hraje podstatnou roli u všech zánětlivých onemocnění, ischemických a neurologických chorob, u některých typů rakoviny a také u procesu stárnutí [69, 71, 73].

Antioxidanty jsou látky schopné zhášet volné radikály a zabraňovat tak buněčnému poškození. Některé antioxidanty se vytváří přirozeně v lidském metabolismu, jiné jsou pro tělo esenciální, a je nezbytné doplnit je z externích zdrojů. Preference spotřebitelů se stále více naklání ve prospěch přírodních zdrojů terapeutických antioxidantů. U mnoha antioxidačních látek přirozeně se vyskytujících v rostlinných zdrojích byly potvrzeny zhášecí vlastnosti vůči volným radikálům. Použití přírodních antioxidantů v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu je vhodnou alternativou syntetických antioxidantů především pro jejich příznivou cenu a nulové škodlivé účinky pro lidský organismus [69, 73, 74].

2.3.1.2 Antimikrobiální účinek

Antimikrobiální látky jsou syntetické nebo přírodní sloučeniny, které mají schopnost usmrtit mikroorganismy, případně inhibovat jejich růst [75].

Mechanismus působení antimikrobiální látky může být založen na interakci s buněčnou membránou, což má za následek změny v permeabilitě a narušení transportu látek přes membránu. Antimikrobiální látka může také inaktivovat některé z důležitých enzymů mikroba, zasáhnout do jeho genetické informace, případně inhibovat syntézu proteinů [76, 77].

Látky s antimikrobiálním účinkem nacházejí své uplatnění v širokém spektru odvětví průmyslu – ve farmacii, kosmetice, potravinářství, v zemědělství i v sanitárních oblastech [78].

2.3.1.3 Ochrana proti poškození UV zářením

I přesto, že je sluneční záření pro lidský organismus esenciální (tkáňová syntéza vitamínu D₃), nadměrná expozice může mít za následek poškození pokožky. Slunce je zdrojem ultrafialového záření různých typů: UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm) a UVA (320-400 nm). Jednotlivé druhy UV záření se liší vlnovou délkou, energií a s tím souvisejícím odlišným škodlivým efektem pro lidský organismus. UVB má typicky za následek zarudnutí kůže, zatímco UVA je spojováno s generováním volných radikálů a stárnutím pokožky [79, 80].

Zánětlivé a degenerativní procesy po akutním a chronickém ozařování pokožky UV zářením jsou zprostředkovány nadprodukcí reaktivních sloučenin kyslíku, které mohou reagovat s DNA, bílkovinami a mastnými kyselinami. To vede k narušení buněčného metabolismu, morfologickým a strukturálním změnám, poškození regulačních drah a změnám v diferenciaci, proliferaci a apoptóze kožních buněk. Výsledkem tohoto oxidativního poškození může být i rozvoj rakoviny kůže. Kůže sama disponuje systémem antioxidační obrany, jehož úkolem je primárně zabránit poškození DNA a následnému zhoubnému bujení. Při nadměrné expozici UV záření a vyčerpání přirozeného antioxidačního systému však k poškození tkáně dojít může, proto je nutné kůži chránit použitím ochranného kosmetického přípravku. Ten obsahuje antioxidanty a UV filtry k blokování UVA i UVB záření, tedy látky, jež mají schopnost záření odrazit nebo pohltit a přeměnit na tepelnou energii a zabránit tak poškození [81, 82, 83].

2.3.2 Polyfenolické látky

Obava spotřebitelů z vedlejších účinků syntetických léčiv a také rostoucí nadužívání antibiotik a s ním spojená rezistence mikroorganismů vede výzkumníky k intenzivnímu studiu přírodních rostlinných bioaktivních látek. Vysokou antioxidační i antimikrobiální aktivitou se vyznačují polyfenolické sloučeniny. Tyto sekundární metabolity rostlin tvoří širokou rodinu různorodých látek, od jednoduchých molekul až po složité struktury [84, 85].

2.3.2.1 Chemická struktura fenolických sloučenin

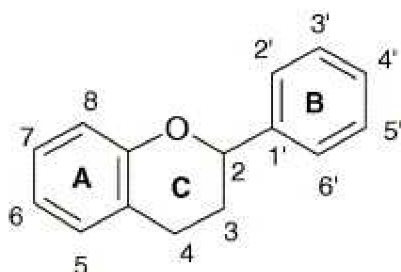
Všechny fenolické látky mají ve své struktuře nejméně jedno benzenové jádro s jednou nebo více (–OH) skupinami. Hydroxylové funkční skupiny mohou být dále funkcionalizované methylem, methoxyem, aminoskupinou nebo glykosylem, což následně ovlivňuje jejich rozpustnost. Díky tomu jsou fenolické sloučeniny extrémně rozmanitou skupinou látek lišící se druh od druhu, ale i tkáň od tkáně v rámci jediného druhu. I přes tuto strukturní diverzitu lze fenolické sloučeniny rozdělit podle počtu uhlíků a jejich vzájemných vazeb do několika tříd uvedených v Tabulce 1 [86, 87].

Tabulka 1: Dělení fenolických sloučenin, převzato a upraveno z [88]

Třída	Strukturní vzorec
Jednoduché fenoly, benzochinony	C_6
Fenolické kyseliny	C_6-C_1
Acetofenony, fenyloctové kyseliny	C_6-C_2
Hydroxyskořicové kyseliny, fenypropanoidy, kumariny	C_6-C_3
Naftochinony	C_6-C_4
Xanthony	$C_6-C_1-C_6$
Stilbeny, anthrachinony	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoidy, isoflavonoidy	$C_6-C_3-C_6$
Lignany, neolignany	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonoidy	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligniny	$(C_6-C_3)_n$
Kondenzované taniny (proanthokyanidiny a flavolany)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Do dnešního dne bylo identifikováno několik tisíc různých fenolických látek s rozličnými strukturami. Všechny tyto sloučeniny jsou syntetizovány ze dvou hlavních rostlinných syntetických drah – šikimátové a polyketidové. Uvedenými metabolismy vzniká obrovské množství různých sloučenin, od jednoduchých molekul až po polymerizované struktury s vysokou molekulovou hmotností [89].

Největší skupinu v rámci rostlinných polyfenolických látek tvoří flavonoidy, více než polovinu celkového množství známých sloučenin. Strukturu flavonoidů tvoří 15 uhlíkových atomů uspořádaných do dvou aromatických jader (A a B) spojených 3-uhlíkatým řetězcem ve formě heterocyklického kruhu (C; Obr. 12). Rozličné substituce na jednotlivých kruzích umožňují vznik mnoha podskupin flavonoidů, např. flavonoly, flavony, flavanony, flavanoly (katechiny), isoflavony a anthokyanidiny [88, 90].



Obrázek 12: Obecná struktura molekuly flavonoidů [88]

2.3.2.2 Přírodní zdroje fenolických sloučenin

Fenolické sloučeniny mají pro rostliny mnoho funkčních rolí. Jsou nositeli zbarvení, které láká opylující hmyz a chrání proti UV záření. Díky své trpké a svíravé chuti chrání rostlinu před požitím

pastevními zvířaty a činí ji rezistentní vůči patogenům. Navíc pro rostliny může být syntéza polyfenolů jedinou možností odbourání některých toxických metabolitů a xenobiotik [86, 91, 92].

Distribuce fenolických látek není na tkáňové, buněčné a subcelulární úrovni jednotná. Nerozpustné fenoly se nacházejí v buněčných stěnách, zatímco rozpustné fenoly se vyskytují ve vakuolách rostlinných buněk. Vnější vrstvy rostlin obsahují vyšší hladiny polyfenolů než vnitřní, protože fenolické sloučeniny přispívají k mechanické síle buněčných stěn a hrají roli v reakci buňky na stres a patogeny. Obsah některých fenolických složek se může zvýšit při stresových podmínkách, jako je působení UV záření, infekce patogeny a parazity, poranění či vystavení vysokým teplotám. Úroveň fenolických sloučenin závisí i na odrůdě, podmínkách pěstování, procesu dozrávání a podmínkách zpracování a skladování [93, 94, 95].

Ačkoliv se fenolické sloučeniny vyskytují téměř ve všech potravinách rostlinného původu, hlavní zdroje těchto antioxidantů představuje ovoce, zelenina a některé nápoje. Existují velké rozdíly mezi celkovým fenolickým obsahem v různých přírodních zdrojích, dokonce u různých rostlin stejného druhu. Přesto lze říct, že mezi nejbohatší zdroje fenolických látek patří cereálie, bobulovité a citrusové ovoce, čaj a káva, červené víno a některé bylinky a koření [88, 93].

2.3.2.3 Extrakce fenolických sloučenin

Izolace fenolických sloučenin z matrice je obecně založena na procesu extrakce. Rozpustnost fenolů se liší kvůli rozličné chemické povaze této skupiny látek, proto je obtížné vyvinout extrakční postup vhodný pro extrakci všech polyfenolických sloučenin. Používají se rozpouštědla jako methanol, propanol, ethanol, aceton, ethylacetát a jejich kombinace, často s různými poměry vody. Extrakty z rostlinných materiálů jsou vždy různorodé směsi polyfenolických sloučenin v závislosti na použitém rozpouštědlovém systému. Povaha rostlinných extraktů je rovněž ovlivněna dobou extrakce. Optimální doba extrahování se pohybuje od 1 minuty do 24 hodin, dlouhodobější extrakce zvyšují pravděpodobnost oxidace polyfenolů. Pro extrakci některých vázaných fenolických sloučenin z rostlinných materiálů lze použít kyselou či alkalickou hydrolýzu [93, 96, 97].

2.3.2.4 Využití fenolických látek v potravinářském a kosmetickém průmyslu

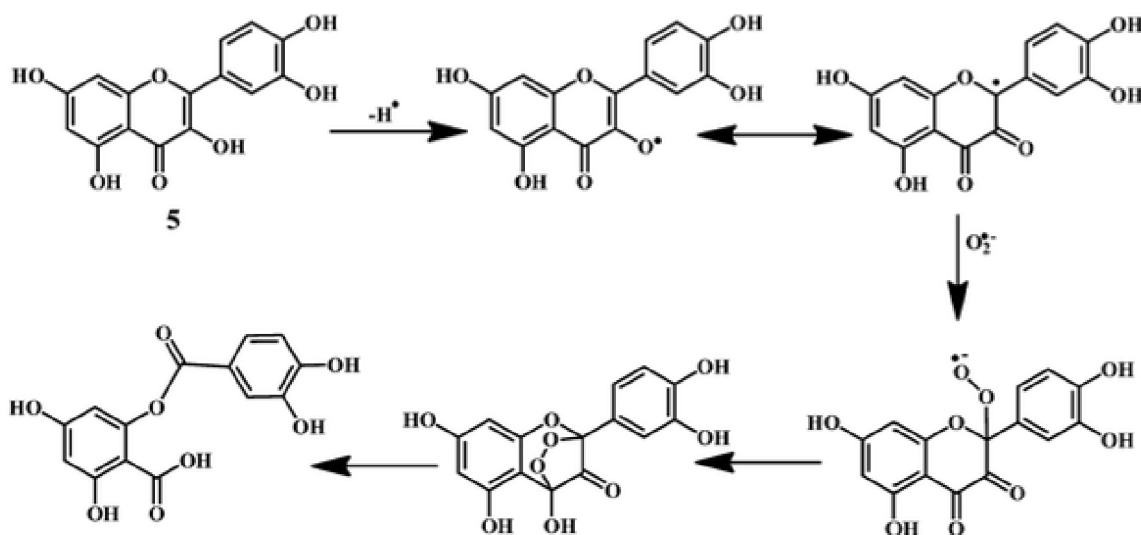
Polyfenoly se používají v mnoha odvětvích potravinářského průmyslu jako bezpečná přírodní barviva, konzervační látky, antioxidanty a přírodní aditiva. Kvůli svým vlastnostem jsou vysoce ceněné i pro kosmetický a farmaceutický průmysl. Hrají klíčovou roli v ochraně rostlin proti UV záření a různým chorobám, účastní se též procesu pigmentace. Tato skupina látek má kromě antioxidačních a protizánětlivých vlastností i silné antimikrobiální účinky, díky své schopnosti vytvářet komplexy s extracelulárními a rozpustnými proteiny mikrobiální buněčné stěny. Protože oxidativní stres může být vyvolán i působením UV záření, polyfenolické sloučeniny mohou výrazně přispívat i k ochraně pokožky před poškozením způsobeným ultrafialovým zářením. Polyfenoly vykazují i další fyziologické vlastnosti, včetně antiaterogenních, anti-trombotických, kardioprotektivních a vazodilatačních účinků [84, 98, 99].

Nevýhodou polyfenolických látek je jejich nízká stabilita, jsou vysoce citlivé na podmínky okolního prostředí. Vyznačují se také špatnou biologickou dostupností, především kvůli nízké rozpustnosti ve vodě. V neposlední řadě má mnoho z těchto sloučenin velmi vytrvalou hořkou chuť, což omezuje jejich použití v potravinách a orálních lécích. Aplikační forma hotového produktu tedy musí být schopná udržet strukturální integritu polyfenolů, maskovat jejich chuť, zvýšit jejich rozpustnost ve vodě a tím i jejich biologickou dostupnost a zabezpečit transport k fyziologickému cíli. Enkapsulace se jeví jako vhodný stabilizační prostředek pro zlepšení vlastností polyfenolů. Obalové materiály zahrnují polymery přírodního či syntetického původu a lipidy. Mikroenkapsulované produkty nacházejí široké

využití v potravinářském, kosmetickém i farmaceutickém průmyslu, v oblastech zemědělských produktů, veterinární medicíny, biotechnologie i biomedicínského průmyslu [100, 101, 102].

2.3.2.5 Mechanismus antioxidačního působení polyfenolů

Antioxidační vlastnosti fenolických sloučenin jsou umožněny jejich molekulární strukturou, konkrétně přítomností hydroxylových skupin a možností rezonančního efektu. Existují dva hlavní mechanismy antioxidačního působení polyfenolů. V prvním případě volný radikál odejme ze struktury polyfenolu jeden vodíkový atom a stává se nereaktivním. Zbytek molekuly antioxidantu, fenoxylový radikál, je díky vodíkovým vazbám, konjugaci a rezonančním efektům v molekule dostatečně stabilní a tudíž nedochází k dalším reakcím s jiným substrátem. Při druhém možném mechanismu dochází k přenosu jednoho elektronu z molekuly antioxidantu na radikál. Jako u předchozího případu, radikál se stává nereaktivním a molekula polyfenolu zůstává stabilní i jako radikálový kationt. Fenolické látky se navíc vyznačují i chelatační aktivitou. Jedná se o schopnost vytvářet komplexy s atomy kovů, zejména železa a mědi, a inhibovat tak tvorbu volných radikálů katalyzovanou přechodným kovem [103, 104, 105].



Obrázek 13: Mechanismus zhášecí aktivity flavonolu quercetinu proti superoxodiovému radikálu, podstata ochrany DNA [106]

2.4 Stanovení antioxidačního účinku

2.4.1 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidačního potenciálu potravin, rostlinných extraktů, komerčních antioxidantů atd. byla vyvinuta celá řada různých technik měření. Tyto metody lze dělit podle způsobu provedení na spektrofotometrické, elektrochemické a chromatografické [107].

2.4.1.1 Metoda využívající zhášení radikálu ABTS^{•+}

Metoda TEAC („Trolox Equivalent Antioxidant Capacity“) je založena na zhášení barevného radikálového kationtu ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)). V přítomnosti antioxidantů dochází k odbarvení modrozelené reakční směsi, přičemž intenzita je přímo úměrná celkové antioxidační aktivitě vzorku. Radikálový kationt ABTS^{•+} může být připraven působením

peroxodisíranu draselného či oxidu manganičitého. Jako standard se využívá ve vodě rozpustný analog vitamínu E Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylát). Výsledná antioxidační aktivita je vypočtena z kalibrační křivky a vyjádřena jako ekvivalent aktivity Troloxu [108].

2.4.1.2 Metoda využívající zhášení radikálu DPPH

Podobně jako metoda TEAC, spočívá i tato technika stanovení celkové antioxidační aktivity ve zhášení radikálu. DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) je stabilní volný radikál schopný přijmout do své struktury atom vodíku a vytvořit redukovanou formu DPPH-H za současného poklesu zbarvení sledovaného spektrofotometricky. Metody ABTS a DPPH jsou považovány za základní techniky pro posouzení antioxidačního potenciálu čistých látek i směsných surovin [107, 108].

2.4.1.3 Inhibice peroxidace lipidů – TBARS metoda

Peroxidace lipidů vyvolaná volnými radikály je destruktivní proces, při kterém dochází k poškození biomembrán a generaci reaktivních sekundárních metabolitů. Malondialdehyd je jedním z konečných produktů tohoto procesu a jako takový je považován za indikátor lipidové peroxidace. Malondialdehyd má schopnost reagovat s kyselinou 2-thiobarbiturovou za vzniku barevného komplexu s maximem absorbance při vlnové délce 535 nm. Úbytek množství vzniklého komplexu malondialdehydu a 2-thiobarbiturátu odpovídá antioxidační aktivitě vzorku [108, 109].

2.4.1.4 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie je často používanou metodou pro charakterizaci redoxních systémů. Elektrochemická detekce sleduje proud procházející mezi pracovní a srovnávací elektrodou, ze závislosti proudu na napětí se kvalitativně stanoví obsah analytu. Proud je produkován nízkomolekulárními antioxidanty v roztoku, jež jsou oxidovány na povrchu pracovní elektrody a jeho množství je přímo úměrné antioxidační kapacitě vzorku [110].

2.4.2 Stanovení specifických skupin antioxidantů

2.4.2.1 Stanovení individuálních fenolických látek

K analýze individuálních polyfenolů se nejčastěji využívá RP-HPLC s UV-VIS, PDA nebo MS detekcí [111]. Metody vysoce účinné kapalinové chromatografie jsou používány pro separaci, identifikaci i kvantifikaci fenolických sloučenin [93].

2.4.2.2 Stanovení celkových polyfenolů

Celkový obsah polyfenolů lze stanovit spektrofotometricky s využitím Folin-Ciocalteu činidla. Tento reagent, obsahující fosforečnan molybdenový a wolframový, reaguje v alkalickém prostředí s fenolickými látkami za vzniku modře zbarveného komplexu. Nevýhodou této metody je nižší specifita, jelikož FC činidlo může být redukováno i jinými, než fenolickými sloučeninami [112].

2.4.2.3 Stanovení celkových flavonoidů

Množství celkového obsahu flavonoidů lze stanovit rovněž spektrofotometricky, reakcí s chloridem hlinitým. Jako standart se používá katechin nebo kvercetin a obsah flavonoidů je pak vyjádřen v mg vztažených na ekvivalentní množství standardní sloučeniny [113].

2.4.2.4 Stanovení některých vitaminů

Vitamíny (askorbát, tokoferoly) lze obecně stanovit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na normální či reverzní fázi po extrakci vhodným typem rozpouštědla. Pro kvantifikaci vitamínu C se často využívá také titrační stanovení s využitím 2,6-dichlorindofenolu [107].

2.5 Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální látky zasahují do procesu syntézy buněčné stěny, inhibují syntézu bílkovin a nukleových kyselin, případně narušují správnou funkci buněčné membrány mikroorganismů. Podle mechanismu působení se jejich účinek dělí na bakteriostatický (inhibice růstu mikroorganismu) a baktericidní (usmrcení mikroorganismu) [114].

Pro hodnocení antimikrobiálního potenciálu sloučenin se nejčastěji užívá hodnota MIC, tzv. minimální inhibiční koncentrace. MIC je minimální koncentrace, která viditelně inhibuje růst mikroorganismu za daných podmínek testu a obvykle se vyjadřuje v $\mu\text{g/ml}$ nebo mg/l [115, 116].

2.5.1 Diluční metody

Diluční metody jsou nejvhodnějším nástrojem pro stanovení hodnot MIC, protože poskytují přesný odhad koncentrace testované látky v živném médiu. Podstatou dilučních metod je přidání přesně definovaného množství testované látky do tekutého kultivačního média a sledování růstu, respektive absence růstu daného mikroorganismu [117]. Pro *in vitro* kvantitativní měření antimikrobiální aktivity lze použít agarovou nebo bujonovou diluční metodu [118].

2.5.1.1 Bujonová diluční metoda

Bujonová diluční metoda je jednou z nezákladnějších metod pro testování citlivosti na antimikrobiální látky. Do řady zkumavek či do mikrotitrační destičky s kultivačním médiem obsahujícím koncentrační řadu antimikrobiální látky je očkováno inokulum testovaného kmene. Po promíchání jsou zkumavky nebo mikrotitrační destička inkubovány za vhodných podmínek v závislosti na testovaném mikroorganismu. Po uplynutí doby inkubace se jako MIC vyhodnotí nejnižší koncentrace testované látky, u které není patrný růst mikroorganismu. Signálem růstu mikroorganismu je vytvoření zákalu, který se měří turbidimetricky či spektrofotometricky [118, 119].

2.5.1.2 Agarová diluční metoda

Agarová diluční metoda zahrnuje inkorporaci různých koncentrací antimikrobiální látky přímo do agarového média s následnou inokulací testovaného mikroorganismu na povrch agarové plotny. MIC je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiálního činidla, která zcela inhibuje růst za daných kultivačních podmínek. Tato technika je vhodná především tehdy, pokud testovaná sloučenina svým zbarvením maskuje měřený nárůst mikroorganismu. Agarová diluční metoda je metodou referenční, je však poměrně pracná [118].

2.5.2 Difuzní metody

Výhodou difuzních metod je jejich jednoduchost a nízká cena, nevýhodou naopak nemožnost automatizace testování. Princip těchto metod spočívá v difuzi testované látky do pevného média, na jehož povrchu je naočkován mikroorganismus [119, 120].

2.5.2.1 Agarová disková difuzní metoda

Disková difuzní metoda je oficiální metoda používaná v mnoha klinických mikrobiologických laboratořích pro rutinní testování antimikrobiální citlivosti. Petriho misky s agarem se zaočkují standardizovaným inokulem testovaného mikroorganismu. Poté se na povrch agaru umístí papírové disky (asi 6 mm v průměru) napuštěné testovanou sloučeninou o požadované koncentraci. Petriho misky jsou následně inkubovány v odpovídajících podmínkách. Antimikrobiální činidlo difunduje do agaru a inhibuje růst testovaného mikroorganismu, míra působení je kvantifikována jako průměr inhibičních zón. Vzhledem k tomu, že inhibice růstu bakterií neznamená bakteriální smrt, nelze touto

metodou rozlišit baktericidní a bakteriostatický účinek testované látky. Navíc agarová disková difuzní metoda není vhodná pro stanovení minimální inhibiční koncentrace MIC, neboť není možné kvantifikovat množství antimikrobiálního činidla difundovaného do agaru. Nicméně, toto testování nabízí i mnoho výhod – jednoduchost, nízké náklady, možnost testování značného množství mikroorganismů a antimikrobiálních činidel a snadnost interpretace získaných výsledků. Uvedená pozitivita tohoto testu přispěla k jeho běžnému použití při antimikrobiálním screeningu rostlinných extraktů, esenciálních olejů a dalších látek [118, 119].

2.5.2.2 Agarová jamková difuzní metoda

Jamková difuzní metoda je rovněž široce využívána k vyhodnocení antimikrobiální aktivity rostlinných a mikrobiálních extraktů. Podobně jako u metody diskové difuze je celý povrch agarové plotny zaočkován inokulem mikroorganismu. Poté jsou v agaru asepticky vytvořeny jamky o průměru 6-8 mm pomocí sterilní špičky. Do vytvořených jamek se následně napipetuje objem (20-100 μ l) antimikrobiálního činidla v požadované koncentraci. Agarové plotny jsou inkubovány za vhodných podmínek v závislosti na testovaném mikroorganismu. Antimikrobiální látka difunduje v agarovém médiu a inhibuje růst testovaného mikrobiálního kmene [118, 120].

2.5.2.3 Gradientová metoda Etest

Metoda antimikrobiálního gradientu kombinuje princip dilučních a difuzních metod a umožňuje stanovení hodnoty MIC. Je založena na možnosti vytvoření koncentračního gradientu testovaného antimikrobiálního činidla. Testovací proužek napuštěný antimikrobiální látkou s rostoucím koncentračním gradientem je nanesen na povrch agaru předem zaočkovaného mikroorganismem. Po uplynutí inkubační doby je vytvořena elipsoidní zóna inhibice. Hodnota MIC je dána průsečíkem okraje proužku a hranicí růstu bakterií. Metoda Etest podává přesnější výsledky, na rozdíl od klasických difuzních metod je však poměrně drahá [118].

2.6 In vitro testy toxicity

Vývoj nových léčiv, kosmetických přípravků i potravinových doplňků je neoddelitelně spjat s testováním bezpečnosti pro lidské zdraví. Protože *in vivo* testování na zvířatech je časově i finančně nákladné a vyvolávají zde i etické problémy, pozornost se přesunuje na vývoj testů *in vitro*. *In vitro* testování bezpečnosti léčiv a kosmetiky je levnější, rychlejší a humánnější variantou. V případě použití lidských buněčných linií a tkání navíc odpadá nutnost druhové extrapolace získaných dat. Sledování toxicity *in vitro* vychází z testovacích modelů, které jsou relevantní pro ochranu cílového příjemce testované látky. Správný vývoj *in vitro* metod vyžaduje systémy, které adekvátně napodobují klíčové body *in vivo* mechanismů. V organismu je však buněčná funkce řízena nejen mikroprostředím obklopujícími buňkami, ale i interakcí s ostatními buňkami. I přes pochopení buněčných mechanismů *in vivo* a uzpůsobení toxikologických testů tomuto fenoménu, je nutné počítat s možnými falešně pozitivními/negativními výsledky *in vitro* testování [121, 122, 123].

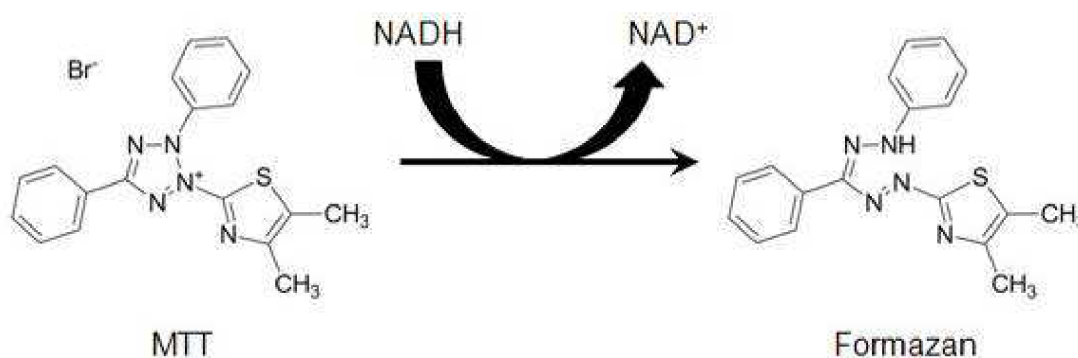
2.6.1 Testy viability a cytotoxicity

Při testování léčiv, kosmetických přípravků a potravinových doplňků je nejdůležitějším parametrem bezpečnosti cytotoxicita. Cytotoxicita je schopnost sloučeniny způsobit buněčnou smrt pomocí změn v buněčném chování a v buněčných procesech. *In vitro* testy cytotoxicity sledují viabilitu buněk vystavených testované látce. Vzhledem k tomu, že viabilita buněk je determinována mnoha různými buněčnými projevy, pro posouzení stavu buněk se používá hned několik různých parametrů. Jedná se o proliferaci buněk, integritu buněčné membrány, sledování mitochondriální aktivity a další. Většina

těchto metod je poměrně jednoduchá a umožňuje otestování velkého množství vzorků během krátké doby. Výsledky tohoto screeningu předchází dalším farmakologickým testům a společně s *in vivo* testy biologického účinku jsou důležitým prvkem ve vývoji nových léčiv a doplňků [118, 124, 125, 126].

2.6.1.1 Redukce tetrazoliových solí

Tetrazoliové soli obsahují ve své struktuře pozitivně nabitě tetrazolové jádro tvořené čtyřmi atomy dusíku a jsou hojně využívány ke stanovení metabolické aktivity buněk. K buňkám vystaveným testované látce je přidána rozpustná žlutá tetrazoliová sůl, např. MTT nebo MTS. Během 2-4hodinové inkubace při 37°C jsou viabilní buňky schopné přeměnit MTT/MTS na nerozpustný fialový formazanový produkt, který je následně rozpuštěn organickým rozpouštědlem (DMSO) a kvantifikován spektrofotometricky. Předpokládá se, že MTT je téměř výlučně redukováno intracelulárně mitochondriální sukcinátdehydrogenasou. Množství formazanu je přímo úměrné počtu metabolicky aktivních buněk v kultuře [127, 128].



Obrázek 14: Redukce fialové tetrazoliové soli na žlutý formazanový produkt [124]

2.6.1.2 Redukce resazurinu

Metabolická aktivita buněk může být sledována i pomocí redoxního indikátoru resazurinu. Formát testu je podobný jako u tetrazoliových solí, resazurin je však rozpustný ve fyziologických pufrách. Viabilní buňky s aktivním metabolismem dokáží zredukovat resazurin na fluoreskující resorufin, množství produkovaného resorufinu se pak kvantifikuje pomocí fluorimetru s 560 nm emisním a 590 nm excitačním filtrem. Metoda využívající redukce resazurinu je navíc citlivější než v provedení s tetrazoliovou solí. Komerčně dostupným produktem využívajícím tento mechanismus je Alamar Blue Assay [124, 129].

2.6.1.3 Měření množství ATP

Měření ATP pomocí luciferázy je nejčastěji užívanou metodou detekce viability u vysokokapacitního screeningu (HTS). ATP je akceptováno jako platný marker životaschopnosti buněk, protože viabilní buňky ho obsahují ve striktně regulovaném množství. Poškozené buňky nejenže ztrácí schopnost ATP syntetizovat, obsahují navíc endogenní ATPasy, které rychle vyčerpávají stávající ATP. Podstatou metody je kvantifikace ATP pomocí luciferasové reakce přímo úměrné počtu viabilních buněk. Pro uvolnění buněčného ATP je nezbytná lyze buněk. Komerční kity obsahují detergent pro lyzi buněk, inhibitory ATPasy pro stabilizaci uvolněného ATP, luciferin jako substrát a stabilní formu luciferasy jakožto katalyzátoru pro reakci, při níž dochází ke generování fotonů. ATP test je nejrychlejší a nejcitlivější z používaných testů viability buněk [124, 129].

2.6.1.4 Měření množství LDH

Laktátdehydrogenasa je cytosolický enzym, který slouží jako indikátor buněčné smrti, protože při poškození buněčné membrány dojde k jeho uvolnění do extracelulárního média. Pro kvantifikaci uvolněné LDH se využívá její schopnosti katalyzovat reverzibilní přeměnu pyruvátu na laktát za současné spotřeby NADH. Původní test byl navržen tak, aby měřil změnu absorbance při 340 nm, ke které dochází při oxidaci NADH na NAD⁺. Při vývoji komerčních kitů vzniklo mnoho dalších modifikací, včetně spřažení s reakcí s tetrazoliovou solí za vzniku formazanu, či kvantifikace barevného produktu reakce pyruvátu s 2,4-dinitrofenylhydrazinem v alkalickém prostředí [127].

2.6.1.5 Barvení lysozomů neutrální červeň

Neutrální červeň (3-amino-7-dimethylamino-2-methylfenazin hydrochlorid) je slabě kationtové barvivo, které pomocí pasivní difuze proniká přes buněčnou membránu a hromadí se v lysozomech, kde se váže na záporně nabitou lysozomální matrix. Princip metody je založen na faktu, že zatímco živé buňky hromadí barvivo ve svých lysozomech, mrtvé buňky nejsou schopné barvivo akumulovat. Výsledná intenzita obarvení buněčné populace měřitelná spektrofotometricky je přímo úměrná množství viabilních buněk [118, 130].

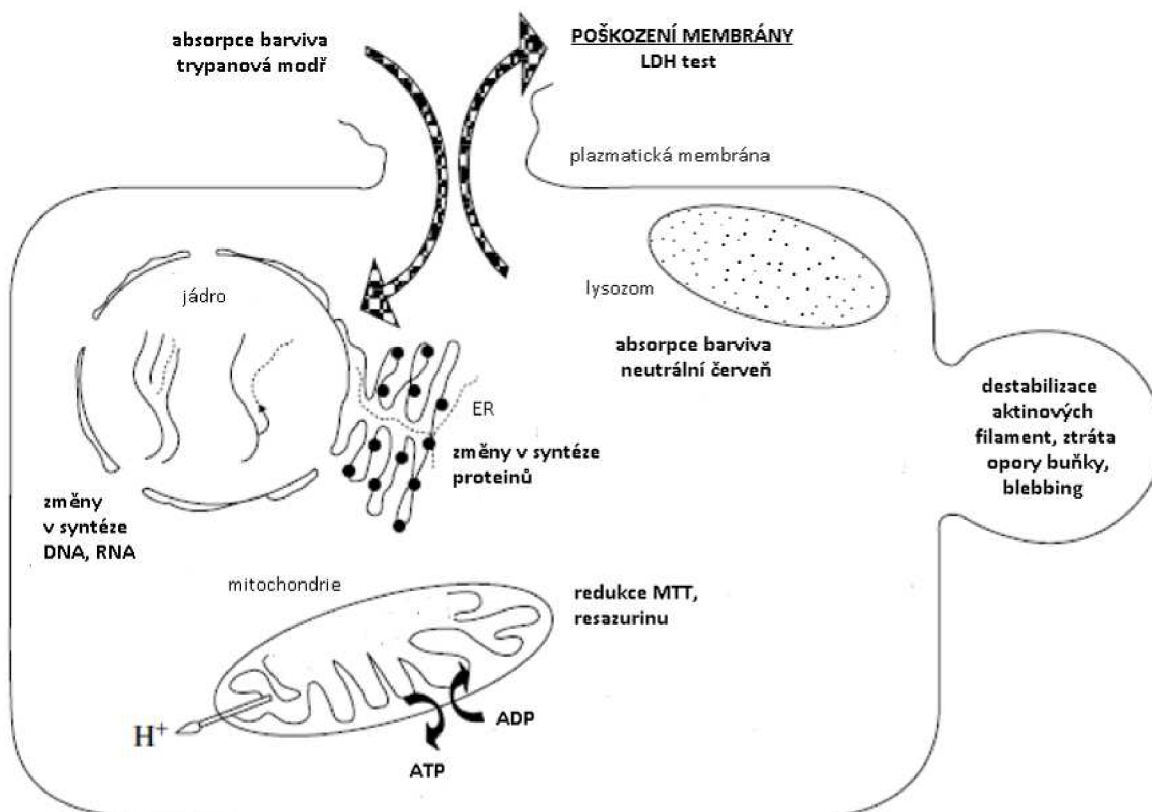
2.6.1.6 Barvení trypanovou modří

Barvení trypanovou modří je jednoduchá, rychlá a levná metoda pro stanovení viability buněk. Trypanová modř, patřící mezi diazo- barviva, není schopná proniknout do buněk s intaktní buněčnou membránou. Mrtvé buňky však kvůli ztrátě membránové selektivity absorbují trypanovou modř do cytoplazmy. Živé buňky tedy při kontaktu s roztokem modří zůstávají bezbarvé, zatímco mrtvé buňky získají tmavě modré zbarvení. K vyhodnocení testu se používá světleného mikroskopu [131, 132].

2.6.1.7 Kalcein-AM metoda

Kalcein-AM je derivát fluorescinu a patří mezi fluorescenční barviva používaná ke sledování viability buněk. Jedná se o vysoce lipofilní barvivo, které je po vstupu do buňky konvertováno intracelulárními esterasami na kalcein produkující intenzivní zelenou fluorescenci při 530nm. Kalcein-AM je zadržován pouze buňkami s intaktní plazmatickou membránou, intenzita fluorescence je tedy přímo úměrná množství viabilních buněk. Často využívaným komerčním kitem založeným na tomto principu je produkt LIVE/DEAD [133].

Počáteční screening studie bezpečnosti nových přípravků tradičně začíná posouzením viability buněk vystavených testované látce. Tyto testy se vyznačují snadností provedení i interpretace výsledků a relativně nízkou cenou. Na druhé straně neposkytují žádné informace o mechanismu případného toxického účinku. Pro získání těchto poznatků je nutné provedení mnoha dalších testů (Obr. 15). Jedná se především o sledování změn v genomu a v genové expresi. Změny v genové/proteinové expresi mohou být detekovány polymerázovou řetězovou reakcí PCR a s pomocí Western/Northern blotu. Produkce charakteristických zánětlivých markerů je mapována enzymatickou imunisorbentní analýzou ELISA. Pro posouzení změn ve vlastní genetické informaci se užívají tzv. genotoxické testy [118, 120, 127, 135].



Obrázek 15: Idealizovaný diagram buňky pro ilustraci parametrů sledovaných v testech cytotoxicity a viability, převzato a upraveno z [134]

2.6.2 Buněčné kultury pro *in vitro* testování toxicity

Využití buněčných kultur má v experimentální práci mnohé výhody, oproti jiným biologickým modelům. Pokus probíhá v kontrolovaném prostředí a na jediném, přesně charakterizovaném typu buněk. Výsledek tedy není ovlivněn interakcí s jinými tkáněmi a buněčnými populacemi. Manipulace s buněčnými kulturami je poměrně snadná, během krátké doby lze získat velké množství homogenního materiálu. Navíc je možné v průběhu experimentu používaný živý model zničit, což při manipulaci s jinými modely, např. pokusnými zvířaty, představuje etický problém [136, 137].

Provoz buněčné laboratoře má svá striktní pravidla, jimž podléhá veškerá práce s buněčnými kulturami. Buňky jsou kultivovány za definovaných podmínek vlhkosti, pH a teploty, ve specifickém růstovém médiu vhodném pro danou buněčnou linii. Pro *in vitro* testy toxicity je dostupná celá řada buněčných kultur, vhodný typ je vybírán s ohledem na tkáň cílového působení testované látky. Buněčná kultura se získává izolací z těla laboratorního zvířete nebo člověka. Postup zahrnuje mechanické rozvolnění tkáně a enzymatické natrávení extracelulární matrix kolagenasou, trypsinem apod. Výsledkem je směs buněk několika různých typů, jež lze od sebe oddělit pomocí centrifugace, různé buněčné typy se totiž liší svou specifickou hmotností. Buněčná kultura získaná izolací z tkáně se nazývá primokultura neboli primární buněčná kultura. Po dosažení konfluency se buňky pasážují, přenesou do nové kultivační nádoby a vzniká tak subkultura, sekundární kultura. Následným pěstováním a dalším pasážováním se získá dostatek homogenního materiálu pro provedení cytotoxických testů. Speciálním typem buněk jsou tzv. buněčné linie, kontinuální nebo také immortalizované kultury. Na rozdíl od normálních buněk se lépe množí, snáze kultivují a nepodléhají stárnutí. Kultury kontinuálních buněk lze izolovat z nádorové tkáně, někdy vznikají spontánní

transformací buněk. Imortalizovanou linií je možné získat i cílenou chemickou či virovou transformací buněčných kultur [136, 137].

Vlastnosti buněčných kultur se liší podle živočišného druhu, tkáně a také podle stáří buněčného zdroje (dospělý jedinec vs. embryo). Nejjednodušší možností získání buněčné kultury jsou zavedené sbírky, např. z ECACC (European Collection of Cell Cultures) a ATCC (American Type Cell Collection) [136, 137].

Pro *in vitro* testování toxicity se využívají tisíce buněčných kultur izolovaných z různých zdrojů. Každá buněčná kultura se vyznačuje specifickým stupněm složitosti a příbuznosti se související *in vivo* situací. Při výběru vhodné buněčné kultury je nutné zvážit mnoho faktorů, především zdrojovou tkáň, využití primokultur respektive imortalizovaných linií, dostupnost buněk, růstové charakteristiky, stabilitu buněk a mnohé další [136, 138].

2.6.2.1 Caco-2 linie

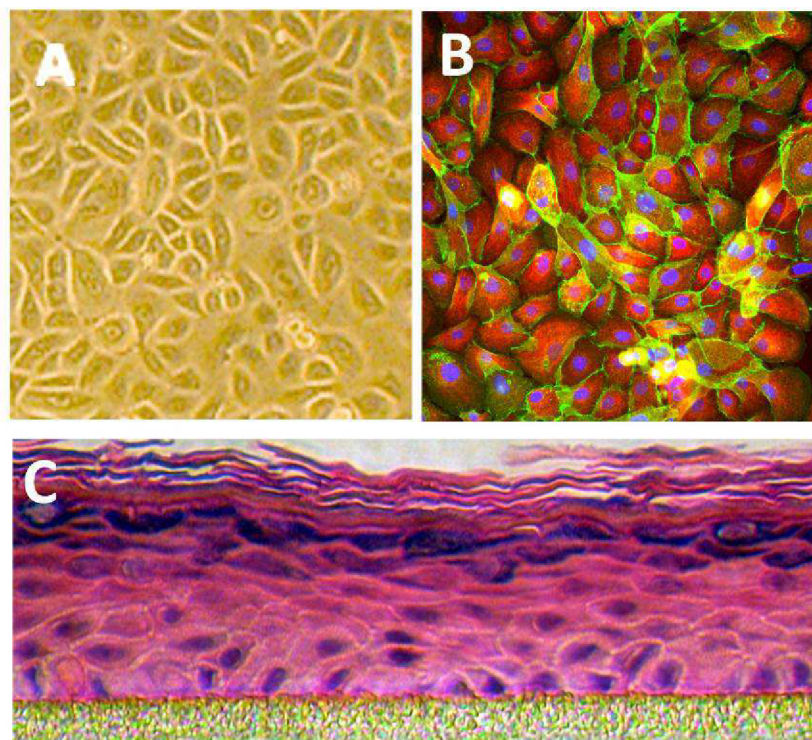
Buněčná linie Caco-2 je jednou z nejčastěji používaných buněčných kultur, zejména při testování toxicity potravin a léčiv. Jedná se o lidskou buněčnou linii izolovanou z karcinomu tlustého střeva. Caco-2 buňky poskytují obraz o bariérových vlastnostech střevní sliznice a jsou tudíž cenným nástrojem farmaceutického i potravinářského průmyslu pro získání informací o absorpci léků a potravních složek. Zároveň slouží jako model pro testování případných toxických metabolitů potravin [139, 140].

2.6.2.2 HT29 linie

Buňky lidského adenokarcinomu tenkého střeva HT29 jsou široce používány k posouzení potenciálního protinádorového účinku různých potravních komponent. Tato buněčná linie, ceněná pro svou podobnost s enterocyty tenkého střeva, slouží i k testování antioxidačních, imunomodulačních a antigenotoxických efektů potravin a léčiv. Ko-kultura HT29 s buňkami Caco-2 je častým modelem pro studium transportu léků a potravních složek přes epitel střevní sliznice [139, 141].

2.6.2.3 HEK – Keratinocyty

Lidské epidermální keratinocyty jsou vhodným modelem ke studiu epitelálních funkcí, kožní biologie a toxikologie. Keratinocyty představují 90% všech buněk v epidermis, nejsvrchnější vrstvě pokožky. První buňky, které přicházejí do styku se sloučeninami aplikovanými lokálně na kůži, jsou právě keratinocyty [142, 143].



Obrázek 16: Lidské epidermální keratinocyty: monovrstva (A), imunozaření – cytokeratin 18 červeně, e-kadherin zeleně, jádra vizualizované DAPI modře (B), 3D model kůže (C) [143]

2.6.2.4 HaCaT linie

HaCaT buňky jsou imortalizovanou linií lidských keratinocytů. Ačkoliv normální keratinocyty jsou primární volbou pro studium mechanismu epidermální odpovědi na xenobiotika, využití alternativní linie HaCaT může představovat mnoho výhod, a to především ve snadnější kultivaci a pomalejším stárnutí buněk. HaCaT buňky jsou spontánně imortalizovanou linií keratinocytů široce využívanou pro testování kožní senzitivity a cytotoxicity [144, 145].

2.6.3 Stanovení genotoxicity

Testování genetické toxicity se rutinně provádí pro identifikaci potenciálních genetických karcinogenů a mutagenů zárodečných buněk. Klasifikace látky z hlediska genotoxicity je obecně založena na kombinaci několika testů pro posouzení typu účinku genetického poškození. Podle úrovně, na níž látka působí, lze genetické poškození spojené s onemocněním rozdělit na genové mutace (bodové mutace, které ovlivňují jednotlivé geny), klastogenní účinky (strukturální změny chromozomů) a aneuploidii (numerické aberace chromozomů). Podle světové zdravotnické organizace WHO je termín „mutace“ chápán jako trvalá změna ve struktuře a/nebo množství genetického materiálu organismu, která může vést k dědičným změnám a zahrnuje genové mutace i strukturální a numerické aberace chromozomů. Genotoxicita je schopnost látek poškozovat DNA nebo buněčné složky regulující funkci genomu (DNA opravné systémy, DNA polymerázy apod.) a zahrnuje všechny nepříznivé účinky na genetickou informaci. Tyto potenciálně škodlivé účinky nemusí nutně souviset s mutagenitou. Genotoxicita je tedy širší termín než mutagenita, která se týká přímo schopnosti vyvolat mutace [146, 147, 148].

Vzhledem k širokému rozsahu genetického poškození, ke kterému může dojít, je testování navrženo tak, aby obsáhlo různé mechanismy mutagenity. Standardní procedura pro schválení farmaceutických a chemických sloučenin zahrnuje testování bodových mutací, aneuploidie i fragmentace chromozomů. V současnosti tato série testů využívá *in vitro* test genové mutace na bakteriích (Amesův test, SOS Chromotest), test na genové mutace *in vitro* na savčích buněčných kulturách (např. TK test myšího lymfomu), a *in vitro* test na savčí chromozomové aberace (numerické nebo strukturální). Všechny uvedené testy jsou krátkodobé a screeningové. Většina krátkodobých testů na bakteriích a savčích buněčných kulturách byla navržena především pro prvotní identifikaci nebezpečnosti, a proto může představovat pouze výchozí bod v procesu hodnocení rizik. To, zda pozorované účinky jsou pro člověka relevantní za předpokládaných podmínek expozice, závisí na farmakokinetických, farmakodynamických a dalších faktorech, které vyžadují vyšetření *in vivo* [146, 147, 148].

2.6.3.1 Amesův test

Amesův test je metoda založená na detekci reverzní bodové mutace u modifikovaného kmene *Salmonella typhimurium*. U tohoto kmene došlo k mutaci, která mikroorganismu zabraňuje syntetizovat aminokyselinu histidin, a proto při jeho nedostatku v kultivačním médiu kmen nemůže růst a vytvářet kolonie. Mutantní kmen jsou v průběhu testování kultivován s potenciálně genotoxickou látkou. Pokud dojde ke zpětné mutaci vlivem testované látky, funkce genu pro syntézu histidinu se obnoví a buňky bakterií jsou tak schopné růst i v médiu neobsahujícím histidin [149, 150].

Amesův test byl původně navržen v klasickém uspořádání na kultivačních agarových miskách a později modifikován i pro provedení na mikrotitračních destičkách. Jedná se o široce využívanou metodu pro průvodní screening mutagenního potenciálu nových chemikálií a léčiv [149, 150].

2.6.3.2 SOS Chromotest

SOS Chromotest je kolorimetrická metoda, která měří expresi genů indukovanou toxickými činidly u speciálně upraveného kmene *E. coli*. Test byl navržen jako rychlejší a levnější alternativa tradičního Amesova testu, jehož součástí je kultivace bakterií rodu *Salmonella* na agarových plotnách. SOS Chromotest se provádí na 96-jamkových destičkách a výsledků bývá dosaženo již po několika hodinách. Jeho citlivost je na stejné úrovni jako u Amesova testu a je proto užitečným nástrojem pro základní screening potenciálně genotoxických sloučenin [151, 152].

Systém SOS hraje ústřední roli při odezvě *E.coli* na genotoxické sloučeniny; reaguje na širokou škálu chemických látek. Právě spouštění tohoto systému je využíváno jako časný signál poškození DNA. V SOS odpovědi hrají klíčovou roli dva geny: *lexA* kóduje represor pro všechny geny v systému a *recA* kóduje protein schopný štěpit *lexA* represor při aktivaci SOS indukčním signálem způsobeným přítomností genotoxické sloučeniny. K monitorování spouštění SOS systému se u tohoto testu využívá fúze SOS genu *sfIA* s *lacZ*, strukturálním genem *E.coli* pro beta-galaktosidasu. Jako kontrola je zároveň sledována syntéza alkalické fosfatasy, jejíž pokles aktivity značí inhibici buněk [152].

Podstatou SOS Chromotestu je inkubace *E.coli* s koncentrační řadou testované látky. Po uplynutí reakční doby je testována aktivita syntetizované beta-galaktosidasy pomocí jednoduchého kolorimetrického testu. Produkovaný enzym štěpí chromogenní substrát a dochází ke změně zbarvení roztoku. Výstup testu je jak kvalitativní (viditelný barevný gradient) pro účely screeningu, tak i kvantitativní. V kvalitativním měření je vynesena závislost odpovědi (barevná produkce spojená s produkcí beta-galaktosidasy) na dávce toxické sloučeniny. Výstupem testu je univerzální parametr SOSIF, tzv. indukční síla, která odráží schopnost sloučeniny indukovat SOS odezvu [151, 152, 153].

2.6.3.3 Kometový test

Kometový test je mikroelektroforetická metoda stanovení poškození DNA. Tato technika, publikovaná v osmdesátých letech minulého století, patří mezi tzv. „single cell“ metody. Podstatou testování je elektroforéza izolovaných buněk a rozdílná migrace poškozené vs. nepoškozené DNA vlivem elektrického pole. Zatímco molekulová hmotnost nepoškozené DNA je velmi vysoká a molekula tak drží svůj sférický tvar, při poškození DNA vlivem toxické sloučeniny dochází ke vzniku menších fragmentů, jež při elektroforéze vytvoří obraz podobný kometě. Pro vizualizaci a vyhodnocení kometového testu se využívají fluorescenční barviva a specializované software [154, 155].

Kometová analýza je široce využívanou technikou při hodnocení toxicity nových farmaceutik i kosmetiky, patří mezi techniky akceptované EFSA a je vhodná i pro posouzení toxicity nanomateriálů [154, 155].

3 CÍLE PRÁCE

Zaměřením disertační práce je využití vybraných přírodních biopolymerů zejména na bázi polysacharidů, případně PHA, k přípravě kombinovaných preparátů obsahujících přírodní aktivní složky ve formě nanočástic nebo nanovláken. Hlavním zaměřením práce je příprava preparátů pro využití v kosmetice a v potravinářství včetně testování genotoxických, cytotoxických a dalších biologických účinků jak materiálů, tak částic a vláken s aktivní složkou (v souladu s aktuální legislativou doporučenou EFSA).

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- screening a výběr vhodných přírodních biopolymerů živočišného, rostlinného a mikrobiálního původu, jejich charakterizace
- příprava moderních typů aplikačních forem (mikro- a nanočástice a vlákna) z biomateriálů na bázi jednoho či více typů přírodních polymerů
- optimalizace metod charakterizace mikro-a nanočástic a vláken na bázi přírodních polymerů
- příprava funkcionalizovaných částic a nanovláken, testování fyzikálně-chemických vlastností funkcionalizovaných materiálů
- zavedení postupů kultivace buněčných kultur a testů cytotoxicity, optimalizace testů genotoxicity
- testování genotoxických, cytotoxických a dalších biologických účinků materiálů i aplikačních forem
- stabilita a biodegradabilita polymerů a aplikačních forem v modelových fyziologických podmínkách

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a chemikálie

4.1.1 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (Německo)
Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Německo)
Mikrocentrifuga Mikro 120, Hettich Zentrifugen (Německo)
Vakuová odparka IKA Werke, RV06-ML (Německo)
Vortex TK3S, TecnoKartell (Německo)
Ultrazvukový homogenizátor/dispergátor Bandelin Sonpuls HS3200, SonorexTechnik (Německo)
Spektrofotometr S-220, Boeco (Německo)
Nanophotometer IMPLEN UV-VIS (Německo)
Zetasizer Nano ZS, Malvern (Spojené království)
Elektrospinningová soustava Fakulty chemické VUT v Brně (Česká republika) - prototyp
Transmisní elektronový mikroskop FEI Tecnai F20 s 4k CCD kamerou, Thermo Fischer (USA)
Rastrovací elektronový mikroskop JEOL JSM-7600F (USA)
HPLC/PDA sestava sestava HPLC Thermo Finnigan Thermo Fischer Scientific (USA)
termostat LCO 101 Column Oven ECOM (Česká republika)
pumpa MS Pump Plus Finnigan SURVEYOR (USA)
detektor PDA Plus Detector Finnigan SURVEYOR (USA)
předkolona C18 AJO Phenomenex
kolona Kinetex C18, 5 mm, 4,6 x 150 mm
vyhodnocovací systém Xcalibur (USA)
Laminární box Aura mini, BioAir Instruments (USA)
Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom (Česká republika)
Optický mikroskop Intraco Micro LM 666 PV/LED (Česká republika)
Software Dino-Capture 2.0 (Česká republika)
Biohazard box, Airstream II, ESCO (Německo)
Univerzální chlazená centrifuga Hermle (Německo)
CellCulture CO₂ inkubátor, ESCO (Německo)
ELISA reader EL800, BioTek (USA)
Software Gen 5, BioTek (USA)
Inverzní biologický mikroskop i-101 LW Scientific (USA)
Kamera BioVID 1080P/2M, LW Scientific (USA)
Software Toupview, ToupTek Photonics (Čína)

4.1.2 Použité chemikálie

4.1.2.1 Chemikálie použité k izolaci a charakterizaci vzorků a přípravě částic

2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) ABTS, Sigma Aldrich (Německo)
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-dikarboxylová kyselina Trolox, Sigma Aldrich (Německo)
Acetonitril pro HPLC, Gradient Grade, Sigma Aldrich (Německo)
Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (Česká republika)
Hovězí sérový albumin, Serva (Německo)
Chitosan, Vitrum-Lachner (Česká republika)
Cholesterol, Sigma Aldrich (Německo)

Katechin, Sigma Aldrich (Německo)
Kofein, Sigma Aldrich (Německo)
Kyselina gallová, Sigma Aldrich (Německo)
Lysozym z vaječného bílku, Serva (Německo)
Lecithin ze sojových bobů, Sigma Aldrich (Německo)
Methanol pro HPLC, VWR Chemicals BDH PROLABO (USA)
Morin, Sigma-Aldrich (Německo)
Peroxidisíran draselný, Sigma Aldrich (Německo)
PHB Lot 720, Biomer, Fakulta chemická (Česká republika)
Rutin, Sigma Aldrich (Německo)
Triethanolamin, Sigma Aldrich (Německo)
Tripolyfosfát sodný, Sigma Aldrich (Německo)

4.1.2.2 Chemikálie použité ke kultivaci a testům toxicity

Agar powder, Himedia (Indie)
NB médium, Himeida (Indie)
Pepton, Himedia (Indie)
Kvasničný extrakt, Sigma Aldrich (Německo)
KGM-Gold Keratinocytes Cell Basal Medium, Lonza (USA)
DMEM high glucose, no pyruvate, Lonza (USA)
Trypsine-Versene EDTA, P-Lab (Česká republika)
Accutase, Biosera (USA)
Fetální bovinní sérum HyClone (USA)
Antibiotic-antimycotic 100X, Biosera (Německo)
MTT Duchefa Biochemie (Nizozemí)
Alamar Blue Cell Viability Reagent, ThermoFischer Scientific (USA)
Pyruvát sodný, WVR (USA)
NADH, WVR (USA)
2,4-dinitrofenylhydrazin, Sigma-Aldrich (Německo)
Komerční kit EBPI SOS Chromotest (Kanada)
Komerční kit BioPlex Pro Human Cytokine Immunoassay BioRad (USA)

4.2 Materiál

4.2.1 Zdroje aktivních složek preparátů

4.2.1.1 Čaje

Zelený čaj Gunpowder Formosa (Oxalis, z.p. Tchajwan), černý čaj Gunpowder Black (Oxalis, z.p. Tchajwan), bílý čaj Pai Mu Tan Bílá pivoňka (Oxalis, z.p. Čína), Lapacho (Oxalis, z.p. Brazílie), medový keř Honeybush (Oxalis, z.p. JAR), Rooibos červený (Oxalis, z.p. JAR), Rooibos zelený (Oxalis, z.p. JAR), guarana (Exotic Herbs, Asie), matcha (Čajová květina, s.r.o., z.p. Japonsko)

4.2.1.2 Kůry

Březová kůra řezaná (Yzop LTD, ČR), dubová kůra (Rosa Canina ČR), vrbová kůra (Rosa Canina, ČR)

4.2.1.3 Byliny

Kopřiva dvoudomá, rakytník řešetlákový, heřmánek pravý, jitrocel kopinatý, levandule lékařská, černý bez květ, rozmarýn lékařský, mateřídouška obecná, echinacea (třapatka nachová), šalvěj lékařská, kozinec blanitý, lichořeřišnice větší, oregano, citronová tráva, fenykl obecný, jetel luční, řebříček obecný. Všechny vzorky byly zakoupeny v prodejně Léčivé rostliny Brno.

4.2.1.4 Koření

Hřebíček, skořice, česnek sušený, muškátový oříšek, badyán, pepř černý, pomerančová kůra, sušená mletá kurkuma, sušený mletý zázvor. Všechny vzorky byly zakoupeny v běžných obchodech.

4.2.1.5 Ovocné/zeleninové vzorky

V práci byly použity vzorky mrkve a směsi lesních plodů (maliny, borůvky, jahody, mražené) běžně dostupné v obchodech. Vzorek okurky hořké byl přivezen z Asie.

4.3 Použité mikroorganismy

Pro testování antimikrobiálních účinků byly v této práci využity dva bakteriální kmeny – *Micrococcus luteus* CCM 1569 a *Serratia marcescens* CC 8587 a jeden kvasinkový kmen – *Candida glabrata* CCM 8270. Všechny kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů v Brně.

4.4 Použité buněčné kultury

Pro testování cytotoxického účinku připravených preparátů byly využity 2 buněčné kultury. Lidské epidermální keratinocyty HEK (102-05a) byly získány ze sbírky Public Health England, Londýn, Spojené Království. Linie imortalizovaných keratinocytů HaCaT byla získána z CLS Cell Line Services GmbH, Eppelheim, Německo.

4.5 Příprava vzorků pro enkapsulaci a charakterizaci

4.5.1 Příprava vodných a alkoholových extraktů

Pro přípravu extraktů z čajů, kůr, bylin a koření bylo navážené množství vzorku zalito 15 ml vybraného rozpouštědla a louhováno po dobu 15 minut. Navážka vzorku činila vždy 1 g. Jako rozpouštědla byla zvolena voda, methanol, ethanol a dimethylsulfoxid. Připravený extrakt byl následně přefiltrován přes gázu.

4.5.2 Příprava ovocných/zeleninových šťáv a extraktů

Extrakty z ovocných a zeleninových vzorků byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 4.5.1, šťávy byly získány pomocí odšťavňovače. Kvůli vysoké viskozitě byly připravené šťávy odstředěny v plastových centrifugačních zkumavkách po dobu 5 minut při 7 500 otáčkách/min.

4.5.3 Izolace lipidických extraktů metodou dle Folche

Lipidické extrakty byly z vybraných vzorků bylin a koření izolovány Folchovou metodou. Odvážených 10 gramů vzorku bylo po homogenizaci smícháno s 200 ml extrakční směsí (chloroform : methanol v poměru 2 : 1). Po 60 minutách extrakce při laboratorní teplotě byl vzorek přefiltrován přes skládaný filtr a poté smíchán s dalšími 100 ml extrakční směsí. Po 30 minutách byly extrakty z obou kroků smíchány a bylo přidáno 36 ml destilované vody. Po protřepání a odpipetování horní vodné fáze byla spodní fáze překapána přes bezvodý síran sodný do baňky s kulatým dnem. Získaný extrakt byl odpařen s pomocí vakuové rotační odparky při teplotě 40 °C a vyextrahované

lipidy byly rozpuštěny v 1 ml chloroformu. V této podobě byly vzorky uchovávány při -4 °C, pro stanovení základních charakteristik a přípravu částic byl chloroform odpařen v digestoři [156].

4.6 Stanovení základních charakteristik vzorků

4.6.1 Stanovení celkových polyfenolů

Celkové polyfenoly byly stanoveny s využitím Folin-Ciocalteuova činidla, princip stanovení je uveden v kapitole 2.4.2.2. Do zkumavek bylo napipetováno 1 ml destilované vody, 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla zředěného 1 : 10 a 50 µl extraktu vzorku. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu a po 5 minutách bylo připipetováno 1 ml nasyceného roztoku uhlíčitanu sodného. Zkumavky byly opět krátce vortexovány a po uplynutí 15 minut byla proměřena absorbance při 750 nm [157].

Pro sestavení kalibrační řady byl použit standardní roztok kyseliny gallové o koncentracích 0,1 – 0,7 mg/ml. Koncentrace celkových polyfenolů v extraktu byla vypočtena ze získané kalibrační rovnice (4.1). Výsledné množství polyfenolů obsažených ve vzorku bylo přepočteno na navážku daného vzorku a výsledky jsou uváděny v mg na gram původního materiálu.

$$A = 1,2921 \cdot c \text{ [mg/ml]} \quad (4.1)$$

4.6.2 Stanovení celkových flavonoidů

Množství celkových flavonoidů bylo stanoveno reakcí s chloridem hlinitým, který tvoří stabilní barevné komplexy s C₄ ketoskupinou a s C₃ nebo C₅ hydroxylovou skupinou na základní struktuře molekuly flavonoidů. Do zkumavek bylo napipetováno 1,5 ml destilované vody, 0,2 ml 5% dusitanu sodného a 0,5 ml extraktu vzorku. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu a po 5 minutách bylo přidáno 0,2 ml 10% chloridu hlinitého. Po krátkém promíchání a uplynutí 5 minut bylo do zkumavek připipetováno 1,5 ml 5% hydroxidu sodného a 1 ml vody. Zkumavky byly vortexovány a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm [158].

Pro sestavení kalibrační řady byl připraven standardní roztok katechinu v koncentračním rozmezí 0,05 – 0,3 mg/ml. Koncentrace flavonoidů v extraktu byla vypočtena ze získané závislosti absorbance na koncentraci (4.2). Výsledné množství flavonoidů obsažených ve vzorku bylo přepočteno na navážku daného vzorku a výsledky jsou uváděny v mg na gram původního materiálu.

$$A = 2,5902 \cdot c \text{ [mg/ml]} \quad (4.2)$$

4.6.3 Stanovení jednotlivých flavonoidů metodou HPLC

Pro stanovení vybraných individuálních flavonoidů byla použita metoda RP-HPLC s PDA detekcí. Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.1 a po vhodném zředění nastříkány na kolonu pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 µl. Analýza probíhala na koloně Kinetex C18 při teplotě 30 °C a průtoku 750 µl/min. Jako mobilní fáze byla použita směs okyselená voda : acetonitril : methanol (50 : 30 : 20), eluce byla izokratická. Detekce byla provedena spektrofotometricky s využitím PDA detektoru při 370 nm. Pro stanovení individuálních flavonoidů byly použity standardní roztoky morinu a rutinu v methanolu. Získaná data byla analyzována pomocí softwaru Xcalibur. Výsledné koncentrace jednotlivých flavonoidů byly vypočteny z externích kalibračních závislostí standardů [159].

4.6.4 Stanovení kofeinu, theofylinu a theobrominu metodou HPLC

Ke stanovení množství kofeinu, theofylinu a theobrominu ve vybraných vzorcích byla využita metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie s reverzní fází. Vzorky byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 4.5.1 a před nástřikem 10x zředěny. Separace probíhala na koloně Kinetex C18 s reverzní fází při teplotě 30 °C a průtoku 600 µl/min. Mobilní fází byla směs vody a acetonitrilu (80 : 20), eluce byla izokratická. Detekce probíhala na PDA detektoru při vlnové délce 270 nm. Pro výpočet koncentrace kofeinu, theofylinu a theobrominu ve vzorcích byla sestavena a proměřena externí kalibrační křivka standardních roztoků kofeinu o různých koncentracích. K vyhodnocení byl použit systém Xcalibur [160].

4.6.5 Stanovení obsahu tříslovin

Třísloviny, neboli taniny, jsou fenolické sloučeniny o velké molekulové hmotnosti schopné vytvářet komplexy s proteiny. Pro stanovení tříslovin byla využita metoda proteinové precipitace. Po přidavku hovězího sérového albuminu k extraktu vzorku dochází k vytvoření sraženiny z proteinů s hydrolyzovatelnými a kondenzovanými tříslovinami. Precipitát je následně rozpuštěn detergentem a stanoven spektrofotometricky jako barevný komplex s chloridem železitým při 510 nm [161].

Hovězí sérový albumin byl rozpuštěn v pufru (0,2 M ledová kyselina octová a 0,17 M chlorid sodný, pH = 4,9) na konečnou koncentraci 1 mg/ml. Pro stanovení tříslovin byly u vybraných vzorků připraveny extrakty do 50% methanolu metodou popsanou v kapitole 4.5.1. Do plastových centrifugačních zkumavek bylo napipetováno 2 ml roztoku albuminu a 1 ml extraktu vzorku. Zkumavky byly ponechány po dobu 24 hodin v ledničce při teplotě 4 °C. Po uplynutí této doby byly zkumavky zcentrifugovány při 3000 g po dobu 15 minut. Supernatant byl odpipetován a peleta následně rozsuspendována ve 4 ml směsi SDS/TEA. Roztok SDS/TEA byl připraven rozpuštěním 50 ml triethanolaminu v 1 litru 10% roztoku dodecylsulfátu sodného. Po rozpuštění pelety byl ke vzorku přidán 1 ml 0,01 M roztoku chloridu železitého v 0,01 molární kyselině chlorovodíkové. Zkumavky byly promíchány na vortexu a po 15 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla proměřena absorbance při 510 nm. Jako blank sloužil roztok chloridu železitého v SDS/TEA. Koncentrace tříslovin v extraktu byla vypočtena ze získané závislosti absorbance na koncentraci (4.3). Výsledné množství tříslovin obsažených ve vzorku bylo přepočteno na navážku daného vzorku a výsledky jsou uváděny v mg na gram původního materiálu.

$$A = 0,5247 \cdot c \text{ [mg/ml]} \quad (4.3)$$

4.6.6 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Pro stanovení antioxidační aktivity byla v této práci použita metoda využívající zhášení radikálového kationtu ABTS^{•+} [162]. ABTS bylo rozpuštěno v destilované vodě na koncentraci 7 mM. Radikálový kation ABTS^{•+} o konečné koncentraci 2,45 mM byl získán reakcí s peroxodisíranem draselným. Roztok byl před měřením ponechán při laboratorní teplotě ve tmě po dobu nejméně 12 hodin. Pro stanovení antioxidační aktivity byl roztok ABTS^{•+} zředěn UV-VIS ethanolem na absorbanci 0,700 ± 0,02 při vlnové délce 734 nm.

Do zúžené kyvety bylo napipetováno 1 ml roztoku radikálu a 10 µl extraktu vzorku. Po deseti minutách inkubace byl zaznamenán pokles absorbance (A₁). Jako výchozí hodnota sloužilo proměření absorbance 1 ml roztoku ABTS^{•+} a 10 µl destilované vody (A₀). Rozdíl těchto hodnot ΔA (A₀ – A₁) byl dosazen do kalibrační rovnice sestavené s využitím standardního roztoku Troloxu. Standart byl připraven rozpuštěním troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) v 60% ethanolu na koncentrační rozmezí 50 – 400 µg/ml. Hodnota antioxidační aktivity extraktu byla

vypočtena z kalibrační rovnice (4.4), přepočtena na navážku materiálu a vyjádřena jako hodnota TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Výsledná antioxidační aktivita vzorku je ekvivalentní aktivitě vypočteného množství Troloxu.

$$A = 0,7415 \cdot c \text{ [mg/ml]} \quad (4.4)$$

4.7 Příprava částic

4.7.1 Příprava chitosanových částic

Chitosanové částice byly připraveny s využitím ultrasonikace. Do 10 ml extraktu vzorku bylo přidáno 30 mg chitosanu a 0,1 ml koncentrované kyseliny octové. Směs byla sonikována a po malých dávkách byly přikapávány 3 ml 0,5% roztoku tripolyfosfátu sodného [163].

4.7.2 Příprava liposomů

Liposomové částice byly připravovány z lecithinu a cholesterolu v poměru 9 : 1 (lectihin : cholesterol) pomocí ultrazvukového homogenizátoru. K 10 ml vody či extraktu vzorku bylo přidáno 90 mg lecithinu a 10 mg cholesterolu. Směs byla ultrazvukována po dobu 1 minuty při frekvenci 20 kHz s využitím chladicí lázně do vzniku liposomové suspenze [25].

4.7.3 Příprava kombinovaných liposomů s PHB

V 1 ml chloroformu bylo rozpuštěno 70 mg lecithinu, 20 mg poly-3-hydroxybutyrátu a 10 mg cholesterolu. Roztok byl smísen s 10 ml destilované vody a ultrazvukován za podmínek uvedených v 4.7.2. Z vytvořené liposomové suspenze byl nakonec na magnetické míchačce při 50 °C odpařen chloroform.

4.8 Analýza částic

4.8.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Pro určení enkapsulační účinnosti bylo využito stanovení neenkapsulovaných polyfenolů metodou uvedenou v kapitole 4.6.1. Enkapsulační účinnost byla vypočtena z hodnot množství polyfenolů získaných proměřením v extraktu před enkapsulací a v supernatantu po enkapsulaci.

$$EU[\%] = \frac{\text{množství polyfenolů v extraktu} - \text{množství polyfenolů v supernatantu}}{\text{množství polyfenolů v extraktu}} \times 100 \quad (4.5)$$

4.8.1.1 Stanovení enkapsulační účinnosti chitosanových částic

Do zkumavky typu Eppendorf byl napipetován 1 ml připravených chitosanových částic a centrifugován po dobu 5 minut při 14 000 ot/min. Po centrifugaci bylo odpipetováno 50 μ l supernatantu a použito ke stanovení enkapsulační účinnosti.

4.8.1.2 Stanovení enkapsulační účinnosti liposomových a PHB-liposomových částic

Liposomová suspenze byla centrifugována po dobu 5 minut při 6 000 ot/min. Supernatant byl odpipetován a znovu stočen při 11 000 ot/min po dobu 60 minut. Po druhé centrifugaci byl supernatant odpipetován a částice byly rozsuspendovány ve stejném množství sterilní vody. 50 μ l supernatantu bylo použito ke stanovení enkapsulační účinnosti [164].

4.8.2 Stanovení velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla

Distribuce velikostí částic u připravených suspenzí byla zjišťována s využitím dynamického rozptylu světla. Princip měření je uveden v kapitole 2.1.4.2. Vzorky byly vhodně naředěny destilovanou vodou a analyzovány s pomocí přístroje ZetaSizer Nano za laboratorních podmínek.

4.8.3 Stanovení elektrokinetické stability částic pomocí zeta potenciálu

Stabilita připravených koloidních systémů byla zjišťována jako hodnota zeta potenciálu pomocí přístroje ZetaSizer Nano. Princip tohoto stanovení je uveden v kapitole 2.1.4.1. Částicové suspenze byly vhodně naředěny a analyzovány za laboratorních podmínek.

4.8.4 Stanovení stability částic

4.8.4.1 Stanovení stability částic v modelových potravinách

Pro stanovení stability částic při styku s potravinami bylo využito tzv. simulantů potravin neboli modelových potravin. Modelové potraviny a jejich složení dle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 38/2001 Sb., o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmů, je uvedeno v tabulce 1. Pro stanovení stability částic v tukových potravinách byl zvolen model olej : voda v poměru 1 : 4.

Tabulka 2: Použité typy modelových potravin, převzato a upraveno z [165]

Druh potraviny	Modelová potravina	Zkratka
Vodné potraviny (tj. vodné potraviny mající pH > 4,5)	Destilovaná voda	MP 1
Kyselé potraviny (tj. vodné potraviny mající pH ≤ 4,5)	Kyselina octová 3 %	MP 2
Alkoholické potraviny	Ethanol 10%	MP 3
Tukové potraviny	Olivový olej 20 %	MP 4

Vzorek částicové suspenze upravený metodou uvedenou v kapitole 4.8.1.2 byl smíchán s modelovou potravinou v poměru 1 : 3 (částice : modelová potravina). Částice byly s modelovými potravinami uchovávány při 4 °C po dobu 2 měsíců a v pravidelných intervalech byla spektrofotometricky sledována jejich stabilita v daném prostředí jako množství uvolněných polyfenolů (kap.4.6.1).

4.8.5 Analýza liposomů a PHB liposomů kryo-TEM mikroskopii

Pro porovnání struktury liposomů a PHB liposomů byla využita kryo-elektronová transmisní mikroskopie. Snímky byly pořízeny pomocí přístroje FEI Tecnai F20 s 4k CCD kamerou FEI Eagle při urychlovacím napětí 200 kV.

Pro přípravu vzorků k mikroskopování byly 4 μl nefiltrované částicové suspenze nanášeny na nosnou folii Quantifoil R2/1 (Holey Carbon on 200 mesh grid). Vitřifikace kapalným ethanem chlazeným kapalným dusíkem byla provedena pomocí zařízení Vitrobot TM (FEI) s následujícími parametry procesu: blot time 2.0 s, blot force -2, 10.0 s wait time. Vzorky nanášené na fóliích byly před samotným mikroskopováním uschovány v tekutém dusíku. Výsledný obraz byl zpracován s využitím automatických software EPU a Tomo.

4.9 Příprava vláken

4.9.1 Příprava pracovních roztoků pro zvláknění

Zásobní roztok poly-3-hydroxybutyrátu byl připraven rozpuštěním PHB v chloroformu na konečnou koncentraci 2% hm., směs byla míchána při 60 °C na magnetické míchačce do úplného rozpuštění.

V případě vláken obohacených o aktivní složku bylo do zásobního roztoku přidáno odpovídající množství lipidického extraktu na konečnou koncentraci 1 mg/ml.

4.9.2 Příprava vláken pomocí elektrospinningu

Zvlákňování probíhalo na elektrospinningové soustavě sestavené na FCH VUT v Brně. (Obr. 16). Injekční stříkačka byla naplněna 20 ml zásobního roztoku a uchycena do dávkovače. Vzdálenost jehly a kolektoru byla nastavena na 15 cm. Jehla a kolektor byly následně připojeny ke kladnému a zápornému pólu zdroje VN. Zvlákňování probíhalo při napětí 15 kV a průměrném průtoku 9 ml/hod. Po ukončení zvlákňování byla vlákenná textilie sesbírána a sterilně uschována pro další práci.



Obrázek 16: Elektrospinningová soustava FCH VUT v Brně

4.10 Analýza vláken

4.10.1 Stanovení antioxidačních vlastností vláken

Antioxidační potenciál vláken byl stanoven metodou uvedenou v kap. 4.6.6. Zvážený vzorek vlákenné textilie o velikosti 1 cm² byl vložen do zkumavky a ponořen do 2 ml roztoku radikálového kationtu ABTS⁺. Po uplynutí 10 minut byl sledován pokles absorbance a vypočtena antioxidační aktivita.

4.10.2 Sledování uvolňování aktivní látky z vláken

Rychlost uvolňování navázané aktivní látky z vláken byla měřena jako množství uvolněných polyfenolů do prostředí metodou uvedenou v kap. 4.6.1. Pro sledování uvolnění hydrofilních látek byla zvolena voda, jako modelové rozpouštědlo pro hydrofobní sloučeniny byl zvolen ethanol. Vzorek vlákenné textilie o velikosti 1 cm² byl vložen do 2 ml modelového prostředí a množství uvolněných polyfenolů bylo stanovováno v čase 0, 2, 5, 10, 20, 30 a 60 minut.

4.10.3 Analýza vláken technikou FTIR-ATR

Navázání složek lipidického extraktu na vlákna bylo pozorováno s využitím infračervené spektroskopie, pro analýzu byla vybrána technika FTIR-ATR. Měření bylo provedeno pomocí spektrometru Nicolet iS50 s jednorázovým diamantovým ATR nástavcem. Pro měření byla vybrána absorbance v rozsahu vlnočtů 4000-400 cm⁻¹, spektra byla stanovena s krokem 4 cm⁻¹ jako průměr 128 skenů. Měření probíhalo oproti vzduchu jako slepému vzorku.

4.10.4 Analýza vláken TEM mikroskopií

K analýze vláken pomocí skenovací elektronové mikroskopie byl použit elektronový mikroskop JEOL JSM-7600F. Snímky byly vytvořeny při urychlovacím napětí 10 kV a zvětšení 1000x a 5000x.

4.11 Antimikrobiální testy

4.11.1 Kultivace mikroorganismů pro testování antimikrobiální aktivity

Pro sledování antimikrobiálního účinku připravených preparátů byly jako modelové mikroorganismy zvoleny kmeny *Micrococcus luteus*, jako zástupce grampozitivních bakterií, a *Serratia marcescens*, jako zástupce gramnegativních bakterií. Antimykotický efekt vzorků byl stanoven s využitím kvasinkového kmene *Candida glabrata*.

4.11.1.1 Kultivace bakteriálních kmenů *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*

Obě kultury byly dlouhodobě uchovávány na agarových plotnách při 4 °C a před samotným antimikrobiálním testem bylo připraveno inokulum zaočkováním kultury do tekutého média. Pro kultivaci obou bakteriálních kmenů bylo používáno komerční živné médium Nutrient Broth, připravené podle instrukcí výrobce. Ve 100ml Erlenmayerových baňkách bylo rozpuštěno 50 ml média a sterilováno v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut. Po vychladnutí bylo médium zaočkováno jednou kličkou a za stálého třepání inkubováno při 37 °C po dobu 24 hodin. Takto připravená bakteriální kultura byla pro diluční test naředěna čerstvým médiem na absorbanci 0,1 při vlnové délce 630 nm. V případě difúzních testů bylo 100 µl 24 hodinové kultury zaočkováno na Petriho misky s živným médiem (Nutrient Broth s přidavkem agaru o koncentraci 25 g/l). Zaočkované agarové plotny byly před nanesením testovaných vzorků kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin.

4.11.1.2 Kultivace kvasinkového kmene *Candida glabrata*

Pro kultivaci kvasinky *Candida glabrata* bylo použito YPD médium o složení: pepton 20 g/l, glukosa 20 g/l, kvasničný extrakt 10 g/l, v případě pevných médií s přidavkem agaru na koncentraci 15 g/l. Inokulum bylo vytvořeno zaočkováním z uchovávací Petriho misky do 50 ml sterilního tekutého média v Erlenmayerově baňce. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin při 37 °C a stálém třepání. Takto připravená kultura byla použita pro testování antimykotického účinku připravených preparátů.

4.11.2 Testování antimikrobiální a antimykotické aktivity částic

4.11.2.1 Bujonová diluční metoda

Při bujonové diluční metodě byla sledována inhibice růstu mikroorganismu na mikrotitračních destičkách. K 50 µl testovaného vzorku bylo přidáno 150 µl mikrobiální kultury a pomocí ELISA readeru byl sledován nárůst buněk v čase 24 hodin. V případě blanku bylo ke kultuře přidáno 50 µl vody či jiného rozpouštědla [166].

4.11.2.2 Agarová difúzní metoda

Difúzní test byl prováděn na agarových plotnách. Po zaočkování mikrobiální kulturou (100 µl buněčné suspenze rozetřeno hokejkou na agar) byly misky inkubovány po dobu 24 hodin. Do tuhého média s vrstvou buněk na povrchu byly následně sterilně vyhloubeny jamky. Do jamek bylo poté pipetováno 50 µl testované látky, v případě blanku 50 µl vody nebo jiného rozpouštědla. Po dalších 24 hodinách byly sledovány velikosti inhibičních zón vytvořených v okolí jamek [167].

4.11.3 Testování antimykotické aktivity vláken

4.11.3.1 Zkumavkový test

Antimykotický účinek nanovláknenných tkanin byl pozorován pomocí zkumavkového testu. Do sterilních zkumavek bylo napipetováno 5 ml YPD média a zaočkováno 100 μ l kvasinkového inokula. Následně byl do každé zkumavky umístěn 1 cm^2 vláken s obsahem lipidického extraktu. Zkumavky byly za stálého třepání kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Po ukončení kultivace byl proměřen zůstatek při absorpční 630 nm. Získané hodnoty byly porovnány s hodnotou zůstatku u buněk kultivovaných s vláknem bez obsahu lipidického extraktu [166].

4.12 Testování toxicity částic

4.12.1 Příprava částic pro testování toxicity

Částicové suspenze byly upraveny postupem uvedeným v kapitole 4.8.1.2. Po centrifugaci byl roztok částic přefiltrován přes sterilní filtr s velikostí pórů 0,2 μ m. Takto připravené vzorky byly podrobeny cytotoxickým a genotoxickým testům. U všech vzorků použitých pro testování toxicity byla stanovena výsledná koncentrace lecithinu, příp. dalších komponent liposomových částic.

4.12.2 Stanovení množství jednotlivých složek v suspenzi liposomů a kombinovaných PHB-liposomových částic

4.12.2.1 Stanovení koncentrace lecithinu v suspenzi částic

Pro určení koncentrace lecithinu v připravených liposomových suspenzích byla použita Stewartova metoda stanovení koncentrace fosfolipidů [168].

Do plastové centrifugační zkumavky bylo napipetováno 50 μ l vzorku, 450 μ l vody, 2 ml činidla AF a 3 ml chloroformu. Činidlo AF vzniklo rozpuštěním 2,7 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ a 3,05 g NH_4SCN do 100 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl 20 vteřin promícháván na vortexu a poté ponechán inkubovat ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Po inkubaci byly zkumavky 5 minut centrifugovány při 1 000 ot/min a následně byla proměřena absorbance spodní chloroformové vrstvy při 450 nm. Obsah lecithinu ve vzorcích byl vypočten z kalibrační rovnice (4.6) získané proměřením standardního roztoku lecithinu v chloroformu v koncentračním rozmezí 0 – 0,25 mg/ml.

$$A = 3,8591 \cdot c \text{ [mg]} \quad (4.6)$$

4.12.2.2 Stanovení koncentrace poly-3-hydroxybutyrátu v suspenzi částic

Připravená suspenze PHB liposomů byla rozpipetována do zkumavek typu Eppendorf a vysušena přes noc v sušárně při 70 °C. Do vialek bylo naváženo přesně 10 mg suchého vzorku a připipetováno 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% kyseliny sírové v methanolu s interním standardem kyselinou benzoovou. Po uzavření byly vialky inkubovány v termostatu po dobu 3 hodin, než proběhla esterifikace. Po ochlazení byly odstraněny nečistoty 0,05 M hydroxidem sodným a vzorky byly následně vhodně naředěny chloroformem. V takto připravených vialkách byl stanoven obsah poly-3-hydroxybutyrátu s využitím plynové chromatografie s FID detekcí [169].

4.12.2.3 Stanovení koncentrace cholesterolu v suspenzi částic

Odvážené množství vysušeného vzorku částicové suspenze (kap. 4.12.2.2) bylo vhodně rozpuštěno v methanolu a podrobena chromatografické analýze. Stanovení množství cholesterolu probíhalo na nepolární koloně Kinetex C18 s izokratickou elucí a mobilní fází methanolem. Vzorek byl

dávkován smyčkou o objemu 20 μ l a analýza probíhala při teplotě 45 °C a průtoku 1,0 ml/min. Detekce probíhala spektrofotometricky s využitím PDA detektoru při vlnové délce 285 nm. Data byla zpracována v softwaru Xcalibur a výsledná koncentrace cholesterolu byla vypočtena z externí kalibrační křivky standardního roztoku cholesterolu [170].

4.12.3 Cytotoxické testy

4.12.3.1 Kultivace HEK buněk

Buňky HEK (102-05a) byly kultivovány v médiu KGM-Gold, s 1% směsí antibiotik a antimykotik. Kultivace buněk probíhala v inkubátoru s řízenou atmosférou 5% CO₂, při 37 °C a 95% vlhkosti. Pro kultivaci byly použity kultivační nádoby o velikosti 25 cm² a 75 cm². Po dosažení 80 - 90% konfluency bylo z lahví odpipetováno kultivační médium a buňky byly třikrát propláchnuty 10 ml sterilního fosfátového pufru. Následně bylo do láhve přidáno 0,5 – 1 ml roztoku enzymu akutasy a buňky byly umístěny do inkubátoru do úplného rozvolnění vazeb (5-10 minut). Buňky odloučené od kultivačního povrchu byly rozsuspendovány ve sterilním pufru a přeneseny do sterilní centrifugační zkumavky. Centrifugace probíhala po dobu 5 minut, při 37°C a 360 g. Po ukončení centrifugace byla usazená peleta buněk rozsuspendována v čistém médiu a s pomocí Bürkerovy komurky byla stanovena celková koncentrace buněk. Buněčná suspenze byla dále ředěna čerstvým médiem podle potřeby testu.

4.12.3.2 Kultivace HaCaT buněk

Pro kultivaci HaCaT buněk bylo používáno medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s obsahem 10% fetálního bovinního séra a 1% obsahem směsi antibiotik/antimykotik. Kultivace buněk probíhala v inkubátoru s řízenou atmosférou 5% CO₂, při 37 °C a 95% vlhkosti. Pro kultivaci byly použity kultivační nádoby o velikosti 25 cm² a 75 cm². Po dosažení 80 - 90% konfluency bylo z lahví odpipetováno kultivační médium a buňky byly třikrát propláchnuty 10 ml sterilního fosfátového pufru. Poté bylo do lahvíček připipetováno 0,5 – 1 ml roztoku trypsinu a buňky byly na 10 – 15 minut ponechány v inkubátoru do úplného odloučení od povrchu lahvíček. Uvolněné buňky byly rozsuspendovány ve sterilním pufru a centrifugovány po dobu 5 minut, při 37 °C a 360 g. Usazená peleta buněk byla rozsuspendována v čerstvém médiu a s využitím Bürkerovy komurky byla stanovena celková koncentrace buněk. Buněčná suspenze byla dále ředěna čerstvým médiem podle potřeby testu.

4.12.3.3 MTT test cytotoxicity

MTT test toxicity liposomových suspenzí byl prováděn na 96jamkových destičkách. Buněčná kultura (100 μ l) byla napipetována do jamek na konečnou koncentraci 25000 buněk/jamka a destička byla kultivována v inkubátoru po dobu 24 hodin. Následně bylo do jamek přidáno 100 μ l kultivačního média s různou koncentrací testovaného vzorku a destička byla inkubována dalších 24 hodin. Po této době bylo do každé jamky připipetováno 20 μ l roztoku MTT/PBS o koncentraci 2,5 mg/ml. Destička byla inkubována 3 hodiny při 37 °C a poté bylo do jamek přidáno 100 μ l 10% roztoku SDS/PBS. Následující den byla pomocí ELISA readeru změřena absorbance při 562 nm [171].

Viabilita buněk kultivovaných s testovanými extrakty byla porovnáována s metabolickou aktivitou buněk inkubovaných v čistém médiu. Součástí testu byla vždy i kontrola působení rozpouštědla v maximální použité koncentraci při ředění liposomových suspenzí. Na každé destičce byla rovněž pozitivní kontrola, tzn. inhibice viability buněk působením 100 μ l 40% ethanolu.

4.12.3.4 Alamar Blue test cytotoxicity

Test viability buněk s využitím barviva Alamar Blue byl prováděn na 96jamkových destičkách. Buněčná kultura (100 μ l) byla napipetována do jamek na konečnou koncentraci 25000 buněk/jamka a destička byla kultivována v inkubátoru po dobu 24 hodin. Následně bylo do jamek přidáno 100 μ l kultivačního média s různou koncentrací testovaného vzorku a destička byla inkubována dalších 24 hodin. Po této době bylo do každé jamky připipetováno 100 μ l roztoku Alamar Blue v kompletním médiu a destička byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Poté byla pomocí ELISA readeru změřena fluorescence při 562/590 nm (excitace/emise). Součástí každé destičky byla kontrola buněk, kontrola rozpouštědla i pozitivní kontrola pomocí 40% ethanolu [172].

4.12.3.5 LDH test cytotoxicity

Laktátdehydrogenasa je stabilní cytoplazmatický enzym, který je v případě poškození cytoplazmatické membrány uvolňován do média. Pro stanovení toxicity s využitím LDH testu byly využity supernatanty buněk z předchozího MTT testování. Tento test probíhal rovněž na mikrotitračních destičkách.

K 10 μ l buněčných supernatantů bylo přidáno 50 μ l roztoku NADH v pyruvátu. Tento roztok vznikl rozpuštěním NADH do 0,75mM roztoku pyruvátu sodného na konečnou koncentraci 1 mg/ml. Po 30 minutách inkubace při 37 °C bylo do jamek přidáno 50 μ l roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazinu (20 mg 2,4-DNPH rozpuštěno ve 100 ml 1 M kyseliny chlorovodíkové). Destička byla ponechána ve tmě po dobu dalších 20 minut. Nakonec bylo do jamek připipetováno 50 μ l 4 M roztoku hydroxidu sodného a po 5 minutách byla proměřena absorbance při vlnové délce 450 nm [173].

Aktivita laktátdehydrogenasy byla vypočtena z kalibrační křivky vytvořené ze standardního roztoku pyruvátu sodného v NADH v koncentracích odpovídajících absolutní aktivitě 0 – 2000 U/ml. Součástí tohoto testu byla i negativní (neovlivněné buňky) a pozitivní kontrola (buňky kultivované s 40% ethanolu).

4.12.3.6 Analýza produkce cytokinů metodou Bioplex

Součástí testů toxicity je i sledování produkce zánětlivých cytokinů, indukovaných působením nanočástic. Cytokiny jsou signální molekuly tvořené polypeptidovými řetězci, které jsou produkovány buňkami jako reakce na vnější stimulaci [173]. Buněčné supernatanty z testování toxicity pomocí Alamar Blue byly použity ke sledování produkce prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8.

Experiment byl proveden imunochemickou metodou Bio-Plex, která je založena na současné detekci více analytů v jednom vzorku. Principem testu je tvorba komplexu mezi kuličkami s kovaletně vázanými protilátkami a proteiny přítomnými ve vzorku.

Stanovení bylo provedeno s využitím komerčního kitu Human Cytokine Assay, Biorad podle instrukcí výrobce. Hodnoty absorbancí byly odečteny pomocí ELISA readeru a koncentrace cytokinů byly vypočteny z lineárních regresních rovnic standardů [174].

4.12.4 Genotoxické testy

Stanovení genotoxického účinku připravených preparátů bylo provedeno s využitím komerčního kitu EBPI SOS Chromotest™ [152].

4.12.4.1 Příprava kultury pro testování genotoxicity

Kultivační médium obsažené v testovacím kitu bylo rozděleno do uzavíratelných plastových centrifugačních zkumavek po 10 ml a zaočkováno vždy jednou kličkou lyofilizované testovací kultury. Médium bylo kultivováno při teplotě 37 °C za anaerobních podmínek po dobu 14 – 16 hodin. Takto

připravená buněčná suspenze byla po naředění čerstvým médiem na absorbanci $A=0,05-0,06$ při $\lambda = 600$ nm použita pro stanovení genotoxicity.

4.12.4.2 SOS Chromotest

Test byl prováděn na mikrotitračních destičkách (96 jamek). Pozitivní kontrolou byl standardní mutagen 4-nitrochinolinoxid (4-NQO) rozpuštěný v 10% DMSO na koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Negativní kontrolou bylo použité rozpouštědlo (10% DMSO a destilovaná voda). Všechny testované vzorky liposomů byly naředěny destilovanou vodou na čtyři různé koncentrace. Testování probíhalo v režimu simultánního sledování aktivity beta-galaktosidasy a alkalické fosfatasy. Do jamek bylo rozpipetováno 10 μl testované látky nebo kontrolního roztoku. Ke vzorkům bylo přidáno 100 μl buněčné suspenze a destička byla následně inkubována při 37 °C. Po dvou hodinách inkubace bylo do jamek připipetováno 100 μl roztoku substrátu alkalické fosfatasy rozpuštěného v chromogenním činidle a pomocí ELISA readeru byla změřena absorbance při 405 a 630 nm. Tato počáteční hodnota byla odečítána od výsledných hodnot po inkubaci pro odstranění případných barevných interferencí vzorků. Následně byla destička inkubována při 37°C po dobu dalších 90 minut. Po ukončení inkubace bylo do jamek připipetováno 50 μl stop roztoku a opět byla změřena absorbance při 405 a 630 nm. Měření absorbancí při $\lambda=630$ nm podává informace o produkci beta-galaktosidasy a tedy o genotoxicitě vzorku, zatímco měření při $\lambda=405$ nm slouží jako kontrola viability bakteriálních buněk.

4.13 Testování toxicity vláken

4.13.1.1 Příprava vláken pro testování toxicity

Pro testování cytotoxicity byla použita vlákna připravená ve sterilním boxu metodou elektrospinningu. Odvážené vzorky nanovlákněné tkaniny byly před inkubací s buněčnou kulturou vysvíceny v laminárním boxu UV zářením po dobu 20 minut.

4.13.1.2 MTT test cytotoxicity

MTT test byl využit i při testování cytotoxického účinku připravených nanovláken. Testování probíhalo na 6jamkových destičkách modifikovanou metodou uvedenou v kap. 4.12.3.3. Do každé jamky byly napipetovány 3 ml buněčné suspenze o konečné koncentraci 30 000 buněk/jamka. Destička byla inkubována při 37 °C a 5% CO_2 po dobu 24 hodin. Poté bylo médium v jamkách odpipetováno a nahrazeno stejným objemem čerstvého média a do každé jamky, kromě kontroly, bylo přidáno odvážené množství nanovlákněné tkaniny. Destička byla následně inkubována po dobu dalších 24 hodin, poté byly z jamek odebrány buněčné supernatanty a do každé jamky bylo napipetováno 0,5 ml roztoku MTT v PBS o koncentraci 2,5 mg/ml. Po tříhodinové inkubaci byly vytvořené formazanové krystaly rozpuštěny v 10% roztoku SDS v PBS a druhý den byla změřena absorbance při 562 nm [171, 175]. Metabolická aktivita buněk inkubovaných se vzorkem nanovláken byla porovnána s mitochondriální aktivitou buněk kultivovaných v samotném kultivačním médiu.

4.14 Statistické zpracování výsledků

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno s využitím matematických funkcí programu MS Excel.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace extraktů přírodních vzorků z hlediska obsahových látek

Úvodní část dizertační práce zahrnovala přípravu a charakterizaci extraktů z různých přírodních zdrojů s vysokým obsahem antioxidantů. Připravené extrakty byly charakterizovány z hlediska obsahu polyfenolů a flavonoidů, celkové antioxidační aktivity a některých dalších dílčích charakteristik podle typu vzorku. Pro porovnání extrakce aktivních látek byla kromě vody použita i další rozpouštědla – ethanol, methanol a DMSO. U vybraných vzorků byly připraveny a charakterizovány i lipidické extrakty.

5.1.1 Stanovení výtežnosti extrakce lipidů dle Folche

Lipidické extrakty byly z vybraných vzorků bylin a koření získány Folchovou metodou (kap. 4.5.3). Množství získaných lipidů z navážky původního materiálu je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3: Výtežnost extrakce lipidů dle Folche

vzorek	výtěžnost lipidů [g/100g]
pomerančová kůra	0,3 ± 0,0
kozinec	1,2 ± 0,2
kopřiva	1,5 ± 0,3
řebříček	1,6 ± 0,1
lapacho	2,1 ± 0,1
jetel	2,4 ± 0,8
heřmánek	2,6 ± 0,4
ličořeřišnice	2,8 ± 0,8
dubová kůra	6,6 ± 1,8
zázvor	8,7 ± 1,7
oregano	10,9 ± 1,9
pepř	11,9 ± 0,9
badyán	12,6 ± 2,7
hřebíček	15,1 ± 3,5
skořice	15,3 ± 0,4
muškátový oříšek	40,0 ± 4,3

Esenciální oleje a další lipidické extrakty nacházejí široké komerční uplatnění především jako aroma, uplatňují se ale také jako aditiva při ochraně potravin před mikrobiálním poškozením. Jedná se o chemicky rozmanité směsi sloučenin, které lze získat izolací z rostlin a různých typů koření [176].

Pro izolaci lipidů Folchovou metodou bylo vybráno celkem 16 vzorků kůr, bylin i koření. Výtěžnost extrakce lipidů byla mnohem vyšší u vzorku koření, kde se podařilo z celkové navážky 100 g vzorku získat až 40 g lipidů. U bylinek byla výtěžnost všeobecně velmi nízká, výjimku tvořil vzorek oregana. U vytvořených extraktů byl zjištěn obsah polyfenolů a celková antioxidační aktivita a poté byly vybrané oleje použity k přípravě liposomů a vláken.

5.1.2 Stanovení celkových polyfenolů

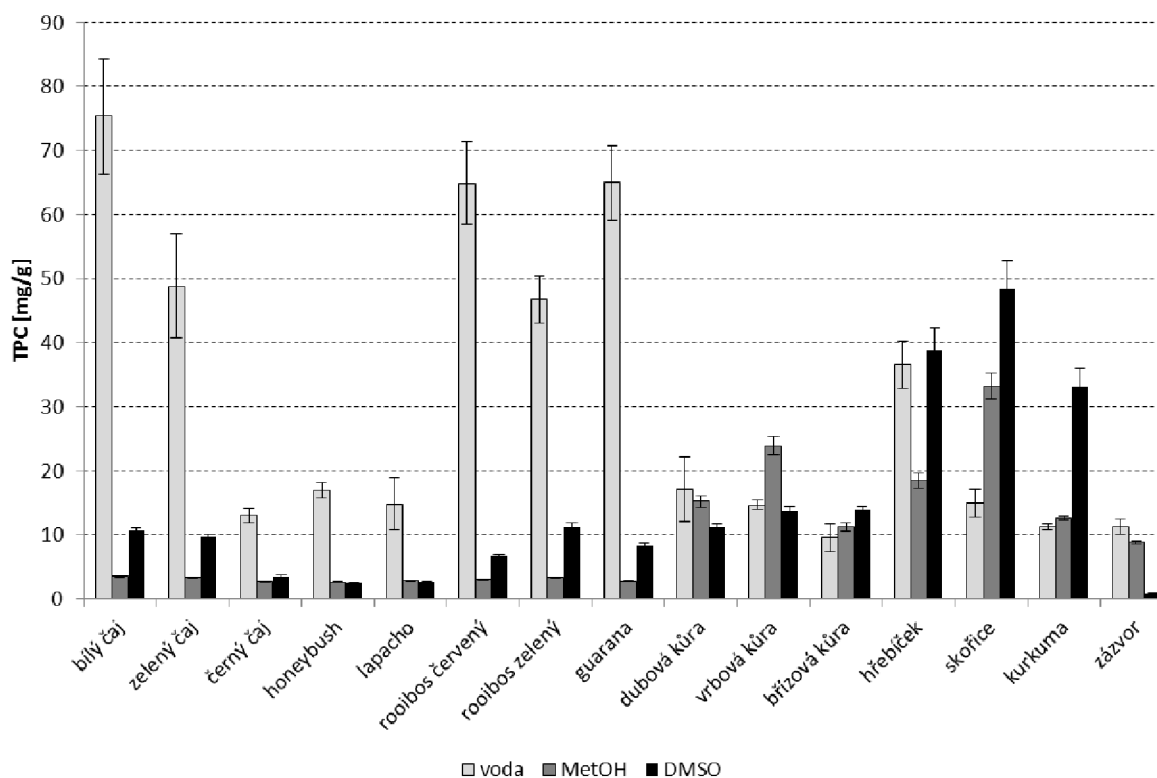
U všech připravených vodných extraktů byl sledován celkový obsah polyfenolů metodou uvedenou v kap. 4.6.1. Každý vzorek byl proměřen nejméně třikrát, průměrné hodnoty ze všech měření a směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tabulce 4. Výsledky jsou vyjádřeny v mg/g materiálu.

Tabulka 4: Stanovení celkového množství polyfenolů (Total Phenolic Content) ve vodných extraktech vzorků

čaje a kůry	TPC [mg/g]	byliny	TPC [mg/g]	koření a další	TPC[mg/g]
bílý čaj	75,3 ± 9,0	kopřiva	7,1 ± 0,2	hřebíček	36,5 ± 3,7
zelený čaj	48,8 ± 8,1	rakytník	6,4 ± 0,4	skořice	14,9 ± 2,2
černý čaj	13,0 ± 1,1	heřmáněk	8,6 ± 0,8	česnek	4,3 ± 0,0
honeybush	16,9 ± 1,2	jitrocel	26,7 ± 2,1	muškátový oříšek	2,2 ± 0,2
lapacho	14,8 ± 4,1	levandule	19,9 ± 3,2	badyán	3,3 ± 0,7
rooibos červený	64,9 ± 6,5	černý bez	62,3 ± 3,0	pepř černý	2,0 ± 0,0
rooibos zelený	46,7 ± 3,7	rozmarýn	26,8 ± 2,9	pomerančová kůra	7,5 ± 0,0
guarana	44,9 ± 5,8	mateřídouška	18,5 ± 0,6	kurkuma	11,3 ± 0,5
matcha	44,5 ± 4,3	echinacea	18,8 ± 2,4	zázvor	11,2 ± 1,2
dubová kůra	17,1 ± 5,0	šalvěj	16,3 ± 4,1	okurka hořká	6,8 ± 0,2
vrbová kůra	14,7 ± 0,7	kozinec	1,2 ± 0,0	lesní plody	3,2 ± 0,0
břizová kůra	9,6 ± 2,1	ličořeřišnice	1,1 ± 0,0	lesní plody šťáva	2,5 ± 0,0
		oregano	29,5 ± 2,1	mrkev	4,3 ± 0,1
		citronová tráva	1,1 ± 0,1	mrkev šťáva	1,4 ± 0,1
		fenykl	10,1 ± 0,9		
		jetel	14,9 ± 1,1		
		řebříček	12,8 ± 2,5		

Z hlediska obsahu polyfenolických látek byly jako nejbohatší vyhodnoceny vzorky různých typů čajů, především čaje bílý a zelený, dále oba typy rooibosu a také guarana a matcha (nad 40 mg/g materiálu). Vysoký obsah polyfenolů byl rovněž zjištěn u černého bezu, jitrocele, rozmarýnu, oregana a hřebíčku (nad 20 mg/g).

Polyfenolické látky jsou velice rozmanitou skupinou z hlediska jejich chemické struktury, což má za následek různý profil extrahovaných polyfenolů při použití různých typů rozpouštědel. Výběr rozpouštědla je tudíž klíčovým faktorem, který ovlivňuje kvalitu a množství extrahovaných fenolických sloučenin [177]. U vybraných vzorků byla proto kromě vody použita i další rozpouštědla, methanol a dimethylsulfoxid pro získání látek nerozpustných ve vodě (Graf 1).



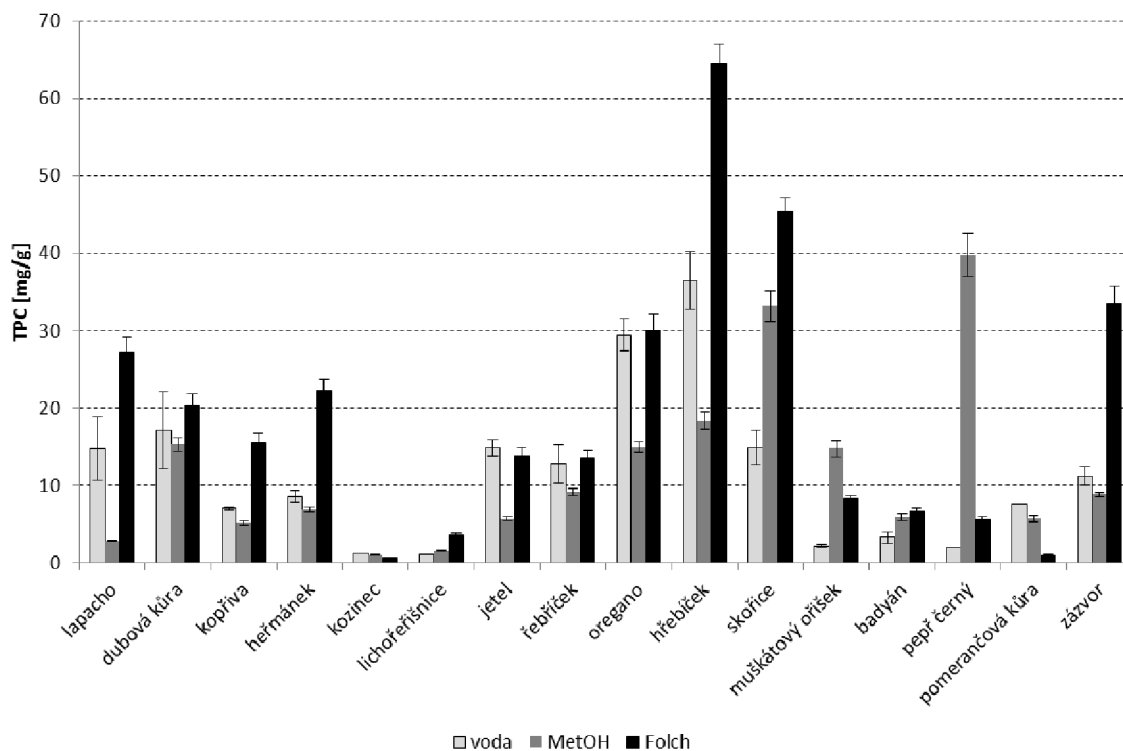
Graf 1: Porovnání množství získaných polyfenolů při extrakci do různých rozpouštědel

U většiny vzorků byl nejvyšší obsah polyfenolů stanoven vždy ve vodném extraktu, výjimku tvořily vrbová a březová kůra, hřebíček, skořice a kurkuma. U těchto vzorků, především v případě hřebíčku, skořice a kurkumy, lze předpokládat velké množství hydrofobních polyfenolických látek rozpustných pouze v organických rozpouštědlech (DMSO).

Z porovnání extrakcí do vody a organického rozpouštědla se obecně jeví z hlediska bezpečnosti i obsahu polyfenolických sloučenin jako lepší volba extrakce do vodného prostředí.

U vybraných vzorků byly připraveny rovněž lipidické extrakty s využitím Folchovy metody. Celkový obsah polyfenolů získaných z jedné matrice byl pak porovnán při extrakci do vody, do organického rozpouštědla a při použití metody extrakce lipidů dle Folche. Bylo zjištěno, že u části analyzovaných vzorků se příprava lipidických extraktů jeví jako nejlepší možnost pro získání antioxidantů. V případě hřebíčku bylo Folchovou metodou získáno téměř dvojnásobné množství polyfenolů oproti extrakci do vody a trojnásobné množství oproti extrakci do methanolu. Velké množství lipofilních polyfenolů pravděpodobně obsahují i lapacho, dubová kůra a některé bylinky (kopřiva, heřmánek, jetel, řebříček a oregano). Třikrát bohatší na množství polyfenolů oproti vodným extraktům byly i vyizolované oleje ze skořice a zázvoru (Graf 2).

Uvedené extrakce a charakterizace slouží pouze jako model pro přípravu preparátů s maximálním obsahem účinných látek. Použití toxických organických rozpouštědel nevyhovuje legislativním stanovám, pro komerční účely je nutné otestovat použití GRAS rozpouštědel (hexanu, případně ethanolu).



Graf 2: Porovnání množství získaných polyfenolů z jedné matrice při použití různých typů extrakce

5.1.3 Stanovení celkových flavonoidů

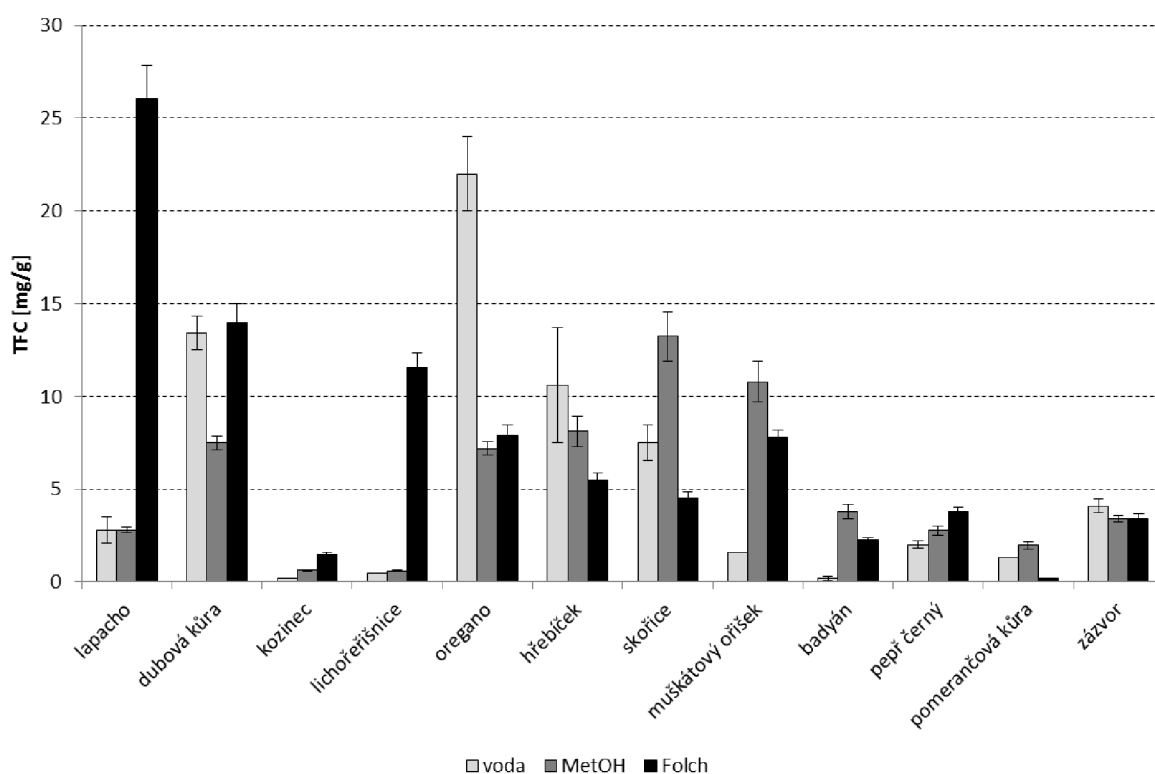
Ve všech připravených vodných extraktech byl rovněž sledován obsah flavonoidů metodou uvedenou v kap. 4.6.2. Každý vzorek byl proměřen nejméně třikrát, průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze všech měření jsou uvedeny v tabulce 5. Výsledky jsou vyjádřeny v mg/g materiálu.

Tabulka 5: Stanovení celkového množství polyfenolů (Total Flavonoids Content) ve vodných extraktech vzorků

čaje a kůry	TFC [mg/g]	byliny	TFC [mg/g]	koření a další	TFC [mg/g]
bílý čaj	4,9 ± 0,1	kopřiva	2,7 ± 0,6	hřebíček	10,6 ± 3,1
zelený čaj	6,1 ± 0,3	rakytník	0,4 ± 0,0	skořice	7,5 ± 1,0
černý čaj	0,3 ± 0,2	heřmánek	2,8 ± 0,4	česnek	0,2 ± 0,1
honeybush	1,0 ± 0,0	jitrocel	12,9 ± 0,6	muškátový oříšek	1,6 ± 0,0
lapacho	2,8 ± 0,7	levandule	6,5 ± 0,5	badyán	0,2 ± 0,1
rooibos červený	19,5 ± 0,5	černý bez	28,2 ± 2,3	pepř černý	1,3 ± 0,2
rooibos zelený	18,6 ± 0,0	rozmarýn	10,0 ± 0,9	pomerančová kůra	1,3 ± 0,0
guarana	36,7 ± 0,2	mateřídouška	17,9 ± 0,3	kurkuma	10,1 ± 0,8
matcha	19,0 ± 0,0	echinacea	9,9 ± 0,0	zázvor	4,1 ± 0,4
dubová kůra	13,4 ± 0,9	šalvěj	8,6 ± 0,4	okurka hořká	9,1 ± 0,6
vrbová kůra	14,6 ± 2,1	kozinec	0,2 ± 0,0	lesní plody	0,3 ± 0,0
břizová kůra	6,4 ± 0,9	ličořeřišnice	0,5 ± 0,0	lesní plody šťáva	0,1 ± 0,0
		oregano	22,0 ± 2,0	mrkev	3,6 ± 0,0
		citronová tráva	0,4 ± 0,2	mrkev šťáva	0,9 ± 0,0
		fenykl	4,4 ± 0,1		
		jetel	5,8 ± 1,1		
		řebříček	5,5 ± 0,5		

Flavonoidy jsou rozmanitá skupina sloučenin patřících mezi polyfenolické látky. U vzorků zeleného a bílého čaje byl vzhledem k vysokému obsahu polyfenolů překvapivě zjištěn velice nízký obsah flavonoidů, méně než desetina celkového množství. Naproti tomu ostatní vzorky čajů a kůr, především oba rooibosy a také guarana se vyznačují vysokým obsahem flavonoidů. U vybraných bylinek byl rovněž naměřen vysoký obsah flavonoidů, a to v případě černého bezu, mateřídoušky a oregana. Ze vzorků koření byly na flavonoidy bohatší pouze vzorky hřebíčku, skořice a kurkumy.

Stejně jako v případě celkových polyfenolů byl i obsah flavonoidů porovnán v extraktech připravených s použitím různých rozpouštědel (Graf 3). Vysoký obsah flavonoidů byl stanoven v lipidických extraktech lapacha a dubové kůry, což koresponduje s výsledky obsahu polyfenolů. Folchova metoda je z hlediska zisku flavonoidů rovněž vhodná i v případě lichořeřišnice a pepře. Methanol se jeví být dobrý extrakčním činidlem pro flavonoidy obsažené ve skořici, badyánu a muškátovém oříšku. Pro ostatní vzorky je nevhodnějším rozpouštědlem voda.



Graf 3: Porovnání množství flavonoidů při různých typech extrakce

5.1.4 Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS

Extrakty byly charakterizovány z hlediska jejich antioxidačního potenciálu metodou uvedenou v kap. 4.6.6. Všechny vzorky byly proměřeny nejméně třikrát, v Tabulce 6 jsou uvedeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze všech měření. Výsledky v mg/g materiálu jsou vztaženy na ekvivalentní množství standardní sloučeniny Troloxu (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

Tabulka 6: Stanovení celkové antioxidační aktivity vodných extraktů vzorků

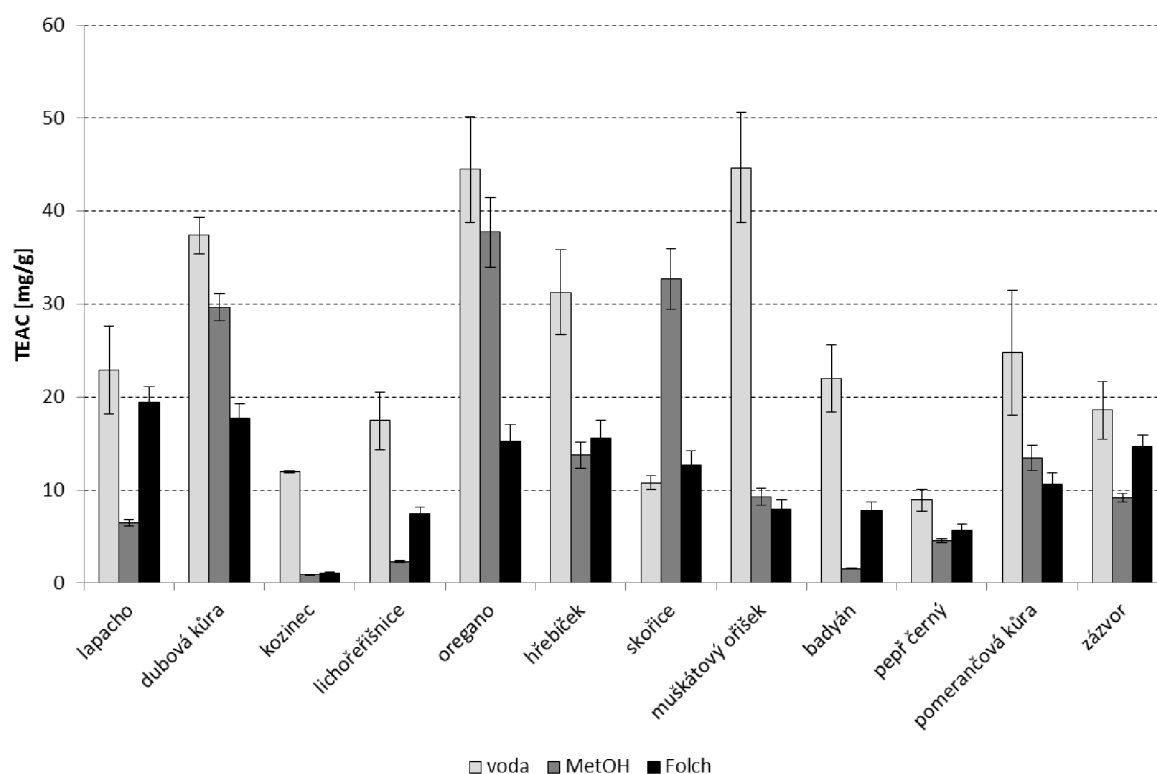
čaje a kůry	TEAC [mg/g]	byliny	TEAC [mg/g]	koření a další	TEAC [mg/g]
bílý čaj	108,5 ± 10,2	kopřiva	3,2 ± 1,1	hřebíček	31,3 ± 4,6
zelený čaj	70,7 ± 9,6	rakytník	2,5 ± 0,7	skořice	10,8 ± 0,7
černý čaj	19,8 ± 2,3	heřmáněk	2,2 ± 0,4	česnek	0,1 ± 0,1
honeybush	25,3 ± 5,4	jitrocel	18,3 ± 5,5	muškátový oříšek	44,7 ± 5,9
lapacho	22,9 ± 4,7	levandule	19,0 ± 3,2	badyán	22,0 ± 3,6
rooibos červený	79,0 ± 5,0	černý bez	23,9 ± 0,2	pepř černý	8,9 ± 1,2
rooibos zelený	67,7 ± 1,5	rozmarýn	18,9 ± 5,5	pomerančová kůra	24,8 ± 6,7
guarana	93,6 ± 4,9	mateřídouška	38,4 ± 3,6	kurkuma	4,3 ± 1,2
matcha	126,7 ± 12,1	echinacea	7,0 ± 0,1	zázvor	18,6 ± 3,1
dubová kůra	37,4 ± 2,0	šalvěj	16,8 ± 0,0	okurka hořká	10,4 ± 2,1
vrbová kůra	28,1 ± 0,6	kozinec	12,0 ± 0,1	lesní plody	3,8 ± 0,1
břizová kůra	16,1 ± 1,1	ličořeřišnice	17,5 ± 3,1	lesní plody šťáva	0,3 ± 0,0
		oregano	44,5 ± 5,7	mrkev	0,6 ± 0,0
		citronová tráva	0,5 ± 0,2	mrkev šťáva	0,5 ± 0,0
		fenykl	5,3 ± 0,1		
		jetel	3,1 ± 0,2		
		řebříček	1,9 ± 0,2		

Celková antioxidační aktivita vodných extraktů vzorků obecně korespondovala se zjištěným obsahem polyfenolických sloučenin. Velmi vysokou antioxidační aktivitou se vyznačovaly vzorky čajů a kůr, největší hodnota byla zjištěna u moderní superpotravině matcha. Zatímco celkové množství polyfenolů vykazovalo stejné hodnoty u matchy i zeleného čaje, antioxidační aktivita matchy je téměř dvojnásobná. Dostupnost a vlastnosti aktivních látek v obou typech čajů se různí kvůli procesu pěstování, zpracování i konzumace. Zelené čaje jsou obvykle pěstovány v jasném slunečním světle, naproti tomu matcha se pěstuje převážně ve stínu. Kromě toho jsou matcha lístky jemně rozemlety na prášek pomocí kamenných mlýnů, zatímco zelené čajové lístky se válcují a balí do pytlů. Tyto rozdíly mají zřejmě za následek rozdílný antioxidační potenciál obou vzorků a jsou důvodem stále silnějších doporučení ke konzumaci matchy namísto klasického zeleného čaje [178].

Dobrý antioxidační potenciál byl zjištěn i některých bylinek, především u oregana, mateřídoušky a černého bezu. Ze vzorků koření se nejvyšší antioxidační aktivitou vyznačovaly vzorky hřebíčku, muškátového oříšku, pomerančové kůry a badyánu.

U vzorků lesních plodů byly zjištěné hodnoty antioxidační aktivity velice nízké. Pro extrakci polyfenolů byl však na rozdíl od sušených bylin použit nativní vzorek směsi lesních plodů, který obsahuje velké množství vody. Lesní plody ve složení borůvky, maliny a jahody jsou považovány za dobrý zdroj přírodních antioxidantů, především barviv anthokyanů. Vzorek mrkve obsahoval velice nízký obsah polyfenolů a vyznačoval se i nízkou antioxidační aktivitou. U mrkve lze předpokládat, že aktivní látky v ní obsažené jsou lipofilního charakteru, a proto je extrakce aktivních sloučenin do vody méně vhodná. Vzorek citronové trávy rovněž obsahoval nízký obsah polyfenolů a vykazoval nízkou antioxidační aktivitu. Citronová tráva je pro svůj obsah polyfenolických sloučenin (především katechol, chlorogenová kyselina, kávová kyselina atd.) široce používána hlavně v Asii [179]. Mnohé studie popisují její antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální, antimykotické a další pozitivní účinky, v této práci se však tyto vlastnosti nepotvrdily. Stejně jako v případě mrkve se tedy i extrakce aktivních látek z citronové trávy do hydrofilního rozpouštědla jeví jako méně vhodná.

Při porovnání antioxidační aktivity různě připravených extraktů bylo zjištěno, že pro většinu testovaných vzorků je nejvhodnějším typem rozpouštědla voda, jako i v případě stanovení celkového obsahu polyfenolů a flavonoidů. I přes vyšší obsah polyfenolů v lipidických extraktech některých typů koření nedosahovala antioxidační aktivita výše hodnot u vodných extraktů (Graf 4). Pro získání extraktů s maximálním antioxidačním potenciálem se jeví jako nejvíce vhodná extrakce do vody.



Graf 4: Porovnání antioxidační aktivity vzorků u různých typů extrakce

5.1.5 Stanovení individuálních charakteristik u vzorků čajů a kůr

Ve vzorcích čajů a kůr byl spektrofotometricky stanoven celkový obsah tříslovin. Ve všech typech čajů a guaraně byl navíc stanoven obsah kofeinu, theofylinu, theobrominu a vybraných individuálních flavonoidů s využitím kapalinové chromatografie.

5.1.5.1 Stanovení obsahu tříslovin

Obsah tříslovin byl stanoven spektrofotometricky metodou uvedenou v kap. 4.6.5. Vzorky byly proměřeny třikrát, výsledné průměrné hodnoty a směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Stanovení obsahu tříslovin ve vzorcích čajů a kůr

vzorek	obsah tříslovin [mg/g]
bílý čaj	30,4 ± 1,5
černý čaj	19,8 ± 1,0
zelený čaj	20,4 ± 1,0
rooibos červený	38,9 ± 2,0
rooibos zelený	27,3 ± 1,0
honeybush	14,2 ± 0,7

vzorek	obsah tříslovin [mg/g]
lapacho	4,9 ± 0,3
guarana	15,0 ± 0,8
matcha	16,4 ± 0,1
vrbová kůra	17,5 ± 0,5
dubová kůra	17,9 ± 1,3
březová kůra	11,5 ± 1,2

Třísloviny se od ostatních polyfenolických sloučenin liší svou schopností precipitovat proteiny, tato vlastnost se využívá při jejich kvantifikaci. Třísloviny nacházejí uplatnění v potravinářství jako aditiva při výrobě piva, vína a ovocných džusů a také ve farmacii, díky svým antimikrobiálním účinkům. Bohatými zdroji tříslovin jsou především různé druhy stromů a keřů [180]. Přítomnost tříslovin byla potvrzena ve všech vodných extraktech čajů a kůr, nejvyšší obsah byl zjištěn u rooibosu červeného.

5.1.5.2 Stanovení kofeinu, theofylinu, theobrominu a individuálních flavonoidů metodou HPLC

Množství kofeinu, theobrominu, theofylinu a individuálních flavonoidů bylo u vzorků čajů a kůr stanoveno s využitím HPLC-PDA metodami uvedenými v kapitolách 4.6.3 a 4.6.4. Vzorky byly proměřeny dvakrát a výsledky jsou uvedeny jako průměr z obou měření a vztaheny na gram původního materiálu.

Tabulka 8: Stanovení kofeinu, theobrominu, theofylinu a individuálních flavonoidů ve vzorcích čajů

vzorek	kofein [mg/g]	theobromin [mg/g]	theofylin [mg/g]	morin [mg/g]	rutin [mg/g]
bílý čaj	16,92	0,00	0,56	0,30	1,03
černý čaj	15,70	7,74	0,84	0,04	4,62
zelený čaj	24,21	12,08	0,83	0,27	3,21
rooibos červený	1,01	31,29	1,64	0,35	1,70
rooibos zelený	1,83	22,42	0,69	0,13	0,67
honeybush	0,45	3,46	0,40	0,18	1,91
lapacho	0,87	7,23	0,17	0,11	2,84
guarana	27,49	5,98	0,21	0,04	0,51
matcha	9,08	5,34	1,54	0,38	3,71

Z výsledků vyplývá, že nejvyšší obsah kofeinu se nachází v guaraně a zeleném čaji. Naopak v obou typech rooibosu, ve vzorku honeybush a lapacho jsou hodnoty kofeinu podle očekávání minimální. Naproti tomu oba rooibosy obsahují vysoké hodnoty theobrominu, analogu kofeinu, což nekoresponduje s dostupnou literaturou [181]. Hodnoty theofylinu a morinu byly ve všech případech velice nízké. Největší množství flavonoidu rutinu bylo naměřeno v černém a zeleném čaji a matche. Rutin patří mezi rostlinné flavonoly a kromě potvrzených antikarcinogenních účinků [182] se vyznačuje i antimikrobiálním a antimykotickým účinkem [182, 183].

5.2 Stanovení enkapsulační účinnosti částic

Tato dílčí část práce zahrnuje přípravu částic s enkapsulovanou aktivní složkou pro využití v potravinářském nebo kosmetickém průmyslu. Kromě tradičně používaných nosičů, jako jsou chitosanové částice a liposomy, byly extrakty enkapsulovány do zcela nového typu kombinovaných PHB-liposomů (příprava viz kap. 4.7). K enkapsulaci byly použity vodné, lipidické a některé organické extrakty přírodních zdrojů antioxidantů.



Obrázek 17: Liposomové suspenze s enkapsulovanými extrakty, zleva bílý čaj, rooibos červený, zelený čaj, černý čaj, matcha a prázdné liposomy

5.2.1 Chitosanové částice

Připravené chitosanové částice byly centrifugovány při 14 000 ot/min po dobu 5 minut a poté bylo v supernatantu spektrofotometricky stanoveno množství volných polyfenolů. Tato hodnota byla porovnána s množstvím polyfenolů stanoveným v extraktech a z rozdílu hodnot byla vypočtena účinnost enkapsulace do chitosanových částic. Měření bylo pro každý vzorek provedeno třikrát, výsledky procentuální účinnosti enkapsulace a směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9: Enkapsulační účinnost u chitosanových částic

vzorek	enkapsulační účinnost [%]
bílý čaj	11,1 ± 0,5
zelený čaj	22,0 ± 1,0
černý čaj	70,1 ± 3,6
rooibos zelený	0,0 ± 0,0
rooibos červený	1,6 ± 0,0
honeybush	20,9 ± 1,0
lapacho	32,3 ± 1,4
guarana	2,7 ± 0,1
levandule	94,6 ± 6,3
jitrocel	52,2 ± 2,6
mateřídouška	77,0 ± 3,5
rozmarýn	85,2 ± 7,8
echinacea	73,8 ± 4,0
černý bez	54,2 ± 2,5
šalvěj	79,6 ± 3,0
hřebíček	71,9 ± 4,6
zázvor	71,7 ± 3,6
skořice	92,0 ± 5,0

Při enkapsulaci čajových extraktů dosahovala účinnost všeobecně nízkých hodnot v porovnání s extrakty bylin a koření s enkapsulační účinností nabývajících hodnot 50% a vyšších. Tento fakt byl pravděpodobně způsoben vysokým obsahem polyfenolických látek v čajích. Vysoká koncentrace těchto sloučenin nejspíš destabilizuje strukturu chitosanu a zabraňuje vytvoření polysacharidových kapslí.

5.2.2 Liposomy a kombinované liposomy

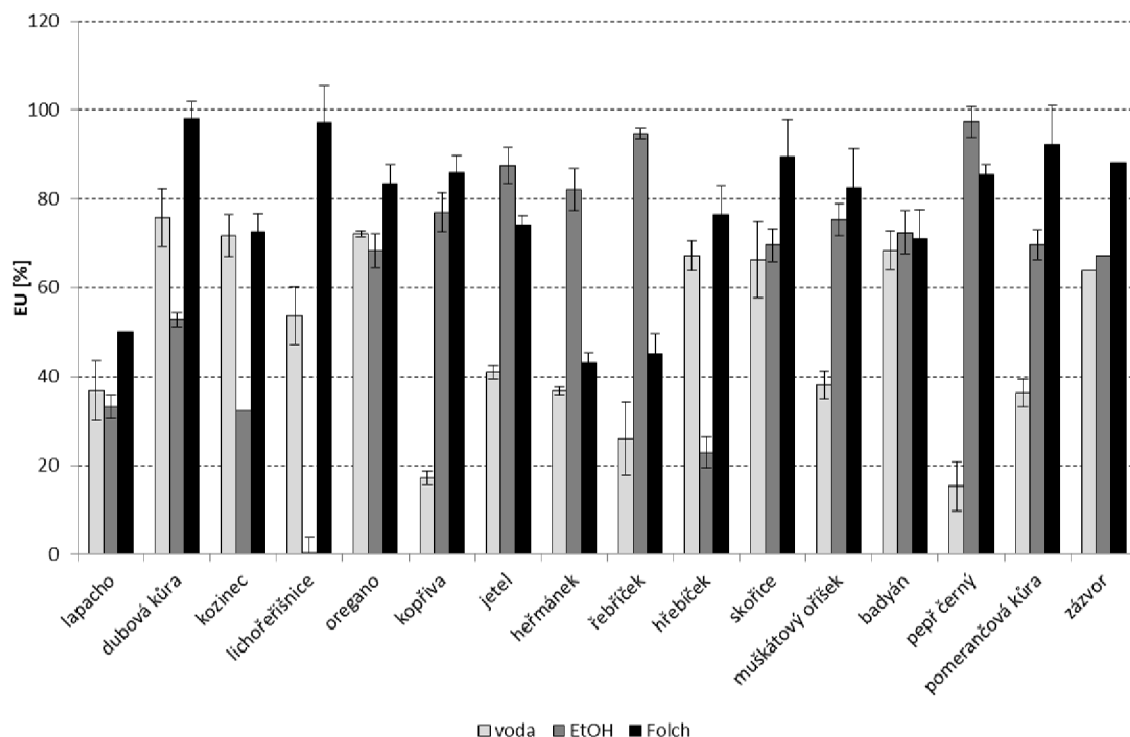
Připravené liposomové a PHB liposomové suspenze byly nejprve zcentrifugovány a supernatant byl použit ke stanovení enkapsulační účinnosti (kap. 4.8.1.2). Všechny částice byly připraveny nejméně třikrát, průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze všech měření jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10: Enkapsulační účinnost u liposomů s vodnými extrakty

čaje a kůry	EU [%]	byliny	EU [%]	koření a další	EU [%]
bílý čaj	26,3 ± 1,3	kopřiva	17,2 ± 0,7	hřebíček	67,2 ± 8,3
zelený čaj	22,5 ± 1,1	heřmáněk	36,8 ± 1,5	skořice	66,3 ± 3,3
černý čaj	29,1 ± 1,5	jitrocel	17,4 ± 0,0	muškátový oříšek	38,2 ± 8,6
honeybush	22,4 ± 1,1	levandule	31,4 ± 0,9	badyán	68,4 ± 3,2
lapacho	36,9 ± 1,8	černý bez	47,2 ± 6,9	pepř černý	15,4 ± 4,4
rooibos červený	41,8 ± 0,1	rozmarýn	48,8 ± 8,1	pomerančová kůra	36,4 ± 5,5
rooibos zelený	24,9 ± 1,7	mateřídouška	7,6 ± 2,3	kurkuma	38,1 ± 4,9
guarana	10,4 ± 0,7	echinacea	20,6 ± 0,6	zázvor	63,9 ± 3,2
matcha	64,9 ± 0,3	šalvěj	14,4 ± 0,8	okurka hořká	39,9 ± 2,0
dubová kůra	75,8 ± 6,6	kozinec	71,7 ± 6,5	lesní plody	45,6 ± 0,5
		ličořeřišnice	53,7 ± 4,8	mrkev	12,6 ± 1,2
		oregano	72,1 ± 6,5		
		citronová tráva	9,8 ± 0,2		
		fenykl	42,1 ± 0,5		
		jetel	41,0 ± 1,6		
		řebříček	26,1 ± 1,0		

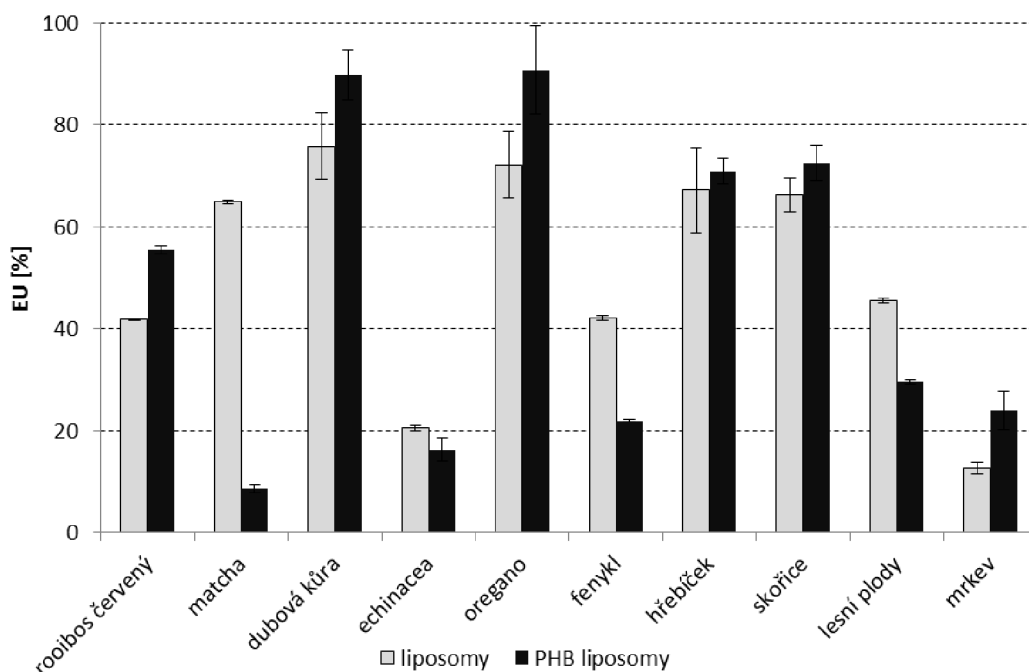
Mezi vodnými extrakty byla účinnost enkapsulace nejvyšší u extraktu z dubové kůry, matchy, hřebíčku, skořice, badyánu a zázvoru. U vodných extraktů bylinek byla účinnost enkapsulace obecně nižší (pod 50%), vyjma vzorku lichořeřišnice, kozince a oregana.

Pro porovnání byly liposomy připraveny i s některými z organických a lipidických extraktů (Graf 5). V případě použití methanolu jako rozpouštědla byl extrakt nejprve odpařen na vakuové odparce a následně rozpuštěn v ethanolu. Pro přípravu liposomů s extrakty z organického rozpouštědla byly vždy použity ethanolické roztoky. Z tohoto měření vyplývá, že při použití organického rozpouštědla se účinnost enkapsulace do liposomů výrazně navyšuje, v některých případech až dvojnásobně (kopřiva, jetel, řebříček, pepř, pomerančová kůra). Rovněž při použití lipidických extraktů došlo ve většině případů ke zvýšení účinnosti enkapsulace, u vybraných vzorků až nad 80%.



Graf 5: Porovnání enkapsulační účinnosti různých typů extraktů do liposomů

Vodné extrakty vybraných vzorků byly použity k enkapsulaci do nového typu částic PHB liposomů a výsledná enkapsulační účinnost byla porovnána se standardními liposomy. U většiny vzorků nebyl pozorován výrazný rozdíl mezi účinností enkapsulace do liposomů a PHB liposomů (Graf 6). I v případě kombinovaných částic slouží jako enkapsulační obal právě fosfolipidová část a polyhydroxybutyrát o použité koncentraci (20 %) účinnost enkapsulace pravděpodobně neovlivňuje.



Graf 6: Porovnání enkapsulační účinnosti extraktů do liposomů a PHB liposomů

5.3 Stanovení velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla

Velikost částic a rozložení jejich velikostí (index polydisperzity Pdl) je důležitým parametrem pro posouzení fyzikální stability systému. Technika dynamického rozptylu světla je široce využívána k určení velikosti malých částic suspendovaných v kapalném prostředí. Při tomto měření lze rovněž získat informace o distribuci velikostí částic v suspenzi. Hodnoty Pdl v rozmezí od 0,1 do 0,25 vypovídají o uniformitě částic v připravené suspenzi, zatímco index polydisperzity vyšší než 0,5 značí široký rozptyl velikostí [184]. Pro stanovení velikosti částic a indexu polydisperzity byl v této práci použit přístroj Malvern ZetaSizer Nano.

5.3.1 Chitosanové částice

Velikost a polydisperzní index byl stanoven u prázdných chitosanových částic a u chitosanových částic s vybranými vodnými extrakty vzorků. Velikost chitosanových částic byla měřena celkem třikrát a výsledky jsou v Tabulce 11 uvedeny jako průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze všech měření.

Tabulka 11: Průměrná velikost a index polydisperzity chitosanových částic

vzorek	velikost částic [nm]	Pdl
prázdné částice	455,8 ± 17,2	0,555
bílý čaj	2715,0 ± 346,5	0,285
zelený čaj	2953,5 ± 43,1	0,294
černý čaj	2344,0 ± 18,4	0,294
rooibos zelený	3424,0 ± 235,0	0,516
rooibos červený	3332,5 ± 50,2	0,332
honeybush	1989,0 ± 192,2	0,261
lapacho	2461,5 ± 10,6	0,295
guarana	3358,0 ± 12,7	0,551
levandule	546,8 ± 18,8	0,365
jitrocel	482,0 ± 205,3	0,476
mateřídouška	915,6 ± 127,9	0,393
rozmarýn	342,4 ± 112,7	0,427
echinacea	3575,0 ± 264,0	0,921
černý bez	507,7 ± 79,6	0,524
šalvěj	880,5 ± 2,3	0,787
hřebíček	2505,5 ± 105,4	0,731
zázvor	1564,0 ± 231,9	0,955
skořice	1872,0 ± 5,7	0,897

Velikost chitosanových částic se pohybovala v rozmezí přibližně 0,5-3,5 μm . Prázdné částice byly vyhodnoceny jako nejmenší, při enkapsulaci aktivní látky se průměrná velikost chitosanových částic zvyšovala. U více než poloviny vzorků došlo ke vzniku částic větších než 1 μm , což je pravděpodobně způsobeno nestabilitou částic a jejich následnou agregací. V žádném z testovaných vzorků nebyl zjištěn index polydisperzity v rozmezí 0,1-0,25 vypovídající o uniformitě připravených částic [184].

Připravené chitosanové částice nejsou svou velikostí vhodné pro použití v kosmetice či farmacii. Možné využití mohou nalézt v potravinových doplňcích, případně nápojích typu „bubble tea“, kde mohou sloužit jako zdravější forma obalových kapslí.

5.3.2 Liposomy a kombinované liposomy

Průměrná velikost částic a index polydisperzity byl stanoven u liposomů s vodnými extrakty, pro porovnání následně i u liposomů s extrakty lipidů a organickými extrakty. Porovnávána byla i velikost liposomů a kombinovaných PHB liposomů s vybranými typy vodných extraktů.

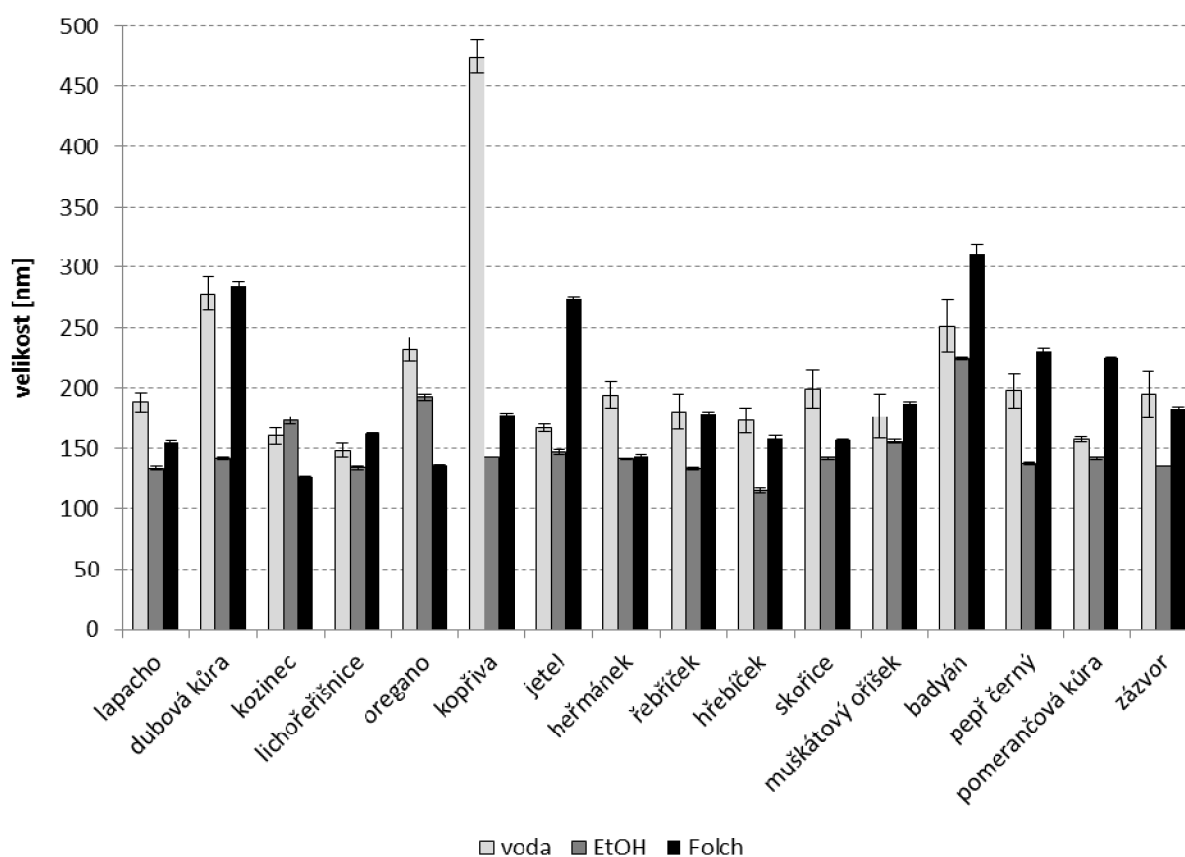
Všechny vzorky byly měřeny nejméně třikrát, výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 12 a Grafech 7 a 8 jako průměrné hodnoty a směrodatné odchylky měření.

Tabulka 12: Průměrná velikost a index polydisperzity liposomových částic

vzorek	velikost částic [nm]	PdI
prázdné částice	115,3 ± 3,3	0,206
bílý čaj	249,2 ± 12,5	0,556
zelený čaj	328,2 ± 16,4	0,362
černý čaj	262,3 ± 13,1	0,438
honeybush	294,1 ± 14,7	0,516
lapacho	188,4 ± 7,6	0,269
roiboos červený	314,4 ± 15,6	0,452
roiboos zelený	319,2 ± 16,0	0,590
guarana	337,2 ± 16,9	0,283
matcha	171,4 ± 6,8	0,334
dubová kůra	278,0 ± 3,6	0,446
jitrocel	480,2 ± 19,2	0,251
levandule	198,3 ± 7,9	0,131
černý bez	220,5 ± 8,8	0,262
rozmarýn	208,4 ± 8,3	0,296
mateřídouška	300,2 ± 12,0	0,285
echinacea	197,4 ± 38,7	0,236
šalvěj	233,2 ± 9,3	0,282
kozinec	160,4 ± 0,4	0,175
lichořeřišnice	148,5 ± 0,8	0,168
oregano	231,7 ± 9,8	0,416
fenykl	219,3 ± 8,8	0,231
kopřiva	474,3 ± 13,7	0,172
jetel	166,5 ± 3,1	0,249
heřmánek	194,1 ± 10,8	0,306
řebříček	180,3 ± 14,8	0,301
hřebíček	172,7 ± 10,3	0,239
skořice	199,1 ± 15,7	0,391
muškátový oříšek	176,6 ± 17,5	0,195
badyán	251,2 ± 21,1	0,237
pepř černý	197,9 ± 14,1	0,181
pomerančová kůra	157,9 ± 0,6	0,182
zázvor	194,5 ± 19,8	0,306
lesní plody	237,0 ± 1,9	0,199
mrkev	157,8 ± 1,3	0,233

Velikost všech liposomů s vodnými extrakty nepřekročila hodnotu 500 nm. Stejně jako u chitosanových částic byly i prázdné liposomy vyhodnoceny jako nejmenší (115 nm), po enkapsulaci aktivní látky se průměrná velikost zvyšovala. Hodnoty indexu polydisperzity byly výrazně nižší, než u chitosanových částic. Vybrané vzorky lze z hlediska Pdl považovat za uniformní (prázdné liposomy, liposomy + levandule, kozinec, fenykl, kopřiva, jetel, hřebíček, muškátový oříšek, badyán, pepř, pomerančová kůra, lesní plody, mrkev). Velikost částic může být dále upravována pomocí extrudéru, tímto způsobem dosáhnout uniformity částicové suspenze i u ostatních vzorků [184].

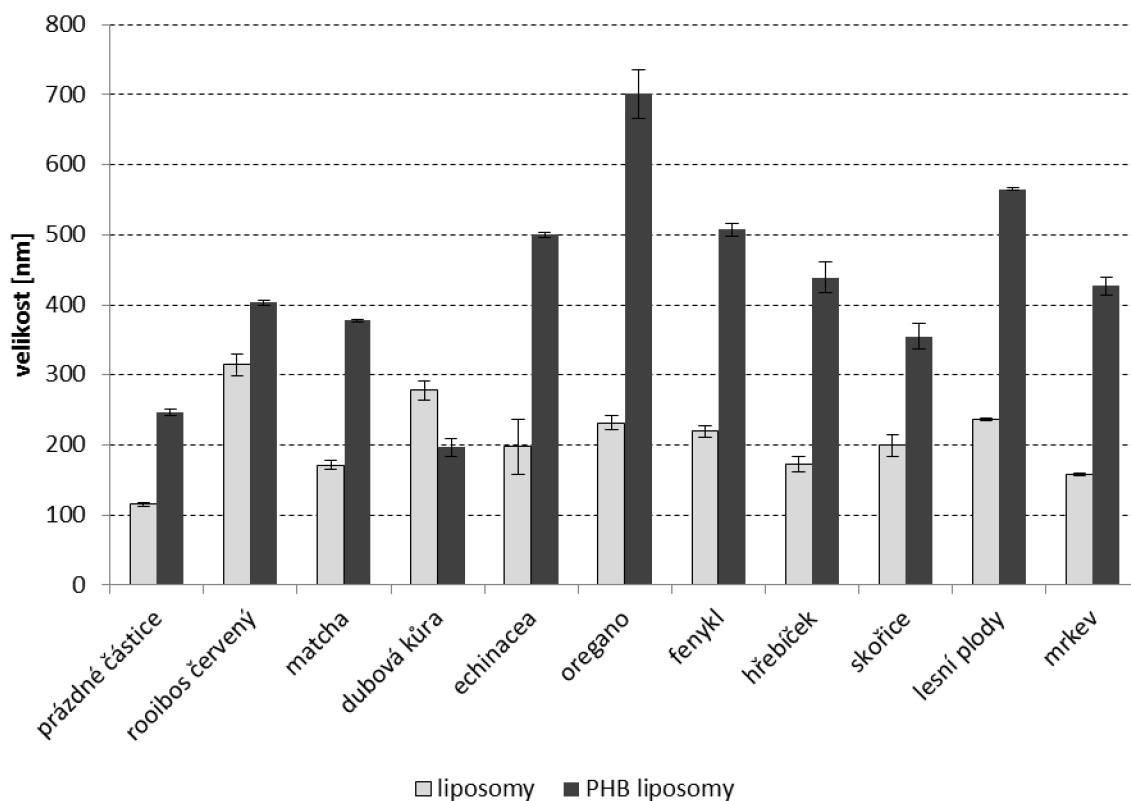
Z výsledků měření velikosti částic při enkapsulaci různých typů extraktů lze říct, že použité rozpouštědlo pravděpodobně nemá výrazný vliv na velikost výsledného liposomu. Hodnoty průměrných velikostí liposomů s enkapsulovanými vodnými, ethanolickými i lipidickými extrakty se obecně lišily pouze minimálně (Graf 7).



Graf 7: Porovnání velikosti liposomů při enkapsulaci různých typů extraktů

Průměrná velikost částice byla porovnána i mezi liposomy a kombinovanými PHB liposomy s vybranými vodnými extrakty. Z grafu 8 lze vyčíst, že inkorporace 20% polyhydroxybutyrátu výrazně navyšuje velikost částice, na dvojnásobek až trojnásobek velikosti původního liposomu. Taktéž index polydisperzity nabýval u PHB liposomů téměř dvojnásobných hodnot vyjma Pdl prázdných PHB liposomových částic (0,238).

Velikost PHB liposomových částic je vyšší, než u klasických liposomů, přesto však nepřesahuje hranici 700 nm. Tyto částice proto mohou své uplatnění nalézt v kosmetických přípravcích.



Graf 8: Porovnání velikosti liposomů a PHB liposomů s enkapsulovanými vodnými extrakty

5.4 Stanovení elektrokinetické stability částic pomocí zeta potenciálu

Zeta potenciál je elektrický potenciál v rovině skluzu, která je hranicí obklopující kapalnou vrstvu média pohybující se s částicí v suspenzi. Zeta potenciál je klíčový parametr stability částicové suspenze. Obecně je za hranici stability považována hodnota +30 mV, resp. -30 mV. Čím vyšší je absolutní hodnota zeta potenciálu, tím je suspenze stabilnější [184]. Pro stanovení zeta potenciálu připravených částicových suspenzí byl v této práci použit přístroj Malvern ZetaSizer Nano.

5.4.1 Chitosanové částice

Zeta potenciál byl stanoven u prázdných chitosanových částic a u chitosanových částic s vybranými vodnými extrakty vzorků. Měření bylo provedeno třikrát a výsledky jsou uvedeny v Tabulce 13 jako průměrné hodnoty ze všech měření a směrodatné odchylky.

Tabulka 13: Hodnoty zeta potenciálu chitosanových částic

vzorek	zeta potenciál [mV]
prázdňé částice	30,3 ± 0,8
bílý čaj	22,9 ± 0,1
zelený čaj	26,2 ± 0,2
černý čaj	20,3 ± 0,4
rooibos zelený	19,2 ± 0,5
rooibos červený	22,6 ± 0,2
honeybush	29,4 ± 0,8
lapacho	39,4 ± 2,2
guarana	7,5 ± 0,5

vzorek	zeta potenciál [mV]
levandule	-4,6 ± 0,2
jitrocel	-2,0 ± 2,9
mateřídouška	1,4 ± 2,0
rozmarýn	7,3 ± 1,3
echinacea	33,9 ± 0,6
černý bez	-2,4 ± 4,7
šalvěj	13,1 ± 0,4
hřebíček	5,8 ± 1,3
zázvor	8,6 ± 1,8
skořice	-0,6 ± 2,8

Hodnota zeta potenciálu prázdných chitosanových částic těsně přesáhla hranici stability +30 mV, tyto částice tedy lze považovat za stabilní. Ostatní vzorky chitosanových částic s enkapsulovanými extrakty (vyjma vzorky echinacey a lapacha) měly hodnoty zeta potenciálu v rozmezí nestability (-30 až +30 mV) a lze tedy předpokládat agregaci částic, což koresponduje s výsledky měření velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla. Vzhledem ke všem výsledkům měření je použita příprava chitosanových částic s enkapsulovanými extrakty metodou sonikace méně vhodnou alternativou.

5.4.2 Liposomy a kombinované liposomy

Zeta potenciál byl stanoven u liposomů s vodnými extrakty, pro porovnání následně i u liposomů s extrakty lipidů a organickými extrakty. Porovnávána byla i koloidní stabilita liposomů a kombinovaných PHB liposomů s vybranými typy vodných extraktů.

Měření bylo provedeno třikrát, výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 14 a Grafech 9 a 10 jako průměrné hodnoty a směrodatné odchylky měření.

Tabulka 14: Hodnoty zeta potenciálu liposomových částic

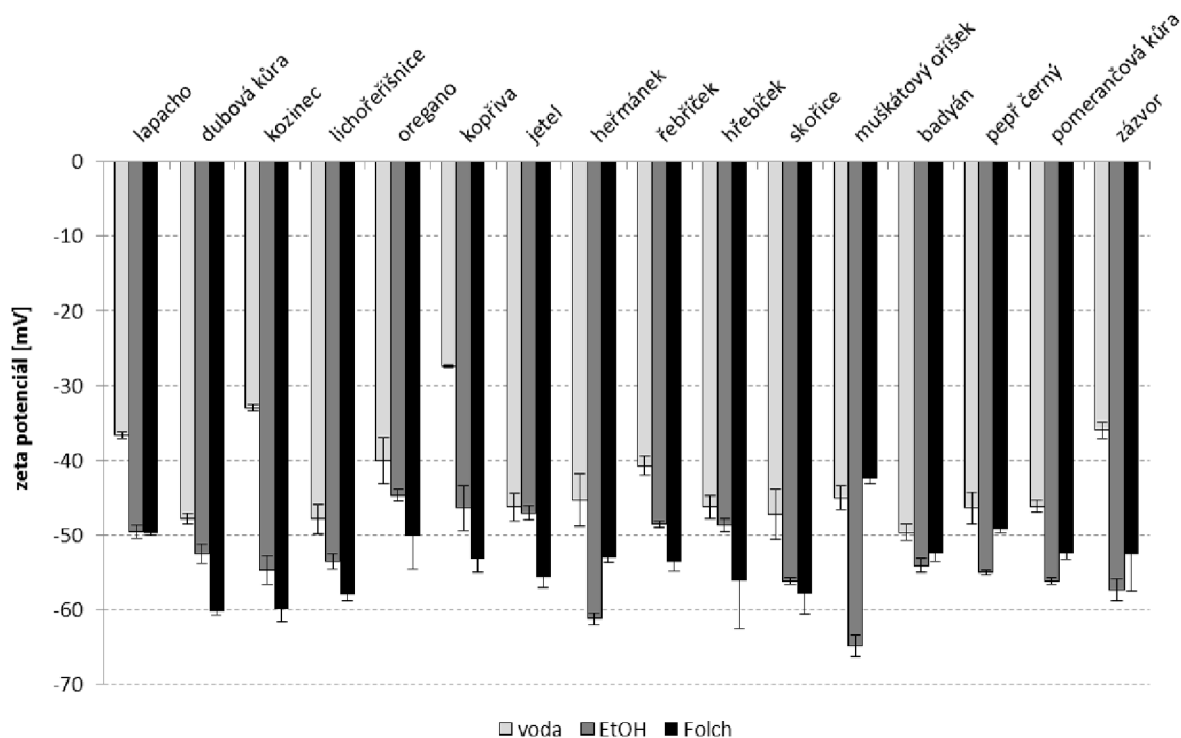
vzorek	zeta potenciál [mV]
prázdné částice	-54,3 ± 0,6
bílý čaj	-38,5 ± 0,4
zelený čaj	-37,4 ± 2,1
černý čaj	-35,5 ± 2,1
honeybush	-37,5 ± 1,5
lapacho	-36,7 ± 0,4
roiboos červený	-47,0 ± 1,3
roiboos zelený	-38,5 ± 0,2
guarana	-36,1 ± 0,7
matcha	-41,8 ± 0,3
dubová kůra	-47,8 ± 0,7
jitrocel	-39,7 ± 0,1
levandule	-35,2 ± 2,8
černý bez	-43,1 ± 0,4
rozmarýn	-35,0 ± 1,9
mateřídouška	-35,6 ± 2,4
echinacea	-41,7 ± 3,5

vzorek	zeta potenciál [mV]
šalvěj	-48,9 ± 2,4
kozinec	-33,0 ± 0,5
ličořeřišnice	-47,9 ± 2,0
oregano	-40,0 ± 3,1
fenykl	-32,5 ± 0,3
kopřiva	-27,4 ± 0,2
jetel	-46,3 ± 1,9
heřmánek	-45,3 ± 3,5
řebříček	-40,7 ± 1,2
hřebíček	-46,3 ± 1,5
skořice	-47,2 ± 3,4
muškátový oříšek	-45,1 ± 1,6
badyán	-49,7 ± 1,1
pepř černý	-46,4 ± 2,1
pomerančová kůra	-46,2 ± 0,8
zázvor	-36,0 ± 1,1
lesní plody	-37,9 ± 0,6
mrkev	-41,4 ± 1,9

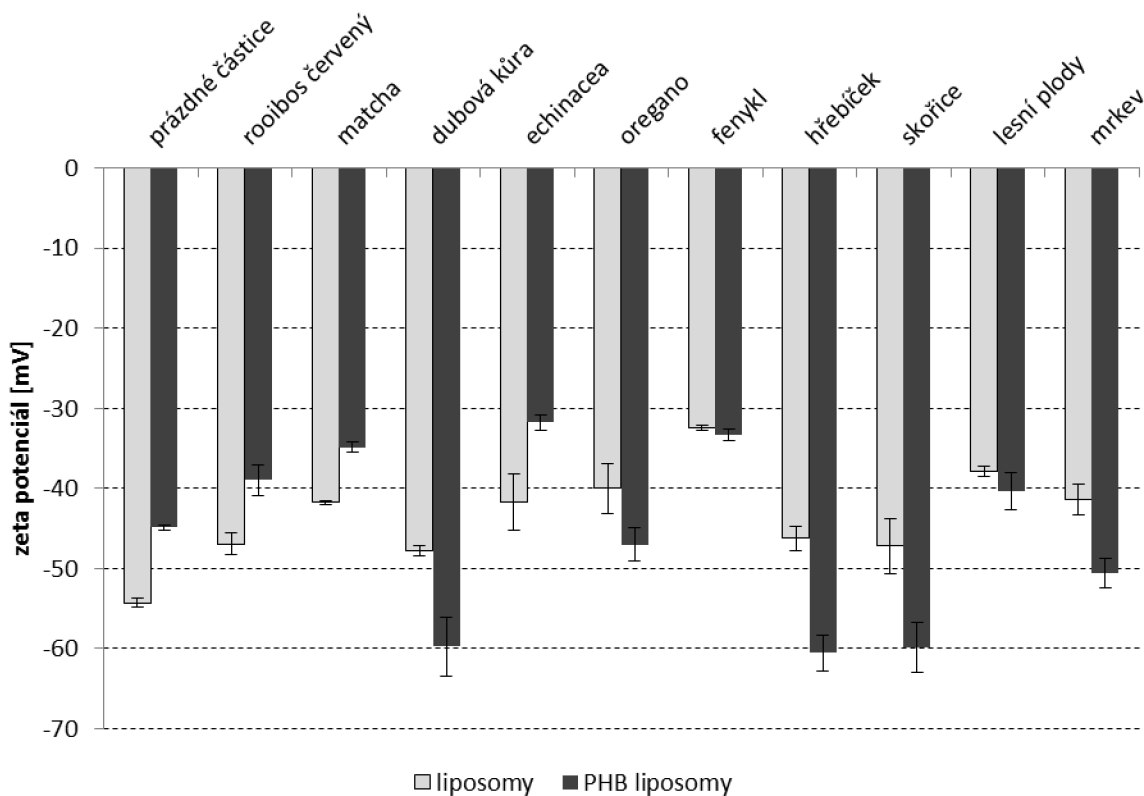
Všechny liposomové částice s enkapsulovanými vodnými extrakty mohou být podle hodnot zeta potenciálu považovány za stabilní. Výjimkou byly pouze liposomy s extraktem z kopřivy, hodnota jejich zeta potenciálu těsně nedosáhla na hranici stability. Prázdné liposomové částice vykazovaly hodnotu zeta potenciálu okolo 54 mV, jedná se tedy o velice stabilní částicovou suspenzi.

Podobně jako v případě měření velikosti částic bylo i zde potvrzeno, že typ enkapsulovaného extraktu nemá výrazný vliv na stabilitu liposomu (Graf 9). Výjimku tvořily pouze liposomy s extraktem z kopřivy, použití ethanolickeho a lipidického extraktu způsobilo významný posun hodnoty zeta potenciálu do oblasti stability. U ostatních částic došlo při použití organických extraktů pouze k menšímu navýšení absolutní hodnoty zeta potenciálu (rozdíl do 10 mV).

U většiny kombinovaných PHB liposomů došlo ke zvýšení koloidní stability částicové suspenze oproti obyčejným liposomům. Výjimku tvořily pouze prázdné částice a vzorky s rooibosem červeným, matchou a echinaceou. Přesto zeta potenciál všech připravených PHB liposomů vykazoval hodnoty menší než -30 mV a částice proto mohou být považovány za stabilní (Graf 10).



Graf 9: Porovnání hodnot zeta potenciálu liposomů s různými typy enkapsulovaných extraktů



Graf 10: Porovnání hodnoty zeta potenciálu liposomů a PHB liposomů s enkapsulovanými vodními extrakty

5.5 Stanovení dlouhodobé stability částic

5.5.1 Stanovení stability částic v modelových potravinách

Mikrobiální aktivita je nejčastěji se vyskytující způsob poškození potravin a je zodpovědná za ztrátu jejich sensorické kvality a bezpečnosti konzumace. Obava z patogenních mikroorganismů znehodnocujících potraviny narůstá se stále častějším výskytem alimentárních onemocnění. Možným řešením je použití přírodních antibakteriálních sloučenin, jako jsou výtažky z bylin a některých typů koření. Tyto extrakty mohou potravinám dodat charakteristickou vůni a chuť a navíc vykazují antioxidační a antimikrobiální aktivitu přispívající k udržitelnosti potravin [185].

Pro přípravu liposomů a stanovení jejich stability v modelových potravinách bylo vybráno celkem 15 vzorků čajů, kůr, bylin či koření. Vzorky byly zvoleny podle výsledků stanovení množství polyfenolů, antioxidační aktivity, sensorických vlastností a také podle antimikrobiálního potenciálu vzorků.

Pro testování dlouhodobé stability částic v potravinách byly liposomy s enkapsulovaným vodným extraktem aktivních sloučenin inkubovány v různých typech modelových potravin (kap. 4.8.4.1). Po jednom, dvou, čtyřech, šesti a osmi týdnech bylo spektrofotometricky stanoveno uvolněné množství polyfenolů (metodou uvedenou v kap. 4.6.1). Výsledky byly následně porovnány s enkapsulovaným množstvím polyfenolů do liposomů. Procentuální hodnota uvolněného množství polyfenolů je pro každý vzorek uvedena v tabulkách 15 a 16.

Tabulka 15: Množství uvolněných polyfenolů z celkového množství enkapsulovaného do liposomů, modelové potraviny 1 a 2

Uvolněné polyfenoly	MP 1 [%]					MP 2 [%]					
	Počet týdnů	1	2	4	6	8	1	2	4	6	8
bílý čaj		1,7	4,0	4,9	12,6	25,8	2,2	5,6	7,8	13,8	24,9
zelený čaj		1,3	10,1	16,0	24,4	35,7	1,4	1,6	9,5	22,3	33,3
černý čaj		0,3	1,1	4,0	15,2	22,4	0,9	1,1	3,8	13,5	29,6
rooibos červený		4,5	18,1	24,0	39,6	55,9	1,8	12,7	27,6	44,0	69,7
matcha		0,7	3,8	4,9	12,6	21,3	2,5	5,8	8,6	19,1	29,5
dubová kůra		3,0	3,9	3,9	23,7	30,9	3,2	7,9	10,5	33,4	39,0
černý bez		1,6	3,6	4,5	16,5	30,2	0,5	4,2	4,2	17,8	28,9
echinacea		0,0	2,3	4,3	14,7	37,0	0,2	2,1	4,0	12,9	28,6
oregano		0,3	5,3	6,0	12,4	21,2	1,0	6,8	6,8	13,1	26,8
fenykl		2,8	4,6	5,0	16,4	30,7	2,9	5,2	6,1	14,7	28,0
citronová tráva		0,0	10,5	23,7	39,7	70,0	0,0	5,3	30,3	7,2	0,0
hřebíček		0,0	6,9	7,2	11,5	26,9	0,0	7,7	8,3	18,4	38,7
skořice		0,0	0,0	7,2	24,1	35,2	0,0	0,0	5,2	24,1	40,7
zázvor		0,3	1,0	1,8	9,6	19,6	2,3	5,1	7,5	12,0	19,9
kurkuma		0,0	0,0	12,0	26,3	34,7	0,0	0,0	4,2	16,5	32,6

MP modelová potravina

Ve vodné modelové potravine (MP 1) vykazovaly částice výbornou stabilitu. Během 2 měsíců skladování se u většiny vzorků z liposomů uvolnilo méně než 40% enkapsulovaných polyfenolů. Výjimku tvořily pouze vzorky rooibosu červeného a citronové trávy, kde došlo k vyššímu uvolnění aktivní látky. Z těchto výsledků lze usuzovat, že připravené liposomy jsou vhodné pro vodné potraviny s pH > 4,5.

U modelové kyselé potraviny (MP 2) došlo k mírně vyššímu uvolnění aktivní látky z liposomů než v případě MP 1. Přesto však lze liposomy považovat za stabilní i v prostředí s pH < 4,5, protože během dvou měsíců skladování nedošlo u většiny vzorků k uvolnění ani poloviny enkapsulované látky. U vzorku citronové trávy se hodnoty uvolněných polyfenolů v průběhu měření snižovaly, v tomto případě pravděpodobně docházelo k jejich degradaci.

Tabulka 16: Množství uvolněných polyfenolů z celkového množství enkapsulovaného do liposomů, modelové potraviny 3 a 4

Uvolněné polyfenoly	MP 3 [%]					MP 4 [%]					
	Počet týdnů	1	2	4	6	8	1	2	4	6	8
bílý čaj		1,0	4,9	5,6	13,0	31,6	5,8	6,9	9,4	42,0	88,8
zelený čaj		5,1	12,7	19,0	40,5	62,7	18,0	20,0	33,1	79,5	TA
černý čaj		1,1	3,1	5,8	15,7	39,8	10,7	16,6	31,7	TA	-
roiboos červený		1,4	19,9	29,4	49,8	26,2	38,9	49,3	75,1	TA	-
matcha		2,7	6,1	7,8	23,7	37,7	3,9	8,3	8,4	46,9	TA
dubová kůra		3,6	7,2	9,4	24,2	41,2	15,9	28,2	34,3	54,3	TA
černý bez		1,3	3,4	5,6	16,6	30,7	4,9	9,1	13,3	49,6	TA
echinacea		0,4	2,7	2,7	16,9	39,4	5,9	8,2	12,7	48,7	TA
oregano		5,8	6,8	7,8	15,9	30,6	6,9	9,3	10,2	37,9	TA
fenykl		4,1	5,2	7,7	25,4	46,9	33,9	50,8	70,7	TA	-
citronová tráva		23,7	25,0	38,2	76,9	TA	TA	-	-	-	-
hřebíček		0,0	7,2	7,4	27,4	55,0	7,1	7,7	17,7	51,9	TA
skořice		0,0	0,0	8,7	25,3	38,1	44,0	44,6	50,6	TA	-
zázvor		0,6	2,5	3,1	10,4	27,8	5,1	8,1	10,8	47,7	15,8
kurkuma		0,0	0,0	11,3	30,4	44,7	7,9	28,3	30,4	94,7	58,9

MP modelová potravina
 TA uvolnění veškeré enkapsulované látky
 - neměřeno

Stabilita liposomů v alkoholovém prostředí modelové potraviny č. 3 byla nižší než v předchozích případech. Z většiny testovaných vzorků se po dvou měsících inkubace uvolnilo 30-50% enkapsulovaného množství polyfenolů. Méně stabilní byly pouze vzorky zeleného čaje, hřebíčku a citronové trávy. U citronové trávy došlo k uvolnění veškerých enkapsulovaných polyfenolů. Na základě těchto výsledků lze považovat tento typ liposomu za vhodný i pro alkoholové potraviny.

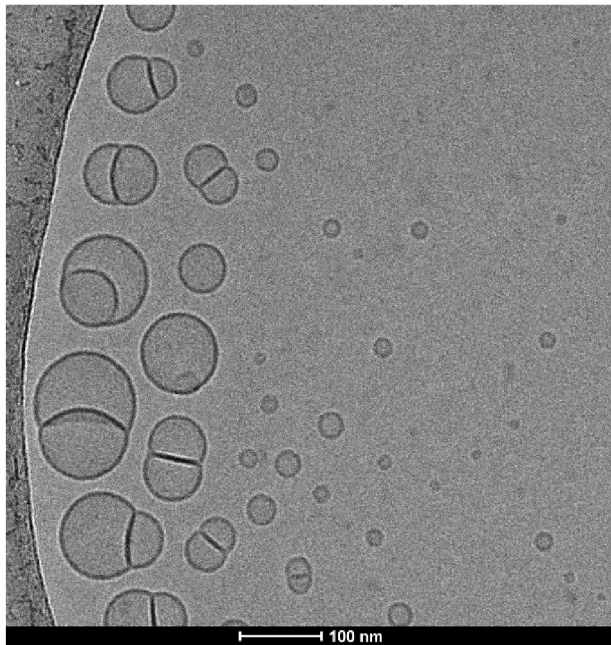
Naopak nevhodné je použití liposomů v případě tukových potravin. Za těchto podmínek dochází k částečnému rozpouštění liposomů v lipidické fázi modelové potraviny a tedy k rychlému uvolnění enkapsulované aktivní látky. Po dvou měsících inkubace bylo téměř ze všech vzorků uvolněno veškeré množství enkapsulovaných polyfenolů. Navíc v tomto prostředí patrně opět docházelo k degradaci aktivní látky, hodnoty naměřených polyfenolů se v průběhu měření snižovaly.

Na základě naměřených dat lze říct, že připravené liposomy jsou vhodné pro použití jako aditiva do potravin s neutrálním a mírně kyselým prostředím, případně do alkoholových potravin, kde částice vykazují dobrou stabilitu. Do úvahy přichází i použití v kosmetických výrobcích na bázi vody, případně gelu, nikoliv v tukových přípravcích.

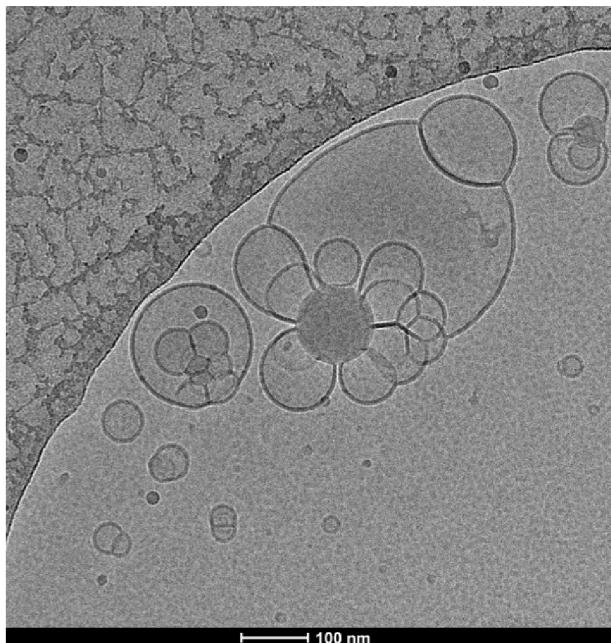
5.6 Analýza liposomů a PHB liposomů pomocí kryo-TEM mikroskopie

Struktura připravených liposomů a PHB liposomů byla pozorována s využitím kryo-elektronové transmisní mikroskopie. Pro pořízení těchto snímků byly použity nefiltrované částicové suspenze, samotné částice proto nemají uniformní velikost.

Snímek A zobrazuje samotné liposomové částice, zatímco na snímku B se nacházejí kombinované PHB liposomy. Získané snímky potvrzují inkorporaci PHB do liposomových částic. Tmavší struktury na snímku B představují polyhydroxybutyrát obklopený vrstvou fosfolipidů. Fosfolipidová část liposomů i nadále funguje jako transportní mechanismus pro enkapsulované aktivní látky. Inkorporace polyhydroxybutyrátu navíc zlepšuje stabilitu částice.



A

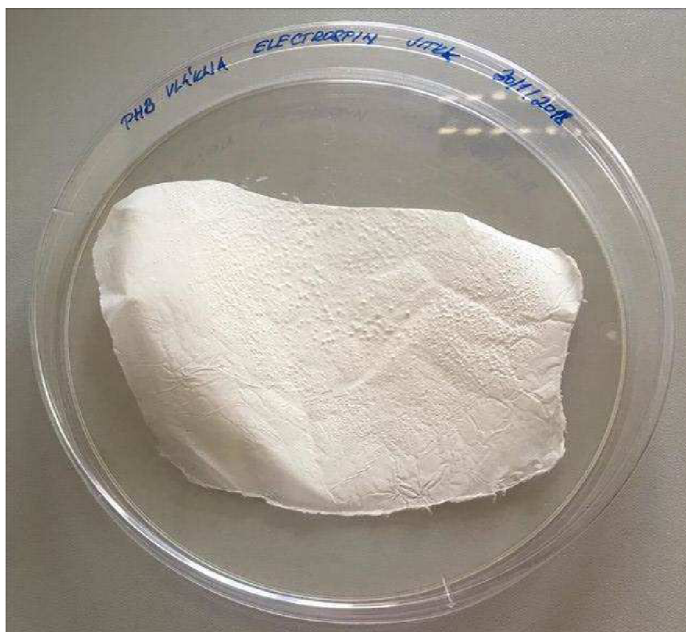


B

Obrázek 19: Kryo-TEM snímky (200 kV) liposomů (A) a PHB liposomů (B). Zvětšeno 62 000x (A) a 50 000x (B)

5.7 Příprava vláken

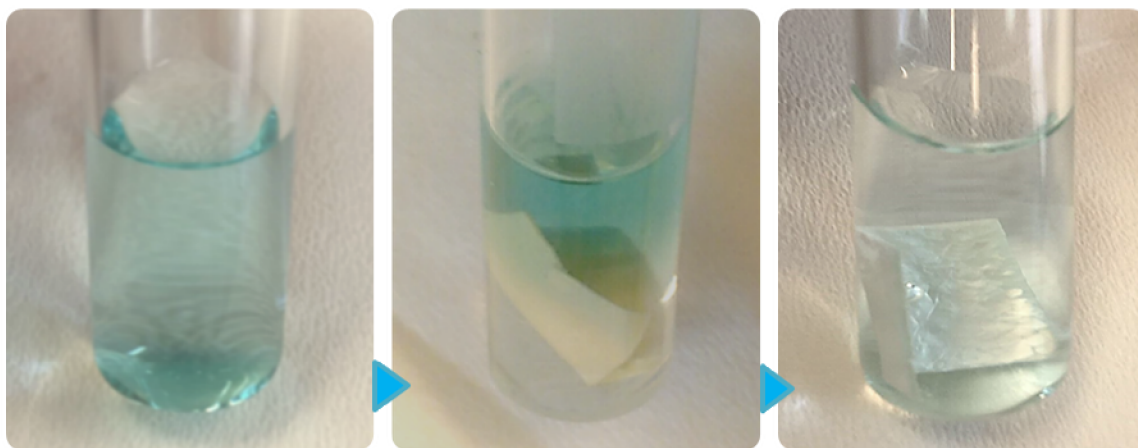
Vlákna byla připravována ze zásobního roztoku polyhydroxybutyrátu metodou elektrospinningu (kap. 4.9.2). Získané vláknenné textilie byly odděleny z kolektoru a uschovávány ve sterilních Petriho miskách při laboratorní teplotě. Kromě samotných PHB vláken byly připraveny i vzorky s přídavkem lipidických extraktů z hřebíčku, skořice, dubové kůry, oregana, kopřivy, jetele, heřmánku a řebříčku. Připravená vlákna byla následně podrobena analýze na FTIR-ATR a poté byly zkoumány jejich antioxidační a antimikrobiální účinky. Rovněž byl ověřen jejich případný toxický efekt při kultivaci s lidskými buněčnými kulturami.



Obrázek 20: PHB vlákna připravená elektrospinningem

5.8 Stanovení antioxidačních vlastností vláken

U vzorků vláken s přídavkem lipidických extraktů byla stanovena jejich antioxidační aktivita metodou ABTS (kap. 4.10.1). Na Obrázku 21 je znázorněn průběh zhášení radikálového kationtu $ABTS^{•+}$ působením vláken s lipidickým extraktem z hřebíčku.



Obrázek 21: Průběh sledování antioxidačních vlastností vláken metodou ABTS

Pro každý vzorek vláken bylo stanovení antioxidačních vlastností provedeno třikrát. Výsledné průměrné hodnoty jsou vyjádřeny jako množství ekvivalentní aktivity Troloxu a vztaženy na 1 cm² vláknenné tkaniny (Tabulka 17).

Tabulka 17: Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků vláken

vzorek vláken	TEAC [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ vláken]
dubová kůra	461,4 \pm 12,1
skořice	470,8 \pm 14,7
hřebíček	444,2 \pm 9,8
oregano	455,0 \pm 6,7
kopřiva	239,1 \pm 16,7
jetel	126,7 \pm 6,5
heřmáněk	121,8 \pm 17,3
řebříček	252,3 \pm 5,8

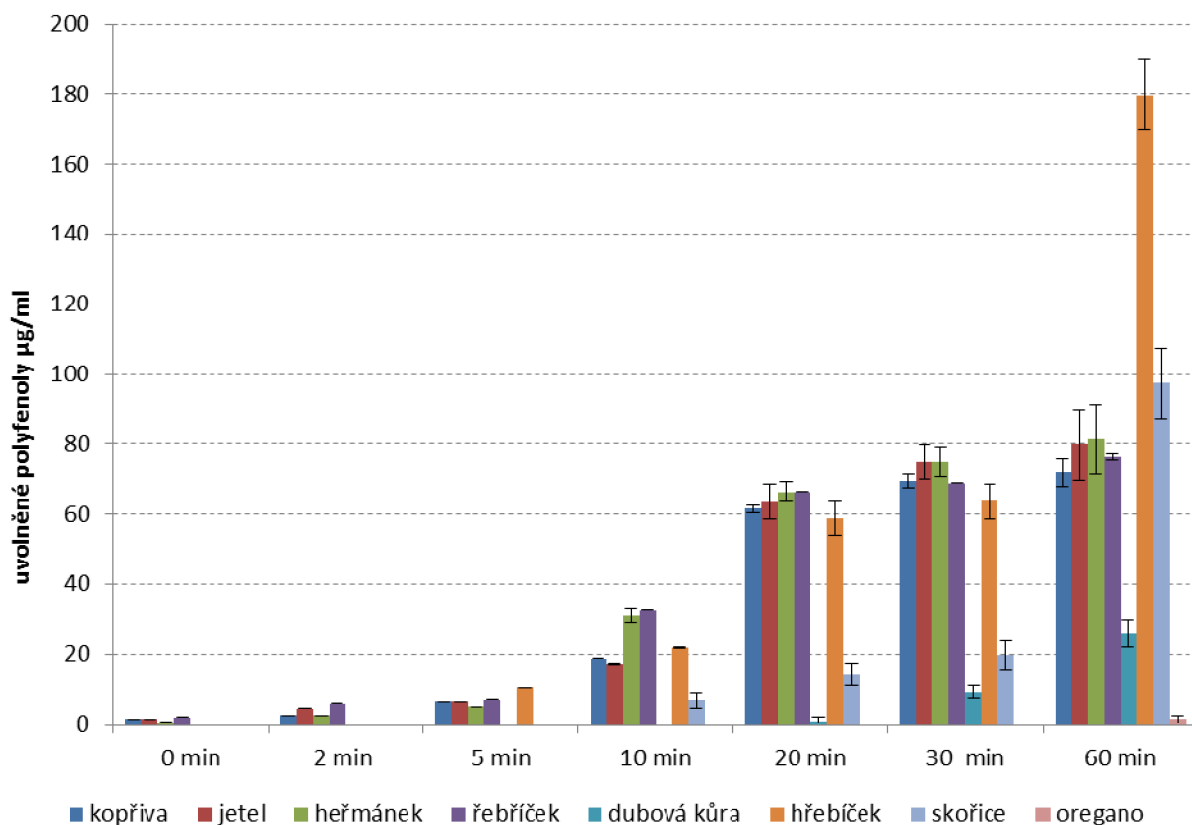
Z výsledků je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitou se vyznačovaly vzorky vláken obsahující lipidický extrakt ze skořice. Podobných hodnot dosahovaly i vlákna s extrakty dubové kůry, hřebíčku a oregana. U ostatních vzorků byla antioxidační aktivita několikanásobně nižší. Tyto výsledky korespondují se stanovením celkového množství polyfenolických sloučenin v lipidických extraktech (kap. 5.1.2). Vlákna obsahující extrakty s vysokým obsahem antioxidačně působících fenolických sloučenin vykazují vysoký antioxidační potenciál.

5.9 Sledování uvolňování aktivní látky z vláken

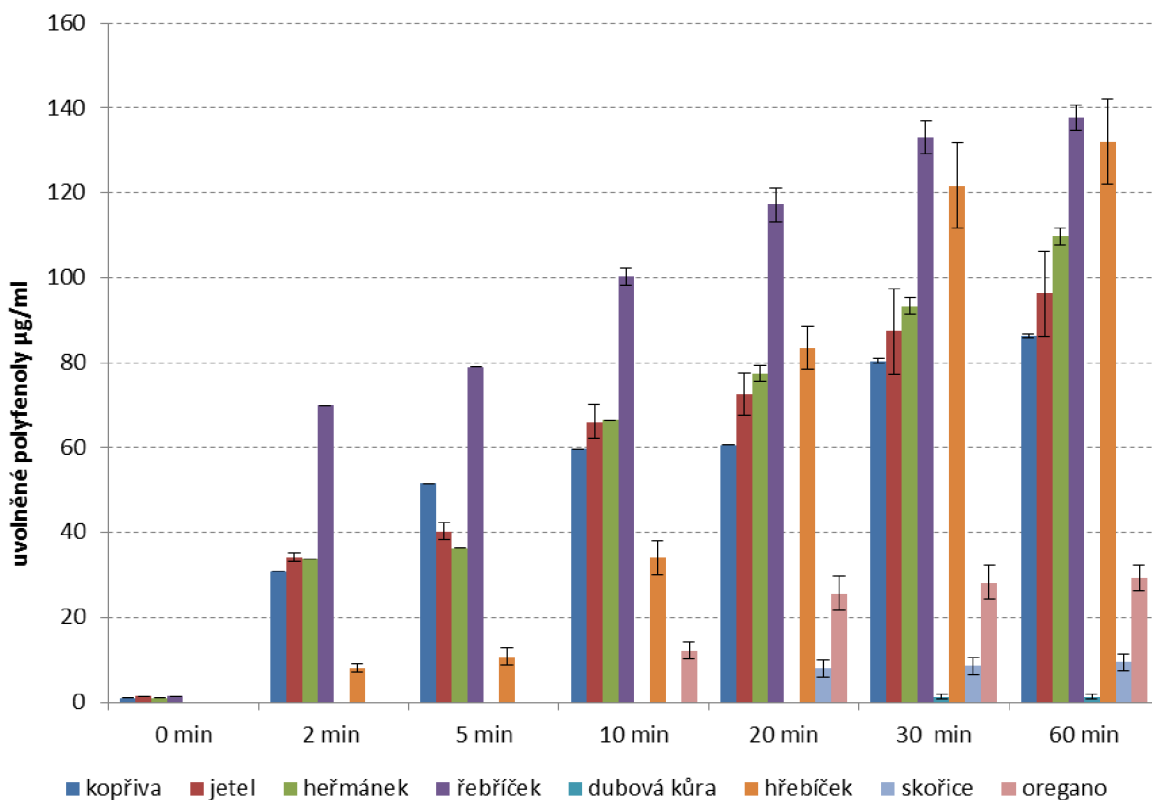
Průběh uvolňování antioxidačně působících látek z vláken do okolního prostředí byl sledován i pomocí spektrofotometrického stanovení polyfenolů. Vzorek vláken o velikosti 1 cm² byl ponořen do vody, případně ethanolu, a ve stanovených časových intervalech bylo měřeno množství uvolněných polyfenolických sloučenin (kap. 4.10.2). Vypočtené koncentrace polyfenolů ve vodném/ethanolickém prostředí jsou uvedeny v Grafech 11 a 12.

Z uvedených výsledků vyplývá, že více polyfenolických sloučenin se během krátkého časového úseku uvolnilo do ethanolu. To potvrzuje původní předpoklad, jelikož vlákna byla obohacena o lipidické extrakty a tedy především o lipofilní polyfenoly, rozpustné v organických rozpouštědlech.

Nejvíce polyfenolů se v případě vodného prostředí uvolnilo ze vzorku vláken s extraktem z hřebíčku, u ethanolu se jednalo o vzorek řebříčku. Naopak nejméně polyfenolů se v obou případech uvolnilo z vláken obsahujících lipidické extrakty dubové kůry, skořice a oregana, kde zřejmě dochází k silnější sorpci aktivních látek na vlákna. Pro budoucí praktické použití je vhodná taková kombinace vláknenného materiálu a extraktu, která umožní stabilitu během skladování a optimální uvolnění aktivní látky po aplikaci funkcionalizovaného materiálu.



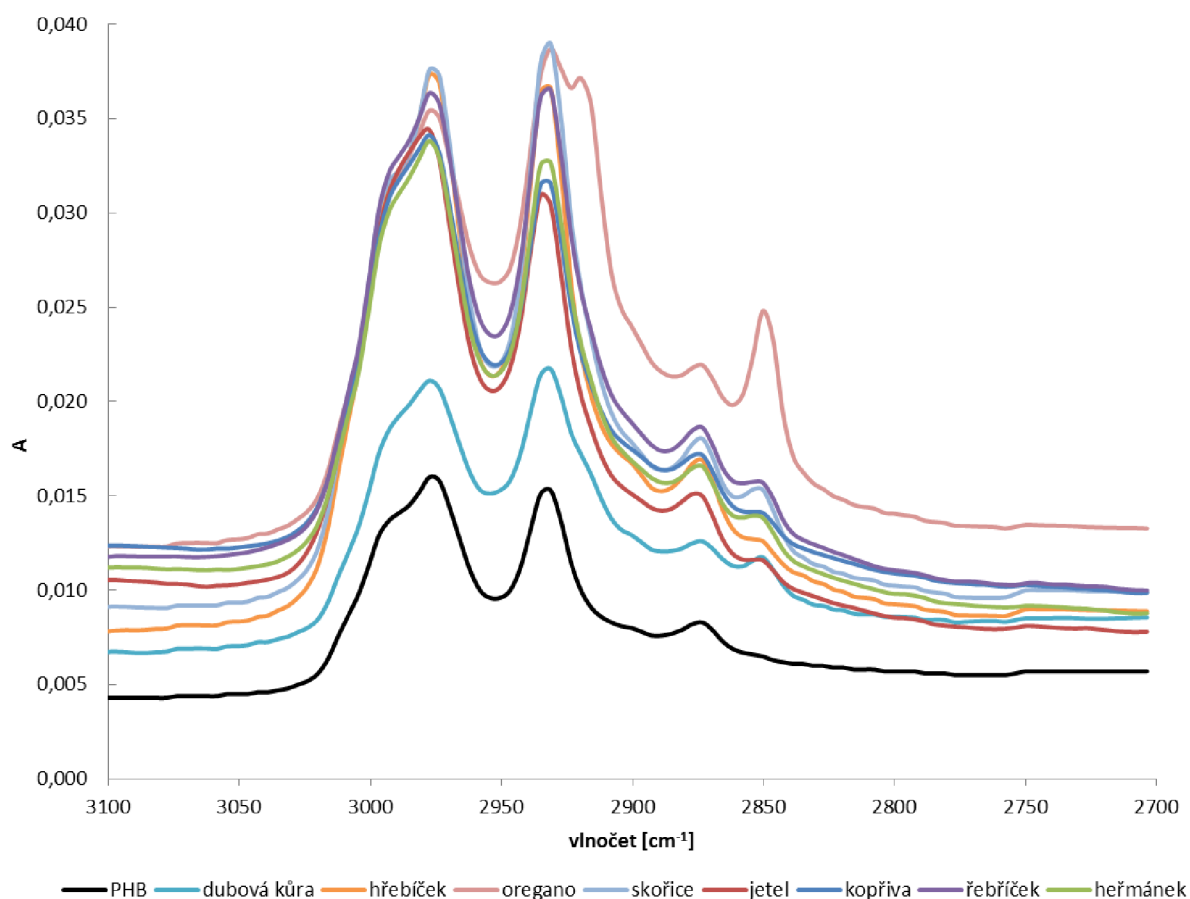
Graf 11: Množství polyfenolů uvolněných z vláken do destilované vody



Graf 12: Množství polyfenolů uvolněných z vláken do ethanolu

5.10 Analýza vláken pomocí FTIR-ATR

Za účelem ověření inkorporace aktivních složek do vláken byla samotná PHB vlákna i s vlákna s lipidickými extrakty analyzována pomocí techniky FTIR-ATR. Pro měření byla vybrána absorbance v rozsahu vlnočtů $4000-400\text{ cm}^{-1}$ s rozlišením 4 cm^{-1} . Významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky vláken byly zaznamenány v oblasti $3100-2800\text{ cm}^{-1}$. Spektra všech pozorovaných vláken zobrazuje Graf 13.



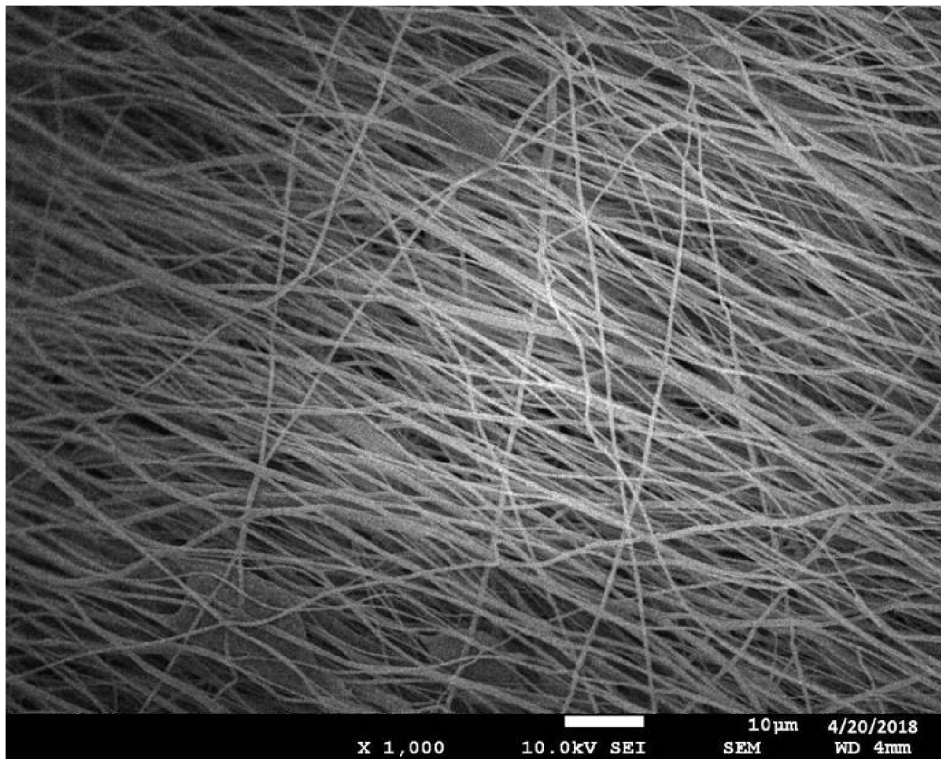
Graf 13: FTIR-ATR spektra jednotlivých vzorků vláken

Oblast vlnočtů $4000-2500\text{ cm}^{-1}$ odpovídá valenčním vibračním vazeb vodíku, u organických sloučenin se jedná především o vazby C-H, O-H a N-H. Oblast vlnočtů $3300-2700\text{ cm}^{-1}$ pak odpovídá vazbám C-H. Valenční vibrace C-H vazeb v aldehydických funkčních skupinách se projevuje při hodnotách vlnočtu 2850 cm^{-1} [186].

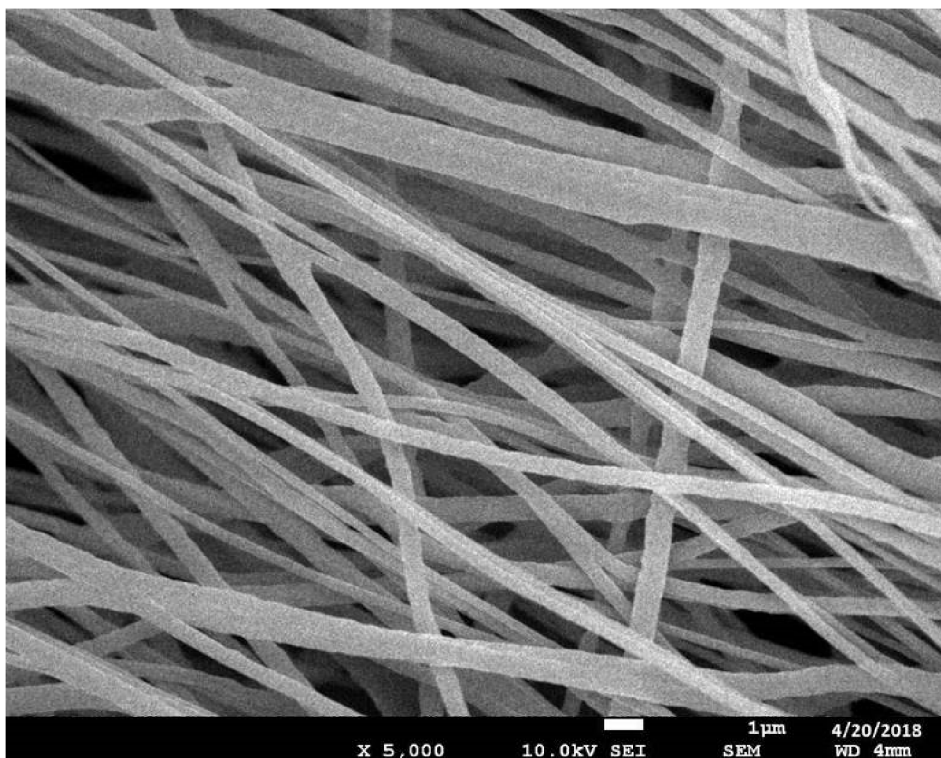
Lipidické extrakty izolované z různých přírodních materiálů jsou komplexní směsí velkého množství látek s různou strukturou. Chemicky se jednotlivé sloučeniny řadí mezi alkoholy, ethery, aldehydy, ketony, estery, aminy, amidy, fenoly a terpeny [187]. Rozdíl ve spektrech samotných vláken a vzorků s příměsí lipidického extraktu, naznačuje, že došlo k navázání aktivních látek z extraktů na polyhydroxybutyrátová vlákna. Pík v oblasti vlnočtu 2850 cm^{-1} ukazuje na navázání některých aldehydů z lipidických extraktů vzorků.

5.11 Analýza vláken pomocí SEM

Připravená PHB vlákna byla analyzována pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Následující snímky byly vytvořeny při urychlovacím napětí 10 kV a zvětšení 1000x a 5000x.



A



B

Obrázek 22 Snímek PHB vláken vytvořený pomocí SEM při zvětšení 1 000x (A) a 5 000x (B)

5.12 Stanovení antimikrobiálního a antimykotického účinku připravených preparátů

Nízkomolekulární sekundární metabolity jsou nezbytné pro odolnost rostlin vůči chorobám. Produkce a kumulace některých sekundárních metabolitů rostlin je indukována při napadení patogenním mikroorganismem a tyto metabolity jsou označovány jako fytoalexiny. Některé z fytoalexinů se vyznačují inhibiční aktivitou vůči celému spektru patogenů, jiné působí inhibičně jen na specifický druh mikroorganismu. Fenolické sloučeniny patří k sekundárním rostlinným metabolitům, jež přispívají k obraně rostlin před napadením. Antimikrobiální a antimykotický efekt fenolických fytoalexinů byl již mnohokrát experimentálně potvrzen [188, 189].

V této části práce byly připravené částice a vlákna, ale i samotné extrakty aktivních sloučenin, hodnoceny z hlediska jejich antimikrobiálního a antimykotického účinku. Pro testování byly použity jak metody difuzní, sledující vytvoření inhibičních zón při kultivaci na tuhém agaru, tak metody diluční. Principem dilučních metod je sledování změny koncentrace mikrobiální kultury měřené jako zákal v tekutém médiu. Testovacím organismem byl *Micrococcus luteus*, jako zástupce grampozitivních bakterií, *Serratia marcescens* jako zástupce gramnegativních bakterií a kvasinka *Candida glabrata*.

5.12.1 Jamková agarová difuzní metoda

Jamková agarová difuzní metoda je standardní metodou široce využívanou k prvotnímu screeningu antimikrobiálního potenciálu testovaných látek. Do agarové plotny porostlé mikroorganismem jsou sterilně vyhloubeny jamky, do nichž je napipetován přesný objem testované látky. Při následné inkubaci dochází k difundování testované látky v agarovém médiu a v případě pozitivního antimikrobiálního účinku k vytvoření inhibičních zón [118, 119]. Přesný postup metody je uveden v kapitole 4.11.2.2). Jamková agarová difuzní metoda byla využita k hodnocení antimikrobiálního potenciálu různých typů připravených extraktů. Pro porovnání účinnosti inhibice růstu bakterií byla nejprve sestavena řada roztoků standardního antimikrobiálního peptidu lysozymu o různých koncentracích (Tabulka 18).

Tabulka 18: Velikost inhibičních zón u různých koncentrací standardního roztoku lysozymu

roztok lysozymu [µg/ml]	velikost inhibiční zóny [mm]	
	ML	SM
0,5	0	0
10	1	0
25	2	0
50	3	0
100	4	1
250	7	4
500	9	6
750	11	9
1000	15	14

Extrakce fenolických sloučenin z rostlinné matrice je ovlivněna množstvím faktorů, především jejich chemickou povahou, použitou extrakční metodou a rozpouštědlem, dobou extrakce apod. Složení výsledného extraktu je tedy velmi proměnlivé a optimalizace přesných podmínek extrakčního procesu je zásadním bodem pro navržení vhodného preparátu s maximálním antimikrobiálním efektem [190].

Ze vzorku dubové, břízové a vrbové kůry byly připraveny různé typy extraktů, lišící se použitým rozpouštědlem (voda, methanol, ethanol, DMSO). Kromě vzorků extrahovaných po dobu 15 minut postupem uvedeným v kap. 4.5.1, byly pro porovnání připraveny vzorky s dobou extrakce 24 hodin. Získané extrakty aktivních látek byly použity pro stanovení antimikrobiálního účinku pomocí agarového difuzního testu. Součástí experimentů bylo vždy stanovení inhibičního účinku samotného rozpouštědla, které sloužilo jako blank. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 19.

Tabulka 19: Velikost inhibičních zón různých extraktů vzorků kůr

vzorek		velikost inhibiční zóny [mm]			vzorek		velikost inhibiční zóny [mm]		
		ML	SM	CG			ML	SM	CG
bříza	15 min	1,0	0,5	0,0	vrba	15 min	2,0	0,0	0,0
H ₂ O	24 hod	0,0	0,0	0,0	ethanol	24 hod	1,5	3,0	0,0
bříza	15 min	1,0	0,0	0,0	vrba	15 min	0,5	0,5	1,5
methanol	24 hod	1,0	2,5	0,0	DMSO	24 hod	1,0	1,5	1,0
bříza	15 min	1,5	0,0	0,0	dub	15 min	0,5	0,0	0,5
ethanol	24 hod	0,0	1,0	0,0	H ₂ O	24 hod	0,5	0,5	0,5
bříza	15 min	3,0	2,0	0,5	dub	15 min	1,0	0,0	0,0
DMSO	24 hod	3,5	0,0	0,0	methanol	24 hod	0,5	2,0	0,0
vrba	15 min	0,5	0,5	0,0	dub	15 min	3,0	0,5	0,0
H ₂ O	24 hod	0,0	0,0	0,5	ethanol	24 hod	1,0	1,5	0,5
vrba	15 min	0,0	0,0	1,5	dub	15 min	1,5	1,0	0,0
methanol	24 hod	0,0	1,0	0,0	DMSO	24 hod	2,5	0,0	1,0

ML *Micrococcus luteus*

SM *Serratia marcescens*

CG *Candida glabrata*

Z výsledků vyplývá, že vodné extrakty všech vzorků vykazovaly nulový, nebo jen minimální antimikrobiální účinek. Vhodnější variantou se jeví použití organických rozpouštědel, nezávisle na době trvání extrakce. Nejvyšší antimikrobiální potenciál vykazoval extrakt břízové kůry do dimethylsulfoxidu a ethanolický extrakt dubové kůry, oba shodně proti grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus*. Proti gramnegativní bakterii *Serratia* působil nejvíce inhibičně ethanolický extrakt z vrbové kůry. Žádný z použitých extraktů neměl podle difuzního testu výrazný inhibiční účinek proti kvasince *Candida*. Antimikrobiální účinek vzorků kůr byl následně ověřen i s pomocí dilučního testu. Výsledky tohoto stanovení korespondovaly s daty získanými difuzním testem. Diluční metoda nepotvrdila výrazný účinek žádného z extraktů vůči testovacím mikroorganismům.

U dalších vybraných vzorků byl pomocí difuzních metod porovnán antimikrobiální a antimykotický účinek připravených vodných, lipidických a případně methanolických extraktů (Tabulka 20). Z výsledků vyplývá, že žádný z použitých extraktů nevykazuje inhibiční efekt vůči gramnegativní bakterii *Serratia*, vyjma lipidického extraktu z pepře, hřebíčku a skořice. Zjištěná data potvrzují dříve experimentálně stanovený vyšší inhibiční účinek rostlinných sekundárních metabolitů vůči grampozitivním bakteriím oproti gramnegativním. Tento fakt je způsoben rozdílem stavby buněčné stěny u obou typů bakterií. Buněčná stěna gramnegativní bakterie obsahuje navíc vnější membránu s molekulami lipopolysacharidů, která funguje jako bariéra před prostupem rostlinných extraktů [191].

Vysoký inhibiční účinek proti grampozitivnímu druhu *Micrococcus* byl zjištěn u lipidického extraktu muškátového oříšku a dubové kůry. Obecně však testované extrakty vykazovaly nejvyšší inhibiční

účinek vůči kvasince *Candida*. Největší inhibiční zóny byly naměřeny u lipidického extraktu hřebíčku a oregana (Tabulka 20).

Tabulka 20: Velikost inhibičních zón různých extraktů vzorků bylin a koření

vzorek	velikost inhibiční zóny [mm]				vzorek	velikost inhibiční zóny [mm]			
	ML	SM	CG			ML	SM	CG	
badyán	VE	N	N	0,0	pepř	VE	N	N	0
	LE	0,0	0,0	0,0		LE	1,5	2,5	3
kozinec	VE	N	N	0,0	česnek	VE	N	N	1,5
	LE	1,0	0,0	0,0		ME	N	N	1,0
lapacho	VE	N	N	0,0	kurkuma	VE	N	N	2,0
	LE	0,0	0,0	0,0		ME	N	N	1,5
ličořeřišnice	VE	N	N	0,0	hřebíček	VE	N	N	5,0
	LE	0,0	0,0	0,0		LE	0,0	2,0	8,0
muškátový oříšek	VE	N	N	0,0		ME	N	N	3,5
	LE	0,5	0,0	0,0	VE	N	N	3,0	
oregano	VE	N	N	2,0	skořice	LE	0,0	3,0	8,0
	LE	5,0	0,5	6,0		ME	N	N	1,0
pomerančová kůra	VE	N	N	0,0	zázvor	VE	N	N	1,0
	LE	1,0	0,0	0,0		LE	0,5	0,0	0,0
dubová kůra	LE	3,0	0,0	0,0		ME	N	N	2,0

N neměřeno

ML *Micrococcus luteus*

VE vodný extrakt

SM *Serratia marcescens*

LE lipidický extrakt

CG *Candida glabrata*

ME metanolvý extrakt

Ačkoliv agarová jamková difuzní metoda patří mezi standardní metody pro posuzování antimikrobiálního potenciálu sloučenin, jedná se o pouze o orientační metodu. Připravené extrakty a především částice byly proto podrobeny antimikrobiálnímu testování v dilučním uspořádání.

5.12.2 Bujonová diluční metoda

Bujonová diluční metoda je jednou z nejzákladnějších metod pro testování citlivosti na antimikrobiální látky. Její podstatou je inkubace bakteriální či kvasinkové kultury s přesně definovaným množstvím testované látky a následné spektrofotometrické sledování inhibice růstu mikroorganismu [118, 119]. Přesný postup testování je uveden v kapitole 4.11.2.1. Bujonová diluční metoda byla použita k posouzení antimikrobiálního a antimykotického účinku samotných extraktů, částic s enkapsulovanými extrakty a také připravených vláken. Pro porovnání účinnosti inhibice růstu bakterií byla nejprve sestavena řada roztoků standardního antimikrobiálního peptidu lysozymu o různých koncentracích (Tabulka 21).

Tabulka 21: Antimikrobiální účinek různých koncentrací standardního roztoku lysozymu

roztok lysozymu [µg/ml]	nárůst buněk oproti blanku [%]		antimikrobiální účinek	
	ML	SM	ML	SM
0,5	98,0	99,8	-	-
10	85,4	99,9	+	-
25	76,7	90,7	+	-
50	71,9	82,6	+	+
100	66,3	72,2	+	+
250	56,4	62,2	++	+
500	43,9	49,4	++	++
750	26,2	38,3	+++	++
1000	5,0	11,0	+++	+++

ML <i>Micrococcus luteus</i>	-	stejný nárůst jako kontrola
SM <i>Serratia marcescens</i>	+	60-90% kontroly
	++	30-60% kontroly
	+++	0-30% kontroly

5.12.2.1 Stanovení antimikrobiálního a antimykotického účinku extraktů

U vzorků čajů a kůr byl porovnáván antimikrobiální účinek extraktů při použití různých typů rozpouštědel (kap. 4.5). Součástí experimentů bylo vždy stanovení inhibičního účinku samotného rozpouštědla, které sloužilo jako blank.

U extraktů vzorků čajů a kůr byl očekáván vysoký antimikrobiální účinek vzhledem k vysokému obsahu tříslovin v těchto vzorcích. Třísloviny jsou látky, které jsou schopné vytvářet komplexy s proteiny přítomnými v plazmatické membráně bakterií a způsobovat tak jejich inhibici [192]. Stejně jako při stanovení pomocí difuzní metody v předchozí kapitole (5.12.1), vzorky všech tří typů kůr nevykazovaly výrazný antimikrobiální efekt. Naproti tomu extrakty čajů působily inhibičně proti gramnegativní i grampozitivní bakterii (Tabulka 22). Vyšší antimikrobiální efekt byl vždy zaznamenán v případě použití extrakce do organického rozpouštědla, oproti neúčinným vodným extraktům. Nejvyšší inhibiční účinek vykazovaly extrakty černého čaje a medového keře honeybush. Alespoň částečný antimikrobiální účinek byl zaznamenán u všech připravených organických extraktů.

Methanol ani dimethylsulfoxid však není možné použít při aplikaci částic do potravin, tyto experimenty opět slouží jako model pro charakterizaci extraktů aktivních sloučenin. Proto bylo dále pracováno převážně s vodnými, případně etanolovými extrakty.

Tabulka 22: Porovnání antimikrobiálního účinku různých typu extraktů čajů

vzorek	rozpouštědlo	ML	SM	vzorek	rozpouštědlo	ML	SM
zelený čaj	voda	-	+	rooibos zelený	voda	-	-
	methanol	-	-		methanol	+	++
	DMSO	++	++		DMSO	++	++
černý čaj	voda	-	+	lapacho	voda	-	-
	methanol	++	+		methanol	+	+
	DMSO	+++	++		DMSO	++	++
bílý čaj	voda	-	-	honeybush	voda	-	+
	methanol	-	+++		methanol	++	++
	DMSO	+	+		DMSO	+++	++
rooibos červený	voda	-	-	guarana	voda	-	-
	methanol	-	+		methanol	+	+++
	DMSO	++	++		DMSO	+++	-

ML *Micrococcus luteus* - stejný nárůst jako kontrola
 SM *Serratia marcescens* + 60-90% kontroly
 ++ 30-60% kontroly
 +++ 0-30% kontroly

V dalším stanovení byly testovány vodné extrakty vybraných vzorků a porovnány z hlediska jejich inhibičního účinku vůči různým mikroorganismům. Z výsledků uvedených v Tabulce 23 vyplývá, že nejvyšší potenciál má vodný vzorek hřebíčku, který vykazoval určitý inhibiční efekt vůči všem testovaným mikroorganismům. Výrazné antimikrobiální účinky vykazoval vodný extrakt kopřivy, a to vůči oběma typům testovaných bakterií. Silně antimykoticky působily vzorky oregana, pepře, kurkumy a zázvoru.

Tabulka 23: Porovnání antimikrobiálního a antimykotického účinku vodných extraktů vzorků bylin a koření na různých mikroorganismech

vzorek	ML	SM	CG	vzorek	ML	SM	CG
badyán	-	+	+	jitrocel	-	-	N
kozinec	-	-	+	rakytník	-	++	N
lapacho	+	-	-	kopřiva	+++	++	N
lichořeřišnice	+	+	-	česnek	N	N	-
muškátový oříšek	-	-	+	hřebíček	+	+	++
oregano	+	-	++	kurkuma	N	N	+++
pepř	++	-	++	skořice	-	-	+
pomerančová kůra	-	-	+	zázvor	-	-	++

ML *Micrococcus luteus* - stejný nárůst jako kontrola
 SM *Serratia marcescens* + 60-90% kontroly
 CG *Candida glabrata* ++ 30-60% kontroly
 N nedetekováno +++ 0-30% kontroly

5.12.2.2 Stanovení antimikrobiálního a antimykotického účinku částic

Antimikrobiální, případně antimykotický efekt byl stanoven i u různých typů připravených částic s enkapsulovanými extrakty. Inhibiční efekt vůči mikroorganismům byl porovnáván mezi různými typy částic (chitosanové částice, liposomy, PHB liposomy) i mezi částicemi s různými typy enkapsulovaných extraktů (vodné, lipidické, ethanolové).

V Tabulce 24 jsou uvedeny výsledky stanovení antimikrobiálního efektu chitosanových částic a liposomů s enkapsulovanými vodnými extrakty vzorků čajů. Z naměřených dat vyplývá, že enkapsulace do částic zvyšuje inhibiční efekt vodných extraktů (kap. 5.12.2.1, Tabulka 22). Zároveň je patrné, že chitosanové částice mají vyšší antimikrobiální účinek než liposomy, a to i přes nižší enkapsulační účinnosti a horší stabilitu částic. Tento fakt je pravděpodobně způsoben chemickým charakterem samotného chitosanu. Díky svému kladnému náboji je chitosan schopen interakce se záporně nabitou buněčnou stěnou a plazmatickou membránou bakterie a způsobuje tak pokles osmotické stability a případně i ztrátu intaktosti membrány a vylití obsahu buňky do prostředí. Chitosan má navíc schopnost vstupovat do jádra bakterií a kvasinek a inhibovat syntézu mRNA a bílkovin vazbou na mikrobiální DNA [193].

Nejvyšší antimikrobiální potenciál proti *Serratia marcescens* byl zaznamenán u obou typů částic s enkapsulovaným extraktem bílého čaje a červeného rooibosu. Na grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus* měly oba typy částic nulový nebo minimální inhibiční účinek.

Tabulka 24: Porovnání antimikrobiálního účinku chitosanových a liposomových částic s vodnými extrakty vzorků

vzorek	chitosan		liposomy	
	ML	SM	ML	SM
zelený čaj	+	-	-	+
černý čaj	+	+	-	+
bílý čaj	+	++	-	++
rooibos červený	+	++	-	++
rooibos zelený	-	+	+	+
lapacho	-	-	+	+
honeybush	+	++	-	+
guarana	+	+	-	-

ML *Micrococcus luteus* - stejný nárůst jako kontrola

SM *Serratia marcescens*

+ 60-90% kontroly

++ 30-60% kontroly

+++ 0-30% kontroly

V dalším testování byl porovnán antimikrobiální účinek liposomů s různým typem enkapsulovaných extraktů (Tabulka 25). Alespoň částečný antimikrobiální efekt byl zaznamenán u všech typů extraktů, ve většině případů byly ethanolové a lipidické extrakty účinnější než vodné. Vyšší inhibiční efekt vzorků byl opět zaznamenán na grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus*. Mezi vzorky pak nejvyšší inhibiční účinek vykazovaly částice s extrakty hřebíčku, zázvoru, pomerančové kůry a kozince.

Tabulka 25: Porovnání antimikrobiálního účinku liposomů s enkapsulovanými různými typy extraktů

vzorek	extrakt	ML	SM	vzorek	extrakt	ML	SM
badyán	VE	+	++	muškátový oříšek	VE	++	+
	EE	+++	+++		EE	+++	++
	OE	+++	++		OE	+++	+++
dubová kůra	VE	+	+	oregano	VE	++	-
	EE	-	++		EE	++	++
	OE	+++	++		OE	++	++
hřebíček	VE	++	++	pepř	VE	++	++
	EE	+++	+++		EE	+	++
	OE	+++	++		OE	+++	+++
kozinec	VE	++	+	pomerančová kůra	VE	++	++
	EE	+++	++		EE	+++	++
	OE	+++	+++		OE	+++	++
lapacho	VE	+	+	skořice	VE	+	++
	EE	+++	++		EE	++	-
	OE	+++	++		OE	+++	++
ličořeřišnice	VE	-	++	zázvor	VE	++	+++
	EE	+	++		EE	++	++
	OE	+++	++		OE	+++	++
kopřiva	VE	-	+++	heřmánek	VE	-	+
	EE	+++	-		EE	++	-
	OE	+++	-		OE	+++	-
jetel	VE	-	++	řebříček	VE	-	+
	EE	++	-		EE	++	-
	OE	+++	-		OE	+++	-

ML *Micrococcus luteus*

SM *Serratia marcescens*

- stejný nárůst jako kontrola

+ 60-90% kontroly

++ 30-60% kontroly

+++ 0-30% kontroly

VE vodný extrakt

EE ethanolový extrakt

LE lipidický extrakt

S využitím kvasinky *Candida glabrata* byl porovnáván antimykotický efekt liposomů a kombinovaných PHB liposomů s různým typem enkapsulovaných extraktů (Tabulka 26). Alespoň částečným antimykotickým účinkem se vyznačovaly všechny testované vzorky, vyjma částic s vodným extraktem skořice. Z tabulky lze rovněž vyčíst, že vyšší antimykotický efekt měly v případě dubové kůry a oregana vodné extrakty, oproti lipidickým. Zároveň nebyl v tomto testování pozorován významný rozdíl v inhibici kvasinky při použití klasických, resp. kombinovaných liposomů.

Tabulka 26: Stanovení antimykotického účinku liposomů a kombinovaných PHB liposomů

vzorek	typ částic	extrakt	CG	vzorek	typ částic	extrakt	CG
dubová kůra	liposomy	VE	++	oregano	liposomy	VE	++
		OE	+			OE	+
	PHB liposomy	VE	++		PHB liposomy	VE	++
		OE	+			OE	+
hřebíček	liposomy	VE	+	skořice	liposomy	VE	-
		OE	+			OE	+
	PHB liposomy	VE	+		PHB liposomy	VE	-
		OE	+			OE	+

CG *Candida glabrata*

- stejný nárůst jako kontrola

VE vodný extrakt

+ 60-90% kontroly

EE ethanolový extrakt

++ 30-60% kontroly

LE lipidický extrakt

+++ 0-30% kontroly

5.12.2.3 Stanovení antimykotického účinku vláken

Infekce kožních ran vede k prodloužení doby potřebné k hojení. Lokální aplikace antibiotika či antimykotika přispívá k rychlejší léčbě infekce. Látka inhibující růst mikroorganismů může být přímo impregnována do obvazového či krycího materiálu. Použití nanovláken umožňuje efektivnější dodávku navázané účinné látky v důsledku vyšší plochy povrchu nanovláknů [194].

Antimykotický efekt vláken s lipidickými extrakty byl studován s využitím zkumavkového testu, přesný postup metody je uveden v kap. 4.11.3.1. Výsledky stanovení jsou uvedeny v Tabulce 27.

Tabulka 27: Stanovení antimykotického účinku vláken zkumavkovým testem

vzorek vláken	CG
kopřiva	-
jetel	-
heřmánek	-
řebříček	-
dubová kůra	+
skořice	++
hřebíček	++
oregano	-

CG *Candida glabrata*

- stejný nárůst jako kontrola

+ 60-90% kontroly

++ 30-60% kontroly

+++ 0-30% kontroly

U vláken s lipidickým extraktem z dubové kůry, skořice a hřebíčku byl pozorován pokles růstu kvasinky při kultivaci se vzorkem. Naopak u vláken s lipidickým extraktem z bylinek nebyl zaznamenán žádný antimykotický účinek vůči kvasince *Candida glabrata*.

5.13 Stanovení toxicity částic

Připravené částice byly sledovány z hlediska jejich případných cytotoxických a genotoxických účinků. Pro stanovení cytotoxicity byly použity humánní buněčné kultury. Ke stanovení genotoxického účinku byl využit modelový prokaryotický organismus. Následující kapitoly shrnují veškeré výsledky testování toxicity připravených částic.

5.13.1 Stanovení množství jednotlivých složek v liposomové suspenzi

Pro testování cytotoxického a genotoxického účinku zkoumané látky je nutné znát její přesné složení a koncentraci. Protože původní liposomová suspenze byla pro testování toxicity upravena centrifugováním a sterilní filtrací, bylo nutné experimentálně stanovit koncentraci jednotlivých komponent liposomových a PHB liposomových částic. Potenciální toxicita testované látky byla poté vztažena na lecithin, jakožto hlavní složku všech typů částic.

5.13.1.1 Stanovení koncentrace složek prázdných liposomů a PHB liposomů

Koncentrace lecithinu v částicových suspenzích byla stanovena Stewartovou metodou (kap. 4.12.2.1). Množství cholesterolu v obou typech suspenzí bylo stanoveno s využitím kapalinové chromatografie (kap. 4.12.2.3). Koncentrace polyhydroxybutyrátu v suspenzi kombinovaných PHB liposomů byla zjištěna pomocí plynové chromatografie (kap. 4.12.2.2). Všechna měření byla provedena pětkrát, výsledné průměrné hodnoty koncentrací a směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tabulce 28.

Tabulka 28: Experimentální stanovení množství jednotlivých složek částic v částicové suspenzi

vzorek	koncentrace jednotlivých složek v liposomové suspenzi [µg/ml]		
	lecithin	cholesterol	polyhydroxybutyrát
liposomy	1054 ± 43	97 ± 13	0
PHB liposomy	678 ± 28	64 ± 9	143 ± 14

Aktivní látky enkapsulované v liposomech nejsou pro okolní prostředí biologicky dostupné, nejprve musí dojít k jejich uvolnění. Zároveň je nezbytné předejít předčasnému uvolnění aktivní látky. Rychlost uvolnění aktivních sloučenin z nosiče je klíčovým krokem při návrhu potravin a kosmetických výrobků s vylepšenými vlastnostmi [195].

Liposomy mohou vykazovat uvolňování enkapsulované sloučeniny již během skladování. Inkorporace biodegradabilního polymeru do struktury liposomu může být slibnou možností zvýšení jejich stability [30, 196]. Přítomnost cholesterolu ve fosfolipidové dvojvrstvě také zvyšuje rigiditu membrány. Navíc vodíkové vazby mezi molekulami cholesterolu a mastnými kyselinami fosfatidylcholinu zvyšují stabilitu a mechanickou pevnost liposomů [197]. Ze získaných dat a snímků z kryo-TEM mikroskopie (Obrázek 19) vyplývá, že se při přípravě částic s 20 % PHB podařilo inkorporovat polymer PHB do struktury částic. Podle naměřených hodnot (Tab. 28) lze také usoudit, že při přípravě kombinovaných PHB liposomů zůstává zachován poměr složek lecithin-cholesterol, jako u klasických liposomů.



Obrázek 23: Příprava liposomové suspenze pro testování cytotoxicity. Vlevo nahoře: peleta liposomů po centrifugaci; vpravo nahoře: porovnání liposomové (vlevo) a PHB liposomové suspenze (vpravo); dole: koncentrační řada liposomové suspenze ředěné kultivačním médiem

5.13.1.2 Stanovení koncentrace lecithinu v suspenzích liposomů s enkapsulovanou aktivní látkou

U vzorků liposomů s enkapsulovanou aktivní látkou byla rovněž stanovena koncentrace lecithinu ve finální částicové suspenzi použité pro testování toxicity. Koncentrace polyfenolů v jednotlivých vzorcích byla vypočtena z výsledků stanovení množství polyfenolů v extraktech a stanovení enkapsulační účinnosti pro dané liposomy. Výsledky průměrných hodnot koncentrace lecithinu a směrodatné odchylky ze tří stanovení a také vypočtené koncentrace polyfenolů jsou uvedeny v Tabulce 29.

Tabulka 29: Experimentální stanovení množství lecithinu v částicových suspenzích a vypočtené maximální množství enkapsulovaných polyfenolů

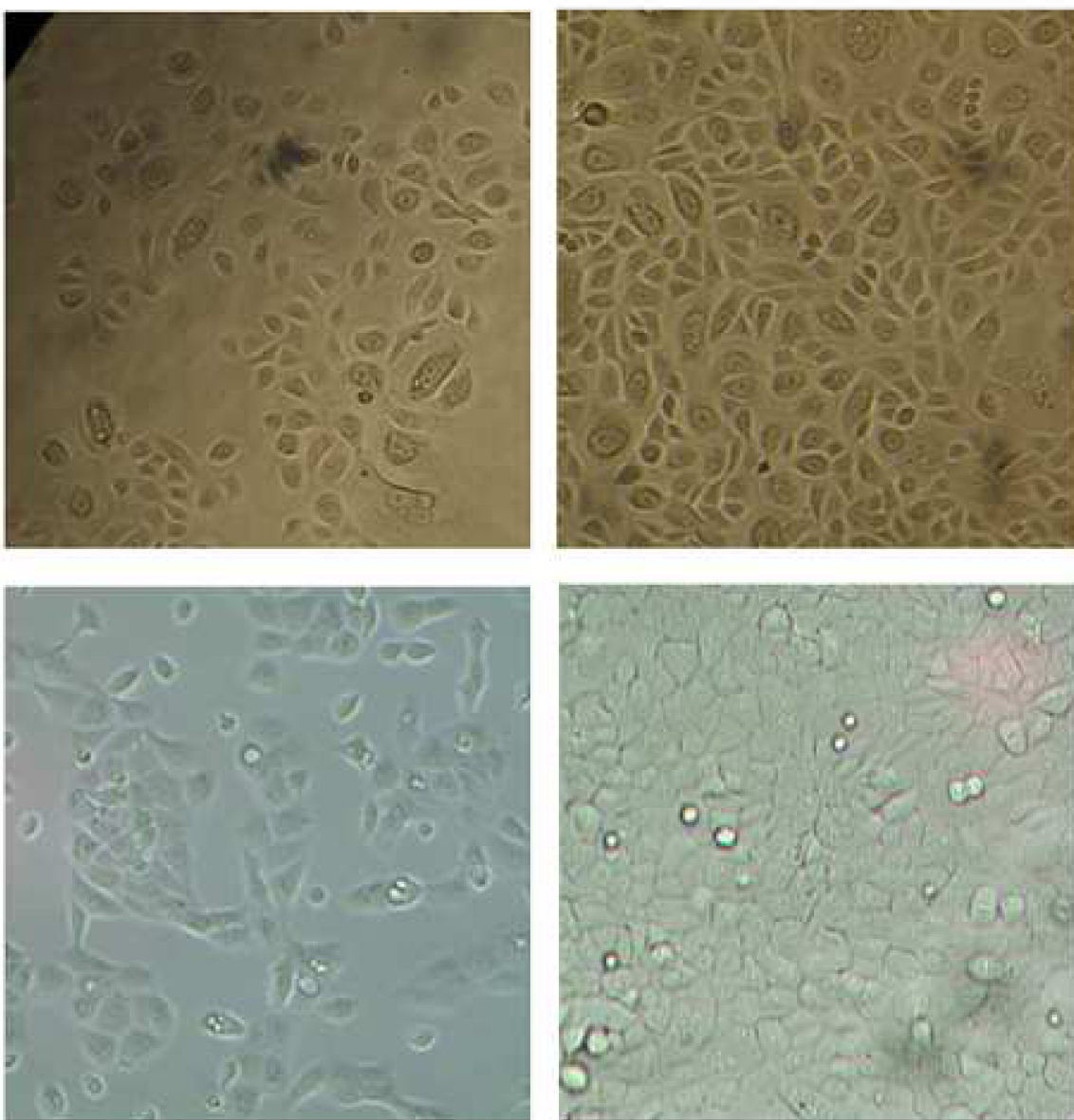
vzorek	typ vzorku	koncentrace lecithinu [$\mu\text{g/ml}$]	maximální teoretická koncentrace polyfenolů v suspenzi [mg/ml]
dubová kůra	VE	957,5 \pm 38,3	0,86
	LE	660,0 \pm 26,4	1,31
hřebíček	VE	600,0 \pm 24,5	1,64
	LE	327,5 \pm 13,1	3,34
zázvor	VE	1107,5 \pm 88,6	0,48
	LE	875,0 \pm 70,1	1,99
skořice	VE	829,3 \pm 66,3	0,66
	LE	415,0 \pm 20,8	2,74
oregano	VE	785,0 \pm 39,3	1,42
	LE	720,0 \pm 36,0	1,67
kopřiva	VE	1307,7 \pm 143,9	0,08
	LE	903,5 \pm 99,4	0,91
jetel	VE	756,7 \pm 83,2	0,41
	LE	463,0 \pm 43,1	0,69
heřmáněk	VE	1084,9 \pm 75,9	0,21
	LE	533,8 \pm 37,4	0,62
řebříček	VE	846,5 \pm 59,3	0,22
	LE	516,5 \pm 25,8	0,42
rooibos	liposomy	414,6 \pm 16,6	1,81
	PHB liposomy	811,1 \pm 40,6	2,42
matcha	liposomy	725,6 \pm 36,3	1,93
	PHB liposomy	572,7 \pm 28,6	0,27
fenykl	liposomy	314,4 \pm 15,7	0,28
	PHB liposomy	427,6 \pm 25,7	0,14
echinacea	liposomy	282,4 \pm 31,1	0,26
	PHB liposomy	339,5 \pm 20,4	0,21
mrkev	liposomy	580,4 \pm 23,2	0,01
	PHB liposomy	660,8 \pm 39,7	0,01
lesní plody	liposomy	615,0 \pm 30,7	0,10
	PHB liposomy	712,6 \pm 35,6	0,06

Experimentálně stanovená koncentrace lecithinu se u liposomových částic pohybovala v rozmezí přibližně 300-1300 $\mu\text{g/ml}$ suspenze. U PHB částic se pak jednalo o rozmezí koncentrací přibližně 300-850 $\mu\text{g/ml}$ suspenze. Vysoký rozptyl hodnot je způsoben ztrátami při nahrazení novým tekutým médiem po centrifugaci a také při sterilní filtraci.

5.13.2 Stanovení cytotoxicity částic

Liposomy jsou obecně považovány za farmakologicky neutrální nosiče s minimální toxicitou i vzhledem ke svému složení, sestávají pouze z přírodních fosfolipidů. Přídavek dalších komponent do struktury liposomu dokáže zlepšit jejich mechanické vlastnosti, avšak může také indukovat vznik imunitní odpovědi organismu a představovat potenciální riziko. Posouzení bezpečnosti a stanovení případných rizik je proto nezbytným krokem vývoje každého nového typu nosiče aktivních látek [29, 198].

Cytotoxicita všech liposomů i PHB liposomů byla stanovena s využitím dvou typů lidských buněčných kultur: HEK buněk a linie HaCaT (obrázek 24). Pro testování toxicity byly použity dvě různé metody zaměřené na metabolickou aktivitu buněk (MTT test a Alamar Blue test) a jedna metoda sledující intaktnost plazmatické membrány (LDH test). Pro získání dalších informací o působení částicových suspenzí na buňky bylo využito sledování produkce prozánětlivých cytokinů IL-8.



Obrázek 24: Nárůst HEK (nahore) a HaCaT (dole) buněk. Snímky kultury vždy třetí den po rozmražení (vlevo) a šestý den po rozmražení (vpravo). Zvětšeno 100x.

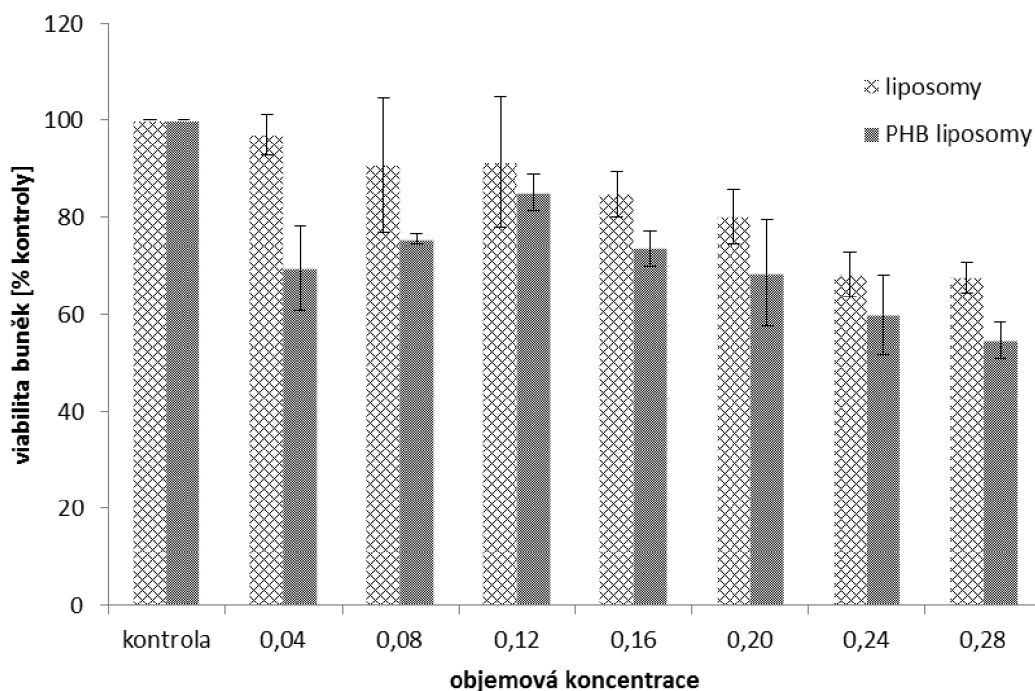
5.13.2.1 Srovnání toxicity prázdných liposomů a PHB liposomů na HEK buňkách

Toxicita liposomů a PHB liposomů byla porovnána s využitím MTT testu na lidských epidermálních keratinocytech. Provedení testu je uvedeno v kap. 4.12.3.3. Obě částicové suspenze byly pro stanovení toxicity naředěny kultivačním médiem na celkový objem 100 μ l přidaný k buňkám. Finální koncentrace jednotlivých složek částicových suspenzí jsou uvedeny v Tabulce 30. Množství lecithinu, cholesterolu a PHB bylo pro jednotlivé objemové koncentrace vypočteno z experimentálně stanovených koncentrací v částicových suspenzích (Tabulka 28). Testované koncentrační rozmezí bylo zvoleno s ohledem na maximální koncentraci částic při zachování co nejnižšího ředění kultivačního média. Koncentrace 0,28 % obj. byla experimentálně ověřena jako netoxická.

Tabulka 30: Vypočtené množství jednotlivých složek v ředěních použitých v cytotoxických testech

objemová koncentrace částic	množství složky [μ g]					
	lecithin	liposomy		PHB liposomy		
		cholesterol	PHB	lecithin	cholesterol	PHB
0.00	0.00	0.00	-	0.00	0.00	0.00
0.04	4.22	0.39	-	2.71	0.26	0.57
0.08	8.43	0.78	-	5.42	0.51	1.14
0.12	12.65	1.16	-	8.14	0.77	1.72
0.16	16.86	1.55	-	10.85	1.02	2.29
0.20	21.08	1.94	-	13.56	1.28	2.86
0.24	25.30	2.33	-	16.27	1.54	3.43
0.28	29.51	2.72	-	18.98	1.79	4.00

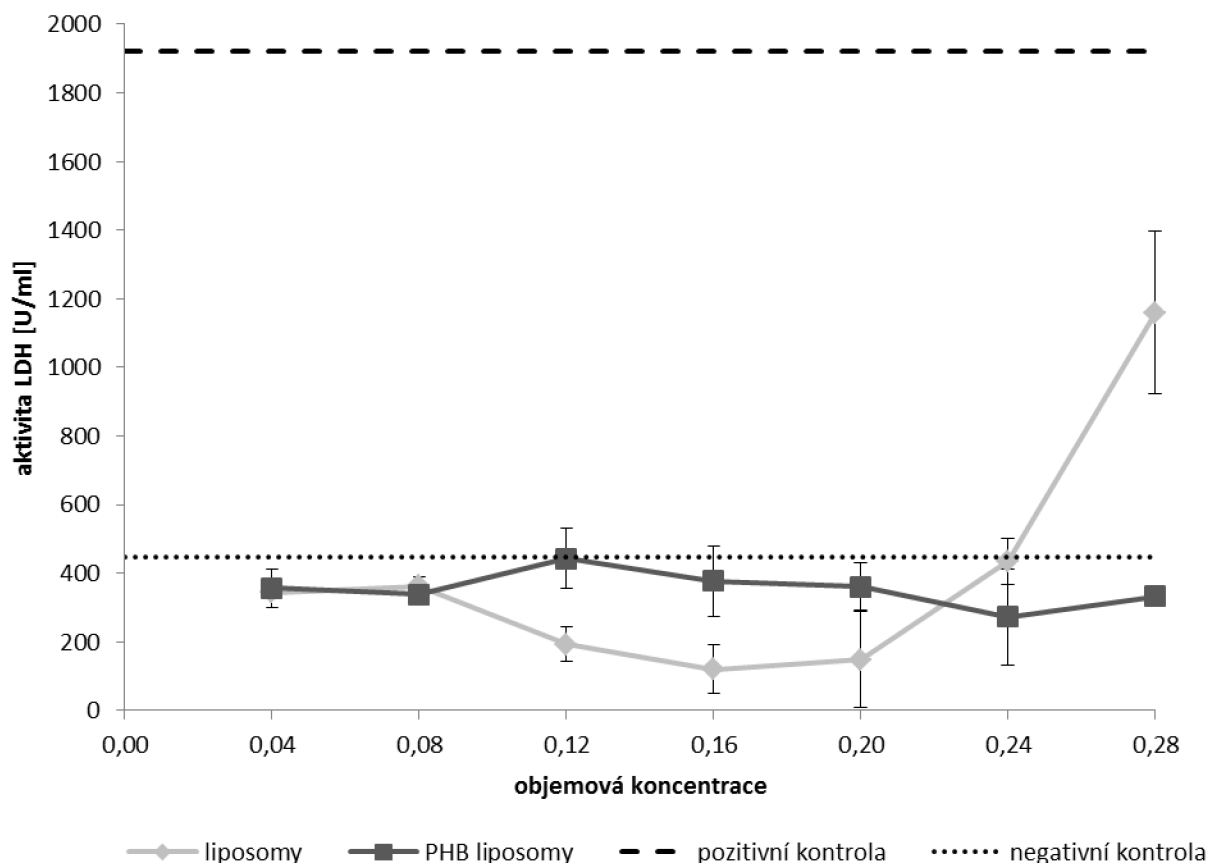
Mitochondriální aktivita buněk kultivovaných s testovanými částicemi po dobu 24 hodin byla porovnána s hodnotou aktivity kontroly (buňky kultivované pouze v médiu). Výsledky shrnuje Graf 14.



Graf 14: Viabilita HEK buněk po expozici liposomovým a PHB liposomovým částicím stanovená pomocí MTT testu. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ze tří měření.

Z výsledků vyplývá, že mitochondriální aktivita buněk klesá se vzrůstající koncentrací obou typů částic, v celém rozsahu koncentračního rozmezí však viabilita neklesá pod 50% inhibice. Z Grafu 14 lze rovněž vyčíst téměř zanedbatelný rozdíl v toxickém efektu liposomů a kombinovaných PHB liposomů.

K porovnání toxicity liposomových a PHB liposomových částic bylo využito také LDH testu (kap. 4.12.3.5). Výsledky testování jsou zobrazeny v Grafu 15.



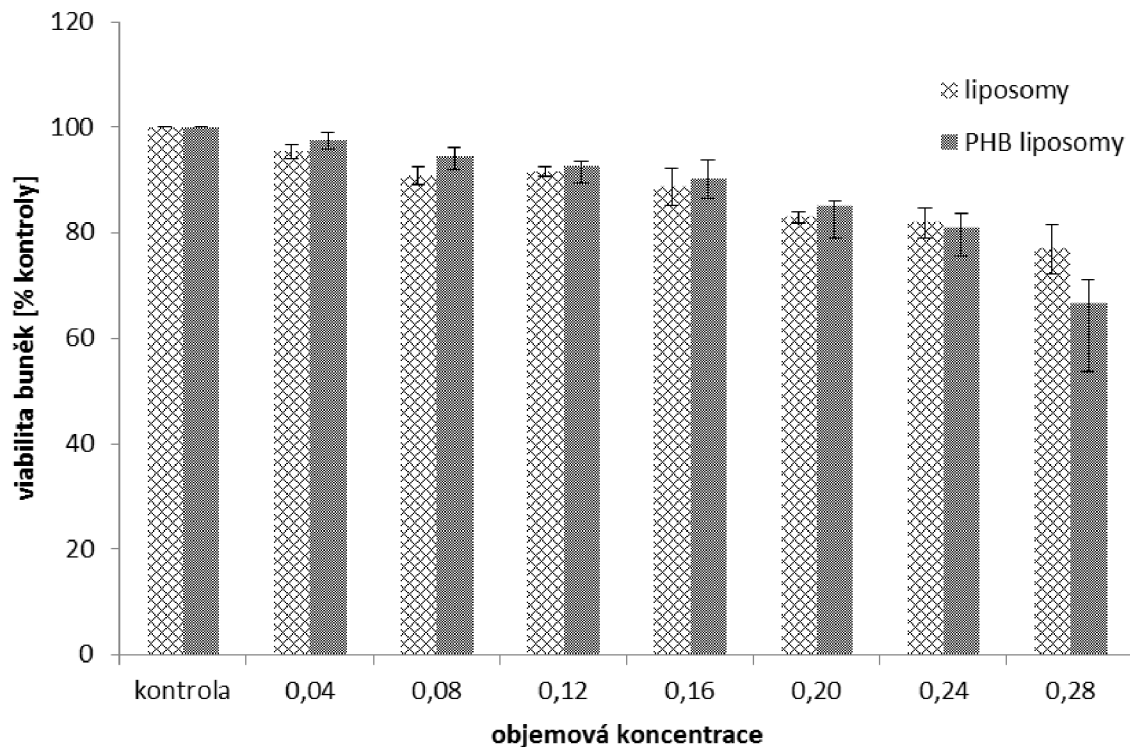
Graf 15: Cytotoxicita vyjádřená jako aktivita laktátdehydrogenasy v médiu po expozici HEK buněk liposomovým a PHB liposomovým částicím. Pozitivní kontrolou byly buňky kultivované se 40% ethanolem, negativní kontrolou buňky kultivované pouze v médiu. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ze tří měření.

LDH test je zaměřen na sledování aktivity laktátdehydrogenasy. Tento cytoplazmatický enzym je v případě poškození cytoplazmatické membrány vlivem toxického činidla uvolňován do kultivačního média.

Z Grafu 15 lze vyčíst, že žádný z vzorků nezpůsobil poškození plazmatické membrány HEK buněk, vyjma nejvyšší testované koncentrace liposomů. Tento výsledek koresponduje s výsledky stanovení MTT testu.

5.13.2.2 Srovnání toxicity prázdných liposomů a PHB liposomů na HaCaT buňkách

Další porovnání toxicity liposomů a PHB liposomů bylo porovnána s využitím Alamar Blue testu na linii buněk HaCaT. Postup metody je uveden v kap. 4.12.3.4. Zjištěná metabolická aktivita buněk kultivovaných s testovanými částicemi po dobu 24 hodin byla opět porovnána s hodnotou aktivity kontroly (buňky kultivované pouze v médiu). Výsledky testování shrnuje Graf 16.

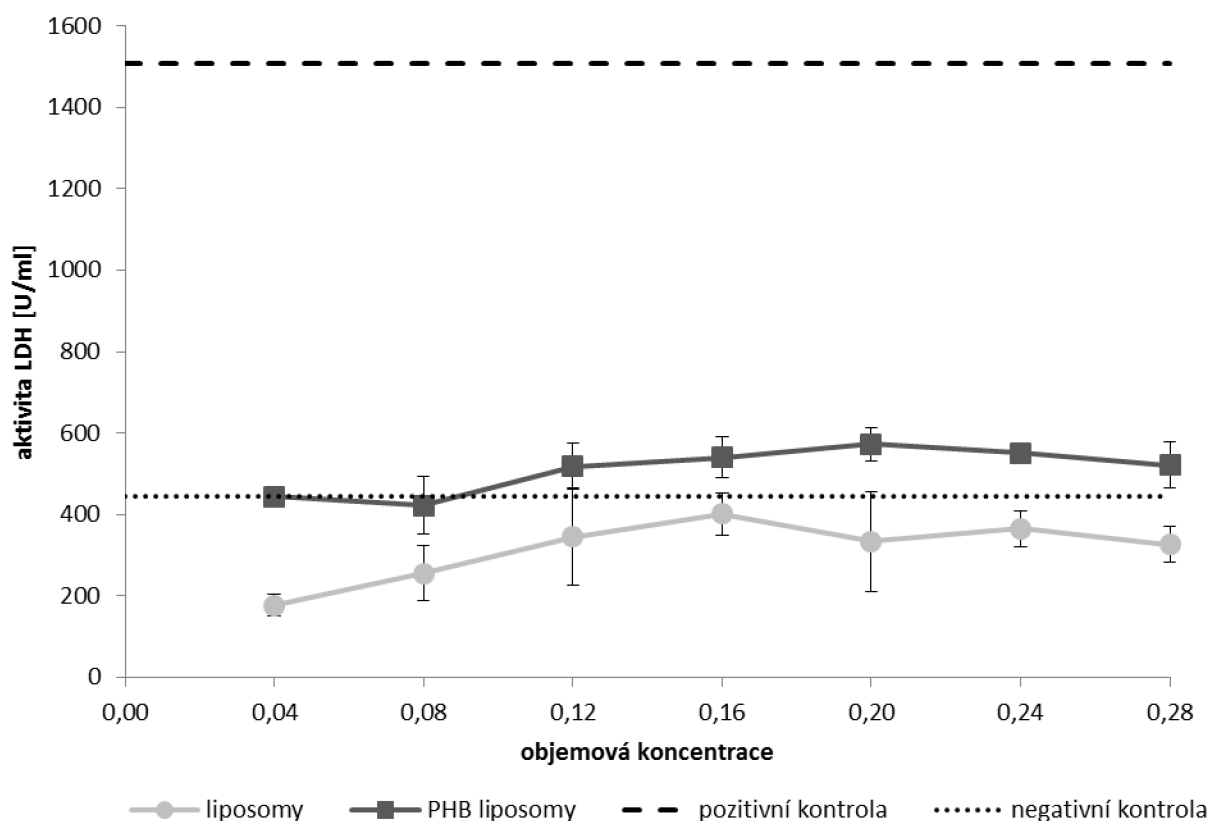


Graf 16: Viabilita HaCaT buněk po expozici liposomovým a PHB liposomovým částicím stanovená pomocí Alamar Blue testu. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ze tří měření.

Z grafu 16 lze vyčíst, že oba typy částicových suspenzí výrazně nesnižovaly metabolickou aktivitu HaCaT buněk a proto je možné částice považovat za netoxické pro tento typ buněk. Rovněž v grafu nejsou patrné výrazné rozdíly mezi toxicitou liposomů a PHB liposomů. Testované částice se tedy v daných koncentracích jeví jako netoxické pro oba použité typy buněk.

Toxicita obou typů částic byla i tentokrát ověřena s využitím LDH testu. Výsledky měření jsou znázorněny v Grafu 17.

Testování produkce laktátdehydrogenasy do kultivačního média potvrdilo minimální toxicitu obou typů částic. Hodnoty aktivity enzymu jsou v obou případech blízké hodnotě naměřené u kontrolních buněk.

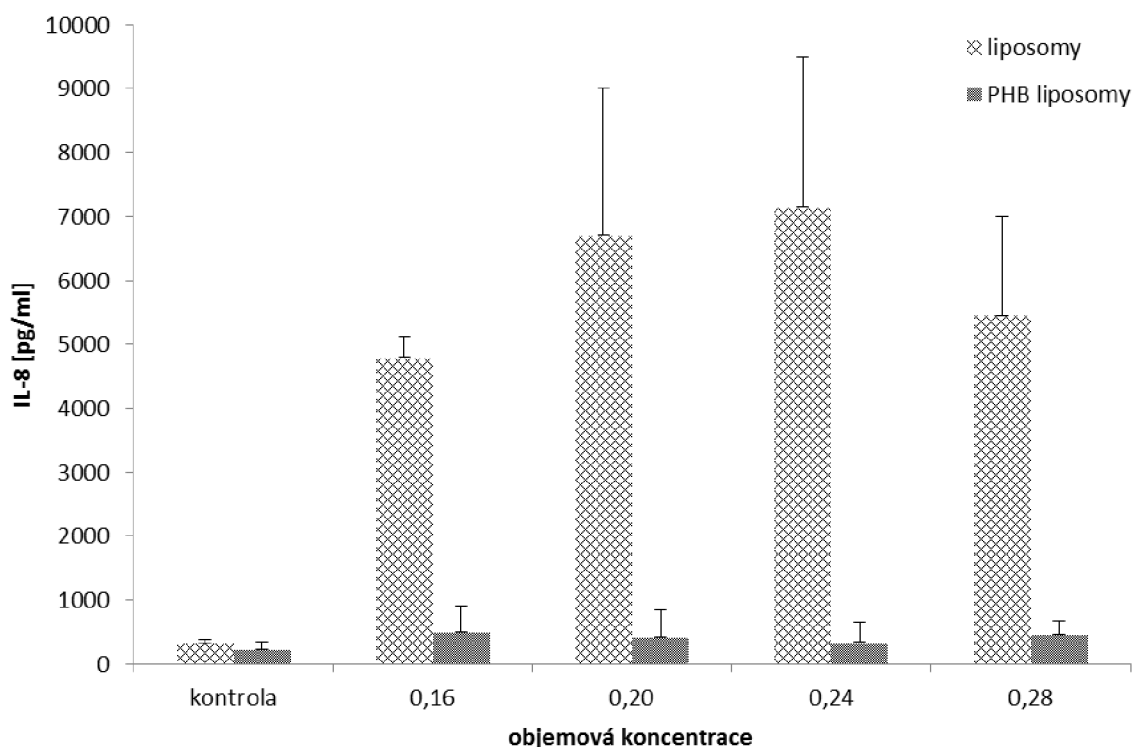


Graf 17: Cytotoxicita vyjádřená jako aktivita laktát dehydrogenasy v médiu po expozici HaCaT buněk liposomovým a PHB liposomovým částicím. Pozitivní kontrolou byly buňky kultivované s 40% ethanolem, negativní kontrolou buňky kultivované pouze v médiu. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ze tří měření.

Součástí testování toxického účinku obou typů částic na linii HaCaT bylo i sledování produkce prozánětlivých cytokinů, indukovaných působením liposomů. Pro testování bylo využito komerčního kitu Human Cytokine Assay, BioRad, podle instrukcí výrobce (kap. 4.12.3.6). Experiment byl proveden metodou Bio-Plex, která umožňuje současnou detekci více analytů v jediném vzorku.

V buněčných supernatantech z testu Alamar Blue byl sledován výskyt prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8. Zjištěné hodnoty hladin cytokinu IL-6 byly pod detekčním limitem použité metody. Výsledné hodnoty produkce cytokinu IL-8 po kultivaci buněk s testovanými částicemi jsou uvedeny v Grafu 18.

Při kultivaci HaCaT buněk se suspenzí liposomů došlo k výrazné produkci prozánětlivého cytokinu IL-8 ve všech testovaných koncentracích. Naproti tomu u testování PHB liposomů byly zjištěné podobné hodnoty produkovaného IL-8 jako u kontroly. Z toho lze usuzovat, že inkorporace PHB do struktury liposomových částic může mít za následek snížení prozánětlivé reakce buněk při kultivaci s liposomy.



Graf 18: Množství prozánětlivého cytokinu IL-8 produkované HaCaT buňkami po expozici liposomovým a PHB liposomovým částicím

Toxický efekt liposomů i nového typu kombinovaných PHB liposomů byl ověřen na dvou typech lidských buněčných kultur. Testování prokázalo minimální vliv částic na viabilitu a inaktivitu plazmatické membrány obou typů buněk.

Zkoumání účinků suspenze liposomů a kombinovaných PHB liposomů ukázalo, že spojení fosfolipidu s polymerem PHB nezpůsobuje výrazně vyšší hladinu cytotoxicity (testy MTT/Alamar Blue, LDH) na lidských kožních buňkách. Nový typ kombinovaných částic může být tedy použit jako aktivní nosiče jak pro hydrofobní, tak pro hydrofilní aktivní složky, jako jsou antioxidanty, komplexní přírodní extrakty, antimikrobiální činidla a mnoho dalších.

Nanočástice jsou také známé svou schopností indukovat produkci prozánětlivých cytokinů [199]. Tento zánět může vyvolat řadu následujících nežádoucích procesů (např. genotoxicitu, buněčnou smrt). Produkce cytokinů IL-8 byla použita jako marker zánětu indukovaného liposomy. Navzdory relativně nízké toxicitě byly u liposomových částic pozorována vysoká hladina produkce IL-8 proteinu. Nicméně nově navržené PHB-liposomové částice nevedly k významnému zvýšení produkce IL-8 ve srovnání s kontrolou. Toto základní vyšetření potvrdilo, že přidavek PHB může vést k podstatnému snížení prozánětlivého účinku liposomů.

5.13.2.3 Stanovení toxicity liposomů s různými typy enkapsulovaných extraktů na HEK buňkách

Lidské epidermální keratinocyty HEK byly následně využity pro testování toxicity liposomů s enkapsulovanou aktivní látkou. Porovnány byly liposomy s vodnými a lipidickými extrakty z dubové kůry, hřebíčku, skořice, zázvoru a oregana. Všechny částicové suspenze byly pro stanovení toxicity naředěny kultivačním médiem na celkový objem 100 μ l přidány k buňkám. Finální koncentrace v jednotlivých objemových koncentracích lecithinu jsou uvedeny v Tabulce 31. Koncentrační rozmezí

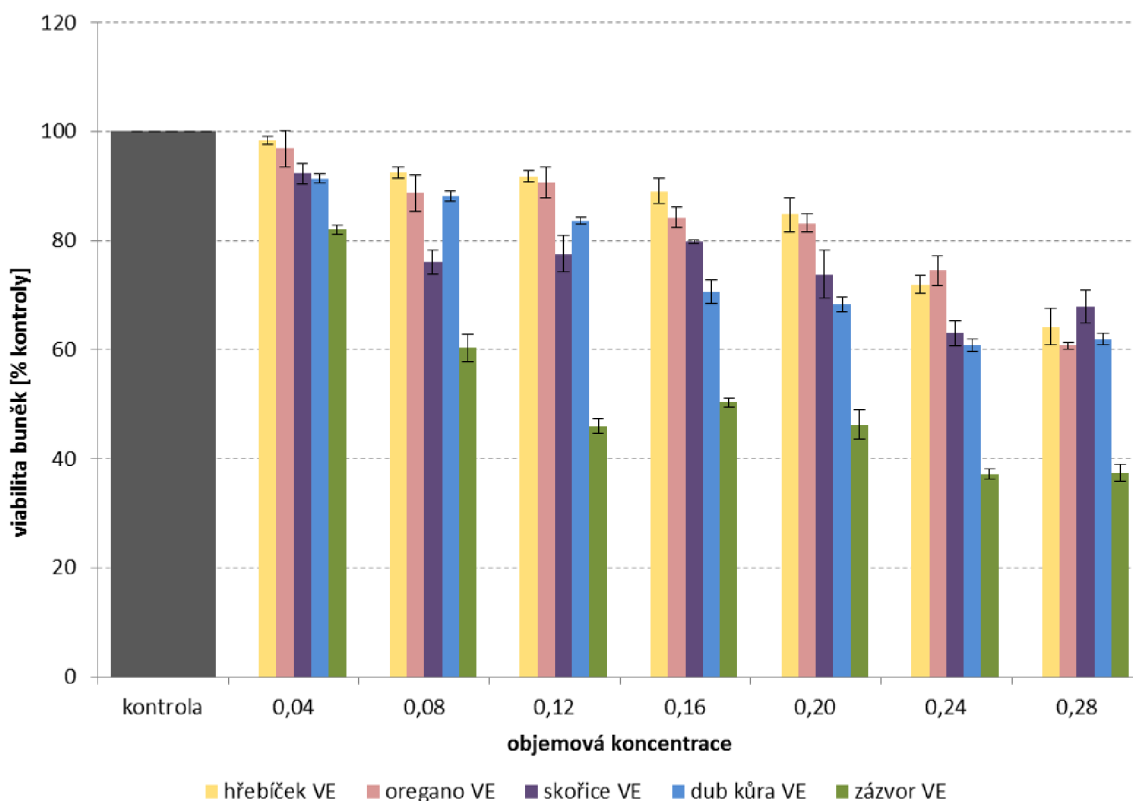
testovaných látek bylo navrženo stejně jako u prázdných liposomových částic (kap. 5.13.2.1). Hodnoty byly vypočteny z experimentálně stanovených koncentrací v částicových suspenzích (Tabulka 29).

Tabulka 31: Vypočtená koncentrace lecithinu v jednotlivých ředěních použitých v MTT testech

obj. konc. částic	koncentrace lecithinu [$\mu\text{g/ml}$]									
	hřebíček		oregano		skořice		dubová kůra		zázvor	
	VE	LE	VE	LE	VE	LE	VE	LE	VE	LE
0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,04	24,0	13,1	31,4	28,8	33,2	16,6	38,3	26,4	44,3	35,0
0,08	48,0	26,2	62,8	57,6	66,3	33,2	76,6	52,8	88,6	70,0
0,12	72,0	39,3	94,2	86,4	99,5	49,8	114,9	79,2	132,9	105,0
0,16	96,0	52,4	125,6	115,2	132,7	66,4	153,2	105,6	177,2	140,0
0,20	120,0	65,5	157,0	144,0	165,9	83,0	191,5	132,0	221,5	175,0
0,24	144,0	78,6	188,4	172,8	199,0	99,6	229,8	158,4	265,8	210,0
0,28	168,0	91,7	219,8	201,6	232,2	116,2	268,1	184,8	310,1	245,0

VE vodný extrakt LE lipidický extrakt

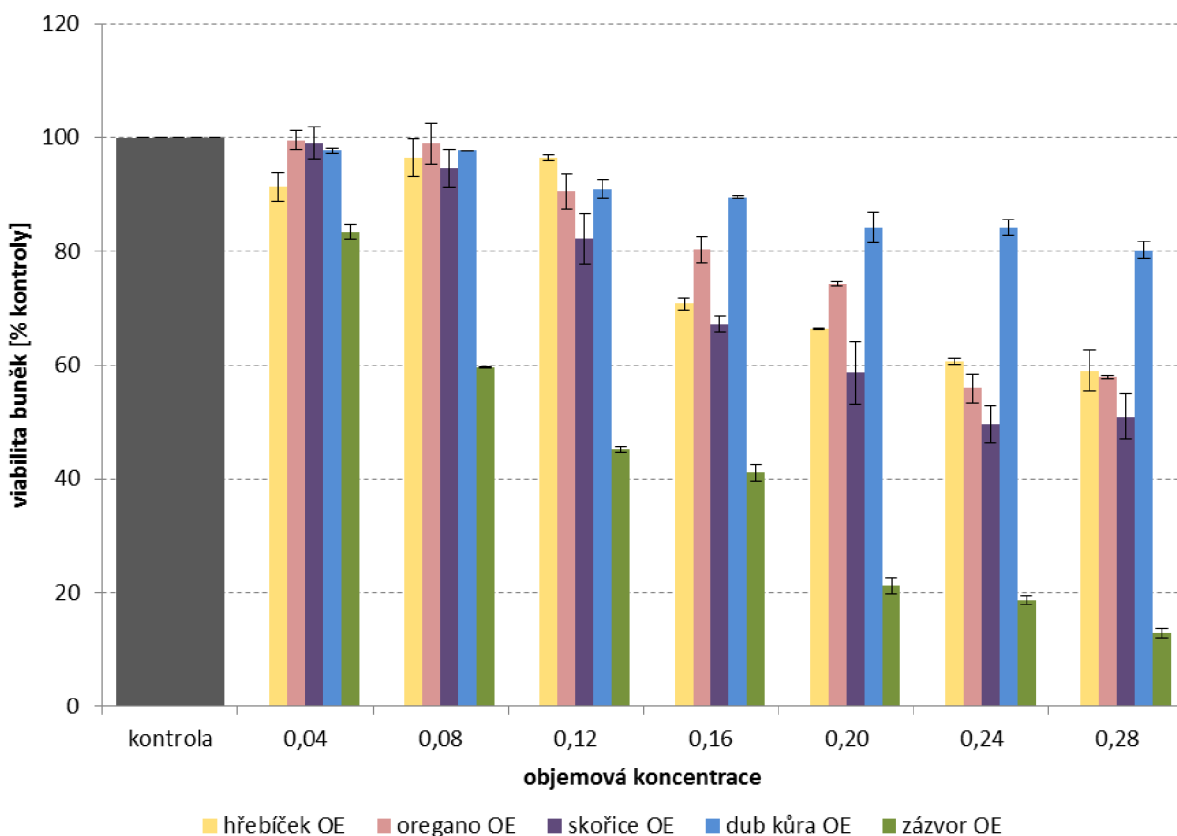
Toxicita byla sledována jako pokles mitochondriální aktivity buněk kultivovaných s částicemi po dobu 24 hodin v porovnání s kontrolou (mitochondriální aktivita buněk kultivovaných pouze v buněčném médiu). Všechny vzorky byly proměřeny nejméně třikrát, průměrné hodnoty měření jsou zobrazeny v Grafech 19 a 20.



Graf 19: Viabilita HEK buněk po expozici liposomům s enkapsulovanými vodnými extrakty různých typů vzorků stanovená pomocí MTT testu. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ze tří měření. Vysvětlení zkratk je uvedeno u Tab. 31.

Z výsledků je zřejmé, že všechny testované liposomy vyjma vzorku s vodným extraktem zázvoru lze v testovaném koncentračním rozmezí považovat za netoxické. Hodnota inhibice metabolické aktivity neklesla pod 50% kontroly [200]. Liposomy s vodným extraktem zázvoru se od objemové koncentrace 0,12 jeví jako mírně toxické (Graf 19).

U liposomů s lipidickými extrakty byl zaznamenán výraznější pokles metabolické aktivity buněk ve srovnání s kontrolou (Graf 20). Vzorek liposomů s lipidickým extraktem z hřebíčku se i v tomto případě jeví od objemové koncentrace 0,12 jako toxický. Na hranici toxicity se od koncentrace 0,24 pohybují i liposomy s lipidickými extrakty z hřebíčku, skořice a oregana. Celkově lze říct, že liposomy s lipidickou aktivní složkou ovlivňují metabolickou aktivitu HEK buněk výrazněji, než liposomy s vodnými extrakty, výjimku tvoří pouze vzorek dubové kůry. Z měření celkového obsahu polyfenolických látek a enkapsulační účinnosti vyplynulo, že liposomy s lipidickými extrakty oregana, skořice, hřebíčku i zázvoru obsahují výrazně vyšší množství aktivních látek než liposomy s vodnými extrakty, což může negativně ovlivnit viabilitu testovaných buněk. Navíc byly lipidické extrakty z materiálu získány metodou dle Folche, která využívá toxická organická rozpouštědla. Pro využití v potravinách či kosmetice je nutné testovat liposomy připravené s využitím GRAS rozpouštědel.



Graf 20: Viabilita HEK buněk po expozici liposomům s enkapsulovanými lipidickými extrakty různých typů vzorků stanovená pomocí MTT testu. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ze tří měření. Vysvětlení zkratk je uvedeno u Tab. 31.

5.13.2.4 Stanovení toxicity liposomů s různými typy enkapsulovaných extraktů na HaCaT buňkách

Vzhledem k tomu, že k posouzení cytotoxicity se obvykle používají mnohočetné tzv. bateriové testy, pro sledování toxického účinku připravených částicových suspenzí byla využita i linie imortalizovaných keratinocytů HaCaT. Na těchto buňkách byla porovnána toxicita liposomů s vodnými a lipidickými extrakty z kopřivy, heřmánku, jetele a řebříčku. Všechny částicové suspenze byly pro stanovení toxicity naředěny kultivačním médiem na celkový objem 100 µl přidaný k buňkám. Finální koncentrace v jednotlivých objemových koncentracích lecithinu jsou uvedeny v Tabulce 32. Hodnoty byly vypočteny z experimentálně stanovených koncentrací v částicových suspenzích (Tabulka 29).

Tabulka 32: Vypočtená koncentrace lecithinu v jednotlivých ředěních použitých v MTT testech

objm. konc. částic	koncentrace lecithinu [µg/ml]								
	řebříček		jetel		kopřiva		heřmánek		
	VE	LE	VE	LE	VE	LE	VE	LE	
0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,04	33,9	20,7	30,3	18,5	52,3	36,1	43,4	21,4	
0,08	67,7	41,3	60,5	37,0	104,6	72,3	86,8	42,7	
0,12	101,6	62,0	90,8	55,6	156,9	108,4	130,2	64,1	
0,16	135,4	82,6	121,1	74,1	209,2	144,6	173,6	85,4	
0,20	169,3	103,3	151,3	92,6	261,5	180,7	217,0	106,8	
0,24	203,2	124,0	181,6	111,1	313,8	216,8	260,4	128,1	
0,28	237,0	144,6	211,9	129,6	366,2	253,0	303,8	149,5	

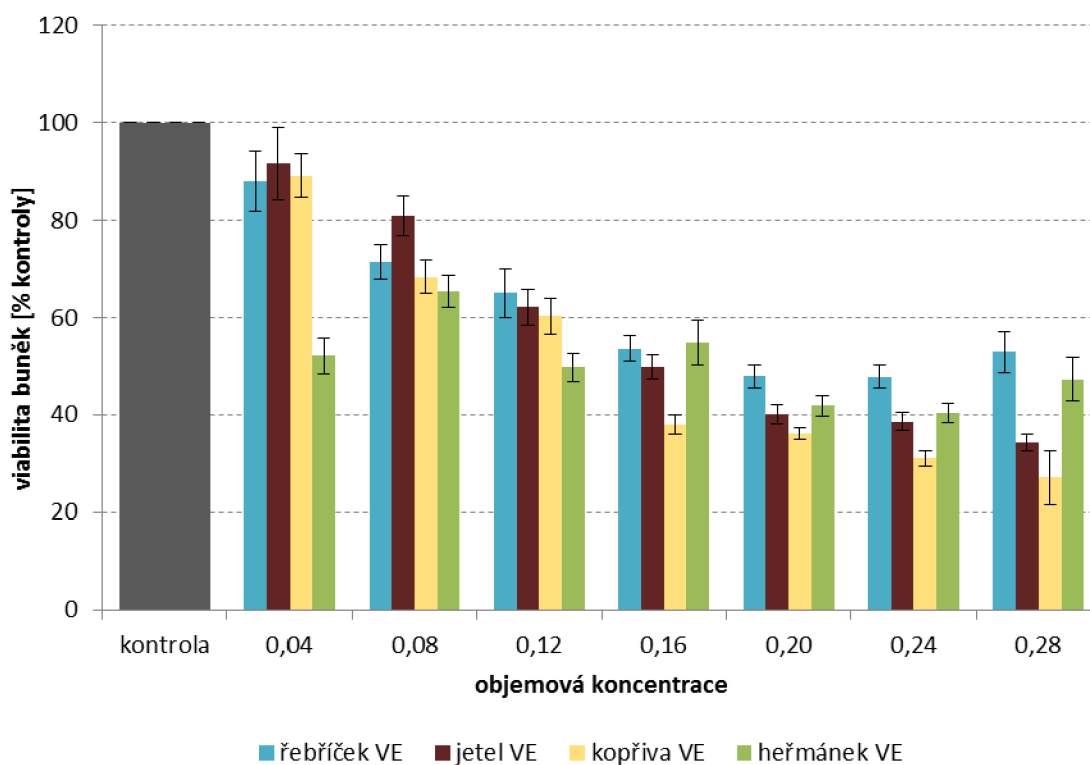
VE vodný extrakt

LE lipidický extrakt

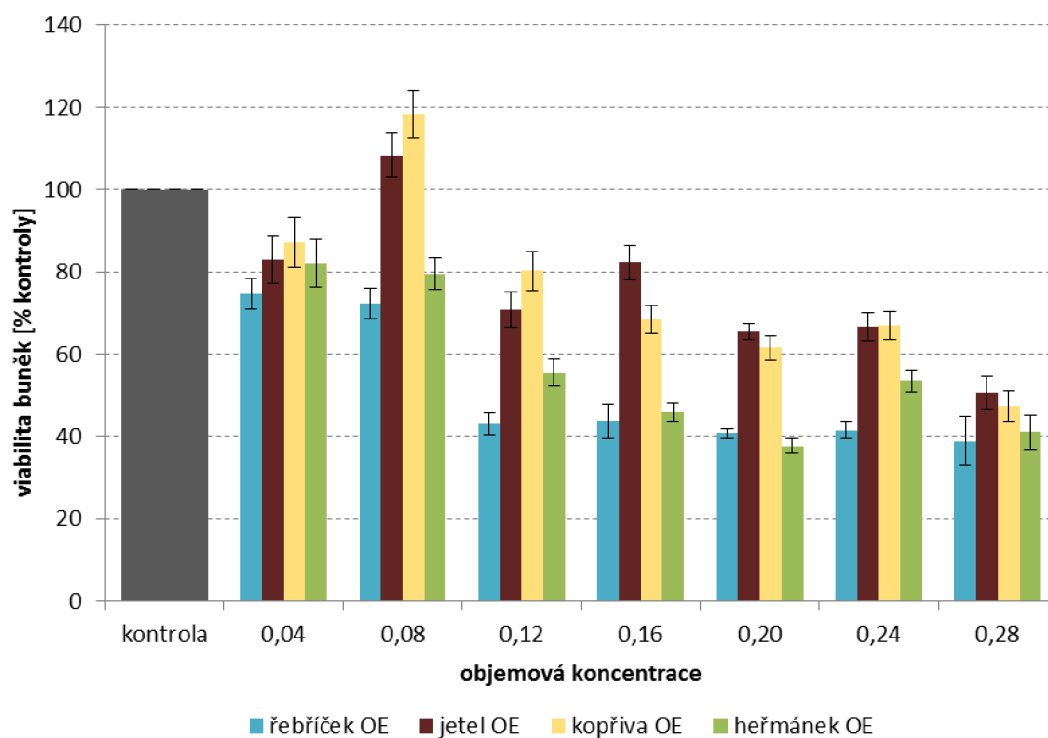
Toxický účinek liposomů byl vyjádřen jako pokles metabolické aktivity buněk po kultivaci s částicemi ve srovnání s kontrolou. Experiment byl proveden metodou MTT testu uvedenou v kapitole 4.12.3.3). Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty v Grafech 21 a 22.

Z výsledků vyplývá, že z testovaných částic má nejvyšší vliv na metabolickou aktivitu buněk extrakt z heřmánku, a to vodný i lipidický. V obou případech se liposomy s heřmánkem jeví jako cytotoxické již od hodnoty objemové koncentrace 0,12. Všechny ostatní liposomy s vodnými extrakty se pohybují na hranici toxicity od hodnoty koncentrace 0,16.

Naopak jako zcela netoxické lze vyjma nejvyšší testované koncentrace prohlásit liposomy s lipidickým extraktem z kopřivy a jetele. Liposomy s lipidickým extraktem z řebříčku mají stejně jako vzorky heřmánku vliv na metabolickou aktivitu buněk HaCaT již od koncentrace 0,12.



Graf 21: Viabilita HaCaT buněk po expozici liposomům s enkapsulovanými vodnými extrakty různých typů vzorků stanovená pomocí MTT testu. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ze tří měření. Vysvětlení zkratk je uvedeno u Tab. 32.



Graf 22: Viabilita HaCaT buněk po expozici liposomům s enkapsulovanými lipidickými extrakty různých typů vzorků stanovená pomocí MTT testu. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ze tří měření. Vysvětlení zkratk je uvedeno u Tab. 32.

5.13.2.5 Porovnání cytotoxicity liposomů a PHB liposomů s různými typy enkapsulovaných extraktů

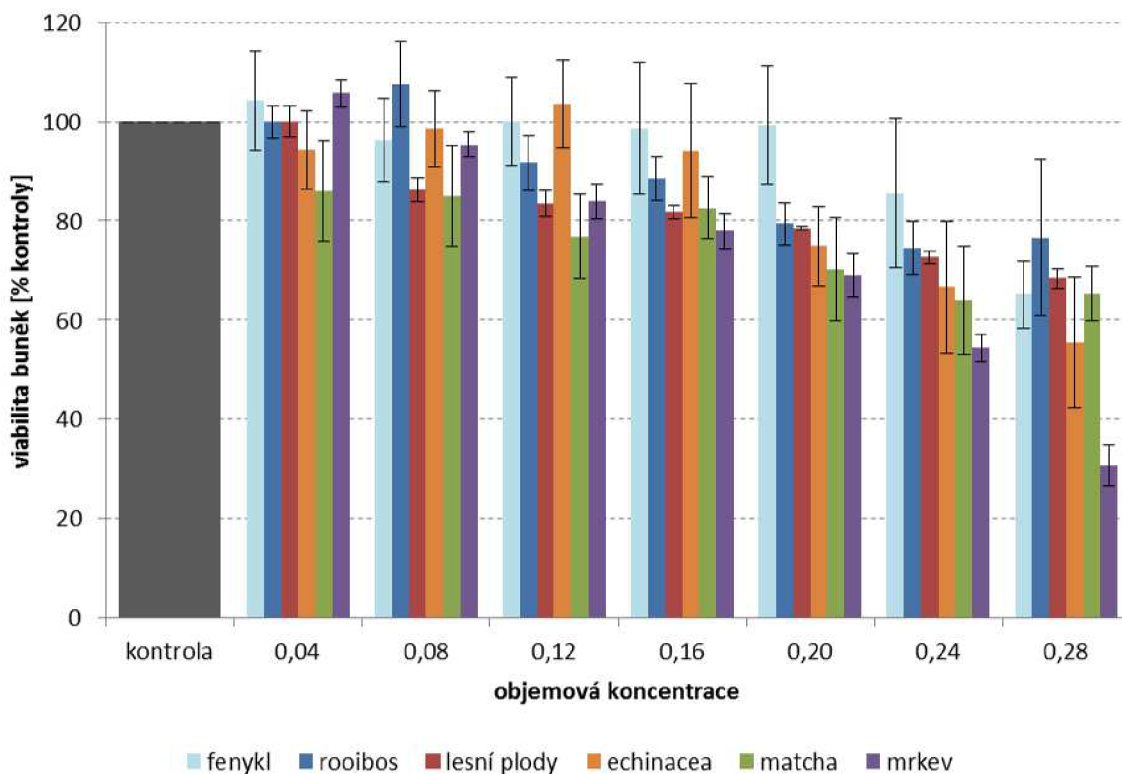
Buněčná linie HaCaT byla použita pro stanovení toxického účinku nového typu kombinovaných PHB liposomů a srovnání s klasickými liposomy. Testovány byly liposomy a PHB liposomy s vodnými extrakty z rooibosu červeného, matchy, echinacey, fenyklu, směsi lesních plodů a mrkve. Všechny částicové suspenze byly pro stanovení toxicity naředěny kultivačním médiem na celkový objem 100 μ l přidány k buňkám. Finální koncentrace v jednotlivých objemových koncentracích lecithinu jsou uvedeny v Tabulce 33. Hodnoty byly vypočteny z experimentálně stanovených koncentrací v částicových suspenzích (Tabulka 29).

Tabulka 33: Vypočtená koncentrace lecithinu v jednotlivých ředěních použitých v cytotoxických testech

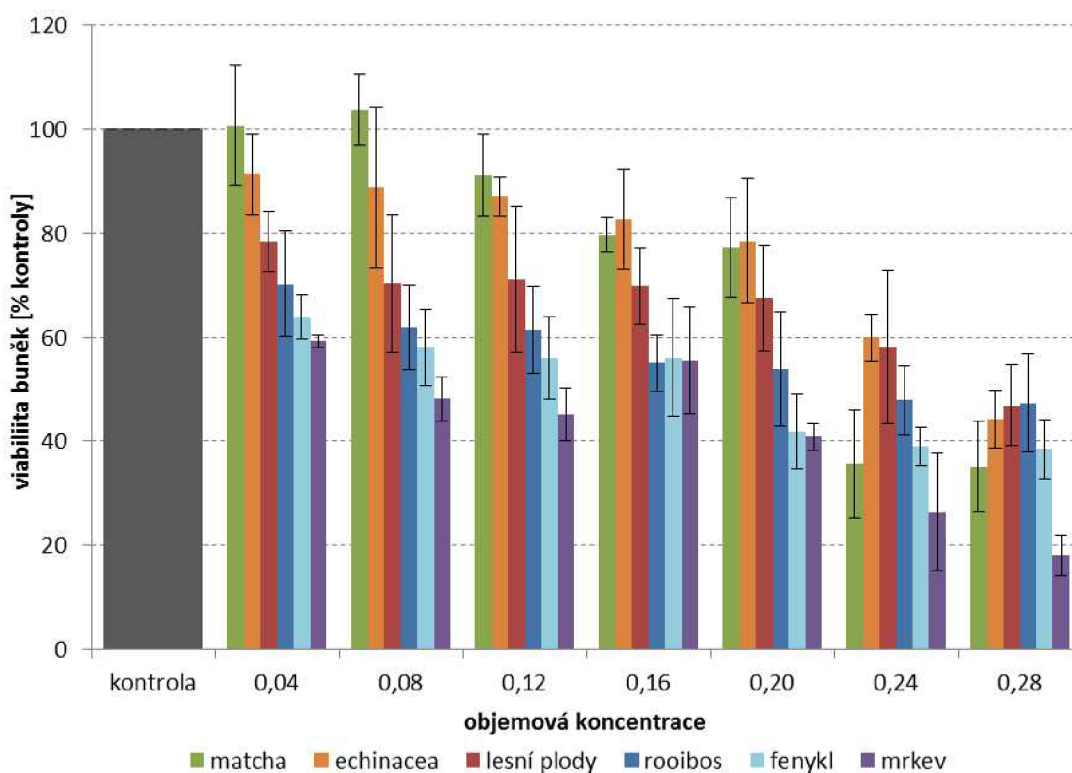
objm. konc. částic	koncentrace lecithinu [μ g/ml]					
	fenykl		rooibos červený		lesní plody	
	liposomy	PHB lipo	liposomy	PHB lipo	liposomy	PHB lipo
0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,04	12,6	17,1	16,6	32,4	24,6	28,5
0,08	25,2	34,2	33,2	64,9	49,2	57,0
0,12	37,7	51,3	49,8	97,3	73,8	85,5
0,16	50,3	68,4	66,3	129,8	98,4	114,0
0,20	62,9	85,5	82,9	162,2	123,0	142,5
0,24	75,5	102,6	99,5	194,7	147,6	171,0
0,28	88,0	119,7	116,1	227,1	172,2	199,5

objm. konc. částic	koncentrace lecithinu [μ g/ml]					
	echinacea		matcha		mrkev	
	liposomy	PHB lipo	liposomy	PHB lipo	liposomy	PHB lipo
0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,04	11,3	13,6	29,0	22,9	23,2	26,4
0,08	22,6	27,2	58,0	45,8	46,4	52,9
0,12	33,9	40,7	87,1	68,7	69,6	79,3
0,16	45,2	54,3	116,1	91,6	92,9	105,7
0,20	56,5	67,9	145,1	114,5	116,1	132,2
0,24	67,8	81,5	174,1	137,4	139,3	158,6
0,28	79,1	95,1	203,2	160,4	162,5	185,0

Toxicita byla vyjádřena jako pokles mitochondriální aktivity buněk po kultivaci s částicemi ve srovnání s kontrolou. Pro stanovení využití MTT test, postup je uveden v kapitole 4.12.3.3). Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty v Grafech 25 a 26.



Graf 23: Viabilita HaCaT buněk po expozici liposomům s enkapsulovanými vodnými extrakty různých typů vzorků stanovená pomocí MTT testu. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ze tří měření.



Graf 24: Viabilita HaCaT buněk po expozici PHB liposomům s enkapsulovanými vodnými extrakty různých typů vzorků stanovená pomocí MTT testu. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ze tří měření.

U žádného ze vzorků klasických liposomů nebyl pozorován významný vliv na metabolickou aktivitu buněk HaCaT v porovnání s kontrolou (hodnota inhibice nepřekročila 50%). Výjimku tvořila pouze nejvyšší objemová koncentrace liposomů s extraktem z mrkve.

Naproti tomu kombinované PHB liposomy vykazovaly výraznější vliv na aktivitu mitochondrií v buňkách HaCaT. PHB liposomy s vodnými extrakty z matchy, echinacey a lesních plodů ovlivňovaly viabilitu buněk od objemové koncentrace 0,24, v nižších hodnotách působily netoxicky. Vzorky PHB liposomů s rooibosem a fenyklem významně snižovaly viabilitu HaCaT buněk již od objemové koncentrace 0,20. Stejně jako v případě obyčejných liposomů, i vzorek PHB částic s vodným extraktem z mrkve byl stanoven jako nejvíce toxický. Vzhledem k minimálnímu experimentálně stanovenému množství aktivní látky lze zjištěnou toxicitu vysvětlit pravděpodobnou přítomností pesticidů na použitém vzorku mrkve.

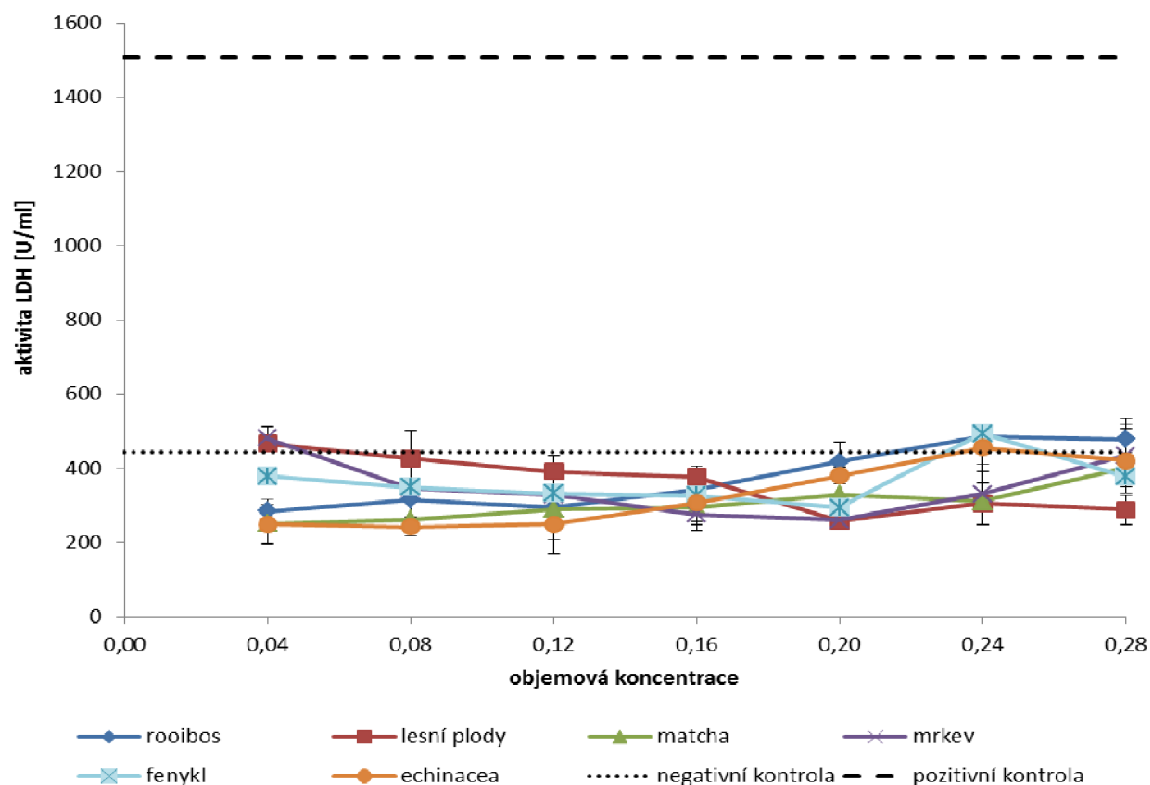
Ze srovnání klasických liposomů a nového typu PHB částic s enkapsulovanými extrakty lze říci, že kombinované PHB liposomy mají významnější vliv na mitochondriální aktivitu HaCaT buněk od objemových koncentrací 0,20 v kultivačním médiu. Do této hodnoty je lze prohlásit za netoxické. Enkapsulace aktivní látky do PHB liposomů podle zjištěných výsledků může zvyšovat inhibiční účinek na viabilitu HaCaT buněk, oproti kultivaci s prázdnými PHB liposomy (kap. 5.13.2.2).

Pro doplnění byl pro srovnání toxického účinku liposomů a kombinovaných liposomů využit ještě další typ testu, tzv. LDH test. V tomto experimentu byl sledováno působení testovaných částic na intaktnost plazmatické membrány buněk HaCaT. Pomocí kolorimetrického stanovení byla stanovena aktivita cytosolického enzymu laktátdehydrogenasy uvolněného do kultivačního média. Postup metody je uveden v kapitole 4.12.3.5. Všechny vzorky byly proměřeny nejméně třikrát, výsledky stanovení jako průměrné hodnoty jsou uvedeny v Grafech 25 a 26.

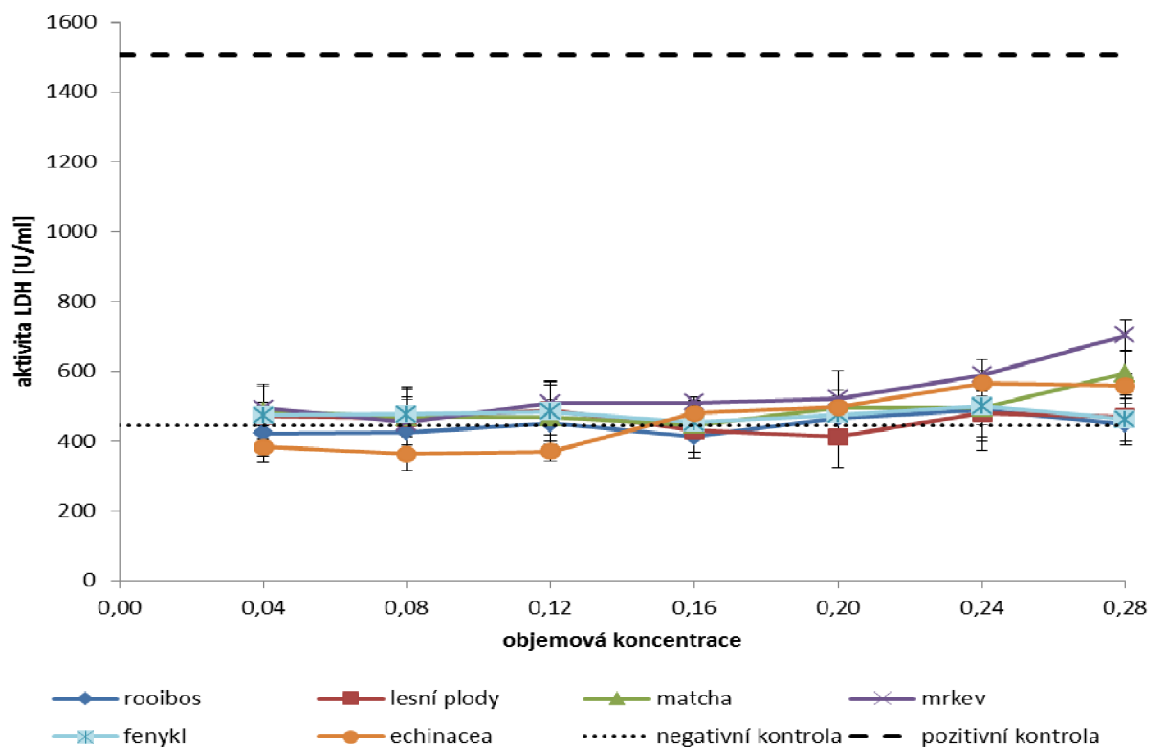
Z výsledků LDH testu vyplývá, že testované liposomy nemají žádný vliv na intaktnost plazmatické membrány HaCaT buněk. Aktivita laktátdehydrogenasy v médiu po kultivaci s částicemi dosahovala stejných anebo nižších hodnot jako aktivita enzymu produkovaného kontrolními buňkami. Všechny testované liposomové částice s enkapsulovanými extrakty je tedy v daném koncentračním rozmezí možné prohlásit za netoxické pro HaCaT buňky.

Ani v případě PHB liposomů nebyl pozorován vliv testovaných částic na intaktnost plazmatické membrány HaCaT buněk. Významný nárůst aktivity LDH enzymu byl zjištěn pouze u nejvyšší koncentrace vzorky obsahujícího extrakt z mrkve. Tuto skutečnost lze vysvětlit výše zmíněnou přítomností pesticidů ve vzorku.

Z výsledků stanovení pomocí LDH testu lze prohlásit účinek liposomů a PHB na intaktnost buněčné membrány za srovnatelný. Ani jeden ze vzorků se za daných podmínek testu neprojevoval jako cytotoxický.



Graf 25: Aktivita LDH v médiu po expozici HaCaT buněk liposomům s enkapsulovanými vodnými extrakty různých typů vzorků. Pozitivní kontrola - buňky kultivované s 40% ethanolem, negativní kontrola - buňky kultivované pouze v médiu. Data jsou vyjádřena jako průměr ze 3 měření.



Graf 26: Aktivita LDH v médiu po expozici HaCaT buněk PHB liposomům s enkapsulovanými vodnými extrakty různých typů vzorků. Pozitivní kontrola - buňky kultivované s 40% ethanolem, negativní kontrola - buňky kultivované pouze v médiu. Data jsou vyjádřena jako průměr ze 3 měření.

5.13.3 Stanovení genotoxického účinku na modelovém organismu

Genotoxický efekt připravených částicových suspenzí byl sledován s využitím geneticky modifikované bakterie *E.Coli* jako modelového organismu. Test byl proveden pomocí komerčního kitu EBPI SOS Chromotest™.

Jako pozitivní kontrola sloužil roztok standardního mutagenu 4-NQO v 10% DMSO v koncentračním rozmezí 0,08-10 µg/ml. Negativní kontrolou byla použita rozpouštědla (10% DMSO a voda).

Všechny liposomové suspenze byly podle instrukcí kitu testovány ve čtyřech různých koncentracích vzniklých dvojkovým ředěním původní liposomové suspenze použité pro testy cytotoxicity. Vzorky byly ředěny destilovanou vodou na následující hodnoty objemové koncentrace: 0,500; 0,250; 0,125; 0,063.

Genotoxický potenciál byl hodnocen u všech vzorků, které byly podrobeny cytotoxickým testům. Testovány byly prázdné liposomy i PHB liposomy, liposomy s enkapsulovaným vodným i lipidickým extraktem z dubové kůry, hřebíčku, skořice, oregana, zázvoru, heřmánku, jetele, kopřivy a řebříčku. Rovněž byly testovány liposomy i PHB liposomy s enkapsulovaným vodným extraktem z matchy, rooibosu, echinacey, fenyklu mrkve a směsi lesních plodů.

Pro hodnocení genotoxického potenciálu testované látky slouží SOS- indukční faktor (SOSIF). Ten byl pro každý vzorek vypočten podle následujícího vzorce:

$$\text{SOSIF} = \frac{(OD_{630x}) / (OD_{405x})}{(OD_{630, \text{negative}}) / (OD_{405, \text{negative}})} \quad (5.1)$$

kde OD_{630x} a OD_{405x} jsou absorbance testovaného vzorku při dané koncentraci a $OD_{630, \text{negative}}$ a $OD_{405, \text{negative}}$ jsou hodnoty absorbancí negativní kontroly.

Podle obecné klasifikace je vzorek považován za negenotoxický při $\text{SOSIF} < 1,5$, jako neprůkazně toxický při $\text{SOSIF} = 1,5-2,0$ a jako genotoxický a vhodný pro další testování, pokud dosahuje hodnot $\text{SOSIF} > 2,0$.

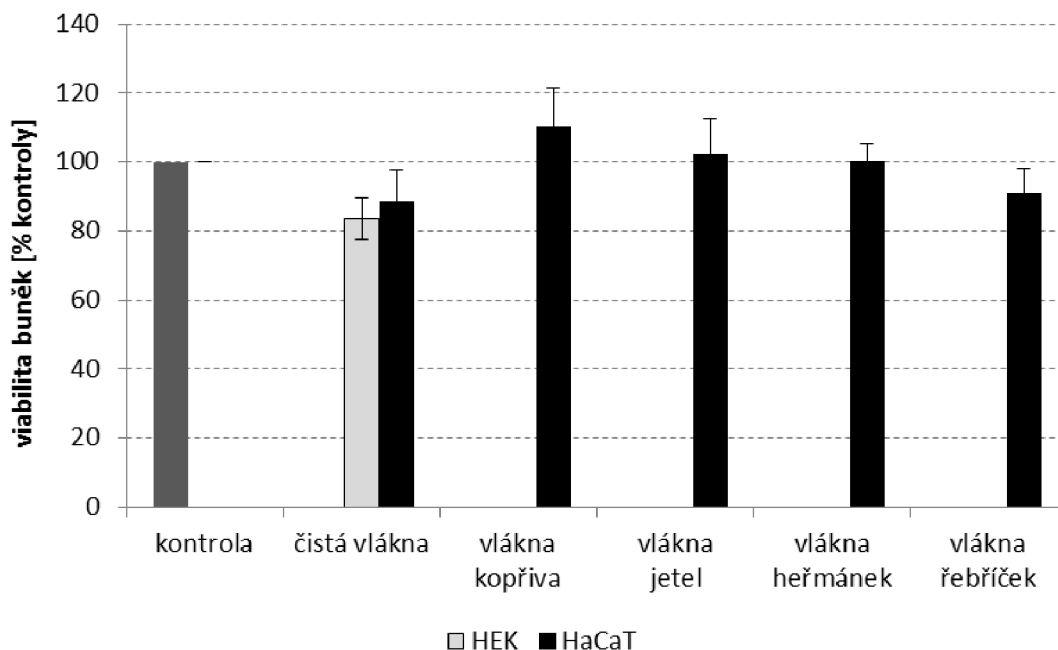
Všechny testované vzorky liposomů a PHB liposomů s různými enkapsulovanými extrakty měly při testovaných koncentracích hodnotu SOSIF menší než 1,5 a mohou tedy být považovány za negenotoxické.

5.14 Stanovení toxicity vláken

U připravených PHB vláken byl orientačně sledován případný cytotoxický účinek na buňky HEK a HaCaT. Pro testování byl využit modifikovaný postup MTT testu (kap. 4.13.1.2). Samotná PHB vlákna byla testována s využitím obou buněčných kultur, toxicita vláken s lipidickými extrakty byla sledována na linii HaCaT. K testování byl vždy použit 1 cm² vláknenné textilie. Protože však jednotlivé textilie neměly stejnou tloušťku, pro úplnost jsou v Tabulce 34 uvedeny hmotnosti jednotlivých vzorků. Všechny vzorky byly testovány dvakrát, v Grafu 27 jsou zobrazeny průměrné hodnoty z obou měření.

Tabulka 34: Velikost a hmotnost jednotlivých vzorků vláken použitých pro testování cytotoxicity

vzorek	velikost	hmotnost
čistá vlákna (HEK)	1 cm ²	2,2 mg
čistá vlákna (HaCaT)	1 cm ²	1,1 mg
vlákna s LE z kopřivy	1 cm ²	3,1 mg
vlákna s LE z jetele	1 cm ²	8,6 mg
vlákna s LE z heřmánku	1 cm ²	8,3 mg
vlákna s LE z řebříčku	1 cm ²	10,9 mg



Graf 27: Viabilita HEK a HaCaT buněk po kultivaci s různými vzorky PHB vláken

Z Grafu 27 vyplývá, že polyhydroxybutyrátová vlákna nejsou v daném množství toxická pro buňky HEK ani pro linii HaCaT. Významný pokles viability buněk HaCaT vzhledem ke kontrole nebyl zaznamenán ani při testování vláken s lipidickými extrakty. Za daných podmínek testu lze tedy všechny vzorky vláken považovat za netoxické. Testování toxicity vláken bude vyžadovat další optimalizaci podmínek testů a přípravy materiálů.

6 ZÁVĚR

Předložená dizertační práce je zaměřena na přípravu kombinovaných preparátů s přírodní aktivní složkou ve formě nanočástic a nanovláken. Moderní typy aplikačních forem byly připraveny z biomateriálů na bázi jednoho či více přírodních polymerů. Aktivní složkou preparátů byly směsi nízkomolekulárních látek získané extrakcí z přírodních zdrojů. Připravené částice a vlákna byly charakterizovány z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností. U funkcionalizovaných preparátů byl také stanoven jejich antioxidační a antimikrobiální účinek. Bezpečnost nových aplikačních forem byla ověřena s využitím cytotoxických a genotoxických testů. Hlavním zamýšleným využitím připravených preparátů je aplikace v potravinářských a kosmetických výrobcích.

V úvodní části práce byla připravena řada různých typů extraktů přírodních zdrojů s vysokým obsahem antioxidantů. Jako zdroje aktivních látek byly na základě dostupných literárních údajů zvoleny vzorky různých typů čajů a kůr, bylin, koření a také vzorky ovoce a zeleniny. Extrakty různých vzorků byly charakterizovány z hlediska obsahu polyfenolů, flavonoidů a celkové antioxidační aktivity. Rovněž byl sledován vliv rozpouštědla na celkový obsah antioxidantů v extraktu. Bylo zjištěno, že extrakty s největším množstvím polyfenolů byly připraveny modelově Folchovou metodou. Vhodným rozpouštědlem pro získání polyfenolických látek je také voda. Nižší obsah polyfenolů byl naměřen v extraktech získaných při přímém použití organických rozpouštědel methanolu a dimethylsulfoxidu. Celková antioxidační aktivita extraktů byla vždy nejvyšší u vodných extraktů. Na základě těchto zjištění byly dále pro přípravu kombinovaných preparátů nejčastěji využívány vodné extrakty zdrojů antioxidantů, v některých případech lipidické. Pro případné komerční využití by bylo pro přípravu extraktů potřeba otestovat použití GRAS rozpouštědel (hexan, ethanol).

Získané extrakty byly použity pro přípravu částic s enkapsulovanou aktivní složkou. Byly připraveny celkem tři různé typy částic: polysacharidové částice z polymeru chitosanu, dále liposomy a také nový typ kombinovaných liposomů s polymerem PHB. Všechny typy částic byly připraveny ultrasonifikací.

Tato metoda se jeví jako nevhodná pro přípravu chitosanových částic. Účinnost enkapsulace do chitosanových částic byla u poloviny vzorků téměř nulová. Velikost připravených částic se pohybovala v řádech mikrometrů a zřejmě docházelo k jejich agregaci. Z výsledků stanovení elektrokinetické stability pomocí zeta potenciálu také vyplývá, že připravené chitosanové částice vykazují nízkou stabilitu. Kvůli své velikosti není tento typ částic vhodný pro použití v kosmetice. Některé stabilnější vzorky mohou nalézt uplatnění při aplikaci do nápojů a potravin, např. jako zdravější forma kapslí v moderním nápoji typu „bubble tea“.

Liposomové částice připravené metodou ultrasonikace vykazovaly velmi dobrou stabilitu a dobrou enkapsulační účinnost. Velikost žádného z vzorků nepřekročila hodnotu 500 nm. Z výsledků měření také vyplývá, že použité rozpouštědlo při přípravě extraktu nemá vliv na velikost a elektrokinetickou stabilitu liposomů s enkapsulovanou aktivní složkou. Naproti tomu použití organického či lipidického extraktu výrazně zvyšovalo účinnost enkapsulace do liposomů.

Enkapsulační účinnost, velikost částice a její stabilita byly parametry hodnocené i u nového typu částic – kombinovaných PHB liposomů. Bylo zjištěno, že inkorporace polyhydroxybutyrátu do struktury liposomu má za následek téměř dvojnásobné zvětšení průměru částice. Tyto suspenze částic vykazovaly také vyšší polydisperzní index, vypovídající o menší uniformitě připravených liposomů. Naproti tomu nebyl zjištěn výrazný rozdíl mezi enkapsulační účinností a stabilitou připravených liposomů a PHB liposomů. Oba typy částic byly vyhodnoceny jako vhodné nástroje pro ochranu a cílený transport aktivních látek a mohou najít aplikaci v nových typech kosmetických výrobků, pokud

budou využita GRAS rozpouštědla. Liposomové částice vyhovují díky svým parametrům i použití v potravinářských aplikacích. Přírodní extrakty antioxidantů mohou v potravinách působit antibakteriálně a zabránit tak mikrobiálnímu znehodnocení, případně potravině dodají charakteristickou chuť či vůni. Vybrané vzorky liposomů s přírodním extraktem byly proto testovány z hlediska jejich stability v modelových potravinách. Liposomové částice vykazovaly dobrou stabilitu ve vodném a mírně kyselém prostředí, naopak jako nestabilní byly vyhodnoceny v tukové prostředí. Na základě získaných dat lze říct, že připravené liposomy jsou vhodné pro použití jako aditiva do potravin s neutrálním a mírně kyselým prostředím, případně do alkoholových potravin, kde částice vykazují dobrou stabilitu. Do úvahy přichází i použití v kosmetických výrobcích na bázi vody, případně gelu, nikoliv v tukových přípravcích.

V další části práce byl testován antimikrobiální účinek připravených extraktů a částic pomocí dilučních i difuzních metod. Testovacím organismem byl *Micrococcus luteus*, jako zástupce grampozitivních bakterií, *Serratia marcescens* jako zástupce gramnegativních bakterií a kvasinka *Candida glabrata*.

Výsledky potvrzují obecně vyšší inhibiční účinek extraktů vůči grampozitivním bakteriím než proti gramnegativním. Nejvyšší inhibice růstu mikroorganismu byla zaznamenána při působení extraktů na kvasinku *Candida*. Tento výsledek je velmi cenný, poněvadž dosud není k dispozici dostatek přírodních antimykotických preparátů a další výzkum je proto velmi nadějný. Z výsledků stanovení antimikrobiálního účinků extraktů tvořených různým typem rozpouštědla vyplývá nejvyšší inhibiční efekt při použití organických extraktů, je však nutné omezit se na použití GRAS rozpouštědel. Dalšímu antimikrobiálnímu testování byly proto podrobeny pouze částice obsahující vodný, ethanolový nebo lipidický extrakt.

Bylo potvrzeno, že enkapsulace do částic má za následek vyšší antimikrobiální účinek u vodných typů extraktů. Zároveň bylo patrné, že chitosanové částice mají vyšší antimikrobiální účinek než liposomy, a to i přes nižší enkapsulační účinnosti a horší stabilitu částic. Tento fakt je pravděpodobně způsoben antimikrobiálním účinkem samotného chitosanu. Částečný inhibiční efekt vůči testovacím mikroorganismům byl zaznamenán u všech vzorků liposomů s různými extrakty. Ve většině případů byly etanolové a lipidické extrakty v inhibici mikroorganismu účinnější než vodné. Vyšší inhibiční efekt vzorků byl opět zaznamenán na grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus*. Z porovnání antimykotického účinku liposomů a PHB liposomů vyplývá, že složení částice nemá vliv na inhibici kvasinky *Candida*.

U připravených liposomů a kombinovaných PHB liposomů byl stanoven a porovnán jejich cytotoxický účinek na lidské kožní buňky. Pro testování byla zvolena kultura lidských epidermálních keratinocytů HEK(102-05a) a buněčná linie HaCaT. K testování toxicity byly použity dvě různé metody zaměřené na metabolickou aktivitu buněk (MTT test a Alamar Blue test) a jedna metoda sledující intaktnost plazmatické membrány (LDH test). Pro získání dalších informací o působení částicových suspenzí na buňky bylo využito sledování produkce prozánětlivých cytokinů IL-8.

Zkoumání účinků suspenze liposomů a kombinovaných PHB liposomů ukázalo, že spojení fosfolipidu s polymerem PHB nezpůsobuje výrazně vyšší hladinu cytotoxicity (testy MTT/Alamar Blue, LDH) na lidských kožních buňkách. Nový typ kombinovaných částic může být tedy použit jako aktivní nosiče jak pro hydrofobní, tak pro hydrofilní aktivní složky, jako jsou antioxidanty, komplexní přírodní extrakty, antimikrobiální činidla a mnoho dalších. Nanočástice jsou také známé svou schopností indukovat produkci prozánětlivých cytokinů. Tento zánět může vyvolat řadu následujících nežádoucích procesů (např. genotoxicitu, buněčnou smrt). Produkce cytokinů IL-8 byla použita jako marker zánětu

indukovaného liposomy. Navzdory relativně nízké toxicitě byly u liposomových částic pozorována vysoká hladina produkce IL-8 proteinu. Naopak nově navržené PHB-liposomové částice nevedly k významnému zvýšení produkce IL-8 ve srovnání s kontrolou. Toto základní vyšetření potvrdilo, že přídavek PHB by mohl vést k podstatnému snížení prozánětlivého účinku liposomů.

Kromě prázdných částic byl testován i cytotoxický efekt liposomů a PHB liposomů s enkapsulovanou aktivní složkou. Nebyl zjištěn výrazný rozdíl v cytotoxickém účinku při použití částic s enkapsulovaným vodným a lipidickým extraktem na buňkách HEK ani HaCaT. Ze srovnání klasických liposomů a nového typu PHB částic lze říci, že kombinované PHB liposomy mají ve vyšších objemových koncentracích významnější vliv na mitochondriální aktivitu HaCaT buněk. Žádný z typů testovaných částic nemá podle výsledků měření vliv na intaktnost buněčné membrány HaCaT buněk.

Genotoxický efekt připravených částicových suspenzí byl sledován s využitím geneticky modifikované bakterie *E.Coli* jako modelového organismu. Test byl proveden pomocí komerčního kitu EBPI SOS Chromotest™. Genotoxický potenciál byl hodnocen u všech vzorků, které byly podrobeny cytotoxickým testům. Žádný ze vzorků nesplňuje podle výsledků měření obecná kritéria genotoxicity, a proto mohou být všechny testované částicové suspenze považovány za negenotoxické.

Součástí práce byla i příprava a charakterizace polyhydroxybutyrátových vláken. Všechna vlákna byla připravena metodou elektrospinningu. Kromě samotných PHB vláken byly připraveny i vzorky s přídavkem lipidických extraktů. Připravená vlákna byla následně podrobena analýze na FTIR-ATR a poté byly zkoumány jejich antioxidační a antimikrobiální účinky. Rovněž byl ověřen jejich případný toxický efekt při kultivaci s lidskými buněčnými kulturami.

Změny ve FTIR spektrech samotných a obohacených vláken potvrzují zachycení aktivních látek z lipidických extraktů do struktury polymerního PHB vlákna. U obohacených vláken byla také naměřena vysoká antioxidační aktivita. Měření krátkodobé stability a kvantifikace uvolněných polyfenolů z vláken taktéž potvrzuje inkorporaci aktivní složky a vytvoření kombinovaného preparátu. Připravená nanovlákna mohou nalézt uplatnění např. jako inteligentní obaly potravin chránící výrobek před mikrobiálním poškozením. Vzhledem k faktu, že připravená vlákna nevykazovala cytotoxický účinek při testování na buňkách HEK ani HaCaT, lze nalézt jejich aplikaci i v kosmetice, případně farmacii jako moderní typy krytí pro hojení ran. Infekce kožních ran vede k prodloužení doby potřebné k hojení. Lokální aplikace antibiotika či antimykotika přispívá k rychlejší léčbě infekce. Látka inhibující růst mikroorganismů může být přímo impregnována do obvazového či krycího materiálu. Použití nanovláken s navázanou aktivní složkou umožňuje efektivnější dostupnost inhibičního přípravku v důsledku vyšší plochy povrchu nanovlákna. V této práci byl potvrzen antimykotický efekt vláken s navázanými lipidickými extrakty vůči kvasině *Candida glabrata*.

Předloženou práci lze považovat za pilotní studii zaměřenou na vývoj nových typů a komplexní charakterizaci moderních nano- a mikrostruktur použitelných v potravinářství a kosmetice včetně souběžného posouzení biologických účinků a bezpečnosti těchto materiálů. Poněvadž lze předpokládat další rozvoj a postupné rozšiřování uvedených materiálů do dalších aplikačních oblastí, budou podobné komplexní studie spojené s testy bezpečnosti nabývat na důležitosti. Předložená práce pak poslouží zejména jako metodický základ pro stanovení experimentálních strategií u navazujících prací.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

4-NQO	4-nitrochinolin oxid
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
AF	ferric chloride hexahydrate in ammonium thiocyanate.
AFM	Atomic Force Microscopy
AM	acetoxymethyl
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosintrifosfát
ATR	Attenuated Total Reflection
COLIPA	The European Cosmetic and Perfumery Association
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
ECACC	The European Collection of Authenticated Cell Cultures
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FC	Folin Ciocalteu
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GIT	gastrointestinální trakt
GRAS	Generally Recognized As Safe
HEK	Human Epidermal Keratinocytes
HTS	High Throughput Screening
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KGM	Keratinocyte Growth Medium
LDH	laktátdehydrogenasa
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MS	Mass Spectrometry
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) 2H-tetrazolium)
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NMR	nukleární magnetická rezonance
PBS	Phosphate Buffer Solution
PDA	Photo-diode Array
PLA	polylactic acid
PLGA	poly(lactic-co-glycolic acid)
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
SC	stratum corneum
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEC	Size Exclusion Chromatography
SEM	Scanning Electron Microscopy

SOSIF	SOS Induction Factor
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TEA	triethanolamin
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TEM	Transmission Electron Microscopy
TK	thymidinkinasa
UV	Ultraviolet Radiation
VIS	Visible Light
VN	vysoké napětí
WHO	World Health Organization
YPD	Yeast Extract-Pepton-Dextrose

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERAURY

- [1] SAKAMOTO, K., et al. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles an Applications*. Elsevier, 2017.
- [2] HE, X., HWANG, H. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016, 24(4), 671-681.
- [3] PETERS, R., et al. Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, 54, 155-164.
- [4] DE VOS, P., et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 2010, 20(4), 292-302.
- [5] POWELL, J., et al. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *Journal of Autoimmunity*. 2010, 34(3), J226-J233.
- [6] HILLYER, J., ALBRECHT, R. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001, 90(12), 1927-1936.
- [7] ENSIGN, L. M., CONE, R., HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, 64(6), 557-570.
- [8] PROW, T., et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011, 63(6), 470-491.
- [9] EL MAGHRABY, G.M., BARRY, B. W., WILLIAMS, A.C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008, 34(4-5), 203-222.
- [10] HOH, A., MAIER, K.. Comparative Cytotoxicity Test with Human Keratinocytes, HaCaT Cells, and Skin Fibroblasts to Investigate Skin-Irritating Substances. 1993.
- [11] SHANG, L., NIENHAUS, K., NIENHAUS, G.. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*. 2014, 12(1), 5-12.
- [12] GOYAL, R., et al. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2016, 240, 77-92.
- [13] SAHOO, S. K., LABHASETWAR, V.. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*. 2003, 8(24), 1112-1120.
- [14] CASANOVA, F., SANTOS, L. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation*. 2015, 33(1), 1-17.
- [15] SILVA, P., et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*. 2014, 44(7), 1304-1311.
- [16] NICOLAAS, J. Z., et al. *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Springer, 2010.
- [17] DESAI, K. G. H., JIN PARK, H. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*. 2005, 23(7), 1361-1394.
- [18] GOUIN, S. Microencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*. 2004, 15(7-8), 330-347.

- [19] PEANPARKDEE, M., IWAMOTO, S., YAMAUCHI, R. Microencapsulation: A Review Of Applications In The Food And Pharmaceutical Industries. *Reviews in Agricultural Science*. 2016, 4.
- [20] NEDOVIC, V., et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. 2011, 1, 1806-1815.
- [21] LASIC, D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology* [online]. 16(7), 307-321.
- [22] SOEMA, P., et al. Predicting the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015, 94, 427-435.
- [23] DIMOV, N., et al. Formation and purification of tailored liposomes for drug delivery using a module-based micro continuous-flow system. *Scientific Reports*. 2017, 7(1).
- [24] WAGNER, A., VORAUER-UHL, K. Liposome Technology for Industrial Purposes. *Journal of Drug Delivery*. 2011, 11, 1-9.
- [25] AKBARZADEH, A., et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013, 8(102).
- [26] GOY, R. C., DE BRITTO, D., ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*. 2009, 19(3), 241-247.
- [27] LEE, K. Y., MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2012, 37(1), 106-126.
- [28] TØNNESEN, H. H., KARLSEN, J. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2002, 28(6), 621-630.
- [29] KNUDSEN, K. B., et al. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015, 11(2), 467-477.
- [30] LAYE, C., MCCLEMENTS, D. J., WEISS, J. Formation of Biopolymer-Coated Liposomes by Electrostatic Deposition of Chitosan. *Journal of Food Science*. 2008, 73(5).
- [31] HALDER, Alaka. What are liposomes in biology and their functions?. In: *Quora: A place to share knowledge and better understand the world*. 2014.
- [32] TIEDE, K., et al. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2008, 25(7), 795-821.
- [33] MOHANRAJ, V. J., CHEN, Y. Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2006, 5(1).
- [34] ROKSTAD, A. M., et al. Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, 67-68, 111-130.
- [35] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano Series User Manual* [online]. 2004.
- [36] CLOGSTON, J. D., PATRI, A. K. Zeta Potential Measurement. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. 2011, 2011-10-19, s. 63-70.
- [37] MURDOCK, R. C., et al. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicological Sciences*. 2008, 101(2), 239-253.

- [38] DE KANTER, M., et al. Enabling the measurement of particle sizes in stirred colloidal suspensions by embedding dynamic light scattering into an automated probe head. *Measurement*. 2016, 80, 92-98.
- [39] STEWART, P. L. Cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography of nanoparticles. *Wiley Periodicals, Inc.* 2016, (9), 1-16.
- [40] WEISS, J., TAKHISTOV, P., MCCLEMENTS, D. J. Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science*. 2006, 71(9), R107-R116.
- [41] MORSY, R., et al. Developing a potential antibacterial long-term degradable electrospun gelatin-based composites mats for wound dressing applications. *Reactive and Functional Polymers*. 2017, 114, 8-12.
- [42] LOPES DA SILVA, J.A. Functional nanofibers in food processing. *Functional Nanofibers and their Applications*. 2012, 262-304.
- [43] LI, X. T., et al. Nanofibrous polyhydroxyalkanoate matrices as cell growth supporting materials. *Biomaterials*. 2008, 29(27), 3720-3728.
- [44] WEN, P., et al. Encapsulation of Bioactive Compound in Electrospun Fibers and Its Potential Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65(42), 9161-9179.
- [45] NAYAK, R., et al. Recent advances in nanofibre fabrication techniques. *Textile Research Journal*. 2011, 82(2), 129-147.
- [46] CHENG, J., et al. Electrospinning versus microfluidic spinning of functional fibers for biomedical applications. *Biomaterials*. 2017, 114, 121-143.
- [47] TEO, W. E., RAMAKRISHNA, S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*. 2006, 17(14), R89-R106.
- [48] SCHIFFMAN, J. D., SCHAUER, C. L. A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer Reviews*. 2008, 48(2), 317-352.
- [49] ZIABARI, M., MOTTAGHITALAB, V., HAGHI, A.K. Application of direct tracking method for measuring electrospun nanofiber diameter. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2009, 26(1), 53-62.
- [50] SHARMA, J., et al. Multifunctional Nanofibers towards Active Biomedical Therapeutics. *Polymers*. 2015, 7(2).
- [51] FORAIDA, Z., et al. Elastin-PLGA hybrid electrospun nanofiber scaffolds for salivary epithelial cell self-organization and polarization. *Acta Biomaterialia*. 2017, 62, 116-127.
- [52] WANG, Y., et al. Electrospun PBLG/PLA nanofiber membrane for constructing in vitro 3D model of melanoma. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, 76, 313-318.
- [53] UYAR, T., KNY, E. *Electrospun materials for tissue engineering and biomedical applications: research, design and commercialization*. Cambridge, MA: Elsevier/Woodhead Publishing, [2017]. Woodhead Publishing series in biomaterials. ISBN 9780081022221.
- [54] GARCÍA, A., et al. High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*. 2014, 82, 117-123.

- [55] KAVITHA, G., et al. Biosynthesis, purification and characterization of polyhydroxybutyrate from *Botryococcus braunii* kütz. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, 89, 700-706.
- [56] XIONG, Y., et al. Application of Polyhydroxyalkanoates Nanoparticles as Intracellular Sustained Drug-Release Vectors. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2010, 21(1), 127-140.
- [57] ERRICO, C., et al. Poly(hydroxyalkanoates)-Based Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, 1-10.
- [58] SHRIVASTAV, A., KIM, H. Y., KIM, Y. R. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *BioMed Research International*. 2013, 1-12.
- [59] PANDA, H. *Nanotechnology Handbook*. ASIA PACIFIC BUSINESS PRESS, 2009. ISBN 9788178331249.
- [60] GRUMEZESCU, A., HOLBAN, A. M. *Impact of Nanoscience in the Food Industry*. Academic Press, 2018. ISBN 9780128114933.
- [61] HIND, A. R., BHARGAVA, S. K., MCKINNON, A. At the solid/liquid interface: FTIR/ATR — the tool of choice. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2001, 93(1-3), 91-114.
- [62] MÜLLER, C. M, et al. Infrared Attenuated Total Reflectance Spectroscopy: An Innovative Strategy for Analyzing Mineral Components in Energy Relevant Systems. *Scientific Reports*. 2015, 4(1).
- [63] RAMALINGAM, M., RAMAKRISHNA, S. *Nanofiber Composites for Biomedical Applications*. Woodhead Publishing, 2017. ISBN 978-0-08-100208-7.
- [64] The Use of the Spectrometric Technique FTIR-ATR to Examine the Polymers Surface. URBANIAK-DOMAGALA, Wieslava. *Advanced Aspects of Spectroscopy*. InTechOpen, 2012, 85-104.
- [65] SUTTON, M. A., et al. Scanning Electron Microscopy for Quantitative Small and Large Deformation Measurements Part I: SEM Imaging at Magnifications from 200 to 10,000. *Experimental Mechanics*. 2007, 47(6), 775-787.
- [66] CHAWDA, P., et al. Co-encapsulation of bioactives for food applications. *Food Quality and Safety*. 2017, 1(4), 302-309.
- [67] STANKOVIĆ, N., et al. Comparative Study of Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Selected Aromatic Plants from Balkan Peninsula. *Planta Medica*. 2016, 82(7), pp. 650-661.
- [68] SAATCHI, A., et al. Application of Some Antifungal and Antioxidant Compounds Extracted from Some Herbs to Be Used in Cakes as Biopreservatives. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2014, 16(1), pp. 561-568.
- [69] LOBO, V., et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 2010, 4(8), 118.
- [70] CHANTA, S., DAVE, R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medical plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*. 2009, 3(13), 981-996.
- [71] SURYA, S., et al. Diabetes mellitus and medicinal plants-a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014, 4(5), pp. 337-347.

- [72] TABASSUM, N., AHMAD, F. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. *Pharmacognosy Reviews*. 2011, 5(9), 30-40.
- [73] IONESCU, D., et al. Polyphenols and Minerals, Antioxidants in the Plants Used in the Natural Treatment of Hepatobiliary Disorders. *Revista de Chimie*. 2014, 65(5), 507-511.
- [74] NJERU, S. N., et al. A Review of some Phytochemicals commonly found in Medicinal Plants. *International Journal of Medicinal plants*. 2013, 105(1), 135-140.
- [75] RAEISI, M., et al. Antimicrobial Effect of Cinnamon Essential Oil Against Escherichia Coli and Staphylococcus aureus. *Health Scope*. 2015.
- [76] DAVIDSON, M. P., SOFOS, J. N., BRANEN, A. L. *Antimicrobials in Food*. Third Edition. Taylor & Francis Group, 2005. ISBN 0-8247-4037-8.
- [77] DHAMA, K., et al. Evidence Based 145 Antibacterial Potentials of Medicinal Plants and Herbs Countering Bacterial Pathogens Especially in the Era of Emerging Drug Resistance: An Integrated Update. *International Journal of Pharmacology*. 2014, 10(1), pp. 1-43.
- [78] SWAMY, M. K., AKHTAR, M. S., SINNIAH, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016, 2016, 1-21.
- [79] SARAF, S., KAUR, CH. In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacognosy Research*. 2010, 2(1), 22-25.
- [80] RIFKIN, R. F., et al. Evaluating the Photoprotective Effects of Ochre on Human Skin by In Vivo SPF Assessment: Implications for Human Evolution, Adaptation and Dispersal. *PLOS ONE*. 2015, 10(9).
- [81] MAIA CAMPOS, P., et al. In Vitro Antioxidant and In Vivo Photoprotective Effects of an Association of Bioflavonoids with Liposoluble Vitamins. *Photochemistry and Photobiology*. 2006, 82(3), 683-.
- [82] SAMBANDAN, D. R., RATNER, D. Sunscreens: An overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011, 64(4).
- [83] SAKARKAR, D. M., DESHMUKH, V. N. Ethnopharmacological Review of Traditional Medicinal Plants for Anticancer Activity. *International Journal of PharmTech Research*. 2011, 3(1), pp. 298-308.
- [84] VOON, H. CH., BHAT, R., RUSUL, G. Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2012, 11(1), 34-55.
- [85] BAHRAMSOLTANI, R., FARZAEI, M. H., RAHIMI, R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. *Archives of Dermatological Research*. 2014, 306(7), 601-617.
- [86] BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2000, 57(3), 101-110.
- [87] SAXENA, M., et al. Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013, 1(6), 169- 182.

- [88] BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K. SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006, 99(1), 191-203.
- [89] DAI, J., MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* [online]. 2010, 15(10), 7313-7352.
- [90] CUSHNIE, T.P., et al. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005, 26(5), 343-356.
- [91] OGBEMUDIA, F. O., THOMPSON, E. O. Variation in Plants Secondary Metabolites and Potential Ecological Roles – A Review. *International Journal of Modern Biology and Medicine*. 2014, 5(3), 111-130.
- [92] KENNEDY, D. O., WIGHTMAN, E. L. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. *Advances in Nutrition*. 2011, 2(1), 32-50.
- [93] NACZK, M., SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, 41(5), 1523-1542.
- [94] DOGAN, S., DIKEN, M. E., DOGAN, M. Antioxidant, phenolic and protein contents of some medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010, 4(23), 2566- 2573.
- [95] MATEI, A. O., GATEA, F., RADU, G. L. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC-MS. *Journal of Chromatographic Science*. 2015, 53(7), 1147- 1154.
- [96] VICHAPONG, J., et al. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *LWT - Food Science and Technology*. 2010, 43(9), 1325-1330.
- [97] AZWANIDA, N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 2015, 4(3), 1-6.
- [98] GHODS, Bahram, Ashraf Haj HOSSEINI, Payman QAJARBEYGI a Alireza MASSIHA. Study on phenolic compounds and their antioxidant activities in Iranian rice varieties. *International Journal of Medicinal Plants and Alternative Medicine*. 2015, 3(2).
- [99] MIRODDI, M., NAVARRA, M., QUATTROPANI, M. C. Systematic Review of Clinical Trials Assessing Pharmacological Properties of Salvia Species on Memory, Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *CNS Neuroscience*. 2014, 20(6), 485-495.
- [100] MUNIN, Aude a Florence EDWARDS-LÉVY. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*. 2011, 3(4), 793-829.
- [101] SHINGISOV, A. U., et al. Physicochemical Characteristics of The New PolyphytoComponent Composition for Food Industry. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2016, 13(2), 879-886.
- [102] HAYOUNI, E. A., et al Tunisian Salvia officinalis L. and Schinus molle L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against Salmonella inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 125(3), 242-251.
- [103] RICE-EVANS, C., MILLER, N. PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 1997, 2(4), 152-159.

- [104] PERRON, N. R., BRUMAGHIM, J. L. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2009, 53(2), 75-100.
- [105] LÜ, J., et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010, 14(4), 840-860.
- [106] NIMSE, S. B., PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*. 2015, 5.
- [107] PISOSCHI, A. M., NEGULESCU, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 2012, 01(1).
- [108] ALAM, N., et al. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, 21(2), 143-152.
- [109] ZEB, A., ULLAH, F.. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2016, 2016, 1-5.
- [110] SOCHOR, J. et al. Electrochemistry as a Tool for Studying Antioxidant Properties. *International journal of electrochemical science*. 2013, 8(8).
- [111] ADOM, K. K., LIU, R. H. Antioxidant Activity of Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50(21), 6182-6187.
- [112] HIDALGO, G. I., ALMAJANO, M. Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination. *Antioxidants*. 2017, 6(1).
- [113] CHANDA, S., DAVE, R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*. 2009, 3(13).
- [114] BONEV, B., HOOPER, J., PARISOT, J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008, (61), 1295-1301.
- [115] WIEGAND, I., HILPERT, K., HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008, 3(2).
- [116] KLANČNIK, A., et al. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, 81(2), 121-126.
- [117] PANDEY, A., et al. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 7, 21-61.
- [118] BALOUIRI, M., SADIKI, M., IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, 6(2), 71-79.
- [119] JORGENSEN, J. H., FERRARO, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, (49), 1749-1755.
- [120] VALGAS, C., et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007, 38(2), 369-380.

- [121] KROLL, A., et al. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009, 72(2), 370-377.
- [122] ROGGEN, E. L. In vitro Toxicity Testing in the Twenty-First Century. *Frontiers in Pharmacology*. 2011, 2-.
- [123] JONES, C. F., GRAINGER, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, 61(6), 438-456.
- [124] RISS, T. L., et al. Bethesda (Md): Eli Lilly & Company And The National Center For Advancing Translational Sciences;. *Cell Viability Assays: Assay Guidance Manual*. 2013.
- [125] POTESER, M. Cell-based in vitro models in environmental toxicology: a review. *Biomonitoring*. 2017, 4(1).
- [126] CABALLERO-DÍAZ, E., VALCÁRCEL CASES, M. Analytical methodologies for nanotoxicity assessment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, 84, 160-171.
- [127] HILLEGASS, J. M., et al. Assessing nanotoxicity in cells in vitro. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2010, 2(3), 219-231".
- [128] BELYANSKAYA, L., et al. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes–cell interaction. *Carbon*. 2007, 45(13), 2643-2648.
- [129] NILES, A. L., MORAVEC, R. A., RISS, T. L. In Vitro Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening. *Current Chemical Genomics*. 2009-6-11, 3, 33-41.
- [130] REPETTO, G., DEL PESO, A., ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. 2008, 3(7), 1125-1131.
- [131] LEWINSKI, N., COLVIN, V., DREZEK, R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small Journal*. 2008, 4(1), 26-49.
- [132] AVELAR-FREITAS, B.A., et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2014, 47(4), 307-315.
- [133] BRATOSIN, D., et al. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry Part A*. 2005, 66A(1), 78-84.
- [134] HODGSON, E. *A Textbook Of Modern Toxicology* [online]. John Wiley, 2004. ISBN 0-471-26508-X.
- [135] BAHADAR, H., et al. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iranian Biomedical Journal*. 2016, 20(1), 1-11.
- [136] GUPTA, R. C. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles* [online]. Academic Press, 2007. ISBN 978-0-12-370467-2.
- [137] SIGMA ALDRICH. *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook*. Third Edition. 2016.
- [138] NANDKISHOR, J. Cell Lines: Types, Nomenclature, Selection and Maintenance. In: *Biology Discussion*. 2016.
- [139] TRAPICAR, M., CENCIC, A. Application of Gut Cell Models for Toxicological and Bioactivity Studies of Functional and Novel Foods. *Foods*. 2012, 1(1), 40-51.

- [140] LEA, T. Caco-2 Cell Line. Verhoeckx K. et al. *The Impact of Food Bioactives on Health*. 2015, 103-111.
- [141] MARTINEZ-MACQUEDA, D., MIRALLES, B., RECIO, I. HT29 Cell Line. *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer Nature, 2017. 113-124.
- [142] EMTER, R., ELLIS, G., NATSCH, A. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010, 245(3), 281-290.
- [143] Human Epidermal Keratinocytes: HEK. In: *Cell Applications, Inc.*
- [144] IVERSON, S. L., SMITH, D. A. *Metabolite Safety in Drug Development*. John Wiley, 2016.
- [145] SEO, M. D., et al. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. *Biomolecules and Therapeutics*. 2012, 20(2), 171-176.
- [146] THYBAUD, V., et al. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007, 627(1), 41-58.
- [147] EASTMOND, D. A., et al. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis*. 2009, 24(4), 341-349.
- [148] DOAK, S.H., et al. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2012, 745(1-2), 104-111.
- [149] SMITH, K. E. C., et al. The dosing determines mutagenicity of hydrophobic compounds in the Ames II assay with metabolic transformation: Passive dosing versus solvent spiking. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013, 750(1-2), 12-18.
- [150] TEJS, S. The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology*. 2008, 4(1).
- [151] QUILLARDET, P., et al. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 1982, 79(19), 5971-5975.
- [152] ENVIRONMENTAL BIO-DETECTION PRODUCTS, INC. *SOS-ChromoTest: A Users Guide*.
- [153] ROBBENS, J., et al. Escherichia coli as a bioreporter in ecotoxicology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 88(5), 1007-1025.
- [154] AZQUETA, A., DUSINSKA, M. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. *Frontiers in Genetics*. 2015, 239(6).
- [155] VASQUEZ, M. Z. Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2012, 747(1), 142-156.
- [156] FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957, 226(1), 497-509.

- [157] SINGLETON, V. L.; ROSSI, Jr J.A.. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965, 16(3), 144-158.
- [158] CHANG C. Y. M., WEN H., CHERN J.. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 2002; 10(3): 178-182.
- [159] ŠTINDLOVÁ, J. *Možnosti enkapsulace přírodních antioxidantů*. 2012. Diplomová práce. Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně.
- [160] MATOUŠKOVÁ, P. *Využití různých technik enkapsulace k řízenému uvolňování aktivních látek v potravinářských a kosmetických přípravcích*. 2015. Dizertační práce. Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně.
- [161] HAGERMAN, A. E., BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1978, 26(4), 809-812.
- [162] RE, R., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, 26(9-10): 1231-1237.
- [163] Denkaş, E. B., Odabaşı M. Chitosan microspheres and sponges: preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*. 2000, 76:1637-43.
- [164] ABREU, A. S., et al. Nanoliposomes for encapsulation and delivery of the potential antitumoral methyl 6-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-1H-indole-2-carboxylate. *Nanoscale Research Letters*. 2011, 6(1), 482.
- [165] ČESKÁ REPUBLIKA. Vyhláška č. 38/2001 Sb.: Vyhláška Ministerstva zdravotnictví o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy. 2001.
- [166] WIEGAND, I., HILPERT, K., HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008, 3, 163-175.
- [167] SWENSON, J. M., et al. Development of a Standardized Screening Method for Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994, 32(7), 1700-1704.
- [168] HEIN, R., UZUNDAL, C. B., HENNIG, A. Simple and rapid quantification of phospholipids for supramolecular membrane transport assays. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2016, 14(7), 2182-2185.
- [169] OBRUCA, S., et al. Application of protease-hydrolyzed whey as a complex nitrogen source to increase poly(3-hydroxybutyrate) production from oils by *Cupriavidus necator*. *Biotechnology Letters*. 2014, 36(4), 775-781.
- [170] RAPTA, M. *Regulace produkce lipidů a lipidických metabolitů u kvasinek*. 2015. Diplomová práce. Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně.
- [171] LI, X., et al. Hydrophobic tail length, degree of fluorination and headgroup stereochemistry are determinants of the biocompatibility of (fluorinated) carbohydrate surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009, 73(1), 65-74
- [172] DAYEH, V. R., et al. Rainbow Trout Gill Cell Line Microplate Cytotoxicity Test. *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*. 2005, 1, 473-503.

- [173] BROWN, D., et al. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology And Applied Pharmacology*. 2001, 175, 191-199.
- [174] BioRad Laboratories, Inc. BioPlex Cytokine Assay: Instruction Manual.
- [175] KIRIS, T. *Cerebral Vasospasm: New Strategies in Research and Treatment*. Springer, 2008, 199-200. ISBN 321175718X.
- [176] NAZZARO, F., et al. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*. 2017, 10(4), 86-.
- [177] SEPAHPOUR, S., et al. Comparative Analysis of Chemical Composition, Antioxidant Activity and Quantitative Characterization of Some Phenolic Compounds in Selected Herbs and Spices in Different Solvent Extraction Systems. *Molecules*. 2018, 23(402), 2-17.
- [178] WEISS, D. J., ANDERTON, CH. R. Determination of catechins in matcha green tea by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2003, 1011(1-2), 173-180.
- [179] SHAH, G., et al. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*. 2011, 2(1), 3-8.
- [180] PIZZI, A. Tannins: Major Sources, Properties and Applications. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources [online]. Elsevier, 2008. 179-199. ISBN 9780080453163.
- [181] JOUBERT, E., DE BEER, D. Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical. *South African Journal of Botany*. 2011, 77(4), 869-886.
- [182] GANESHPURKAR, A., SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2017, 25(2), 149-164.
- [183] SATHIYA DEEPIKA, M., et al. Combined effect of a natural flavonoid rutin from *Citrus sinensis* and conventional antibiotic gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Food Control*. 2018, 90, 282-294.
- [184] WU, L., ZHANG, J., WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011, 63(6), 456-469.
- [185] OUERGHEMMI, I., et al. Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2017, 25(2), 350-359.
- [186] COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. MEYERS, R.A. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, 2000, s. 10815–10837.
- [187] DHIFI, W., et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*. 2016, 3(4).
- [188] MADDIX, C. E., LAUR, L. M., TIAN, L. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Against the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*. 2010, 60(1), 53–58.
- [189] MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I.; BOKROVÁ, J.; BENEŠOVÁ, P. Effect of Encapsulation of Antimicrobial Activity of Herbal Extracts with Lysozyme. *Food Technology And Biotechnology*, 2016, 54(3), 304-316.

- [190] MOKRANI, A., MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*. 2016, (162), 68-76.
- [191] RAKHOLIYA, K. D., KANERIA, M. J, CHANDA, S. V. Medicinal Plants as Alternative Sources of Therapeutics against Multidrug-Resistant Pathogenic Microorganisms Based on Their Antimicrobial Potential and Synergistic Properties. *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*. 2013, s. 165-179.
- [192] PIZZI, A. Tannins: Major Sources, Properties and Applications. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. *Elsevier Science*, 2008, 179-199.
- [193] SHARMA, A., et al. Nano-technology for targeted drug delivery to combat antibiotic resistance. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2012, 9(11), 1325-1332.
- [194] YILMAZ, F., CELEP, G., TETIK, G. Nanofibers in Cosmetics. *Nanofiber Research*. 2016. ISBN 978-953-51-2528-0.
- [195] BOZZUTO, G., MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*. 2015, 10, 975-999.
- [196] EDWARDS, K., BAEUMNER, A. Analysis of liposomes. *Talanta*. 2006, 68(5), 1432-1441.
- [197] HSIEH, Y. F., et al. Properties of Liposomes Prepared with Various Lipids. *Food Chemistry and Toxicology*. 2002, 67(8), 2808-2813.
- [198] SERCOMBE, L., et al. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*. 2015, 6(286).
- [199] POTTER, T. M. et al. Analysis of Pro-inflammatory Cytokine and Type II Interferon Induction by Nanoparticles. MCNEIL, Scott E., ed. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. New York, NY: Springer New York, 2018, 173-187. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-7350-7.
- [200] LESTARI, F., A.J. HAYES, A.R. GREEN a B. MARKOVIC. In vitro cytotoxicity of selected chemicals commonly produced during fire combustion using human cell lines. *Toxicology in Vitro*. 2005, 19(5), 653-663.

9 ŽIVOTOPIS A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Jitka Bokrová
Datum narození: 9. 4. 1990
Místo narození: Valtice
Národnost: česká
Trvalé bydliště: 690 02 Břeclav, Fügnerova 2
Telefon: + 420 777 891 156
E-mail: xcbokrova@fch.vutbr.cz

VZDĚLÁNÍ

2005 – 2009 Gymnázium a Jazyková škola s právem státní jazykové zkoušky Břeclav
2009 – 2012 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, bakalářské studium zakončeno státní zkouškou, titul Bc., téma bakalářské práce: „Zdravotní účinky českého piva“
2012 – 2014 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, magisterské studium zakončeno státní zkouškou, titul Ing., téma diplomové práce: „Příprava enkapsulovaných enzymů pro využití v kosmetice“
2014 – Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, doktorské studium

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

2014 – 2018 VUT Brno, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, technicko-hospodářský pracovník
2018 – VUT Brno, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, Junior Researcher

PEDAGOGICKÁ ČINNOST

2016/2017 letní semestr – Laboratoř oboru I
2017/2018 zimní semestr – Praktikum z biochemie

ZAHRANIČNÍ POBYTY

Erasmus⁺ Traineeship

Místo: Heriot Watt University, School of Life Sciences, Edinburgh, UK
Doba: 4. 2. 2016 – 4. 5. 2016

BEST Course: Breaking Good. Designing the Pharmaceuticals of Tomorrow

Místo: The Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark
Doba: 30. 6. 2017 – 9. 7. 2017

PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Časopisy s IF

BOKROVÁ, J.; MÁROVÁ, I.; MATOUŠKOVÁ, P.; PAVELKOVÁ, R.; CONOLLY, M.; BROWN, D.; BOYLES, M.; STONE, V. Design and Potent Cytotoxic Effect of Novel PHB-liposome Nanoparticles. *Toxicology Research - v recenzním řízení*.

MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I.; **BOKROVÁ, J.**; BENEŠOVÁ, P. Effect of Encapsulation of Antimicrobial Activity of Herbal Extracts with Lysozyme. *FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 2016, roč. 54, č. 3, s. 304-316. ISSN: 1330-9862.

Sborníky s plným uvedením textu

BOKROVÁ, J.; MATOUŠKOVÁ, P.; TILŠAROVÁ, K.; MÁROVÁ, I. *Preparation and Characterization of Liposomes as Cosmetic Delivery Systems*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. s. 144-148.

MATOUŠKOVÁ, P.; HAZUCHOVÁ, E.; **BOKROVÁ, J.**; BENEŠOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Production of hydrolytic enzymes and improvement of enzyme activity and stability using encapsulation techniques. In *Proceedings of the 4th International Conference on Chemical Technology*. 1. Prague: Ocean Design, 2016. s. 452-456. ISBN: 978-80-86238-94-4.

MATOUŠKOVÁ, P.; VRTNÁ, M.; ŠNAJDAROVÁ, K.; **BOKROVÁ, J.**; MÁROVÁ, I. *The effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on the viability of probiotic bacteria*. Ostrava: TANGER Ltd., 2016. s. 120-121. ISBN: 978-80-87294-68-0

BOKROVÁ, J.; MATOUŠKOVÁ, P.; PAVELKOVÁ, R.; MÁROVÁ, I. Preparation and Stability of Liposome Particles with Encapsulated Natural UV Filters. *Czech Chemical Society Symposium Series*, 2015, roč. 13, č. 2, s. 53-55. ISSN: 2336-7210.

Mezinárodní konference

BOKROVÁ, J.; RUČKOVÁ, M.; MATOUŠKOVÁ, P.; PAVELKOVÁ, R.; HOOVÁ, J.; MÁROVÁ, I. *Cytotoxic and Genotoxic Effects of Liposome Particles with Encapsulated Natural Extracts*. NANOCON Book of Abstracts. Ostrava: TANGER Ltd., 2017. s. 146-146. ISBN: 978-80-87294-78-9.

BOKROVÁ, J.; MATOUŠKOVÁ, P.; HOOVÁ, J.; POKORNÁ, M.; MÁROVÁ, I. *Influence of Food Matrices on Probiotic Bacteria Viability*. Recent Advances in Food Analysis Book of Abstracts. Praha: 2017. s. 340-340. ISBN: 978-80-7080-999-0.

BOKROVÁ, J.; MATOUŠKOVÁ, P.; SOSKOVÁ, S.; PLACHÁ, M.; HOOVÁ, J.; PAVELKOVÁ, R.; VYSOKÁ, M.; MÁROVÁ, I. *Candida glabrata - a Model Organism for Studying Antifungal Activity of Plant Extracts*. 44th Annual Conference on Yeast Book of Abstracts. 34th Annual Conference on Yeasts, Book of abstracts. 2017. s. 50 (s.)ISSN: 1336-4839.

MATOUŠKOVÁ, P.; **BOKROVÁ, J.**; BENDOVIÁ, A.; SOSKOVÁ, S.; VYSOKÁ, M.; MÁROVÁ, I. *Antimicrobial Activity of Liposomes with Encapsulated Active Components from Plant Extracts*. Ostrava: TANGER Ltd., 2017. s. 137-137.

MATOUŠKOVÁ, P.; **BOKROVÁ, J.**; PAVELKOVÁ, R.; VYSOKÁ, M.; MÁROVÁ, I. *Organic particles as delivery systems for complex source of antimicrobial and antioxidant component for food applications*. Praha: 2017. s. 267-267.

PAVELKOVÁ, R.; MÁROVÁ, I.; MATOUŠKOVÁ, P.; **BOKROVÁ, J.**; SOSKOVÁ, S.; PLACHÁ, M. *Using Candida glabrata for screening antifungal activity of plant extracts*. 45th Annual conference on yeast. 34th Annual Conference on Yeasts, Book of abstracts. 2018. s. 57-57. ISSN: 1336-4839.

BOKROVÁ, J.; MATOUŠKOVÁ, P.; VEJROSTOVÁ, P.; TILŠAROVÁ, K.; MÁROVÁ, I. *Safety Assessment of Nanoparticles with Antioxidant Properties*. NANOCON 2016, LIST OF ABSTRACTS. Ostrava: TANGER Ltd., 2016. s. 129 (s.)ISBN: 978-80-87294-68- 0.

MATOUŠKOVÁ, P.; HAZUCHOVÁ, E.; **BOKROVÁ, J.**; BENEŠOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Production of hydrolytic enzymes and improvement of enzyme activity and stability using encapsulation techniques*. 4th International Conference on Chemical Technology ICCT 2016 Sborník příspěvků. Mikulov: 2016. ISBN: 978-80-86238-91- 3.

MATOUŠKOVÁ, P.; HOOVÁ, J.; **BOKROVÁ, J.**; BENEŠOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Liposomes as delivery systems for complex source of caffeine and vitamins for food and cosmetic applications*. 7th International Conference NANOCON 2015 - Conference Proceedings. Ostrava: TANGER Ltd., 2015. s. 111-112. ISBN: 978-80-87294-59- 8.

BOKROVÁ, J.; MATOUŠKOVÁ, P.; PAVELKOVÁ, R.; MÁROVÁ, I. *Preparation and Stability of Liposome Particles with Encapsulated Natural UV Filters*. Book of Abstracts. Brno: 2015. s. 35-35. ISBN: 978-80-214-5228- 2.

BOKROVÁ, J.; MATOUŠKOVÁ, P.; PAVELKOVÁ, R.; MÁROVÁ, I. *Preparation and Stability of Cosmetic Emulsions Enriched by Liposome Particles with Natural UV Filters*. NANOCON 2015 Proceedings of abstracts. Ostrava: Tanger Ltd., 2015. s. 99 (s.)ISBN: 978-80-87294-59- 8.

MÁROVÁ, I.; MATOUŠKOVÁ, P.; BYRTUSOVÁ, D.; PATOČKOVÁ, K.; **BOKROVÁ, J.**; HURTOVÁ, J.; BENEŠOVÁ, P. *Preparation and stability of organic core-shell particles with encapsulated complex natural sources of phenolics, caffeine and vitamins*. NANOCON 2014. Conference Proceedings. Ostrava. TANGER Ltd., 2014. s. 131-131. ISBN: 978-80-87294-55-0